

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**  
**EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KAR**  
**EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

**Doktori Iskola vezetője:**

Prof. Dr. Bódis József, egyetemi tanár

**Programvezető:**

Prof. Dr. Kovács L. Gábor, egyetemi tanár

**Témavezetők:**

Prof. Dr. Figler Mária

Dr. Ábrahám Hajnalka

**A kokain- és amfetamin regulált transzkript peptid expressziójának  
életkorfüggő változásai patkányok táplálékfelvételét szabályozó agyi  
régióiban**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Armbruszt Simon



**Pécs, 2014**

## Tartalomjegyzék

Bevezetés-----	3
A testtömeg-szabályozás anatómiai modellje-----	4
A CART peptid-----	8
Életkorfüggő változások a központi idegrendszer területén az orexigén és anorexigén peptidek vonatkozásában -----	11
Az Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty patkány-----	13
Célkitűzések -----	17
Anyag és módszer -----	18
Kísérleti állatok -----	18
Orális glükóz tolerancia teszt -----	19
Immunhisztokémia -----	19
CART peptid immunreaktivitás intenzitásának kvantifikálása-----	20
Statisztika -----	21
Eredmények-----	22
Fiatal LETO és OLETF patkányok vizsgálata-----	22
Fiatal és idős Long-Evans patkányok vizsgálata -----	32
Eredmények megbeszélése -----	39
Összefoglalás -----	49
Irodalmi hivatkozások jegyzéke -----	50
Publikációk jegyzéke -----	71
Köszönetnyilvánítás -----	77
Mellékletek -----	78
1. Rövidítések jegyzéke-----	78
2. Ábrák és táblázatok jegyzéke -----	81

## Bevezetés

Az elhízás incidenciája folyamatosan növekszik világszerte, a legnagyobb egészségügyi szervezetek az elhízást egyértelműen idült betegségnek tartják (World Health Organization, 2000). A túlsúly kialakulásának mechanizmusa a tudományos érdeklődés egyik fókuszpontjában van. Az esetek többségében a szükséglet meghaladó energiafelvétel áll a háttérben, amely az energia-egyensúly megbomlását idézi elő. A hipokalóriás (energiaszükséglet alatti) diéta minden esetben testtömegcsökkenésre vezet, ám a megvalósítása a gyakorlatban sokszor nem hatásos.

Az epidemiológiai vizsgálatok adatai alapján a testsúly kb. 45-55 éves korig fokozatosan növekszik, majd ezután 70-75 éves korig inkább stagnál, ezt követően pedig minden kóros ok, vagy egyéni szándék nélkül is csökkenni kezd. 20 és 70 éves kor között - még közel állandó testtömeg mellett is - az emberi test összetétele jelentősen megváltozik: a zsírtartalom gyarapodik, elsősorban a vázizomzat rovására. Hasonló változást figyeltek meg rágcsálóknál is (Kaneda és mtsai., 2001; Kappeler és mtsai, 2003) Az életkorfüggő testösszetétel változások jelentős morbiditást és mortalitást növelő tényezők, az elhízás mértékével például exponenciálisan nő a mortalitás: túlsúly esetén a halálozás mintegy kétszeres, míg súlyos obesitas már több mint tízszeresére növeli a kockázatot (Carmienke és mtsai, 2013; Fan és mtsai., 2013).

Az elhízás állapotát többen az alkoholizmushoz, illetve a drogfüggőséghez hasonlítják a központi idegrendszerbeli elváltozások hasonlósága miatt (Vicentic és Jones, 2006; Hubert és mtsai., 2008; Kenny, 2011; DiLeone és mtsai., 2012). Mind ez idáig nem került bevezetésre hatékony farmakoterápia az elhízás ellen, a kutatási trendek alapján a jövő gyógyszerei az agy jutalmazó rendszerén keresztül ható anyagok lehetnek (Hunter és Kuhar, 2003; Bays, 2004; Vicentic és Jones, 2006). Az energiaháztartás központi idegrendszeri szabályozása az idegsejtek által termelt, és idegsejtekre ható neuropeptidek révén valósul meg, a szabályozás molekuláris szintű mechanizmusa azonban még nem teljesskörűen ismert.

## A testtömeg-szabályozás anatómiai modellje

Az energiaháztartást az alapanyagcsere, a mozgás és az energiabevitel egyensúlya szabályozza. A szabályozásnak humorális és idegi elemei vannak, az adatok feldolgozása a központi idegrendszerben cortico-limbicus, hypothalamicus és agytörzsi szinteken történik. A tápanyagbevitelből származó humorális információ intestinalis peptidek („brain-gut” peptidek, pl. ghrelin, glukagon-like peptid-1, kolecisztokinin, YY peptid) révén, illetve az egyes tápanyagokból származó molekulák (pl. glükóz, szabad zsírsavak, aminosavak) útján szabályozza elsősorban hypothalamicus magokban található neuronok aktivitását (Juhász és mtsai., 2007). A hypothalamicus neuronok trofikus hatású hormonokon keresztül hatnak a metabolikus rátára (Murphy és mtsai., 2006). Emellett a hypothalamus subcorticalis és corticalis kapcsolatain keresztül összeköttetésben van az agytörzszel és a mesolimbicus-dopaminerg rendszerrel (Williams és Elmquist, 2012; Zeltser és mtsai., 2012).

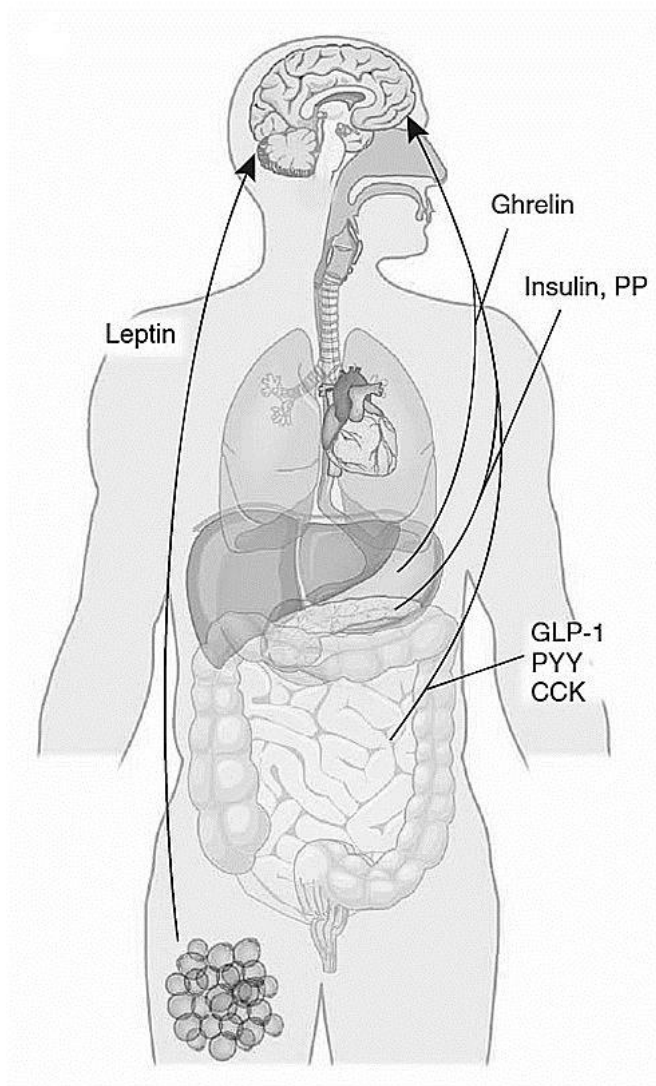
Egy faj túlélése egyedeinek szaporodási és tápanyag-felvételi folyamatainak eredményességétől függ. Nem meglepő tehát, hogy e folyamatok molekuláris szabályozása közeli kapcsolatban áll egymással. A megfelelő energiaállapotot a hypothalamus nucleus arcuatus-a (ARC) és ventromedialis magja (VMH) monitorozza, amelyek a metabolikus kontroll központjai, ugyanis a bennük levő idegsejtek glükózérzékenyek, az ARC területén leptinreceptort és inzulinreceptort expresszálnak (Chun-Xia és mtsai., 2011). Az ARC idegsejtjei anorexigén (táplálékfelvételt csökkentő) molekulákat (pl. pro-opiomelanocortin - POMC, kokain-amfetamin regulált transzkript - CART) és orexigén (táplálékfelvételt fokozó) peptideket (pl. agouti-related peptid - AgRP, neuropeptid Y - NPY) termelnek. A POMC poszttranszlációs feldolgozását követően számos, biológiailag aktív fehérje keletkezik, többek között különböző melanocytá stimuláló hormonok (MSH), amelyek a melanokortin receptorain (MC3R, MC4R) keresztül hatnak. Az AgRP-t expresszáló idegsejtek gátolják a POMC-neuronokat gamma-amino-vajsav (GABA) termelésén keresztül, s egyidejűleg NPY-t is termelnek, ezáltal számottevően fokozva a táplálékfelvételt. A hypothalamus sejtjei a zsírszövetből, a bélből, a

hasnyálmirigyből, a vérből és neuropeptidekből származó információk alapján lépnek működésbe (Anubhuti, 2006; Yeo és Heisler, 2012; Ellacott és mtsai., 2006; Williams és Elmquist, 2012; Zeltser és mtsai., 2012).

Az energiaraktárak állapota és az adipocyták száma szoros összefüggésben van, tehát a zsírtömeg méretével arányos mennyiségben termelődő adipositas szignál szolgáltat afferens jelet a központi idegrendszer számára. A leptin, ami az *ob* (obesitas kifejezés után) elnevezésű gén terméke, a vér-agy gáton átjutva az ARC-ban anorexigén peptidek expresszióját fokozza, egyidejűleg orexigén szignálok (pl. NPY) csökkenését idézi elő, hasonlóan az inzulin központi idegrendszeri hatásához. Emellett a zsírsejtekben az interleukin-6, -8, 10, tumor nekrozis faktor alfa (TNF $\alpha$ ) és adiponectin expresszió is fokozódik. A VMH az energiaellátottság mellett a szaporodási funkciók (pl. szexuális magatartás, gonadotropin kiválasztása) szabályozásában is részt vesz (Zhang és mtsai., 1994, 1997; Canello és mtsai., 2004).

A homeosztázis érdekében az alul- és túltápláltság szabályozásának is kialakultak a mechanizmusai. Az éhezés – legyen az akár csak egy átmeneti, negatív energia-egyensúlyi állapot – lényegesen hatékonyabb motivációs jel útján jelzi az idegrendszer számára a szervezetre irányuló veszélyt, mint a túltápláltság.

A gasztrointesztinális traktusból az éhség- és jóllakottság érzést kiváltó szignálok útján - az ízérzékelés viscerális jelével együtt – az agytörzsi nucleus tractus solitarii-be (NTS), illetve a hypothalamus-ba jut az ingerület (Grill és Hayes, 2009). Ebben a folyamatban vesz részt többek között a ghrelin, a YY peptid (PYY), a pancreas polipeptid (PP-fold) peptidcsalád, a glukagon-like peptid-1 (GLP-1), az oxyntmodulin (OXM), és a cholecystokinin (CCK) (1. ábra). E gyomor-bélrendszeri peptidek közül a ghrelin az egyetlen orexigén hatású, amit a gyomor- és a bélnyálkahártya sejtek termelnek. A CCK a nervus vagus révén, de a vér-agy gáton átjutva közvetlenül (pl. a gyomor feszülés tudatosulása révén) is fokozza a jóllakottságérzést. A gasztrointesztinális peptidek hatása rövid ideig tart és számos kompenzáló mechanizmus képes csökkenteni a peptidek termelődését (Cummings és mtsai., 2001; Toshinai és mtsai., 2003; Fan és mtsai., 2004; De Lartigue és mtsai., 2012).

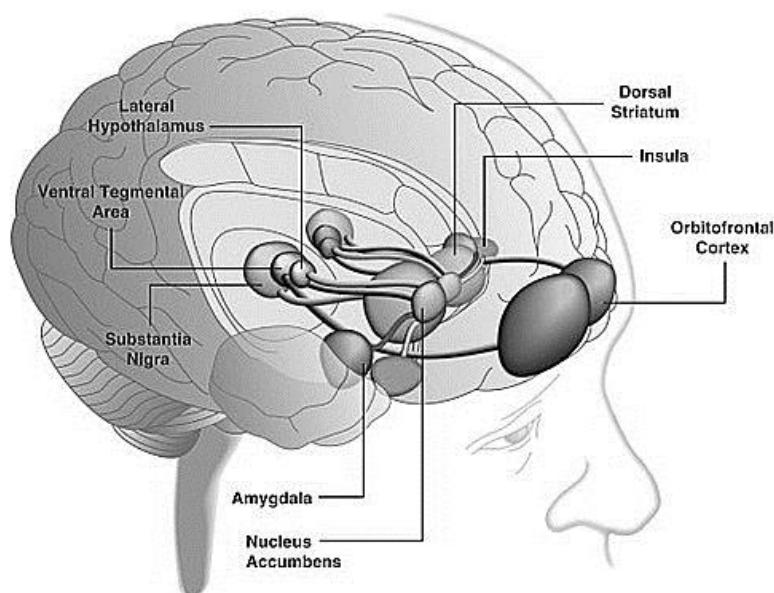


**1. ábra - Afferens perifériás ingerek a táplálékfelvétel szabályozásban (Corral, 2012)**

A központi idegrendszerben a hypothalamicus és az agytörzsi magok a táplálékfelvétel és az energiaegyensúly afferens jeleit fogadják és dolgozzák fel. Egyúttal továbbítják azokat az integrálásért felelős thalamus felé, az érzelmi reakciókért, az ösztönös viselkedésért és memóriafolyamatokért felelős agyi régiók és a jutalmazási rendszer agyi magjai felé. Ezeket a funkciókat a limbicus rendszerhez tartozó területek látják el. Az ingerület legvégül a nagyagykéregbe, azaz a tudatosulás „központjába” érkezik. Mindezek a központi idegrendszeri területek az efferens – akaratlagos motoros és az autonóm visceralis – válaszok elindításában és összehangolásában is részt vesznek (Saper és mtsai., 2002).

Az elhízásnak és a függőségeknek számos közös molekuláris jellemzője van. Egyik fontos jellemző, hogy szinte teljesen megegyező pályákon keresztül fejtik ki hatásukat a drogok és elsősorban a nagy zsírtartalmú és/vagy ízletesnek tartott ételek (2. ábra). Az ételek hedonikus fogyasztása megnövekedett tápanyagfelvételhez vezet, s ennek neuroadaptív megvalósulása általános sémát követ. A hypothalamicus és agytörzsi, homeosztaticus energia-egyensúlyi központok mellett ezáltal, a jutalmazási központ is kulcsszerepet játszhat a táplálkozási magatartás kialakításában (Kelley, 2004, 2005; Yamamoto és mtsai., 2006).

A jutalmazási-rendszer központjának a nucleus accumbens (NACC) tekinthető, amely egy köpeny (shell) és egy mag (core) zónára bontható. Az ízérzékelés és a posztingesztív szignálok a NACC sejtjeiben dopamin felszabadulást fokozó hatásúak, míg a hypothalamicus anorexigén szignálok a NACC sejtjeinek fokozott acetil-kolin termelését idézik elő. A dopamin neurotranszmisszió „motivációfokozó” hatású, míg az „élvezet” inkább az ópiát, a GABA és az endokannabinoid jelátvitelhez köthető (Upadhaya és mtsai., 2012). Jelenlegi ismereteink számos ellentmondáshoz vezettek a jutalmazási-rendszer működése kapcsán. Elhízottakban például sérül a dopamin jelátvitel (elsősorban a D2 receptorokon keresztül), mégis többet esznek (Kenny, 2011).



**2. ábra - Az emberi agyban aktíválódnak területek ízletes étel fogyasztása során, vagy azzal összefüggésbe hozható egyéb szenzoros ingerek hatására (Kenny, 2012)**

## **A CART peptid**

A jutalom-érzet működésében kiemelt szerepet tulajdonítanak a kokain-amfetamin regulált transzkript (CART) peptidnek. A CART mRNS-t, kokain, ill. amfetamin adását követően patkány striatumában mutatták ki (Douglass és Daoud, 1995), később kiderült, hogy mind az mRNS, mind pedig fehérje terméke, nagy mennyiségben jelen van számos központi- és környéki idegrendszeri struktúrában pszichostimuláns kezelés nélkül is (Koylu és mtsai., 1997, 1998). A CART peptid kontroll állatokban a táplálékfelvétel szabályozás, jutalmazás és visceralis szenzoros, illetve homeosztatisz szabályozásért felelős agyi központokban mutatható ki nagyobb mennyiségben (Douglass és Daoud, 1996; Koylu és mtsai., 1997, 1998; Seress és mtsai., 2004). Humán- és transzgénikus állatkísérletek alapján a CART gén mutációja evési zavarokhoz és/vagy obesitáshoz vezethet (Del Giudice és mtsai., 2001; Guerardel és mtsai., 2005; Boone és mtsai., 2008).

A CART gén, szekvencia analízis vizsgálatok alapján, erősen konzervált szerkezetű a különböző fajokban. Emberben az 5. kromoszómán található gén produktuma alternatív splicing útján kisebb peptid fragmentumok formájában lehet jelen, amelyeknek feltehetően neurotranszmitter és ko-transzmitter funkcióik vannak (Douglass és Daoud, 1995; Koylu és mtsai., 1997; Adams és mtsai., 1999; Kuhar és mtsai., 1999). Patkányban a polipeptidet az 5. kromoszómán három exonból és a köztük lévő két intronból álló szakasz kódolja, ami által két eltérő transzkriptum jöhet létre. Az ún. pre-CART peptid 116, illetve 129 aminosav hosszúságú, de érési folyamatok során egy 27 aminosav hosszúságú leader-szekvencia levágódik az éretlen fehérjékről és végül 89, vagy 102 aminosav hosszúságú érett, ám biológiailag inaktív peptid jön létre. Emberben csak a rövidebb változat létezik, de a kódoló régió nukleotid sorrendje 90%-ot meghaladó mértékben azonos a rágcsáló gén szekvenciájával, a biológiailag aktív peptid fragmentum pedig szinte minden szekvenálásra használt faj esetében közel azonos. Mivel a gén promóter régiója számos transzkripció faktor számára tartalmaz kötőhelyet (pl. CREB, Fos, Jun), továbbá magát az érett peptidet is különböző kalcium-függő szerin-proteázok aktiválják, feltételezhető, hogy nagyon szerteágazó hatásmechanizmus révén vesz



részt az idegéletani folyamatokban (Lakatos és mtsai., 2005; Kozsurek, 2009). Hasítások révén különböző fragmentumok képződnek, melyek szöveti megoszlása mutat némi differenciát (Douglass és Daoud, 1996; Adams és mtsai.; 1999; Thim és mtsai., 1999; Kuhar és mtsai., 2000, 2002; Dominguez és mtsai., 2002, 2006; Lakatos és mtsai., 2002; Dey és mtsai., 2003; Dylag és mtsai., 2006).

A CART peptid nagy mennyiségben expresszálódik a központi idegrendszer azon területein, melyek a memóriafolyamatokért, stressz reakciókért felelősek. Emellett nagy mennyiségben jelen van olyan magvakban, amelyek a jutalmazási reakciókat, valamint a táplálékfelvételt szabályozzák. Ezek közé tartozik a limbicus rendszer, a hypothalamus, egyes amygdala magvak, a stria terminalis, az Edinger-Westphal mag, a NACC, a NTS (Douglass és Daoud, 1996; Koylu és mtsai., 1997, 1998; Kozicz, 2003; Seress és mtsai., 2004; Rogge és mtsai., 2008; Xu és mtsai., 2010). A hypothalamus-ban pl. a CART a harmadik leggyakoribb mRNS. A CART peptid bizonyítottan csökkenti a táplálékfelvételt, de a hatásmechanizmus, illetve az obesitasra és a diabetesre kifejtett hatása részben felderítetlen. A CART peptid egyben a Langerhans-szigetek hormon szekréciójának regulátora is, és a  $\beta$ -sejtekben fokozottan termelődik 2-es típusú diabetes mellitus-os patkányokban (Wierup és mtsai., 2006). CART knock out egerekben csökkent 2-es típusú glükóz transzporter (GLUT-2) immunreaktivitás, inzulin szekréció és glükóz elimináció mutatható ki és változatlan táplálékbevitel mellett is megnövekszik a testtömeg. Ezekben az állatokban a  $\beta$ -sejtek diszfunkciója életkorfüggő elváltozásokat mutatott (Wierup és mtsai., 2005).

A CART peptid expresszió szorosan összefügg más fontos táplálékfelvétel szabályozó utakkal, mint pl. a NPY vagy leptin szignalizáció. *In vitro* adott NPY a CART peptid expresszió emelkedését idézte elő dózisfüggő mértékben (Dhillon és mtsai., 2002), emellett a CART peptid centrális adása csökkentette a táplálékfelvételt NPY stimulált patkányoknak (Kristensen és mtsai., 1998). Ezen interakció hátterében állhatnak azon NPY-immunreaktív axon terminálisok, amelyek CART peptid-immunreaktív perikaryonokon végződnek a dorsomedialis hypothalamicus magban (DMH) és az ARC-ban (Broberger és mtsai., 1999). Azon állatmodellekben, ahol a

leptin szignalizáció hiányzik, a CART expresszió csökkent mértékű az ARC-ban (Kristensen és mtsai., 1998; Broberger és mtsai., 1999). Perifériás vagy intranasalis leptin adása obes patkányokban növeli a CART expressziót az ARC-ban és más hypothalamicus magokban, a DMH-t is beleértve (Kristensen és mtsai., 1998; Schulz és mtsai., 2012). Mindezen eredmények kissé ellentmondásosak, utalhatnak akár egy megváltozott bazális CART expresszióra elhízásban, de mindenképpen jelentős NPY-CART-leptin összefüggést jeleznek (Hommel és mtsai., 2006; Huo és mtsai., 2007; Leshan és mtsai., 2010).

