

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR**

Ph.D. értekezés

**Az RFamid-típusú peptidek (RFRP-1 és RFRP-3)
táplálékfelvételi és magatartási hatásai
az amygdala centrális magjában**

Kovács Anita

**Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola vezetője:
Prof. Dr. Lénárd László
Programvezető: Prof. Dr. Lénárd László
Témavezető: Prof. Dr. Lénárd László**

Pécs, 2014

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	5
1.1. Az amygdala anatómiája	6
1.2. Az amygdala szerepe a táplálékfelvétel és magatartási folyamatok szabályozásában	8
1.3. Az RFamid családkhoz tartozó peptidek rövid jellemzése	12
1.4. Az RFamid családkhoz tartozó RFamid-típusú peptidek (RFRPs) felfedezése és jellemzése	13
1.4.1. Az RFamid-típusú peptidek szöveti megoszlása	16
1.4.2. RFamid-típusú peptidek receptorai	17
1.4.3. RFamid-típusú peptidek receptorainak (NPFF receptorok) előfordulása	18
1.4.4. NPFF receptor antagonisták	19
1.4.5. Az RFamid-típusú peptidek hatásai	21
2. CÉLKITŰZÉSEK	25
3. ANYAGOK és MÓDSZEREK	27
3.1. Kísérleti állatok	27
3.2. Műtétek	27
3.3. A kísérletek menete	28
3.4. Anyagok, mikroinjekciók	29
3.5. Táplálékfelvétel mérése	30
3.6. Az állatok magatartásának vizsgálata táplálékfelvételi paradigmában	32
3.7. Vízfelvétel mérése	32
3.8. Testhőmérséklet mérési kísérletek	32
3.9. Magatartási tesztek	33
3.9.1. Open field teszt	34
3.9.2. Emelt keresztpalló teszt (Elevated plus-maze test)	34
3.9.3. Helypreferencia teszt	35
3.10. Adatok kiértékelése	36
3.10.1. Szövevény	36
3.10.2. Statisztika	36
3.10.3. Az adatok ábrázolása	37
4. EREDMÉNYEK	38

4.1. Szöveti értékelés	38
4.2. Táplálékfelvételt vizsgáló kísérletek eredményei	39
4.2.1. Az intraamygdaláris RFRP-1 mikroinjekciók hatása a táplálékfelvétellelre	39
4.2.2. Az intraamygdaláris RFRP-3 mikroinjekciók hatása a táplálékfelvétellelre	43
4.2.3. Az intraamygdaláris NPFF-receptor antagonistá RF9 mikroinjekcióinak hatása a táplálékfelvétellelre	46
4.2.4. A depriváció hatása az RFRP-1 és RFRP-3 által kiváltott táplálékfelvétel csökkenésre	50
4.2.5. Az intraamygdaláris RFRP-1 és RFRP-3 mikroinjekciók hatása a vízfelvételelre	52
4.3. Az állatok magatartásának vizsgálata táplálékfelvételi paradigmában	54
4.4. A testhőmérsékletet vizsgáló kísérletek eredményei	57
4.4.1. Az intraamygdaláris RFRP-1 mikroinjekció hatása a testhőmérsékletre	57
4.4.2. Az intraamygdaláris RFRP-3 mikroinjekciók hatása a testhőmérsékletre	58
4.5. Magatartási kísérletek eredményei	59
4.5.1. Az RFRP-1 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása open field tesztben	59
4.5.2. Az RFRP-3 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása open field tesztben	61
4.5.3. Az RFRP-1 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása emelt keresztpalló tesztben	64
4.5.4. Az RFRP-3 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása emelt keresztpalló tesztben	70
4.5.5. Az RFRP-1 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása helypreferencia tesztben	71
4.5.6. Az RFRP-3 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása helypreferencia tesztben	74
5. DISZKUSSZIÓ	75
5.1. Az eredmények megbeszélése, értékelése	75
5.1.1. Táplálékfelvételt vizsgáló kísérletek megvitatása	75
5.1.2. A magatartást analizáló kísérletek megvitatása a táplálékfelvételi paradigmában	80
5.1.3. A testhőmérséklet mérési kísérlet megvitatása	80
5.1.4. Vízfelvétel mérési kísérlet megvitatása	81
5.2. Magatartási tesztek eredményeinek megbeszélése	82
5.2.1. Open field teszt	82

5.2.2. Emelt keresztpalló teszt	83
5.2.3. Helypreferencia teszt	87
6. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE	91
7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	93
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	95
9. IRODALOMJEGYZÉK	96
10. FÜGGELÉK	109
10.1. Publikációs jegyzék	109

1. BEVEZETÉS

Jelen dolgozat tárgya két neuropeptid, az RFRP-1 (Neuropeptide SF) és az RFRP-3 (Neuropeptide VF), táplálékfelvételi és magatartási hatásainak vizsgálata az amygdala egy kitüntetett magcsoportjában a centrális amygdalában. Számos neuropeptidnek ismerjük a táplálékfelvételben betöltött szerepét (többek között a NPY, orexin, ghrelin, CCK), ugyanakkor vannak újabb és újabb peptidek, melyek felfedezésre kerülnek napjainkban is. A táplálékfelvétel és az energiametabolizmus komplex központi idegrendszeri szabályozásában számos neurotranszmitter és neuropeptid vesz részt. A regulációban központi szerepe van a hypothalamusnak, de az agytörzsi struktúrák is jelentős szereppel bírnak a perifériáról érkező szignálok közvetítésében, illetve a megfelelő visceromotoros válaszok kialakításában. A táplálékfelvételi folyamatok szabályozásában az emócionális, jutalmazási és averzív hatások is fontosak, melyek létrejöttében jelentős a kortikális és limbikus területek (köztük az amygdala) modulációs szerepe. Jól ismert, hogy a táplálékfelvétel célja a szervezet energiaraktárainak a feltöltése. A szervezet törekszik egy homeosztatikusan kijelölt beállítási pont (set point) körüli tápanyagraktár feltöltöttségi szintre. A táplálékfelvétel iránti igény azonban már akkor jelentkezik, amikor a raktárak csökkennek ugyan, de még fedezni tudják az energiaszükségletet. Az éhségmotiváció által indukált evés nem passzív folyamat, hanem megerősítésen alapuló, örömmel járó viselkedés, amit kognitív és érzelmi folyamatok is irányítanak. Jelenlegi ismereteink szerint a testsúlyszabályozási zavarok, mint a bulimia nervosa, az anorexia nervosa vagy a testsúly szabályozási zavar másik véglete a túlsúlyosság, illetve elhízás hátterében (túl a pszichológiai tényezőkön, mozgásszegény életmódon stb.) a táplálkozási magatartás szabályozásának és az energia felhasználásban szerepet játszó neurokémiai folyamatoknak a zavara állhat. Ezen idegrendszeri folyamatok jelentős része peptid molekulákon-neuropeptideken keresztül valósul meg. A neuropeptidek az emberi szervezetben a központi idegrendszer különböző struktúráiban, illetve perifériás szövetekben termelődnek. Ezen peptidek hatásukat a periférián és/vagy a központi idegrendszerben található éhség-jóllakottsági rendszereken keresztül fejtik ki. Így bizonyos peptidek fokozzák a táplálékfelvételt (orexigén peptidek), mások viszont azáltal, hogy fokozzák a jóllakottság érzetét, csökkentik a táplálékfelvételt (anorexigének). Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy számos neuropeptidről ismert,

hogy egy adott struktúrába vagy perifériára adva orexigén hatású, míg más struktúrában anorexigén hatást mutat, amely magyarázható a dóziszfüggéssel, a receptor denzitással, valamint a struktúrák eltérő afferens és efferens kapcsolatrendszerével.

Az értekezés az endogén RFamid-típusú peptidek táplálékfelvételre és magatartásra kifejtett hatásának tárgykörével foglalkozik, célterületünk pedig a táplálékfelvétel és magatartási folyamatok regulációjában szerepet játszó limbikus struktúra, az amygdala volt.

1.1. Az amygdala anatómiája

Az amygdala (AMY) az agy temporális lebenyében található mandula alakú struktúra, melyet a XIX. század elején Burdach azonosított. Ma már tudjuk, hogy Burdach valójában az amygdala azon sejtcsoportját nevezte el, melyet ma bazolaterális komplexként ismerünk. Az amygdala nem egységes struktúra, több magból és magcsoportból áll. Kezdetben a kutatók két nagy magcsoportra osztották: egy filogenetikailag régebbi, az olfactoros rendszerrel kapcsolatban álló corticomediális részre (ide sorolták a centrális, mediális és kortikális magokat, valamint a laterális olfactorius köteget), illetve egy filogenetikailag újabb bazolaterális részre (amely a laterális és a bazális magcsoportokat foglalta magában). Későbbi vizsgálatok során kiderült, hogy az amygdala sokkal kiterjedtebb, több mint tíz magból áll, így ma már amygdala komplexumról beszélünk [109, 110, 155-157, 169-171, 186-188, 201].

Az AMY magjait többféleképpen csoportosítják [169, 188, 201]. Swanson az AMY magcsoportjait kapcsolatrendszerük (afferentációs és efferentációs projekcióik) és neurotranszmitter-receptor rendszerük alapján három nagy részre osztotta: egy részét a striatum ventromedialis kiterjedésének, másik részét a szaglókéreg caudalis végének, végül a harmadik magcsoportot a claustrum medialis kiterjedésének tekintette. A striatalis részhez tartozik az anterior amygdaloid area, a centralis (CeA) és a medialis (MedA) mag, mely területeken a projekciós neuronok főként GABAergek, jellemző továbbá ugyanazon neuropeptidek jelenléte ezen neuronokban, mint a striatális régiókban [201]. Érdemes megemlíteni, hogy az AMY többi régiójában az ingerületátvivő anyag elsősorban a glutamát, az interneuronokban pedig főként GABA neurotranszmitter található [33, 137]. A szaglókérgi részhez tartozik a laterális szaglóköteg magja, az amygdala kortikális magjai, valamint a piriform amygdaloid

areák. A claustrum ventromedialis kiterjedése tartalmazza a lateralis (LatA), a basolateralis (BLA) magot, valamint a posterior magot (PA).

Jelenlegi anatómiai ismereteink szerint az amygdala magcsoportjai alapján három részre osztható: mély, felszínes és az előbbiekhöz nem sorolható, de az amygdalához tartozó magokra [169]. A mély magokhoz vagy bazolaterális csoportba sorolható a laterális, a bazális és accesorius bazális mag. A felszínes vagy kérgi magokhoz tartozik a laterális szaglóköteg magja és a kérgi magok, végül a harmadik csoport a centromediális csoport, mely magában foglalja a mediális és a centrális magot, valamint az intercalaris magokat és az amygdalo-hippocampalis areát. Az egyes magokon belül további szubdivíziókat különböztetnek meg. A dolgozat tárgyát képező centrális amygdala további négy szubdivízióra osztható: capsularis, lateralis, intermedialis és medialis részre.

Az AMY kapcsolatrendszere nagy komplexitást mutat. Az AMY számos kétirányú kapcsolattal rendelkezik a kortikális és szubkortikális területek felé [156, 171, 141]. Szenzoros bemenetet kap a szomatoszenzoros, vizuális, akusztikus, gusztatoros, viszceralis és polimodális információk feldolgozásáért felelős kérgi területekről, továbbá a thalamus szenzoros információ-feldolgozásban szerepet játszó magcsoportjaitól [119, 138, 139, 222, 223, 240]. Az AMY számos asszociációs és más limbikus kérgi területtel is kapcsolatban áll, így többek között az orbitofrontalis (OBF), medialis prefrontalis (mPFC), prelimbikus és infralimbikus, insularis és anterior cingularis kéreg területeivel [222]. Kapcsolatban áll továbbá a limbikus rendszer számos struktúrájával, többek közt a nucleus accumbenssel (Nacc), a septummal és a hippocampus (HPC) egyes régióival [1, 26, 102, 223]. Az amygdala szerotonerg, noradrenerg, kolinerg és dopaminerg innervációval egyaránt rendelkezik [167, 131, 223, 227]. Szerotonerg beidegzést a raphe magokból, noradrenerg beidegzést a locus coeruleusból kap. Kolinerg rostok érkezik a ventrális pallidumból, a bazális előagyból és a laterodorzális tegmentális areából, valamint dopaminerg rostokat kap a ventrális tegmentális areából. Az amygdalán belül az egyes magcsoportok között szintén kiterjedt kapcsolatrendszer mutatható ki. A CeA-ba érkezik rostok a mediális, a laterális és bazolaterális AMY magokból, azonban ezen kapcsolatok többnyire egyirányúak [169].

A CeA-ról ismert, hogy az amygdala magok és amygdalán kívüli kortikális és szubkortikális agyi struktúrák felől érkező információk integráló helye [97]. A CeA szenzoros bemenetet kap a hypothalamicus pályákon és intraamygdaláris kapcsolatokon kívül a kortikális, a thalamikus és agytörzsi területekről is [161]. Viszceroceptív és

gusztatoros információt kap többek között az anterior és posterior insularis kérgi részekről [139], a ventrális poszteromediális thalamicus magtól [150, 214], a parabrachialis magtól és a nucleus tractus solitariitól (NTS) [9, 156], valamint szomatoszenzoros és auditoros információt kap egyes thalamicus magvaktól [13, 127].

Az AMY két fő kimenete a stria terminális és a ventrális amygdalofugális pálya [109, 227]. A stria terminálison keresztül, melynek rostjai főként a CeA-ból erednek, az AMY információkat küld a stria terminális magjába, a ventromediális (VMH) és laterális hypothalamusba (LH) [37, 168], a medialis preopticus areába, a thalamusba [111] és a periaqueductális szürkeállományba [178]. A ventrális amygdalofugális pálya rostjai elsősorban az AMY és a hypothalamus között létesítenek kapcsolatot [109]. A hypothalamus projekciói az AMY-ban főképpen a centrális és a mediális magokon végződnek [188]. Az amygdaláris magok közül a CeA biztosítja a fő kimenetet a hypothalamus és az agytörzs felé. Fontos projekciós területei az agytörzsön belül a periaqueductalis szürkeállomány (PAG), a ventralis tegmentalis area (VTA), a substantia nigra (SN), a locus coeruleus (LC), a parabrachialis mag és a NTS [178, 221, 224, 227]. A CeA a bazális előagyi struktúrákkal is kapcsolatban áll, többek között a Nacc előagyi struktúrával [102]. Továbbá számos felszálló pályarendszer kapcsolatban van a CeA-val, többek között a monoaminerg rendszerek (noradrenerg, szerotonerg vagy dopaminerg) vagy a bazális előagyi kolinerg rendszer [188, 34].

1.2. Az amygdala szerepe a táplálékfelvétel és magatartási folyamatok szabályozásában

Az AMY mind funkcionálisan, mind struktúráját tekintve heterogén magcsoportok összesége. A táplálékfelvétel és testtömeg szabályozás mellett részt vesz a memória folyamatok szabályozásában, a tanulásban, a figyelem fenntartásában, az alvás-ébrenléti folyamatok szervezésében, a szenzoros információk érzelmi feldolgozásában, valamint a félelem-düh, támadás-védekezés és a szexuális magatartásformák szervezésében [6, 73, 119, 164].

Az AMY a limbikus rendszer részeként szerepet játszik az éhség motiválta magatartás idegi szabályozásában. Már korai kísérletek során megfigyelték, hogy az AMY ingerlése vagy léziója befolyásolja a táplálkozási magatartást [54, 105]. Elsőként Klüver és Bucy írták le 1939-ben, hogy az AMY-t is érintő temporális lebeny léziója hatással van többek között a táplálékfelvételre is, nevezetesen majmokkal végzett

kísérleteik során azt figyelték meg, hogy az állatok táplálkozási szokásai megváltoztak, orális tendencia (ehetetlen anyagok szájba vétele) és fokozott étvágy alakult ki [105]. Hasonló hatást mutattak ki macskákban végzett kísérletekben is, kétoldali amygdala léziót követően azt tapasztalták, hogy az állatok hyperphagiássá váltak és testtömegük 6-8 hétig gyarapodott. Továbbá az AMY teljes kiirtása hyperphagiát és elhízást eredményezett, a macskák még a romlott ételeket is elfogyasztották, sőt az ehetetlen tárgyakat is megpróbálták megenni (omniphagia), amit a Klüver-Bucy szindróma egyik tüneteként is értelmezhetünk. Ugyanakkor látszólag ellentmondó eredményekről is beszámoltak, patkányban az AMY kétoldali léziója adipsiát és aphagiát eredményezett [199], specifikusabb, a CeA-ra korlátozódó lézió viszont hím patkányokban fokozta a zsírtömeg gyarapodását [14].

Ezt követően az 1970-es években Fornberg kutyákkal végzett AMY léziós kísérletei is igazolták, hogy az AMY táplálékfelvételi magatartásban betöltött szerepe nem egységes. A CeA léziója hypophagiát és testtömeg csökkenést okoz, míg a BLA roncsolása hyperphagiát és testtömeg növekedést eredményez [55-60]. Így hasonlóan a hypothalamushoz az AMY-ban is található egy éhség, illetve egy jóllakottság központ, vagyis a CeA és az LH, valamint BLA és a VMH szerepe hasonló a táplálékfelvétel szabályozásában. Hangsúlyozni kell azonban, hogy az amygdaláris központok szerepe nem egyenértékű a hypothalamus centrumaival, ugyanis az AMY említett területeinek csak módosító hatása van a hypothalamus táplálkozás szabályozó folyamataira [78, 107]. Az AMY a limbikus rendszer részeként elsősorban az érzelmi állapot befolyásolása és tanulási folyamatok révén játszik kiemelkedő szerepet a táplálékfelvételi magatartás létrejöttében. Számos neuropeptidről bebizonyosodott, hogy amygdalába történő injektálásuk befolyásolja a táplálékfelvételt. Többek között a galanin intraamygdaláris injektálása növelte a táplálékfelvételt [196], a CRH (kortikotropin-releasing hormon) BLA-ba adva csökkentette, míg a CeA-ba adva nem befolyásolta a táplálékfelvételt [93]. Továbbá az enterostatin és az orexigén hatásáról ismert NPY mikroinjektálása az AMY-ba csökkentette a zsírbevitelt [128, 173]. Igazolták továbbá, hogy a ghrelin [206], a bombesin, illetve a bombezinszerű peptidok: a gasztrin-releasing peptid [49] vagy a neuromedin C [50] központi idegrendszeri hatásainak egy része szintén az amygdalán keresztül valósul meg. Immunhisztokémiai vizsgálatok kimutatták az RFRP immunoreaktív rostok jelenlétét a limbikus rendszer számos struktúrájában, beleértve az AMY-t is [65, 235, 236].

Az AMY esszenciális szerepet játszik az emocionális magatartási folyamatok, vagyis az emóciók (félelem, agresszió, düh, öröm) által kiváltott viselkedés és tanulás szabályozásában. Az AMY részt vesz a szorongással kapcsolatos viselkedés szabályozásában is. Az AMY centromediális magjának léziója anxiolitikus hatású, szignifikánsan fokozta az explorációs magatartást radial maze (többkarú útvesztő) tesztben, míg a bazolaterális AMY lézióknak nincs ilyen hatása [75]. A CeA-ra korlátozó lézió szintén szorongásoldó hatásúnak bizonyult, fokozódott az állatok explorációs aktivitása open-field tesztben [228]. Ezzel szemben Treit és munkatársai által végzett kísérletekben az AMY léziója nem bizonyult anxiolitikus hatásúnak emelt keresztpalló tesztben, de csökkentette az állatok tanulását passzív elhárító szituációban [209]. Mind a CeA-ban, mind a BLA-ban kimutatták a szerotonin (5-HT)-, benzodiazepin (BZD), valamint opioid-receptorok jelenlétét, melyek fontos szerepet játszanak a szorongással kapcsolatos magatartás szabályozásában [70, 74, 133, 144, 158, 176, 229]. Benzodiazepin agonisták (például midazolam) injektálása a BLA-ba [166], valamint a GABA agonista muscimol injekciója a CeA-ba szorongásoldó hatásúnak bizonyult emelt keresztpalló tesztben [145]. Ugyanakkor egy nem szelektív opioid-receptor antagonist, a naltrexon adása a CeA-ba csökkenti a diazepam anxiolitikus hatását, míg a BLA-ba injektálva nincs ilyen hatása [18].

A CeA kapcsolatban áll a periaqueductalis szürkeállománnyal (PAG) és a dorzális raphe maggal, mely agyterületek nemcsak a fájdalomérzésben, hanem a külvilági ingerekre adott félelmi/szorongásos válaszok integrálásában is szerepet játszanak [143, 198]. Az AMY működési zavarának valószínűleg szerepe van a generalizált szorongással járó betegségek kialakulásában, míg a PAG fontos szerepet játszik a pánikrohamok kialakulásában [73]. Emberen végzett funkcionális képalkotó vizsgálatok az AMY fokozott aktivációját mutatták depresszióban és egyes szorongással járó betegségeken szenvedő pácienseknél [38, 83].

Az AMY részt vesz a memóriefolyamatok szabályozásában is [164]. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy az AMY részt vesz a hosszútávú memóriefolyamatok kialakításában [20], ha az az emocionális memóriával kapcsolatba hozható, így az erős érzelmi reakciókat kiváltó akár pozitív akár negatív élmények megjegyzésében fontos szerepe van [6, 23]. A memória kialakulásával, illetve retenciójával kapcsolatba hozható számos neuromodulátor rendszer, melyek részt vesznek az intraamygdaláris memória folyamatok szabályozásában. Ilyen neurotranszmitter-neuropeptid rendszer például a noradrenerg, a kolinerg, a GABAerg vagy az arginin-vasopresszin rendszerek [39, 44,

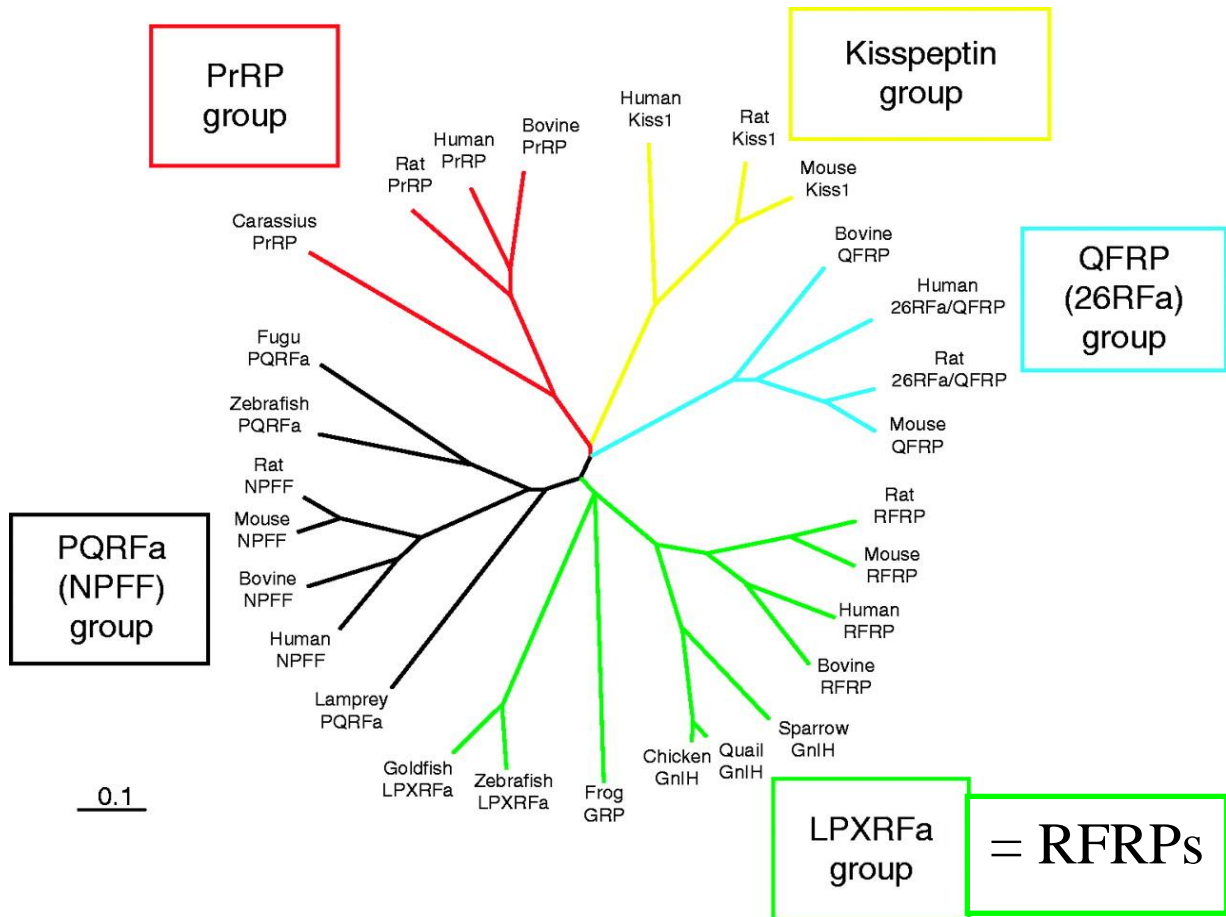
114]. Ezen anyagok intraamygdaloid mikroinjekciója befolyásolja a memória konszolidációt. Ezen felül számos neuropeptidről bizonyított, hogy szerepe van a memória folyamatokban, például az amygdalába injektált substance P memóriát fokozó hatású passzív elhárító tesztben [98]. Acylált ghrelin (A-Ghr) BLA-ba injektálva fokozza a tanulási folyamatokat és a memóriát averzív szituációban [71, 205, 207]. Igazolták továbbá a CeA-ba injektált neurotenszin pozitív megerősítő hatását helypreferencia tesztben és memóriát moduláló hatását passzív elhárító paradigmában [117, 118]. A CeA-nak szerepet tulajdonítanak az asszociatív tanulásban, elsősorban a kondicionált félelemmel kapcsolatos tanulásban és az instrumentális tanulásban [79, 154]. A CeA szelektív léziója vagy az AMY eltávolítása rontja az averzív tanulási szituációkhoz kötött memória kialakulását és rögzülését [77, 125, 149]. A CeA léziójának hatására kimutattak tanulási deficitet appetitív tanulási paradigmákban is [162].

Az AMY-nak az említetteken kívül jelentős szerepe van a pozitív megerősítési-jutalmazási folyamatok, úgymint a drog-addikció koordinálásában. Igazolták, hogy az AMY-ban jelenlévő dopamin receptorok részt vesznek bizonyos drogok jutalmazó hatásának közvetítésében [21, 61, 180, 183, 241]. Az AMY szerepét a megerősítési folyamatokban további irodalmi adatok támasztják alá, mely szerint az AMY egyes magcsoportjaiban elektromos öningerlés is kiépíthető [204, 232]. Heimer és Alheid 1991-ben leírták, hogy a jutalmazási és motivációs folyamatokban az ún. „kiterjedt amygdalának” kiemelkedő szerepe van. A kiterjedt amygdala anatómiai struktúrái a Nacc shell régiója, a CeA és a BNST [84]. Megfigyelték, hogy ezen struktúrák citoarchitektonikai tulajdonságaik, afferentációs és efferentációs kapcsolataik, valamint funkcionális szempontok alapján hasonlóságokat mutatnak [85, 239]. Dopamin D1 receptor antagonistá adása mindhárom agyterületen blokkolta a kokain-önadagolást [46]. Továbbá bizonyították, hogy a CeA-ban és a Nacc-ben amfetaminnal kiépíthető kémiai öningerlés [26, 88]. Számos tanulmány hangsúlyozza az AMY, azon belül is a CeA szerepét a jutalmazás és az inger-jutalom asszociációs tanulás agyi folyamataiban. Munkacsoportunk igazolta, hogy a CeA-ba injektált substance P jutalmazó hatású helypreferencia tesztben [99], továbbá a neurotenszin injektálása ezen agyi magcsoportba szintén pozitív megerősítő hatásúnak bizonyult [117]. Az RFRP peptidek táplálékfelvételi hatásain kívül esetleges megerősítő hatásait is vizsgáltuk, a megfelelő fejezetben részletesen kitérünk erre, azonban először részletesen ismertetném az RFRP peptidek rendszerezését, szerkezetét, hatásait és idegrendszeri lokalizációjukat.

1.3. Az RFamid családkhoz tartozó peptidek rövid jellemzése

Az RFamid családkhoz tartozó peptidek közös jellemzője, hogy peptidszekvenciájuk C-terminálisán egy arginin (R), illetve egy fenilalanin (F) aminosav található, innen származik elnevezésük: RFamid peptidek [63]. Az RFamid peptid családon belül 5 csoportot különíthetünk el: Neuropeptide FF (PQRFa) csoport [52], PrRP csoport [86], LPRFa (RFRPs, GnIH) csoport [211, 219], kisspeptin csoport [182] és a QRFP (26RFa) csoport [25, 64] (1. ábra). Gerincesekben elsőként azonosított RFamid peptid, az 1983-ban csirkékben felfedezett LPLRFamid peptid volt [36]. Hatásai közül érdemes kiemelni, hogy i.c.v. adva csirkékben anorexigén hatást mutatott, ugyanakkor ez a peptid aminosavszekvenciáját tekintve megegyezik a dolgozat tárgyát képező egyik peptid, az RFRP-1 C-terminálisának aminosavszekvenciájával. Emlősben, borjú hypothalamusból izolálták elsőként az NPF csoporthoz tartozó, Neuropeptide FF (NPF) és Neuropeptide AF (NPAF) peptideket [234], melyek részt vesznek a fájdalom-transzmisszióban [96, 160], a táplálékfelvétel szabályozásban [148], a kardiovaszkuláris [4], valamint a stressz-válaszok szabályozásában [92]. Ezen peptidek állnak a legközelebb szekvenciájukat tekintve az RFamid-típusú peptidekhez (RFamide-related peptides), vagyis az RFRP-1 és RFRP-3 peptidhez. Az RFamid család egy másik peptidje a PrRP, mely nevét a prolaktin szint szabályozásában betöltött szerepéről kapta, ma már ismert, hogy fontos szerepe van a táplálékfelvétel szabályozásában, a stressz reakciók kialakításában és az alvás-ébrenlét szabályozásában is [200, 208]. Ismert, hogy rágcsálókban a PrRP i.c.v. injekciója anorexigén hatású [116]. A kisspeptinek a Kiss1 gén által kódolt fehérjék gyűjtőneve. A gén terméke egy 145 aminosavból álló fehérje, ami különböző hosszúságú fragmentumokra hasad (KP-10, -13, -14, -54). A Kiss1 gén ismert, mint humán metasztázis szupresszor gén. Ugyanakkor a kisspeptinről bizonyított, hogy esszenciális komponense a szaporodás centrális szabályozásának, mert a Kiss1 gén vagy a kisspeptin receptor gén hiánya hipogonadotrop hipogonadizmust okoz rágcsálókban és emberben [192, 67]. A kisspeptin centrális beadása GPR54 közvetítésével stimulálja LH és FSH szekrécióját, továbbá irányítja a GnRH pulzatis és surge jellegű felszabadulását [130, 40]. A QRFP csoport két tagja a QRFP26 és a QRFP43, melyeknek centrális alkalmazása növeli a zsírbevitelt patkányokban [172]. E két peptid perifériás hatásai közül említést érdemel a kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt hatásuk. Intravénás alkalmazásukkor hipertenziót és tachycardiát

tapasztaltak, a vérnyomásnövelő hatás alfa és béta receptor antagonistákkal blokkolható volt [48].



1. ábra Az RFamid család felosztása (Osugi és munkatársai, Bechtold és munkatársai)

1.4. Az RFamid családhoz tartozó RFamid-típusú peptidek (RFRPs) felfedezése és jellemzése

Tsutsui és munkatársai 2000-ben madárban izoláltak egy 12 aminosavból álló peptidet, amely gátolta a hypophysis szintjén a gonadotropinok szekrécióját, így a gonadotropin-inhibitory hormon (GnIH) nevet kapta [212]. Későbbi vizsgálatok során kiderült, hogy a GnIH neuronok rostjai szinapszisokat képeznek a GnRH neuronokkal, így gátló hatását kifejtheti a GnRH neuronokon GnIH receptorain keresztül is [216, 210]. A madár GnIH-val homológ peptideket azonosították emlősökben is, melyeket az RFamid-típusú peptidekként (RFRPs: RFamide-related peptides) ismerünk.

Az emlős RFRP gént 2000-ben Hinuma és munkatársai fedezték fel [87]. Patkányban, egérben, borjában és emberben izolálták az RFRP preproteinek aminosavszekvenciáját. A humán génről 3 peptid szintetizálódik, nevezetesen az RFRP-1, RFRP-2 és az RFRP-3. Ellenben egérben és patkányban az RFRP génről csak 2 peptid szintetizálódik, az RFRP-1 és az RFRP-3. A munkacsoport *in situ* hibridizációs technikával vizsgálta az RFRP mRNS expresszációát patkány perifériás szövetben és központi idegrendszerében. Azt találták, hogy az RFRP mRNS legnagyobb denzitással a hypothalamusban fordul elő, azon belül a ventromediális nucleus és a dorsomediális nucleus között, kiterjedve a LH areáig. A humán gén felfedezésével párhuzamosan Liu és munkatársai szintén izolálták egérben és patkányban ugyanazt az RFRP kódoló gént, amit Neuropeptid VF génnek neveztek el, amelyről két peptid szintetizálódik, a Neuropeptid VF és a Neuropeptid SF. Ezek megfelelnek az RFRP-1 és RFRP-3 peptideknek [129]. Így az irodalomban mindkét név elterjedt. Az RFRP-1 és az RFRP-3 peptidek az RFamid peptidcsalád LPXRfamid csoportjába tartoznak. Az X jelöli a leucin (L) AS-at (így az RFRP-1 aminosavszekvenciájának C-terminálása: Leucin-Prolin-Leucin-Arginin-Fenilalanin), vagy a glutamin (Q) AS-at (RFRP-3 aminosavszekvenciájának C-terminálisa: Leucin-Prolin-Glutamin-Arginin-Fenilalanin).

Az RFRP peptidek erősen konzervatív szekvenciát mutatnak, az egyes fajok között is legfeljebb csak egy-két aminosavban térnek el C-terminálisukban. Az RFRP-1 szekvencia azonos patkányban és egérben, és mindössze két aminosavban különbözik a humán szekvenciától. Hasonlóképpen az RFRP-3 is konzervált szekvenciával rendelkezik, patkány és egér, valamint az emberi és szarvasmarha RFRP-3 szekvencia teljesen azonos (I. Táblázat).

Fontos kiemelni, hogy az RFRP-1 aminosavszekvencia utolsó 4 aminosava a Leucin-Prolin-Leucin-Arginin-Fenilalanin (LPLRF) megegyezik a gerincesekben (csirkében) izolált első RFamid peptiddel, amely anorexigén hatású. Továbbá az RFRP-3 esetében a peptid C terminálisán lévő utolsó négy aminosava megegyezik az NPF család 2 peptidjének (NPF, NPAF) aminosavszekvenciájával. A receptorokkal történő interakcióban valószínűleg ez döntő jelentőséggel bír.

I. Táblázat: Az RFamid-típusú peptidek aminosavszekvenciája néhány gerinces fajban és az NPFF család 2 peptidjének szekvenciája patkányban [27, 35, 52, 148].

Faj	Peptid	Szekvencia	Aminosavak száma
Egér	RFRP-1 vagy NPSF	VPHSAANLPLRF SVSFQELKDWGAKKDIKMSPAPAN KVPHSAANLPLRF	12 37
	RFRP-3 vagy NPVF	(V) NMEAGTRSH FPSLPQRF FPSLPQRF	17vs.18 8
	RFRP-1 vagy NPSF	VPHSAANLPLRF SVTFQELKDWGAKKDIKMSPAPAN KVPHSAANLPLRF	12 37
Patkány	RFRP-3 (GNIH) vagy NPVF	ANMEAGTMSH FPSLPQRF FPSLPQRF	18 8
	RFRP-1	SPAPAN KVPHSAANLPLRF	19
Hörcsög	RFRP-3	ILSR VPSLPQRF	12
	RFRP-1	SLTFEEVKDWGPKIKMNTPAVN KMPPSAANLPLRF	35
Szarvasmarha	RFRP-3	VPNLPQRF	8
	RFRP-1 vagy NPSF	MPHSFANLPLRF SLNFEELKDWGPKNVIKMSTPAVN KMPHSFANLPLRF	12 37
Ember	RFRP-2	SAGATANLPLRS	12
	RFRP-3 vagy NPVF	VPNLPQRF NMEVSLVRR VPNLPQRF	8 17
	GnIH	SIKPSAY LPLRF	12
Galamb	GnIH- RP-1	SLNFEEMKDWGSKNFMKVNTPTVN KVPNSVANLPLRF	37
	GnIH- RP-2	SSIQSLLN LPQRF	13
	NPAF	AGEGLNSQFWSLAA PQRF	18
Patkány	NPFF	FLF PQRF	7

Fontos kiemelni, hogy a patkány RFRP-1 vagy másik nevén Neuropeptid SF 12 vagy 37 aminosavból (AS) épül fel, és nincs egyetértés a szekvenciahosszúságban a neveket illetően. Továbbá az RFRP-3 vagy másik nevén Neuropeptide VF esetében, ha NPVF-et említene a publikációkban, akkor többnyire a rövidebb (8 aminosavból álló) peptidet alkalmazták. Kísérleteinkben a patkány RFRP-1 12 AS-ból álló, az RFRP-3 esetében a 8 AS-ból álló formáját alkalmaztuk.

1.4.1. Az RFamid-típusú peptidek szöveti megoszlása

In situ hibridizációs technikával kimutatták, hogy az RFRP gén elsősorban a hypothalamusban expresszálódik, azon belül a dorsomedialis hypothalamusban (DMH), illetve a periventriculáris és paraventriculáris hypothalamus magvakban [65, 235]. Néhány immunhisztokémiai vizsgálat azt mutatja, hogy az RFRP-1 és RFRP-3 (RFRP-1/3) ugyanabban a neuronban expresszálódik a hypothalamusban és a központi idegrendszer számos struktúrájában patkányoknál [236, 181]. Nagyszámú RFRP-1/3 immunreaktív sejttestet azonosítottak a DMH-ban, a ventromedialis nucleus környékén, illetve a dorzális tuberomammilláris magban. RFRP-3 immunreaktív rostok találhatóak a limbikus rendszer különböző területein (a stria terminalis bed nucleusában, az amygdala valamennyi magjában, köztük a CeA-ban), a hypothalamusban (legnagyobb denzitással a laterális hypothalamicus areában, az arcuatus magban és a ventromediális magban), a thalamusban (centrális, laterális és mediális magjában) és a NTS-ban [94, 112]. További immunhisztokémiai vizsgálatok RFRP-3 immunreaktív terminálisokat mutattak ki az amygdalában és a köztiagyban, legnagyobb számban a mediális amygdalában és a thalamus paraventriculáris magjában [27].

RFRP-1 immunreaktív rostok legnagyobb denzitással a hypothalamus ventromediális magjában (VMN) fordulnak elő, ugyanakkor néhány limbikus struktúrában (többek közt az AMY-ban, valamint a septális magokban) is jelentős mennyiségű RFRP-1 tartalmú rostot azonosítottak. Az RFRP-1 immunreaktív rostokat találtak az agytörzs magjai közül nagy denzitással a NTS-ban, a PAG-ban, a medialis és laterális parabrachialis magban, közepes sűrűségben a dorzális raphe magban és a LC-ban. Fukusumi és munkatársai kromatográfiás és immunhisztokémiai vizsgálatai RFRP-1 rostok jelenlétét legnagyobb koncentrációban a hypothalamusban, nagy koncentrációban a thalamusban és a közepagyban, közepes koncentrációban az

agykéregben, a striatumban és a nyúltvelőben, míg alacsony koncentrációban a HPC-ban és a kisagyban detektálták [65].

Rizwan és munkatársai RFRP-1/3 immunreaktív rostot nagy denzitásban azonosítottak a HPC CA2/CA3 régiójában, szórványosan a Nacc-ben, a preopticus areában, a periventriculáris nucleusban, az anterior hypothalamicus areában és a LH-ban [181]. RFRP peptidek i.c.v.adása c-Fos protein (a neurális aktivitás markere) expressziót indukál a hypothalamus arcuatus magjában, a LC-ban és a NTS-ban [236].

Az RFRP-3 neuronok terminálisai hörcsög, borjú, majom és emberi hypothalamusban kiterjednek az eminentia mediana külső (neuroszekréción) zónájára [28, 113, 193]. Ezeket a projekciókat patkányban eddig nem sikerült felfedni, bár egy tanulmány említést tesz a jelenlétükről, melyben egy olyan antitestet használtak az RFRP-3 rostok kimutatására, amely különbözött a korábban rágcsálókban használtaktól. Ez felveti a lehetőséget, hogy az RFRP-3 a portális vénán keresztül bejut az adenohypophysisbe, ahol befolyásolja a gonadotropinok szekréciónját. Patkányban RFRP-3 rostokat lokalizáltak a GnRH sejtek közvetlen közelében a preopticus areán belül [94].

1.4.2. RFamid-típusú peptidek receptorai

Az RFRP peptidek két receptoron keresztül fejtik ki hatásukat: NPFF1 és NPFF2 (NPFF-R) receptorokon. Bonini és munkatársai munkája nyomán az NPFF receptorok gén DNS szekvenciája 2000-ben vált ismertté, továbbá a receptorok endogén ligandjaként elsőként az NPAF és az NPFF peptideket azonosították [12]. A humán NPFF2 gén a 4. kromoszómán lokalizált, míg az NPFF1 gén a 10. kromoszómán közel a NPY Y4 génhez. Szekvencaanalízis (PCR) vizsgálatok felfedték, hogy a humán és a patkány NPFF1 receptor (430, illetve 432 aminosavból felépülő protein) 87%-os homológiát mutat [12, 45, 129]. Érdekes továbbá megemlíteni azt is, hogy a NPFF1 receptor relatíve nagy szekvenca-homológiát mutat más peptidek, mint az orexin1 (37%), orexin2 (35%), neuropeptid Y2, Y1, Y4 (34%, 32%, 31%), cholecisztokinin (34%), PrRP (32%) receptoraival, melyek szerepet játszanak a táplálékfelvételi folyamatokban. NPFF2 receptor aminosavszekvenciája szintén szekvenca-homológiát mutat, a patkány és a humán NPFF2 receptor 78%-ban mutat azonosságot (420 és 417 aminosavból felépülő proteinek), melyek 49-50%-ban homológiát mutatnak a patkány és hNPFF1 receptorokkal [12]. Az NPFF receptorok (másik nevükön NPFF1:

OT7TO22, NPFF2: HLWAR77, NPGPR és GPR74) G-protein kapcsolt receptorok családjába tartozó, 7 transzmembrán doménnel rendelkező polipeptidek [45]. Az NPFF2 receptorok Gi vagy Go proteint kötő receptorok, melyen keresztül a ligand kötődése az intracelluláris cAMP-szintet csökkenti. Az NPFF1 aktiválódása képes mind a cAMP csökkentésére, mind pedig a cAMP szint emelésére [87]. NPFF1 képes Gs (stimuláló) proteinek kötő receptorokat is aktiválni, ezt bizonyítják Gherardi és Zajac kísérletei is, melyek szerint az olfactoricus bulbus membránban az NPFF peptid receptorkötődést követően az adenilát cikláz enzim aktivációját okozza [68].

Az NPFF receptorok 30-35%-os azonosságot mutatnak az NPY receptorokkal [12]. Filogenetikai és kromoszómális vizsgálatok felfedtek egy közeli kapcsolatot a GPR10 receptor (PrRP receptora) és az NPY receptorcsaládok között [115], továbbá egy evolúciós kapcsolatot az NPFF receptorok és az NPY receptorok között. Az NPFF és NPY peptidek megegyező C-terminális aminosavszekvenciával rendelkeznek (RFamid), ami lehetséges interakciót feltételez az NPFF és NPY receptorokkal [19, 136].

Az NPFF receptorokat az endogén ligandjaik iránti eltérő affinitás jellemzi, az RFRP-1 és RFRP-3 legnagyobb affinitással az NPFF1 receptorhoz, míg az NPFF és az NPAF peptidek az NPFF2 receptorhoz kötődnek nagyobb affinitással, azonban mind az RFRP peptidek, mind az NPFF családhoz tartozó peptidek mindkét receptorhoz kötődve képesek hatást kifejteni [12, 45, 68, 129]. Számos kísérletben vizsgálták a peptidek agonista aktivitását és megállapították, hogy az RFRP-3 és az RFRP-1 nagy affinitással kötődik az NPFF1 receptorhoz, de gyenge affinitást mutat az NPFF2 receptorhoz. Az in vitro és in vivo kísérleti eredmények alapján így az NPFF1 receptort tartják az RFRP peptidek endogén receptorának.

1.4.3. RFamid-típusú peptidek receptorainak (NPFF receptorok) előfordulása

Biokémiai és autoradiográfiai analízissel számos kutatócsoport vizsgálta az NPFF1 és NPFF2 receptor-kötő helyeit, valamint a receptorok mRNS előfordulását patkány központi idegrendszerében [12, 129, 230]. Legnagyobb denzitással az NPFF1 kötőhelyeket a laterális septumban, az anterodorzális thalamicus magban és a colliculus superiorban találták. Közepes koncentrációban találták a Nacc-ben, a stria terminalis beágyazott magjában és az interpedunculáris magban. Alacsonyabb koncentrációban

pedig a thalamicus magvakban, HPC-ban és az AMY-ban azonosították. NPFF1 mRNS viszonylag magas koncentrációban található a hypothalamicus magvakban, a laterális septumban, az anterodorzális thalamicus magban, a bulbus olfactoricusban, a CeA-ban, továbbá a substantia nigrában. NPFF2 kötőhelyek legnagyobb denzitással a parafasciculáris és a reticuláris thalamicus magokban, a laterális hypothalamusban, a spinális trigeminális magban és a gerincvelőben detektáltak. NPFF2 mRNS előfordulása különösen jellemző a gerincvelőben, a NTS-ban, a parafasciculáris thalamicus magban és az LH-ban [129].

Chung-Hung Wu és munkatársai külön vizsgálták a dopaminerg mesocorticolimbicus pálya rendszerében az NPFF1 és NPFF2 receptorok előfordulását [230]. Azt találták, hogy a VTA-ban mindkét receptor nagy mennyiségben expresszálódik, illetve a PFC-ben és a Nacc-ben szintén jelen van mindkét receptor típus. Továbbá a VTA-ban mind a dopaminerg (tirozin-hidroxiláz-pozitív) neuronokon, mind pedig a GABAerg (glutaminsav dekarboxiláz-67 pozitív) neuronokon kimutatták az NPFF receptorokat. Korábban még az NPFF1 és NPFF2 receptorok azonosítása előtt, Allard és munkatársai ugyancsak leírtak NPFF kötőhelyeket a dopaminerg mesocorticolimbicus rendszer néhány struktúrájában: a VTA-ban, a cinguláris kéregben, a caudatumban és a putamenben [3]. Továbbá Dupouy és Zajac szintén kimutatták a NPFF lokalizációját a VTA-ban és a Nacc-ben [42].

A humán vizsgálatok az állatkísérleti eredményekhez hasonló eloszlást írtak le: magas koncentrációban detektálták NPFF1 mRNS-t az AMY-ban, a Nacc-ben és a hypothalamicus magvakban. Érdekes különbség azonban, hogy patkány gerincvelőben főként NPFF2 receptorokat detektáltak, míg emberben a gerincvelőben NPFF1 receptorokat mutattak ki nagyobb számban [69].

1.4.4. NPFF receptor antagonisták

In vitro kísérletekben vizsgálták különböző RFamid analógok antagonistá aktivitását (funkcionális aktivitás, EC50), valamint a ligandok affinitását (IC50) a receptorokhoz, nevezetesen az RF2 (benzoyl RFamid dipeptide), RF9, RF48 és RF49 peptideket. Azt találták, hogy az RF2 gyenge affinitást mutat mindkét NPFF receptor típushoz. Az RF48 és RF49 az NPFF2 receptor iránt mutat nagyobb affinitást, míg az NPFF1 receptorhoz gyengébb affinitással rendelkezik. Ezen 3 analógról felfedték, hogy részleges agonista aktivitással is rendelkeznek [194]. Az RF9 vizsgálata során kiderült,

hogy mind az NPPF1, mind az NPPF2 receptor iránt nagy affinitást mutat. Továbbá megvizsgálták más receptorokhoz való kötődését is, mint például a NPY1 és más rokon GPR-receptor (GPR10, GPR54, GPR103), valamint opioid receptorok esetében. Az RF9 nagyon jó szelektivitással rendelkezik, nem mutat e receptorok iránt kompetitív aktivitást 10 μ M-dózisig. Ezen eredmények demonstrálják, hogy az RF9 egy erős és szelektív NPPF receptor antagonistája, ugyanakkor a két NPPF receptor szubtípus iránt nem mutat szelektivitást. Az RF9 *in vivo* kísérletekben szintén nagyon hatékony antagonistának bizonyult [194]. Patkányban az RF9 blokkolta az NPPF indukálta vérnyomás és szívfrekvencia növekedést. Továbbá, az RF9 előkezelés kivédte az opioid indukálta hiperalgéziát [194]. Irodalmi adatok szerint az RF9 képes az NPPF receptorok által közvetített magatartási hatások blokkolására. NPPF *i.c.v.* injekciója gátolja az amfetamin indukálta helypreferenciát, ugyanakkor az RF9 előkezelés blokkolta az NPPF hatását. Önmagában adott RF9 nem változtatta meg az amfetamin indukálta helypreferenciát. RF9 *i.c.v.* adása nem befolyásolta a magatartási paramétereket emelt keresztpalló tesztben, illetve rotarod tesztben sem [108]. Az RFRP-3 (VPNLPQRF-amid) agykamrába adva egerekben hypotermiát indukált, ami RF9 előkezeléssel kivédhető volt. Fontos kiemelni azt a feltételezést, hogy az előbbi hatásért valószínűleg az NPPF1 receptorok aktivációja felelős [146, 175]. Az RF9 a dansyl-PQRamid (egy szelektív NPPF2 receptor agonista) hyperthermiás hatását szintén blokkolta egerekben [146]. Mindazonáltal az RF9 nem tudta kivédeni a hRFRP-1 okozta kontraktilitást gátló hatást patkány szívizomban, amely szintén NPPF2 receptoron keresztül közvetítődik [153].

A BIBP3226 komponens, melyet elsőként úgy azonosítottak, mint egy nem peptid típusú NPY Y1 receptor antagonistája, melyről később *in vitro* kísérletekben bebizonyosodott, hogy nagy affinitást mutatott mind NPPF1, mind az NPPF2 receptorokhoz is [185]. NPPF és RFRP-3 peptidek intravénás adása patkányban növelte a vérnyomást és artériás középnyomást, amit a peptidek együttes adása a BIBP2226 antagonistával ugyan csökkentett, de nem blokkolta teljesen a vérnyomásnövelő hatásukat [47]. Továbbá az NPPF és RFRP-3 *i.c.v.* adása hypothermiát indukált egerekben, mely hatásokat a BIBP3226 teljes mértékben eliminált. RFRP-3-nak önmagában adva nincs hatása fájdalomtesztben (farok elrántási: tail-flick teszt), ugyanakkor morfinnal történő együttes alkalmazása növelte a morfin analgéziát [47]. Az RFRP-3 ezen hatását a BIBP3226 nem volt képes blokkolni.

Kísérleteinkben az RF9 antagonisták alkalmazása mellett döntöttünk, noha a BIBP3226 antagonistát is választhattuk volna. Fontos megemlíteni, hogy a BIBP3226 egy erős NPY Y1 receptor antagonisták, noha az NPFF és RFRP-3 hatásai függetlenek az NPY Y1 receptortól, mivel ezen peptideknek nem képesek kötődni az NPY receptorokhoz [159]. Ugyanakkor a CeA-ba azonosították a NPY Y1 receptortípust, amihez a BIBP3226 antagonisták nagy affinitást mutat, így ezen antagonisták alkalmazása helyett az RF9 antagonistát választottuk. Az RF9 egy peptid típusú, erős és szelektív NPFF receptor antagonisták, melyet RF9 trifluoroacetát só formájában vettünk (Sigma Co.), majd fiziológiai sóoldatban oldva injektáltuk a CeA-ba. (Az RF9 esetében azonos eljárást alkalmazták, melyet számos más peptidnél is használnak, így az RF9 liofilizáltan, trifluoroacetát só formájában került hozzánk.)

1.4.5. Az RFamid-típusú peptidek hatásai

Mint az már jól ismert az RFRP-3 peptid kulcsfontosságú szerepet játszik a reprodukcióban, szaporodási magatartás szabályozásában. RFRP-3 peptidet a madár gonadotropin gátló hormon (GnIH) emlős formájaként azonosították, mert genetikailag rokon és funkcionálisan hasonló hatású, mint a madár GnIH [28, 213, 217, 218]. Egérben végzett elektrofiziológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az RFRP-3 [(humán RFRP-3 (8AS)] közvetlenül hat a GnRH neuronokra a hypothalamusban, gátolja a neurális aktivitásukat, vGlut2 (vezikuláris glutamát transzporter) direkt gátlásával [231]. Továbbá az RFRP-3 centrális vagy perifériás alkalmazása csökkenti a plazma LH szintjét ovariectomizált szíriai hörcsögökben és patkányokban, ugyanakkor nincs hatással a plazma FSH szintjére, valamint a TRH-ra és a kortizol szintre sem [113, 147, 181]. Érdekes megfigyelés, hogy az RFRP-3 i.c.v. injektálása növeli a növekedési hormon szintjét függetlenül a napi periodicitástól [94].

Az RFRP-1 szintén erős szerkezeti homológiát mutat a GnIH-val, de eddigi kimutatott hatásait tekintve a szaporodásban nincs jelentős funkciója. Bár egyes eredmények arra utalnak, hogy a prolaktin regulációjában van szerepe. Hinuma és munkatársai megfigyelték, hogy az RFRP-1 centrális adása a plazma prolaktinszint növekedését eredményezi az injektálást követő 10-30. percben, ami úgy alakulhat ki, hogy a peptid a hypothalamicus periventriculáris dopaminerg neuronokat gátolja, így a prolaktin felszabadul a dopaminerg gátlás alól (diszinhíbió) [87, 189]. Ugyanakkor kimutatták, hogy ezeken a neurokon expresszálódik a peptid nagy affinitású receptora

is, az NPFF1. Más hypophysis hormonra, úgy mint a GH, FSH, LH, TSH és ACTH nincs hatása [189]. Egyes szerzők ellenben azt tapasztalták, hogy az RFRP-1 vagy RFRP-3 i.c.v. injekciója stressz hormon (ACTH) felszabadulást indukál, valamint fokozza az oxytocin neuronok aktivitását [95].

Ismert, RFRP-ir neuronok nagy számban expresszálódnak a dorsomedialis hypothalamusban [65, 236], amely struktúra kulcsfontosságú szerepet játszik a neuroendokrin és magatartási stresszválaszok szabályozásában. RFRP-3 igen nagy dózisu (7.5 nmol dózis, amely kb. százszorosa az általunk használt effektív dózisoknak) i.c.v. alkalmazását követően anxiogén hatást mutattak ki open field tesztben. RFRP-3 hatására csökkent az állatok lokomotoros aktivitása, illetve a centrális areában (open field apparátus középső területe) töltött idő. RFRP-1 igen nagy dózisu alkalmazását követően open field tesztben csökkent az állatoknak a centrális areában töltött idejük, azonban a lokomotoros aktivitásuk a kontroll csoporthoz képest nem változott. Az RFRP-1 és RFRP-3 i.c.v. adása patkányokban növelte a plazma ACTH és oxytocin koncentrációját, míg a vazopresszin koncentrációra nem volt hatással [95]. Fontos tudnunk, hogy az oxytocinnak bizonyították anxiolitikus hatását a CeA-ba [5] és a PVN-ba [11]. Továbbá az oxytocin akut és/vagy krónikus centrális adása szintén szorongásoldó hatású patkányban és egérben [177], valamint a CeA-ba injektált oxytocin receptor antagonistá előkezelés eliminálta az oxytocin anxiolitikus hatását [151]. RFRP neuronokat azonosították a hypothalamicus PVN-ba és SON-ba is, feltételezik, hogy ezen neuronok idegrostjainak egy része a CRH és az oxytocin tartalmú sejteken végződnek [174].

Az RFRP-3 i.c.v. adása egérben testhőmérséklet csökkenést okozott, mely NPFF receptor antagonistá RF9 előkezeléssel kivédhető volt [47]. Ugyanakkor egy szelektív NPFF2 receptor agonista, a dansyl-PQRamide agykamrába történő injektálása növelte a testhőmérsékletet, ami RF9 előkezeléssel szintén blokkolható volt [146]. Az NPFF centrális alkalmazása hypothermiát indukált egerekben, amit az RF9 előkezelés eliminált [47]. Az RFRP-3 nagyobb affinitást mutat az NPFF1 receptor iránt, míg az NPFF sokkal szelektívebb az NPFF2 szubtípusra. Ezen eredmények azt sugallják, hogy az NPFF receptor szubtípusok ellentétes hatást közvetítenek a testhőmérséklet vonatkozásában.

Az RFRP-3 centrális adása indukál egy csekély antinociceptív hatást (farok-elrántási tail-flick fájdalomtesztben) az injektálást követő 30 percben, ez azonban nem érte el statisztikailag szignifikáns szintet, vagyis csak tendenciaként említhető.

Ugyanakkor morfinnal történő együttes alkalmazását követően az RFRP-3 a morfin indukálta antinociceptív (analgeziás) hatás növekedését és meghosszabbodását eredményezte, mely hatás szignifikáns volt [47]. Fontos megemlíteni, hogy az NPPF i.c.v. alkalmazása ugyanakkor gátolja a morfin indukálta analgeziát [47].

Az RFRP-3 i.v. adása növeli a vérnyomást, az artériás középnyomást, valamint tachycardiát okoz patkányban. Az NPPF i.v. alkalmazása ugyancsak vérnyomás-, artériás középnyomás növekedését és tachycardiát eredményez [47]. Megemlítendő, hogy PCR vizsgálatok kimutatták, hogy patkány cardiovascularis rendszerében túlnyomórészt NPPF2 receptorok lokalizáltak [12].

Különböző fájdalomtesztekben (monofilament teszt, paw pressure teszt, farok-elrántási: tail-flick teszt) végzett kísérletek során kimutatták, hogy az RFRP-1 [humán RFRP-1 (12AS)] intrathecalis adása taktilis antiallodiniát és termális antinociceptív hatásokat indukált patkányban [165]. Míg a peptid NTS-ba történő injektálása során mechanikai antihyperalgetikus hatást figyeltek meg. Az RFRP-1 ezen fájdalom moduláló hatásait az NPPF2 receptoron közvetíti, mely receptort nagy denzitásban lokalizálták a gerincvelőben, valamint a NTS-ban, ahol az NPPF1 receptort nem detektálták [129]. Ugyanakkor az RFRP-1 [patkány RFRP-1 (37AS)] centrális alkalmazása szupressálja a morfin analgeziát formalin tesztben és hot plate tesztben patkányban [129].

RFRP-3 neuronok közvetlenül küldenek efferenseket a táplálékfelvételt szabályozó hypothalamicus sejtekhez a LH-ba, a VMN-ba és az arcuatus magba (POMC és NPY sejtekhez) szarvasmarha [174] és egér agyban [66], valamint hasonló projekciókat találtak rhesus majmokban is [217]. Elektrofiziológiai kísérletek eredményei alapján elmondható, hogy az RFRP-3 gátolja a POMC neuronokat és csökkenti a POMC neuronok kisspeptin okozta aktivációját egerekben [66]. Továbbá, patkányokban az RFRP peptidek i.c.v adása c-Fos protein expressziót eredményez a hypothalamus arcuatus magjában [236].

Newmyer és munkatársai csirkéken végzett vizsgálataik során megfigyelték, hogy i.c.v. RFRP-1 injekciókat követően csökkent az állatok víz- és táplálékfelvétele [152]. Vizsgálták továbbá a peptid injektálását követően a vér glükózkonzentrációját és a magatartási formák (sztereotíp viselkedési formák) változását. Nem tapasztaltak szignifikáns különbséget a peptid injektálását követően sem a vér glükózkonzentrációjában, sem a viselkedési formákban a kontroll kezelésekhöz viszonyítva. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az RFRP-1 anorexigén hatása nem

hozható összefüggésbe anxiogén hatás megjelenésével. Az RFRP-3 centrális injektálása csirkékben jóllakottságot indukál, ugyanakkor a vízfelvételt nem befolyásolja [29]. Érdemes továbbá megemlíteni azt is, hogy a PrRP i.c.v. adása csirkékben orexigén hatású, ugyanakkor a PrRP kezelés után alkalmazott RFRP-3 eliminálja a PrRP táplálékfelvételt növelő hatását [29]. Fontos megfigyelés, hogy az obes ob/ob leptin deficiens típusú egerekben az arcuatus magban RFRP-3 expresszió csökkenést figyeltek meg, míg ugyanezen egerekben leptin injektálását követően az RFRP-3 expresszió növekedését tapasztalták az arcuatus magban [233].

Patkányokon az RFRP-3 i.c.v. alkalmazását követően táplálékfelvételt fokozó hatásról számoltak be. Valójában Johnson és munkatársai, valamint Murakami és munkatársai ugyanazt a módszert alkalmazták az RFRP-3 orexigén hatásának kimutatására. Nevezetesen RFRP-3 i.c.v. (500 ng dózist injektáltak 0,3 vagy 0,5 ul térfogatban) alkalmazását követően mérték a szilárd táplálékfelvételt, melynek során egy óra elteltével nem volt kimutatható szignifikáns hatás, míg a 2 órás mérésnél szignifikáns táplálékfelvétel növekedést tapasztaltak [94, 147].

A mi kutatásaink jelentős része szintén az RFRP peptidek táplálékfelvételre gyakorolt hatásának vizsgálatára irányultak, az i.c.v. beadás helyett azonban specifikusabb, a CeA-ra korlátózódó RFRP mikroinjektálásokat végeztünk.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Korábbi kísérletek alapján megállapították, hogy az RFRP-3 i.c.v. adva fokozza a táplálékfelvételt patkányban, továbbá az RFRP-1 anorexigén hatású i.c.v. alkalmazva csirkékben. A centrális amygdalában kimutatták mindkét peptid jelenlétét, valamint NPFF1 receptorokat is. Az eddigi vizsgálatok csekély információt nyújtanak ezen peptidek táplálékfelvételre és egyéb magatartási folyamatokban betöltött szerepükre vonatkozóan. Az irodalomban nem találtunk adatot arra vonatkozóan, hogy az amygdalába mikroinjektált RFRP-1 és RFRP-3 miként befolyásolja a táplálékfelvételi magatartást és egyéb magatartási folyamatokat. Kísérleteinkben az AMY egy jól körülhatárolt magcsoportjára a CeA-ra fókuszáltunk, mivel ezen intraamygdaloid régió bizonyítottan szerepet játszik a táplálékfelvételi magatartás, stressz-válaszok és megerősítési folyamatok szabályozásában.

- 1) Vizsgálataink arra irányultak, hogy az RFamid-típusú peptidek emlős (pontosabban rágcsálók) idegrendszerben előforduló képviselői, az RFRP-1 és RFRP-3 a CeA-ba injektálva kifejtenek-e hatást a táplálékfelvételre.
 - a) Vizsgáltuk az RFRP-1 és RFRP-3 táplálékfelvételre gyakorolt hatását ad libitum táplált patkányokban.
 - b) *Autoradiográfiás, illetve immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei szerint a centrális amygdala gazdagon ellátott RFamid-típusú peptideket kötő receptorokkal (NPFF1 receptorokkal). Bár a peptidek affinitást mutatnak az NPFF-2 receptor szubtypushoz is, azonban a CeA-ban ezt a receptor szubtypust nem sikerült felfedni. Kísérleteinkben tanulmányoztuk, hogy a táplálékfelvételre gyakorolt hatás specifikus-e, azaz NPFF-receptor antagonistákkal előkezeléssel kivédhető-e?*
 - c) Vizsgáltuk, hogy a 24 órás táplálékmegvonás indukálta éhség-hajtóerő: motivációs drive milyen hatással van az RFRP-1 és RFRP-3 okozta táplálékfelvétel változásra.

d) Vizsgáltuk az RFRP-1 és RFRP-3 akut táplálékfelvétel változást indukáló hatásának lehetséges egyéb nem specifikus okait:

- vizsgáltuk az RFRP-1 és RFRP-3 hatását a testhőmérséklet változásra (esetleges hypothermiát, hyperthermiát kiváltó hatást), a vízfelvétele, valamint a magatartási változásokra (különböző magatartásformákat vizsgáltunk: evés, mosakodás, vakaródzás, exploráció, pihenés).

2) Tanulmányoztuk a CeA-ba injektált RFRP-1 és RFRP-3 hatását patkányok spontán motoros aktivitására open field tesztben, valamint szorongásra kifejtett hatását emelt keresztpalló tesztben. *Fontos volt megvizsgálni, hogy a peptidek befolyásolják-e a lokomóciót, illetve ha anxiogén vagy anxiolitikus hatást indukálnak, akkor az a táplálékfelvétel mértékét is befolyásolhatja.* Továbbá, NPPF-receptor antagonistákkal előkezeléssel próbáltuk igazolni az NPPF1 receptorok szerepét az anxiolitikus vagy anxiogén hatás közvetítésében.

3) Vizsgáltuk az RFRP-1 és RFRP-3 esetleges jutalmazó, pozitív megerősítő vagy averzív hatását helypreferencia teszttel. *Helypreferencia teszt során, ha az állatok az apparátus egy adott térrészében több időt töltenek, mint a többi részen, azt nemcsak a preferencia kialakulása okozhatja, hanem lehet a hipoaktivitás következménye is, amely magyarázható lehet az anyag szorongáskeltő hatásával. Ezt az előbb említett emelt keresztpalló tesztben vizsgáltuk, illetve a helypreferencia teszt specifikus paramétereit is elemeztük.*

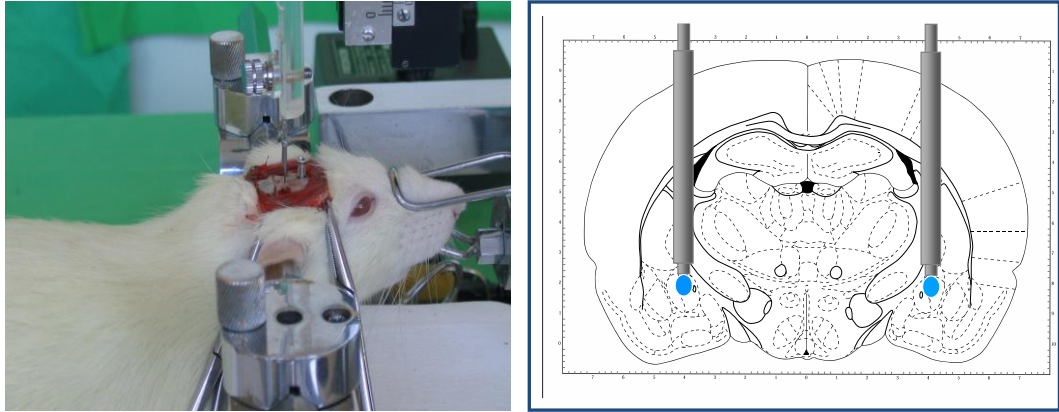
3. ANYAGOK és MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteink során 280-320 g testtömegű hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatok két héttel a műtétek előtt kerültek át a tenyészetből a klimatizált állatházunkba, ahol külön ketrecekbe helyeztük el őket. A helyiségben a hőmérséklet 22 ± 1 °C, a relatív páratartalom 50-60 %-os volt. Mesterséges megvilágítást alkalmaztunk, melynek során a napszakok szerinti 12-12 óra sötét és világos periódust (reggel 6 órai kezdettel) biztosítottunk. A magartartási kísérletek során a patkányok standard laboratóriumi tápot (CRLT/N egységes rágcsálótáp, Charles River Magyarország Kft., Budapest) és csapvizet ad libitum fogyaszhattak. A táplálékfelvételi kísérleteknél a víz korlátlanul, szilárd táp csak a kísérleteknek megfelelően állt rendelkezésükre. A patkányokat a műtéteket megelőzően „handlingeltük”, azaz a kísérletet végzők kezéhez szoktattuk, melyre azért volt szükség, mert a mikroinjekciókat kézben tartott éber állatoknak adtuk be. Az állatok tartásánál és a kísérletek során végig egyetemünk, ill. a nemzetközileg érvényes állatetikai kódex szabályait betartva jártunk el (Pécsi Tudományegyetem, ill. European Union Council Directive 86/609/EEC, National Institutes of Health Guidelines for Laboratory Animals).

3.2. Műtétek

A műtétek során az altatáshoz ketamin (80mg/testtömeg kg, Calypsol Richter Gedeon) és diazepam (20mg/testtömeg kg, Seduxen Richter Gedeon) 4:1 arányú keverékét használtuk, melyet i.p. alkalmaztunk. A sztereotaxikus technikával végzett műtétek során rozsdamentes fém vezetőkanülöket bilaterálisan vezettünk be a CeA fölé (2. ábra). A kanülök átmérője 22 gauge (0,7 mm) volt és belső vége a célzott struktúra felett 1 mm-rel helyezkedett el. A célzott terület koordinátáit Paxinos és Watson agyatlasza [163] alapján határoztuk meg: AP: a bregmához viszonyítva -2,3 mm, ML: $\pm 4,1$ mm, DV: -6,5 mm a dura felszínétől számítva.



2. ábra A műtéthez használt sztereotaxikus készülékbe fogott állat, valamint patkány agyszelet sematikus képe Paxinos és Watson agyatlása alapján a célterületnek megfelelően a kanülök és mikroinjekciók helyének ábrázolása

A vezetőkanülöket a koponyacsontba erősített csavarok segítségével és fogászati akriláttal (Duracryl, Dental, Csehország) rögzítettük a koponyacsonthoz. A műtét végén a kanülöket 27 gauge (0,4 mm) átmérőjű rozsdamentes acéldugóval zártuk le, megakadályozva ezzel az eltömődésüket. Az állatok testtömegét a műtétet megelőzően és azokat követően is naponta mértük, a műtétet követő ötödik napon az állatok testtömege elérte vagy meghaladta a preoperatív értéket.

3.3. A kísérletek menete

Kísérleteinket a felépülési időszakot követően a 7. postoperatív napon kezdtük meg. Ezen idő alatt az állatok visszanyerték vagy meghaladták a preoperatív súlyukat. Táplálékfelvételi kísérleteink önkontrollosak voltak, ami azt jelenti, hogy a kísérleti napon az állatcsoport random módon kiválasztott résztvevőit adott peptiddel, másokat vehiculummal kezeltük, majd a következő kísérleti napon felcseréltük a kezeléseket.

A nemzetközileg elfogadott és a gyakorlatban használt önkontrollos kísérleti paradigmát kutatócsoportunk már korábban is alkalmazta a táplálékfelvételi kísérleteknél. Az RFRP peptidek esetében ugyancsak ezt a paradigmát választottuk. Ennek több oka volt: a peptidek közvetlen amygdalába történő mikroinjekciója esetében nem állt rendelkezésre adat a hatékony dózistartományt illetően, ezért több dózist kellett alkalmaznunk. A különböző koncentrációjú oldatok hatásának vizsgálatához sok mikroinjekció szükséges. Azonban az agyszövet funkcionális épségének megőrzése

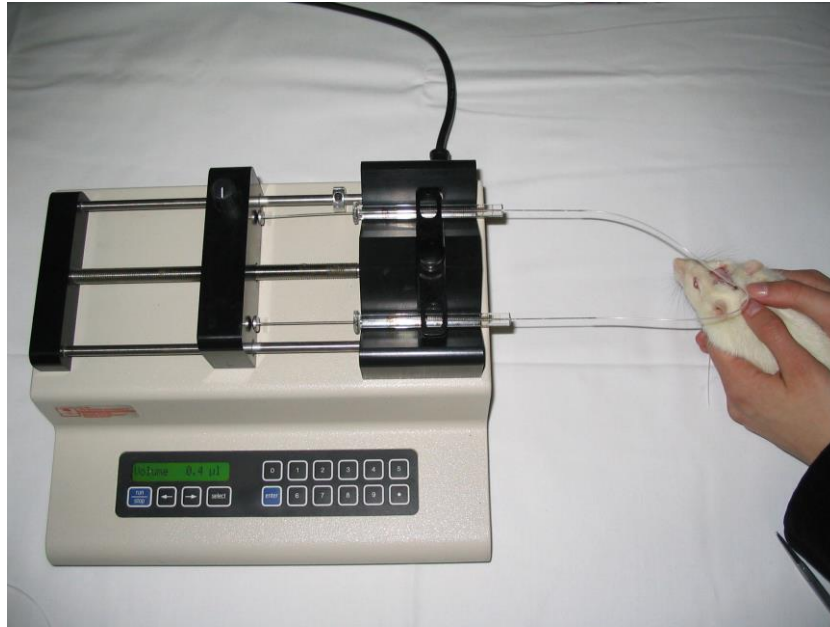
érdekében a mikroinjekciók száma korlátozott. Így az eltérő, több dózisban történő mikroinjekciók használata nagy állatszámot is igényel. Más kísérleti elrendezés esetén az állatcsoportoknak az eltérő dózisú RFRP kezelések kivitelezése rövid időn belül (viszonylag egyidőben) nagyon nehezen valósítható meg. Ezért a rövid időn belül történő több dózisú mikroinjekciók alkalmazására az önkontrollos paradigma alkalmazása jelentette a lehetséges megoldást. Egy másik fontos szempont volt, hogy az állatok táplálékfelvételének mértéke nagy variabilitást mutat patkányról patkányra, így ugyanazon állat táplálékfelvételének mérése vehiculum, illetve a peptid valamely dózisének alkalmazása után, vagyis az önkontrollos kísérleti elrendezés megbízhatóbb adatokat nyújt.

3.4. Anyagok, mikroinjekciók

Kísérleteink során az RFRP-1 (048-48, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA) 25, 50, 100 és 200 ng (azaz 18,93; 37,8; 75,7; 151,4 pmol) dózisének, az RFRP-3 (048-33, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA) 25, 50, 100 és 200 ng (azaz 25,25; 50,5; 100,1; 201,9 pmol) és az NPPF receptor antagonistá RF9 (R4282, Sigma Aldrich Co. trifluoracetát só) 20, 25 ng és 50 ng (41,4; 51,8 és 103,6 pmol) dózisének használtunk. Az anyagokat 0,15 M-os NaCl-ban oldottuk, a mikroinjekciók térfogata 0,4 µl volt. Kontroll kezelésként a vehiculumot (0,15 M steril NaCl) alkalmaztuk ugyanabban a térfogatban. Az előbb említett dózisek az egyik agyféltekéhez történt injekciók dózisének jelentik, tehát az állatok a fent említett dózisek kétszeresét kapták, mivel a mikroinjekciók minden esetben kétoldaliak voltak. A továbbiakban mind az ábrákon, mind a dolgozat szöveges részében az egyoldali dóziseket tüntetjük fel.

Közvetlenül a kísérletet megelőzően, az anyagbeadás előtt a dugókat eltávolítottuk a vezetőkanülokből. Az anyagbeadást a krónikusan implantált vezetőkanülbe helyezett beadókanülon (külső átmérő 27 gauge, 0.4 mm) keresztül végeztük. A beadókanül 1 mm-rel túlnyúlt a vezetőkanülon, így elérve célterületet, az oldat a CeA-ba került. A beadókanült 20 cm-es polietilén csővel 10 µl-es Hamilton fecskendőhöz csatlakoztattuk, mely az oldott anyagokat tartalmazta. A Hamilton fecskendőt Cole-Parmer automata minipumpával (Cole-Parmer, IITC, Life Sci. Instruments, California) működtettük, amelyet úgy programoztunk, hogy 1 percen keresztül folyamatosan, egyenletes tempóban juttassa az anyagot a célterületre. A beadást követően a beadókanült további 1 percig a vezetőkanülben hagytuk, hogy

megakadályozzuk az anyag visszafolyását, majd eltávolítása után ismét dugóval zártuk a vezetőkanült. Az ANT előkezelés minden esetben 15 perccel előzte meg az RFRP-1 vagy RFRP-3 mikroinjekciókat. Az injekciókat kézben tartott éber állatoknak adtuk be (3. ábra).



3. ábra Neurokémiai anyagok mikroinjektálásának illusztrálása

3.5. Táplálékfelvétel mérése

A táplálékfelvétel mérését ad libitum táplált, illetve 24 órán át deprivált állatokon végeztük. Ad libitum táplált állatokkal végzett kísérletek során a patkányoktól a kísérlet kezdete előtt 1 órával elvettük a szilárd táplálékot, míg a 24 órán keresztül éheztetett állatokkal végzett kísérletek során a mikroinjekciókat megelőző 24 órában és a mérési periódusok ideje alatt a szilárd táplálékot megvontuk. A táplálékfelvételi vizsgálatokat folyékony táp alkalmazásával végeztük, amely módszerrel számos peptid táplálékfelvételt befolyásoló hatása már korábban is publikálásra került [49, 50, 80, 206, 225, 226]. Ezen folyékony táplálékfelvételi paradigmának számos előnye van. Egyik előnye a folyékony táp alkalmazásának a szilárd táp mérésével szemben, hogy a folyékony táp nem igényli az etetőrácsból való eltávolítást. Így a folyékony tápmérés alatt egyrészt nem zavarjuk az állatokat, másrészt nem vész el a mérés ideje alatt az a táplálékfelvételre fordítható idő, ami a szilárd táp esetében a táp etetőrácsból való kiszedésével, mérlegre helyezésével elveszne. A folyékony táp mérésének további

előnye, hogy az állatok megzavarása nélkül, akár 5 perces időintervallumokban leolvasható az aktuális fogyasztás, és e paradigmában is (akárcsak a szilárd tápnál) biztosítható az azonos ízű és energiatartalmú táplálék minden kísérleti állat esetében.

A neofóbia elkerülése végett, két héttel a műtétek előtt az állatokat folyékony táp felvételre, tejivásra (136,45 kJ/100 ml, Milk Quick, Berettyóújfalu) szoktattuk, melyhez egy kalibrált milliliteres beosztású itatótubusból juthattak (4. ábra). Első héten délelőtt 8 órától 12 óráig a szokványos rágcsálótáp helyett tej állt az állatok rendelkezésére, hogy hozzászokjanak, s az új ízt reprezentáló tejjel kapcsolatos neofóbia megszűnjön. Hét nappal a műtétek előtt, ugyanúgy, mint a későbbi kísérletek folyamán végig, már csak napi egy órán keresztül fogyaszthatták a folyékony tápot, hogy megszokják a kísérleti procedúra hosszát, és stabil alaptéjfelvétel alakuljon ki. Azon állatokat, melyeknél nem alakult ki egyenletes fogyasztás kizártuk a kísérletből. Vizsgálataink során ml-es pontossággal mértük az akut táplálékfelvételt, a mikroinjekciókat követő első fél órában 5 percenként, majd a 40., 50., 60. percben. A mérés után az állatok újra szilárd táphoz, valamint folyadékhoz juthattak.