## **Életkorfüggő változások a központi idegrendszer területén az orexigén és anorexigén peptidek vonatkozásában**

A táplálékfelvétel és a testtömeg gyarapodás precízen szabályozott mechanizmusok eredménye, amelyek életkorfüggő változásokat mutatnak. Fiatal egyedek pozitív energia-egyensúlya az anabolikus folyamatok dominanciáját segíti, de a kor előrehaladtával a katabolikus folyamatok válnak predominánssá. Középkorú rágcsálónál elhízást figyeltek meg, míg idősök esetében táplálékfelvétel és következetes testtömeg csökkenés anorexiás állapothoz vezethet (Blanton és mtsai., 1998, 2001; Petervari és mtsai., 2009, 2010, 2011). A táplálékfelvétel csökkenése multifaktoriális, melyben perifériás és centrális mechanizmusok is szerepet játszanak, többek közt a központi idegrendszeri neuronok által termelt fehérje, illetve polipeptid mediátorok által. Számos neuropeptid esetében figyeltek meg a különböző korcsoportokban változásokat mind a peptid expresszióját, mind hatását tekintve, amelyek a megváltozott táplálékfelvétel és metabolikus ráta hátterében állhatnak (Scarpace és mtsai., 2000; Teter, 2009).

Az életkor előrehaladtával a CCK iránti szenzitivitás, és ezáltal a peptid anorexiás hatásának csökkenését írták le, konzekvens peptid vérplazmaszint növekedésekkel kísérve (Balasko és mtsai., 2012, 2013). Egy másik életkorfüggő hatást mutató anorexigén neuropeptid az alfa-melanocyta-stimuláló hormon (alpha-MSH). Intracerebroventricularisan injektálva az állatokba, erősen lecsökkentette fiatal felnőttkorú állatok táplálékfelvételét. Ezzel szemben az alpha-MSH anorexigén hatása középkorú patkányokban csökkent, majd idős patkányokban ismét nagyon hatékonyá vált (Petervari és mtsai., 2009, 2010). Az orexigén peptidek közül idős korban az AgRP és a NPY gének expressziója a hypothalamicus ARC magban csökkent, míg nagyon idős állatokban megnövekedett az AgRP szenzitivitás a peptid intracerebroventricularis adását követően (Wolden-Hanson és mtsai., 2004). Ugyanakkor, a NPY-nak erősebb táplálékfelvétel fokozó hatása van fiatal patkányokban, mint idősebbekben (Quian és mtsai., 1988; Scarpace és mtsai., 2000; Blanton és mtsai., 2001; Akimoto-Takano és mtsai., 2005).

Az anorexigén hatású CART peptid és a NPY között kölcsönös interakció van. Intracerebroventricularis adását követően a CART peptid csökkenti a táplálékfelvételt, egyúttal gátolja a NPY indukálta orexigén hatást (Lambert és mtsai., 1998; Volkoff és Peter, 2000). *In situ* hibridizációs vizsgálatok alapján, az ARC-ban a CART mRNS és a NPY mRNS expressziója ellentétesen változik (Wolden-Hanson és mtsai., 2004). Idős állatokban a NACC területén is megfigyelhető a NPY expresszió csökkenése azáltal, hogy csökken a NPY-immunreaktív neuronok száma (Pereira és mtsai., 2013). A CART anorexigén hatásának megfelelően a peptid a NACC köpeny zónájába injektálva gátolja a táplálékfelvételt (Hunter és mtsai., 2004; Yang és mtsai., 2005). Fontos tény, hogy az exogén CART adásától függetlenül is nagy számú CART-immunreaktív idegrost és axon terminális található meg a NACC-ben (Koylu és mtsai., 1998). Ezen túlmenően a CART expresszió a NACC-ben a táplálékbeviteltől függően változik: éhezés hatására csökken a CART mRNS expressziója, ugyanakkor a CART peptid immunreaktivitása CCK-1 receptor deficiens, hiperfágiás, diabeteses és obes patkányokban csökkent (Yang és mtsai., 2005; Abraham és mtsai., 2009; Subhedar és mtsai., 2011).

Mágneses rezonancia vizsgálatok (MRI) alapján, az öregedés élettani folyamata során számos agyi struktúra méretnövekedése figyelhető meg. Ezen változások között a NACC mutatja a legnagyobb százalékos életkorfüggő különbséget és negatív korrelációban áll a korrallal (Jernigan és mtsai., 2001; Walhovd és mtsai., 2011; Long és mtsai., 2012). Az időseknél megfigyelhető térfogat csökkenéssel szemben a NACC, MRI vizsgálatok során, nagyobb volt elhízott emberekben (Orsi és mtsai., 2011).

## **Az Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty patkány**

Az elhízás többek között olyan betegségekkel társul, mint a diabetes, a szív- és érrendszeri betegségek, légzési elégtelenség, izomgyengeség. Az emberben gyakori kórkép patomechanizmusának megértéséhez esszenciálisak a megfelelő állatmodellek. Az elhízásnak számos rágcsló és főemlős modellje létezik, melyeket öt csoportba lehet sorolni: a) spontán modellek, amelyekben a betegség vagy állapot spontán fordul elő, b) kísérletesen, vagy c) genetikai manipuláció által előidézett elváltozás, d) negatív modell, amely ellenálló valamely állapottal vagy betegséggel szemben és e) ún. árva modellek olyan betegségekkel, melyeknek nem ismert humán megfelelője (Kanasaki és Koya, 2011; Panchal és Brown, 2011).

A legtöbb genetikai modellben egereket használnak, de spontán mutáció során patkányban is kialakulhatnak obes állattípusok. Ilyen az Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) patkány, melyben hiányzik a funkcionális CCK-1 receptor egy spontán deléción miatt, amely a CCK-1 receptor génjében következett be (Takiguchi és mtsai., 1997; Yamada és mtsai., 2012). A CCK egy intestinalis neuropeptid, amely jóllakottság érzést vált ki és elsősorban CCK-1 receptoron keresztül hat. Mind a nagyobb molekulájú CCK-variáns, mind pedig a CCK-oktapeptid a keringésbe jutva csökkenti a felvett táplálék mennyiségét; ez az anorexigén hatás főként CCK-1 receptorokon keresztül valósul meg. Ez a jel az OLETF állatokban a mutáció miatt megszűnik. Emiatt az OLETF patkányok nem tudják kontrollálni az elfogyasztott ételadagok nagyságát és a kialakuló hiperfágia miatt elhíznak, továbbá 3 hónapos korra következetesen kialakul náluk a 2-es típusú diabetes mellitus, jól meghatározható és hosszú prediabetikus szakasszal (Kawano és mtsai., 1992; Moran, 2000, 2008). A CCK anorexiás hatása részben az afferens vagus rostok végződéseit ingerelve, részben pedig közvetlenül az agy kemoszenzitív neuronjain keresztül jön létre. OLETF patkányokban nem változik a gyomorürülés, de csökken a gyomor feszülés hatására kiváltott vagovagalis reflexválasz (Hajnal és mtsai., 2005, 2007).

Jóllehet az OLETF patkányokban a hyperglükemia és a 2-es típusú diabetes mellitus csak a 18 hetes kor után alakul ki, az állatok táplálékfogyasztása kezdetektől eltér a kontrollként használt normál testtömegű Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) állatokétól (Schroeder és mtsai., 2007). Az OLETF patkányok születés után több tejet fogyasztanak, mint LETO társaik, ennek ellenére az OLETF patkányok testtömege az első hat hétben hasonlóan alakul, mint a LETO patkányoké (Schroeder és mtsai., 2007). A 8. héten azonban már az OLETF patkányok 10%-kal nagyobb testtömeggel rendelkeznek, mint a LETO kontrollok, és ez a különbség a 20. hétre 30-40%-ra növekszik (Kawano és mtsai., 1994; Hajnal és mtsai., 2005; Moran, 2008). A prediabetikus szakaszra megnövekedett orális cukor érzékenység és a glükózzal, szacharinnal, fruktózzal, alaninnal és nátrium-glutamáttal (MSG) szemben fokozott ízpreferencia jellemző az OLETF törzsben, mint az azonos korú LETO kontrollokban. Ez arra utal, hogy a prediabetes során fokozott érzékenység alakul ki az édes íz iránt (De Jonghe és mtsai., 2005; Hajnal és mtsai., 2005). OLETF patkányokban cukor oldattal mért operáns viselkedési vizsgálatok során funkcionális kapcsolatot találtak a NACC-ben a szinaptikus dopamin szabályozás, és a dopamin receptor agonistákkal és antagonistákkal szembeni érzékenység között (Anderzhanova és mtsai., 2007; Hajnal és mtsai., 2007).

A CCK-1 receptorok hiánya *ad libitum* táplálás mellett, a DMH-ban és az ARC-ban a központi idegrendszeri orexigén szignalizáció megváltozását idézi elő. Ilyen jellegű változás pl. a hypothalamicus NPY expresszió növekedés (Moran és Bi, 2006; Bi és mtsai., 2007). Az első 10 hétben, amikor az obesitas kialakul az OLETF törzsben, a NPY expresszió az ARC és DMH területén megnövekszik. Felnőtt hím OLETF patkányokban az ARC, míg fiatalabbakban a DMH területén van jelentősebb fokozott NPY termelés (Iida és mtsai., 1998). Az orexigén szignálok mellett az anorexigén jelátvitel is megváltozik, pl. MC4R agonisták kötődése csökken a ventromedialis hypothalamus-ban, a NACC köpeny régiójában és a ventralis tegmentális területen (VTA) (Lindblom és mtsai., 2000). Hasonló életkorfüggő változásokat írtak le a proopiomelanocortin mRNS expresszió vonatkozásában az ARC-ban, mikor a fiatal állatok kezdenek zsírt raktározni (Fan és mtsai., 2004).

Anatómiai és funkcionális bizonyítékai is vannak a CART és a CCK közti interakciónak. Broberger és mtsai. (1999) leírták, hogy a CART peptid kolokalizál a CCK-1 receptorokkal centrális projekciójú vagus afferens neuronokban a NTS területén. Továbbá CART peptid negyedik agykamrába történő injektálását követően erősen lecsökken a szacharóz felvétel, valamint stimulálja a c-Fos expresszióját az NTS-ben, hasonlóan a CCK-ról leírtakhoz. A nervus vagus afferens neuronjainak sejtestjében a CCK fokozza a CART peptid szintézisét és szekrécióját (De Lartigue és mtsai., 2007). Kooperatív hatást írtak le a CART peptid és a CCK között a hypothalamus paraventricularis magjában és a DMH-ban is (Maletinska és mtsai., 2008). A CART peptid és a CCK közötti funkcionális kapcsolat miatt a CART expresszió megváltozik az OLETF patkányokban. Felnőtt (35-40 hetes), obes, diabeteses OLETF patkányokban a CART peptid expresszió szignifikánsan csökkent a NACC rostralis részén, a basolateralis amygdala (BLA) rostralis területén és a NTS rostromedialis részén a LETO kontrollokhoz képest (Abraham és mtsai., 2009). Más, a központi táplálékfelvétel szabályozásban szerepet játszó területeken, mint a ventralis tegmentalis area, a nucleus parabrachialis, az amygdala és hypothalamicus magvak, tendenciózus CART peptid expresszió csökkenés volt megfigyelhető az elhízott, diabeteses OLETF állatokban, de a különbség nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. Annak ellenére, hogy a CART immunreaktivitás csökkenése számos agyterületen megfigyelhető elhízott, diabeteses OLETF állatokban, a kérdés, hogy a CART expresszió változását elsődlegesen a CCK-1 szignalizáció, vagy az obes, diabeteses fenotípus váltja-e ki idősebb korban, nyitott maradt.

Feltételezhető, hogy a CART expresszió a fiatal OLETF egyedekben ugyanolyan mértékben csökkent, mint az idősebb (35-40 hetes), megváltozott metabolikus állapotú, diabeteses patkányokban, és a CART peptid expressziójában megfigyelhető változás a CCK szignalizáció megváltozásának direkt következménye. Elképzelhető viszont az is, hogy a CART peptid expresszió megnövekedett mértékű a fiatal OLETF állatokban az idősebb (35-40 hetes) és a kontrollként használt állatokhoz képest. Ebben az esetben a CART epresszió szabályozása független a CCK jelátvitelétől és a fiatal OLETF patkányokban

megnövekedett CART peptid expresszió a CART korai kompenzatórikus reakciója és a hiperfágiára adott válasz lehet. Ha a CART peptid expresszió a fiatal nem obes OLETF törzsben változatlan, akkor feltételezhetően a CART expresszió nem áll a CCK jelátvitellel direkt kapcsolatban és a korábban megfigyelt (Abraham és mtsai., 2009) CART-immunreaktivitás csökkenés a felnőtt, obes, diabeteses OLETF patkányokban az elhízás, a zsírszövet akkumuláció, vagy a metabolikus változások következménye.

Ennek eldöntése érdekében vizsgáltuk a CART immunreaktivitást a táplálékfelvétel-szabályozásért felelős agyi területeken fiatal (6,5 hetes  $\pm$  1 hét) OLETF patkányokban. Ebben a korban az OLETF patkányok több táplálékot fogyasztanak, mint az azonos korú LETO kontrollok, de még nem alakul ki szignifikáns különbség a testtömegükben, azaz még nem elhízottak és a 2-es típusú diabetes nem alakul ki bennük.



## Célkitűzések

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a CART peptid expressziója több agyi régióban (a NACC rostralis területén, a rostro-medialis NTS-ben, és a basolateralis amygdala-ban) szignifikánsan csökken a kontroll állatokban láthatóhoz képest a CCK-1 receptor deficiens, hiperfágiás, obes és diabateses OLETF patkányokban (Abraham és mtsai, 2009). Ezek alapján felmerült a kérdés, hogy vajon a CCK-1 receptor gén mutációja és a csökkent mértékű CCK-1 receptoron keresztüli szignalizáció közvetlenül befolyásolja-e az anorexigén CART peptid expressziót, vagy a csökkent CART peptid expresszió a hiperfágia, obesitas, vagy a diabetes mellitus által kiváltott anyagcsere változás következménye.

- 1) Vizsgálni kívántuk, hogy a CCK-1 receptor hiánya hogyan befolyásolja a CART peptid expressziót fiatal, még nem elhízott és nem diabateses OLETF állatokban. Ezért a CART peptid immunreakciót a táplálkozás szabályozásért felelős központi idegrendszeri területeken összehasonlítottuk fiatal, nem obes, nem diabateses OLETF és azonos korú kontroll állatokban. Eredményeinket összevetettük az idősebb (35-40 hetes), hiperfág és diabateses OLETF állatokban megfigyelt változásokkal. A longitudinális követés célja az volt, hogy okozati összefüggést keressünk a megváltozott CART szignalizáció és az elhízás kialakulása között.
- 2) Nem ismert, hogy a CART peptid expressziójának változása a NACC területén szerepet játszik-e az időskori anorexia kialakulásában. Ennek érdekében idős, egészséges patkányokban vizsgáltuk a CART peptid immunreaktivitás eloszlását és intenzitásának mértékét a NACC területén. Az eredményeket a fiatal és középkorú, egészséges, hím és nőtény patkányokban kapott eredményekhez hasonlítottuk.

## Anyag és módszer

### Kísérleti állatok

1. CART peptid expressziójának vizsgálata a CCK-1 receptor deficiens patkányokban

Vizsgálataink során fiatal ( $6,5 \pm 1$  hetes) hím OLETF ( $n=3$ ) és azonos korú LETO kontroll ( $n=3$ ) patkányokat használtunk (testtömeg:  $202,5 \pm 74,25$  g). Az állatok a „Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan” ajándékai voltak, és a The Pennsylvania State University Milton Hershey Orvostudományi Központjának állatházában kerültek elhelyezésre. Az állatok 12:12h világos-sötét ciklusban éltek, és *ad libitum* fogyasztottak csapvizet és pelletált patkány-tápot (Teklad 2018). Az állatokat a „National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publications No. 80-2959, 2002) irányelvének, és a 2010/63/EU Európai Unió direktívájának megfelelően kezeltük, a „The Pennsylvania State University Institutional Animal Care and Use Committee” jóváhagyása mellett.

2. A CART peptid expressziójának életkor-függő vizsgálata a NACC-ben

Ehhez a vizsgálathoz fiatal felnőtt hím (4 hónapos,  $324 \pm 20,22$  g) ( $n=4$ ), fiatal felnőtt nőstény (7 hónapos,  $220 \pm 16,01$  g) ( $n=3$ ), középkorú nőstény (15 hónapos,  $232 \pm 9,12$  g) ( $n=3$ ), idős hím (25-32 hónapos,  $426,6 \pm 24,94$  g) ( $n=4$ ), és idős nőstény (26-30 hónapos,  $271,6 \pm 17,44$  g) ( $n=3$ ) Long-Evans patkányokat használtunk, amelyeket a Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium állatházában tartottunk a PTE ÁOK Központi Épületében. A 12:12h világos-sötét ciklusban tartott patkányok *ad libitum* fogyaszthattak csapvizet és pelletált patkány-tápot. A perfúziót megelőzően az elfogyasztott táplálék mennyiségét 1 hónapon keresztül mértük. Az állatokat a „National Institute of Health Guide for the Care and

Use of Laboratory Animals” (NIH Publications No. 80-2959, 2002) irányelvének, és a 2010/63/EU Európai Unió direktívának megfelelően kezeltük, a PTE ÁOK Állatetikai Bizottságának jóváhagyása mellett.

### **Orális glükóz tolerancia teszt**

Az OLETF törzsből származó állatokat elismerten felhasználják a 2-es típusú diabetes mellitus modellezésére és a pre-diabetikus állapot vizsgálatára, ezért orális glükóz tolerancia tesztet (OGTT) végeztünk a vizsgálni kívánt egyedeken az anyagcsere-zavar meglétének igazolása céljából. Mivel a CART peptid expresszió összefüggésbe hozható a stresszválasszal is (Gozen és mtsai., 2007; Hunter és mtsai., 2007; Xu és mtsai., 2010), a vérvétel okozta stresszhatás elkerülése végett az OGTT-t egy párhuzamos vizsgálatban végeztük el, a jelen vizsgálatban használt állatokkal azonos korú és nemű egyedek körében az alábbi módon: 16 órás éheztetést követően egy vércukorszint mérés és 2 g/kg-os glükóz terhelés következett gyomorszondán keresztül, majd ezt követően 30, 60, 90 és 120 perces vércukorszint mérés történt standard glucometer segítségével (LifeScan, One-Touch Basic). Azon állatok számítottak diabetikusnak, melyeknek a plazmából mért glükóz csúcserőke elérte a 300 mg/dl vagy 16,66 mmol/l-t, és a 120 perces érték meghaladta a 200 mg/dl vagy 11,11 mmol/l értéket (Kawano és mtsai., 1992).

### **Immunhisztokémia**

Mivel a CART peptid szintje a plazmában és az agyszövetekben diurnális változásokat mutat (Vicentic et al., 2004), az állatokat - anesztéziát követően - mindig délután ugyanabban az időben (14 és 16h között) perfundáltuk. A transzkardiális perfúziót rövid ideig 0,1 M foszfát-puffer (PB, pH 7,4) oldattal, majd 4%-os paraform-aldehiddel végeztük el. Az agyat eltávolítottuk a koponyából, majd utófixáltuk 4 °C-on, egy éjszakán át a perfúzióhoz használt fixálószerrel. A fixálás után a mintákból vibratom segítségével 60 µm-es metszeteket készítettünk immunhisztokémiai eljárás céljára. A foszfát-pufferral történő 3x10 perces mosást

követően a metszeteket 1%-os hidrogén-peroxid oldattal kezeltük 30 percig az endogén peroxidáz aktivitás blokkolásának céljából, majd a metszeteket 1 órán keresztül inkubáltuk normál ló szérumban (0,1%, Vector Laboratories, Burlingame, CA), amely 0,4% Triton X-100-at (Sigma-Aldrich) tartalmazott. Ezt követően a metszeteket primer anti-CART (55-102) (Phoenix Pharmaceuticals) antitesttel inkubáltuk foszfát-pufferban feloldva, 1:10000-es hígításban egy éjszakán át szobahőmérsékleten, folyamatos rázás mellett. A metszeteket 3x10 perces mosást követően biotinilált másodlagos antitesttel (1:100, Vector Laboratories, Burlingame, CA) inkubáltuk 4 órán át szobahőmérsékleten, majd ismét 3x10 perces mosás után az avidin-biotin peroxidáz komplexszel (1:50, Vector Laboratories, Burlingame, CA) végeztünk 2 órás inkubációt szobahőmérsékleten (Adams, 1992). Ezután a metszeteket ismét 3x10 percig mostuk, majd a peroxidáz szubsztrát hidrogén-peroxid és 3,3'-diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich) kromogén jelenlétében az immunreakciót láthatóvá tettük. A metszeteket tárgylemezre húztuk fel, levegőn szárítottuk, emelkedő koncentrációjú etil-alkohol oldattal dehidratáltuk, végül xilollal derítettük és Eukitt-tel (Fluka) lefedtük őket.