4. ábra Patkány táplálékfelvételének mérése ml-es beosztású itatótubusból

3.6. Az állatok magatartásának vizsgálata táplálékfelvételi paradigmában

A vizsgálatok során 25 percen keresztül videokamerával rögzítettük az állatok viselkedését (Panasonic SDR-H85 video camera) az 50 ng RFRP-1, az 50 ng RFRP-3, illetve a vehiculum CeA-ba injektálását követően. Azért választottuk ezt az időtartamot, mert az RFRP peptidek anorexigén hatása főként az első 25 percben nyilvánul meg. Az állatokat a táplálékfelvételi kísérletekhez hasonlóan a megszokott környezetükben vizsgáltuk. A videofelvételeket az állatok ketrece elé helyezett kamerával készítettük. A videofelvételek off-line kiértékelését két független megfigyelő végezte, akik nem tudták melyik videoelemzést végzik. A kísérletek önkontrollosak voltak. A kezeléseket követően minden alkalommal a tej behelyezését tekintettük a videofelvétel rögzítés kezdő időpontjának.

Mértük, hogy az állatok a 25 perces megfigyelés 5 perces szakaszaiban mennyi időt töltöttek a folyékony tápfelvétellel, a mosakodási mozgásformával, vakaródzással, pihenéssel, valamint az explorációval.

3.7. Vízfelvétel mérése

A műtétek előtt egy héttel az állatok napi 4 órán át kalibrált, ml-es beosztású itatótubusból fogyaszthattak vizet. A kísérletek során az 50 ng RFRP-1, 50 ng RFRP-3, 100 ng RFRP-3 vagy a vehiculum beadása után 60 percig vizsgáltuk a vízfelvételt, az első fél órában 5 percenként, majd a 40., 50., és 60. percben.

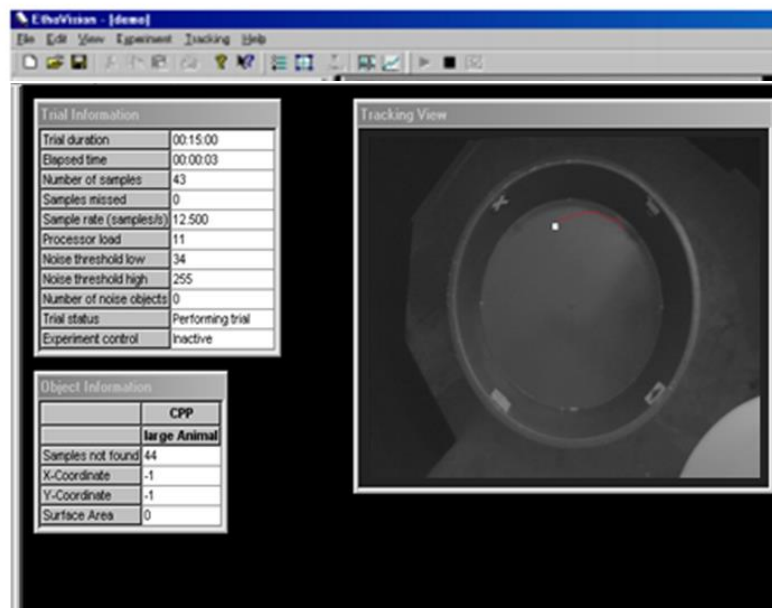
3.8. Testhőmérséklet mérési kísérletek

Jól ismert, hogy a testhőmérséklet változása befolyásolja a táplálékfelvételt. Az irodalomban találtunk adatot arra vonatkozóan, hogy az RFRP-3 i.c.v. adva befolyásolja a testhőmérsékletet [47, 146, 175]. Ha az RFRP peptidek intraamygdaloid injektálása hypothermiát indukálna, lehetséges, hogy az állatok e hatás miatt nem keresik fel annyiszor az etetőt és ezért csökken a táplálékfelvételük. Mindezekért indokoltnak láttuk megvizsgálni az állatok testhőmérsékletét az RFRP peptidek intraamygdaláris injektálásait követően. Az állatok testhőmérsékletét az anuson keresztül 2.5 cm-re a colonba helyezett 0,1 °C pontosságú digitális hőmérővel (digital clinical thermometer, Kruuse, Cat.no 291103) vizsgáltuk. Az 50 ng RFRP-1, 50 ng RFRP-3, 100 ng RFRP-3,

illetve a vehiculum beadása előtt 10 perccel, valamint a kezelések után 10 és 20 perccel mértük az állatok testhőmérsékletét.

3.9. Magatartási tesztek

A kísérleteket hangszigetelt és klimatizált kísérleti szobában végeztük. A patkányok viselkedését az apparátusok fölé helyezett videokamera segítségével figyeltük, valamint videomagnó segítségével rögzítettük. Az egyes paramétereket egy speciális számítógépes program, az 'EthoVision Basic' segítségével mértük (Noldus Information Technology b.v., Wageningen, Hollandia). Ez a program az általunk kijelölt területen és módon követi, valamint digitálisan rögzíti az állat mozgását, továbbá online és off-line analízisre is lehetőséget ad (5. ábra). A program révén számos paraméter megadható (megtett út, idő, belépések száma, első belépés latenciája stb.), akár a teljes apparátus területén, akár az apparátus egyes általunk kijelölt részeiben.



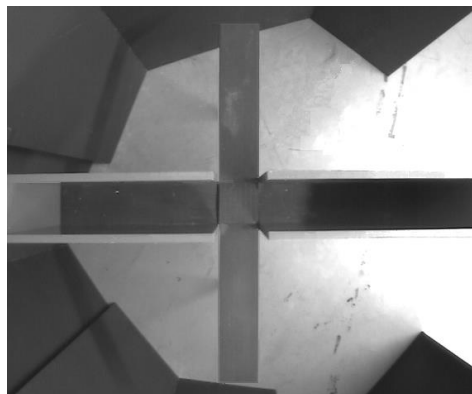
5. ábra Az Ethovision számítógépes program illusztrálása

3.9.1. Open field teszt

Open field tesztben az állatok spontán (motoros) aktivitását vizsgáltuk. A kísérletek során a patkányokat egy 60x60x60 cm-es dobozba helyeztük. A doboz alját 16 egyenlő méretű négyzetre osztottuk. A megvilágítást egy 40 W-os piros égő szolgáltatta. Öt percen keresztül figyeltük és a doboz fölé erősített videókamerával rögzítettük az állatok viselkedését. Mértük az állatok által megtett távolságot, a keresztezések számát és az állatoknak az open field apparátus centrális areájában töltött idejét [a dobozt centrális (ez jelentette középső négy négyzet területét-ami az egész apparátus 25%-a) és perifériás területre is felosztottuk].

3.9.2. Emelt keresztpalló teszt (Elevated plus-maze test)

Az emelt keresztpalló tesztet egyes anyagok szorongást oldó vagy szorongást keltő hatásának kimutatására használják. Előnye más tesztekkel szemben az, hogy mind anxiogén, mind anxiolitikus hatások kimutatására alkalmas. A kísérleti apparátus két nyitott (50 cm x 12 cm) és két zárt (50 cm x 12 cm x 40 cm) karból áll, melyek 1 méterrel a talaj fölött kereszt alakban helyezkednek el. A Zárt kar oldala 40 cm magas, teteje nyitott (6. ábra). A megvilágítást egy 40 W-os piros égő szolgáltatta. Az apparátust minden egyes ülést követően kimostuk és megszáritottuk. Tíz perccel az intraamygdaláris injekciókat követően a kísérleti állatot az apparátus közepére helyeztük, orral az egyik zárt kar irányába. Ezt követően 5 percig figyeltük és videóval rögzítettük az állatok mozgását. Mértük a zárt karokon, a nyitott karokon és a nyitott karok végein eltöltött időt, valamint a zárt karokra, a nyitott karokra és a nyitott karok végeire történő belépések számát. Mértük továbbá az állatok által 5 perc alatt megtett út teljes hosszát.



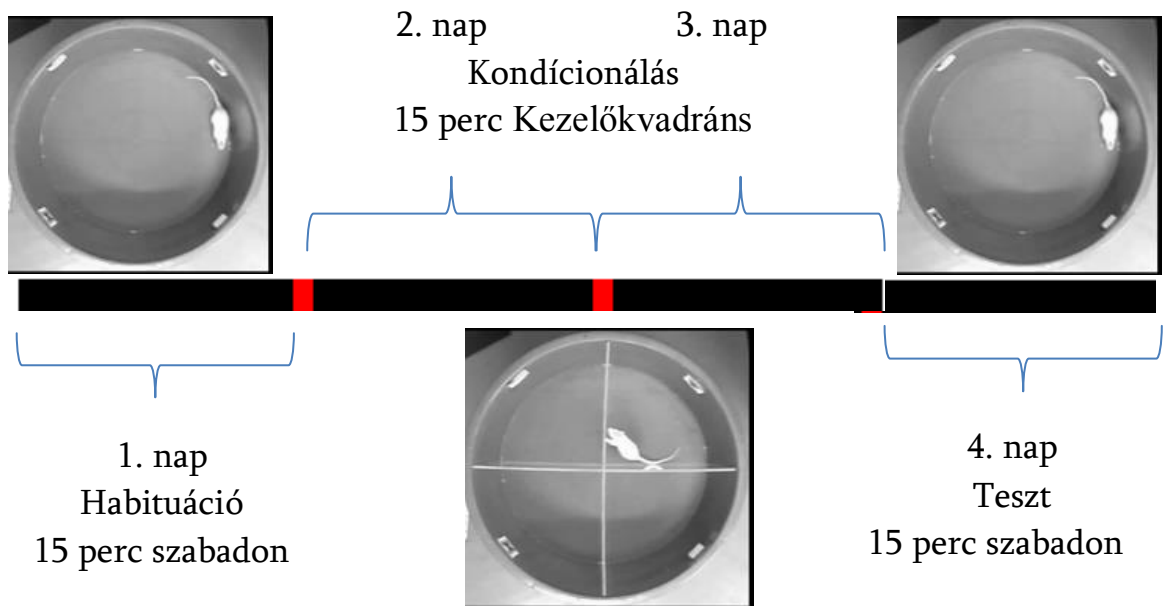
6. ábra Az Emelt keresztpalló teszt felépítése

3.9.3. Helypreferencia teszt

A helypreferencia kimutatására egy 85 cm átmérőjű, 40 cm magas falú, henger alakú apparátust használtunk (amely egy kör alakú ‘open field’ doboz). A sötétszürke színű doboz alján lévő két fekete vonal az apparátust négy egyenlő nagyságú kvadránsra osztotta. Az állatok térbeli tájékozódását külső vizuális “jelek”, ún. “cue”-k segítették, amelyek a kísérletek során végig konstans pozícióban voltak. Vizsgálataink során az apparátust 40 W-os izzóval világítottuk meg. A dobozt minden egyes kísérlet után kimostuk és megszárazítottuk. A kísérleti feltételek (apparátus méretei, megvilágítás stb.) megfeleltek a Huston és munkatársai által bevezetett kísérleti módszernek [83, 99, 117, 191].

A helypreferencia tesztet négy egymást követő napon végeztük (7. ábra). A kísérlet első napján az állatokat habituáltuk, melynek során az állatokat konstans irányban az apparátus közepére helyeztünk. Ezt követően az állatok 15 percen (900 s) keresztül szabadon mozoghattak az egész doboz területén. Ezen idő alatt mértük a patkányok által megtett utat és az egyes kvadránsokban töltött időt másodperc pontossággal. A kísérlet második és harmadik napján történt az állatok kondicionálása (7. ábra). Ezekon a napokon az állatokat az anyagbeadáskövetően a kezelő kvadránsba helyeztük. A kezelő kvadráns a kör alakú apparátus egyik átlátszó plexiüveggel elválasztott negyede (kvadránsa) volt. Minden egyes állatnak az apparátus egy olyan kvadránsát választottuk ki a társításra, amelyben az állat a Habitúáció során nem a legtöbb, de nem is a legkevesebb időt töltötte. A kezelő kvadránsok megoszlása kiegyenlített volt az egyes csoportokon belül, az állatokat a különböző kezelési csoportokba véletlenszerűen soroltuk be. Az állatokat, a bilaterális mikroinjekciót követően azonnal 15 percre a kezelő kvadránsba zártuk, egy plexi térelválasztó lap biztosította, hogy az állat ne tudjon a többi kvadránsba átmenni. A kezelő kvadránsban töltött idő alatt az állat összekapcsolhatta, társíthatta a beadott anyagok által kiváltott hatást a kvadránsban látott környezettel. Az állatok mindvégig láthatták a külső vizuális jeleket, melyek alapján tájékozódhattak. Mindkét nap ugyanazt az eljárást használtuk. A negyedik napon, a teszt során a plexi térelválasztó lapot eltávolítottuk, majd a patkányokat anyagbeadás nélkül az apparátus közepére helyeztük konstans pozícióban, és 15 percig (900 s) újra szabadon mozoghattak az egész dobozban (7. ábra). Ekkor ismét mértük, hogy az állatok mennyi időt töltenek az egyes kvadránsokban. A

helypreferencia kiépülésének az volt a kritériuma, hogy az állatok a teszt során szignifikánsan több időt töltsenek a kezelő kvadránsban, mint a habituáció alatt.



7. ábra A helypreferencia teszt illusztrálása

3.10. Adatok kiértékelése

3.10.1. Szövettan

A kísérletek befejezését követően az állatokat i.p. uretán (20%) oldattal elaltattuk, és először fiziológiás sóoldattal, majd ezt követően 10%-os formaldehid oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Az eltávolított agykból egy hét postfixációs periódust követően mikrotommal 40 μm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket krezil-ibolyával festettünk meg. Az értékelés fénymikroszkóppal történt, Paxinos és Watson-féle sztereotaxikus [163] atlasz segítségével rekonstruáltuk a kanülök valós helyét. Az eredmények kiértékelése során a statisztikai analízisből kizártuk azon állatokat, amelyek esetében a kanül nem a célterületen volt.

3.10.2. Statisztika

A táplálékfelvétel mérési vizsgálatok során nyert adatok kiértékeléséhez variancia analízist (ANOVA with repeated measures, SPSS Windows 18.0) alkalmaztunk. Mivel ezen kísérleteink önkontrollosak voltak, melyek során az

RFRP peptidekkel, illetve antagonistával kombinált kezeléseket is alkalmaztunk, a kísérletek menete és az állatcsoportok nagy száma miatt post hoc tesztekkel nem értékelhettük adatainkat. Mindezt ahol a varianciaanalízis a kezelés és/vagy a kezelés-idő interakció tekintetében szignifikáns eltérést mutatott párosított t-próbával folytattuk az analízist. Párosított t-próbával hasonlítottuk össze az egyes időpontban ugyanazon állatcsoport eltérő kezeléseket követően nyert adatait. A táplálékfelvétel változással kapcsolatos kísérleteink, így a vízfelvétel-, a táplálékdeprivációs táplálékfelvétel-, a testhőmérséklet mérési, továbbá az állatok magatartásának vizsgálata táplálékfelvételi paradigmában végzett kísérletek szintén önkontrollosak voltak, így a fent említett statisztikát alkalmaztuk az adatok analízisére.

Magatartási vizsgálataink nem voltak önkontrollosak. Így azok során az eltérő kezelésekből részesült állatcsoportok eredményeinek statisztikai értékelésére egy-egy szempontra vagy két szempontra varianciaanalízist (ANOVA, SPSS Windows 18.0) alkalmaztunk. Ezt követően, szignifikáns különbség esetén Tukey féle post hoc tesztet végeztünk az eredmények további analízisére. A szignifikancia szintet minden esetben $p < 0,05$ -nek tekintettük, a szignifikáns értékeket a grafikonokon csillaggal jelöltük.

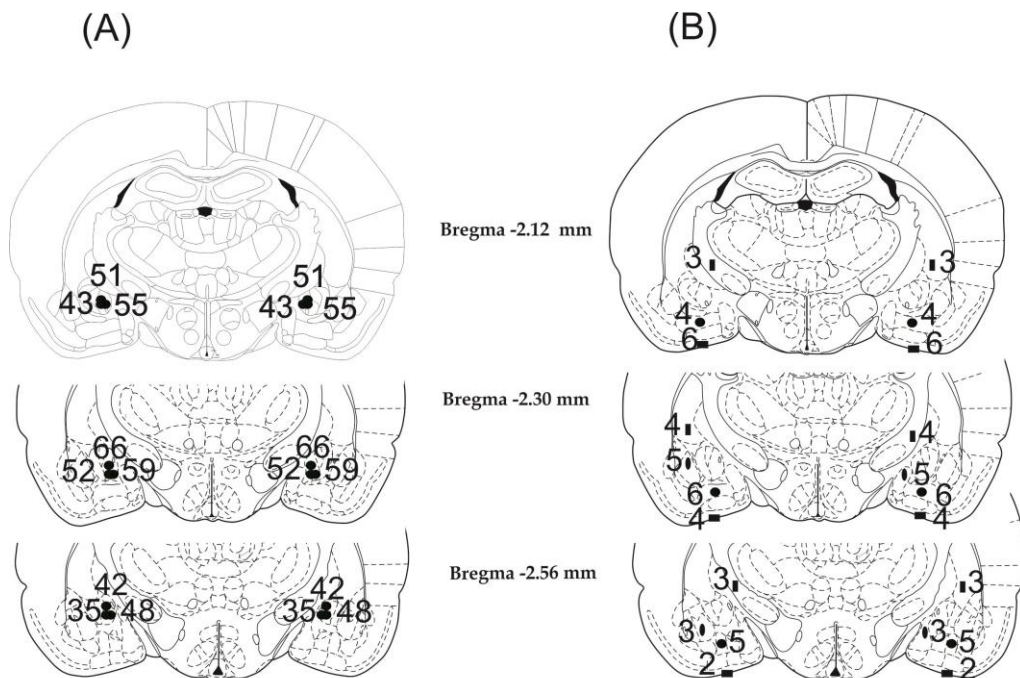
3.10.3. Az adatok ábrázolása

A táplálékfelvétel mérési, deprivációs és vízfelvételi kísérletek során nyert adatok ábrázolására kumulatív diagrammokat alkalmaztunk. Az ábrázolt értékek a kísérletben részt vevő, a szövettani kiértékelést követően „megmaradt” n számú állatnál mért értékek átlagai. Az ábrákban feltüntetett kontroll értékek megfelelnek ugyanazon állatcsoport vehiculum beadása utáni fogyasztásának. A vízszintes tengelyen percben tüntettük fel a táplálékfelvétel mérésének időpontjait, a függőleges tengelyen a fogyasztott folyékony táp mennyiségét jelöltük ml-ben a kísérleti állatok testtömegének 100 grammjára számítva. A további kísérletekben az ábrázolást oszlopdiagrammokkal végeztük. Az eltérő kezelésben részesült állatcsoportokat különböző oszlopok jelölik. A függőleges tengelyen a mért paramétert, a vízszintes tengelyen a kísérlet metodikájának megfelelő fázist tüntettük fel. Minden ábrán feltüntetettük a mérés hibájával korrigált szórást is (átlag \pm S.E.M.).

4. EREDMÉNYEK

4.1. Szövetteni értékelés

Az eredmények szövettani feldolgoása alapján a kísérletekben résztvett 496 db Wistar patkány közül 451 esetben a célterületnek, azaz a CeA-nak megfelelően helyezkedtek el a bilaterális kanülök, a fennmaradó 45 patkánynál a kanülök pozíciója a célterületen kívül esett (8. ábra). Ezek közül 12 esetben a kanülök az agyalon a liquor térbe értek, további 15 esetben a kanülök vége 1 mm-rel a célterület alatt végződött a basomedialis AMY területén. Nyolc esetben aszimmetrikusan, a célterülettől medialisán, illetve lateralisán végződtek, ami a lateralis/basolateralis AMY-nak, illetve a medialis AMY területének felel meg. Végül tíz esetben a kanülök vége 1 mm-rel a célterület felett és attól lateralisán, illetve medialisán helyezkedett el a caudatum-putamen, illetve a capsula interna területén. A statisztikai analízisből kizártuk azokat az állatokat, amelyek esetében a kanül nem a célterületen volt.



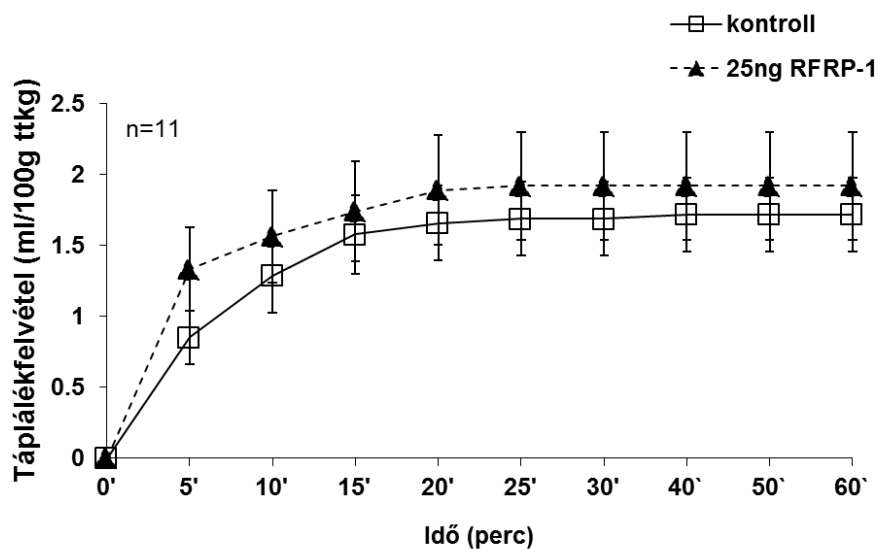
8. ábra A mikroinjekciók helyeinek sematikus ábrázolása Paxinos és Watson agyatlasza alapján. A diagram közepén látható számok a bregmától mért anterior-posterior távolságot mutatják.

(A) panel: a körök a célterületnek megfelelő bilaterális mikroinjekciók helyeit mutatják (n=451). (B) panel: az azonos szimbólumok a nem megfelelő pozícióban lévő bilaterális kanülök végének helyeit jelölik (n=45). A szimbólumok melletti számok azon állatok számát jelentik, amelyek esetében a mikroinjekció a szimbólummal megjelölt helyekre történt.

4.2. Táplálékfelvételt vizsgáló kísérletek eredményei

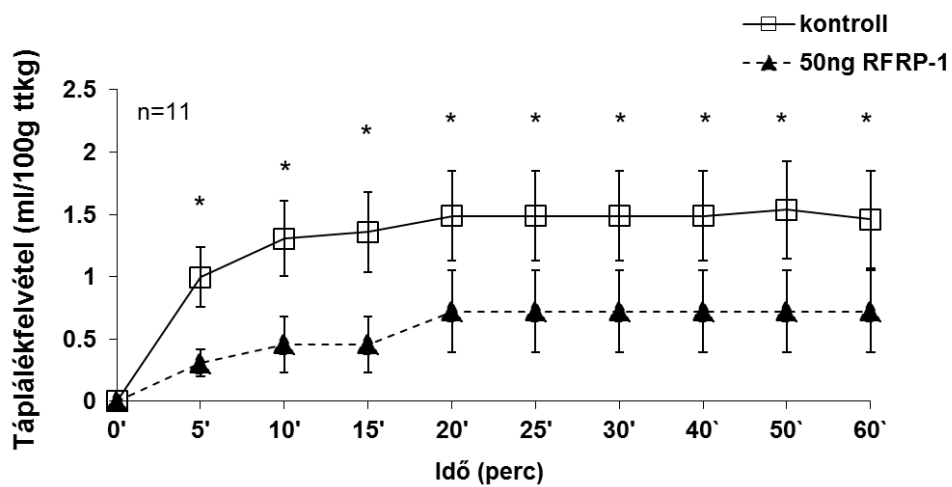
4.2.1. Az intraamygdaláris RFRP-1 mikroinjekciók hatása a táplálékfelvételre

Kísérleteink során a vehiculum, illetve a 25, 50, 100 és 200 ng RFRP-1 vezetőkanulón keresztül történő CeA mikroinjekciókat követően 60 percen keresztül mértük az állatok tejfogyasztását. Az RFRP-1 legalacsonyabb, **25 ng-os** dózisa nem okozott változást a táplálékfelvételben a kontroll kezeléshez képest (9. ábra). A 25 ng (18.93 pmol) RFRP-1 mikroinjekciót követően az ANOVA analízis kizárólag az idő szignifikáns hatását mutatta a táplálékfelvételre, sem a kezelés, sem pedig a kezelés-idő interakció nem mutatkozott szignifikánsnak (idő hatása: $F[8,80]=13,079$, $p<0,001$, kezelés hatása: $F[1,10]=0,376$, $p>0,05$, idő x kezelés: $F[8,80]=0,970$, $p>0,05$, 9. ábra).



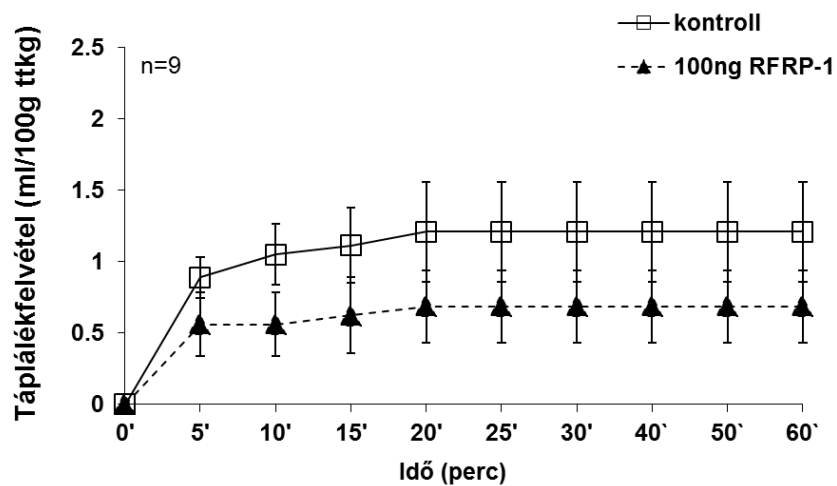
9. ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 25 ng RFRP-1 vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-1 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

Vizsgálataink szerint az **50 ng** (37.8 pmol) RFRP-1 injekciója szignifikáns táplálékfelvétel redukciót okozott. ANOVA analízis alapján az idő és a kezelés szignifikánsnak bizonyult (idő hatása: $F[8,80]=3,128$ $p<0,004$, kezelés hatása: $F[1,10]=29,345$, $p<0,001$, idő x kezelés: $F[8,80]=0,293$, $p>0,05$). A párosított t-próba eredménye alapján az 50 ng dózisú RFRP-1 mikroinjekciója a mérés kezdetétől a mérés végéig tartó szignifikáns táplálékfelvétel redukciót okozott a kontroll kezelés hatásához képest ($n=8$, $p<0,01$, 10. ábra).



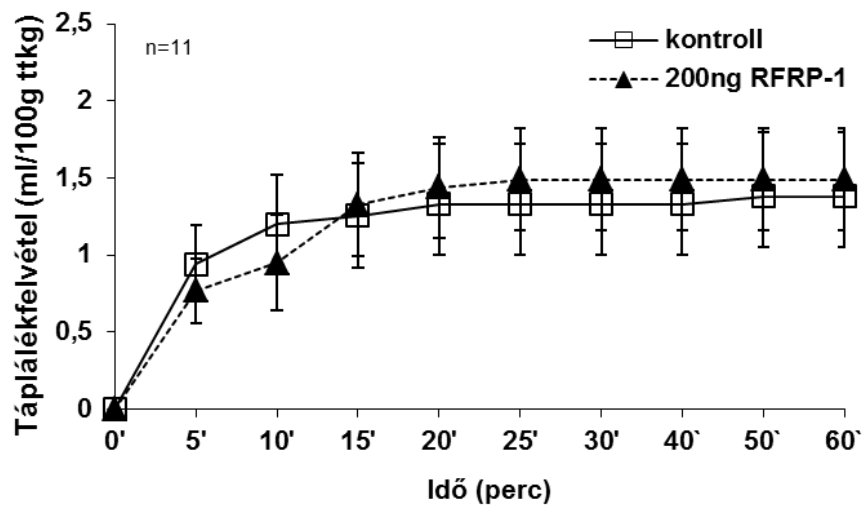
10.ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 50 ng RFRP-1 vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-1 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

A hatékony dózist a duplájára emelve látható, hogy a **100 ng** (75.7 pmol) RFRP-1 mikroinjekciója már nem okoz szignifikáns változást a táplálékfelvételben. A mérés kezdetétől fogva ugyan nem szignifikáns a különbség, de látható tendencia a tápfelvételcsökkenésre az RFRP-1 kezelés esetén a kontroll kezeléshez viszonyítva (n=9, $p>0,05$, 11. ábra). Az ANOVA analízis nem mutatott szignifikáns eltérést a kezelés és az idő x kezelés interakció vonatkozásában sem (idő: $F[8,64]=2,139$, $p<0,05$, kezelés: $F[1,8]=1,222$ $p=0,301$, idő x kezelés interakció: $F[8,64]=0,261$, $p=0,976$).



11. ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 100 ng RFRP-1 vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-1 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

A **200 ng** (151.4 pmol) RFRP-1 alkalmazása nem okozott redukción a táplálékfelvételben a kontroll kezeléshez viszonyítva a vizsgált periódus egyik időpontjában sem (12. ábra). Az ANOVA analízis nem mutatott szignifikáns eltérést a kezelés és az idő x kezelés interakció vonatkozásában sem (idő: $F[8,72]=4,258$, $p<0,001$, kezelés: $F[1,9]=0,179$ $p=0,682$, idő x kezelés interakció: $F[8,72]=1,001$, $p=0,443$).

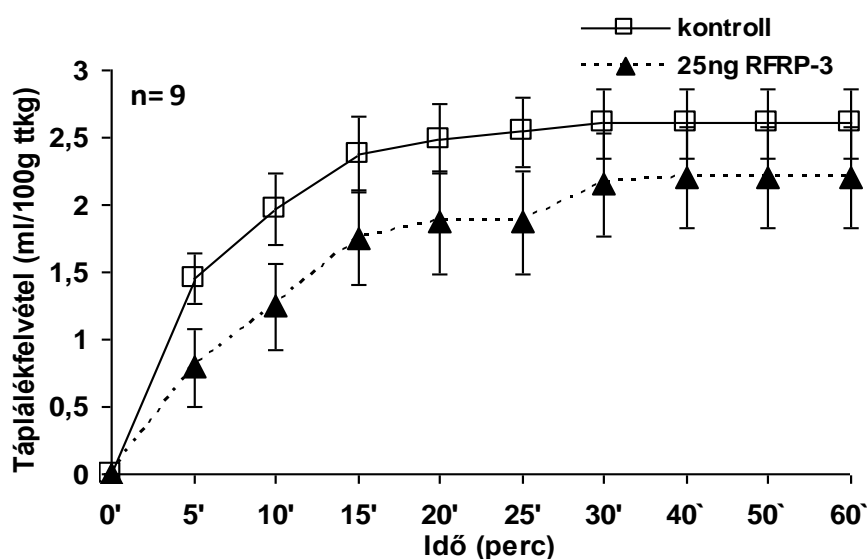


12.ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 200 ng RFRP-1 vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-1 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

4.2.2. Az intraamygdaláris RFRP-3 mikroinjekciók hatása a táplálékfelvételre

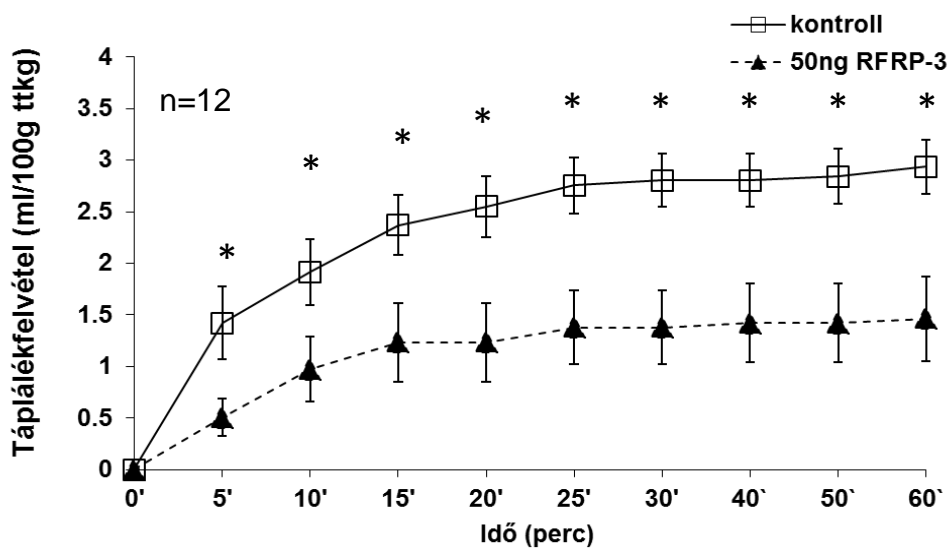
Kísérleteink során vizsgáltuk az RFRP gén másik, rágcsálókban is szintetizálódó peptidjének, az RFRP-3-nak a táplálékfelvételre gyakorolt hatását. Kísérleteink során az RFRP-3 különböző dózisait injektáltuk a CeA-ba és 60 perces periódusban mértük a folyékony táplálékfelvételt.

Vizsgálatainkban a **25 ng** (25.25 pmol) RFRP-3 mikroinjekciója nem okozott változást a táplálékfelvételben a kontroll kezeléshez képest a megfigyelt időintervallum egyik időpontjában sem (13. ábra). 25 ng RFRP-3 mikroinjekciót követően az ANOVA analízis kizárólag az idő szignifikáns hatását mutatta a táplálékfelvételre, sem a kezelés sem pedig a kezelés-idő interakció nem mutatkozott szignifikánsnak (idő hatása: $F[8,64]=13,298$, $p<0,001$, kezelés hatása: $F[1,8]=1,242$, $p=0,201$, idő x kezelés: $F[8,64]=0,710$, $p=0,835$).



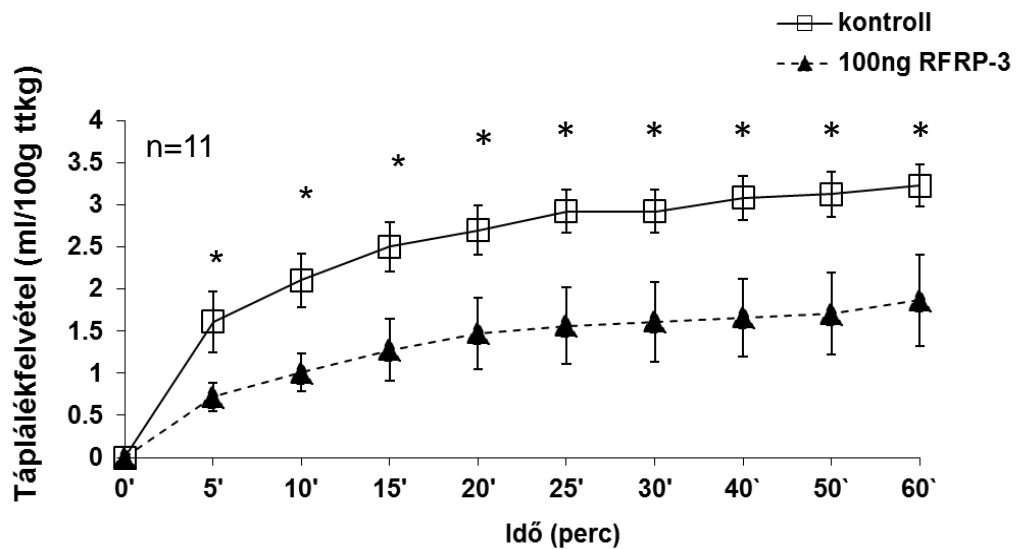
13.ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 25 ng RFRP-3 vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-3 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

Megfigyeléseink szerint az **50 ng** (50.5 pmol) RFRP-3 injekciója szignifikáns táplálékfelvétel csökkenést okozott (14. ábra). ANOVA analízis alapján az idő és a kezelés szignifikánsnak bizonyult (idő hatása: $F[8,104]=34,484$, $p<0,001$, kezelés hatása: $F[1,11]=6,215$, $p=0,027$,) idő x kezelés interakció: $F[8,104]=2,322$, $p=0,450$). A párosított t-próba eredménye alapján az RFRP-3 injekciója a mérés kezdetétől a mérés végéig tartó szignifikáns táplálékfelvétel redukciónak okozott a vehiculum kezelés hatásához képest ($p=0,001-0,039$).



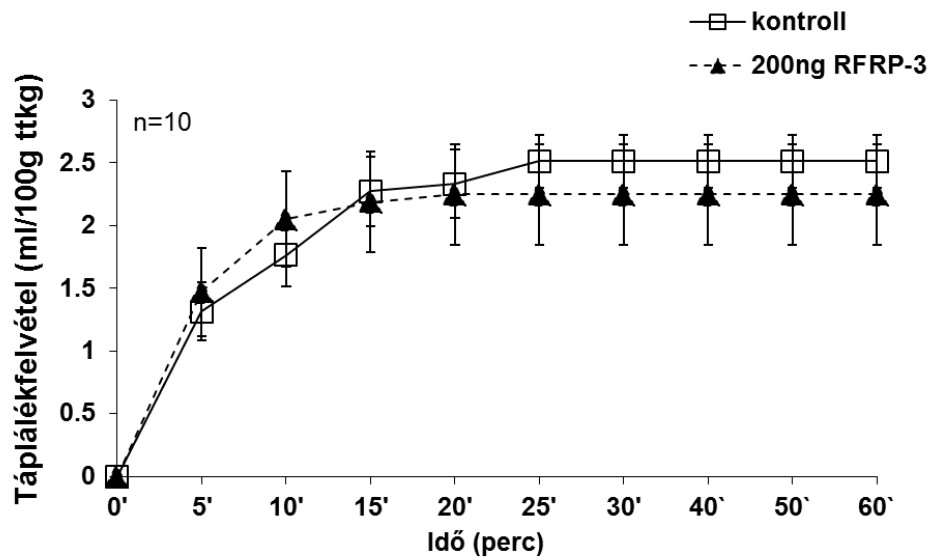
14.ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 50 ng RFRP-3 vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-3 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

A **100 ng** (100.1 pmol) RFRP-3 mikroinjekciója hasonló hatást eredményezett (ANOVA: idő: $F[8,88]=22,968$, $p<0,001$, kezelés: $F[1,11]=14,962$, $p=0,003$, idő x kezelés interakció: $F[8,88]=0,464$, $p=0,878$). Párosított t-próba eredménye alapján a 100 ng RFRP-3 szignifikáns táplálékfelvétel csökkenést idézett elő a vizsgált periódus végéig ($p=0,002-0,026$) (15. ábra).



15.ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 100 ng RFRP-3 vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-3 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

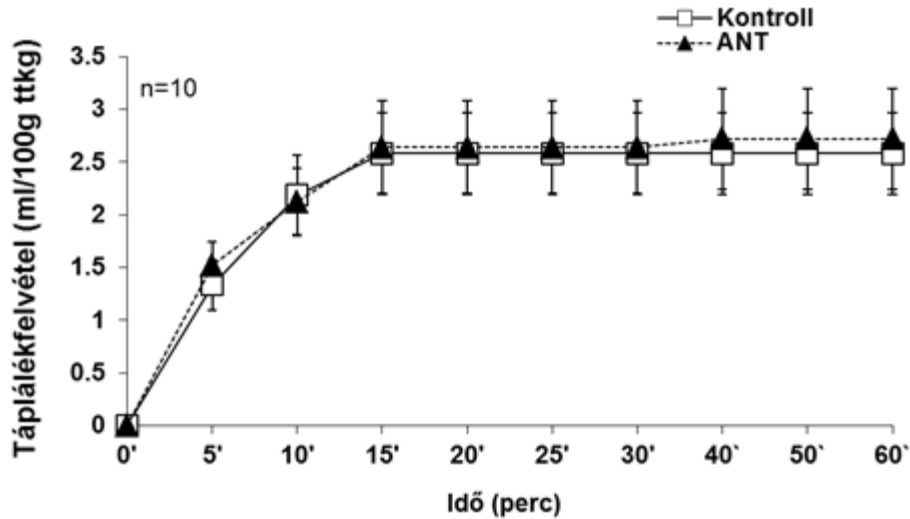
A **200 ng** (201.9 pmol) RFRP-3 alkalmazása nem okozott redukción a táplálékfelvételben a kontroll kezeléshez viszonyítva a vizsgált periódus egyik időpontjában sem (16. ábra). Az ANOVA analízis nem mutatott szignifikáns eltérést a kezelés és az idő x kezelés interakció vonatkozásában sem (idő: $F[8,72]=4,258$, $p<0,001$, kezelés: $F[1,9]=0,179$ $p=0,682$, idő x kezelés interakció: $F[8,72]=1,001$, $p=0,443$).