### **CART peptid immunreaktivitás intenzitásának kvantifikálása**

A metszetek a Pécsi Tudományegyetem Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumában kerültek kiértékelésre. A táplálékfelvétel, jutalmazás és stresszel összefüggésbe hozható agyi területekről digitális fényképet készítettünk Olympus BX51 mikroszkóp segítségével. A Paxinos&Watson által a patkány agyról készített anatómiai atlasz alapján határoztuk meg az egyes magok és agyi területek határait. A kvantifikációhoz fekete-fehér felvételeket használtunk, melyeket az AnalySIS (Olympus Corporation), valamint a nyíltforráskódú, Java-ban írt program, a National Institutes of Health, USA támogatásával létrehozott ImageJ szoftverrel értékeltük ki. Az eredmények validálása érdekében, a kétféle programmal mért értékeket összehasonlítottuk egymással. Miután meggyőződünk a megbízhatóságukról, a nőstény állatok NACC-ben mérhető CART-immunreaktivitását az ImageJ szoftverrel határoztuk meg. Minden állatban antero-posterior irányba haladva az összes

vizsgálni kívánt területről szürke szín intenzitás-méréseket (3-49) végeztünk. Mivel a CART peptidet a szinaptikus terminálisok is tartalmazzák (Smith és mtsai., 1997), a mérések során háttérként az azonos metszetben található, meghatározott területen jól elkülöníthető fehér állományban mért intenzitást használtuk fel. Mindkét szoftver a kijelölt célterületeken található pixelekből vett minták színéhez numerikus értékeket párosít, amit „intenzitás”-nak nevezünk. Relatív szürke szín intenzitást az adott területen mért átlagos szürke szín intenzitás és a háttér szürke szín intenzitásának különbsége adta. Minden mérést a LETO és OLETF patkányok esetében azonos megvilágítottság mellett és azonos nagyítású objektívvel (20x) készült felvételek alapján végeztünk el.

### **Statisztika**

Az immunreakció intenzitásának meghatározását követően statisztikai szignifikanciát mértünk kétmintás Student t-próba módszerrel, amelyet post-hoc analízissel egészítettünk ki. Az alkalmazott elemszám figyelembevételével azt is számításba vettük, hogy az adatsorunk esetleg ferde eloszlást mutat, emiatt nem-paraméteres Mann-Whitney U tesztet is végeztünk, amely kevésbé érzékeny az extrém szélsőértékekre. Kiegészítésként egyszempontos varianciánálízist (ANOVA) hajtottunk végre a CART-immundenzitások átlagainak összehasonlítására. A statisztikai próbákat SPSS 17.0 for Windows szoftver segítségével végeztük el. Minden adat esetében meghatároztuk a szórást, a standard hibát; statisztikailag szignifikáns eredménynek azt fogadtuk el, ahol  $p < 0,05$ .

## **Eredmények**

### **Fiatal LETO és OLETF patkányok vizsgálata**

#### ***Orális glükóz tolerancia teszt eredményei a fiatal LETO és OLETF állatokban***

Az OGTT értékei a cukorterhelés előtti 0. percben  $90 \pm 2,00$  mg/dl és  $89 \pm 3,05$  mg/dl voltak a LETO, illetve OLETF állatokban. A fiatal LETO és OLETF patkányok terhelést követő vércukorszint értékeiben nem volt kimutatható szignifikáns eltérés és sem a diabetes, sem a pre-diabetes kritériumát nem teljesítette egyik megvizsgált csoport sem.

#### **A CART peptid immunreaktivitás**

A perikaryon és a dendritek mellett a CART peptid az axonokban és az axon terminálisokban is megtalálható (Smith és mtsai., 1997), emiatt az immunhisztokémia a CART expresszió mértékét az axon kötegekben és különálló rostokban is kimutatja. Vizsgálatainkban CART-pozitív idegsejttesteket és rostokat tartalmazó agyi régiókat tanulmányoztunk fiatal, nem obes, nem diabeteses OLETF patkányokban és az eredményeket összevetettük azonos korú LETO kontrollokkal.

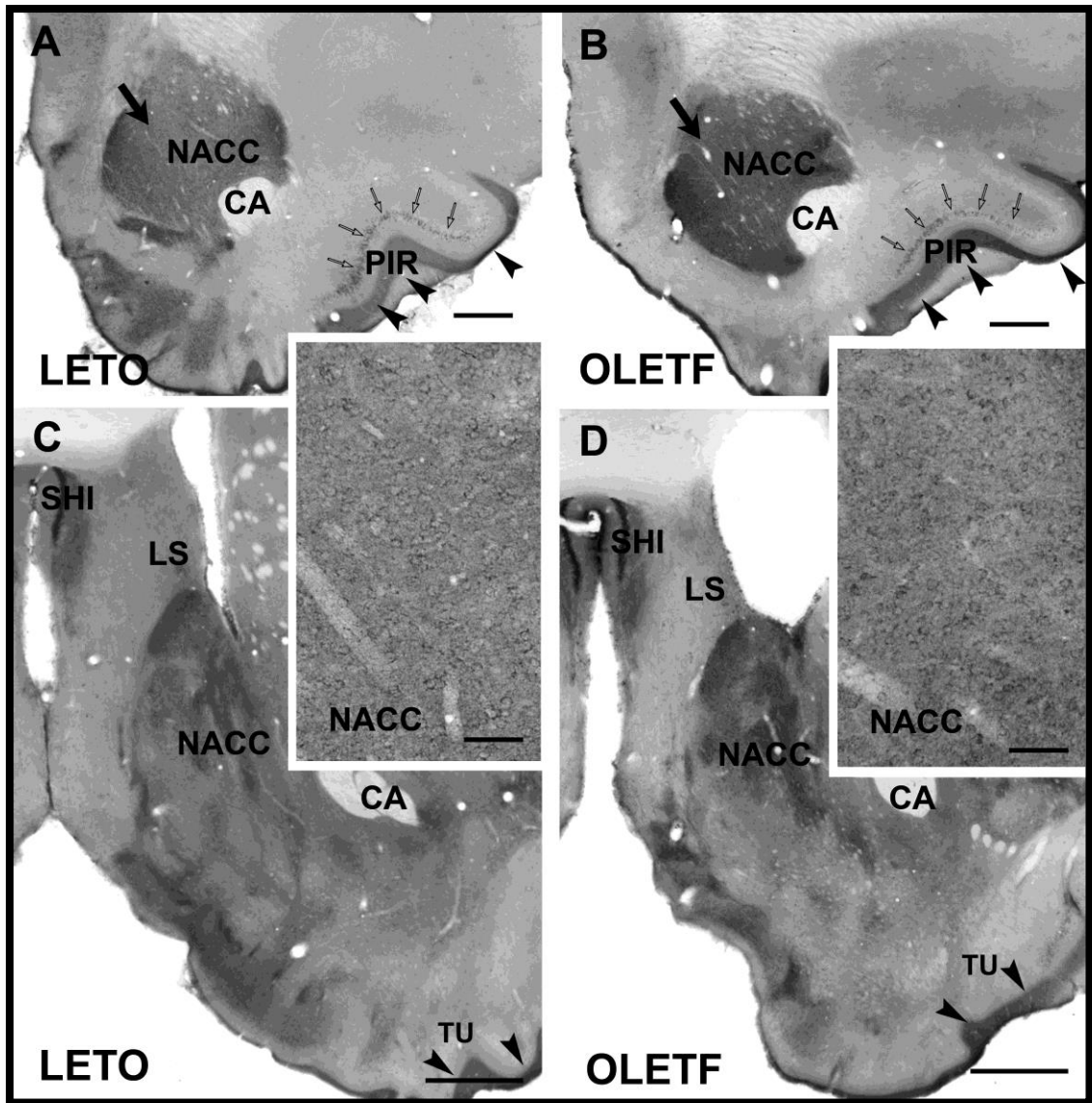
#### ***CART peptid immunreaktivitás az előagy területén fiatal LETO és OLETF állatokban***

Az előagyban mind a LETO, mind az OLETF állatokban a CART immunreaktivitás hasonló volt ahhoz, amit korábbi vizsgálatokban leírtak (Koylu és mtsai., 1997, 1998; Seress és mtsai., 2004; Abraham és mtsai., 2009; Janzso és mtsai., 2010).

A CART peptid immunreaktív neuronok eloszlása a bulbus olfactorius és a piriformis cortex területén hasonló volt a LETO és az OLETF patkányokban. Erős CART immunreaktivitást találtunk az NACC rostralis és a caudalis részén a fiatal LETO és OLETF patkányokban, szemmel látható különbség nélkül (3. és 4. ábra). A nucleus caudatus, putamen, globus pallidus és a claustrum számos CART-immunpozitív neuront és axont tartalmaz, az OLETF és LETO állatokban megfigyelhető különbség nélkül. A medialis és a lateralis septum is hasonló CART-immunreaktív idegrost-hálózatot tartalmazott mindkét patkánytörzsben, mint amit korábban leírtak (4. ábra). Erős immunreakciót figyeltünk meg a hypothalamus-ban a paraventricularis-, periventricularis- és arcuatus magokban a LETO és az OLETF patkányokban (5. ábra). A korábban leírtakkal megegyező módon találtunk CART-immunpozitív sejteket és rostokat a paraventricularis mag magno- és parvicelluláris magjában. Az eminentia mediana területén nagyon intenzív CART immunreaktivitás volt megfigyelhető mindkét törzsben. A perifornicalis magban és a hypothalamus dorsomedialis részén a LETO és az OLETF patkányokban is nagyméretű és erősen CART-pozitív neuronokat találtunk.

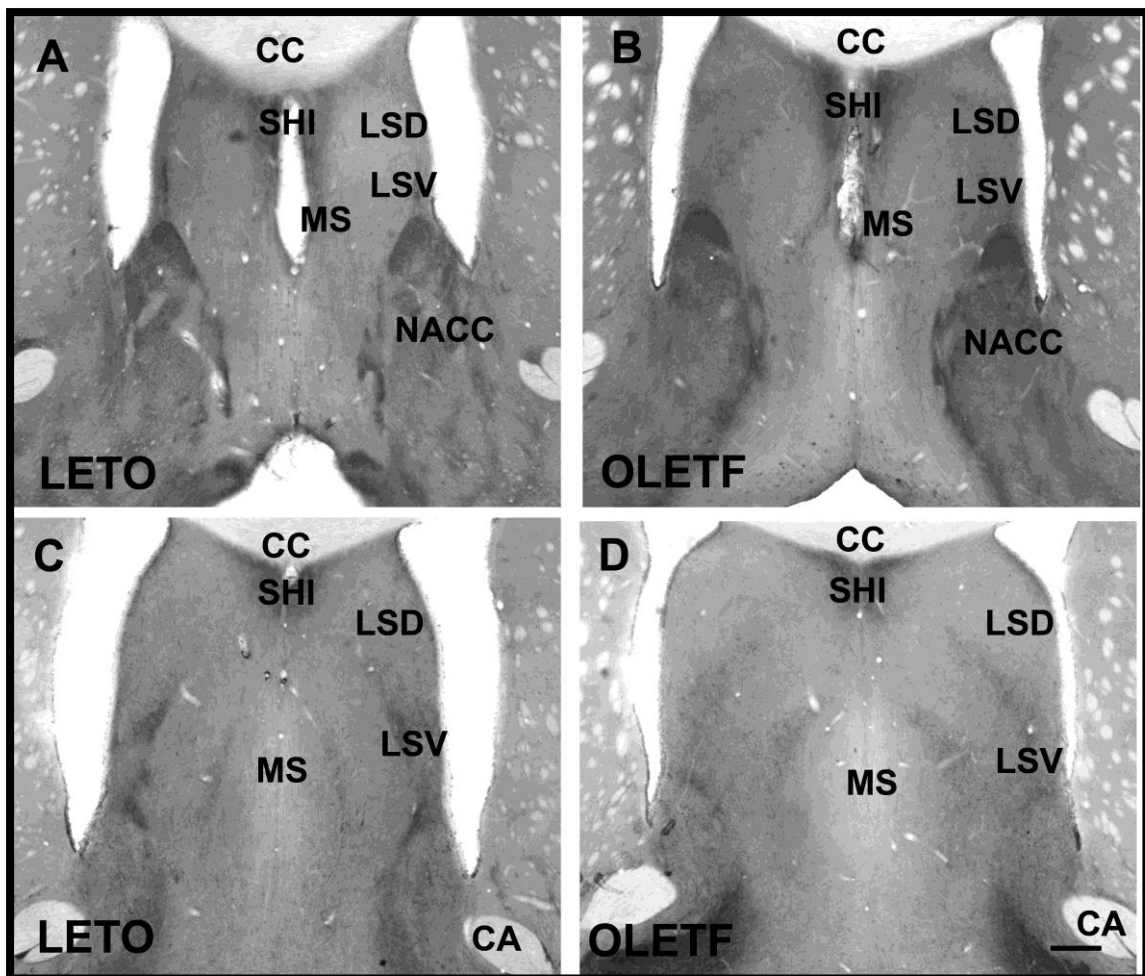
Az amygdala-ban a CART-pozitív elemek és a kromogén intenzitás a különböző magokban hasonló volt az OLETF és a LETO patkányokban. A medialis, centralis és posterior helyzetű amygdala magokban CART-pozitív rostokat, míg a basolateralis, centralis és corticalis magokban immunreaktív neuronokat és rostokat is találtunk (6. ábra).

Az archicorticalis és neocorticalis területeken a CART-immunreaktív neuronok és axonok elhelyezkedése azonos volt a korábban publikáltakkal (Seress és mtsai., 2004; Abraham és mtsai., 2007, 2009).

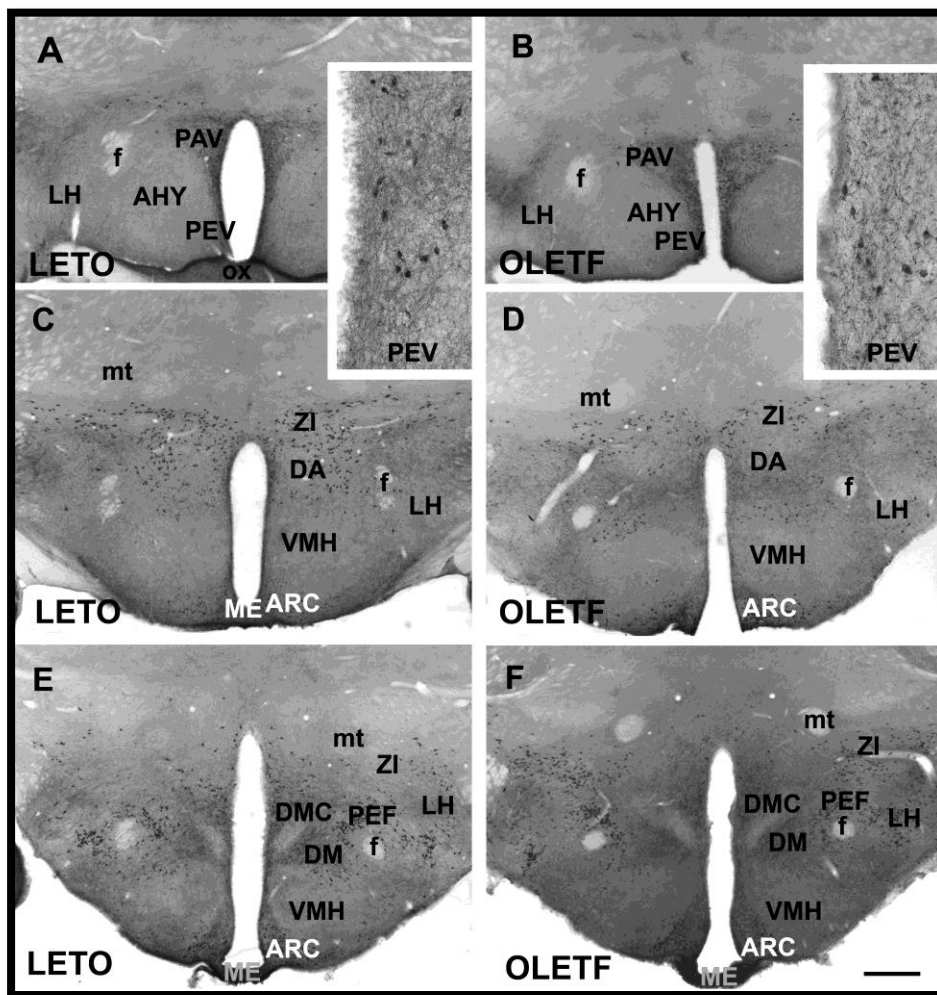


3. ábra - CART peptid immunreaktív neuronális struktúrák a nucleus accumbens-ben (NACC) és az előagy rostralis területén  $6,5 \pm 1$  hetes nem obes OLETF (B és D) patkányokban és azonos korú sovány LETO kontroll (A és C) állatokban. A LETO-ban, a comissura anterior-tól (CA) dorsomedialisan, a NACC rostralis részében denz CART-immunreaktív rost hálózat látható. CART-immunpozitív neuronok (világos nyílhegyek) és denz immunreaktív axonok (sötét nyílhegyek) találhatóak a piriformis kéregben (PIR). Az OLETF-ben a NACC rostralis része, és a PIR, a LETO-hoz hasonlóan tartalmaz immunpozitív neuronokat és denz axon hálózatot. Nincs látható különbség a LETO (C) és az OLETF (D) törzsben a NACC caudalis területén, amely mérsékelt denzitású immunreaktív rostokat és neuronokat tartalmaz. A tuberculum olfactorium-ban (TU) erősen denz immunreaktív rost hálózat figyelhető meg mindkét törzsben, míg a lateralis septum-ban (LS) és a septohippocampalis magban (SHI) közepesen denz immunreaktív rostok detektálhatóak. A közbeiktatott képen az NACC rostralis része látható nagy nagyításban. A lépték  $500 \mu\text{m}$  az A-B,  $600 \mu\text{m}$  a C- D, és  $50 \mu\text{m}$  a közbeiktatott képen.

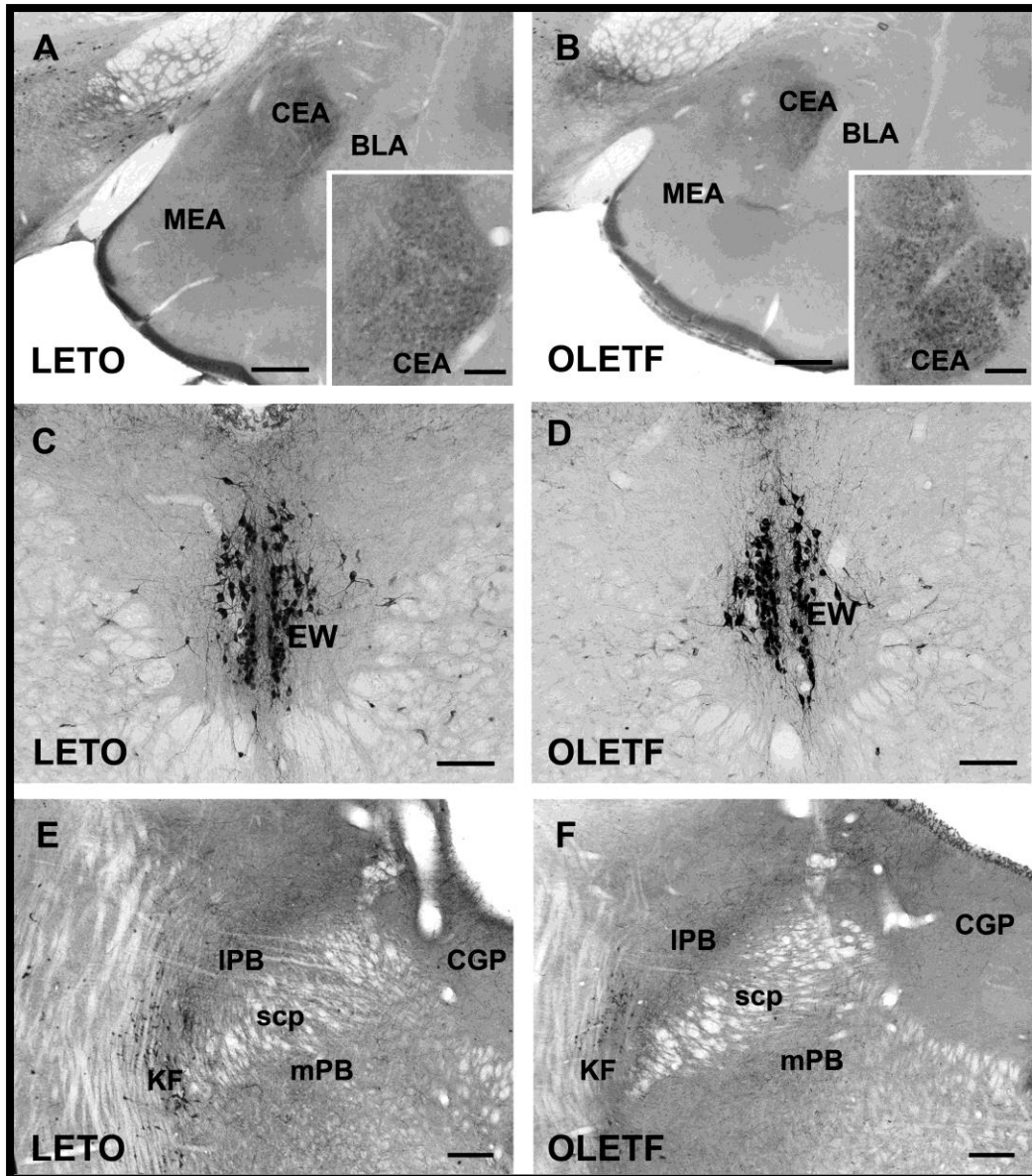




4. ábra - CART peptid immunreakció a septum-ban  $6,5 \pm 1$  hetes nem obes OLETF (B és D) patkányokban és azonos korú sovány LETO (A és C) kontroll állatokban. A septum rostralis (A és B) és caudalis (C és D) részén a septohippocampalis mag (SHI) denz CART-pozitív rost hálózatot tartalmaz, míg a lateralis septum ventralis (LSV) és dorsalis (LSD) területein mérsékelten denz CART-immunreaktív rostok láthatóak mindkét törzsben. A medialis septum (MS) alacsony denzitású a laza hálózat következtében, míg a NACC septalis része ezzel szemben erősen denz CART-immunreaktív axonokat tartalmaz. A lépték  $250 \mu\text{m}$  az A és B, és  $500 \mu\text{m}$  a C és D képeken.