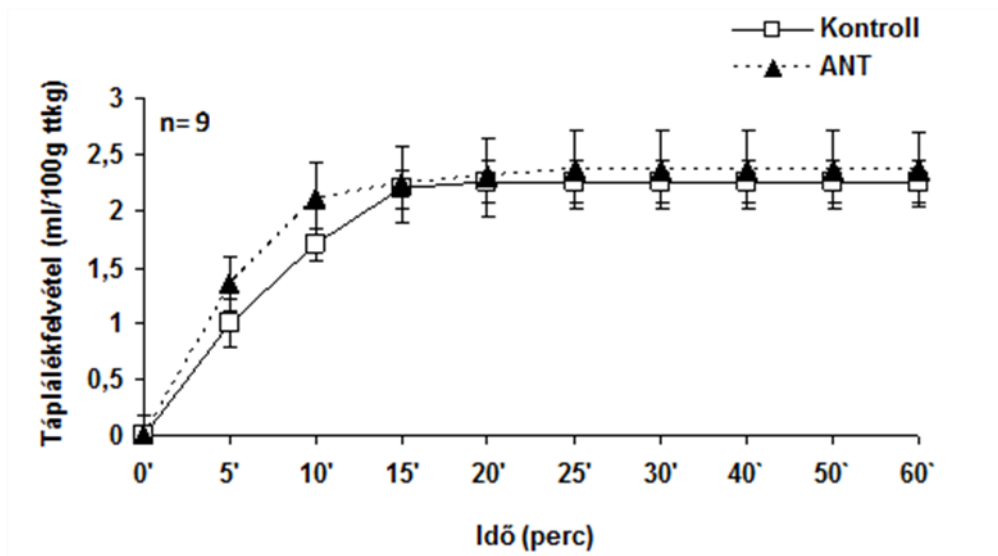
16.ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 200 ng RFRP-3 vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-3 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

4.2.3. Az intraamygdaláris NPFF-receptor antagonistá RF9 mikroinjekcióinak hatása a táplálékfelvételre

Az RFRP-1 okozta anorexigén hatás szubsztrátspecifikusságáról antagonistá előkezeléssel győződünk meg. Először meg kellett vizsgálnunk, hogy az antagonistá önmagában alkalmazva befolyásolja-e a táplálékfelvételt, ezért elsőként a **20 ng** (41.4 pmol) és **50 ng** (103.6 pmol) ANT mikroinjekcióinak hatását tanulmányoztuk a táplálékfelvételre. Eredményeink szerint sem az alacsonyabb, sem a magasabb dózisú RF9 önmagában alkalmazva nem változtatta meg a táplálékfelvétel dinamikáját (17., 18. ábra).



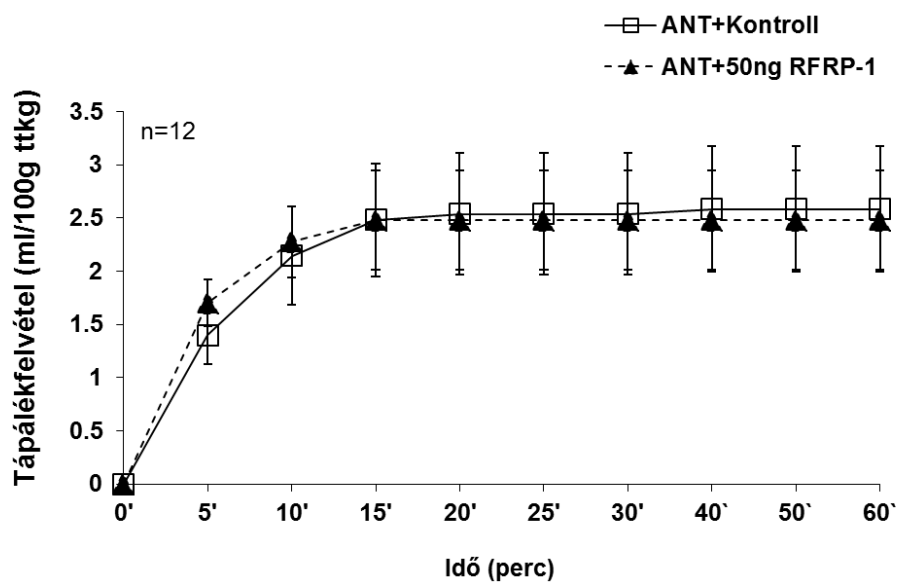
17.ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 20 ng ANT vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az ANT kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.



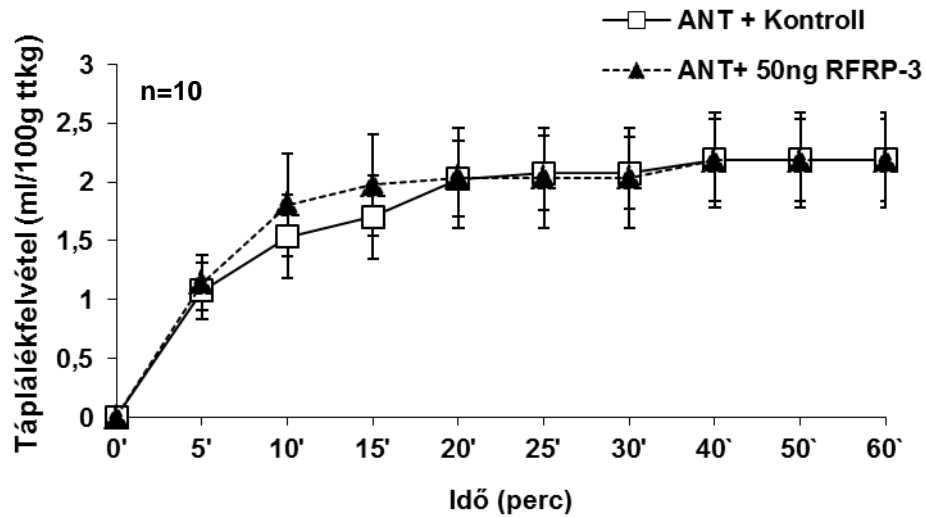
18.ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 50 ng ANT vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az ANT kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

Miután meggyőződünk arról, hogy az ANT mikroinjekció nem okozott változást a kontroll kezeléshez viszonyítva, kombinált kezeléseket kezdtünk. Irodalmi adatok és saját megfigyeléseink szerint a 15 perces időintervallum, melyet az ANT és az RFRP mikroinjekciók között hagytunk, elegendő a receptorokhoz való kötődéshez, s az antagonistá hatásának kialakulásához.

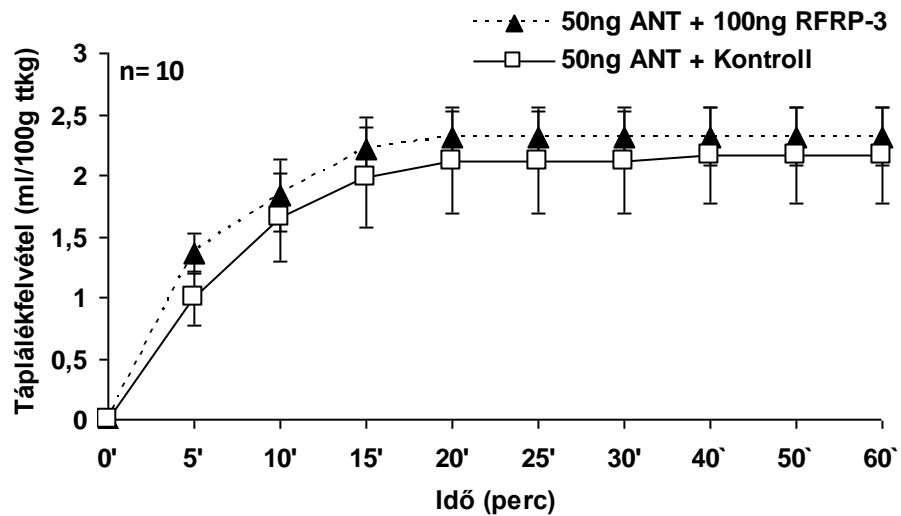
Vizsgálataink során az előző kísérletekben hatásosnak bizonyult 50 ng RFRP-1, illetve 50 ng RFRP-3 és 100 ng RFRP-3 dózissal ekvimoláris, tehát azonos moláris mennyiségű ANT (20, 25 és 50 ng) előkezelés hatását vizsgáltuk. A 20 ng RF9 antagonistával való kezelés meggátolta az 50 ng RFRP-1 táplálékfelvétel csökkentő hatásának kialakulását (19.ábra). Az RFRP-3 okozta táplálékfelvétel redukció szintén eliminálható volt az antagonistá előkezelés alkalmazásával (20. és 21. ábra).



19.ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 20 ng ANT+ 50 ng RFRP-1 vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az ANT+ 50 ng RFRP-1 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.



20.ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 25 ng ANT+50 ng RFRP-3 vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az ANT+50 ng RFRP-3 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.



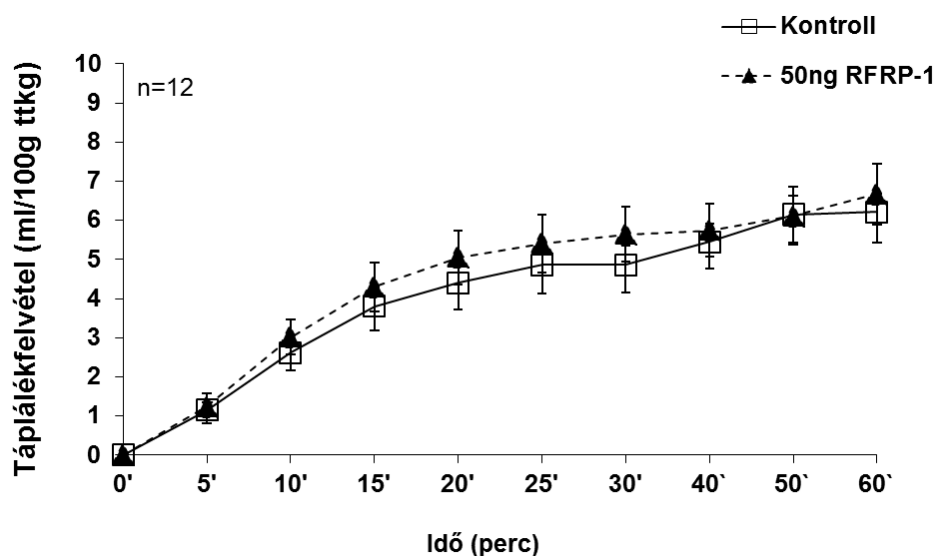
21.ábra A folyékony táplálékfelvétel változása 50 ng ANT+100 ng RFRP-3 vagy a vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az ANT+100 ng RFRP-3 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

Eredményeink azt mutatják, hogy az intraamygdaláris RFRP-1 és RFRP-3 peptidekkel kiváltható táplálékfelvétel redukció antagonistá előkezeléssel felfüggeszthető volt, ezért feltételezhetjük, hogy az RFRP-1 és az RFRP-3 hatása az AMY-n belül receptor specifikus.

4.2.4. A depriváció hatása az RFRP-1 és RFRP-3 által kiváltott táplálékfelvétel csökkenésre

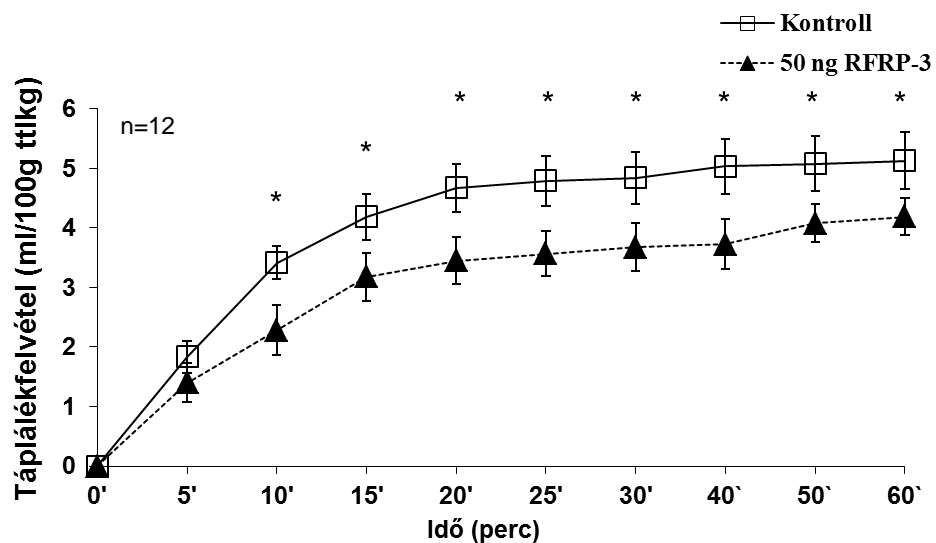
Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy az RFRP peptidek bilaterális mikroinjekciójának van-e hatása a 24 órát éheztetett állatok táplálékfelvételére. Jól ismert ugyanis, hogy táplálékmegvonást követően fokozódik az éhség-hajtóerő.

Megfigyeléseink szerint a 24 órán át táplálékdeprivált patkányok 50 ng RFRP-1 peptiddel való kezelése nem okozott szignifikáns változást a táplálékfelvételben (n=12, ANOVA n.s., 22. ábra).



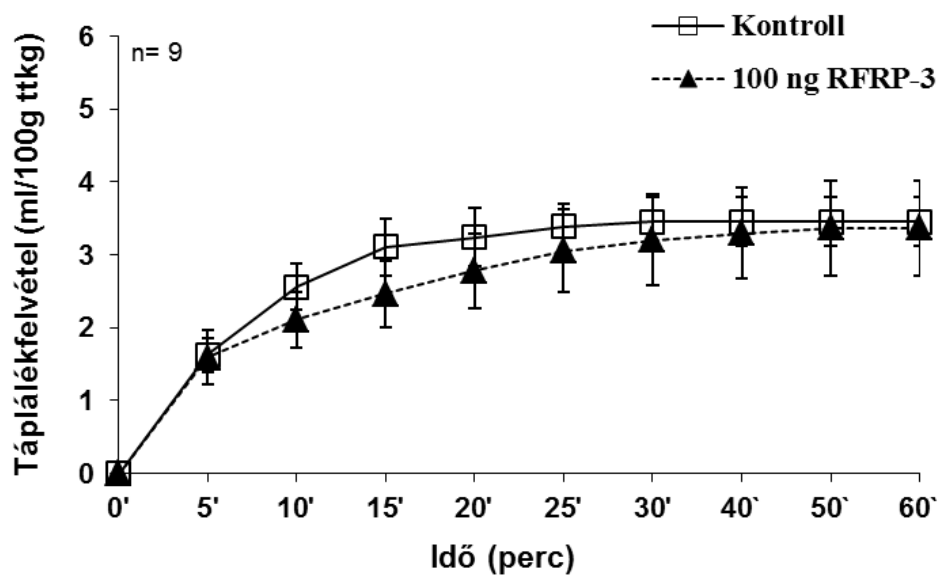
22. ábra Az 50 ng RFRP-1 hatása a folyékony táplálékfelvételre 24 órán át táplálékdeprivált állatokon. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-1 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

Ezzel szemben az 50 ng RFRP-3 kezelést követő ANOVA analízis az idő és a kezelés összefüggésében szignifikáns eltérést mutatott (n=12, idő hatása: $F[8,88]=54,889$, $p<0,0001$, kezelés hatása: $F[1,11]=11,193$ $p=0,007$, idő x kezelés: $F[8,88]=1,128$, $p=0,353$). Az ezt követő párosított t-próba eredménye alapján a peptid a vizsgálat első 5 percében nem okozott táplálékfelvétel csökkenést a kontrollhoz képest, míg a 10. perctől kezdve a mérés végéig szignifikáns táplálékfelvétel redukciót okozott ($p=0.013-0.036$, 23.ábra).



23.ábra Az 50 ng RFRP-3 hatása a folyékony táplálékfelvétellel 24 órán át táplálékdeprivált állatokon. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-3 kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

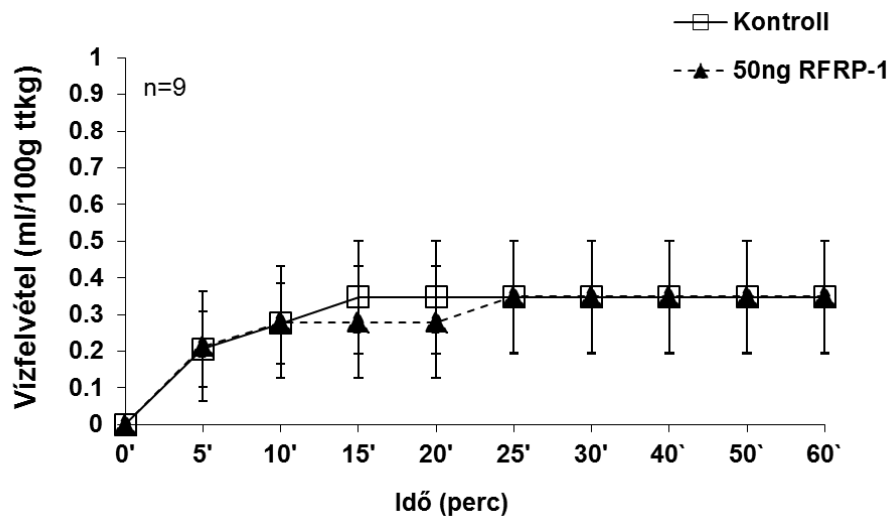
A 100 ng RFRP-3 kezelést követő ANOVA analízis nem mutatott szignifikáns eltérést sem a kezelés, sem az idő-kezelés összefüggésében (n=9, idő hatása: $F[8,64]=16,463$, $p<0,001$, kezelés hatása: $F[1,8]=1,159$, $p=0,313$, idő x kezelés: $F[8,64]=1,024$, $p=0,427$). Ugyanakkor a 10-20. perces méréseknél látható tendencia a táplálékfelvételcsökkenésre, de ez a szignifikancia szintjét nem éri el (24.ábra), (párosított t-próba: $p=0.102-0.184$).



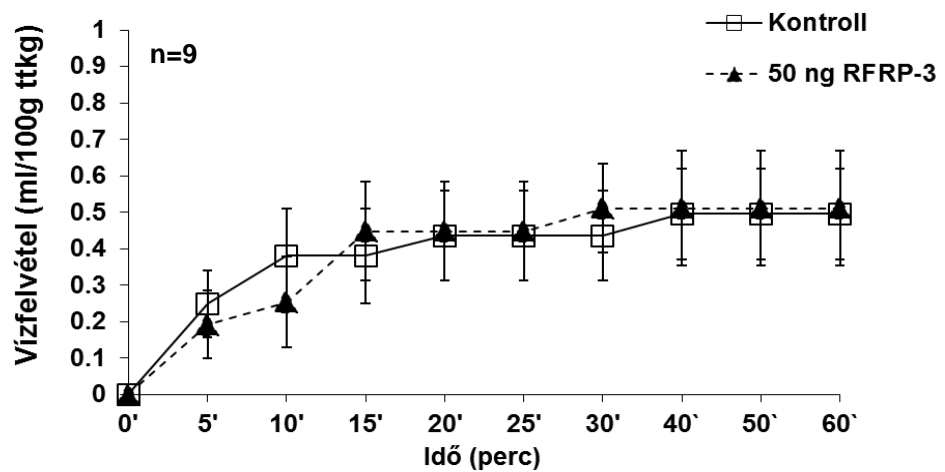
24.ábra A 100 ng RFRP-3 hatása a folyékony táplálékfelvételen 24 órán át táplálékdeprivált állatokon. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-3 kezelések követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

4.2.5. Az intraamygdaláris RFRP-1 és RFRP-3 mikroinjekcióik hatása a vízfelvételekre

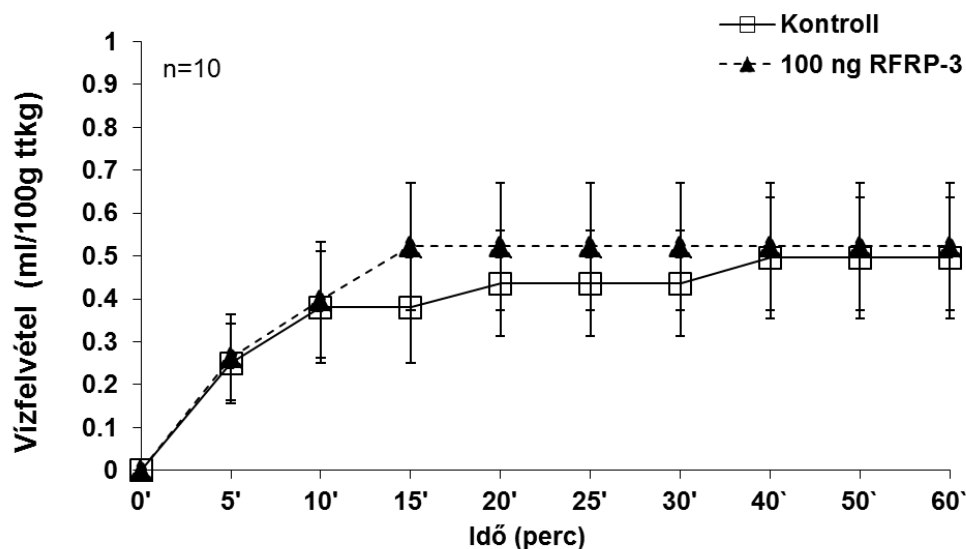
Kísérleteinkben folyékony táplálékfelvételi paradigmát alkalmaztunk. Mivel a folyékony táplálékfelvétel és a vízfelvétel hasonló motoros viselkedést igényel, ezért szükségesnek éreztük, hogy kísérleteinkben külön megvizsgáljuk a peptidek hatását a vízfelvételekre. Tanulmányoztuk, hogy az általunk előző kísérletekben használt ugyanazon dózisú RFRP-1 és RFRP-3 CeA-ba történő injektálást követően miként hat a vízfelvételekre (25., 26., 27. ábra).



25.ábra A 50 ng RFRP-1 hatása a vízfelétele. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-1 kezeléseket követő vízfelétele átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.



26.ábra A 50 ng RFRP-3 hatása a vízfelétele. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-3 kezeléseket követő vízfelétele átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.



27.ábra A 100 ng RFRP-3 hatása a vízfelvételekre. Az üres négyzetek a kontroll-, a fekete háromszögek pedig az RFRP-3 kezeléseket követő vízfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

Kísérleteink eredményeként elmondhatjuk, hogy a CeA-ba injektált táplálékfelvételi kísérletekben effektív dózisú RFRP-1, illetve RFRP-3 nincs hatással a patkányok vízfelvételeire. Tehát a vízfelvétellel szemben is specifikusnak tekinthető a folyékony tápfelvétel.

4.3. Az állatok magatartásának vizsgálata táplálékfelvételi paradigmában

Ezen kísérletekre azért volt szükség, hogy megállapíthassuk, magyarázható-e a táplálékfelvételen bekövetkező változás egyéb magatartási változással. Például, ha az állat a peptid kezelés hatására több időt tölt mosakodással, explorációval, akkor a táplálékfelvétellel töltött ideje csökken, ami magyarázhatná a tejfelvétel csökkenését is. Mind az RFRP-1, mind az RFRP-3 anorexigén hatása az első 25 percen nyilvánul meg, ezért a kísérleti állatok magatartásának megfigyelését az intraamygdaláris injekciókat követően 25 perces időszakban végeztük. A II.-III. Táblázatban láthatóak a videofelvételekről elemzett 5 perces kiértékelések adatai, melyek az állatok által a különböző magatartásformákkal (evés, mosakodás, vakaródzás, exploráció, pihenés) töltött idejüket mutatják be az egyes kezeléseknél.

Az RFRP-1 kezelés hatására nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes viselkedési formákat illetően. Bár fontos megemlíteni, hogy az első 5 percben az RFRP-1 kezelést kapott állatok evéssel töltött ideje csökkent, illetve az explorációra fordított idejük nőtt ugyanezen állatok kontroll kezelés követően mért idejükhöz viszonyítva. Az RFRP-1 kezelést követően a mosakodással töltött időben a 4. megfigyelési periódusban némi fokozódás látható, de ezek az értékek nem mutatnak szignifikáns eltérést. Az RFRP-1 kezelést követően az állatok táplálékfelvétellel töltött ideje az első 10 percben idejük 25%-át tette ki, míg kontroll kezelést követően 40 %-ot mutatott. Ugyanakkor az explorációval töltött idejük az első 10 percben az RFRP-1 kezelés esetén idejük 64%--át, míg vehiculum kezelés esetén 50%-ot tette ki. Megállapíthatjuk, hogy az RFRP-1 kezelés hatására kialakuló táplálékfelvétel redukció nem magyarázható a viselkedési formák megváltozásával.

Az RFRP-3 kezelés esetén a videófelvetelek analízisének eredményei a III. Táblázatban láthatóak. Vizsgálataink során egyik megfigyelési periódusban sem találtunk eltérést a magatartási formákban a két kezelést (RFRP-3 vs. Kontroll) összehasonlítva. Az állatok az első 10 percben főként az explorációval töltötték idejüket. A kontroll kezeléshez képest az RFRP-3 kezelés esetén az állatok táplálékfelvétellel töltött ideje az első 10 percben csökkent, de nem érte el a szignifikáns szintet. A megfigyelés előrehaladtával az evéssel töltött idő fokozatosan csökkent, a mosakodással, vakaródzással töltött idő megnőtt, végül a pihenés ideje növekedett meg. Az állatok exploráló magatartása a megfigyelt periódus végéig hasonló szinten maradt. Megállapíthatjuk, hogy az RFRP-3 indukálta táplálékfelvétel csökkenés nem tulajdonítható a magatartási formákban történő változásoknak.

II. Táblázat: Az 50 ng RFRP-1 vagy vehiculum (Kontroll kezelés) hatása a különböző viselkedési formákkal töltött időre. Az eredményeket (n=7) ötperces időintervallumokban secundumban adtuk meg (átlag±S.E.M.).

Ötperces megfigyelési periódusok	Evés		Mosakodás		Vakaródzás	
	Kontroll	50 ng RFRP-1	Kontroll	50 ng RFRP-1	Kontroll	50 ng RFRP-1
1.	156.28±27.20	84.28±10.11	28.85±8.52	16.86±3.24	10.71±7.09	0.00±0.00
2.	86.29±13.47	67.86±14.78	18.29±3.64	54.29±15.17	19.86±5.95	7.71±2.48
3.	48.14±17.77	46.43±10.09	99.85±22.47	67.28±17.33	15.71±4.77	9.14±2.97
4.	15.71±6.70	19.57±8.61	31.71±18.46	110.43±23.6	26.38±6.55	8.5±2.70
5.	0.00±0.00	14±9.26	30.43±18.62	36.57±20.87	10±4.30	19.71±8.48

Ötperces megfigyelési periódusok	Exploráció		Pihenés	
	Kontroll	50 ng RFRP-1	Kontroll	50 ng RFRP-1
1.	104.14±31.05	207.14±9.81	0.00±0.00	0.00±0.00
2.	192.4±14.14	174.30±29.86	0.00±0.00	0.00±0.00
3.	133.57±22.98	169.71±22.76	0.00±0.00	8.86±5.86
4.	160.00±29.75	108.28±26.70	76.86±33.12	52.57±17.57
5.	174.57±32.11	85.14±27.2	144.57±37.67	144.57±37.67

III. Táblázat: Az 50 ng RFRP-3 vagy vehiculum (Kontroll kezelés) hatása a különböző viselkedési formákkal töltött időre. Az eredményeket (n=8) ötperces időintervallumokban secundumban adtuk meg (átlag±S.E.M.).

Ötperces megfigyelési periódusok	Evés		Mosakodás		Vakaródzás	
	Kontroll	50 ng RFRP-3	Kontroll	50 ng RFRP-3	Kontroll	50 ng RFRP-3
1.	102.5±26.33	54.38±12.04	29±8.38	21.88±4.98	9.63±6.60	0.00±0.00
2.	108±14.05	76.88±18.66	24.13±3.64	36.25±12.27	14.88±5.93	0.00±0.00
3.	11.37±4.24	39.5±8.91	72.88±20.83	63±14.01	26.75±5.80	6.5±3.70
4.	16±9.13	15.38±5.67	37.38±16.82	34.88±8.93	26.38±6.55	8.5±2.70
5.	0.00±0.00	4±2.82	1.75±1.23	3.14±2.07	11±4.20	10.38±3.38

Ötperces megfigyelési periódusok	Exploráció		Pihenés	
	Kontroll	50 ng RFRP-3	Kontroll	50 ng RFRP-3
1.	158.88±31.14	225.25±12.16	0.00±0.00	4.00±2.82
2.	161.8±15.38	157±15.42	0.00±0.00	22.38±15.82
3.	162.25±27.11	155.88±19.25	15.13±10.7	21.38±8.22
4.	121.25±26.37	143.25±25.66	71.00±30.94	65.75±28.88
5.	149.88±27.87	161.58±29.72	137.88±30.58	147.43±29.10

4.4. A testhőmérsékletet vizsgáló kísérletek eredményei

Jól ismert, hogy a testhőmérsékletbeli változások befolyásolhatják a táplálékfelvételt, ezért megvizsgáltuk az RFRP kezelések hatását a testhőmérsékletre. Az irodalomban talált adatok alapján elmondható, hogy az RFRP-3 i.c.v. adva testhőmérséklet csökkenést okoz egérben. Továbbá, hogy az RFRP-3 magasabb dózisú alkalmazása (30 nmol) kisebb mértékű hypothermiát vált ki, mint közepes dózisban (10 nmol) alkalmazva [47, 146, 175].

Az RFRP-1 testhőmérséklet változásra vonatkozó hatásáról nem találtunk adatot az irodalomban. Mindeddig nincs adat arra vonatkozóan sem, hogy alacsony dózisban az amygdalába injektált RFRP-1 és RFRP-3 miként befolyásolja a testhőmérsékletet patkányokban.

4.4.1. Az intraamygdaláris RFRP-1 mikroinjekció hatása a testhőmérsékletre

Az 50 ng RFRP-1 és a kontroll kezelés testhőmérsékletre gyakorolt hatását a IV. Táblázatban foglaltuk össze. A kísérlet során sem a 10., sem a 20. percben nem mutatkozott eltérés a testhőmérsékletben a két kezelést összehasonlítva.

IV. Táblázat: A táblázatban a colonban mért testhőmérséklet értékeinek változását tüntettük fel az injektálás előtt 10 perccel, illetve az 50 ng RFRP-1 és a kontroll kezelést követően (n=8). N.S.: nem szignifikáns.

	Kontroll	50 ng RFRP-1	
10 perccel az injekció előtt	36,73±0,13	36,67±0,17	N.S.
10 perccel az injekció után	37,01±0,11	36,77±0,19	N.S.
20 perccel az injekció után	36,83±0,18	36,82±0,14	N.S.

Ezen kísérleteink eredményeként elmondhatjuk, hogy az 50 ng RFRP-1 kezelés nincs hatással a patkányok testhőmérsékletére a mikroinjektálást követő 20 percben, tehát e paraméter változása nem lehet oka a táplálékfelvételen bekövetkezett reduciónak.

4.4.2. Az intraamygdaláris RFRP-3 mikroinjekciók hatása a testhőmérsékletre

Az 50 ng RFRP-3 és a kontroll kezelés, valamint a 100 ng RFRP-3 és a kontroll kezelés testhőmérsékletre gyakorolt hatását a V.-VI. táblázatban foglaltuk össze. A kísérlet során sem a 10., sem a 20. percben nem mutatkozott eltérés a testhőmérsékletben a kezeléseket összehasonlítva.

V. Táblázat: A táblázatban a colonban mért testhőmérséklet értékeinek változását tüntettük fel az injektálás előtt 10 perccel illetve az 50 ng RFRP-3 és a kontroll kezelést követően (n=8). N.S.: nem szignifikáns.

	Kontroll	50 ng RFRP-3	
10 perccel az injekció előtt	36,46±0,15	36,62±0,25	N.S.
10 perccel az injekció után	36,77±0,15	36,75±0,13	N.S.
20 perccel az injekció után	36,83±0,15	36,72±0,19	N.S.

VI. Táblázat: A táblázatban a colonban mért testhőmérséklet értékeinek változását tüntettük fel az injektálás előtt 10 perccel, illetve a 100 ng RFRP-3 és a kontroll kezelést követően (n=8). N.S.: nem szignifikáns.

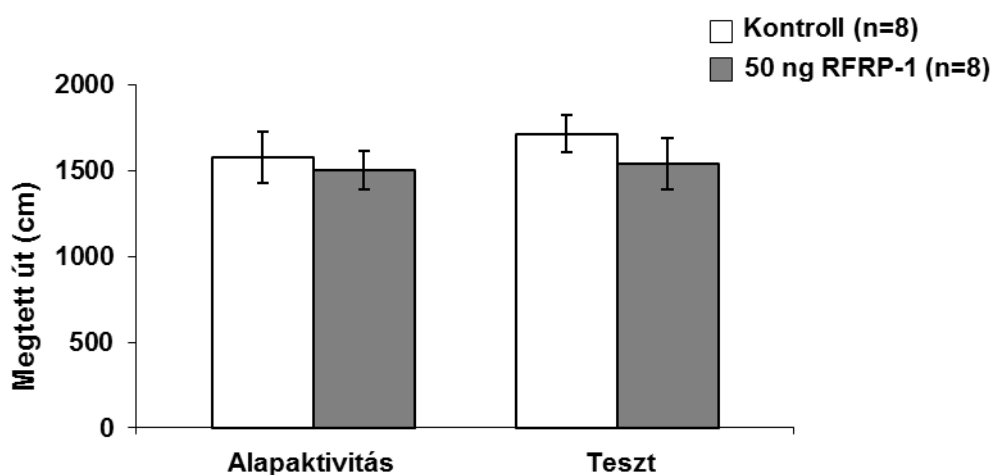
	Kontroll	100 ng RFRP-3	
10 perccel az injekció előtt	36,48±0,14	36,7±0,08	N.S.
10 perccel az injekció után	36,81±0,20	36,92±0,16	N.S.
20 perccel az injekció után	36,61±0,18	36,93±0,08	N.S.

Az eredmények összefoglalásaként megállapíthatjuk, hogy a kezelések hatására egyik mérési időpontban sem található különbség a testhőmérsékletben, tehát a táplálékfelvétel csökkenés oka nem a testhőmérséklet változásban keresendő.

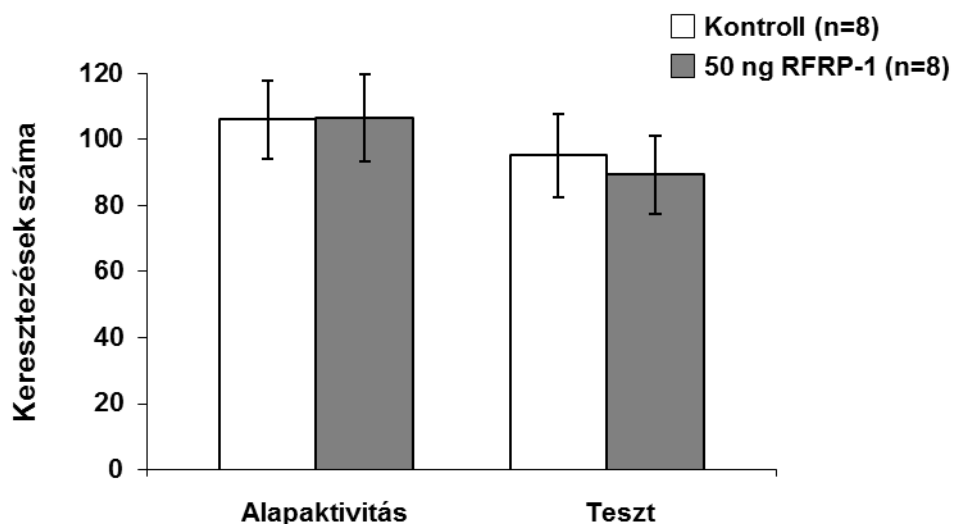
4.5. Magatartási kísérletek eredményei

4.5.1. Az RFRP-1 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása open field tesztben

Open field tesztben az RFRP-1 spontán (motoros) aktivitásra kifejtett hatását vizsgáltuk. Tíz perccel a vehiculum, illetve az 50 ng RFRP-1 bilaterális CeA injekcióját követően 5 percen keresztül mértük a patkányok által megtett utat és a keresztezések számát, melyek jó indikátorai a motoros aktivitásnak (28-29. ábra). A vehiculummal kezelt, illetve az 50 ng RFRP-1 kezelésben részesült állatcsoportok teszt során kapott adatait összehasonlítottuk az egy nappal a mikroinjekciókat megelőzően végzett mérés során felvett megtett út hosszával és a keresztezések számával, azaz az alapaktivitással. Továbbá az anxiogén”-szerű” hatás kimutatására használt paramétert, az open field apparátus centrális areájában töltött időt szintén összehasonlítottuk a különféle kezelésben részesült állatcsoportoknál. Az eredmények statisztikai értékelése során semmilyen összefüggésben nem találtunk eltérést az állatcsoportok között. A két-szemponos ANOVA analízis nem mutatott szignifikáns különbséget a kísérlet egyes ülései között [$F(1,16)=0,450$, $p=0,508$], a különféle kezelésben részesült (50 ng RFRP-1 vagy vehiculum) csoportok között [$F(1,16)=0,926$ $p=0,344$] és a különféle kezeléseket és a kísérlet egyes ülései közötti interakció tekintetében sem [$F(1,32)=0,013$, $p=0,987$].

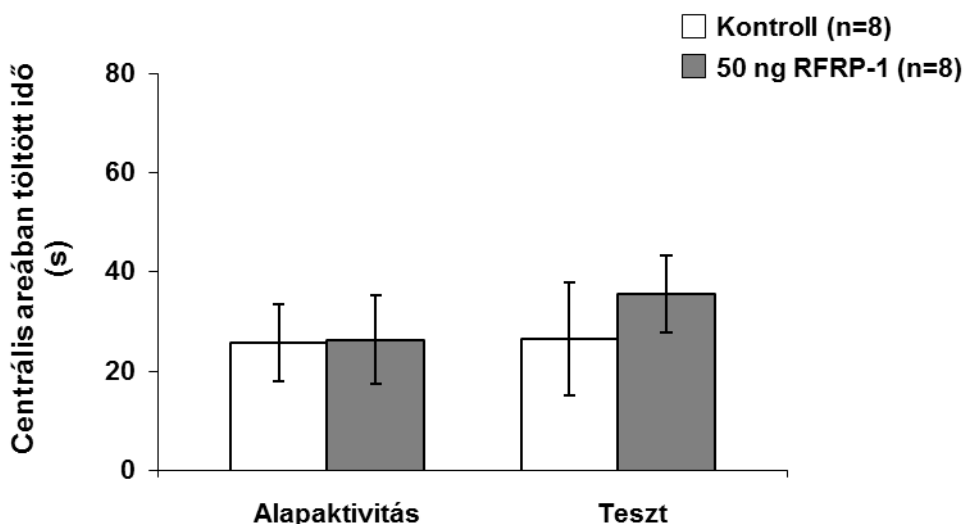


28. ábra A CeA-ba mikroinjektált RFRP-1 hatásának vizsgálata open field tesztben. Az oszlopok a megtett utat mutatják (Átlag \pm S.E.M). Az állatcsoportok (A kontroll, illetve 50 ng RFRP-1 kezelésben részesült csoport) jelölése és az állatszámok jobb oldalon láthatóak.