5. ábra - CART peptid immunreakció a hypothalamusban  $6,5 \pm 1$  hetes nem obes OLETF (B, D és F) patkányokban és azonos korú sovány LETO (A, C és E) kontroll állatokban. A hypothalamus paraventricularis (PAV) és periventricularis (PEV) magjai nagy mennyiségben tartalmaznak CART-immunreaktív sejteket és rostokat, míg a hypothalamus anterior (AHY) és lateralis (LH) területén közepesen denz immunreaktív rost hálózat látható mindkét törzsben (A és D). A nagyobb nagyítású képeken a PEV CART-immunreaktív neuronjai és rostjai figyelhetőek meg. A zona incerta (ZI) nagy mennyiségben tartalmaz CART-immunreaktív neuronokat, míg a nucleus arcuatus (ARC) emellett denz axon hálózattal is rendelkezik. A LH-ban kevésbé denz immunreaktív hálózat látható, a ventromedialis (VMH) és dorsalis (DMH) hypothalamicus magok pedig nagyon alacsony immunreaktivitást mutatnak (C és D). A ZI és a perifornicalis mag (PEF) számos erősen jelölt neuront tartalmaz, míg a PEV, az ARC és a dorsomedialis mag (DM) közepes mértékben jelölt. A dorsomedialis hypothalamus pars compacta területén (DMC), a VMH-ban és az LH-ban alacsony denzitású immunreaktív axonok vannak (E és F). Mindkét törzsben nagyon erős immunreakció detektálható az eminentia mediana-ban (ME). A lépték  $500 \mu\text{m}$  az A-F képeken, és  $100 \mu\text{m}$  a közbeiktatott képen.



6. ábra - CART peptid immunreakció az amygdala magokban (A és B), az Edinger-Westphal magban (C és D) és a nucleus parabrachialis-ban (E és F)  $6,5 \pm 1$  hetes nem obes OLETF patkányokban és azonos korú sovány LETO kontroll állatokban. Nagy mennyiségű CART-immunreaktív neuron és rost látható a centralis amygdala magokban (CEA), és kevesebb rost a medialis magban (MEA) (A és B). A basolateralis amygdala magok (BLA) rostralis részében a legalacsonyabb a CART-immunreaktív rostok denzitása. A közbeiktatott képen CART-immunreaktív neuronok láthatóak a CEA területén. Az Edinger-Westphal mag (EW) nagy, erősen CART-immunreaktív sejteket tartalmaz (C és D). A hídban a nucleus parabrachialis lateralis része (IPB) erősen immunreaktív rost hálózattal rendelkezik, míg a medialis részen (mPB) és a periaqueductalis szűrkeállományban (CGP) alacsonyabb a CART-immunreaktív axonális denzitás. CART-immunreaktív neuronokat találunk mindkét törzsben a Kolliker-Fuse magban (KF). A lépték 200  $\mu\text{m}$  az A, B, E és 100  $\mu\text{m}$  a C, D és a közbeiktatott képen.

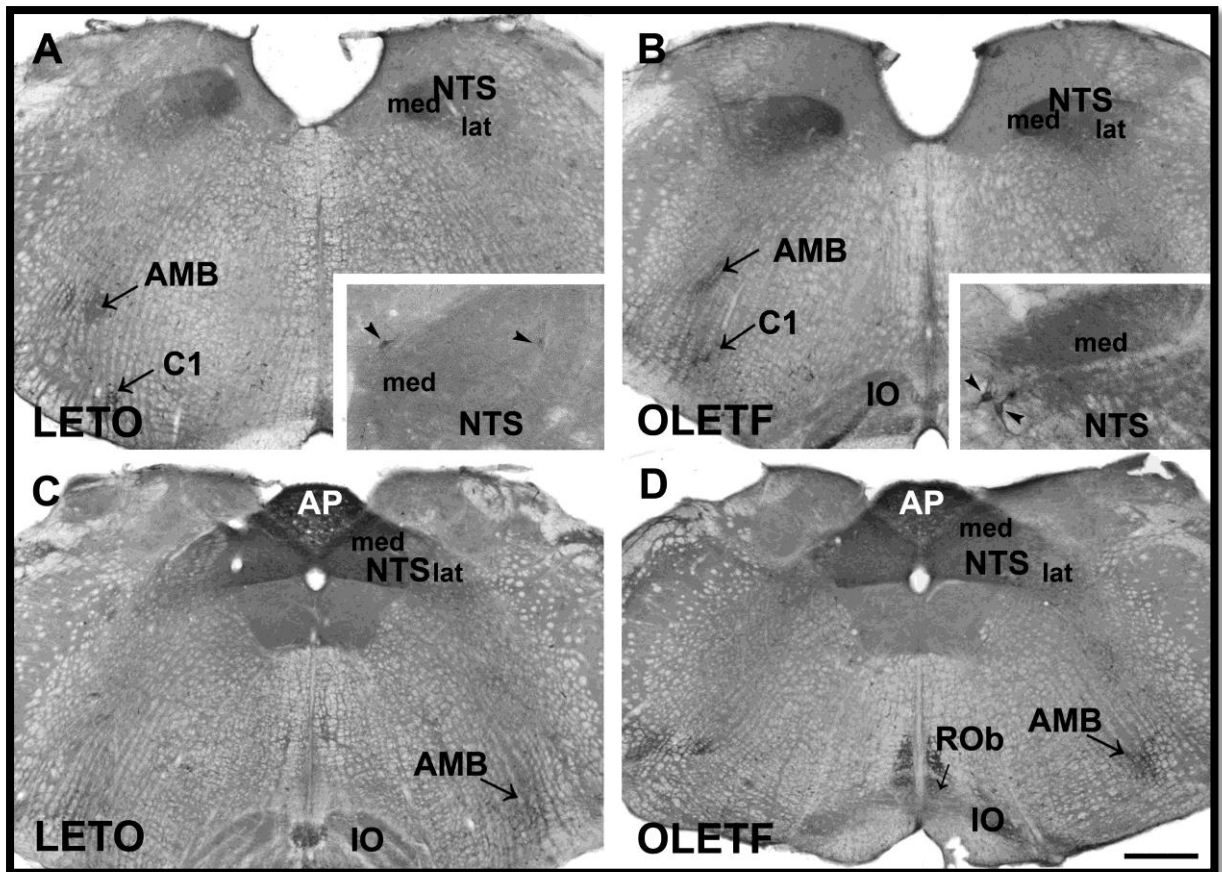
### ***CART peptid immunreaktivitás a középagy területén fiatal LETO és OLETF állatokban***

Nagyszámú és erősen CART-pozitív neuronok találhatóak az Edinger-Westphal magban mindkét törzsben (6. ábra). A periaqueductalis szürkeállományban több, míg a VTA-ban kevesebb CART-immunreaktív rostot találtunk a fiatal OLETF-ekben és LETO-kban. A CART-immunreaktív sejtek és rostok eloszlása hasonló volt a két vizsgált törzsben ezekben a régiókban is.

### ***CART peptid immunreaktivitás az utóagy területén fiatal LETO és OLETF állatokban***

Mind a dorsalis, mind a ventralis nucleus parabrachialis tartalmazott CART-pozitív rostokat, de a dorsalis területen nagyobb számban voltak megfigyelhetőek az immunreaktív idegrostok a fiatal állatokban. A Kolliker-Fuse mag mindkét törzsben tartalmazott CART-immunpozitív neuronokat. A CART-pozitív elemek eloszlásában és intenzitásában nem volt kimutatható különbség a két törzs között (6. ábra).

A nyúltvelőben a nucleus tractus solitarius (NTS) nagyszámú CART-immunreaktív rostot tartalmazott (7. ábra). Emellett a NTS rostrális területén medialisán egy-egy CART-immunreaktív idegsejt is látható (7. ábra). A CART immunreaktivitás intenzitása az NTS rostrális és caudalis területén medialisán erősebb, mint lateralisan.



7. ábra - CART peptid immunreakció a medulla oblongata-ban  $6,5 \pm 1$  hetes nem obes OLETF (B és D) patkányokban és azonos korú sovány LETO (A és C) kontroll állatokban. A nucleus tractus solitarii medialis részén (NTS, med) denz CART--immunreaktív rost hálózat látható, míg a lateralis rész (NTS, lat) kevésbé denz immunreaktív axonokat tartalmaz. A nucleus ambiguus-ban (AMB) és az oliva inferiorban (IO) CART-immunreaktív rostok vannak, CART-immunreaktív sejtek a C1 régióban láthatóak. A nyílhegyek CART-immunreaktív neuronokat és rostokat mutatnak a medialis NTS területén nagy nagyításban. A nyúltvelő rostralis részén (C és D) is hasonló képet mutat a CART-immunreaktív axonok eloszlása. Az area postrema (AP) erős CART peptid immunreaktivitással rendelkezik. A nucleus raphe obscurus (ROb), az AMB és az IO gyengébben jelölődött. A lépték  $500 \mu\text{m}$  az A-D, és  $80 \mu\text{m}$  a közbeiktatott képen.

### ***CART peptid immunreaktivitásának kvantifikálása fiatal LETO és OLETF állatokban***

A CART immunfestődés mértékének kvantifikálását azokon a területeken végeztük el a fiatal, nem obes, nem diabeteses OLETF és LETO patkányokban, ahol korábban Abraham és mtsai. (2009) szignifikáns különbségeket mértek az idősebb (35-40 hetes), elhízott és diabeteses OLETF és a kontrollként használt LETO állatok között. Munkánk során megmértük a CART-immunreakció intenzitását a NACC rostralis területén; az amygdala medialis, centralis és basolateralis magjaiban; és a medialis és lateralis NTS rostralis részén. Emellett megmértük az immunjelölődés intenzitásának mértékét a hypothalamus periventricularis zónájában és az Edinger-Westphal mag területén, mely áréak a stresszválasz szabályozásában vesznek részt; noha utóbbiról feltételezik, hogy a táplálékfelvétel és a jutalmazási funkciókban is szerepet játszhat (Weitemier és Ryabinin, 2005; Giardino és mtsai., 2011).

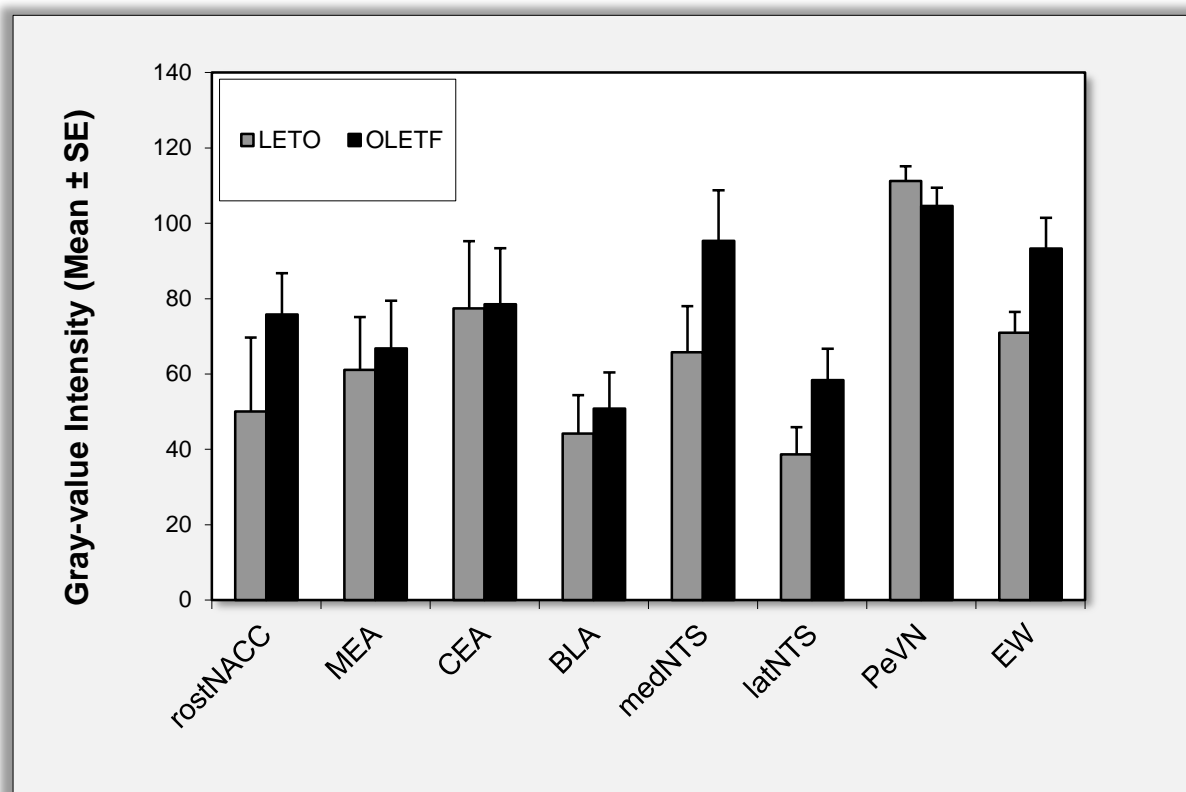
Nem találtunk szignifikáns különbséget a CART-immunreaktivitás intenzitásában a NACC-ben sem a fiatal, nem diabeteses, nem obes OLETF patkányokban, sem az azonos korú LETO kontrollokban. A CART immunreakció intenzitása megnőtt ugyan a NACC rostralis részén OLETF ( $78,07 \pm 17,54$ ) patkányokban, de a különbség nem volt szignifikáns ( $p = 0,14$ ) a LETO ( $49,48 \pm 1,7$ ) kontrollokhoz képest (8. ábra).

Az immunreaktivitás intenzitását megmértük a basolateralis (LETO:  $44,22 \pm 10,1$ ; OLETF:  $50,78 \pm 9,60$ ), centralis (LETO:  $77,45 \pm 17,77$ ; OLETF:  $78,55 \pm 14,84$ ), és a medialis (LETO:  $61,08 \pm 14,01$ ; OLETF:  $66,79 \pm 12,62$ ) amygdala magokban is, de nem találtunk szignifikáns eltérést az OLETF és fiatal LETO patkányokban (8. ábra).

A hypothalamus periventricularis zónájában is végeztünk mérést, és a mérési eredmények hasonló CART immunreaktivitást mutattak mindkét törzsben (OLETF:  $113,24 \pm 34,58$ ; LETO:  $124,6 \pm 26,15$ ), szignifikáns különbség nélkül ( $p = 0,056$ ) (8. ábra).

A mérhető kromogén intenzitás az Edinger-Westphal magban valamivel magasabb volt az OLETF (93,27 ± 21,69) patkányokban, mint a LETO (70,96 ± 27,15) kontrollokban, de a különbség nem érte el a szignifikancia szintet (p = 0,056) (8. ábra).

Az intenzitás mind a lateralis, mind a medialis rostrális NTS-ben magasabb volt az OLETF állatokban (medialis: 97,41 ± 8,57; lateralis: 59,06 ± 3,81), mint a LETO kontrollokban (medialis: 66,73 ± 9,00; lateralis: 39,21 ± 5,26), de szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni (medialis: p = 0,11; lateralis: p = 0,12) (8. ábra).

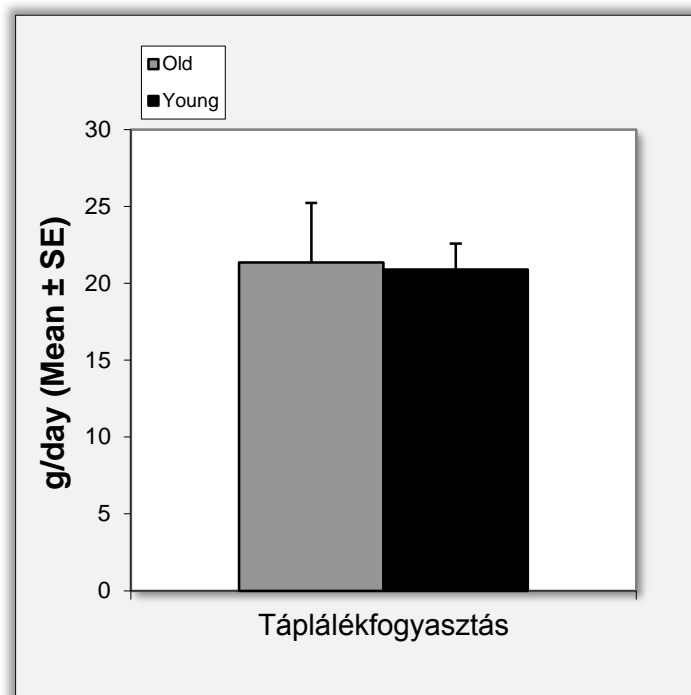


**8. ábra - CART peptid immunreaktivitás a szürke-szín intenzitás mérések alapján a 6,5 ± 1 hetes nem obes OLETF (fekete oszlopok) patkányokban és azonos korú sovány LETO (szürke oszlopok) kontroll állatokban, különböző agyi területeken. Egy-egy oszlop számos fotó méréseit összesíti: nucleus accumbens 18 (OLETF) és 21 (LETO); periventricularis hypothalamus 44 (OLETF) és 27 (LETO); amygdala magok 28 (OLETF) és 20 (LETO); nucleus tractus solitarii 50 (OLETF) és 29 (LETO); Edinger-Westphal mag 18 (OLETF) és 36 (LETO). A hibavonalak a konfidencia intervallumot jelölik.**

## Fiatal és idős Long-Evans patkányok vizsgálata

### *Az állatok táplálékfogyasztása*

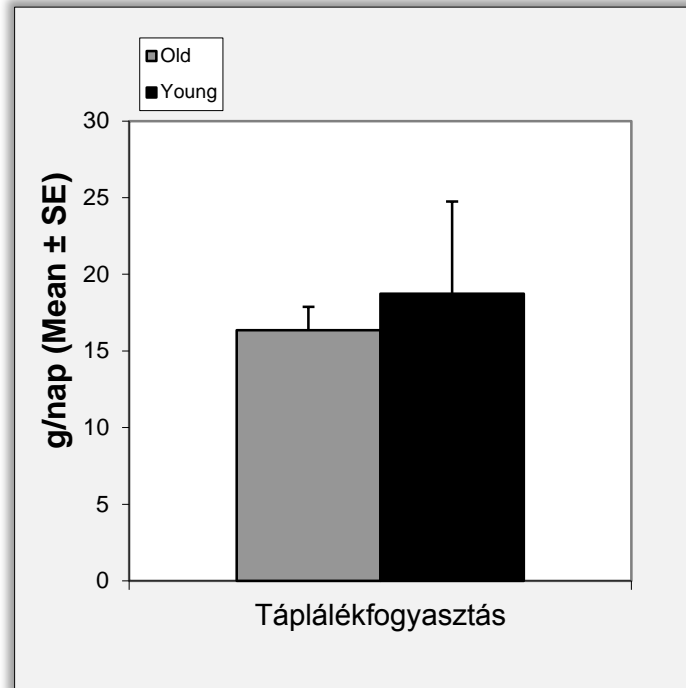
A perfúziót megelőző egy hónapon keresztül tartó napi táplálékfogyasztás mérése során nem találtunk szignifikáns eltérést a fiatal és az idős Long-Evans patkányok között. A fiatal hím állatok  $20,89 \pm 1,69$  gramm tápot ettek naponta, míg az idősek  $21,35 \pm 3,88$  grammot (9. ábra).



**9. ábra – Átlagos napi táplálékfogyasztás mértéke fiatal (fekete oszlopok) és idős (szürke oszlopok) hím Long-Evans patkányokban. A hibavonalak a konfidencia intervallumot jelölik.**

A nőstény állatok kevesebb tápot fogyasztottak a hímeknél, és a fiatal nőstények többet ettek ( $18,73 \pm 6,02$  g/nap) mint az idősebb nőstények ( $16,36 \pm 1,52$  g/nap), de a különbség nem volt szignifikáns.



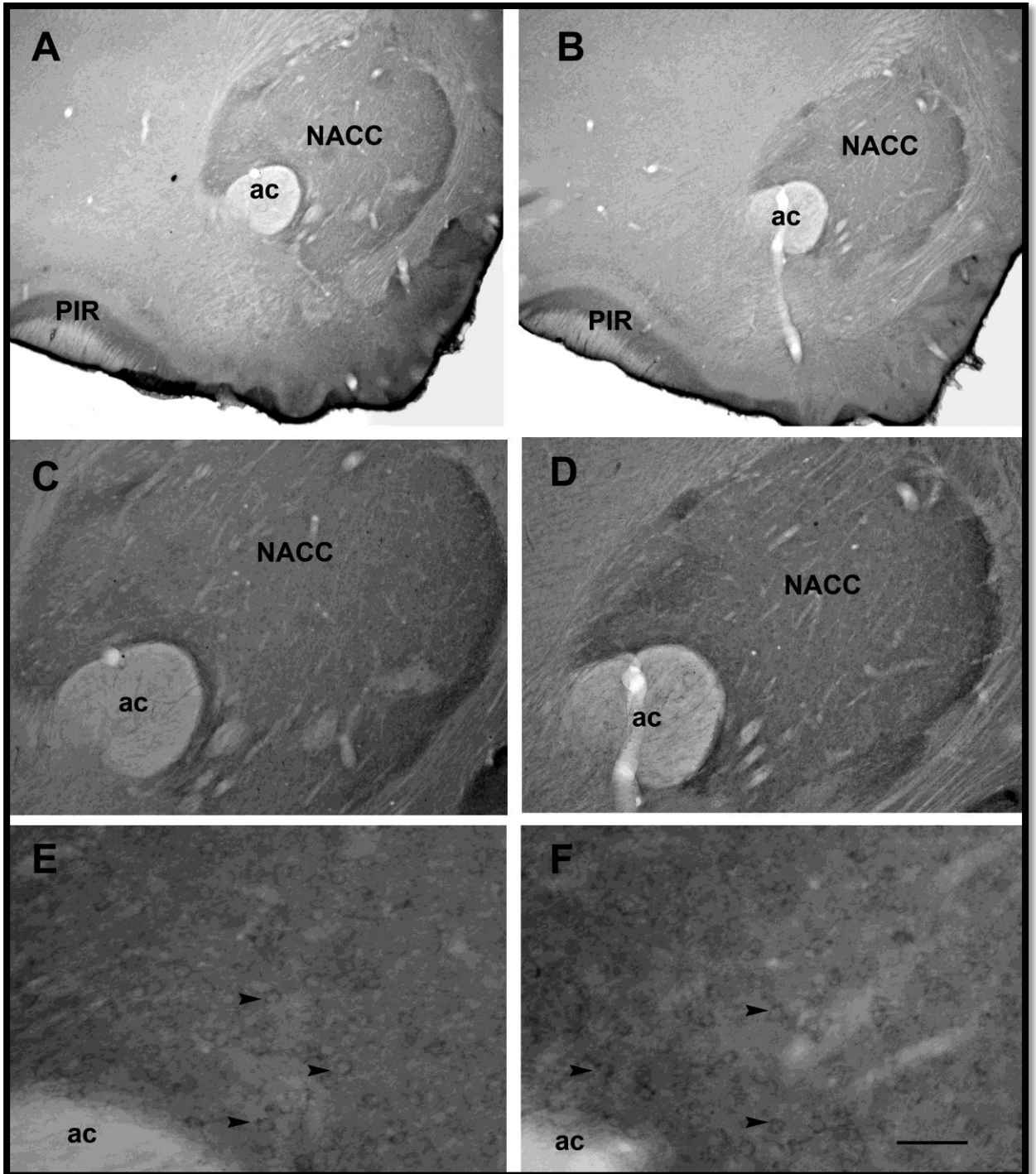


**10. ábra – Átlagos napi táplálékfogyasztás mértéke fiatal (fekete oszlopok) és idős (szürke oszlopok) nőtény Long-Evans patkányokban. A hibavonalak a konfidencia intervallumot jelölik.**

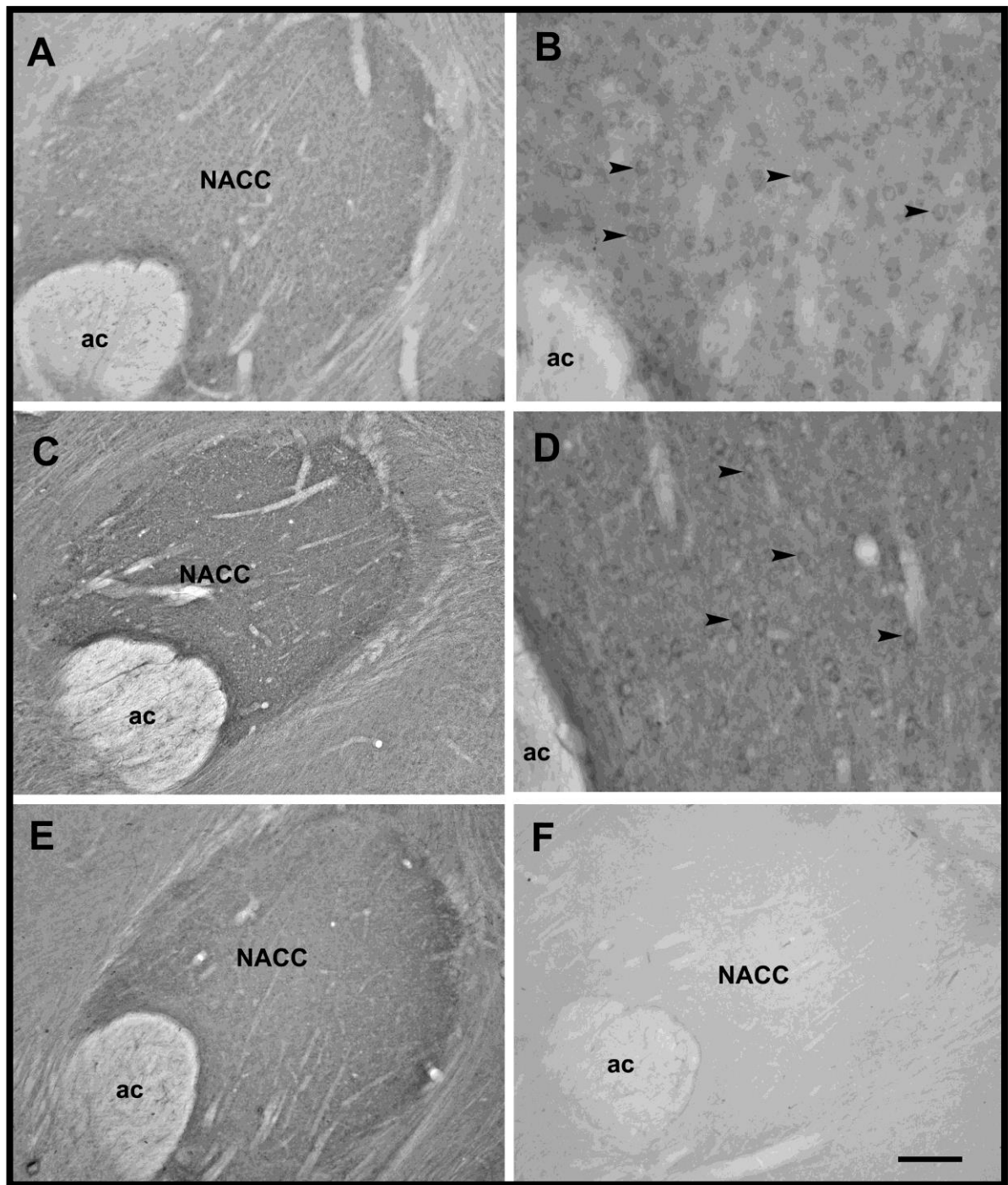
A 100 g testtömegre vetített napi táp fogyasztás esetében szignifikáns ( $p < 0,005$ ) életkor-függő változás volt észlelhető a hím és a nőtény csoportban is. A fiatal hím állatok ( $6,44 \pm 0,52$  g / 100 g testtömeg / nap) többet ettek az időseknél ( $5,00 \pm 0,90$  g / 100 g testtömeg / nap), hasonlóan a fiatal ( $8,51 \pm 2,81$  g / 100 g testtömeg / nap) és idős nőtényekhez ( $6,02 \pm 0,52$  g / 100 g testtömeg / nap).

### ***CART peptid immunreaktivitás a nucleus accumbensben***

A NACC-ben mind a fiatal, a középkorú és öreg patkányokban, a CART-immunreaktív sejtek és axonok eloszlása megegyező volt a korábban publikált vizsgálatokban megfigyelttel (Koylu és mtsai., 1997, 1998; Abraham és mtsai., 2009; Janzso és mtsai., 2010). A NACC rostralis és caudalis részén is erősen CART-immunpozitív neuronok és rostok találhatóak mindkét korcsoportban. Összehasonlítva a CART immunreaktivitás eloszlását és intenzitását fénymikroszkópban, nem találtunk látható korfüggő elváltozásokat (11., 12. ábra).



11. ábra - CART peptid immunreakció az előagy rostralis területén fiatal (A, C, E) és idős hím Long-Evans (B, D, F) patkányokban. A nyílhegyek CART-immunreaktív perikaryonokat mutatnak (E-F) a nucleus accumbens (NACC) területén. Kiegészítő magyarázat: ac, comissura anterior; PIR, piriformis kéreg. A lépték 200  $\mu$ m az A-B, 100  $\mu$ m a C-D, és 60  $\mu$ m az E-F képeken.



12. ábra – CART immunreaktivitás a nucleus accumbens (NACC) rostralis részében fiatal felnőtt (A, B), középkorú (C, D), és idős (E) nőstény patkányokban. Az F kép a CART peptid immunreaktivitásának hiányát mutatja negatív kontroll állatokban, ahol az elsődleges antitesttel történő kezelés kihagyásra került. A nyílhegyek (B, D) CART-pozitív sejtestekre mutatnak, amelyek nagy számban találhatóak meg a NACC-ben. Kiegészítő magyarázat: ac, comissura anterior. A lépték 100  $\mu$ m az A, C, E és 60  $\mu$ m a B, D képeken.

### ***CART peptid immunreaktivitásának kvantifikálása a nucleus accumbens-ben fiatal és idős állatokban***

A CART immunreaktivitás fiatal, középkorú és idős állatokban történő összehasonlíthatóság érdekében az immunreakció mértékét szoftveres denzitometria segítségével értékeltük ki a NACC-ben, fekete-fehér felvételeken. A kvantifikálásra használt módszer validálása érdekében két különböző szoftvert használtunk: az ImageJ-t - amely egy nyílt forráskódú program -, és az AnalySYS-t (Olympus Corp.). A szürke-szín intenzitás értékekben a két kiértékelő program között nem találtunk szignifikáns különbségeket.

A CART immunfestett metszeteken nem találtunk szignifikáns életkor-függő intenzitásbeli különbségeket a fiatal és az idős patkányok között. A CART-immunreakció a NACC-ben 4 hónapos patkányokban ( $21,60 \pm 7,07$ ), és 25-32 hónapos patkányokban ( $22,27 \pm 3,81$ ), az ImageJ szoftverrel mérve, azonos értékeket adott (13. ábra; 1. táblázat). Ezzel a programmal a legmagasabb intenzitás érték 33,76 volt a fiatalokban és 24,38 az idős állatokban, 16,60 illetve 17,67-es minimum értékek mellett. Az ImageJ programhoz hasonlóan az AnalySYS szoftver segítségével sem találtunk jelentős különbséget a CART immunreakció mértékében a fiatal ( $57,04 \pm 5,80$ ) és az idős ( $62,36 \pm 4,17$ ) vizsgált egyedek között (14. ábra). A legmagasabb érték 61,23 és 63,19 voltak a fiatal illetve az idős állatokban, 36,86 (fiatal) és 53,27-es (idős) minimum értékek mellett.

A két szoftver tekintetében megállapítható, hogy az ImageJ magasabb szórás értéket produkál, de statisztikailag értékelve ugyanolyan végeredményt ad az immunfestés intenzitásának mértékéről. Az abszolút értékekben megfigyelhető eltérés oka a két szoftver eltérő programozása és kalibrációs módszere, amelyet a pixelek intenzitásának meghatározására használnak.

A CART peptid immunreaktivitás vizsgálatakor nem találtunk az idős csoporton belüli (25-32 hónapos) egyedek között sem korfüggő különbséget.

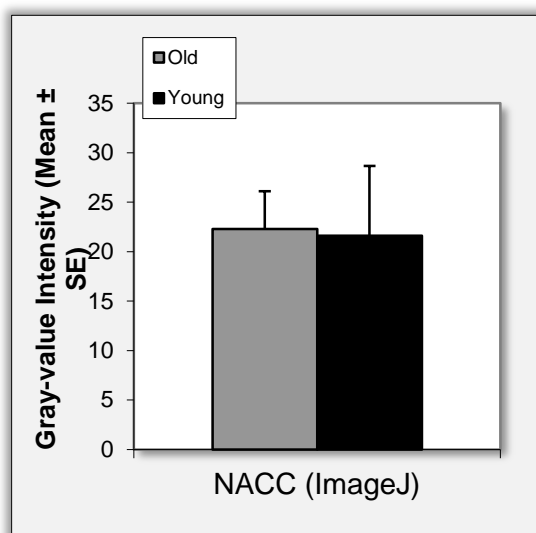
Ezt követően összehasonlítottuk a CART immunreakció mértékét a hím (25-32 hónapos) és nőstény (26-30 hónapos) idős csoportok között az ImageJ szoftver segítségével. Nem találtunk szignifikáns különbséget az intenzitások között a

NACC-ben az idős hím ( $22,2 \pm 3,81$ ) és a nőtény ( $19,4 \pm 1,73$ ) patkányok között, amely alapján feltételezhető, hogy nincs nemek közötti különbség a CART expresszióban idős patkányokban (1. táblázat).

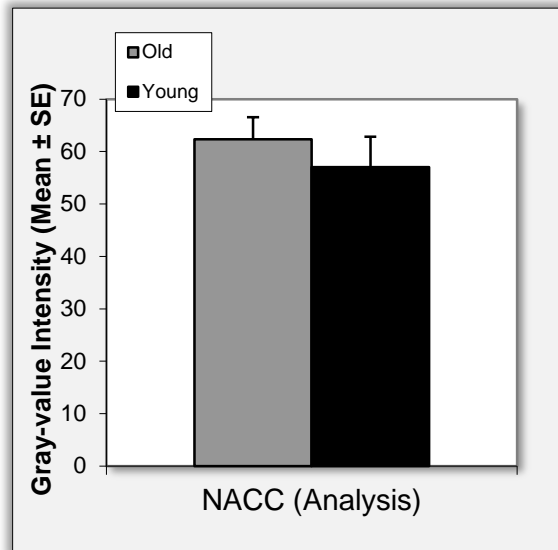
Szintén összehasonlítottuk a fiatal hímek ( $21,6 \pm 7,02$ ) és nőtények ( $20,0 \pm 6,32$ ) értékeit, ebben sem találtunk szignifikáns különbséget. Végül összehasonlítottuk a fiatal ( $20,0 \pm 6,32$ ), középkorú ( $27,02 \pm 7,29$ ) és idős ( $19,4 \pm 1,73$ ) nőtények denzitometriás eredményeit, és nem találtunk korfüggő, statisztikailag szignifikáns különbséget (15. ábra).

	Hím	Nőtény
Fiatal felnőtt	$21,6 \pm 7,02$	$20,0 \pm 6,32$
Középkorú felnőtt	NA	$27,02 \pm 7,29$
Idős felnőtt	$22,2 \pm 3,81$	$19,4 \pm 1,73$

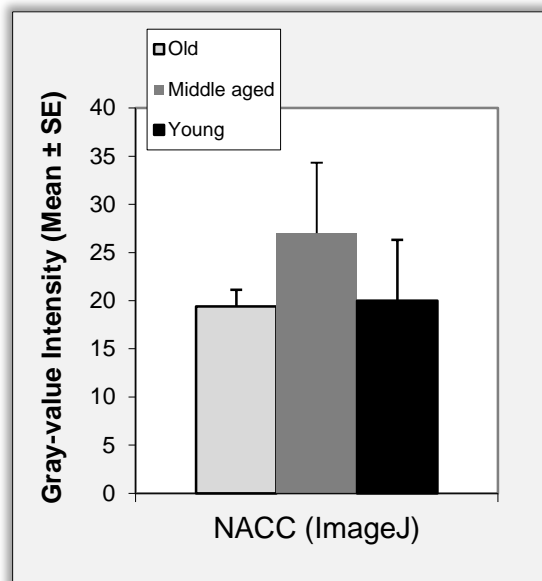
1. táblázat - Átlagos CART peptid immundenzitás értékek a nucleus accumbens-ben különböző korú patkányokban. Az értékek a mért eredményeket (ImageJ) és a szórást mutatják.



13. ábra - CART peptid immunreaktivitás szürke-szín intenzitás mérési eredményei fiatal (fekete oszlopok) és idős (szürke oszlopok) hím Long-Evans patkányokban a nucleus accumbensben (NACC) ImageJ szoftver segítségével. A hibavonalak a konfidencia intervallumot jelölik.



14. ábra - *CART* peptid immunreaktivitás szürke-szín intenzitás mérési eredményei fiatal (fekete oszlopok) és idős (szürke oszlopok) hím Long-Evans patkányokban a nucleus accumbensben (NACC) AnalySYS szoftver segítségével. A hibavonalak a konfidencia intervallumot jelölik.



15. ábra - *CART* peptid immunreaktivitás szürke-szín intenzitás mérési eredményei fiatal (fekete oszlopok), középkorú (sötétszürke), és idős (világosszürke oszlopok) nőstény Long-Evans patkányokban a nucleus accumbensben (NACC) ImageJ szoftver segítségével. A hibavonalak a konfidencia intervallumot jelölik.

## Eredmények megbeszélése

### A CART peptid expresszió OLETF patkányokban

A táplálékfelvétel központi idegrendszeri szabályozása a folyamat irányításáért felelős agyi régiók idegsejtjeiben expresszált orexigén és anorexigén neuropeptidok révén valósul meg. A táplálékfelvételt serkentő, vagy gátló peptidok expressziója, illetve szignalizációja egyensúlyának felborulása táplálkozási zavarokhoz vezet. A CART peptid anorexigén hatású, bizonyítottan csökkenti a táplálékfelvételt és modulálja a mesolimbicus dopaminerg rendszert (Koylu és mtsai., 1997; Kuhar és Dall Vechia, 1999; Thim és mtsai., 1998; Hunter és mtsai., 2004). Az emberi elhízás rágcslókon való sikeres tanulmányozását az emlős fajok testsúlyt szabályozó rendszerében fellelhető nagyfokú homológia biztosítja. Az OLETF patkányokban a CCK-1 receptor gén spontán deléciós mutációja következtében hiányzik a CCK-1 receptor funkció. Emiatt ezek az állatok hiperfágiások és elhízottak lesznek, és felnőtt korukra kialakul náluk a 2-es típusú diabetes mellitus.

2009-ben Abraham és mtsai. CART expresszió változást írtak le ebben a természetes mutáns, CCK-1 deficiens patkány törzsben: a NACC rostralis köpeny zónájában - és annak medialis pólusában - szignifikáns CART-immunreaktivitás csökkenést mértek CCK-1 receptor deficiens, elhízott, diabeteses 35-40 hetes OLETF patkányokban. Továbbá CART peptid immunpozitivitás csökkenést találtak a basolateralis amygdala-ban, és a NTS rostro-medialis részében. Mivel a NTS fogadja az emésztőrendszer felől a mechanoreceptív és kemoreceptív információkat, a megfigyelt CART expresszióbeli eltérés alapján feltételezhető, hogy ezekben az állatokban esetleg a viszcero-szenzoros információk integrációjának zavara vezethet a hiperfágiához.

A NACC-ben mind a magban található idegsejtek számja, mind azok axonkollaterálisai, mind a maghoz érkező axonok és axon terminálisok tartalmazzak CART peptidet.

A NACC-ben megfigyelhető továbbá, hogy a CART-immunreaktív idegrostok és perykarionok denzitása a köpeny-régióban sokkal erőteljesebb, mint amit a magban, vagy a dorsalis striatumban lehet mérni. A CART peptid expresszió az obes, diabeteses, CCK-1 receptor deficiens patkányokban a köpeny-régió rostralis területén és a medialis pólus környékén mutatott szignifikáns csökkenést a kontrollokhoz képest. A NACC rostralis pólusának összeköttetései jelentősen eltérnek a caudalis ventralis köpeny zónától és a magétól; jelentős interkonnektivitást figyeltek meg az agytörzs autonóm központjaival, továbbá a sublenticularis substantia innominata-val és a lateralis hypothalamusszal (Zahm és Brog, 1992). Ezen megfigyelések alapján feltételezik, hogy a NACC rostralis pólusa az autonóm válaszok és viselkedési mintázatok integrációjában játszhat szerepet.

Az amygdala basolateralis magja különböző averzív viselkedések kialakításában vesz részt - többek közt az íz averzióban is. A jutalmazási-rendszer működéséhez való kapcsolódásának pontos fiziológiai mechanizmus ugyan nem ismert, de számos anatómiai bizonyíték van arra, hogy szerepe lehet az ízérzékelés általi jutalmazási folyamatokban (Louillot és Besson, 2000; Lundy és Norgren, 2004; Reilly és Bornovalova, 2005). A NACC-ban és az amygdala magvakban megfigyelt expresszió csökkenés ezekben az állatokban vélhetően megváltozott íz- és táplálék általi jutalmazási funkciókhoz, és ezáltal hiperfágiához valamint elhízáshoz vezetett.

Jelen vizsgálatban arra kerestük a választ, hogy vajon a CCK-1 receptor hiánya az életkor, vagy esetleg a megváltozott anyagcsere állapot által vezet a fenti - az obes és diabeteses, 35-40 hetes OLETF patkányokban megfigyelhető - CART expresszió eltérésekhez. Vizsgálatunk során megmértük a CART peptid immunreaktivitás intenzitását fiatal nem obes, nem diabeteses OLETF állatokban. Azokra az agyi régiókra koncentráltunk, ahol a középkorú, megváltozott anyagcserével rendelkező, elhízott és diabeteses állatokban eltérés volt tapasztalható.