29. ábra A CeA-ba mikroinjektált RFRP-1 hatásának vizsgálata open field tesztben. Az oszlopok a keresztezések számát reprezentálják (Átlag± S.E.M). Az állatcsoportok (A kontroll, illetve 50 ng RFRP-1 kezelésben részesült csoport) jelölése és az állatszámok jobb oldalon láthatóak.

A keresztezések számának ANOVA analízise nem mutatott szignifikáns különbséget a kísérlet egyes ülései között [$F(1,16)=1,398$, $p=0,247$], a különféle kezelésben részesült csoportok között [$F(1,16)=0,049$, $p=0,826$] és a kezelés x ülés interakció sem volt szignifikáns [$F(1,32)=0,07$, $p=0,794$].



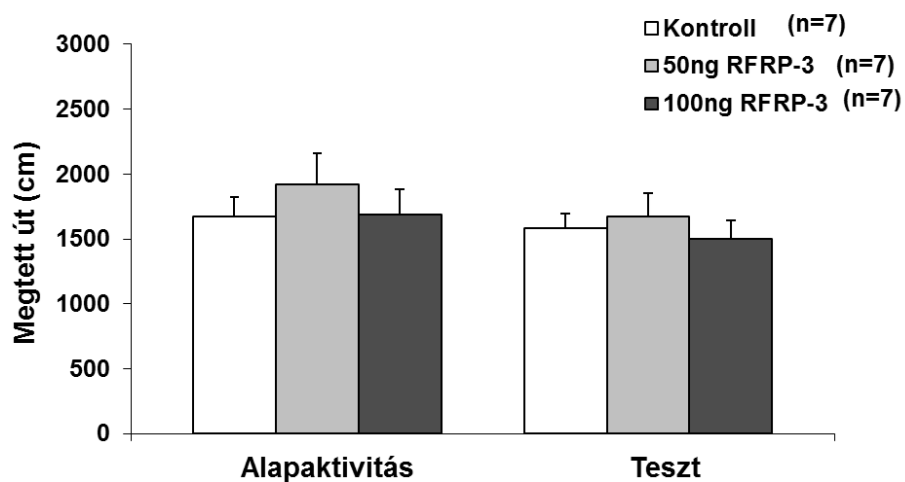
30. ábra A CeA-ba mikroinjektált RFRP-1 hatásának vizsgálata open field tesztben. Az oszlopok a centrális areában töltött időt reprezentálják (Átlag± S.E.M). Az állatcsoportok (A kontroll, illetve 50 ng RFRP-1 kezelésben részesült csoport) jelölése és az állatszámok jobb oldalon láthatóak.

A centrális areában töltött időre vonatkozóan az ANOVA analízis nem mutatott szignifikáns különbséget a kísérlet egyes ülései között [$F(1,16)=0,293$, $p=0,593$], a különféle kezelésben részesült csoportok között [$F(1,16)=0,271$, $p=0,607$] és a kezelés x ülés interakció sem volt szignifikáns [$F(1,32)=0,199$, $p=0,659$] (30.ábra).

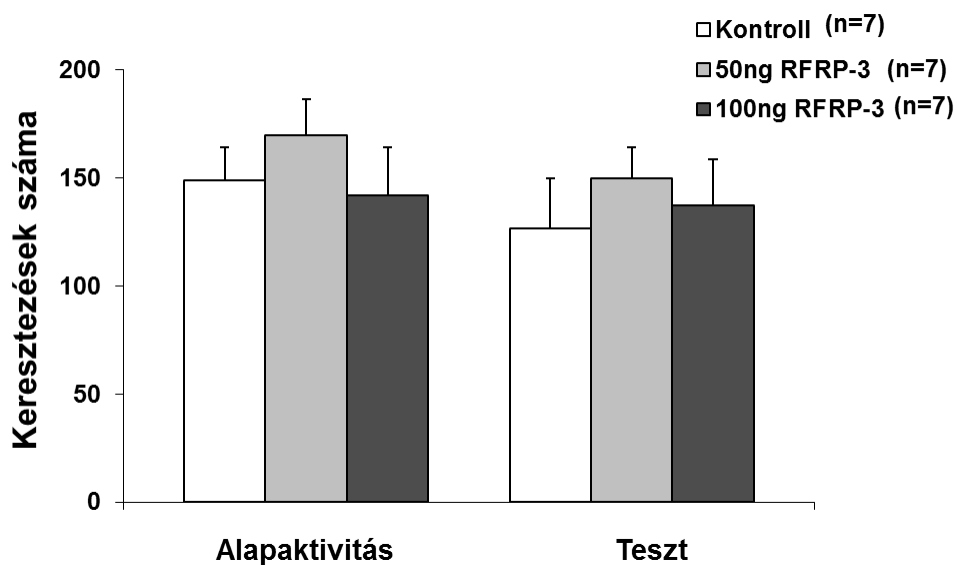
Ezen adatok alapján arra következtethetünk, hogy 50 ng RFRP-1 az állatok általános aktivitására nem volt hatással, a peptid ezen dózisa nem okoz sem hypoaktivitást, sem hyperaktivitást, így ezen paraméterek nem játszanak szerepet az anorexigén hatás kialakulásában.

4.5.2. Az RFRP-3 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása open field tesztben

Tíz perccel a vehiculum, az 50 ng vagy a 100 ng RFRP-3 bilaterális CeA injekcióját követően 5 percen keresztül mértük a patkányok által megtett utat és a keresztezések számát. Az eltérő kezelésben részesült állatcsoportok teszt során kapott adatait összevetettük, illetve összehasonlítottuk az egy nappal a mikroinjekciókat megelőzően végzett mérés során felvett megtett út hosszával és keresztezések számával, azaz az alapaktivitással. Az eredmények statisztikai értékelése során nem találtunk szignifikáns különbséget az kísérlet egyes ülései között [$F(1,21)=1,525$, $p=0,225$], a különféle kezelésben részesült csoportok között [$F(2,14)=0,789$, $p=0,462$] és a kezelés x ülés interakció tekintetében sem [$F(2,42)=0,104$, $p=0,902$] (31.ábra).

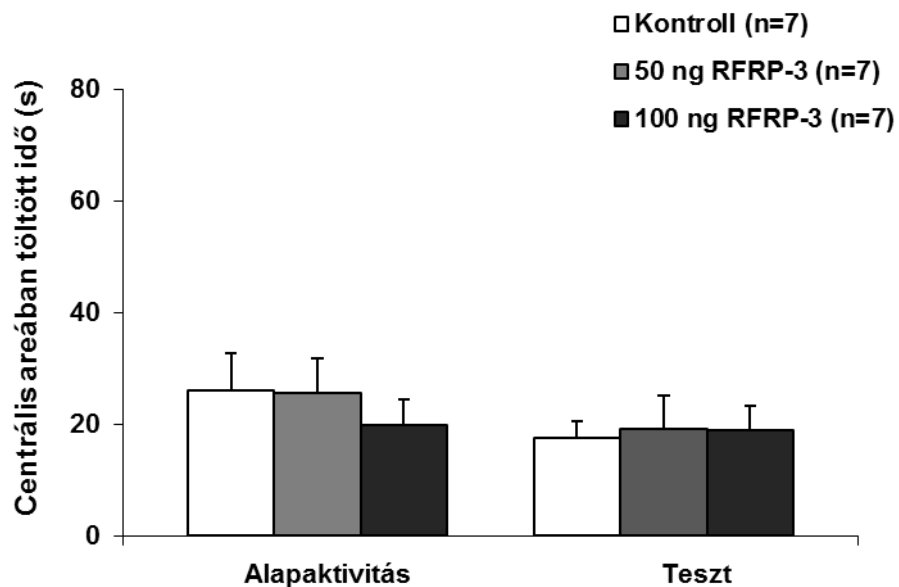


31. ábra A CeA-ba mikroinjektált RFRP-3 hatásának vizsgálata open field tesztben. Az oszlopok a megtett utat mutatják (Átlag± S.E.M). A kontroll, illetve RFRP-3 kezelésben részesült csoportok jelölése és az állatszámok jobb oldalon láthatóak.



32. ábra A CeA-ba mikroinjektált RFRP-3 hatásának vizsgálata Open field tesztben. Az oszlopok a keresztezések számát reprezentálják (Átlag± S.E.M). A kontroll, illetve RFRP-3 kezelésben részesült csoportok jelölése és az állatszámok jobb oldalon láthatóak.

A keresztezések számát illetően az ANOVA analízis nem mutatott szignifikáns különbséget a kísérlet egyes ülései között [$F(1,21)=1,007$, $p=0,322$], a különféle kezelésben részesült csoportok között [$F(2,14)=0,817$, $p=0,450$] és a kezelés x ülés interakció sem volt szignifikáns [$F(2,42)=0,118$, $p=0,889$] (32.ábra).



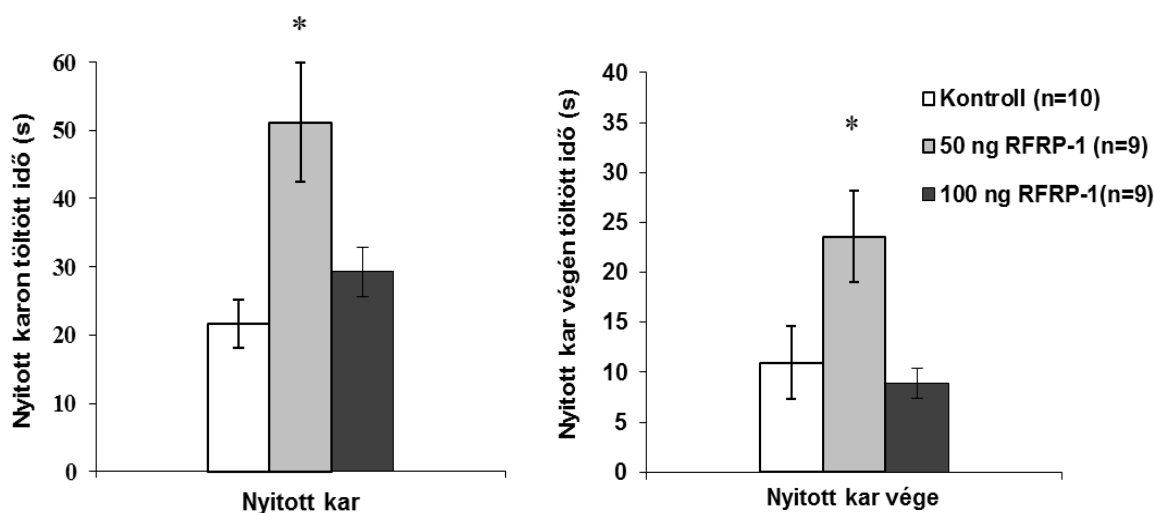
33. ábra A CeA-ba mikroinjektált RFRP-3 hatásának vizsgálata Open field tesztben. Az oszlopok a centrális areában töltött időt reprezentálják (Átlag± S.E.M.). A kontroll, illetve RFRP-3 kezelésben részesült csoportok jelölése és az állatszámok jobb oldalon láthatóak.

A centrális areában töltött időre vonatkozóan az ANOVA analízis nem mutatott szignifikáns különbséget a kísérlet egyes ülései között [$F(1,21)=1,007$, $p=0,322$], a különféle kezelésben részesült csoportok között [$F(2,14)=0,817$, $p=0,450$] és a kezelés x ülés interakció sem volt szignifikáns [$F(2,42)=0,118$, $p=0,889$] (33.ábra).

Ezen adatok alapján arra következtethetünk, hogy a korábbi kísérleteinkben hatékonyan bizonyult dózistartományban az RFRP-3 nem befolyásolja az állatok általános aktivitását.

4.5.3. Az RFRP-1 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása emelt keresztállító tesztben

Emelt keresztállító tesztben vizsgáltuk az RFRP-1 lehetséges szorongást fokozó (anxiogén), illetve szorongás oldó (anxiolitikus) hatását. Tíz perccel a vehiculum, az 50 ng vagy a 100 ng RFRP-1 bilaterális CeA injekcióját követően 5 percen keresztül mértük a zárt karokon, a nyitott karokon és a nyitott karok végein eltöltött időt, valamint a zárt karokra, a nyitott karokra, a nyitott karok végeire történő belépések számát és az összes megtett utat. A kapott eredmények a 34. ábrán és a VII. Táblázatban láthatóak. Az egyszempontos ANOVA analízis szignifikáns különbséget mutatott a csoportok között a nyitott karon töltött időben [$F(2, 25) = 7,248$; $p < 0,01$], valamint a nyitott kar végén töltött időben [$F(2, 25) = 5,068$; $p < 0,05$]. Az 50 ng RFRP-1 hatására ($n = 9$) szignifikánsan nőtt a nyitott karon töltött idő, valamint a nyitott kar végén töltött idő mind a kontrollokhoz ($n = 10$, $p < 0,05$), mind a 100 ng RFRP-1 kezelést kapott csoporthoz ($n = 9$, $p < 0,05$) képest. A 100 ng RFRP-1 kezelésben részesült csoportnál nőtt ugyan a nyitott karon töltött idő a kontrollokhoz viszonyítva, a két csoport között azonban nem volt szignifikáns a különbség, a nyitott kar végén töltött idő ugyancsak nem változott a nagyobb dózisú RFRP-1 hatására.



34. ábra CeA-ba mikroinjektált RFRP-1 hatásának vizsgálata Emelt keresztállító tesztben. Az oszlopok a nyitott karon és a nyitott kar végén töltött idő átlagát reprezentálják (Átlag \pm S.E.M). A három különféle kezelésben részesült csoport jelölése és az állatszámok a jobb oldalon láthatóak.

Az ANOVA analízis szignifikáns különbséget mutatott a csoportok között a nyitott és zárt karon töltött idő arányában (VII.Táblázat: nyitott karon/zárt karon töltött idő) [$F(2,25)= 0,460$; $p<0,05$]. Az 50 ng dózisú RFRP-1 kezelés hatására szignifikánsan nőtt a nyitott karon/zárt karon töltött idő aránya a kontroll csoportéhoz képest ($p<0,05$). A zárt karon töltött idő nem változott jelentősen az RFRP -1 kezelésekre hatására (VII. Táblázat).

Szignifikáns különbséget találtunk a nyitott karon [$F(2, 25)= 7,963$; $p<0,01$], és a nyitott kar végén megtett út esetében is [$F(2, 25)= 8,816$; $p<0,01$]. Hasonlóan a karon töltött idők esetében tapasztaltakhoz, az 50 ng RFRP-1 kezelés hatására szignifikánsan nőtt a nyitott karon, valamint a nyitott kar végén megtett út a kontrollokhoz képest ($p<0,05$). Az 100 ng RFRP-1 hatására nem volt szignifikáns a különbség sem a nyitott karon megtett útban ($p>0,05$), sem a nyitott kar végén megtett útban a kontrollokhoz képest ($p>0,05$). Ugyanakkor az 50 ng és 100 ng RFRP-1 kezelést kapott csoportok között szignifikáns különbség mutatkozott ($p<0,01$).

Az RFRP-1 kezelésekre nem befolyásolták sem az összes belépések számát, sem az állatok által összes megtett utat (VII.Táblázat), nem volt szignifikáns különbség a paraméterekben a csoportok között. Az 50 ng dózisú RFRP-1 hatására kis mértékben nőtt az összes megtett út a nagyobb dózist kapott RFRP-1 és a kontroll csoportéhoz viszonyítva, a különbség azonban egyik csoportnál sem volt szignifikáns. Ezen adatok alapján arra következtethetünk, hogy az RFRP-1 kezelésekre az állatok általános aktivitására nem voltak jelentős hatással. Az 50 ng RFRP-1 kezelés hatására kis mértékben nőtt a nyitott kar látogatási gyakorisága a kontroll csoportéhoz képest, de ez a különbség nem volt szignifikáns [$F(2, 25)= 2,326$; $p=0,118$]. Szignifikánsan nőtt ugyanakkor a nyitott kar végére történő belépések száma [$F(2, 25)= 5,88$; $p<0,01$]. Az 50 ng dózisú RFRP-1 hatására szignifikánsan nőtt a nyitott kar végére történő belépések száma mind a kontrollokhoz ($p<0,05$), mind a 100 ng RFRP-1-et kapott ($p<0,01$) csoportéhoz képest.

VII. Táblázat: A CeA-ba adott RFRP-1 hatása Emelt keresztpalló tesztben.

	Kontroll	50 ng RFRP-1	100 ng RFRP-1
Karon töltött idő (s)			
Nyitott kar	21,65 ± 3,50	51,17 ± 8,73*	29,24 ± 3,65
Nyitott kar vége	10,94 ± 3,64	23,57 ± 4,55*	8,84 ± 1,52
Zárt kar	230,06 ± 18,57	211,42 ± 2,56	247,96 ± 5,64
Nyitott kar/Zárt kar	0,126 ± 0,045	0,269 ± 0,059*	0,120 ± 0,017
Belépések száma			
Összes	17,90 ± 1,91	23,00 ± 1,91	18,55 ± 2,65
Zárt kar	11,30 ± 1,60	13,33 ± 0,78	12,22 ± 1,93
Nyitott kar	6,60 ± 1,17	9,66 ± 1,41	6,33 ± 0,97
Nyitott kar vége	2,00 ± 0,68	4,00 ± 0,60*	1,33 ± 0,28
Nyitott kar/ Zárt kar	0,811 ± 0,29	0,725 ± 0,09	0,573 ± 0,07
Megtett út (cm)			
Összes	2187,06 ± 80,47	2430,01 ± 117,63	2150,40 ± 150,29
Zárt kar	1785,95 ± 82,72	1684,62 ± 115,84	1727,53 ± 113,93
Nyitott kar	194,93 ± 39,94	454,29 ± 69,09*	228,31 ± 35,26
Nyitott kar vége	55,26 ± 16,56	176,27 ± 34,50*	59,11 ± 13,30

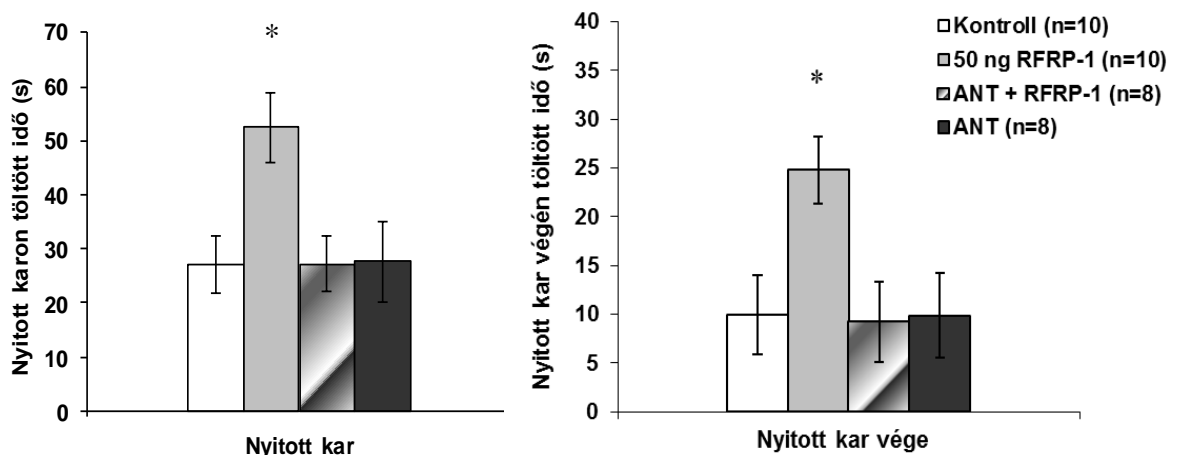
*:p<0,05 a Kontrollhoz és a 100 ng RFRP-1 csoporthoz képest

A nyitott és a zárt karra történő belépések aránya nem változott az egyes csoportok esetében. Ezen utóbbi eredmények arra utalnak, hogy az RFRP-1 kezelések hatására elsősorban nem a belépések száma nőtt meg, hanem inkább az az idő, amit az állatok egy-egy belépés alkalmával a nyitott karon töltöttek, ugyanakkor a nyitott kar végén mind az ott töltött idő, mind a belépések száma szignifikánsan nőtt az 50 ng dózisú RFRP-1 kezelés hatására.

Eredményeinként tehát elmondhatjuk, hogy a CeA-ba injektált RFRP-1 szorongásoldó hatásának bizonyult Emelt keresztpalló tesztben. A kisebb dózisú (50 ng) RFRP-1 hatására nőtt a nyitott karon, valamint a nyitott kar végén töltött idő, és az ott megtett út is. A kezelés ugyanakkor az állatok aktivitását nem változtatta meg

(az RFRP-1 kezelés hatására nem változott sem az össz belépések száma, sem az összesen megtett út).

A következő kísérletben az NPPF receptorok szerepét vizsgáltuk az RFRP-1 anxiolitikus hatásának közvetítésében, oly módon, hogy az NPPF receptor antagonistát injektáltunk a CeA-ba, illetve kombinált kezelést alkalmaztunk. Eredményeink a 35. ábrán és VIII. Táblázatban láthatóak. Szignifikáns különbséget találtunk a csoportok között a nyitott karon töltött időben [ANOVA, $F(3, 32) = 4,574$; $p < 0,01$], valamint a nyitott kar végén töltött időben [$F(3, 32) = 4,085$; $p < 0,05$]. Az 50 ng dózisú RFRP-1 hatására ($n = 10$) szignifikánsan nőtt a nyitott karon ($p < 0,05$), valamint a nyitott kar végén töltött idő ($p < 0,05$) a kontrollokhoz képest ($n = 9$), tehát az 50 ng dózisú RFRP-1 anxiolitikus hatását ismét kimutattuk.



35. ábra A CeA-ba mikroinjektált NPPF receptor antagonistá RF9 hatásának vizsgálata Emelt kereszt-palló tesztben. Az oszlopok a nyitott karon és a nyitott kar végén töltött idő átlagát reprezentálják (Átlag \pm S.E.M). A négy különféle kezelésben részesült csoport jelölése és az állatszámok a jobb oldalon láthatóak.

Az NPPF receptor antagonistát az RFRP-1 effektív dózisával közel ekvimoláris dózisban alkalmaztuk 15 perccel az RFRP-1 kezelést megelőzően (ANT+RFRP-1, $n = 8$). A 20 ng dózisú RF9 injektálása kivédte az RFRP-1 szorongásoldó hatását. Az RFRP-1 kezelésben részesült csoport esetén a nyitott karon, valamint a nyitott kar végén töltött idő szignifikánsan különbözött a kontroll, az ANT és az ANT + RFRP-1 kezelést kapott csoporttól ($p < 0,05$). Az RF9 antagonistá előkezelés felfüggesztette az RFRP-1 anxiolitikus hatását, mert az ANT+RFRP-1 csoport nyitott karon, illetve nyitott kar végén töltött ideje szignifikánsan csökkent az RFRP-1 kezelt csoporthoz képest,

ugyanakkor az előkezelés hatására eltűnt a különbség a kontrollokhoz képest (VIII. Táblázat).

Az antagonistá önmagában adva (ANT, n=8) nem volt hatással az állatok viselkedésére, a karokon töltött idők nem különböztek a kontroll csoportnál mért értékektől. Az RFRP-1 kezelés hatására szignifikánsan nőtt a nyitott kar végén töltött idő a kontroll és az ANT+RFRP-1 csoportokhoz képest ($p < 0,05$), az ANT csoport esetében a különbség éppen elérte a statisztikailag szignifikáns szintet (az érték $p=0,05$).

VIII. Táblázat: A CeA-ba adott NPPF receptor antagonistá hatása Emelt keresztpláló tesztben

	Kontroll	50 ng RFRP-1	20 ng ANT	ANT+ RFRP-1
Karon töltött idő (s)				
Nyitott kar	27,08 ± 5,35	52,45 ± 6,38*	27,65 ± 7,49	27,25 ± 5,01
Nyitott kar vége	9,96 ± 3,72	24,82 ± 3,45*	9,89 ± 4,32	9,25 ± 4,09
Zárt kar	220,22 ± 17,7	209,41 ± 9,43	246,44 ± 11,13	245,05 ± 6,43
Nyitott kar/ Zárt kar	0,155 ± 0,047	0,266 ± 0,049	0,122 ± 0,035	0,114 ± 0,022
Belépések száma				
Összes	21,5 ± 2,47	23,6 ± 1,75	20,50 ± 2,92	20,75 ± 2,58
Zárt kar	13,6 ± 1,83	13,4 ± 1,11	12,62 ± 1,73	13,25 ± 1,85
Nyitott kar	8,4 ± 1,20	10,2 ± 1,04	7,87 ± 1,641	7,5 ± 0,82
Nyitott kar vége	2,00 ± 0,760	4,11 ± 0,45*	1,50 ± 0,53	1,37 ± 0,56
Nyitott kar/ Zárt kar	0,810 ± 0,27	0,788 ± 0,081	0,652 ± 0,131	0,611 ± 0,069
Megtett út (cm)				
Összes	2410,53±103,73	2549,89 ± 122,46	2525,80 ± 139,7	2652,13 ± 218,21
Zárt kar	1948,21±77,00	1818,44±138,12	2147,36±112,85	2236,57±180,41
Nyitott kar	217,03±53,95	447,258±50,09*	193,6±58,48	209,03±41,75
Nyitott kar vége	68,73±25,94	171,51±28,02*	59,97±23,02	62,54±20,74

*: $p < 0,05$ a Kontrollhoz, az ANT, az ANT + RFRP-1 csoporthoz képest

A nyitott és zárt karon töltött idő aránya esetében az egyes csoportok közötti különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet [$F(3, 32) = 2,799$; $p = 0,056$]. Az RFRP-1 kezelést kapott csoport esetében az arány nagyobb volt, mint a másik három csoport esetében, a különbség azonban csak tendenciaként mutatkozott. Az RFRP-1 kezelés hatására nőtt a nyitott karon töltött idő aránya a kontroll csoporthoz képest, de nem érte el a szignifikáns szintet. Az antagonistának önmagában nem volt hatása e paraméterre sem, a nyitott karon és zárt karon töltött idő aránya nem különbözött a kontrolloktól.

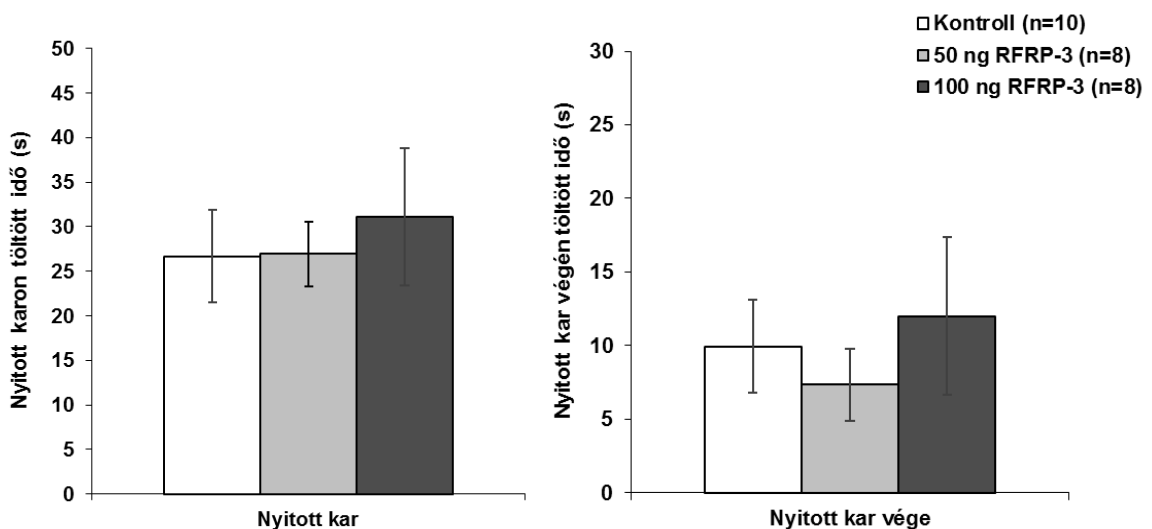
Szignifikáns különbséget találtunk a nyitott karon [$F(3, 32) = 5,740$; $p < 0,01$], valamint a nyitott kar végén megtett út esetében is [$F(3, 32) = 4,822$; $p < 0,01$]. Hasonlóan a karokon töltött idők esetében tapasztaltakhoz, az 50 ng RFRP-1 kezelés hatására szignifikánsan nőtt a nyitott karon, valamint a nyitott kar végén megtett út ($p < 0,001$ és $p < 0,01$) a kontrollokhöz képest (VIII. Táblázat). Továbbá a kombinált kezelésnél, a 20 ng RF9 receptor antagonistá előkezelés kivédte az RFRP-1 hatását, mert az állatok által a nyitott karon, valamint a nyitott kar végén megtett út szignifikánsan különbözött az RFRP-1 kezelést kapott csoport esetében mért értékektől ($p < 0,05$), ugyanakkor nem különbözött a kontroll csoport esetében kapott eredményektől ($p > 0,05$). Az antagonistá önmagában adva nem volt hatással e paraméterekre, a karokon megtett út nem különbözött a kontroll csoportnál mért értékektől. A nyitott karon megtett út, valamint a nyitott kar végén megtett út vonatkozásában ugyanakkor szignifikánsan különbözött az RFRP-1 kezelésben részesült csoporttól ($p < 0,01$, $p < 0,05$).

Az RFRP-1 kezelés e kísérletben szintén nem befolyásolta sem az állatok által összes megtett utat, sem az összes belépések számát (VIII. Táblázat). Ezen adatok alapján arra következtethetünk, hogy a kezelések az állatok általános aktivitására nem voltak hatással. Szignifikánsan nőtt ugyanakkor a nyitott kar végének látogatási gyakorisága [$F(3,32) = 4,604$; $p < 0,01$]. Az 50 ng dózisú RFRP-1 hatására szignifikánsan nőtt a nyitott kar végére történő belépések száma az ANT és az ANT+RFRP-1 csoportokhoz képest ($p < 0,05$), a kontrollokhöz képest is nőtt ugyan, de a különbség nem volt szignifikáns ($p = 0,064$). A nyitott kar esetében is nőtt a belépések száma, azonban ez a különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet (VIII. Táblázat). A nyitott és zárt karra történő belépések aránya nem különbözött az egyes csoportok esetében. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az 50 ng RFRP-1 hatására nem nőtt meg

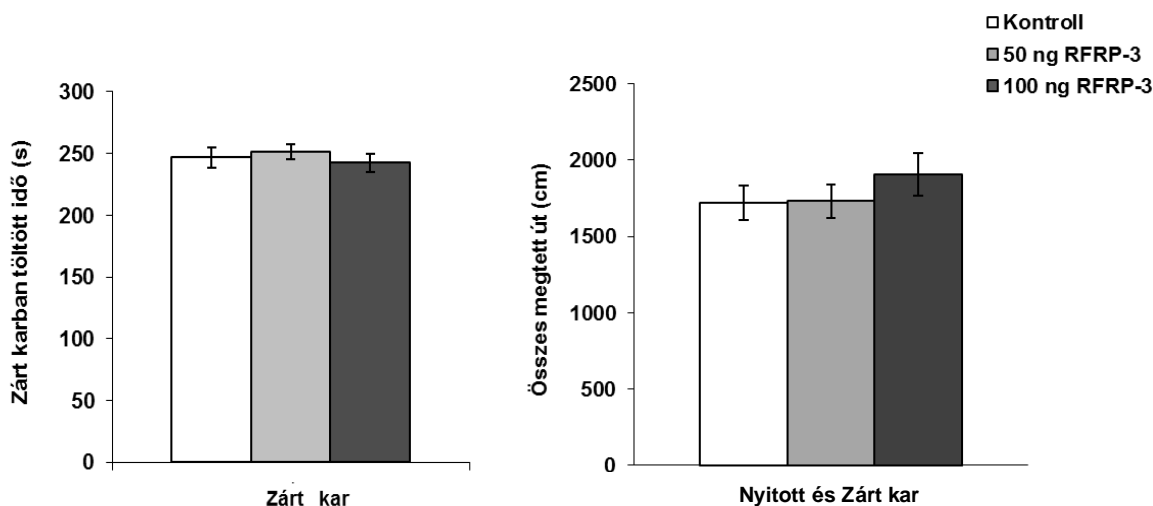
a belépések száma, így valószínűleg az az idő nőtt, amit az állatok egy-egy belépés alkalmával a nyitott karon, vagy a nyitott kar végén töltöttek.

4.5.4. Az RFRP-3 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása emelt keresztpalló tesztben

Az emelt keresztpalló tesztet elvégeztük a CeA-ba adott RFRP-3 anxiogén vagy anxiolitikus hatásának tesztelésére is, a nyitott karon, a nyitott kar végén és a zárt karon töltött időt, valamint az összes megtett utat az alábbi ábrákon mutatjuk be. Az egy-szemponos ANOVA analízis nem mutatott szignifikáns különbséget a nyitott karon [F(2,23)=0,170, p=0,845], illetve a nyitott kar végén töltött időben a csoportok között [F(2,23)=0,329, p=0,723] (36.ábra). Nem találtunk továbbá szignifikáns különbséget a zárt karon töltött időben [F(2,23)=0,338, p=0,716] és az összes megtett útban sem [F(2,23)=0,736, p=0,490] (37.ábra). A belépések számában szintén nem volt különbség a csoportok között (az adatokat nem ábrázoltuk). Ezen eredmények azt sugallják, hogy sem az 50 ng, sem pedig a 100 ng dózisú RFRP-3 nem indukál sem anxiogén, sem anxiolitikus hatást.



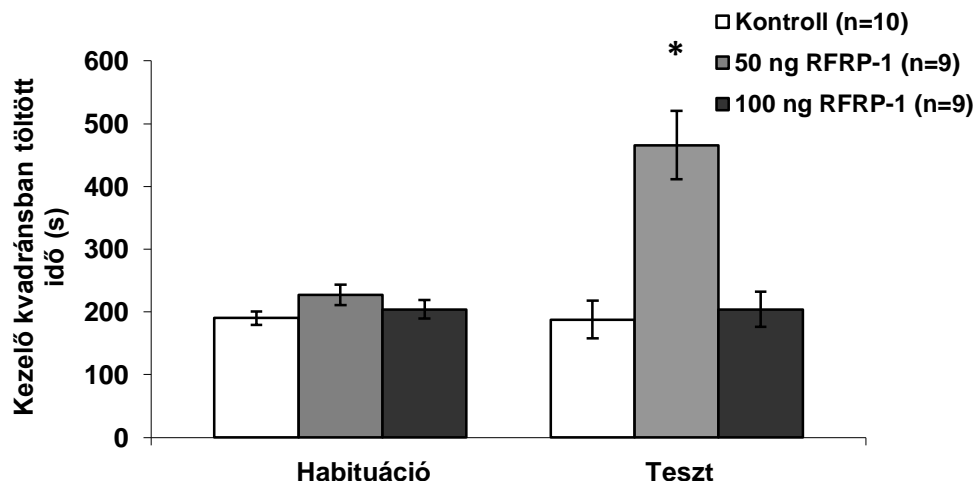
36. ábra A CeA-ba mikroinjektált RFRP-3 hatásának vizsgálata emelt keresztpalló tesztben. Az oszlopok a nyitott karon és a nyitott kar végén töltött idő átlagát reprezentálják (Átlag± S.E.M). A három különféle kezelésben részesült csoport jelölése és az állatszámok jobb oldalon láthatóak.



37. ábra A CeA-ba mikroinjektált RFRP-3 hatásának vizsgálata emelt keresztpalló tesztben. Az oszlopok a zárt karon töltött időt valamint karokon megtett összes mutatják (Átlag± S.E.M). A három különféle kezelésben részesült csoport jelölése és az állatszámok jobb oldalon láthatóak.

4.5.5. Az RFRP-1 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása helypreferencia tesztben

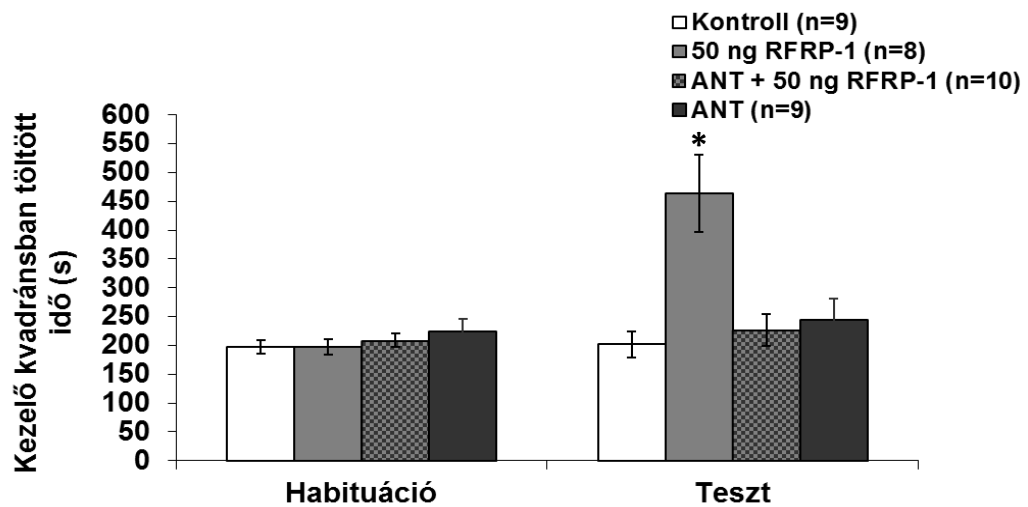
A helypreferencia teszt egy anyag jutalmazó-megerősítő hatásának vizsgálatára szolgál. A CeA-ba injektált RFRP-1 kezelések hatását az állatok helypreferenciájára a 38. ábrán mutatjuk be. A két-szemponos ANOVA analízis alapján szignifikáns különbséget találtunk a kísérlet egyes ülései között [$F(1,28)=12,237$ $p<0,001$], a különféle kezelésben részesült csoportok között [$F(2,20)=16,575$ $p<0,01$] és a különféle kezelések és a kísérlet egyes ülései közötti interakcióban [$F(2,56)=12,426$ $p<0,001$]. Az ANOVA analízis eredménye azt mutatta, hogy a habituáció során a kezelő kvadránsban töltött idő esetében nem alakult ki előzetes preferencia az egyes csoportok között, ugyanakkor a habituációhoz képest a teszt során az 50 ng RFRP-1-et ($q=9,109$, $p<0,001$) kapott állatok szignifikánsan több időt töltöttek a kezelő kvadráns területén. Ez a kontroll és a 100 ng RFRP-1 kezelésben részesült állatokról nem mondható el ($q=0,1424$, $p>0,05$ N.S.). A teszt során az 50 ng RFRP-1 ($q=10,513$, $p<0,001$) kezelésben részesült állatok szignifikánsan több ideig tartózkodtak a kezelő kvadráns területén, mint a kontroll csoport tagjai, tehát az RFRP-1 50 ng dózisa megerősítő hatású.



38. ábra A CeA-ba mikroinjektált RFRP-1 hatásának vizsgálata helypreferencia tesztben. Az oszlopok a kezelő kvadránsban töltött időt reprezentálják (Átlag± S.E.M) a habituáció és a teszt során. A kontroll, illetve az RFRP-1 kezelésben részesült csoportok jelölése és az állatszámok jobb oldalon láthatóak.