Munkánk során a CART peptid expresszióját a táplálékfelvételt szabályozó agyi régiókban fiatal ( $6,5 \pm 1$  hetes) normál és CCK-1 receptor deficiens OLETF patkányokban vizsgáltuk. A felnőttkorban hiperfág, obes és 2-es típusú diabeteses OLETF állatok 6 hetes korban még nem obesek, és nem is diabetesesek. Ugyanakkor viszont táplálékfelvételük mutat már hiperfág jeleket, annak ellenére, hogy súlyuk nem különbözik szignifikánsan a kontrollokétól. Mivel magasabb metabolikus rátát, vagy aktivitás fokozódást nem írtak le ennél a törzsnél, a testtömegük jelentősen növekszik a kontroll állatokhoz képest. 10 hetes korra már 25%-al nagyobb az OLETF állatok testtömege, mint a kontrolloké, a két törzs közötti különbség végül 35%-os csúcserőket mutat. Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy  $6,5 \pm 1$  hetes korban a CART peptid immunreaktív neuronok és axonjaik eloszlása az OLETF patkányokban hasonló volt az azonos korú sovány LETO kontrollokhoz képest, és ahhoz, amit korábban a Sprague-Dawley illetve Long-Evans patkánytörzsből megfigyeltek (Koylu és mtsai., 1997, 1998; Seress és mtsai., 2004). Szemmel látható eltérés a CART peptid immunreaktivitásában nem volt észlelhető a táplálkozás-szabályozásért, a stresszért, a tanulásért és a memóriaért felelős agyi területeken. Ellentétben azzal, amit az elhízott, diabeteses és idősebb (35-40 hetes) állatoknál megfigyeltek, nevezetesen, hogy a CART peptid expresszió több agyi területen csökkent az azonos korú kontrollokhoz képest (Abraham és mtsai., 2009), a fiatal nem obes és nem diabeteses OLETF patkányokban a CART peptid expresszió szignifikánsan nem különbözött ezeken a területeken attól, amit az azonos korú kontrollban mértünk. A NTS-ben, a basolateralis amygdala-ban és a NACC-ben  $6,5 \pm 1$  hetes korban az OLETF és a kontroll LETO patkányokban hasonló CART immunreaktivitás volt megfigyelhető. Érdekes különbség, hogy míg idősebb (35-40 hetes), obes és diabeteses OLETF állatokban a CART peptid expresszió mértéke ezeken a területeken alacsonyabb volt, mint a kontrollokban, addig fiatalabb OLETF patkányokban a CART peptid immunreaktivitás intenzitása az azonos korú kontroll állatokkal összehasonlítva enyhén magasabb volt, szignifikáns különbség nélkül. Ez arra utal, hogy a fenti régiókban, diabetesben és obesitásban megfigyelhető csökkent CART anorexigén peptid expresszió kialakulása még nem jelentkezik abban a korban, amikor az OLETF állatok testsúlya még nem különbözik a kontrollokétól és

még nem alakul ki diabetes mellitus. Mindez arra is utal, hogy a fiatal korban megfigyelhető hiperfágia nem a csökkent CART expresszió következménye. Ellenkezőleg, a fiatal nem obes OLETF állatokban megfigyelhető emelkedett CART expresszió, egy a hiperfágiát kontrollálni próbáló kompenzatórikus reakció lehet. Megállapítható továbbá, hogy a CCK-1 receptoron keresztül ható jelátviteli ágensek nem befolyásolják a CART peptid kifejeződését és megoszlását a magzati fejlődés és a postnatalis érés során.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a CART peptid expresszióját nem szabályozza közvetlenül a CCK-1 receptoron keresztül ható CCK. Feltételezhető, hogy a megváltozott CART peptid expresszióért obes és diabeteses állatokban nem direkt módon felelős a CCK-1 receptor mutációja. Valószínűleg egyéb, az elhízással és/vagy a diabétesssel összefüggésben álló faktorok, mint pl. megváltozott leptin szignalizáció, megváltozott anyagcsere, tehetők felelőssé az OLETF patkány törzsben

Mindezek mellett elméletileg a hiperfágia szintén lehetne oka a megváltozott CART expresszióknak az OLETF, diabeteses patkányokban. Ennek ellentmond ugyan, hogy születés után az OLETF patkányok a LETO kontrollokhoz képest több tejet fogyasztanak, testtömegbeli különbség kialakulása nélkül 6 hetes korig (Schroeder és mtsai., 2007; Moran és mtsai., 2008). Ez a 6 hetes kor egybevág az általunk is használt állatok korával ( $6,5 \pm 1$  hét). Ebben a korban a CCK-1 receptor deficiens állatokban csak enyhe, de nem szignifikáns CART peptid expresszió emelkedést láttunk az azonos korú kontroll állatokhoz képest. Ezzel szemben idősebb, obes és diabeteses OLETF-ekben a CART peptid expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az idősebb kontrollokban. Ezek alapján az feltételezhető, hogy a hiperfágia direktén nem változtatja meg az NACC-ben, amygdala-ban és az NTS-ben a CART expressziót. Feltételezzük, hogy a kis mértékben emelkedett CART peptid expresszió egy kompenzatórikus mechanizmus része lehet, válaszul az emelkedett táplálékbevitelre. Rágcsálókban a táplálékbevitel megszorítása gyors és dinamikus CART expresszió változást és CART szignalizáció csökkenést eredményez, ami a CART peptidet termelő sejtek energia homeosztázisban betöltött

szerepére utal (Robson és mtsai., 2002; Higuchi és mtsai., 2008; Dandekar és mtsai., 2012). Megemlítendő, hogy hasonló kompenzatórikus mechanizmust a hiperfágia esetén még sosem írtak le.

A fiatal ( $6,5 \pm 1$  hét) nem diabeteses és az idős (35-40 hét) diabeteses állatokban a táplálékfelvétel szabályozásáért felelős agyi régiókban megfigyelhető CART peptid immunreaktivitásban megjelenő különbség másik feltételezett oka az elhízás. Ismert, hogy a csökkent CART expresszió bizonyítottan elhízáshoz vezet (Asnicar és mtsai., 2001; Boone és mtsai., 2008; Del Giudice és mtsai., 2001; Guerardel és mtsai., 2005), és más CART-független elhízott állatmodellekben szintén csökkent CART expressziót írtak le (Kristensen és mtsai., 1998; Tian és mtsai., 2004; Schulz és mtsai., 2012). Ez alapján a CART peptid immunreaktivitás intenzitásának csökkenése oka, és következménye is lehet az obesitásnak. Mivel a mi OLETF-LETO állatmodellünkben a hiperfágia már jelen volt miközben a CART expresszió nem változott, arra következtetünk, hogy a CART peptid expresszió csökkenés az obes, diabeteses, CCK-1 receptor deficiens OLETF patkányokban nem oka, hanem következménye az elhízásnak.

A következő faktor, ami magyarázhatja a fiatal ( $6,5 \pm 1$  hét), nem diabeteses és idősebb (35-40 hét) állatokban a CART peptid expresszióban megfigyelt különbséget a diabetéssel kapcsolatba hozható metabolikus változások lehetnek. Ezek között kiemelkedő szerepe lehet a glükokortikoidoknak, amelyek az agyban befolyásolják a CART szintjét. A CART peptid szintje a vérben diurnális ritmust követ a glükokortikoidok szintjének változásával párhuzamosan, és a CART peptid expresszió diurnális változása az agyban is nyomon követhető a NACC-ben, az amygdala-ban és a hypothalamus-ban (Jaworski és mtsai., 2003; Vrang és mtsai., 2003; Vicentic és mtsai., 2004, 2005). A kísérleti állatok perfúziójának azonos időpontban való elvégzése révén, ezt a diurnális ritmus okozta esetleges zavaró tényezőt igyekeztünk kizárni a vizsgálataink során, ezért a glükokortikoidok CART expresszióra gyakorolt hatása vélhetően nem befolyásolta az eredményeinket.

Éheztetett patkányokban, a CART peptid napi ritmusa a hypothalamus-ban a táplálékbevitellel is mutat kapcsolatot (Savontaus és mtsai., 2002; Bertile és mtsai., 2003), emellett étkezéstől függő ritmicitást a CART expresszióban leírtak a mesolimbicus régiókban is, beleértve az NACC-t és az amygdala-t (Vicentic és mtsai., 2005).

Ismert a kortikoszteroidok szerepe az energia homeosztázisban és az elhízás kialakulásában (Perello és mtsai., 2004; Duclos és mtsai., 2005). Emellett a CCK fokozza a glükokortikoidok szekrécióját és a CCK-1 receptorok aktivációja emelkedett plazma kortikoszteron szintet eredményez (Sander és Porter, 1988; Katsuura és mtsai., 1992). Ezzel összhangban a szérum és a vizelet kortikoszteron szintje csökken és a mellékvese mérete szignifikánsan kisebb, míg a plazma ACTH szintje szignifikánsan magasabb OLETF patkányokban a LETO kontrollokhoz képest (Noguchi és mtsai., 2007). Érdekes megjegyezni, hogy ezek a különbségek 16 hetesnél idősebb állatokban voltak kimutathatóak, míg az 5-8 hetesekben, amikor még nem elhízottak és nem diabetesesek, ez az eltérés még nem figyelhető meg. A CART expresszió ritmusa megegyezik a kortikoszteroidoknál megfigyelt ritmussal, és a CART peptid táplálékbeviteltől függő termelődése feltételezhetően a glükokortikoidok által is modulált (Germano és mtsai., 2007; Liu és mtsai., 2011). Az azonban, hogy a CART expresszió kortikoszteron általi szabályozása direkt, vagy indirekt módon történik-e, nem eldönthető.

A következő molekula, amely az OLETF állatmodellben szabályozhatja a CART gén expresszióját, a leptin, mivel az elhízással magas szérum leptin koncentráció és/vagy leptin rezisztencia jár együtt (Considine és mtsai., 1996). A leptin bizonyítottan képes a hypothalamus-ban a CART peptid szintjét befolyásolni, és az elhízással összefüggő megváltozott leptin-szignalizáció a CART mRNS szintézisének drasztikus csökkenését idézi elő, míg leptin kezeléssel a CART szintje visszaállítható az ARC-ban (Kristensen és mtsai., 1998). A CART gén promóter régiója ugyanis tartalmaz egy STAT kötőhelyet, amelyet a leptin aktivál (Elias és mtsai., 1998; Dominguez és mtsai., 2002). Az obes OLETF patkányokban a prediabetikus stádiumban (8-14. hét), a plazma leptin szintje 2-3-szor magasabb a

kontrollokhoz viszonyítva, azonban ezt megelőzően, 5 hetes korban még nem különbözik szignifikánsan (Niimi és mtsai., 1999).

Érdekes módon mind a szérum leptin szintjét, mind a mellékvese működését tekintve, életkorfüggő változások figyelhetők meg az OLETF patkányokban, és szoros korrelációt írtak le a szérum leptin, a kortikoszteron és az ACTH szintekben a CCK-1 receptor hiányos állatok élete során (Noguchi és mtsai., 2007). Mivel mindkét faktor képes a CART expressziót befolyásolni, mindkettő felelős lehet a CART peptid expresszió 35-40 hetes állatokban megfigyelt csökkenéséért (Abraham és mtsai., 2009). Fiatal ( $6,5 \pm 1$  hét) korban, amikor még sem az elhízás, sem a szénhidrát anyagcserezavar nem áll fenn az OLETF törzsben, mind a leptin, mind a kortikoszteron szintek hasonlóak a kontrollokban mértékhez, amely magyarázhatja, hogy miért nincs szignifikáns különbség az OLETF és kontroll LETO állatokban megfigyelhető CART peptid expresszió intenzitásában a megvizsgált agyi területeken.

A fentiekől függetlenül természetesen feltételezhető, hogy a fiatal, nem diabeteses ( $6,5 \pm 1$  hetes) és az idősebb (35-40 hetes), elhízott és diabeteses állatok között a CART peptid expressziójában a táplálékfelvételt szabályozó agyi régiókban megfigyelhető különbség az életkor előrehaladtával alakul ki.

## **A CART peptid expresszió életkorfüggő változása a nucleus accumbens-ben**

Számos neuropeptidről bizonyosodott be, hogy a táplálékfelvétel-szabályozásában szerepet játszó agyi területeken megváltozik az expressziójuk az életkor előrehaladtával. Idősebb korban az orexigén szignálok - elsősorban az NPY és NPY-receptorok - hypothalamicus expressziójának csökkenését mutatták ki, de az AgRP és az orexin esetében is hasonló elváltozás volt megfigyelhető (Kmiec, 2006). Az orexigén NPY-al kapcsolatban azt is kimutatták, hogy 12 hónapos állatokban hatásosabb, mint a 3 hónaposakban, viszont a 24 hónaposakban sokkal kisebb táplálékfelvételt indukál (Soos és mtsai., 2010). A CART esetében, a hypothalamicus ARC-ban, az mRNS expresszió emelkedését mutatták ki idős patkányokban, fiatalabbakban megfigyelhető képest (Sohn és mtsai., 2002).

Annak érdekében, hogy az életkor által okozott CART peptid expresszió változást igazoljuk, vagy kizárjuk, különböző korú kontroll állatokban összehasonlítottuk a CART peptid expresszióját a NACC-ban. Ez az a terület ugyanis, ahol az egyik legmarkánsabb különbség figyelhető meg az OLETF törzsben, ha a fiatal ( $6,5 \pm 1$  hetes) és az idősebb, diabeteses (35-40 hét) állatokban, valamint az azonos korú kontrollokban mért CART-immunreaktivitás intenzitást vesszük figyelembe.

A vizsgálathoz használt fiatal (4-7 hónapos), középkorú felnőtt (15 hónapos) és idős (25-32 hónapos) hím és nőstény állatok esetében a 100 gramm testtömegre számított napi táplálékbevitel szignifikáns eltérést mutatott. Mind a hím, mind a nőstény idős (25-32 hónapos) patkányok szignifikánsan kevesebb tápot fogyasztottak, mint a fiatalabb (4-7 hetes) állatok. A felvett táplálék mennyiségének időskori csökkenése ellenére a NACC-ben CART peptid immunreaktivitás nem különbözött fiatal és idős korban, sem hím, sem nőstény állatokban és ezekben az állatokban talált CART peptid expresszió megegyezett az középkorú (15 hónapos) állatokban találttal.

Ebből arra következtetünk, hogy a CART peptid mennyisége a NACC-ben, normál testalkatú és egészséges patkányokban stabil értéket vesz fel és nem mutat az életkortól függő ingadozásokat.

Az általunk vizsgált idős patkányok életkora 25 és 32 hónap között változott, amely a humán életszakaszok közül azon időszaknak feleltethető meg, amikor a táplálékbevitelben csökkenés következik be és az öregedéssel összefüggésbe hozható alultápláltság prevalenciája megnövekszik, akár drasztikus mértékű testtömeg csökkenést is előidézve (Black és mtsai., 2003). Jóllehet ezen életszakasz emberek esetében akár hosszabb ideig is eltarthat, patkányoknál csak a halálukat megelőző 3 hétre jellemző (Black és mtsai., 2003). Ezt az utolsó 3 hetet megelőzően a táplálékbevitelük nem különbözik a fiatalabb állatokétól. Vizsgálatainkban az idős állatok 100 gramm testtömegre számítva szignifikánsan kevesebb tápot fogyasztottak, mint a fiatalok, ennek ellenére a CART expresszióban nem találtunk eltérést a NACC-ben. Mindazonáltal meg kell említeni, hogy a témában publikált életkorfüggő táplálékbeviteli vizsgálatok során, jellemzően 25-30 hónapos patkányokat használtak (Akimoto-Takano és mtsai., 2005; Kessler és mtsai., 2011; Petervari és mtsai., 2011, 2010).

Ebben a korban az orexigén peptidek, mint az NPY, AgRP és orexin, hypothalamicus expressziója a fiatalabb állatokhoz képest változik, ezzel szemben az anorexigén POMC expressziója változatlan marad (Kaneda és mtsai., 2001; Kappeler és mtsai., 2003; Porkka-Heiskanen és mtsai., 2004; Sohn és mtsai., 2002; Wolden-Hanson és mtsai., 2004). A hypothalamicus ARC-ban a CART peptidet a POMC-termelő neuronok szubpopulációja tartalmazza (Elias és mtsai., 1998, 2001). A CART expresszió idős korban az ARC-ban nő, ezzel ellentétben viszont a NACC-ben nem mutat életkori változást idős korban, csökkent táplálékfelvétel esetén sem.

A NACC-ben található CART-immunreaktivitását a NACC neuronjainak és nyúlványainak, lokális axonkollaterálisanak, és távolabbi területekről érkező, a NACC-ban végződő axon terminálisainak immunpozitivitása okozza. A legtöbb CART axon terminális leginkább a NACC CART-pozitív idegsejtjeiből ered, míg a

CART immunoreaktív axonok kisebb része érkezik a laterális hypothalamusból, a perifornicalis területről, az ARC-ból valamint az amygdala magokból. Ezek közül a területek közül egyedül az ARC-ban mutattak ki idős korban CART expresszió változást.

A NACC-ben a CART-immunreaktív sejteket számos dopaminerg axonterminális innerválja, ami egy másik, a táplálkozás szabályozásért felelős régió területéről, a VTA-ból érkezik. Az idős állatok NACC-ében megfigyelhető dopamin szignalizációt tekintve fontos, hogy csökkent receptorkötődés és alacsonyabb bazális extracelluláris dopamin felszabadulás van jelen, amely arra utal, hogy a VTA-ban is kialakulhat életkor függő változás (Diao és mtsai., 1997). Mivel a dopamin receptor agonisták csökkentik a NACC-ban a CART mRNS átírását (Hunter és mtsai., 2006), az idős állatokban megfigyelhető csökkent dopamin szignál logikusan növelné a CART expressziót. A CART-dopamin interakció tekintetében azonban egy homeosztatis funkció is szerepet kap a NACC-ban, ami alapján, abban az esetben, ha a dopamin szignalizáció erősödne, a CART peptid felszabadul, mintegy mérsékelve a dopamin reakciót (Hubert és mtsai., 2008). A dopamin-CART szignalizáció egyensúlyban tartása alapján feltételezhető az is, hogy az időskori csökkent dopamin szignalizáció hatására nem történik CART peptid felszabadulás, ami viszont a NACC-ban a CART peptid változatlan expresszióját jelenti. Tekintve, hogy a legtöbb CART-immunreaktív axon terminális a NACC-ban lokális axonkollaterálisokhoz tartozik, a CART peptid NACC-ban betöltött homeosztatis funkciója logikus magyarázat arra, hogy miért nem látunk életkor függő CART peptid expresszió változást még idős korban sem, amikor is a táplálékfelvétel a fiatalabb korú állatokéhoz képest csökken.

Meg kell azonban jegyezni, hogy a változatlan CART peptid expresszió nem jár szükségszerűen együtt változatlan CART peptid által kiváltott hatással a NACC neuronjain. Ennek, valamint a CART peptid időskori anorexiában betöltött funkciójának tisztázása további kutatásokat tesz szükségessé.



## Összefoglalás

Jelen kutatásban CART peptid immunreaktivitás életkor függő változását vizsgáltuk az agy egyes, táplálkozás szabályozásért felelős területein.

Először  $6,5 \pm 1$  hetes nem obes, nem diabeteses CCK-1 receptor deficiens OLETF patkányokban, valamint velük azonos korú LETO kontroll állatokban tanulmányoztuk a CART peptid immunreaktivitást. Annak ellenére, hogy korábbi vizsgálatok során az idősebb (35-40 hetes) elhízott és diabeteses OLETF patkányokban, a CART peptid immunreaktivitás a NACC rostralis területén, a rostro-medialis NTS-ben, és a basolateralis amygdalában szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az azonos korú LETO kontrollokban, a fiatal nem obes nem diabeteses OLETF állatokban a CART peptid expresszió nem mutatott szignifikáns eltérést a NTS-ben, a basolateralis amygdala-ban és a NACC-ben a kontroll LETO patkányokban talált immunreaktivitáshoz képest.

A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy vajon az életkor, vagy esetleg a megváltozott anyagcsere állapot vezet a fenti CART expresszió eltérésekhez. Vizsgálatainkat kiterjesztettük fiatal, középkorú és idős, hím és nőstény nem mutáns állatokra is az esetleges életkorfüggő CART expresszió változások miatt. A különböző korú állatokban nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a CART peptid immunreaktivitásában, sem a hím, sem a nőstény állatok esetén.

Megállapítottuk, hogy a NACC-ben a CART peptid expressziója nem mutat életkorfüggő elváltozásokat a fiatal, a középkorú, az idős és a nagyon időskorú patkányokban, ellentétben más táplálkozás szabályozást befolyásoló neuropeptidekkel.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk továbbá, hogy a CART expresszió nincs közvetlen kapcsolatban a CCK-1 receptorral, és az azon keresztül történő szignalizációval, és feltételezhető, hogy a megváltozott CART expresszióért egyéb, az elhízással és/vagy diabétesszel összefüggésben álló faktorok tehetők felelőssé ezekben a patkány törzsekben.

## Irodalmi hivatkozások jegyzéke

1. Abraham, H., Orsi, G., Seress, L. (2007) Ontogeny of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide and calbindin immunoreactivity in granule cells of the dentate gyrus in the rat. *Int J Dev Neurosci.* 25:265-274.
2. Abraham, H., Covasa, M., Hajnal, A. (2009) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunoreactivity in the brain of the CCK-1 receptor deficient obese OLETF rat. *Exp Brain Res.* 196:545-556.
3. Adams, J.C. (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem.* 40:1457-1463.
4. Adams, L.D., Gong, W., Vechia, S.D., Hunter, R.G., Kuhar, M.J. (1999) CART: from gene to function. *Brain Res.* 848:137-140.
5. Akimoto-Takano, S., Sakurai, C., Kanai S., Hosoya, H., Ohta, M., Miyasaka, K. (2005) Differences in the appetitestimulating effect of orexin, neuropeptide Y and ghrelin among young, adult and old rats. *Neuroendocrinology.* 82:256–263.
6. Anderzhanova, E., Covasa, M., Hajnal, A. (2007) Altered basal and stimulated accumbens dopamine release in obese OLETF rats as a function of age and diabetic status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293:R603-611.
7. Anubhuti, A.S. (2006) Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides.* 40:375-401.

8. Asnicar, M.A., Smith, D.P., Yang, D.D., Heiman, M.L., Fox, N., Chen, Y.F., Hsiung, H.M., Köster, A. (2001) Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. *Endocrinology*. 142:4394-4400.
9. Balasko M., Soos, S., Koncsecsko-Gaspar, M., Szekely, M., Petervari E. (2012) Anorexic effect of peripheral cholecystokinin(CCK) varies with age and body composition (Short communication). *Acta Physiologica Hungarica*. 99:166–172.
10. Balasko, M., Rostas, I., Furedi, N., Miko, A., Tenk, J., Cseplo, P., Koncsecsko-Gaspar, M., Soos, S., Szekely, M., Petervari E. (2013) Age and nutritional state influence the effects of cholecystokinin on energy balance. *Exp. Gerontol*. 48:1180-1188.
11. Bays, H.E. (2004) Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. *Obes Res*. 12:1197-1211.
12. Bertile, F., Oudart, H., Maho, Y.L., Raclot, T. (2003) Recombinant leptin in the hypothalamic response to late fasting. *Biochem Biophys Res Commun*. 310:949-955.
13. Bi, S. (2007) Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in energy homeostasis. *Peptides*. 28:352-356.
14. Black, B.J. Jr., McMahan, C.A., Masoro, E.J., Ikeno, Y., Katz, M.S. (2003) Senescent terminal weight loss in the male F344 rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284:R336-342.

15. Blanton, C.A., Horwitz, B.A., Murtagh-Mark, C., Gietzen, D.W., Griffey, S.M. (1998) Meal patterns associated with the age-related decline in food intake in the Fischer 344 rat. *Am J Physiol.* 275:1494-1502.
16. Blanton, C.A., Horwitz, B.A., Blevins, J.E., Hamilton, J.S., Hernandez, E.J., McDonald, R.B. (2001) Reduced feeding response to neuropeptide Y in senescent Fischer 344 rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280:1052-1060.
17. Boone, E.M., Hawks, B.W., Li, W., Garlow, S.J. (2008) Genetic regulation of hypothalamic cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) in BxD inbred mice. *Brain Res.* 1194:1-7.
18. Broberger, C., Holmberg, K., Kuhar, M.J., Hokfelt, T. (1999) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat vagus nerve: A putative mediator of cholecystokinin-induced satiety. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:13506-13511.
19. Canello, R., Tounian, A., Poitou, C., Clement, K. (2004) Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes Metab.* 30:215–227.
20. Carmienke, S., Freitag, M.H., Pischon, T., Schlattmann, P., Fankhaenel, T., Goebel, H., Gensichen, J. (2013) General and abdominal obesity parameters and their combination in relation to mortality: a systematic review and meta-regression analysis. *Eur J Clin Nutr.* 67:573-585.
21. Chun-Xia, Y., Scherer, T., Tschop, M.H. (2011) Cajal revisited: does the VMH make us fat? *Nature Neuroscience.* 14:806–808.
22. Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L.

- (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl J Med.* 334:292–295.
23. Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., et al. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes.* 50:1714–1719.
  24. Dandekar, M.P., Nakhate, K.T., Kokare, D.M., Subhedar, N.K. (2012) Involvement of CART in estradiol-induced anorexia. *Physiol Behav.* 18:460-469.
  25. De Jonghe, B.C., Hajnal, A., Covasa, M. (2005) Increased oral and decreased intestinal sensitivity to sucrose in obese, prediabetic CCK-A receptor-deficient OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288:R292-300.
  26. De Lartigue, G., Dimaline, R., Varro, A., Dockray, G.J. (2007) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: stimulation of expression in rat vagal afferent neurons by cholecystokinin and suppression by ghrelin. *J Neurosci.* 27:2876-2882.
  27. De Lartigue, G., Barbier de la Serre, C., Espero, E., Lee, J., Raybould, H.E. (2012) Leptin Resistance in Vagal Afferent Neurons Inhibits Cholecystokinin Signaling and Satiating in Diet Induced Obese Rats. *PLoS One.* 7:e32967.
  28. Del Giudice, E.M., Santoro, N., Cirillo, G., D'Urso, L., Di Toro, R., Perrone, L. (2001) Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (Leu34Phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family. *Diabetes.* 50:2157-2160.

29. Dey, A., Xhu, X., Carroll, R., Turck, C.W., Stein, J., Steiner, D.F. (2003) Biological processing of the cocaine and amphetamine-regulated transcript precursors by prohormone convertases, PC2 and PC1/3. *J Biol Chem.* 278:15007-15014.
30. Dhillon, W.S., Small, C.J., Stanley, S.A., Jethwa, P.H., Seal, L.J., Murphy, K.G., Ghatei, M.A., Bloom, S.R. (2002) Hypothalamic Interactions Between Neuropeptide Y, Agouti-Related Protein, Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript and Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone In Vitro in Male Rats. *Journal of Neuroendocrinology.* 14:725–730.
31. Diao, L.H., Bickford, P.C., Stevens, J.O., Cline, E.J., Gerhardt, G.A. (1997) Caloric restriction enhances evoked DA overflow in striatum and nucleus accumbens of aged Fischer 344 rats. *Brain Res.* 763:276–280.
32. DiLeone, R. J., Taylor, J. R., Picciotto, M.R. (2012) The drive to eat: comparisons and distinctions between mechanisms of food reward and drug addiction. *Nature Neuroscience*, 15:1330–1335.
33. Dominguez, G., Lakatos, A., Kuhar, M.J. (2002) Characterization of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide gene promoter and its activation by a cyclic AMP-dependent signaling pathway in GH3 cells. *J Neurochem.* 80:885-893.
34. Dominguez, G. (2006) The CART gene: structure and regulation. *Peptides.* 27:1913-1918.
35. Douglass, J., Daoud, S. (1996) Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene.* 169:241-245.

36. Duclos, M., Timofeeva, E., Michel, C., Richard, D. (2005) Corticosterone-dependent metabolic and neuroendocrine abnormalities in obese Zucker rats in relation to feeding. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288:E254-266.
37. Dylag, T., Kotlinska, J., Rafalski, P., Pachuta, A., Silberring, J. (2006) The activity of CART peptide fragments. *Peptides.* 27:1926-1933.
38. Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., Elmquist, J.K. (1998) Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron.* 21:1375-1385.
39. Elias, C.F., Lee, C.E., Kelly, J.F., Ahima, R.S., Kuhar, M.J., Saper, C.B., Elmquist, J.K. (2001) Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol.* 432:1-19.
40. Ellacott, K.L., Halatchev, I.G., Cone, R.D. (2006) Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem. *Endocrinology.* 147:3190-3195.
41. Fan, J., Song, Y., Chen, Y., Hui, R., Zhang, W. (2013) Combined effect of obesity and cardio-metabolic abnormality on the risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Cardiol.* 168:4761-4768.
42. Fan, W., Ellacott, K.L., Halatchev, I.G. Takahashi, K., Yu, P., Cone, R.D. (2004) Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat Neurosci.* 7:335-336.
43. Germano, C.M., de Castro, M., Rorato, R., Laguna, M.T., Antunes-Rodrigues, J., Elias, C.F., Elias, L.L. (2007) Time course effects of

adrenalectomy and food intake on cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression in the hypothalamus. *Brain Res.* 29:55-64.

44. Giardino, W.J., Cocking, D.L., Kaur, S., Cunningham, C.L., Ryabinin, A.E. (2011) Urocortin-1 within the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus is critical for ethanol preference. *PLoS One.* 6:26997.
45. Gozen, O., Balkan, B., Yasarbas, G., Koylu, E.O., Kuhar, M.J., Pogun, S. (2007) Sex differences in the regulation of cocaine and amphetamine-regulated transcript expression in hypothalamic nuclei of rats by forced swim stress. *Synapse.* 61:561-568.
46. Grill, H.J., Hayes, M.R. (2009) The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. *Int J Obes (Lond).* 33:S11-15.
47. Guérardel, A., Barat-Houari, M., Vasseur, F., Dina, C., Vatin, V., Clément, K., Eberlé, D., Vasseur-Delannoy, V., Bell, C.G., Galan, P., Hercberg, S., Helbecque, N., Potoczna, N., Horber, F.F., Boutin, P., Froguel, P. (2005) Analysis of sequence variability in the CART gene in relation to obesity in a Caucasian population. *BMC Genet.* 6:19.
48. Hajnal, A., Acharya, N.K., Grigson, P.S., Covasa, M., Twining, R.C. (2007) Obese OLETF rats exhibit increased operant performance for palatable sucrose solutions and differential sensitivity to D2 receptor antagonism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293:R1846-1854.
49. Hajnal, A., Covasa, M., Bello, N.T. (2005) Altered taste sensitivity in obese, prediabetic OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 289:R1675-1686.



50. Hajnal, A., De Jonghe, B.C., Covasa, M. (2007) Dopamine D2 receptors contribute to increased avidity for sucrose in obese rats lacking CCK-1 receptors. *Neuroscience*. 148:584-592.
51. Higuchi, H., Niki, T., Shiiya, T. (2008) Feeding behavior and gene expression of appetite-related neuropeptides in mice lacking for neuropeptide Y Y5 receptor subclass. *World J Gastroenterol*. 14:6312-6317.
52. Hommel, J.D., Trinko, R., Sears, R.M., Georgescu, D., Liu, Z.W., Gao, X.B., Thurmon, J.J., Marinelli, M., DiLeone, R.J. (2006) Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*. 51:801-810.
53. Huo, L., Maeng, L., Bjørbaek, C., Grill, H.J. (2007) Leptin and the control of food intake: neurons in the nucleus of the solitary tract are activated by both gastric distension and leptin. *Endocrinology*. 148:2189-2197.
54. Hubert, G.W., Jones, D.C., Moffett, M.C., Rogge, G., Kuhar, M.J. (2008) CART peptides as modulators of dopamine and psychostimulants and interactions with the mesolimbic dopaminergic system. *Biochemical Pharmacology*. 75:57-62.
55. Hunter, R.G., Kuhar, M.J. (2003) CART peptides as target for CNS drug development. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2:201205.
56. Hunter, R.G., Philpot, K., Vicentic, A., Dominguez, G., Hubert, G.W., Kuhar, M.J. (2004) CART in feeding and obesity. *Trends Endocrinol Metab*. 15:454-459.
57. Hunter, R.G., Bellani, R., Bloss, E., Costa, A., Romeo, R.D., McEwen, B.S. (2007) Regulation of CART mRNA by stress and corticosteroids in the hippocampus and amygdala. *Brain Res*. 1152:234-240.

58. Hubert, G.W., Jones, D.C., Moffett, M.C., Rogge, G., Kuhar, M.J. (2008) CART peptides as modulators of dopamine and psychostimulants and interactions with the mesolimbic dopaminergic system. *Biochem Pharmacol.* 75:57-62.
59. Iida, M., Murakami, T., Sei, M., Kuwajima, M., Yamada, M., Aono, T., Shima, K. (1998) Circulating leptin did not associate with the development of the hyperglycemia accompanied by insulin insensitivity in spontaneous neminsulin dependent diabetes mellitus model Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty rats. *Regul Pept.* 77:141-146.
60. Janzso, G., Valcz, G., Thuma, A., Szoke, B., Lendvai, Z., Abraham, H., Kozicz, T., Halasy, K. (2010) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide-immunopositive neuronal elements in the lateral septum: rostrocaudal distribution in the male rat. *Brain Res.* 1362:40-47.
61. Jaworski, J.N., Vicentic, A., Hunter, R.G., Kimmel, H.L., Kuhar, M.J. (2003) CART peptides are modulators of mesolimbic dopamine and psychostimulants. *Life Sci.* 73:741-747.
62. Jernigan, T.L., Archibald, S.L., Fennema-Notestine, C., Gamst, A.C., Stout, J.C., Bonner, J., Hesselink, J.R. (2001) Effects of age on tissues and regions of the cerebrum and cerebellum. *Neurobiol Aging.* 22:581-594.
63. Juhász, A., Katona, E., Csongrádi, É., Paragh, Gy. (2007) A testtömegszabályozás összefüggése az obesitas kialakulásával. *Orvosi Hetilap.* 148:1827-1836.
64. Kanasaki, K., Koya, D. (2011) Biology of Obesity: Lessons from Animal Models of Obesity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011:197636.

65. Kaneda, T., Makino, S., Nishiyama, M., Asaba, K., Hashimoto, K. (2001) Differential neuropeptide responses to starvation with ageing. *J Neuroendocrinol.* 13:1066-1075.
66. Kappeler, L., Gourdj, D., Zizzari, P., Bluet-Pajot, M.T., Epelbaum, J. (2003) Age-associated changes in hypothalamic and pituitary neuroendocrine gene expression in the rat. *J Neuroendocrinol.* 15:592-601.
67. Katsuura, G., Ibi, N., Matsushita, A. (1992) Activation of CCK-A receptors induces elevation of plasma corticosterone in rats. *Peptides.* 13:203-205.
68. Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Natori, T. (1994) OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain. *Diabetes Res Clin Pract.* 24:S317-320.
69. Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M., Natori, T. (1992) Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes.* 41:1422-1428.
70. Kelley, A.E. (2004) Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev.* 27:765-776.
71. Kelley, A.E., Baldo, B.A., Pratt, W.E. (2005) A proposed hypothalamic-thalamic-striatal axis for the integration of energy balance, arousal, and food reward. *J Comp Neurol.* 493:72-85.
72. Kenny, P. J. (2011) Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nature Reviews.* 12:638–651.

73. Kenny, P. J. (2011) Reward mechanisms in obesity: New insights and future directions. *Neuron*. 69:664-679.
74. Kessler, B.A., Stanley, E.M., Frederick-Duus, D., Fadel, J. (2011) Age-related loss of orexin/hypocretin neurons. *Neuroscience*. 178:82-88.
75. Kmiec, Z. (2006) Central regulation of food intake in ageing. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 57:S7-16.
76. Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., Kuhar, M.J. (1998) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol*. 391:115-132.
77. Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., Ling, N.C., DeSouza, E.B., Kuhar, M.J. (1997) Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol*. 9:823-833.
78. 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.
79. Kozsurek, M. (2009) A kokain- és amfetamin-regulált transzkript (CART) peptid a gerincvelői szintű nociceptív információfeldolgozásban szerepet játszó neuronális hálózatokban. Doktori értekezés. Semmelweis Egyetem, Szentágotthai János Idegtudományok Doktori Iskola.  
[http://phd.sote.hu/mwp/phd\\_live/vedes/export/kozsurekmark.e.pdf](http://phd.sote.hu/mwp/phd_live/vedes/export/kozsurekmark.e.pdf)
80. Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J.,

- Hastrup, S. (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*. 393:72-76.
81. Kuhar, M.J., Dall Vechia, S.E. (1999) CART peptides: novel addiction- and feeding-related neuropeptides. *Trends in Neurosciences*. 22:316-320.
  82. Kuhar, M.J., Adams, L.D., Hunter, R.G., Dall Vechia, S., Smith, Y. (2000) CART peptides. *Regulatory Peptides*. 89:1-6.
  83. Kuhar, M.J., Adams, S., Dominguez, J., Jaworski, J., Balkan, B. (2002) CART peptides. *Neuropeptides*. 36:1-8.
  84. Lakatos, A., Dominguez, G., Kuhar, M.J. (2002) CART promoter CRE site binds phosphorylated CREB. *Brain Res Mol Brain Res*. 104:81-85.
  85. Lakatos, A., Prinster, S., Vicentic, A., Hall, R.A., Kuhar, M.J. (2005) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signalregulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. *Neurosci Lett*. 384:198-202.
  86. Lambert, P.D., Couceyro, P.R., McGirr, K.M., Dall Vechia, S.E., Smith, Y., Kuhar, M.J. (1998) CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse*. 29:293-298.
  87. Larsen, P.J., Vrang, N., Petersen, P.C., Kristensen, P. (2000) Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res*. 8:590-596.
  88. Leshan, R.L., Opland, D.M., Louis, G.W., Leininger, G.M., Patterson, C.M., Rhodes, C.J., Münzberg, H., Myers, M.G. Jr. (2010) Ventral tegmental area leptin receptor neurons specifically project to and regulate

cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons of the extended central amygdala. *J Neurosci.* 30:5713-5723.

89. Lindblom, J., Schiöth, H.B., Watanobe, H., Suda, T., Wikberg, J.E., Bergström, L. (2000) Downregulation of melanocortin receptors in brain areas involved in food intake and reward mechanisms in obese (OLETF) rats. *Brain Res.* 852:180-185.
90. Long, X., Liao, W., Jiang, C., Liang, D., Qiu, B., Zhang, L. (2012) Healthy aging: an automatic analysis of global and regional morphological alterations of human brain. *Acad Radiol.* 19:785-793.
91. Louilot, A., Besson, C. (2000) Specificity of amygdalostriatal interactions in the involvement of mesencephalic dopaminergic neurons in affective perception. *Neuroscience.* 96:73-82.
92. Lundy, R.F. Jr., Norgren, R. (2004) Activity in the hypothalamus, amygdala, and cortex generates bilateral and convergent modulation of pontine gustatory neurons. *J Neurophysiol.* 91:1143-1157.
93. Maletinska, L., Maixnerova, J., Matyskova, R., Haugvicova, R., Pirnik, Z., Kiss, A., Zelezna, B. (2008) Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice. *BMC Neurosci.* 21:101.
94. Moran, T.H., Bi, S. (2006) Hyperphagia and obesity in OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361:1211-1218.
95. Moran, T.H. (2000) Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition.* 16:858-865.

96. Moran, T.H. (2008) Unraveling the obesity of OLETF rats. *Physiol Behav.* 22:71-78.
97. Murphy, K.G., Bloom, S.R. (2006) Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature.* 444:854–859.
98. Myers, M.G. Jr, Münzberg, H., Leininger, G.M., Leshan, R.L. (2009) The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC. *Cell Metab.* 9:117-123.
99. Niimi, M., Sato, M., Yokote, R., Tada, S., Takahara, J. (1999) Effects of central and peripheral injection of leptin on food intake and on brain Fos expression in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat with hyperleptinaemia. *J Neuroendocrinol.* 11:605-611.
100. Noguchi, S., Ohno, Y., Aoki, N. (2007) Adrenocortical insufficiency in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, a type 2 diabetes mellitus model. *Metabolism.* 56:1326-1333.
101. Orsi, G., Perlaki, G., Kovacs, N., Aradi, M., Papp, Z., Karadi, K., Szalay, C., Karadi, Z., Lenard, L., Tenyi, T., Plozer, E., Gabriel, R., Nagy, F., Doczi, T., Komoly, S., Jokeit, H., Schwarcz, A., Janszky, J. (2011) Body weight and the reward system: the volume of the right amygdala may be associated with body mass index in young overweight men. *Brain Imaging Behav.* 5:149-157.
102. Panchal, S. K., Brown, L. (2011) Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Article ID 351982.
103. Paxinos, G., Watson, C. (1982) The rat brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press, Sydney.*

104. Pereira, P.A., Santos, D., Neves, J., Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M.M. (2013) Nerve growth factor retrieves neuropeptide Y and cholinergic immunoreactivity in the nucleus accumbens of old rats. *Neurobiol Aging*. 34:1988-1995.
105. Perello, M., Moreno, G., Gaillard, R.C., Spinedi, E. (2004) Glucocorticoid-dependency of increased adiposity in a model of hypothalamic obesity. *Neuro Endocrinol Lett*. 25:119-126.
106. Petervari, E., Balasko, M., Garami, A., Szekely, M. (2009) Suppression of food intake by intracerebroventricular injection of alpha-MSH varies with age in rats (Short communication). *Acta Physiologica Hungarica*. 96:483–487.
107. Petervari, E., Garami, A., Soos, S., Szekely, M., Balasko, M. (2010) Age-dependence of alpha-MSH-induced anorexia. *Neuropeptides*. 44:315-322.
108. Petervari, E., Szabad, A.O., Soos, S., Garami, A., Szekely M., Balasko, M. (2011) Central alpha-MSH infusion in rats: Disparate anorexic vs. metabolic changes with aging. *Regulatory Peptides*. 166:105–111.
109. Porkka-Heiskanen, T., Alanko, L., Kalinchuk, A., Heiskanen, S., Stenberg, D. (2004) The effect of age on prepro-orexin gene expression and contents of orexin A and B in the rat brain. *Neurobiol Aging*. 25:231-238.
110. Quian, H., Azain, M.J., Hartzell, D.L., Baile, C.A. (1998) Increased leptin resistance as rats grow to maturity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 219:160–165.
111. Reilly, S., Bornovalova, M.A. (2005) Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev*. 29:1067-1088.



112. Robson, A.J., Rousseau, K., Loudon, A.S., Ebling, F.J. (2002) Cocaine and amphetamine-regulated transcript mRNA regulation in the hypothalamus in lean and obese rodents. *J Neuroendocrinol.* 14:697-709.
113. Rogge, G., Jones, D., Hubert, G.W., Lin, Y., Kuhar, M.J. (2008) CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci.* 9(10), 747-58. Erratum in: *Nat Rev Neurosci.* 11:218.
114. Sander, L.D., Porter, J.R. (1988) Influence of bombesin, CCK, secretin and CRF on corticosterone concentration in the rat. *Peptides.* 9:113-117.
115. Saper, C.B. (2002) The Central Autonomic Nervous System: Conscious Visceral Perception and Autonomic Pattern Generation. *Annual Review of Neuroscience.* 25:433-469.
116. 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.
117. Scarpace, P.J., Matheny, M., Shek, E.W. (2000) Impaired leptin signal transduction with age-related obesity. *Neuropharmacology.* 39:1872–1879.
118. Scarpace, P.J., Matheny, M., Moore, R.L., Tümer, N. (2000) Impaired leptin responsiveness in aged rats. *Diabetes.* 49:431–435.
119. Schroeder, M., Lavi-Avnem, Y., Zagoory-Sharon, O., Moran, T.H., Weller, A. (2007) Preobesity in the infant OLETF rat: the role of suckling. *Dev Psychobiol.* 49(7):685-91. Erratum in: *Dev Psychobiol.* 50:202.