A következő kísérletben az NPFF-R antagonistá RF9 hatását vizsgáltuk helypreferencia tesztben (39. ábra). A két-szemponos ANOVA szignifikáns különbséget mutatott a kísérlet egyes ülései között [$F(1,36)=13,039$, $p<0,01$], a különféle kezelésben részesült csoportok között [$F(3,20)=6,999$ $p<0,001$], a különféle kezelések és a kísérlet egyes ülései közötti interakció is szignifikáns volt [$F(3,72)=8,062$, $p<0,001$]. A habituációhoz képest a teszt során az 50 ng RFRP-1-et ($q=8,324$, $p<0,001$) kapott állatok szignifikánsan több időt töltöttek a kezelő kvadráns területén. Továbbá a teszt során, az 50 ng RFRP-1 ($q=8,590$, $p<0,001$) kezelésben részesült állatok szignifikánsan több ideig tartózkodtak a kezelő kvadráns területén, mint a kontroll csoport tagjai. Ugyanakkor az RFRP-1 pozitív megerősítő hatását az antagonistá előkezelés kivédte. Nem alakult ki helypreferencia az ANT+RFRP-1 kezelésben részesült csoportnál [ANT+RFRP-1: habituáció vs. teszt ($q=0,6399$, $p>0,05$ N.S.)]. A kontroll és az RF9 antagonistával kezelt állatoknál sem alakult ki helypreferencia [kontroll: habituáció vs. teszt ($q=0,1581$, $p>0,05$ N.S.)] és [ANT: habituáció vs. teszt ($q=0,6513$, $p>0,05$ N.S.)]. A teszt során az 50 ng RFRP-1 kezelésben részesült állatok szignifikánsan több időt töltöttek a kezelő kvadránsban, mint a kontroll kezelésben részesült állatcsoport [teszt: 50 ng RFRP-1 vs. kontroll

($q=8,437$, $p<0,001$]. Tehát az 50 ng RFRP-1 kezelés helypreferenciát indukált, amit az NPPF-R antagonistá RF9 előkezelés eliminált.



39. ábra Az NPPF-R antagonistá hatásának vizsgálata helypreferencia tesztben. Az oszlopok a kezelő kvadránsban töltött időt reprezentálják (Átlag± S.E.M) a habituáció és a teszt során. A négy különféle kezelésben részesült csoport jelölése és az állatszámok jobb oldalon láthatóak.

Vizsgáltuk továbbá helypreferencia tesztben is a kezeléseket hatásait a lokomotoros aktivitásra (IX. táblázat). Megállapíthatjuk, hogy egyik kezelés (50 ng RFRP-1, ANT, kombinált kezelés) sem befolyásolta a vizsgált paramétereket, vagyis az állatok által a négy kvadránsba történő belépések számát és a megtett távolságot a kontroll csoporthoz képest helypreferencia tesztben. A belépések számát és a megtett utat illetően a két-szemponos ANOVA analízis alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a különféle kezelésben részesült csoportok között [$F(3,20)=0,326$ $p>0,05$] és [$F(3,20)=2,143$ $p>0,05$].

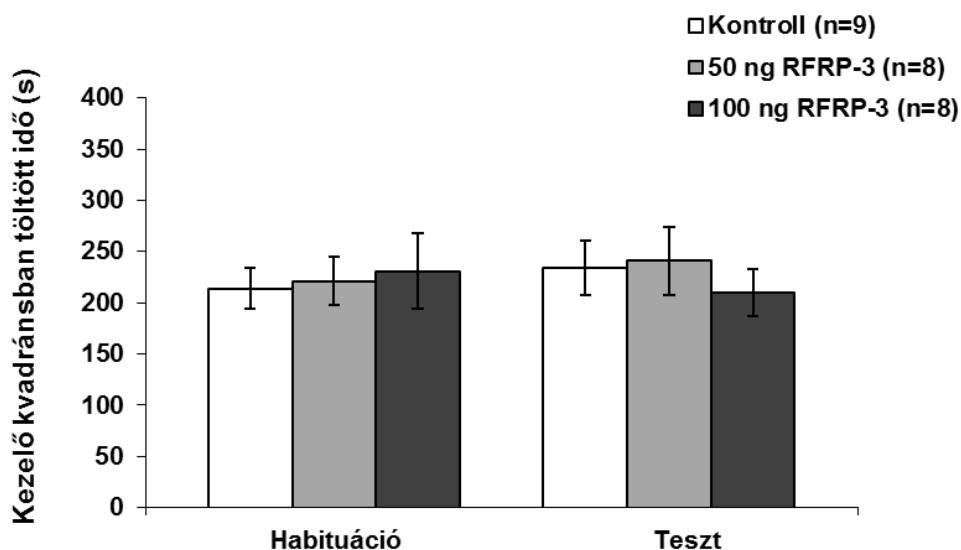
IX. Táblázat: Lokomotoros aktivitás helypreferencia tesztben

2. Kísérlet	Összes belépés száma		Megtett távolság (cm)	
	Habituáció	Test	Habituáció	Test
Kontroll	130.2±11.0	101.2±11.8	7519.7±295.1	6924.7±514.6
RFRP-1 50 ng	121.8±9.5	95.5±11.0	6965.2±353.6	6557.6±344.4
ANT + RFRP-1	125.1±8.3	104.2±11.8	7739.3±393.5	6817.3±464.0
ANT 20 ng	122.2±9.6	118.3±16.7	8543.8±487.5	7067.9±373.0

4.5.6. Az RFRP-3 bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása helypreferencia tesztben

A helypreferencia tesztet elvégeztük a CeA-ba adott RFRP-3 pozitív megerősítő hatásának vizsgálatára is. A habituáció és a teszt során a kezelő kvadránsban töltött időt az 40. ábrán mutatjuk be. A két-szemponos ANOVA nem mutatott szignifikáns különbséget sem a kezelések között [$F(2, 18) = 0,068$; $p = 0,934$], sem a kísérlet egyes ülései között [$F(1, 25) = 0,076$; $p = 0,785$], továbbá a kezelés x ülés interakció sem volt szignifikáns [$F(2, 50) = 0,329$; $p = 0,722$].

A habituáció során nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes kvadránsokban töltött időben egyik csoportba tartozó állatok esetében sem (az adatokat nem ábrázoltuk). Nem volt eltérés a kezelő kvadránsban töltött időben a csoportok között, sem a habituáció, sem a teszt során [$F(2, 22) = 0,091$; $p = 0,913$ és $F(2, 22) = 0,298$; $p = 0,745$]. Sem a kontroll állatok, sem az 50 ng RFRP-1-et kapott csoport nem töltött szignifikánsan sem több, sem kevesebb időt a kezelő kvadránsban a teszt során, mint a habituációkor. A 100 ng RFRP-1 kezelésben részesült csoport ($n=8$) valamivel kevesebb időt töltött a kezelő kvadránsban, a különbség azonban nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet.



40. ábra A CeA-ba mikroinjektált RFRP-3 hatásának vizsgálata helypreferencia tesztben. Az oszlopok a kezelő kvadránsban töltött időt reprezentálják (Átlag \pm S.E.M) a habituáció és a teszt során. A kontroll, illetve az RFRP-3 kezelésben részesült csoportok jelölése és az állatszámok jobb oldalon láthatóak.

5. DISZKUSSZIÓ

5.1. Az eredmények megbeszélése, értékelése

5.1.1. Táplálékfelvételt vizsgáló kísérletek megvitatása

Neurofiziológiai kutatások eredményei felfedték, hogy a táplálkozási magatartásban, az éhség-jóllakottság szabályozásában mely agyi struktúrák, illetve pályarendszerek játszanak elsődleges szerepet. A LC területéről induló ventrális noradrenergias rendszer (VNAR) a "jóllakottság-pálya" elnevezést kapta, mivel sértését követően -a VMH-ban végzett léziós kísérletekhez hasonlóan-az állatok hyperphagiássá váltak [2]. Az "éhségpályát" két másik katekolaminrendszer, a substantia nigra-ból kiinduló ún. nigrostrialis dopaminergias rendszer (NSDR) [135, 220], valamint a főként a VTA-ból eredő mezolimbikus dopaminergias rendszer (MLDR) együttesen alkotja [123, 124]. Ez utóbbi két rendszer - terminálisokat adva - áthalad az LH-on és a globus palliduson is [124, 135]. A további kutatások nyomán bebizonyosodott, hogy számos extrahypothalamicus struktúra is fontos szerepet játszik a táplálékfelvétel központi idegrendszeri szabályozásában. Közöttük az AMY, mely szintén e két rendszer kettős szabályozása alatt áll.

Az AMY különböző területeinek léziója során mind hyperphagia, mind hypophagia megfigyelhető. Fonberg kutyákon végzett léziós kísérleti eredményei alátámasztják, hogy az AMY dorsomediális-centrális része az éhség, míg basolaterális része a jóllakottság érzetének kialakulásában játszik szerepet [56]. Macskákon végzett basolaterális AMY lézió hatására hyperphagiássá váltak az állatok, míg az AMY dorzomediális régiójának sértése aphagiához vezet és az instrumentális táplálkozási reakciók megszűnését idézi elő [54]. Az AMY komplexitását erősítik továbbá azon neurokémiai és hisztológiai vizsgálatok is, melyek az AMY kettős katekolamin - noradrenalin (NA) és dopamin (DA) – beidegzésére irányultak [220]. Lénárd és munkatársai kimutatták, hogy a testtömeg szabályozásában a katekolaminok aránya a döntő, nem az abszolút mennyiségük: a relatív DA-hiányt eredményező mikroléziók fogyást, a NA-hiánnyal járó léziók pedig testsúlygyarapodást okoznak [121, 122]. Az AMY komplexumon belül a legmagasabb tirozin-hidroxiláz aktivitást és DA-koncentrációt a CeA-ban mutattak ki [8, 101]. A CeA kétirányú kapcsolatban áll a hypothalamusszal és az agytörzszel, így információkat kap fontos vegetatív

működések szabályozó központoktól, a NTS-től, n. vagus motoros magjától, a parabrachialis mag felől [90]. Ezen struktúrák úgy ismertek, mint a táplálékfelvétellel kapcsolatos vegetatív funkciók modulátorai és az ízérző pályarendszer fontos átkapcsoló állomásai.

Az AMY-ban igazolták különböző orexigén és anorexigén peptidek és peptid receptorok jelenlétét. Míg például a galanin és az orexin A intraamygdaloid injektálása fokozta a táplálékfelvételt [80, 196], addig a CRH injektálása a BLA-ba jóllakottságot indukált, ugyanakkor a CeA-ba injektálva nem befolyásolta a táplálékfelvételt [93]. A bombezin-szerű peptidek, mint a bombezin vagy neuromedin C direkt injektálása a CeA-ba anorexigén hatású [49, 50]. Továbbá az enterostatin és az orexigén hatásáról jól ismert NPY specifikus adása a CeA-ba csökkentette a zsírfelvételt [103, 128].

A CeA-ban kimutattak mind RFRP-1, mind RFRP-3 immunreaktív rostokat, továbbá a peptidek egyik receptorát, az NPF1 receptor jelenlétét is igazolták [12, 129, 235, 236]. Eredményeink azt mutatják, hogy az 50 ng dózisú RFRP-1 injektálása a CeA-ba szignifikáns, tranzienst folyékony táplálékfelvétel csökkenést okoz. Az RFRP-1 táplálékfelvételcsökkentő hatása az első 5-25 percben történik, de a kumulatív értékelés következtében 60 percig szignifikáns marad a hatás. *Az RFRP-1 hatása specifikusnak bizonyult, mivel NPF1 receptor antagonistával (RF9) eliminálható volt. Ezek az első eredmények, melyek patkányban a RFRP-1 táplálékfelvétel csökkentő hatásáról számolnak be a CeA-ban.*

Az RFRP-3 esetében eredményeink azt mutatják, hogy a CeA-ba történő injektálása szignifikáns, tranzienst folyékony táplálékfelvétel csökkenést okoz az 50-100 ng dózistartományban. Az RFRP-3 táplálékfelvétel csökkentő hatása ugyancsak az első 5-25 percben történik, de a kumulatív értékelés következtében 60 percig szignifikáns marad a hatás. *Az RFRP-3 anorexigén hatása specifikus, mivel NPF1 receptor antagonistával RF9 alkalmazásával eliminálható volt. Ezek az első eredmények, melyek patkányban a RFRP-3 táplálékfelvétel csökkentő hatásáról számolnak be a CeA-ban.*

Ezen eredmények azonban szemben állnak az irodalomban eddig fellelhető eredményekkel. Nevezetesen Johnson és munkatársai, valamint Murakami és munkatársai által végzett kísérletekben, az RFRP-3 i.c.v. injektálása táplálékfelvétel növekedést okozott [94, 147]. Az általunk alkalmazott hatékony dózistartomány pikomolos tartományba (50.5-101.1 pmol/0.4ul) esett, ez sokkal alacsonyabb, mint az agykamrába történő injektálások során használt dózisok (505 - 1010 pmol/5ul), melyeknél a peptid orexigén hatásáról számoltak be.

Fontos tudni, hogy nagyszámú RFRP-3 immunreaktív neuront találtak az arcuatus magban, a DMH-ban, a dorzális mammilláris magban és a periventrikuláris területeken a 3. agykamra falához közel [112, 213, 236]. Az RFRP-3 neuronok efferens rostokat küldenek a VMN-ba, az LH-ba az MCH és orexin sejtekhez, valamint az arcuatus magba mind az NPY immunreaktív, mind a POMC immunreaktív sejtekhez. Ezeket a projekciókat felfedték egérben, borjúban és rhesus majmokban [174, 213, 217]. Patkányban szintén kimutattak az arcuatus magban RFRP-3 projekciókat, de sejtszinten még nem azonosították [112]. Ezen projekciók szerepének vizsgálatára irányultak elektrofiziológiai kísérletek, melyek felfedték, hogy az RFRP-3 gátolja a POMC neuronok aktivitását és csökkenti a kisszeptin okozta POMC neuronok tüzelési aktivitását (excitációját) egérben [66]. A táplálékfelvételt gátló (anorexigen) sejtek, mint pl. a POMC neuronok gátlása eredményezheti a táplálékfelvétel növekedését, ez magyarázhatja az RFRP-3 orexigén hatását. Feltételezhető, hogy az RFRP-3 i.c.v. adását követő táplálékfelvételt fokozó hatás az NPY/POMC rendszeren keresztül valósul meg. A CeA-ba injektált RFRP-3 pedig más mechanizmuson keresztül fejti ki hatását.

Továbbá fontos kiemelni a különbséget az i.c.v. alkalmazás és egy jól körülhatárolt agyi struktúra célzott mikroinjekciójának hatásai között. Az i.c.v. injekció esetében az alkalmazott neuropeptid diffúziós sebessége nagyobb a liquorban, mint az agyi parenchymában, így az RFRP-3 az agykamra viszonylag nagy felszínén szétterjed, mielőtt bekerülne az agyszövetbe. Ezért, véleményünk szerint, az i.c.v. injekció egy jóval általánosabb hatást okoz, mint a lokális mikroinjekció. Továbbá a hatás függ a receptor denzitástól és a peptid féléletidejétől is (ezen peptidek esetében ez nem ismert). Kísérleteinkben a CeA-ba beültetett kanülök viszonylag távol vannak az agykamrától. A diffúzió miatt minél távolabb van egy adott agyi struktúra, ott annál kisebb a beadott anyag koncentrációja. Ezért feltételezhetjük, hogy az i.c.v. injektált RFRP-3 azon NPFF receptorokhoz kötődött, melyek az agykamra falához közelebb helyezkedtek el, valamint koncentrációja fokozatosan csökkent az agyi parenchymában. Ezzel szemben az RFRP-3 CeA-ba történő injektálása során a lokális, elérhető NPFF receptorokhoz tud kötődni és ily módon befolyásolja a lokális neuronhálózatok működését. Fontos megemlíteni, hogy más neuropeptidek esetében is találunk különbségeket az i.c.v. hatás és a peptid valamely közvetlen agyi parenchymába történő injektálásának hatása között. Az acylált ghrelin i.c.v. injektálva fokozza a táplálékfelvételt [195], míg a BLA-ba adva

anorexigén hatást mutat [206]. Az NPY i.c.v. adva stimulálja a táplálékfelvételt [81, 103], míg közvetlenül a CeA-ba injektálva csökkenti a zsírbevitelt [173].

Fontos továbbá megemlíteni azt is, hogy az RFRP peptidek i.c.v. adása c-Fos protein expressziót indukál a LC-ban, az NTS-ban, valamint az arcuatus magban [236]. Érdekes lehetőségeket vetnek fel azon eredmények, melyek szerint az obes ob/ob leptin deficiens egerekben csökken az RFRP-3 expresszió az arcuatus magban, valamint ugyanezen egerekben leptin i.c.v. adását követően nőtt az RFRP-3 expresszió. Ezen eredmények azt sugallják, hogy az RFRP-3 szerepet játszik a leptin szignál közvetítésében [233].

Eredményeinkhez hasonló adatokat mutatnak mind kinetikájában, mind az RFRP-3 specifikus hatásában azon vizsgálatok, melyek szerint az RFRP-3 (VPNLPQRF-NH₂-aminosavszekvenciájú humán RFRP-3) táplálékfelvétel csökkentő hatást fejt ki i.c.v. adva csirkékben. Az RFRP-3 anorexigén hatása rövid-idejű (60 percig szignifikáns), a vízfelvételeire nincs hatása, valamint a lokomóciót és egyéb sztereotíp magatartást sem befolyásolja [29]. Csirkékben i.c.v. injektálva a neuropeptid FF (NPF, amely szekvenciáját tekintve a legközelebb áll a RFRP peptidekhez) ugyancsak anorexigén hatású, azonban a hatás hosszabb ideig tart, mint az RFRP-3 esetében. Feltételezik, hogy az RFRP-3 és az NPF anorexigén hatása az NPF receptorok 2 eltérő altípusán közvetítődik. Az NPF sokkal nagyobb affinitással kötődik az NPF2 receptorhoz, mint az NPF1 receptorhoz. Az NPF anorexigén hatása NPF2 receptoron keresztül közvetítődik, míg az RFRP-3 nagyobb affinitást mutat az NPF1 receptorhoz, valószínűleg anorexigén hatását ezen receptoron fejt ki [12, 129]. Ezen eredmények azt sugallják, hogy az NPF2-es receptor közvetítette hatás erőteljesebb és hosszabb ideig tart, míg az NPF1 közvetítette hatás tranziensebb [175]. Ez az eredmény egyezést mutat, a mi eredményeinkkel, mely szerint az RFRP-1 és RFRP-3 táplálékfelvételt csökkentő hatása az NPF1 receptoron keresztül érvényesül, ezért tranziensebb, míg i.c.v. adva patkányban mindkét receptoron közvetítődhet a hatás.

Más magyarázat is lehetséges az RFRP-3 anorexigén hatásával kapcsolatban. Nagy dózisú PrRP (az RFamid család egy másik peptidje) és RFRP-3 peptidek együttes injektálása csirkékben nem várt hatást mutat, ugyanis ez esetben a PrRP orexigén hatását csökkentette az RFRP-3 anorexigén hatása [29]. Ez felveti a lehetőséget, hogy az RFRP-3 táplálékfelvétel csökkentő hatása a PrRP orexigén rendszer antagonizálásán keresztül hat. Szintén csirkékben vizsgálták, hogy az RFRP-3 indukálta jóllakottságra

hogyan hatnak a különböző opioid-receptor antagonisták [30]. Kimutatták, hogy az RFRP-3 és delta opioid receptor antagonisták együttes centrális injektálása táplálékfelvételre redukciót okoz.

Vizsgálatainkban az NPF1 receptor antagonisták RF9 előkezelés meggátolta mind az RFRP-1, mind az RFRP-3 táplálékfelvételre csökkentő hatását a CeA-ban. Az RF9 egy szelektív NPF1 receptor antagonisták, ugyanakkor az NPF1 receptor két szubtypusára nézve nem mutat szelektivitást [194]. A CeA-ban az NPF1 receptort azonosították, az NPF2 receptort nem mutatták ki. Maletinska és munkatársai az RF9 antagonisták hatásával ellentmondó eredményeket írtak le egéren, ugyanis azt találták, hogy az RF9 önmagában történő i.c.v. adása dózisfüggő anorexién hatást mutat. Ezekben a kísérletekben az RF9-et 30 nanomólos dózisban (14,5 µg, ami körülbelül 300 x vagy 600 x nagyobb dózis, mint a mi kísérleteinkben alkalmazott dózisok) injektálták az agykamrába. Továbbá ezen tanulmány szerint az RF9 anorexién hatását az NPF2-es receptor közvetíti [132].

Az irodalomban nem találunk adatot arra vonatkozóan, hogy az RFRP-1 és RFRP-3 táplálékdeprivált állatokon miként befolyásolja a táplálékfelvételt. Ugyanakkor fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy a CeA-ba injektált RFRP-1 és RFRP-3 megtartja-e anorexién hatását a 24-órás táplálékmegvonást követő vizsgálatoknál. A kísérletek során különbséget figyeltünk meg az RFamid-típusú peptidek hatásában. A 24 órán át táplálékdeprivált patkányoknál az 50 ng RFRP-1 mikroinjektálása a CeA-ba nem okoz változást a táplálékfelvételen. Ellenben az RFRP-3 kisebb dózisa (50 ng) 24-órás éheztetés után is képes csökkenést indukálni a táplálékfelvétel mértékében. Az RFRP-3 nagyobb dózisának alkalmazása táplálékdeprivációt követően ugyancsak nincs hatással a táplálékfelvételre.

Fontos kiemelni tehát, hogy az RFRP-1 táplálékfelvétel szabályozásban betöltött szerepe kisebb, mint az RFRP-3 esetében. Az RFRP-1 CeA-ba injektált 50 ng-os dózisa anorexién hatású, míg az RFRP-3 esetében két dózis is effektívnek bizonyult, továbbá az RFRP-3 50 ng-os dózisa a 24 órán át táplálékdeprivált állatoknál is anorexiénnek bizonyult.

5.1.2. A magatartást analizáló kísérletek megvitatása a táplálékfelvételi paradigmában

Az evéssel kapcsolatos magatartást analizáló kísérleteinkben a táplálékfelvételt mérő kísérletekhez hasonlóan szignifikáns mértékű táplálékfelvétel csökkenést tapasztaltunk. A vizsgálatok során a patkányoknál nem tapasztaltunk rosszullétet, amely felelős lenne a táplálékfelvétel csökkenéséért. Ugyanígy az i.c.v. RFRP-1, illetve RFRP-3 kezelések során sem írták, hogy rosszullétet okoznának, holott ezek a dózisok még magasabbak is voltak az általunk használt dózisoknál. Az RFamid család egy másik peptidje, a PrRP, amely i.c.v. adva anorexigén hatású patkányokban, szintén nem okoz rosszullétet, továbbá nem okoz kondicionált-ízaverziót, a táplálkozási magatartást (behavioral satiety sequence) befolyásolja, így a táplálékfelvétel homeosztatikus regulátoraként tartják számon [116].

A kísérleteink során azt figyeltük meg, hogy az RFRP kezelések hatására mindjárt a vizsgálat elején csökkent a táplálékfelvétellel töltött idő és nőtt az exploráció mértéke. Az RFRP-1 kezelés utáni negyedik 5 perces periódusban a mosakodással töltött idő megnövekedett, de nem érte el a szignifikáns szintet. Az RFRP-3 kezelést követően ugyancsak nem találtunk eltérést a kontroll értékekhez viszonyítva. Mindegyik kezelés esetén elmondható, hogy a megfigyelt periódus második felében az állatok mosakodással, vakaródzással töltött ideje, végül a pihenéssel töltött idő nőtt meg. Továbbá az állatok exploráló magatartása a kísérlet végéig hasonló szinten maradt.

Eredményeink tehát bizonyítják, hogy a CeA-ba injektált RFRP-1 és RFRP-3 kiemelkedő viselkedési hatások indukálása nélkül csökkenti a táplálékfelvételt, tehát a táplálékfelvételre specifikusak.

5.1.3. A testhőmérséklet mérési kísérlet megvitatása

A testhőmérséklet mérése során az egyes mérési időpontokban a kezelések között (vehiculum vs. 50 ng RFRP-1, vehiculum vs. 50 ng RFRP-3 vagy 100 ng RFRP-3) nem találtunk szignifikáns eltérést. Tehát a táplálékfelvétel csökkenésének bekövetkezése a testhőmérsékleti változásoktól függetlennek tekinthető. A bevezetőben ismertettük, hogy az agykamrába adott RFRP-3 hypothermiát indukál egerekben [47]. A testhőmérséklet csökkenés maximuma a 30 nmol dózisú RFRP-3 kezelés esetében az injektálást követő 15. percben volt, a testhőmérséklet a 90. percben visszatért a bazális

értékre. Quelven és munkatársai kimutatták, hogy a harmadik agykamrába adott RFRP-3 már kisebb dózisban is (10 nmol) hypothermiát vált ki, ekkor a hatás maximuma a 10. percen volt [175]. Jelen kísérletekben a táplálékfelvétel csökkenés az első 20-25 percre korlátozódik, ezért fontos volt megvizsgálni erre az időszakra vonatkozóan a peptidek injektálását követően az esetleges testhőmérsékletben bekövekező változásokat.

Ismert, hogy az egyik fő hőszabályozó (termoregulációs) központban, az anterior hypothalamus preoptikus area területén is expresszálnak az NPPF receptor szubtypusok, illetve az RFRP peptidek [72, 181, 184, 236]. Fontos megfigyelés, hogy i.c.v. injektálása a szelektív NPPF2 receptor agonista dansyl-PQRamid-nak (5 nmol-os dózisban) testhőmérséklet növekedést okoz, míg az RFRP-3 10 nmol-os dózisa hypothermiát indukál [146]. RF9 antagonistá előkezelés mind a két hatást kivédte. Fang és munkatársai kimutatták, hogy az NPPF centrális alkalmazása testhőmérséklet csökkenést okoz, ami az RF9 antagonistá előkezeléssel ugyancsak kivédhető volt [47]. Fontos megjegyezni, hogy az NPPF sokkal szelektívebb az NPPF2 receptorhoz, míg az RFRP-3 nagyobb affinitást mutat az NPPF1 receptorhoz. Valószínűleg a két NPPF receptor szubtypus ellentétes hatást közvetít a testhőmérséklet vonatkozásában.

Fontos továbbá megemlíteni, hogy irodalmi adatok szerint az RFRP-3 kis affinitással kötődik az NPPF2 receptorhoz, magasabb dózisú i.c.v alkalmazása kisebb mértékű hypothermiát vált ki, mint közepes dózissal, amit a peptid NPPF2 kötődésével magyaráznak. Ugyanakkor a két receptor kostimulációja hypothermiát indukál.

Kísérleteinkben sem az RFRP-1, sem az RFRP-3 a CeA-ba injektálva nem indukált testhőmérsékletváltozást. Így a táplálékfelvétel csökkenés nem hozható összefüggésbe a testhőmérsékleti változásokkal.

5.1.4. Vízfelvétel mérési kísérlet megvitatása

A vízfelvétel mérése során nem tapasztaltunk eltérést a RFRP kezelt csoportok és a kontroll csoportok vízfelvételében. Eredményeink értelmezésének fontos szempontja, hogy folyékony táplálékfelvételi paradigmát alkalmaztunk. A tejbevitel során az ivás és az evés, mint magatartási minták hasonló motoros viselkedést igényelnek. Ezért fontos volt megvizsgálnunk az RFRP peptidek intraamygdaloid alkalmazását követő hatását a vízfelvételre ugyanabban a paradigmában, mint, amit a folyékony táplálékfelvételnél alkalmaztunk. Érdekes megemlítenünk, hogy Newmyer és munkatársai csirkéken végzett vizsgálataik során a táplálékfelvétel csökkenése mellett a

vízfelvétel csökkenését tapasztalták RFRP-1 i.c.v. injekcióját követően [152]. Ugyanakkor, az RFRP-3 centrális injektálása csirkékben jóllakottságot indukál és a vízfelvételt nem befolyásolja [30]. Ismereteink szerint az RFRP-1 és az RFRP-3 hatását a vízfelvételre eddig még nem vizsgálták patkányban.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy sem az RFRP-1, sem az RFRP-3 CeA-ba történő alkalmazását követően nem befolyásolja a vízfelvételt. A peptidek táplálékfelvétel csökkentő hatása nem hozható összefüggésbe a táplálékfelvétel folyékony jellegével.

5.2. Magatartási tesztek eredményeinek megbeszélése

5.2.1. Open field teszt

Az Open field teszt a motoros aktivitás vizsgálatára alkalmas paradigma. A CeA-ba mikroinjektált RFRP-1 és RFRP-3 hatása az állatok motoros aktivitására több szempontból is fontos volt számunkra. Mind az RFRP-1, mind az RFRP-3 a CeA-ba injektálva táplálékfelvétel csökkentő hatású, ezért fontos volt megvizsgálnunk, hogy a táplálékfelvételt csökkentő hatás nem tulajdonítható-e téves következtetésből, pl. hogy az állat motoros aktivitása csökken és ez okból nem megy oda a táplálékhoz. Továbbá helypreferencia tesztben kimutattuk, hogy az RFRP-1 pozitív megerősítő hatású, azaz az állatok több időt töltenek egy adott térrészben. Ez esetleg magyarázható lenne szintén az állatok hypoaktivitásával. Kaewwongse és munkatársai arról számoltak be, hogy az agykamrába injektált RFRP-1 hatására csökkent az állatok által az open field apparátus centrális areájában töltött idő, de nem befolyásolta a lokomóciót, valamint az RFRP-3 hatására szintén csökkent az e kezelésben részesült állatok open-field centrális areában töltött idejük, illetve csökkent az állatok motoros aktivitása [95]. Az open field centrális areában töltött időt használják az állatok szorongásának kimutatására is. Ha a kezelésben részesült állatok kevesebb időt töltenek a doboz középső területén a kontroll csoporthoz viszonyítva, akkor szorongás-szerű hatást vált ki az anyag. Az RFRP-1 és RFRP-3 nagy dózisban volt alkalmazva az i.c.v. kísérletekben, (az RFRP-1 10 µg: 7,5 nmol; az RFRP-3 szintén 7,5 nmol-os dózisban), ami körülbelül 200X nagyobb dózist jelent, mint a mi kísérletünkben alkalmazott effektív dózisok. Vizsgálatainkban nem tapasztaltunk változást a lokomócióban sem az RFRP-1, sem az RFRP-3 kezeléseket követően.

Eredményeink tehát igazolják, hogy a CeA-ba injektált RFRP-1-nek és RFRP-3-nak az általunk alkalmazott dózisokban nincs hatása a patkányok lokomotoros aktivitására, valamint a centrális areában töltött időre. Így az RFRP-1 és RFRP-3 anorexigén hatása nem magyarázható az állatok hypoaktivitásával vagy anxietas kialakulásával. Továbbá az RFRP-1 pozitív megerősítő hatása helypreferencia tesztben ugyancsak nem magyarázható az állatok aktivitásában bekövetkezett változásával.

5.2.2. Emelt keresztpalló teszt

Mivel mind az RFRP-1, mind az RFRP-3 i.c.v. injektálása szorongáskeltő hatásúnak bizonyult open-field tesztben [95], ezért kísérleteinkben vizsgáltuk a CeA-ba injektált RFRP peptidek esetleges anxiogén vagy anxiolitikus hatását. Ezekre a vizsgálatokra azért volt szükség, mert lehetséges, hogy az RFRP-1 és/vagy RFRP-3 szorongást vált ki az állatokban és ezért az állat „lefagy” (úgynevezett freezing), így kevesebbet mozog, kevesebbszer keresi fel az etetőt. Így a peptid kezelésben részesült állatok kevesebbet fogyasztanak a tejből, és tévesen feltételezzük a peptidek anorexigén hatását. Kísérleteinkben a peptidek anxiogén vagy anxiolitikus hatásának kimutatására az Emelt keresztpalló tesztet használtuk, amelyet a leggyakrabban alkalmaznak ezen hatások kimutatására [89]. Egy drog anxiolitikus hatását ebben a paradigmában az jelzi, ha az állatok az anyag hatására több időt töltenek el a Nyitott karon, karvégén, illetve többször kimerészkednek a nyitott karra, annak legvégére is, mint a Kontrollok. Anxiogén hatás esetén ennek ellenkezője figyelhető meg, azaz, hogy az állatok szinte ki sem mozdulnak a Zárt karból.

Az 50 ng RFRP-1 hatására szignifikáns mértékben nőtt a Nyitott karon, valamint a Nyitott kar végén töltött idő a Kontroll csoporthoz képest. Szignifikánsan nőtt továbbá az állatok által a Nyitott karon, valamint a Nyitott kar végén megtett út is. A Nyitott karon töltött idő mellett ez a paraméter szintén jó markere egy anyag anxiolitikus hatásának kimutatására. Ugyanakkor az állatok motoros aktivitása, amelyet az állatok által 5 perc alatt megtett úttal, valamint a belépések számával jellemeztünk, nem változott az 50 ng RFRP-1 kezelések hatására. Egy anyag motoros aktivitásra gyakorolt hatásának jellemzésére használják még a Zárt karra történő belépések számát is. Az eredmények leírásakor ezt a paramétert ugyan nem emeltük ki, de a táblázatokban látható (VII. Táblázat), hogy a kezelések nem befolyásolták a Zárt karra történő belépések számát.

Ezek alapján elmondható, hogy a kisebb dózisú RFRP-1 szorongásoldó hatásúnak bizonyult. A 100 ng RFRP-1 kezelések hatására nem változott sem a Nyitott karon, sem a Nyitott kar végén töltött idő, és az ott megtett út sem, valamint ez a kezelés az állatok általános aktivitását sem befolyásolta. Tehát a 100 ng RFRP-1-nek nem volt sem anxiolitikus, sem anxiogén hatása.

A továbbiakban vizsgáltuk az NPPF receptorok szerepét az anxiolitikus hatás közvetítésében. A kísérletek során egy peptid típusú, specifikus NPPF receptor antagonistá, RF9 alkalmazásával sikerült kivédeni az RFRP-1 anxiolitikus hatását. Elmondhatjuk tehát, hogy a RFRP-1 szorongásoldó hatásának közvetítésében a CeA-ban NPPF receptorok vesznek részt. Valószínűsíthető, hogy a két NPPF receptor szubtípus közül az NPPF1 közvetíti az anxiolitikus hatást, mivel ezt a receptortípust azonosították a centrális amygdalában.

Számos kutatócsoport vizsgálta az AMY szerepét a félelemmel és szorongással kapcsolatos magatartás szabályozásában. Az AMY-t főként a kondicionált félelemmel és az anticipátoros szorongással kapcsolatos folyamatok szabályozásában tartják fontos struktúrának [73]. Az AMY bizonyos magjainak léziója, pontosabban a CeA és a mediális amygdala léziója anxiolitikus hatásúnak bizonyult [76]. Továbbá a CeA lézióját követően az explorációs aktivitás fokozódásáról számoltak be open-field tesztben, amit szintén szorongásoldó hatásként tartanak számon [228]. Számos további kísérleti eredmény támasztja még alá az AMY szerepét a szorongással kapcsolatos viselkedési folyamatok szabályozásában [10, 18, 32].

Az RFRP-1 indukálta anxiolitikus hatás létrejöttének egyik lehetséges mechanizmusa lehet a CRF-en keresztül történő kortikoszteroidok szintjének befolyásolása az amygdalában. A CRF i.c.v. hatásai már jól ismertek, CRF i.c.v. infúziója endokrinológiai, fiziológiai és magatartásbeli változásokat idéz el [17]. CRF hatására nőtt a plazma noradrenalin és adrenalin koncentrációja, ami az artériás vérnyomás és szívfrekvencia növekedéshez vezetett kutyákban és patkányokban [16, 17]. Ugyanakkor a CRF szisztémás adása hypotenziót és bradycardiát okoz [53, 100]. File és munkatársai kimutatták, hogy az agykamrába injektált CRF szorongáskeltő hatású, emelt keresztpalló tesztben a CRF kezelés csökkentette az állatok nyitott karon töltött idejét [51]. CRF agonisták intraamygdaloid injekciója szorongáskeltő, míg CRF antagonisták adása szorongásoldó hatásúnak bizonyultak [126, 202]. Továbbá immobilizációs stressz hatására a CeA-ban emelkedett CRF szintet mutattak ki [142]. Ugyanakkor, léziós kísérletekben bizonyították, hogy a CeA léziója esetén nem jön létre

immobilizációs stressz hatására plazma kortizolszint emelkedés [7]. A stressz és az RFRP peptidek kapcsolatát Kirby és munkatársai vizsgálták. Stressz hatására emelkedett RFRP mRNS-szintet detektáltak a DMH-ban patkányban [104]. 3 órás akut stressz hatására (az állatot 3 órára egy átlátszó mindkét végén zárt műanyagcsőbe helyezték) RFRP mRNS- növekedést tapasztaltak, míg 24 órával később már nem volt különbség a Kontrollokhoz képest. Krónikus stressz hatására (14 egymást követő napon, napi 3 óráig az állatokat a műanyagcsőbe helyezték) 24 órával az immobilizáció után szintén emelkedett RFRP mRNS szintet detektáltak a DMH-ban. Ugyanakkor az akut stressz okozott egy hirtelen, hosszantartó emelkedést a plazma kortikoszteronszintjében, míg a krónikus stressz szintén a plazma kortikoszteronszint növekedését eredményezte. Megvizsgálták, továbbá az RFRP sejtek és a kortikotropin-releasing receptor 1 (CRH-R1), valamint a glukokortikoid receptor interakcióját. Azt találták, hogy az RFRP sejtek koexpresszálják mindkét receptort. Az RFRP immunreaktív sejtek 12,8 %-án kimutatták CRH-R1 receptort, míg 53,1%-a expresszál glukokortikoid receptort. Érdeemes megemlíteni, hogy az adrenalektómia eliminálta a stressz választ, vagyis a kortikoszteron felszabadulást, valamint az akut stressz hatására bekövetkező RFRP mRNS növekedést szintén felfüggesztette a DMH-ban. Ezért feltételezhető, hogy a stressz indukálta RFRP mRNS növekedés függ a glukokortikoidok cirkuláló szintjétől.

Kaewongse és munkatársai az agykamrába adott RFRP-1 és RFRP-3 hatását vizsgálták a plazma ACTH és oxytocin szintjére [95]. Öt perccel a beadást követően megnövekedett ACTH és oxytocin plazmaszintet mértek. Mind az RFRP-1, mind az RFRP-3 i.c.v. injektálása fokozott c-fos protein aktivációt indukál a hypothalamicus SON-ban és a PVN-ban található oxytocin neuronokban. Továbbá a peptidek adását követően szignifikáns dóziszfüggő oxytocin felszabadulást izoláltak a SON-ból [95]. Az oxytocin akut és/vagy krónikus i.c.v. injektálása szintén szorongásoldó hatású patkányban és egérben [177]. Fontos megemlíteni, hogy a CeA-ba és a PVN-ba injektált oxytocin szintén anxiolitikus hatásúnak bizonyult [5, 11], valamint a CeA-ba injektált oxytocin receptor antagonistá előkezelés blokkolta az oxytocin anxiolitikus hatását [151].

Az anxiolitikus hatás kialakulásának egy másik lehetséges mechanizmusa az RFRP-1 és a szerotonin interakciója révén valósulhat meg. Ismert, hogy az AMY sűrű szerotonerg beidegzést kap a dorzális raphe magból, továbbá számos 5-HT-receptor szubtypust kimutattak a AMY különböző magcsoportjaiban, köztük a CeA-ban is [144,

229]. Megfigyelték, hogy félelmi kondicionálás során nő az AMY 5-HT szintje [91]. A mediális amygdalába adott 5-HT₂ receptor agonisták anxiolitikus hatásának bizonyultak szociális interakció és Emelt keresztpalló tesztben [43]. Fontos tudni, hogy a DMH-ban az RFRP neuronokon azonosították az 5-HT_{1A} receptortípust [197].