120. Schulz, L.C., Schlitt, J.M., Caesar, G., Pennington, K.A. (2012) Leptin and the placental response to maternal food restriction during early pregnancy in mice. *Biol Reprod.* 87:120.
121. Seress, L., Abraham, H., Doczi, T., Lazar, G., Kozicz, T. (2004) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) is a selective marker of rat granule cells and of human mossy cells in the hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience.* 125:13-24.
122. Smith, Y., Koylu, E.O., Couceyro, P., Kuhar, M.J. (1997) Ultrastructural localization of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides in the nucleus accumbens of monkeys. *Synapse.* 27:90-94.
123. Sohn, E.H., Wolden-Hanson, T., Matsumoto, A.M. (2002) Testosterone (T)-induced changes in arcuate nucleus cocaine-amphetamine-regulated transcript and NPY mRNA are attenuated in old compared to young male brown Norway rats: contribution of T to age-related changes in cocaine-amphetamine-regulated transcript and NPY gene expression. *Endocrinology.* 143:954-963.
124. Soos, S., Balasko, M., Jech-Mihalffy, A., Szekely, M., Petervari, E. (2010) Anorexic vs. metabolic effects of central leptin infusion in rats of various ages and nutritional states. *J Mol Neurosci.* 41:97-104.
125. Subhedar, N., Barsagade, V.G., Singru, P.S., Thim, L., Clausen, J.T. (2011) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) in the telencephalon of the catfish, *Clarias gariepinus*: distribution and response to fasting, 2-deoxy-D-glucose, glucose, insulin, and leptin treatments. *J Comp Neurol.* 519:1281-1300.

126. Takiguchi, S., Takata, Y., Funakoshi, A., Miyasaka, K., Kataoka, K., Fujimura, Y., Goto, T., Kono, A. (1997) Disrupted cholecystokinin type-A receptor (CCKAR) gene in OLETF rats. *Gene*. 197:169-175.
127. Teter, B. (2009) Rodent Aging. Handbook of the Neuroscience of Aging. *Academic Press, London*.
128. Thim, L., Nielsen, P.F., Judge, M.E., Andersen, A.S., Diers, I., Egel-Mitani, M., Hastrup, S.(1998) Purification and characterisation of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast. *FEBS Lett*. 428:263-268.
129. Thim, L., Kristensen, P., Nielsen, P.F., Wulff, B.S., Clausen, J.T. (1999) Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:2722-2727.
130. Tian, D.R., Li, X.D., Shi, Y.S., Wan, Y., Wang, X.M., Chang, J.K., Yang, J., Han, J.S. (2004) Changes of hypothalamic alpha-MSH and CART peptide expression in diet-induced obese rats. *Peptides*. 25:2147-2153.
131. Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Mondal, M.S., Shimbara, T., Guan, J.L., Wang, Q.P., Funahashi, H., Sakurai, T., Shioda, S., Matsukura, S., Kangawa, K., Nakazato, M. (2003) Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*. 144:1506–1512.
132. Upadhyaya, M.A., Nakhate, K.T., Kokare, D.M., Singh, U., Singru, P.S., Subhedar, N.K. (2012) CART peptide in the nucleus accumbens shell acts downstream to dopamine and mediates the reward and reinforcement actions of morphine. *Neuropharmacology*. 62:1823-1833.

133. Yamamoto, T. (2006) Neural substrats for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Archives of Histology and Cytology*. 69:243–255.
134. Yeo, G. S. H., Heisler, L. K. (2012) Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nature Neuroscience*. 15:1343–1349.
135. Vicentic, A., Lakatos, A., Hunter, R., Philpot, K., Dominguez, G., Kuhar, M.J. (2005) CART peptide diurnal rhythm in brain and effect of fasting. *Brain Res*. 1032:111–115.
136. Vicentic, A., Jones, D.C. (2006) The CART (Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript) System in Appetite and Drug Addiction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 320:499-506.
137. Vrang, N., Larsen, P.J., Tang-Christensen, M., Larsen, L.K., Kristensen, P. (2003) Hypothalamic cocaine–amphetamine regulated transcript (CART) is regulated by glucocorticoids. *Brain Res*. 965:45–50.
138. Volkoff, H., Peter, R.E. (2000) Effects of CART peptides on food consumption, feeding and associated behaviors in the goldfish, *Carassius auratus*: actions on neuropeptide Y- and orexin A-induced feeding. *Brain Res*. 887:125-133.
139. Walhovd, K.B., Westlye, L.T., Amlien, I., Espeseth, T., Reinvang, I., Raz, N., Agartz, I., Salat, D.H., Greve, D.N., Fischl, B., Dale, A.M., Fjell, A.M. (2011) Consistent neuroanatomical age-related volume differences across multiple samples. *Neurobiol Aging*. 32:916-932.
140. Weitemier, A.Z., Ryabinin, A.E. (2005) Lesions of the Edinger-Westphal nucleus alter food and water consumption. *Behav Neurosci*. 119:1235-1243.

141. WHO Technical Report Series. (2000) Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. World Health Organization, Geneva.
142. Wierup, N., Bjorkqvist, M., Kuhar, M.J., Mulder, H., Sundler, F. (2006) CART Regulates Islet Hormone Secretion and is Expressed in the  $\beta$ -Cells of Type 2 Diabetic Rats. *Diabetes*. 55:305-311.
143. Wierup, N., Richards, W.G., Bannem, A.W., Kuhar, M.J., Ahren, B., Sundler, F. (2005) CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight. *Regul Pept*. 129:203-211.
144. Williams, K.W., Elmquist, J.K. (2012) From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat Neurosci*. 15:1350-1355.
145. Wolden-Hanson, T., Marck, B.T., Matsumoto, A.M. (2004) Blunted hypothalamic neuropeptide gene expression in response to fasting, but preservation of feeding responses to AgRP in aging male Brown Norway rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287:R138-146.
146. Xu, L., Bloem, B., Gaszner, B., Roubos, E.W., Kozicz, T. (2010) Stress-related changes in the activity of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and nesfatin neurons in the midbrain non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Neuroscience*. 170:478-488.
147. Yang, S.C., Shieh, K.R., Li, H.Y. (2005) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the nucleus accumbens participates in the regulation of feeding behavior in rats. *Neuroscience*. 133:841-851.

148. Zahm, D.S., Brog, J.S. (1992) On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*. 50:751-767.
149. Zeltser, L.M., Seeley, R.J., Tschöp, M.H. (2012) Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance. *Nature Neuroscience*. 15:1336-1342.
150. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M. R, Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.
151. Zhang, F., Basinski. M., Beals, J.M., Briggs, S.L., Churgay, L.M., Clawson, D.K., DiMarchi, R.D., Furman, T.C., Hale, J.E., Hsiung, H.M., Schoner, B.E., Smith, D.P., Zhang, X.Y., Wery, J.P., Schevitz, R.W. (1997) Crystal structure of the obese protein leptin-E 100. *Nature*. 387:206-209.
152. Zheng, H., Patterson, L.M., Berthoud, H.R. (2002) CART in the dorsal vagal complex: sources of immunoreactivity and effects on Fos expression and food intake. *Brain Res*. 957:298-310.

## Publikációk jegyzéke

### Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

- Armbruszt S., Figler M., Abraham H. (2014) Stability of CART peptide expression in the nucleus accumbens in aging. *Acta Biologica Hungarica*. (közlésre elfogadva)

**IF: 0,563**

- Armbruszt S. (2013) A táplálékfelvétel központi idegrendszeri szabályozása. *Új Diéta*. 4:26-27.

- Armbruszt S., Abraham H., Figler M., Kozicz T., Hajnal A. (2013) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in feeding- and reward-related brain areas of CCK-1 receptor deficient young rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 50-51:75-84.

**IF: 2,520**

- Armbruszt S. (2012) Az elhízás biológiája: ideális állatmodellek. *Új Diéta*. 5-6:16-17.

---

**Kumulatív IF (publikációk): 3,083**

### Az értekezés alapjául szolgáló konferencia absztraktok

- Armbruszt S., Abraham H., Figler M., Hajnal A. (2013) Életkortól függő változások a CART (cocaine- and amphetamine regulated transcript) peptid immunreaktivitásában a táplálkozás-szabályozásért felelős agyi központok

területén. *PTE Egészségtudományi Doktori Iskola III. Tudományos Fóruma*, Pécs.

- Armbruszt S., Abraham H., Figler M., Hajnal A. (2013) A cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART) peptid immunreaktivitásának vizsgálata a táplálkozás-szabályozásért felelős agyi központok területén cholecystokinin-1 receptor deficiens patkányokban. *Fiatal Oktatók Kutatói Fóruma*, Pécs.
- Armbruszt S., Abraham H., Figler M., Kozicz T., Hajnal A. (2012) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in feeding- and reward-related brain areas of CCK-1 receptor deficient rats. *1st International Doctoral Workshop on Natural Sciences*, Pécs. Poster Prize Second Place
- Armbruszt S., Abraham H., Figler M., Hajnal A. (2011) Age-related change of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in the rat nucleus accumbens. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 5:638.

**IF: 0,896**

- Armbruszt S., Abraham H., Figler M., Hajnal A. (2010) Investigation of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in feeding-related brain areas of CCK-1 receptor deficient rats. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 5:597.

**IF: 1,131**

- Armbruszt S., Abraham H., Figler M., Hajnal A. (2010) CART (Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript) peptid immunreaktivitásának vizsgálata a táplálkozás-szabályozásért felelős agyi központok területén CCK-1 receptor



deficiens patkányokban. *Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXXV. Vándorgyűlése*, Balatonőszöd.

- Armbruszt S., Abraham H., Figler M., Hajnal A. (2010) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in feeding-related brain areas of CCK-1 receptor deficient rats. *Frontiers in Neuroscience, Conference Abstract: IBRO International Workshop 2010*. doi: 10.3389/conf.fnins.2010.10.00002
- 

#### Az értekezés alapját nem képező publikációk

- Armbruszt S., Garami A. (2014) The short- and long-term effects of food intake on thermogenesis. *Temperature*. 1:96.
- Kiss A., Armbruszt S., Lelovics Zs. (2012) A folsav (B<sub>4</sub>-vitamin) a táplálkozásban a legújabb kutatási eredmények tükrében. *Studium Practicum*. 6:7-9.
- Szekeresne Szabo Sz., Mark L., Kiss Sz., Polyak E., Gubiczkone Kisbenedek A., Bonyarne Muller K., Armbruszt S., Figler M. (2011) A borok oleonsav-tartalmának analitikai vizsgálata. *Új Diéta*. 3-4:48-49.
- Figler M., Armbruszt S., Cseh J. (2010) Funkcionális emésztési zavarok. *Medicus Anonymus*. 3-4:15-18.
- Marics B., Armbruszt S., Figler M., Mark L. (2010) Analitikai vizsgálatok a különböző zöldtea-készítmények epigallokatechin-gallát és egyéb biológiailag aktív komponenseinek meghatározására. *Új Diéta*. 3-4:42-43.

- Polyak E., Szucs P., Armbruszt S., Faludi A., Figler M. (2009) Bizonyos zöldségek nitráttartalmának összehasonlítása. *Új Diéta*. 2:28-29.
  - Armbruszt S., Figler M., Sandor J. (2008) A folsavszupplementáció helyzete Európában és Magyarországon. *Új Diéta*. 6:2-3.
- 

#### Az értekezés alapját nem képező előadások és konferencia absztraktok

- Armbruszt S., Gulyas M., Figler M., Schaffer B. (2013) Margarinkészítmények egészségre gyakorolt hatásának megítélése a transz-zsír-sav és szterintartalmuk alapján. *A Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXXVIII. Vándorgyűlése*, Eger.
  - Armbruszt S., Gulyas M., Figler M., Schaffer B. (2013) Margarinok egészségre gyakorolt hatása a transz-zsír-sav és szterin tartalmuk alapján. *Magyar Gasztroenterológiai Társaság 55. nagygyűlése*, Tihany.
  - Armbruszt S., Bartus M., Figler M. (2012) A dietetikus szakma kompetenciáinak megítélése és a szakmai együttműködésre való készség vizsgálata orvosok körében. *Magyar Gasztroenterológiai Társaság 54. nagygyűlése*, Tihany.
  - Muller K., Szelig K., Kisbenedek A., Polyak E., Szabo S., Armbruszt S., Figler M. (2011) The degree of fibre consumption among active workers. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 5:653.
- IF: 0,896**
- Kisbenedek A., Raposa B., Polyak E., Muller K., Szabo S., Armbruszt S., Varjas T., Figler M., Ember I. (2011) Examination of effect of tartazin and

azurobin on gene expression in mice treated DMBA. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 5:647.

**IF: 0,896**

- Szabo S., Mark L., Kiss S., Polyak E., Kisbenedek A., Muller K., Armbruszt S., Figler M. (2011) HPLC-MS analysis of resveratrol in different nutritions. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 5:647.

**IF: 0,896**

- Marton K., Potz V., Szabo Sz., Kisbenedek A., Muller K., Armbruszt S., Figler M., Varjas T. (2010) Chemopreventive effects of tea extracts. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 5:A48.

**IF: 1,131**

- Marton K., Komar A., Szabo S., Kisbenedek A., Muller K., Armbruszt S., Kerenyi M., Figler M. (2010) Effects of gastric juices on antimicrobial food. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 5:608-609.

**IF: 1,131**

- Muller K., Kisbenedek A., Szabo Sz., Marton K., Armbruszt S., Figler M. (2010) Practical difficulties of dietary compliance. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 5:609-610.

**IF: 1,131**

- Szabo S., Kerenyi M., Batai I., Nemeth Zs., Marton K., Kisbenedek A., Armbruszt S., Muller K., Figler M. (2010) The response of pathogenic bacteria to sprouted seeds. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 5:615.

**IF: 1,131**

- Jambor E., Marics B., Armbruszt S., Montsko G., Mark L., Ohmacht R. (2009) LC-MS analysis of green tea polyphenols. *15th International Symposium on Separation Sciences*, Siófok.
  - Batki K., Armbruszt S., Kives Zs. (2009) Incidence of Eating Disorders in Obesity. *Obesitologia Hungarica*. S78:49.
  - Armbruszt S., Figler M. (2007) Comparative analysis of low-energy slimming diets followed by obese health care workers. *Combating Obesity: Strategies for Prevention and Intervention*, Graz. Winner of the COSPI Poster Prize
-

## **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Figler Máriának és Dr. Ábrahám Hajnalkának áldozatos munkájukért és a folyamatos iránymutatásért melyet számomra nyújtottak. Köszönettel tartozom Dr. Hajnal Andrásnak, a PennState University Milton S. Hershey Medical School College of Medicine professzorának, hogy rendelkezésünkre bocsátotta az OLETF patkányokat, és számtalan jó tanáccsal ellátott minket. Köszönöm Prof. Dr. Seress Lászlónak a támogatást, hogy a szövettani munkát a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumában végezhettem. Köszönöm a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumában dolgozó asszisztenseknek, különösen, Papp Emesének, hogy a szövettani munkában a segítségemre volt. Szeretném megköszönni a PTE ÁOK Gyógyszertani Intézetében Prof. Dr. Pintér Erikának, hogy az intézetben működő mikroszkópot és a hozzá tartozó AnalySIS szoftvert használhattam. Köszönöm továbbá a PTE ETK Tudományos Bizottságának, hogy a kutatást anyagilag is támogatta.

## Mellékletek

### 1. Rövidítések jegyzéke

ACC/NACC - nucleus accumbens  
AgRP - agouti-related peptid  
AHY – hypothalamus, nucleus anterior  
AMB - nucleus ambiguus  
AP - area postrema  
ARC - nucleus arcuatus  
BLA, blAMY - basolateralis amygdala  
CA - commissura anterior  
CART - kokain- és amfetamin regulált transzkript peptid  
cAMY - amygdala, nucleus centralis  
caudNACC - nucleus accumbens, caudalis  
caud-NTS - nucleus tractus solitarii, caudalis  
CC - corpus callosum  
CCK - cholecystokinin  
CEA – amygdala, nucleus centralis  
CGP – periaqueductalis szürkeállomány centralis része  
CP - putamen, caudate nucleus  
DA - dorsalis hypothalamus  
DMC - hypothalamus, nucleus dorsomedialis  
DPB - nucleus parabrachialis, dorsal  
elPBN - nucleus parabrachialis külső lateralis része  
f - fornix  
GABA - gamma-amino-vajsav  
GLP - glucagon-like peptid  
GLUT-2 - 2-es típusú glükóz transzporter  
IO - nucleus olivaris inferior

KF - nucleus Kölliker-Fuse  
LH - lateralis hypothalamus  
IPBN - nucleus parabrachialis, lateralis  
LETO - Long-Evans Tokushima Otsuka  
LS - lateralis septum  
LSD - septum lateralis, dorsalis  
LSV – septum lateralis, ventralis  
MCR - melanocortin-receptor  
ME - eminentia mediana  
MEA, mAMY - amygdala, nucleus medialis  
mPBN - nucleus parabrachialis medialis  
mt - fasciculus mammillothalamicus  
MRI - mágneses rezonancia képalkotás  
MS - medialis septum  
MSH - melanocyta stimuláló hormon  
NPY - neuropeptid-Y  
NTS - nucleus tractus solitarii  
ORX - orexin  
OXM - oxyntmodulin  
OLETF - Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty  
PAV - hypothalamus, nucleus paraventricularis  
PEF - nucleus perifornicalis  
PEV - hypothalamus, nucleus periventricularis  
PIR - piriformis cortex  
POMC - pro-opiomelanocortin  
PP - pancreas-polipeptid  
PYY - peptid-tirozin-tirozin  
ROb - nucleus raphe obscurus  
rostNACC - nucleus accumbens, rostralis  
rost-mAMY - amygdala, nucleus medialis, rostralis része  
rost-cAMY - amygdala, nucleus centralis, rostralis része  
rost-blAMY - amygdala, nucleus basolateralis, rostralis része

rost-NTS - nucleus tractus solitarii, rostralis része

scp - pedunculus cerebellaris superior

SHI - nucleus septohippocampalis

TNF $\alpha$  - tumor necrosis factor- $\alpha$

VMH - ventromedialis hypothalamus

VPB - nucleus parabrachialis ventralis

ZI - zona incerta



## 2. Ábrák és táblázatok jegyzéke

### Ábrák

1. Afferens perifériás ingerek a táplálékfelvétel szabályozásban (6. oldal).
2. Az emberi agyban aktiválódó területek ízletes étel fogyasztása során, vagy azzal összefüggésbe hozható egyéb szenzoros ingerek hatására (8. oldal).
3. CART peptid immunreaktív neuronális struktúrák a NACC-ben és az előagy rostralis területén 6,5 ± 1 hetes nem obes OLETF patkányokban és azonos korú sovány LETO kontroll állatokban (24. oldal).
4. CART peptid immunreakció a septum-ban 6,5 ± 1 hetes nem obes OLETF patkányokban és azonos korú sovány LETO kontroll állatokban (25. oldal).
5. CART peptid immunreakció a hypothalamusban 6,5 ± 1 hetes nem obes patkányokban és azonos korú sovány LETO kontroll állatokban (26. oldal).
6. CART peptid immunreakció az amygdala magokban, az Edinger-Westphal magban és a nucleus parabrachialis-ban 6,5 ± 1 hetes nem obes OLETF patkányokban és azonos korú sovány LETO kontroll állatokban (27. oldal).
7. CART peptid immunreakció a medulla oblongata-ban 6,5 ± 1 hetes nem obes OLETF patkányokban és azonos korú sovány LETO kontroll állatokban (29. oldal).

8. CART peptid immunreaktivitás a szürke-szín intenzitás mérések alapján a  $6,5 \pm 1$  hetes nem obes OLETF patkányokban és azonos korú sovány LETO kontroll állatokban, különböző agyi területeken (31. oldal).
9. Átlagos napi táplálékfogyasztás mértéke fiatal és idős hím Long-Evans patkányokban (32. oldal).
10. Átlagos napi táplálékfogyasztás mértéke fiatal és idős nőstény Long-Evans patkányokban (33. oldal).
11. CART peptid immunreakció az előagy rostralis területén fiatal és idős hím Long-Evans patkányokban (34. oldal).
12. CART-immunreaktivitás a NACC rostralis részében fiatal felnőtt, középkorú, és idős nőstény patkányokban (35. oldal).
13. CART peptid immunreaktivitás szürke-szín intenzitás mérési eredményei fiatal és idős hím Long-Evans patkányokban NACC-ben ImageJ szoftver segítségével (37. oldal).
14. CART peptid immunreaktivitás szürke-szín intenzitás mérési eredményei fiatal és idős hím Long-Evans patkányokban a NACC-ben Analysis szoftver segítségével (38. oldal).
15. CART peptid immunreaktivitás szürke-szín intenzitás mérési eredményei fiatal, középkorú, és idős nőstény Long-Evans patkányokban a NACC-ben ImageJ szoftver segítségével (38. oldal).

### Táblázatok

1. Átlagos CART peptid immundenzitás értékek a NACC-ben különböző korú patkányokban (37. oldal).

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS BENYÚJTÁSA ÉS NYILATKOZAT A  
DOLGOZAT EREDETISÉGÉRŐL**

Alulírott

név: **Armbruszt Simon Ferenc**

születési név: **Armbruszt Simon Ferenc**

anyja neve: **Bohacek Magdolna**

születési hely, idő: **Pécs, 1980.06.30.**

**„A kokain- és amfetamin regulált transzkript peptid expressziójának életkorfüggő változásai patkányok táplálékfelvételét szabályozó agyi régióiban”**  
című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a(z)

**Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Doktori Iskola**

**Egészségtudomány határterületei Programjához/témacsoportjához**

Témavezető(k) neve: **Prof. Dr. Figler Mária, Dr. Ábrahám Hajnalka**

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet

- korábban más doktori iskolába (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be,
- fokozatszerzési eljárásra jelentkezésemet két éven belül nem utasították el,
- az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom,
- öt éven belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor,
- értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be,

az irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljesek, az értekezés elkészítésénél hamis vagy hamisított adatokat nem használtam.

Dátum: **2014. november 18.**

.....

doktorjelölt aláírása