Felmerülhet továbbá az opiát-rendszerrel való kölcsönhatás is. Csirkékben i.c.v. adva az RFRP-3 és egy delta opioid receptor antagonistá együttes injektálása nagyobb táplálékfelvétel redukciónak okozott, mint amikor mindkettő önmagában volt injektálva [30]. Magatartási vonatkozásban az RFRP-1 és RFRP-3 opiátokkal való kapcsolata még tisztázatlan. A CeA-ban közepes sűrűségben mutattak ki opioid receptorokat [133], továbbá opiát agonisták CeA-ba injektálása anxiolitikus hatásúnak bizonyult. Végül, de nem utolsón, felmerülhet RFRP-1 szorongásoldó hatásának kialakulása a benzodiazepinokkal való interakciók révén (BZD). A BZD-k anxiolitikus hatásának kialakulása valószínűleg GABA-erg gátlás révén valósul meg [190]. BZD-receptorokat a CeA-ban közepes denzitásban mutattak ki [238]. Továbbá leírták a CeA esetében is a GABA-erg rendszer és az anxiétás kapcsolatát [18]. Igazolták a BZD agonisták CeA-ba történő mikroinjektálását követő anxiolitikus hatását [145, 166].

Kísérleteink eredményei alapján tehát az RFRP-1 a CeA-ba injektálva szorongásoldó hatásúnak bizonyult. Az anxiolitikus hatás közvetítésében valószínűleg NPFF1 receptorok játszanak szerepet. Ugyanakkor az RFRP-3 a CeA-ba injektálva nem szorongásoldó, valamint nem szorongáskeltő hatású, ugyanakkor nagy dózisu i.c.v. alkalmazása során anxiogén hatásúnak bizonyult. Feltehetően e hatás kialakulásában a korábban említett stresszhormonok felszabadulása (ACTH, CRH) játszhat szerepet. Az RFRP-1 CeA-ba létrejött szorongásoldó hatásának kialakulásában szerepet játszhat a CRH, oxytocin, szerotonin, benzodiazepinokkal való kölcsönhatás. Nem ismert a CeA-ban az RFRP-1 indukálta anxiolitikus hatás kialakulásának pontos mechanizmusa, ezért további kísérletek szükségesek az RFRP-1 és a neuropeptid-neurotranszmitter rendszerek interakcióinak feltérképezésére.

5.2.3. Helypreferencia teszt

A kondicionált helypreferencia paradigmát széleskörűen használják különféle anyagok jutalmazó, megerősítő hatásának tesztelésére [106]. A CPP vizsgálatára Huston és munkacsoportja által kifejlesztett metódust követtük [83], cirkuláris open field apparatátust használtunk és megfelelő megvilágítást alkalmaztunk. A módszer előnye, hogy a környezet homogenitása következtében nem alakul ki előzetes preferencia, az állatok az apparátus egyik negyedében sem töltenek szignifikánsan több időt a kezelések előtt (habituáció során). A kondicionálások előtt az állatok bilaterális mikroinjekcióban részesülnek, majd a beadást követően az állatok a kezelő kvadránsba kerülnek. Ha egy anyag kellemes érzetet vált ki, akkor ezt az állatok a kezelő kvadránssal társítják és így később a teszt alkalmával, amikor szabadon mozoghatnak mind a négy kvadráns területén, azt a negyedet preferálják, ahol korábban az anyagot kapták, így alakul ki a helypreferencia. Fontos kiemelni, hogy a teszt során az állatok már nem részesülnek anyagbeadásban, így nem az adott anyag hatása, hanem a kondicionálások alkalmával kialakult megerősítés gyakorol hatást a patkányok viselkedésére.

Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy a CeA-ba mikroinjektált RFRP-1 pozitív megerősítő hatású. Az RFRP-1 magatartási hatásai még kevésbé ismertek az irodalomban, helypreferencia tesztben eddig még nem vizsgálták, illetve megerősítő hatásai nem ismertek. Az RFamid-típusú peptidekhez legközelebb álló peptid, az NPFF hatását ugyanakkor vizsgálták helypreferencia tesztben. A Nacc-be és a VTA-ba önmagában injektálva nem indukált sem helypreferenciát, sem helyaverziót [230]. Együttes adása morfinnal mindkét struktúrában gátolta a morfin indukálta helypreferenciát. A VTA-ba történő együttes adásukat követően mérték a dopamin szint változását a Nacc-ben, PFC-ben és az OT-ben [230]. A VTA-ba adott morfint követően ezen agyterületeken dopaminszint emelkedést mutattak ki, míg NPFF és morfin együttes adásakor a dopaminszint növekedése blokkolódott. Az NPFF azon két receptoron közvetíti hatását, melyeken az általunk vizsgált peptidek, azaz az NPFF1 és NPFF2 receptoron. Az NPFF elsősorban az NPFF2 receptorhoz köt, de kis szelektivitású és képes mindkét receptort aktiválni, míg az RFRP-1 és RFRP-3 az NPFF-1 receptorhoz mutat nagyobb affinitást [12, 72, 129]. Immunhisztokémiai módszerekkel kimutatták, hogy mind az NPFF1, mind az NPFF2 megtalálható a VTA-ban és a Nacc-ben, a PFC-ben, az OT-ben, valamint a HPC-ban [3, 42, 230]. Kimutatták a tirozin-hidroxiláz,

NPFF1 és/vagy NPFF2 receptorok együttes előfordulását a VTA-neuronokon. Továbbá GAD-67 (GABA neurális marker)-pozitív neuronokon szintén detektálták az NPFF1 és/vagy NPFF2 jelenlétét [230]. Ezek az eredmények felvetik a lehetőségét, hogy az NPFF-nek közvetlen hatása van a dopaminerg neuronokra a receptorokon keresztül, illetve közvetett hatása van a dopaminerg neuronokon keresztül a GABAerg neuronokra. A VTA-ban a GABAerg neuronok diszinhibíciója jól ismert, mint egy fontos mechanizmusa az opioidok okozta mesocorticolimbicus dopaminerg neurális aktivitás növekedésének, ezáltal a jutalmazó hatás kialakulásának. Azonban mind az NPFF peptid, mind egy szelektív NPFF2 receptor agonista (1DME) blokkolta a morfin okozta helypreferenciát, valószínűleg egy közvetlen dopaminerg neurokon kifejtett mechanizmuson keresztül. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy számos neuropeptidről ismert, hogy egy adott struktúrába vagy perifériára adva pozitív megerősítő hatású, míg más struktúrában averzív hatást mutat, amely magyarázható a dózisfüggéssel, a receptor denzitással, valamint a struktúrák eltérő afferens és efferens kapcsolatrendszerével. Egyébiránt, megjegyzendő, hogy az NPFF család másik peptidje az NPAF injekciója növelte a dopamin felszabadulást patkány striatum és amygdala agyszelet preparátumban [92].

Az RFRP-1 peptidet kimutatták a CeA-ban, továbbá az NPFF-1 receptor jelenlétét szintén igazolták. Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy az RFRP-1 jutalmazó hatása a CeA-ban specifikus, mivel NPFF receptor antagonistá adásával RF9-el sikerült kivédeni a peptid pozitív megerősítő hatását. Kísérleteinkben használt antagonistá az RF9, egy NPFF receptor antagonistá, mely nem szelektív az NPFF receptor szubtípusokra, ugyanakkor a CeA-ban az NPFF2 receptort eddig még nem azonosították, ezért valószínűsíthető, hogy az RFRP-1 jutalmazó hatását NPFF-1 receptorok közvetítik a CeA-ban. Az antagonizáló hatás magyarázatára felmerül az a lehetőség, hogy ez az antagonistá averzív, illetve szorongáskeltő hatású, ezáltal csökkenti az állat által az adott térrészben töltött időt. A bevezetésben említettük, hogy az RF9 nagy dózisban agykamrába adva nem bizonyult sem anxiogén, sem anxiolitikus hatásúnak, illetve önmagában adott RF9 nem befolyásolta az amfetamin okozta megerősítő hatást [108]. Az általunk vizsgált kísérletben, az RFRP-1-el közel ekvimoláris dózisban alkalmazott RF9 önmagában adva nem volt hatással az állatok viselkedésére, nem okozott sem helypreferenciát, sem helyaverziót. Ez szemben áll azzal a feltételezéssel, hogy az antagonistá azáltal gátolja az RFRP-1 pozitív megerősítő hatását, hogy önmagában averzív hatással rendelkezik.

Számos addiktív drogról bebizonyosodott, hogy fokozza az állatok spontán lokomotoros aktivitását. Általánosságban elmondható, hogy azon anyagok, amelyek helypreferenciát indukálnak, fokozhatják a lokomóciót, míg azon anyagok, melyek helyaverziót váltanak ki hypoaktivitást okoznak. Vannak azonban ezzel ellentmondó eredmények is. Tanulmányozták a kinolinsav-indukálta amygdala léziók hatását a kokainnal kiváltott kondicionált lokomócióra és helypreferenciára. Azt tapasztalták, hogy az AMY léziók nem voltak hatással sem az alap, sem a kokain indukálta lokomócióra, ezzel szemben a kokain kiváltotta helypreferenciát teljesen blokkolták [82]. E kísérleti eredmények bizonyítják, hogy a kokain pszichomotoros stimuláló, valamint jutalmazó, megerősítő hatásait az AMY-lézió különbözőképpen befolyásolja. Schildein és munkatársai vizsgálták a Nacc shell régiójába adott amfetamin, morfin és substance P hatását a helypreferenciára, lokomócióra és számos sztereotíp viselkedési formára [191]. A morfin és a substance P nem indukált helypreferenciát, hatásukra nem volt változás a sztereotíp viselkedésformákban sem (ágaskodás, mosakodás), ugyanakkor morfin hatására nőtt a lokomóció a Kontroll csoporthoz viszonyítva. Az amfetamin kisebb dózisa nem okozott helypreferenciát, ugyanakkor nőtt az ágaskodások száma és a lokomóció, nagyobb dózisa helypreferenciát indukált egyéb magatartásformák befolyásolása nélkül (ágaskodás, mosakodás, lokomóció). Az amfetamin indukálta helypreferencia hatására nem nőtt a kezelő kvadránsba történő belépések száma, valamint az összes kvadránsba történő belépések száma sem. Tehát, ezek alapján elmondható, hogy a helypreferencia kialakulása nem feltétlenül hozható összefüggésbe a lokomóció és a sztereotíp viselkedési formák megváltozásával.

A mi adataink is azt a hipotézist támasztják alá, hogy a lokomotoros aktivitás nem szükségszerűen korrelál a helypreferencia kialakulásával. Kísérleteink során az RFRP-1 kezelésben részesült állatcsoport esetében sem tapasztaltuk a motoros aktivitás megváltozását, így ebben az esetben is elmondható, hogy az RFRP-1 jutalmazó hatása nem hozható összefüggésbe a motoros aktivitás megváltozásával.

Felmerül a kérdés, hogy az RFRP-1 pozitív megerősítő, jutalmazó hatása hogyan alakulhat ki. Ismert, hogy a mezolimbikus DA-rendszer (MLDR) kulcsszerepet játszik a pozitív megerősítő folyamatokban, az inger-jutalom közvetítette asszociációs tanulásban, továbbá a pszichostimuláns drogok és egyéb jutalmazó anyagok pozitív megerősítő hatásában [106]. Az MLDR innerválja az AMY-t is, továbbá a megerősítő hatás kialakulásában fontos szerepet tulajdonítanak a Nacc-ben és az AMY-ban történő DA-felszabadulásnak. Mindkét agyi struktúrában kiépíthető volt pszichostimulánsok

hatására kémiai öningerlés [26]. Kísérleti eredmények igazolják, hogy a mezoamygdaloid DA pálya jelentősen befolyásolja az AMY funkcióit [82]. Az AMY-t innerváló dopaminerg rostok a VTA laterális és az SN mediális részéből származnak [8]. A dopaminerg neuronok axonterminálisai a bazális és interkaláris AMY magok, valamint a CeA területére koncentrálnak, a többi mag diffúzabb dopaminerg beidegzést kap [8, 101]. Az amygdaloid komplexen belül a CeA-ban mutatták ki a legmagasabb tirozin-hidroxiláz aktivitást és a legnagyobb DA koncentrációt [101]. A CeA küld rostokat a VTA-ba és az SN-ba, befolyásolja ezen struktúrákban a DA neuronok aktivitását [227]. Továbbá a CeA-ból érkeznek GABAerg inputok a VTA-ba és az SN dorzális részébe, valamint a retrorubralis areába [62, 227]. A reciprok kapcsolatok alapján feltételezhető, hogy a CeA befolyásolni tudja a MLDR és nigrostriatális pályarendszerek működését. Az AMY-ban kimutatták mind a D1, mind a D2 receptor jelenlétét, az amygdala magok közül a D1 receptor legnagyobb koncentrációban a CeA-ban fordul elő [140]. A Nacc-ben, BNST-ban, valamint a CeA-ban található D1 receptorok antagonizálása gátolja a kokain-önadagolást [21]. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a monoaminerg neurotranszmisszió szerepet játszik a pszichostimuláns drogok jutalmazó hatásának közvetítésében a CeA-ban. Helypreferencia tesztekben igazolták, hogy a kolinerg neurotranszmisszió szintén szerepet játszhat a megerősítési folyamatokban [237]. Az RFRP-1 és receptorainak acetilkolinnal történő interakciói az irodalomból kevésbé ismertek.

A központi idegrendszeren belül RFRP-1 immunreaktív elemek több olyan agyi struktúrában is előfordulnak, melyeknek szerepük van a jutalmazó hatások közvetítésében, többek közt a striatumban, HT-ban, AMY-ban, VTA-ban, valamint a Nacc-ben [65, 181, 236]. Az RFRP-1 két receptortípusa szintén megtalálható ezeken a területeken [12, 45, 129, 230]. Ugyanakkor kevésbé ismerjük az RFRP-1 interakcióit neurotranszmitterekkel és más neuropeptidekkel, ezért csak valószínűsíthetjük, hogy, *az RFRP-1 CeA-ban kialakult pozitív megerősítő hatásának közvetítésében, az MLDR-rel való kölcsönhatás játszik szerepet. További kísérleteket tervezünk az RFRP-1 hatásainak pontosabb és részletesebb megismerésére, valamint a DA-nal való esetleges interakcióinak feltérképezésére.*

6. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE

Eredményeink igazolják, hogy:

- 1) **Az RFRP-1 50 ng-os dózisa a CeA-ba injektálva akut táplálékfelvétel csökkenést okozott ad libitum táplált patkányokban, mely ANT előkezeléssel felfüggeszthető volt. Az RFRP-3 50 ng és 100 ng dózisa szintén anorexigén hatásúnak bizonyult, amely ANT előkezeléssel eliminálható volt.**
- 2) **24 órás éheztetést követően az RFRP-1 mikroinjekciója nem okozott változást a táplálékfelvételen, ami arra utal, hogy az AMY-ba injektált RFRP-1 hatására megvalósuló táplálékfelvétel redukció függ az éhség-jóllakottság állapotától. Ellenben az 50 ng dózisú RFRP-3 mikroinjekciója a 24 órás éheztetést követően is szignifikáns táplálékfelvétel redukciót okozott. Ez esetben tehát az RFRP-3 képes volt az egynapos táplálékdepriváció által kiváltott éhség (motivációs) hajtóerő ellenére is anorexigén hatást kifejteni.**
- 3) **A RFRP-1 és RFRP-3 indukálta szignifikáns táplálékfelvétel csökkenés nem tulajdonítható egyéb nem specifikus hatásnak. Vizsgálataink szerint az RFRP-1 és RFRP-3 anorexigén hatását a beadást követő 5-25 percen feje ki, ekkor vizsgáltuk a peptidok vízfelvételeire, illetve testhőmérsékletre gyakorolt hatását. A peptid kezelésekre hatására ezekben a paraméterekben nem következett be változás, vagyis a peptidok okozta táplálékfelvétel redukció nem hozható összefüggésbe ezen nem specifikus hatásokkal.**
- 4) **Sem az RFRP-1, sem az RFRP-3 mikroinjektálását követően nem változott az állatok által a különböző magatartásformákkal (mosakodás, vakarózkodás, exploráció, pihenés) töltött idő a kontroll csoportokhoz képest. Megállapíthatjuk, hogy az RFamid-típusú peptidok indukálta táplálékfelvétel csökkenés nem tulajdonítható a magatartási formákban történő változásoknak.**

- 5) **Open field tesztben igazoltuk, hogy sem az RFRP-1, sem az az RFRP-3 nem befolyásolja az állatok spontán motoros aktivitását.** A peptidek nem indukálnak hypoaktivitást, illetve hyperaktivitást sem. Így az anorexigén hatás kialakulásában ezen tényezők nem játszanak szerepet.

- 6) **Emelt keresztpalló tesztben igazoltuk, hogy a CeA-ba injektált 50 ng dózisé RFRP-1 szorongásoldó hatású. Ezen anxiolitikus hatás specifikus, mivel NPPF receptor antagonistával kivédhető volt. Ugyanakkor az 50 ng RFRP-3 és a 100 ng dózisé RFRP-3 nem befolyásolja a szorongást, azaz nincs anxiolitikus vagy anxiogén hatása.**

- 7) **Helypreferencia teszt során a kisebb dózisé RFRP-1 pozitív megerősítő hatásúnak bizonyult.** A jutalmazó hatás közvetítésében feltehetően a CeA-ban megtalálható NPPF1 receptorok játszanak szerepet. **Az RFRP-1 pozitív megerősítő hatása specifikus, mivel NPPF receptor antagonistával eliminálható volt.** A helypreferencia kialakulása nem hozható összefüggésbe anxiogén hatás kialakulásával, a helypreferencia teszt során kiértékelésre került lokomotoros aktivitást jelző paraméterek (megtett távolság, belépések száma) nem változtak a kezelések hatására.

- 8) **Az RFRP-3 egyik dózisa sem indukál helypreferenciát. Megállapíthatjuk, hogy az RFRP-3 a vizsgált magatartási paradigmák egyikében sem befolyásolta az állatok viselkedését. Ugyanakkor anorexigén hatása erősebbnek mondható, mint az RFRP-1 táplálékfelvételcsökkentő hatása, ugyanis az RFRP-3 kezelés esetén a táplálékdeprivált állatoknál is kimutatható volt az anorexigén hatás.**

Összefoglalásként, eredményeink ismeretében elmondhatjuk, hogy a CeA-ba injektált RFRP peptidek bizonyosan szerepet játszanak a magatartási folyamatok szabályozásában. Kimutattuk, hogy míg az RFRP-3 a táplálékfelvételi folyamatok szabályozásában jut jelentős szerephez, addig az RFRP-1 más magatartási folyamatok koordinálásában is szereppel bír. Noha mindkét peptid ugyanarról a génről szintetizálódik, az eltérő hatásokért a különböző aminosavszekvenciájuk (ami már a C-terminálisukban is megnyilvánul) lehet a felelős. Az RFRP peptidek hatásmechanizmusának pontosabb megismeréséhez további kísérleteket tervezünk, egyrészt más antagonisták alkalmazását tervezzük a receptorális mechanizmusok és interakciók felderítése érdekében, másrészt vizsgálni szeretnénk az RFRP peptidek kölcsönhatásait a dopaminerg rendszerrel. Bár ezek még az első alapkutatási eredmények a CeA-ban a peptideket illetően, reméljük, hogy új utakat, lehetőségeket nyitnak meg az idegrendszeri betegségek kutatásához, végül terápiájához.

7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A-Ghr: acylált ghrelin	AMY: amygdaloid complex
AS: aminosav	BLA: nucleus basolateralis amygdalae
BNST: a stria terminalis beágyazott magja	BZD: benzodiazepinek
CCK: kolekisztokinin	CeA: nucleus centralis amygdalae
CRF: corticotropin-releasing factor	CRH: corticotropin-releasing hormon
CPP: kondicionált helypreferencia	DA: dopamin
DMH: dorsomedialis hypothalamus	F: fenilalanin
GABA: γ -amino-vajsav	GnIH: gonadotropin-inhibitory hormon
GnRH: gonadotropin-releasing hormon	HPC: hippocampus
HT: hypothalamus	i.c.v.: intracerebroventrikuláris
LatA: nucleus lateralis amygdalae	LC: locus coeruleus
LH: lateralis hypothalamus	MLDR: mesolimbicus dopamin rendszer
MedA: nucleus medialis amygdalae	Nacc: nucleus accumbens
NPAF: neuropeptid AF	NPFF: neuropeptid FF
NPFF1: NPFF receptor 1	NPFF2: NPFF receptor 2
NPVF: neuropeptid VF	NTS: nucleus tractus solitarii
OBF: orbitofrontális	OT: tractus olfactorius
RF9: NPFF receptor antagonista	PA: nucleus posterior amygdalae
PAG: periaqueductalis szürkeállomány	PFC: prefrontalis kéreg
PVN: nucleus paraventricularis	R: arginin
RF9: NPFF receptor antagonista	RFRP: RFamid-típusú peptid
SN: substantia nigra	SON: nucleus supraopticus
VTA: ventralis tegmentalis area	VMH: ventromedialis hypothalamus

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet **Prof. Dr. Lénárd László** akadémikusnak, témavezetőmnek, a témaválasztás, valamint a kísérletes munka során nyújtott hasznos tanácsaiért és észrevételeiért, a szakmai és emberi támogatásáért, valamint a disszertáció elkészítése során nyújtott segítségéért. Köszönöm segítségét és támogatását **Prof. Dr. Karádi Zoltán** egyetemi tanárnak, a PTE ÁOK Élettani Intézet vezetőjének.

Kiemelt köszönettel tartozom közvetlen munkatársamnak, **Dr. László Kristóf** adjunktusnak a kísérletes munkában nyújtott segítségéért és szakmai tanácsaiért. Köszönöm **Dr. Gálosi Rita** adjunktusnak a támogatását, szakmai tanácsait. Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Ollmann Tamás** és **Dr. Péczely László** munkatársaimnak a magatartási kísérletek kivitelezésében és azok szakmai kiértékelésben nyújtott segítségéért. A kísérletes munkában nyújtott segítségéért köszönettel tartozom **Dr. Zagoracz Olga** munkatársamnak.

Külön köszönet illeti **Konyovitsné Schulteisz Annát**, laboratóriumi asszisztensnőt, a kísérletek kivitelezése során nyújtott kiváló technikai segítségéért. A szövegtani munkák magas szintű kivitelezéséért köszönetet szeretnék mondani **Kovácsné Korona Erzsébet** asszisztensnőnek.

Köszönöm továbbá az Intézet azon többi munkatársának, akik az évek során tanácsaikkal, észrevételeikkel segítettek munkámat, valamint köszönöm barátaimnak, családomnak a kitartó támogatást.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Aggleton JP, A description of the amygdalo-hippocampal interconnections in the macaque monkey. *Exp Brain Res* 1986. 64: p. 515-526.
- [2] Ahlskog JE, Hoebel BG, Overeating and obesity from damage to a noradrenergic system in the brain. *Science*, 1973. 182(108): p. 166-169.
- [3] Allard M, Geoffre S, Legendre P, Vincent JD, Simonnet G, Corresponding author contact information Characterization of rat spinal cord receptors to FLFQPQRFamide, a mammalian morphine modulating peptide: a binding study. *Brain Research*, 1989. 500(1-2): p. 169-176.
- [4] Allard M, Labrousse S, Nosjean A, Laguzzi R, Mechanisms Underlying the Cardiovascular Responses to Peripheral Administration of NPF in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther.*, *J Pharmacol Exp Ther*, 1995. 274(1): p. 577-83.
- [5] Bale LT, Davis MA, Auger PA, Dorsa MD, and McCarthy MM, CNS Region-Specific Oxytocin Receptor Expression: Importance in Regulation of Anxiety and Sex Behavior. *The Journal of Neuroscience*, 2001. 21(7): p. 2546-2552.
- [6] Baxter MG, Murray EA, The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosc*, 2002. 3(7): p. 563-573.
- [7] Beaulieu S, Di Paolo T, Côté J, Barden N, Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. *Neuroendocrinology*, 1987. 45: p. 37-46.
- [8] Ben-Ari Y, Zigmond RE, Moore KE, Regional distribution of tyrosine hydroxylase, norepinephrine and dopamine within the amygdaloid complex of the rat. *Brain Research*, 1975. 87(1): p. 96-101
- [9] Bernard JF, Alden M, Besson JM, The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *J Comp Neurol*, 1993. 329: p. 201-229.
- [10] Blanchard DC, Blanchard RJ, Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol*, 1972. 81: p. 281-290.
- [11] Blume A, Bosch OJ, Miklos S, Torner L, Wales L, Waldherr M, Neumann ID. Oxytocin reduces anxiety via ERK1/2 activation: local effect within the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci*, 2008. 27(8): p. 1947-1956.
- [12] Bonini JA, Jones KA, Adham N, Forray C, Artymyshyn R, Durkin MM, Smith KE, Tamm JA, Boteju LW, Lakhiani PP, Raddatz R, Yao WJ, Ogozalek KL, Boyle N, Kouranova EV, Quan Y, Vaysse PJ, Wetzel JM, Branchek TA, Gerald C, Borowsky B, Identification and Characterization of Two G Protein-coupled Receptors for Neuropeptide FF. *J Biol Chem*, 2000. 275(50): p. 39324-31.
- [13] Bordi F, LeDoux JE, Response properties of single units in areas of rat auditory thalamus that project to the amygdala. II. Cells receiving convergent auditory and somatosensory inputs and cells antidromically activated by amygdala stimulation. *Exp Brain Res*, 1986. 64: p. 515-526.
- [14] Bovetto S, Richard D, Lesion of central nucleus of amygdala promotes fat gain without preventing effect of exercise on energy balance. *Am J Physiol*, 1995. 269: p. R781-786.
- [15] Brown EE, Fibiger HC, Differential effects of excitotoxic lesions of the amygdala on cocaine-induced conditioned locomotion and conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl)*, 1993. 113(1): p. 123-30.
- [16] Brown M, Corticotropin releasing factor: Central nervous system sites of action. *Brain Research*, 1986. 399(1): p. 10-14.
- [17] Brown MR, Fisher LA, Rivier J, Spiess J, Rivier C, Vale W, Corticotropin-releasing factor: Effects on the sympathetic nervous system and oxygen consumption. *Life Sciences*, 1982. 30(2): p. 207-210.

- [18] Burghardt PR, Wilson MA, Microinjection of naltrexone into the central, but not the basolateral, amygdala blocks the anxiolytic effects of diazepam in the plus maze. *Neuropsychopharmacology*, 2006. 31: p. 1227-1240.
- [19] Cabrele C, Beck-Sickinger AG, Molecular characterization of the ligand-receptor interaction of the neuropeptide Y family. *J Pept Sci*, 2000. 6(3): p. 97-122.
- [20] Cahill L, Neurobiological mechanisms of emotionally influenced, long-term memory. in *Progress in Brain Research, Prog Brain Res.* 2000, Elsevier. 126: p. 29-37.
- [21] Caine B, Heinrichs SC, Coffin VL, Koob GF et al., Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. *Brain Research*, 1995. 692(1-2): p. 47-56.
- [22] Caine SB, Koob GF, Pretreatment with the dopamine agonist 7-OH-DPAT shifts the cocaine self-administration dose-effect function to the left under different schedules in the rat. *Behav Pharmacol*, 1995. 6(4): p. 333-347.
- [23] Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt B, Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2002. 26(3): p. 321-352.
- [24] Cassell MD, Gray TS, Kiss JZ, Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala - a cytological, hodological, and immunocytochemical study. *J. Comp. Neuro*, 1986. 246: p. 478-499.
- [25] Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, Do-Rego JC, Vandesande F, Llorens-Cortes C, Costentin J, Beauvillain JC, Vaudry H, Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. 100: p. 15247-15252.
- [26] Chevrette J, Stellar JR, Hesse GW, Markou A, Both the shell of the nucleus accumbens and the central nucleus of the amygdala support amphetamine self-administration in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2002. 71(3): p. 501-507.
- [27] Clarke IJ, Qi Y, Puspita Sari I, Smith JT, Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2009. 30(3): p. 371-378.
- [28] Clarke IJ, Parkington HC, Gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) as a regulator of gonadotropes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014 385, (1-2): p.36-44.
- [29] Cline MA, Bowden CN, Calchary WA, Layne JE, Short-Term Anorexigenic Effects of Central Neuropeptide VF are Associated with Hypothalamic Changes in Chicks. *Journal of Neuroendocrinology*, 2008. 20(8): p. 971-977.
- [30] Cline MA, Sliwa L, Neuropeptide VF-associated satiety involves mu and kappa but not delta subtypes of opioid receptors in chicks. *Neurosci Lett*, 2009. 455(3): p. 195-198.
- [31] Costall B, Kelly ME, Naylor RJ, Onaivi ES, Tyers MB, Neuroanatomical sites of action of 5-HT₃ receptor agonist and antagonists for alteration of aversive behaviour in the mouse. *Br J Pharmacol Biochem Behav*, 1989. 96: p. 325-332.
- [32] Davidson RJ, Abercrombie H, Nitschke JB, Putnam K, Regional brain function, emotion and disorders of emotion. *Current Opinion in Neurobiology*, 1999. 9(2): p. 228-234.
- [33] Davis M, Rainnie D, Cassell M, Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in Neurosciences*, 1994. 17(5): p. 208-214.
- [34] Davis M, Whalen PJ, The amygdala: vigilance and emotion. *Molecular Psychiatry*, 2001. 6: p. 13-34.
- [35] Dockray GJ, The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Exp Physiol*, 2004. 89(3): p. 229-35.
- [36] Dockray GJ, Reeve JR, Shively J, Gayton RJ, Barnard CS, A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamideG. *Nature*, 1983. 305: p. 328-330.
- [37] Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW, Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res*, 2001. 38: p. 192-246.

- [38] Drevets WC, Videen TO, Price JL, Preskorn SH, Carmichael ST, Raichle ME, A functional anatomical study of unipolar depression. *J Neurosci*, 1992. 12: p. 3268-3641.
- [39] Duméry V, Blozovski D, Development of amygdaloid cholinergic mediation of passive avoidance learning in the rat. I. Muscarinic mechanisms. *Exp Brain Res*, 1987. 67: p. 61-69.
- [40] Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 2006. 147(3): p. 1154-1158.
- [41] Dunn AJ, Berridge CW, Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Brain Res Rev*, 1990. 15: p. 71-100.
- [42] Dupouy V, Zajac JM, Neuropeptide FF receptors in rat brain: a quantitative light-microscopic autoradiographic study using [125I][D.Tyr1, (NMe)Phe3]NPFF. *Synapse*, 1996. 24(3): p. 282-296.
- [43] Duxon MS, Kennett GA, Lightowler S, Blackburn TP, Fone KC, Activation of 5-HT_{2B} Receptors in the Medial Amygdala causes Anxiolysis in the Social Interaction Test in the Rat. *Neuropharmacology*, 1997. 36(4-5): p. 601-608.
- [44] Ellis ME, Manipulation of the amygdala noradrenergic system impairs extinction of passive avoidance. *Brain Res*, 1984. 324: p. 129-133.
- [45] Elshourbagy NA, Ames RS, Fitzgerald LR, Foley JJ, Chambers JK, Szekeres PG, Evans NA, Schmidt DB, Buckley PT, Dytko GM, Murdock PR, Milligan G, Groarke DA, Tan KB, Shabon U, Nuthulaganti P, Wang DY, Wilson S, Bergsma DJ, Sarau HM, Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 2000. 275(34): p. 25965-71.
- [46] Epping-Jordan MP, Markou A, and Koob GF, The dopamine D-1 receptor antagonist SCH 23390 injected into the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis decreased cocaine reinforcement in the rat. *Brain Research*, 1998. 784(1-2): p. 105-115.
- [47] Fang Q, Guo J, He F, Peng YL, Chang M, Wang R, In vivo inhibition of neuropeptide FF agonism by BIBP3226, an NPY Y1 receptor antagonist. *Peptides*, 2006. 27(9): p. 2207-2213.
- [48] Fang Q, Liu Q, Li N, Jiang TN, Li YL, Yan X, Wang R, Cardiovascular effects of intravenous administered 26RFa, a novel RFamide peptide ligand for GPR103, in anaesthetised rats. *European Journal of Pharmacology*, 2009. 621(1-3): p. 61-66.
- [49] Fekete E, Víggh J, Bagi EE and Lenard L, Gastrin-releasing peptide microinjected into the amygdala inhibits feeding. *Brain Res*, 2002. 955: p. 55-63.
- [50] Fekete E, Bagi EE, Toth K and Lenard L, Neuromedin C microinjected into the amygdala inhibits feeding. *Brain Res Bull*, 2007. 71: p. 386-392.
- [51] File SE, Johnston AL, Baldwin HA, Anxiolytic and anxiogenic drugs: Changes in behaviour and endocrine responses. *Stress Medicine*, 2006. 4(4): p. 221-230.
- [52] Findeisen M, Rathmann D, Beck-Sickingler AG, RFamide Peptides: Structure, Function, Mechanisms and Pharmaceutical. *Pharmaceuticals*, 2011. 4(9): p. 1248-1280
- [53] Fisher LA, Jessen G, Brown MR, Corticotropin-releasing factor (CRF): mechanism to elevate mean arterial pressure and heart rate. *Regul Pept*, 1983. 5(2): p. 153-161.
- [54] Fonberg E, Delgado JMR, Avoidance and alimentary reactions during amygdala stimulation. *J Neurophysiol*, 1961. 24: p. 651-654.
- [55] Fonberg E, The amygdaloid body and its significance in the appetitive and emotional behavior in animals. *Acta Physiol Pol*, 1974. 25: p. 93-139.
- [56] Fonberg E, Amygdala functions within the alimentary system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1974. 34: p. 435-466.
- [57] Fonberg E, Aphagia, produced by destruction of the dorsomedial amygdala in dogs. *Bull Acad Pol Sci Biol*, 1966. 14: p. 719-722.
- [58] Fonberg E, Hyperphagia produced by lateral amygdalar lesions in dogs. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1971. 31: p. 19-32.
- [59] Fonberg E, The instrumental alimentary-avoidance differentiation in dogs. *Acta Biol Exp (Wars)*, 1968. 28: p. 363-373.

- [60] Fonberg E, The normalizing effect of lateral amygdalar lesions upon the dorsomedial amygdalar syndrome in dogs. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1973. 33: p. 449-466.
- [61] Fuchs RA, Weber SM, Rice HJ, Neisewander JL, Effects of excitotoxic lesions of the basolateral amygdala on cocaine-seeking behavior and cocaine conditioned place preference in rats. *Brain Research*, 2002. 929(1): p. 15-25.
- [62] Fudge JL, Haber SN, The central nucleus of the amygdala projection to dopamine subpopulations in primates. *Neuroscience*, 2000. 97(3): p. 479-494.
- [63] Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S, Recent advances in mammalian RFamide peptides: The discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides*, 2006. 27(5): p. 1073-1086.
- [64] Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, Shintani Y, Hinuma S, Fujino M, A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *The Journal of biological chemistry*, 2003. 278: p. 46387-46395.
- [65] Fukusumi S, Habata Y, Yoshida H, Iijima N, Kawamata Y, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Kitada C, Shintani Y, Suenaga M, Onda H, Nishimura O, Tanaka M, Iyata Y, Fujino M, Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2001. 1540(3): p. 221-232.
- [66] Fu LY, van den Pol AN, Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci*, 2010. 30: p. 10205-10219.
- [67] Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003. 312(4): p. 1357-1363.
- [68] Gherardi N and Zajac JM, Neuropeptide FF Receptors of Mouse Olfactory Bulb: Binding Properties and Stimulation of Adenylate Cyclase Activity. *Peptides*, 1997. 18(4): p. 577-583.
- [69] Goncharuk V, Jhamandas JH. Neuropeptide FF2 receptor distribution in the human brain: An immunohistochemical study. *Peptides*, 2008. 29(9): p. 1544-1553.
- [70] Gonzalez LE, Andrews N, File SE, 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Research*, 1996. 732(1-2): p. 145-153.
- [71] Goshadrou F. and Ronaghi A, Attenuating the effect of Ghrelin on memory storage via bilateral reversible inactivation of the basolateral amygdala. *Behavioural Brain Research*, 2012. 232(2): p. 391-394.
- [72] Gouardères C, Mazarguila H, Mollereau C, Chartrel N, Leprince J, Vaudry H, JZajac JM, Functional differences between NPFF1 and NPFF2 receptor coupling: High intrinsic activities of RFamide-related peptides on stimulation of [35S]GTPγS binding. *Neuropharmacology*, 2007. 52(2): p. 376-386.
- [73] Graeff FG, Silveira MCL, Nogueira RL, Audi EA, Oliveira RMW, Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behavioural Brain Research*, 1993. 58(1-2): p. 123-131.
- [74] Griebel G, 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: More than 30 years of research. *Pharmacology & Therapeutics*, 1995. 65(3): p. 319-395.
- [75] Grijalva CV, Levin ED, Morgan M, Roland B and Martin FC, Contrasting effects of centromedial and basolateral amygdaloid lesions on stress-related responses in the rat. *Physiol Behav Neurosci*, 1990. 48: p. 495-500.
- [76] Grijalva CV, Levin ED, Morgan M, Roland B, Martin FC, Contrasting effects of centromedial and basolateral amygdaloid lesions on stress-related responses in the rat. *Physiology & Behavior*, 1990. 48(4): p. 495-500.
- [77] Grossman SP, Grossman L, Walsh L, Functional organization of the rat amygdala with respect to avoidance behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 1975. 88: p. 829-850.

- [78] Hajnal A, Sándor P, Jando G, Vida I, Czurko A, Karadi Z and Lenard L, Feeding disturbances and EEG activity changes after amygdaloid kainate lesions in the rat. *Brain Res Bull*, 1992. 29: p. 909-916.
- [79] Hall J, Parkinson JA, Connor TM, Dickinson A, Everitt BJ, Involvement of the central nucleus of the amygdala and nucleus accumbens core in mediating Pavlovian influences on instrumental behaviour. *Eur J Neurosci*, 1992. 13: p. 1984-1992.
- [80] Hangodi O, Urbán B, Bagi ÉE, Fekete É, Lénárd L, Effect of orexin microinjection into the amygdala on liquid food and water ingestion. International IBRO Workshop, Budapest, Hungary, Jan 29-31, Poster Effect of orexin microinjection into the amygdala on liquid food and water ingestion. International IBRO Workshop, 2004. Budapest, Hungary, Jan 29-31, Poster.
- [81] Hanson ES, Dallman MF, Neuropeptide Y (NPY) may integrate responses of hypothalamic feeding systems and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol*, 1995. 7(4): p. 273-279.
- [82] Harmer CJ, Hitchcott PK, Morutto SL, Phillips GD, Repeated d-amphetamine enhances stimulated mesoamygdaloid dopamine transmission. *Psychopharmacology (Berl)*, 1997. 132(3): p. 247-254.
- [83] Hasenöhr R, Frisch C, Huston JP, Evidence for anatomical specificity for the reinforcing effects of SP in the nucleus basalis magnocellularis. *Neuroreport*, 1998. 9: p. 7-10.
- [84] Heimer L, Alheid GF, Piecing together the Puzzle of Basal Forebrain Anatomy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1991. 295: p. 1-42.
- [85] Heimer L, De Olmos JS, Alheid GF, Pearson J, Sakamoto N, Shinoda K, Marksteiner J, Switzer RC III, Chapter II The human basal forebrain. Part II, In: Bloom FE, ABr, Hökfelt T, editors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Elsevier, 1999. p. 57-226.
- [86] Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H, Fujino M, A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature*, 1998. 393: p. 272-276.
- [87] Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, Fujii R, Watanabe T, Kikuchi K, Terao Y, Yano T, Yamamoto T, Kawamata Y, Habata Y, Asada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Tanaka M, Iyata Y, Fujino M, New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol*, 2000. 2(10): p. 703-708.
- [88] Hoebel BG, Anthony AP, Hernandez L, Aulisi EF, Stanley BG, Lenard L, Self-injection of amphetamine directly into the brain. *Psychopharmacology*, 1983. 81(2): p. 158-163.
- [89] Hogg S, A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996. 54: p. 21-30.
- [90] Hopkins DA, Holstege G, Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. *Exp Brain Res*, 1978. 32: p. 529-547.
- [91] Inoue T, Koyama T, Yamashita I. Effect of conditioned fear stress on serotonin metabolism in the rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1993. 44(2): p. 371-374.
- [92] Jászberényi M, Bagosi Z, Thurzó B, Földesi I, Szabó G, Telegdy G, Endocrine, behavioral and autonomic effects of neuropeptide AF. *Hormones and Behavior*, 2009. 56(1): p. 24-34.
- [93] Jochman KA, Newman SM, Kalin NH, Bakshi VP, Corticotropin-releasing factor-1 receptors in the basolateral amygdala mediate stress-induced anorexia. *Behav Neurosci*, 2005. 119(6): p. 1448-1458.
- [94] Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS, Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Hormones and Behavior*, 2007. 51(1): p. 171-180.
- [95] Kaewwongse M, Takayanagi Y, Onaka T, Effects of RFamide-related peptide (RFRP)-1 and RFRP-3 on oxytocin release and anxiety-related behaviour in rats. *J Neuroendocrinol*, 2011. 23(1): p. 20-27.

- [96] Kavaliers M. and Innes D, Sex differences in the effects of neuropeptide FF and IgG from neuropeptide FF on morphine- and stress-induced analgesia. *Peptides*, 1992. 13(3): p. 603-607.
- [97] Kelly R. and Stefanacci L, Amygdala: Structure and Circuitry in Primates, in *Encyclopedia of Neuroscience*, L.R. Squire, Editor 2009, Academic Press: Oxford. p. 341-345.
- [98] Kertes E, László K, Berta B and Lénárd L, Effects of substance P microinjections into the globus pallidus and central nucleus of amygdala on passive avoidance learning in rats. *Behavioural Brain Research*, 2009. 198(2): p. 397-403.
- [99] Kertes E, László K, Berta B and Lénárd L, Positive reinforcing effects of substance P in the rat central nucleus of amygdala. *Behavioural Brain Research*, 2009. 205(1): p. 307-310.
- [100] Kiang JG, Wei ET, CRF-evoked bradycardia in urethane-anesthetized rats is blocked by naloxone. *Peptides*, 1985. 6(3): p. 409-413.
- [101] Kilts CD, and Anderson CM, Mesoamygdaloid dopamine neurons: differential rates of dopamine turnover in discrete amygdaloid nuclei of the rat brain. *Brain Research*, 1987. 416(2): p. 402-408.
- [102] Kim EM, Quinn JG, Levine AS, O'Hare E, A bi-directional μ -opioid-opioid connection between the nucleus of the accumbens shell and the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Research*, 2004. 1029(1): p. 135-139.
- [103] King PJ, Williams G, Doods H, Widdowson PS, Effect of a selective neuropeptide Y Y2 receptor antagonist, BIIIE0246 on neuropeptide Y release. *European Journal of Pharmacology*, 2000. 396(1): p. R1-R3.
- [104] Kirby ED, Geraghty AC, Ubuka T, Bentley GE, Kaufer D, Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(27): p. 11324-11329.
- [105] Klüver H and Bucy PC, Preliminary analysis of function of the temporal lobes on monkeys. *Arch Neurol Psychiatry*, 1939. 42: p. 979-1000.
- [106] Koob GF, Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1992. 13(0): p. 177-184.
- [107] Korczynsky R and Fonberg E, Instrumental reactions and food and water intake in medial amygdala rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1976. 36: p. 667-685.
- [108] Kotlinska JH, Gibula-Bruzda E, Koltunowska D, Raouf H, Suder P, Silberring J, Modulation of neuropeptide FF (NPFF) receptors influences the expression of amphetamine-induced conditioned place preference and amphetamine withdrawal anxiety-like behavior in rats. *Peptides*, 2012. 33(1): p. 156-163.
- [109] Krettek JE, Price JL, Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol*, 1978. 178: p. 225-254.
- [110] Krettek JE, Price JL, A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol*, 1978. 178: p. 255-280.
- [111] Krettek JE, Price JL, A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex. *Brain Res*, 1974. 67: p. 169-174.
- [112] Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R, Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *PNAS*, 2006. 103(7): p. 2410-2415.
- [113] Kriegsfeld LJ, Gibson EM, Williams WP 3rd, Zhao S, Mason AO, Bentley GE, Tsutsui K, The Roles of RFamide-Related Peptide-3 (RFRP-3) in Mammalian Reproductive Function and Behavior. *J Neuroendocrinol*, 2010 22(7): p. 692-700.
- [114] Laczi F, Gaffari O, De Kloet ER and De Wied D, Arginine-vasopressin content of hippocampus and amygdala during passive avoidance behavior in rats. *Brain Res*, 1983. 280: p. 309-315.
- [115] Lagerström MC, Fredriksson R, Bjarnadóttir TK, Fridmanis D, Holmquist T, Andersson J, Yan YL, Raudsepp T, Zoorob R, Kukkonen JP, Lundin LG, Klovins J, Chowdhary BP, Postlethwait JH, Schiöth HB, Origin of the prolactin-releasing hormone (PRLH)

- receptors: Evidence of coevolution between PRLH and a redundant neuropeptide Y receptor during vertebrate evolution. *Genomics*, 2005. 85(6): p. 688-703.
- [116] Lawrence CB, Ellacott KL, Luckman SM, PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling. *Endocrinology*, 2002. 143(2): p. 360-367.
- [117] László K, Tóth K, Kertes E, Péczely L, Lénárd L, The role of neurotensin in positive reinforcement in the rat central nucleus of amygdala. *Behavioural Brain Research*, 2010. 208(2): p. 430-435.
- [118] László K, Tóth K, Kertes E, Péczely L, Ollmann T, Madarassy-Szücs A, Lénárd L, The role of neurotensin in passive avoidance learning in the rat central nucleus of amygdala. *Behavioural Brain Research*, 2012. 226(2): p. 597-600.
- [119] LeDoux JE, Farb C, Rugierro DA, Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J. Neurosci*, 1990. 10: p. 1043-1054.
- [120] Leonard C and Scott JW, Origin and distribution of the amygdalofugal pathways in the rat: an experimental neuroanatomical study. *J Comp Neurol*, 1971. 141: p. 313-329.
- [121] Lénárd L, Hahn Z, Amygdalar noradrenergic and dopaminergic mechanisms in the regulation of hunger and thirst-motivated behavior. *Brain Res*, 1982. 233(1): p. 115-132.
- [122] Lénárd L, Hahn Z, Karádi Z, Body weight changes after neurochemical manipulations of lateral amygdala: noradrenergic and dopaminergic mechanisms. *Brain Res*, 1982. 249(1): p. 95-101.
- [123] Lénárd L, Karádi Z, Szabó I, Hahn Z. , Pallidal mechanism in the organization of feeding and sensorymotor integration. In *Recent Developments of Neurobiology in Hungary*, 1982. 1: p. 79-113.
- [124] Lénárd L, Sex-dependent body weight loss after bilateral 6-hydroxydopamine injection into the globus pallidus. *Brain Res*, 1977. 128(3): p. 559-568.
- [125] Liang KC, McGaugh JL, Martinez JL, Jensen RA, Vasquez BJ, Messing RB, Messing, Post-training amygdaloid lesions impair retention of an inhibitory avoidance response. *Behav Brain Res*, 1982. 4: p. 237-249.
- [126] Liang KC, Lee EH, Intra-amygdala injections of corticotropin releasing factor facilitate inhibitory avoidance learning and reduce exploratory behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 1988. 96: p. 232-236.
- [127] Linke R, Braune G, Schwegler H, Differential projection of the posterior paralaminar thalamic nuclei to the amygdaloid complex in the rat. *Exp Brain Res*, 2000. 134: p. 520-532.
- [128] Lin L, York DA, Enterostatin actions in the amygdala and PVN to suppress feeding in the rat. *Peptides*, 1997. 18(9): p. 1341-1347.
- [129] Liu Q, Guan XM, Martin WJ, McDonald TP, Clements MK, Jiang Q, Zeng Z, Jacobson M, Williams DL Jr, Yu H, Bomford D, Figueroa D, Mallee J, Wang R, Evans J, Gould R, Austin CP, Identification and Characterization of Novel Mammalian Neuropeptide FF-like Peptides That Attenuate Morphine-induced Antinociception. *J Biol Chem*, 2001. 276(40): p. 36961-36969.
- [130] Li XF, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, Knox AM, Lin Y, Petrou NA, Roseweir A, Lightman SL, Milligan SR, Millar RP, O'Byrne KT, Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One*, 2009. 4(12): p. 8334.
- [131] Loughlin SE, Fallon JH, Dopaminergic and non-dopaminergic projections to amygdala from substantia nigra and ventral tegmental area. *Brain Res*, 1983. 262: p. 334-338.
- [132] Maletínská L, Tichá A, Nagelová V, Spolcová A, Blechová M, Elbert T, Zelezná B, Neuropeptide FF analog RF9 is not an antagonist of NPF receptor and decreases food intake in mice after its central and peripheral administration. *Brain Research*, 2013. 1498(0): p. 33-40.
- [133] Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H and Watson SJ, Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci*, 1988. 11: p. 308-314.

- [134] Marchand S, Betourne A, Marty V, Daumas S, Halley H, Lassalle JM, Zajac JM, Frances B, A neuropeptide FF agonist blocks the acquisition of conditioned place preference to morphine in C57Bl/6J mice. *Peptides*, 2006. 27(5): p. 964-972.
- [135] Marshall JF, Richardson JS, Teitelbaum P, Nigrostriatal bundle damage and the lateral hypothalamic syndrome. *J Comp Physiol Psychol*, 1974. 87(5): p. 808-830.
- [136] Mazarguil H, Gouardères C, Tafani JA, Marcus D, Kotani M, Mollereau C, Roumy M, Zajac JM, Structure-activity relationships of neuropeptide FF: role of C-terminal regions. *Peptides*, 2001. 22(9): p. 1471-1478.
- [137] McDonald AJ and Augustine JR, Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *Neuroscience*, 1993. 52(2): p. 281-294.
- [138] McDonald AJ and Mascagni F, Cortico-cortical and cortico-amygdaloid projections of the rat occipital cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *Neuroscience*, 1996. 71(1): p. 37-54.
- [139] McDonald AJ, Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*, 1998. 55(3): p. 257-332.
- [140] Meador-Woodruff JH, Mansour A, Healy DJ, Kuehn R, Zhou QY, Bunzow JR, Akil H, Civelli O, Watson SJ Jr. Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 5(4): p. 231-242.
- [141] Mehler WR, Subcortical afferent connections of the amygdala in the monkey. *J Comp Neurol*, 1980. 190: p. 733-762.
- [142] Merali Z, McIntosh J, Kent P, Michaud D, Anisman H, Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. *J Neurosci*, 1998. 18 p. 4758-4766.
- [143] Millan MJ, The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, 2003. 70(2): p. 83-244.
- [144] Morales M, Battenberg E, deLecea L, Sanna PP and Bloom FE, Cellular and subcellular immunolocalization of the type 3 serotonin receptor in the rat central nervous system. *Molecular Brain Research*, 1996. 36: p. 251-260.
- [145] Moreira CM, Masson S, Carvalho MC, Brandão ML, Exploratory behaviour of rats in the elevated plus-maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and central amygdaloid nuclei. *Brain Research Bulletin*, 2007. 71(5): p. 466-474.
- [146] Moulédous L, Barthas F, Zajac JM, Opposite control of body temperature by NPFF1 and NPFF2 receptors in mice. *Neuropeptides*, 2010. 44(5): p. 453-456.
- [147] Murakami M, Matsuzaki T, Iwasa T, Yasui T, Irahara M, Osugi T, Tsutsui K, Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *Journal of Endocrinology*, 2008. 199 (1): p. 105-112
- [148] Murase T, Arima H, Kondo K, Oiso Y, Neuropeptide FF reduces food intake in rats. *Peptides*, 1996. 17(2): p. 353-354.
- [149] Nagel JA, Kemble ED, Effects of amygdaloid lesions on the performance of rats in four passive avoidance tasks. *Physiol Behav Neurosci*, 1976. 17: p. 245-250.
- [150] Nakashima M, Uemura M, Yasui K, Ozaki HS, Tabata S, Taen A, An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex. *Neurosci Res*, 2000. 36: p. 297-309.
- [151] Neumann ID, Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog Brain Res*, 2002. 139: p. 147-162.
- [152] Newmyer BA, Cline MA, Neuropeptide SF is associated with reduced food intake in chicks. *Behavioural Brain Research*, 2009. 205(1): p. 311-314.
- [153] Nichols R, Bass C, Demers L, Larsen B, Li E, Blewett N, Converso-Baran K, Russell MW, Westfall MV, Structure-Activity Studies of RFamide-related Peptide-1 Identify a Functional Receptor Antagonist and Novel Cardiac Myocyte Signaling Pathway Involved in Contractile Performance. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012 55(17): p. 7736-7745.
- [154] Ono T, Nishijo H, Uwano T, Amygdala role in conditioned associative learning. *Progress in Neurobiology*, 1995. 46(4): p. 401-422.

- [155] Ottersen OP, Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat: II. Afferents from the hypothalamus and the basal telencephalon. *J Comp Neurol*, 1980. 194: p. 267-289.
- [156] Ottersen OP, Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferents from the lower brain stem. *J Comp Neurol*, 1981. 202: p. 335-356.
- [157] Ottersen OP, Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, 1982. 205: p. 30-48.
- [158] Paden CM, Krall S, LYNCH WC, Heterogeneous distribution and upregulation of mu, delta and kappa opioid receptors in the amygdala. *Brain Res*, 1987. 418: p. 349-355.
- [159] Panula P., Engström M, Brandt A, Wurster S, Savola JM, Panula P. Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. 305(3): p. 825-32.
- [160] Panula P, Kalso E, Nieminen M, Kontinen VK, Brandt A, Pertovaara A, Neuropeptide FF and modulation of pain. *Brain Research*, 1999. 848(1-2): p. 191-196.
- [161] Paré D, Amygdala: Structure and Circuitry in Rodents and Felines, in *Encyclopedia of Neuroscience*, L.R. Squire, Editor 2009, Academic Press: Oxford. p. 347-353.
- [162] Parkinson JA, Robbins TW, Everitt BJ, Dissociable roles of the central and basolateral amygdala in appetitive emotional learning. *Eur J Neurosci* 2000. 12: p. 405-413.
- [163] Paxinos G, Watson C, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 2nd edition. New York, Academic Press, 1986.
- [164] Peinado-Manzano MA, The role of the amygdala and the hippocampus in working memory for spatial and non-spatial information. *Behavioural Brain Research*, 1990. 38(2): p. 117-134.
- [165] Pertovaara A, Ostergård M, Ankö ML, Lehti-Koivunen S, Brandt A, Hong W, Korpi ER, Panula P, RFamide-related peptides signal through the neuropeptide FF receptor and regulate pain-related responses in the rat. *Neuroscience*, 2005. 134(3): p. 1023-1032.
- [166] Pesold C. and Treit D, The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Research*, 1995. 671(2): p. 213-221.
- [167] Petrov T, Krukkof TL, Jhamandas JH, Chemically defined collateral projections from the pons to the central nucleus of the amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Cell Tissue Res*, 1994. 277: p. 289-295.
- [168] Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW, Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res*, 2001. 38: p. 247-289.
- [169] Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE, Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosciences*, 1997. 20(11): p. 517-523.
- [170] Porrino LJ, Crane AM, Goldman-Rakic PS, Direct and indirect pathways from the amygdala to the frontal lobe in rhesus monkeys. *J Comp Neurol*, 1981. 198: p. 121-136.
- [171] Price JL and Amaral DG, An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. *J Neurosci*, 1981. 1: p. 1242-1259.
- [172] Primeaux SD, Blackmon C, Barnes MJ, Braymer HD, Bray GA, Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats. *Peptides*, 2008. 29(11): p. 1994-2000.
- [173] Primeaux SD, York DA, Bray GA, Neuropeptide Y administration into the amygdala alters high fat food intake. *Peptides*, 2006. 27(7): p. 1644-1651.
- [174] Qi Y, Oldfield BJ, Clarke IJ, Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *J Neuroendocrinol*, 2009. 21(8): p. 690-697.
- [175] Quelven I, Roussin A, Zajac JM, Comparison of pharmacological activities of Neuropeptide FF1 and Neuropeptide FF2 receptor agonists. *European Journal of Pharmacology*, 2005. 508(1-3): p. 107-114.

- [176] Richards JG, Möhler H, Benzodiazepine receptors. *Neuropharmacology*, 1984. 23: p. 233-242.
- [177] Ring RH, Malberg JE, Potestio L, Ping J, Boikess S, Luo B, Schechter LE, Rizzo S, Rahman Z, Rosenzweig-Lipson S, Anxiolytic-like activity of oxytocin in male mice: behavioral and autonomic evidence, therapeutic implications. *Psychopharmacology (Berl)*, 2006. 185(2): p. 218-225.
- [178] Rizvi TA, Ennis M, Behbehani MM, Shipley MT, Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *J Comp Neurol*, 1991. 303: p. 121-131.
- [179] Reid MS, Herrera-Marschitz M, Hökfelt T, Lindfors N, Persson H, Ungerstedt U, Striatonigral GABA, dynorphin, substance P and neurokinin A modulation of nigrostriatal dopamine release: evidence for direct regulatory mechanisms. *Exp Brain Res*, 1990. 82: p. 293-303.
- [180] Rezaïof A, Zarrindast MR, Sahraei H, Haeri-Rohani A, Involvement of dopamine D2 receptors of the central amygdala on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2002. 74(1): p. 187-197.
- [181] Rizwan MZ, Porteous R, Herbison AE, Anderson GM, Cells expressing RFamide-related peptide-1/3, the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone orthologs, are not hypophysiotropic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology*, 2009 150(3): p. 1413-1420.
- [182] Roaa J, Aguilera E, Dieguez C, Pinillaa L, Tena-Sempere M, New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2008. 29(1): p. 48-69.
- [183] Robledo P, Robbins TW, Everitt BJ, Effects of excitotoxic lesions of the central amygdaloid nucleus on the potentiation of reward-related stimuli by intra-accumbens amphetamine. *Behavioral Neuroscience*, 1996. 110(5): p. 981-990.
- [184] Romanovsky AA, Thermoregulation: some concepts have changed. *Functional architecture of the thermoregulatory system. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* , 2007. 292(1): p. 37-46.
- [185] Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Beck-Sickinger AG, Doods HN, The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist: BIBP3226. *Eur J Pharmacol.* , 1994. 271(2-3): p. 11-13.
- [186] Russchen FT, Amygdalopetal projections in the cat. I. Cortical afferent connections. A study with retrograde and anterograde tracing techniques. *J Comp Neurol*, 1982. 206: p. 159-179.
- [187] Russchen FT, Amygdalopetal projections in the cat. II. Subcortical afferent connections. A study with retrograde tracing techniques. *J Comp Neurol*, 1982. 207: p. 157-176.
- [188] Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M and Power J, The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*, 2003. 83: p. 803-834.
- [189] Samson WK, Keown C, Samson CK, Samson HW, Lane B, Baker JR, Taylor MM. Prolactin-releasing peptide and its homolog RFRP-1 act in hypothalamus but not in anterior pituitary gland to stimulate stress hormone secretion. *Endocrine*, 2003. 20 (1-2): p. 59-66.
- [190] Scheel-Krüger J, Petersen EN, Anticonflict effect of the benzodiazepines mediated by a GABAergic mechanism in the amygdala. *Eur J Pharmacol*, 1982. 82: p. 115-116.
- [191] Schildein S, Agmo A, Huston JP, Schwarting RK. Intraaccumbens injections of substance P, morphine and amphetamine: effects on conditioned place preference and behavioral activity. *Brain Research*, 1998. 790(1-2): p. 185-194.
- [192] Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaughter SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA,

- Colledge WH, The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *N Engl J Med*, 2003. 349(17): p. 1614-1627.
- [193] Simonneaux V, Ancel C, RFRP neurons are critical gatekeepers for the photoperiodic control of reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012. 3: p. 168.
- [194] Simonin F, Schmitt M, Laulin JP, Laboureyras E, Jhamandas JH, MacTavish D, Matifas A, Mollereau C, Laurent P, Parmentier M, Kieffer BL, Bourguignon JJ, Simonnet G, RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance and paradoxical hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006. 103: p. 466-471.
- [195] Skibicka PK, and Dickson LS, Ghrelin and food reward: The story of potential underlying substrates. *Peptides*, 2011. 32(11): p. 2265-2273.
- [196] Smith BK, York DA, Bray GA, Effects of dietary preference and galanin administration in the paraventricular or amygdaloid nucleus on diet self-selection. *Brain Res Bull*, 1996. 39(3): p. 149-154.
- [197] Soga T, Wong DW, Clarke IJ, Parhar IS, Citalopram (antidepressant) administration causes sexual dysfunction in male mice through RF-amide related peptide in the dorsomedial hypothalamus. *Neuropharmacology*, 2010. 59(1-2): p. 77-85.
- [198] Spiaci A, Coimbra NC, and Zangrossi H, Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. *Neuroscience*, 2012. 227(0): p. 350-360.
- [199] Schwartz NB, Kling A, The effects of amygdaloid lesions on feeding, grooming and reproduction in rats. *Acta Neuroveg*, 1962. 26: p. 12-34.
- [200] Sun B, Fujiwara K, Adachi S, Inoue K. Physiological roles of prolactin-releasing peptide. *Regulatory Peptides*, 2005. 126(1-2): p. 27-33. Spiaci A, Coimbra NC, and Zangrossi H, Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. *Neuroscience*, 2012. 227(0): p. 350-360.
- [201] Swanson LW, Petrovich GD, What is the amygdala? *Trends Neurosci*, 1998. 21: p. 323-331.
- [202] Swiergiel AH, Takahashi LK, Kalin NH, Attenuation of stress-induced behavior by antagonism of corticotropin-releasing factor receptors in the central amygdala in the rat. *Brain Res*, 1993. 623: p. 229-234.
- [203] Takayanagi Y, Onaka T, Roles of prolactin-releasing peptide and RFamide related peptides in the control of stress and food intake. *FEBS J*, 2010. 277(24): p. 4998-5005.
- [204] Touzani K. and Vellely L, Electrical self-stimulation in the central amygdaloid nucleus after ibotenic acid lesion of the lateral hypothalamus. *Behavioural Brain Research*, 1998. 90(2): p. 115-124.
- [205] Tóth K, László K, and Lénárd L, Role of intraamygdaloid acylated-ghrelin in spatial learning. *Brain Research Bulletin*, 2010. 81(1): p. 33-37.
- [206] Tóth K, László K, Bagi EE, Lukács E and Lénárd L, Effects of intraamygdaloid microinjections of acylated-ghrelin on liquid food intake of rats. *Brain Res Bull*, 2008. 77: p. 105-111.
- [207] Tóth K, László K, Lukács E, Lénárd L, Intraamygdaloid microinjection of acylated-ghrelin influences passive avoidance learning. *Behavioural Brain Research*, 2009. 202(2): p. 308-311. Tóth ZE, Zelena D, Mergl Z, Kirilly E, Várnai P, Mezey E, Makara GB, Palkovits M, Chronic repeated restraint stress increases prolactin-releasing peptide/tyrosine-hydroxylase ratio with gender-related differences in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 2008. 104(3): p. 653-666.
- [208] Tóth ZE, Zelena D, Mergl Z, Kirilly E, Várnai P, Mezey E, Makara GB, Palkovits M, Chronic repeated restraint stress increases prolactin-releasing peptide/tyrosine-hydroxylase ratio with gender-related differences in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 2008. 104(3): p. 653-666.
- [209] Treit D, Menard J, Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. *Behav Neurosci*, 1997. 111(3): p. 653-658.

- [210] Tsutsui K, A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Progress in Neurobiology*, 2009. 88(1): p. 76-88.
- [211] Tsutsui K and Ukena K, Hypothalamic LPXRF-amide peptides in vertebrates: Identification, localization and hypophysiotropic activity. *Peptides*, 2006. 27(5): p. 1121-1129.
- [212] Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ, A Novel Avian Hypothalamic Peptide Inhibiting Gonadotropin Release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000. 275(2): p. 661-667.
- [213] Tsutsui K, Ubuka T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Discovery, progress and prospect. *General and Comparative Endocrinology*, 2012. 177(3): p. 305-314.
- [214] Turner BH, Herkenham M, Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. *J Comp Neurol*, 1991. 313: p. 295-325.
- [215] Tzschentke TM, Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol*, 1998. 56: p. 613-672.
- [216] Ubuka, T., et al., Gonadotropin-inhibitory hormone neurons interact directly with gonadotropin-releasing hormone-I and -II neurons in European starling brain. *Endocrinology*, 2008. 149(1): p. 268-278.
- [217] Ubuka T, Lai H, Kitani M, Suzuuchi A, Pham V, Cadigan PA, Wang A, Chowdhury VS, Tsutsui K, Bentley GE, Gonadotropin-inhibitory hormone identification, cDNA cloning, and distribution in rhesus macaque brain. *J Comp Neurol.* , 2009. 517(6): p. 841-855.
- [218] Ubuka T, Son YL, Bentley GE, Millar RP, Tsutsui K. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), GnIH receptor and cell signaling. *General and Comparative Endocrinology*, 2013. 190(0): p. 10-17.
- [219] Ukena K and Tsutsui K, A new member of the hypothalamic RF-amide peptide family, LPXRF-amide peptides: structure, localization, and function. *Mass Spectrom Rev*, 2005. 24: p. 469-486.
- [220] Ungerstedt U, Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 1971. 367: p. 95-122.
- [221] Van Der Kooy D, Kodaly L, McGinty JF, Gerfen CR, Bloom FE, The Organization of Projections From the Cortex, Amygdala, and Hypothalamus to the Nucleus of the Solitary Tract in Rat. *J Comp Neurol*, 1984. 224: p. 1-24.
- [222] Veening JG, Cortical afferents of the amygdaloid complex in the rat: An HRP study. *Neurosci Lett* 1978. 8: p. 191-195.
- [223] Veening JG, Subcortical afferents of the amygdaloid complex in the rat: an HRP study. *Neurosci Lett*, 1978. 8: p. 197-202.
- [224] Veening JG, Swanson LW, Sawchenko PE, The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation: A combined retrograde transport-immunohistochemical study. *Brain Research*, 1984. 303(2): p. 337-357.
- [225] Víg, J, Lénárd L, and Fekete É, Bombesin microinjection into the basolateral amygdala influences feeding behavior in the rat. *Brain Research*, 1999. 847(2): p. 253-261.
- [226] Víg J, Lénárd L, Fekete É, Hernádi I, Bombesin injection into the central amygdala influences feeding behavior in the rat. *Peptides*, 1999. 20(4): p. 437-444.
- [227] Wallace DM, Magnuson DJ, Gray TS, Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic, and adrenergic cell groups in the rat. *Brain Research Bulletin*, 1992. 28(3): p. 447-454.
- [228] Werka T, Skar J, Ursin H, Exploration and avoidance in rats with lesions in amygdala and piriform cortex. *J Comp Physiol Psychol.*, 1978 92(4): p. 672-681.

- [229] Wright DE, Seroogy KB, Lundgren KH, Davis BM and Jennes L, Comparative localization of serotonin, (1a), (1c) and (2) receptor subtype messenger-RNAs in rat-brain. *J Comp Neurol*, 1995. 351: p. 357-373.
- [230] Wu CH, Tao PL, and Huang EY, Distribution of neuropeptide FF (NPFF) receptors in correlation with morphine-induced reward in the rat brain. *Peptides*, 2010. 31(7): p. 1374-1382.
- [231] Wu M, Dumalska I, Morozova E, van den Pol AN, Alreja M. Gonadotropin inhibitory hormone inhibits basal forebrain vGluT2-gonadotropin-releasing hormone neurons via a direct postsynaptic mechanism. *J Physiol.* , 2009. 587(7): p. 1401-1411.
- [232] Wurtz RH and Olds J, Amygdaloid Stimulation and Operant Reinforcement in the Rat. *J Comp Physiol Psychol*, 1963. 56: p. 941-949.
- [233] Yadav VK, Oury F, Tanaka KF, Thomas T, Wang Y, Cremers S, Hen R, Krust A, Chambon P, Karsenty G, Leptin-dependent serotonin control of appetite: temporal specificity, transcriptional regulation, and therapeutic implications. *J Exp Med*, 2011. 208(1): p. 41-52.
- [234] Yang, Fratta W, Majane EA, and Costa E, Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(22): p. 7757-7761.
- [235] Yano T, Iijima N, Hinuma S, Tanaka M, Iбата Y, Developmental expression of RFamide-related peptides in the rat central nervous system. *Developmental Brain Research*, 2004. 152(2): p. 109-120.
- [236] Yano T, Iijima N, Kakihara K, Hinuma S, Tanaka M, Iбата Y, Localization and neuronal response of RFamide related peptides in the rat central nervous system. *Brain Research*, 2003. 982(2): p. 156-167.
- [237] Yeomans JS, Kofman O, McFarlane V, Cholinergic involvement in lateral hypothalamic rewarding brain stimulation. *Brain Research*, 1985. 329(1-2): p. 19-26.
- [238] Young WS 3rd, Kuhar MJ, Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 1980. 212(2): p. 337-346.
- [239] Zahm DS, Jensen SL, Williams ES, Martin JR III, Direct comparison of projections from the central amygdaloid region and nucleus accumbens shell. *Eur J Neuroscience*, 1999. 11(4): p. 119-26.
- [240] Zald DH, The human amygdala and the emotional evaluation of sensory stimuli. *Brain Research Reviews*, 2003. 41(1): p. 88-123.
- [241] Zarrindast MR, Rezaeifard A, Sahraei H, Haeri-Rohani A, Rassouli Y, Involvement of dopamine D1 receptors of the central amygdala on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rat. *Brain Research*, 2003. 965(1-2): p. 212-221.

10. FÜGGELÉK

10.1. Publikációs jegyzék

I. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

A. Kovács, K. László, R. Gálosi, K. Tóth, T. Ollmann, L. Péczely, L. Lénárd: Microinjections of RFRP-1 in the central nucleus of amygdala decreases food intake in the rat. *BRAIN RESEARCH BULLETIN* 88: (6) pp. 589-595. (2012) (IF: **2,818**, Független idéző: 3).

A. Kovács, K. László, R. Gálosi, T. Ollmann, L. Péczely, O. Zagoracz, N. Bencze, L. Lénárd: Intraamygdaloid microinjection of RFamide-related peptide-3 decreases food intake in rats. *BRAIN RESEARCH BULLETIN* 107: pp. 61-68. (2014) (IF: **2,974**)

L. Lénárd, **A. Kovács**, T. Ollmann, L. Péczely, O. Zagoracz, R. Gálosi, K. László: Positive reinforcing effects of RFamide-related peptide-1 in the rat central nucleus of amygdala *BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH* 275: pp. 101-106. (2014) (IF: **3,391**)

II. Egyéb publikációk

L. Péczely, T. Ollmann, K. László, **A. Kovács**, R. Gálosi, Á. Szabó, Z. Karádi, L. Lénárd: Role of D1 Dopamine Receptors of the Ventral Pallidum in Inhibitory Avoidance Learning. *BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH* 270: pp. 131-136. (2014)(IF:**3,391**)

L. Peczely, T. Ollmann, K. Laszlo, **A. Kovacs**, R. Galosi, A. Szabo, Z. Karadi, L. Lenard: Effects of ventral pallidal D1 dopamine receptor activation on memory consolidation in morris water maze test. *BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH* 274: pp. 211-218. (2014)(IF:**3,391**)

T. Ollmann, L. Peczely, K. Laszlo, **A. Kovacs**, R. Galosi, E. Berente, Z. Karadi, L. Lenard: Positive reinforcing effect of neurotensin microinjection into the ventral pallidum in conditioned place preference test. *BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH* 278: pp. 470-475. (2015) (IF: **3,391**)

III. Konferenciaszereplések

Kristóf László, **Anita Kovács**, Gabrielle D. Lacy, Tamás Ollmann, László Péczely, Erika Kertes, Zoltán Karádi: The role of intraamygdaloid oxytocin in reinforcing mechanisms. *FEPS 2014 Congress Budapest, Hungary, August 27-30, 2014.*

Anita Kovács, K. László, T. Ollmann, L. Péczely, O. Zagoracz, R. Gálosi, N. Bencze, L. Lénárd: Effects of intraamygdaloid microinjections of RFRP-1 on anxiety and positive reinforcement. *FEPS 2014 Congress Budapest, Hungary, August 27-30, 2014.*

A. Kovács, K. László, O. Zagoracz, T. Ollmann, L. Péczely, L. Lénárd: Effects of intraamygdaloid microinjections of RFRP peptides on passive avoidance learning in rats. *IBRO Workshop, Debrecen, Hungary, January 16-17, 2014.*

O. Zagoracz, **A. Kovács**, K. László, L. Lénárd: Orexigenic effect of QRFP-26 in the medial hypothalamus is caused by interaction with NPPF receptors. IBRO Workshop, Debrecen, Hungary, January 16-17, 2014.

L. Péczely, Á. Szabó, T. Ollmann, K. László, **A. Kovács**, R. Gálosi, Z. Karádi, L. Lénárd: The role of D2 dopamine receptors of the ventral pallidum in motivational and learning processes. IBRO Workshop, Debrecen, Hungary, January 16-17, 2014.

V. Kállai, R. Gálosi, A. Tóth, Z. Petykó, T. Ollmann, L. Péczely, **A. Kovács**, J. Kállai, I. Szabó, L. Lénárd: The MAM-E17 rat model of schizophrenia: Behavioral examinations. IBRO Workshop, Debrecen, Hungary, January 16-17, 2014.

T. Ollmann, E. Berente, L. Péczely, K. László, **A. Kovács**, R. Gálosi, Z. Karádi, L. Lénárd: Effects of neurotensin microinjection in the ventral pallidum on anxiety. IBRO Workshop, Debrecen, Hungary, January 16-17, 2014.

Kovács A, László K, Ollmann T, Péczely L, Zagoracz O, Gálosi R, Bencze N, Lénárd L. Effects of RFRP-3 administration into the central amygdala on food intake in rats. III. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia. Pécs, 2014. április 15-17.

Kállai V, Gálosi R, Tóth A, Petykó Z, Ollmann T, Péczely L, **Kovács A**, Karádi Z, Kállai J, Szabó I, Lénárd L. Magatartási vizsgálatok MAM-E17 skizofrén állatmodellen. III. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia. Pécs, 2014. április 15-17.

Péczely L, Ollmann T, László K, Kállai V, **Kovács A**, Lénárd L. A ventrális pallidum D2 dopamin receptorainak szerepe a memóriakonzolidációban. III. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia. 2014. április 15-17.

Ollmann T, Péczely L, László K, Kállai V, **Kovács A**, Lénárd L. A ventrális pallidum neurotensin-1-receptorainak szerepe a pozitív megerősítésben és a szorongásban. III. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia. Pécs, 2014. április 15-17.

Anita Kovács, Kristóf László, Noémi Bencze, Olga Zhizhina, Tamás Ollmann, László Péczely, László Lénárd: Effects of intraamygdaloid microinjections of RFRP peptides in conditioned place preference test. 14th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society. Budapest, Hungary, January 17-19, 2013.

O. Zhizhina, **A. Kovács**, K. László, L. Lénárd: Effects of QRFP-26 administration into the central amygdala on food intake in rats. XIV. Conference of the Hungarian Neuroscience Society. Budapest, Hungary, January 17-19, 2013.

Kovács Anita: Az amygdala centrális magjába injektált RFRP-1 hatása helypreferencia tesztben és emelt kereszt-palló tesztben. V. Nemzetközi és XI. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia, Konferencia helye, ideje: Pécs, 2013. április 17-19.

Anita Kovács, Kristóf László, Noémi Bencze, Olga Zagoracz, Tamás Ollmann, Péczely László, László Lénárd: Effects of RFRP peptides microinjections into the central nucleus of amygdala in conditioned place preference test. II. Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, Hungary, May 15-17, 2013.

Kovács A, László K, Zagoracz O, Bencze N, Ollmann T, Péczely L, Lénárd L: Intraamygdaloid microinjection of RFRP-1 influences passive avoidance learning. A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös Tudományos Kongresszusa, Budapest, 2013. június 5-8.

Zagoracz O, **Kovács A**, László K, Lénárd L: Effects of direct QRFP-26 administration into hypothalamic amygdaloid areas on food intake in rats. A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös Tudományos Kongresszusa. Budapest, 2013. június 5-8.

Péczely L, Ollmann T, **Kovács A**, László K, Gálosi R, Lénárd L. Role of ventral pallidal dopamine receptors in conditioned place preference. 2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences. Pécs, 2013. szeptember 11-12.

Kovács A, László K, Bencze N, Zhizhina O, Ollmann T, Péczely L, Lénárd L: Az amygdala centrális magjába injektált RFRP-1 hatása helypreferencia tesztben és emelt keresztpalló tesztben. A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómus Társaság, a Magyar Biofizikai Társaság, és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Vándorgyűlése, Debrecen, 2012. június 10-13.

Ollmann T, Berente E, Szabó Á, Gubik Á, Péczely L, László K, **Kovács A**, Lénárd L: A ventrális pallidum neurotensin 1 receptorainak szerepe a pozitív megerősítési folyamatokban. A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómus Társaság, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Élettani Társaság, és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Vándorgyűlése, Debrecen, 2012. június 10-13.

A. Kovács, N. Bencze, K. László, T. Ollmann, L. Péczely, O. Zhizhina, L. Lénárd: Intraamygdaloid RFRP-1 microinjections results in food intake decrease in rats. 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, June 14-18, 2012.

T. Ollmann, Á. Szabó, E. Berente, L. Péczely, K. László, **A. Kovács**, L. Lénárd: Neurotensin injected into the ventral pallidum results in conditioned place preference. 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, June 14-18, 2012.

L. Péczely, Á. Szabó, Á. Gubik, T. Ollmann, K. László, **A. Kovács**, L. Lénárd: D2 dopamine receptors of the basal forebrain are involved in passive avoidance learning mechanisms. 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, June 14-18, 2012.

Kovács A, László K, Ollmann T, Péczely L, Zhizhina O, Lénárd L: Intraamygdaloid RFRP-3 results in food intake decrease in rats. Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience 65: (Suppl1) p. 38. IBRO International Workshop, Szeged, 2012. január 19-21.

A. Kovács, K. Tóth, K. László, R. Gálosi, T. Ollmann, L. Lénárd: Effects of intraamygdaloid microinjections of RFRP-1 on liquid food intake of rats. 13th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society. Budapest, 2011. január 22-24.

T. Ollmann, L. Péczely, K. László, **A. Kovács** and L. Lénárd: Role of neurotensin injected into the ventral pallidum in open field and in conditioned place preference test. 13th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, January, Budapest, Hungary, 2011. P6-24, Frontiers in Neuroscience. Budapest, 2011. január 22-24.

Kovács A, László K, Ollmann T, Péczely L, Lénárd L: Effects of intraamygdaloid microinjections of RFRP-3 on liquid food intake of rats. 2011 FAMÉ abstract: Acta Physiologica, 202 (Suppl 684): pp. 59-60. Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, Pécs, 2011. június 08-11.

Ollmann T, Péczely L, László K, **Kovács A**, Lénárd L: Effects of neurotensin and neurotensin receptor conditioned place preference test. 2011 FAMÉ abstract: Acta Physiologica, 202 (Suppl 684): p. 89, P63. Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, Pécs, 2011. június 08-11.

Péczely L, Szabó Á, Ollmann T, László K, **Kovács A**, Lénárd L: The role of D2 dopamine receptors of the ventral pallidum and nucleus accumbens in passive avoidance learning mechanisms. 2011 FAMÉ abstract: Acta Physiologica, 202 (Suppl 684): p. 97, P70. Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, Pécs, 2011. június 08-11.