

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

**Intraamygdaloid ghrelinerg mechanizmusok szerepe a táplálékfelvétel és
a táplálékfelvételt befolyásoló metabolikus paraméterek és magatartási
folyamatok szabályozásában**

Ph.D. értekezés

Dr. Tóth Krisztián

Témavezető: Prof. Dr. Lénárd László

Programvezető: Prof. Dr. Lénárd László

Doktori Iskola Vezetője: Prof. Dr. Lénárd László

Pécs, 2009

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
1.1. A táplálékfelvétel szabályozása.....	2
1.1.1. Agyi központok és pályarendszerek.....	3
1.1.2. A táplálékfelvétel „sztatikus” szabályozása. A metabolikus paraméterek szerepe	4
1.1.3. „Brain-Gut” peptidek - A kapcsolat a periféria és a központi idegrendszer között	5
1.2. Táplálékfelvétel, memória, tanulás.....	6
1.3. Az amygdala	7
1.3.1. Az amygdala táplálékfelvétel és memória folyamatok szabályozásában betöltött szerepének áttekintése	9
1.4. A ghrelin	11
1.4.1. A ghrelin felfedezése	11
1.4.2. A ghrelin szöveti megoszlása	12
1.4.3. A ghrelin hatásai	13
1.4.4. A ghrelin receptorai	16
1.4.4.1. GHS-R1a altípus az A-GHR-t kötő receptor	17
1.4.4.2. GHS-R1b altípus funkcionális szerepe	19
2. CÉLKITŰZÉSEK	20
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
3.1. Kísérleti állatok.....	22
3.2. Műtétek.....	22
3.3. A kísérletek menete.....	23
3.4. Anyagok, mikroinjekciók.....	24
3.5. Táplálékfelvétel mérés	26
3.6. Vércukorszint mérési vizsgálatok.....	26
3.7. Egyéb metabolikus paraméterek mérése	27
3.8. Magatartási tesztek.....	27
3.8.1. Open field teszt.....	27
3.8.2. Emelt keresztpalló teszt (Elevated plus-maze)	28
3.8.3. Passzív elhárító teszt	28
3.8.4. Morris féle úsztatási teszt (Morris water maze)	29
3.9. Adatok kiértékelése.....	29
3.9.1. Szövevény	29
3.9.2. Statisztikai kiértékelés	30

3.9.3. Az adatok ábrázolása	30
4. EREDMÉNYEK	32
4.1 Táplálékfelvétel mérési vizsgálatok.....	32
4.1.1. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása a folyékony táplálékfelvételre ad libitum táplált állatokban.....	32
4.1.2. GHS-R antagonistá D-Lys3-GHRP-6 mikroinjekcióinak hatása a táplálékfelvételre ad libitum táplált állatokban	37
4.1.3. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása a folyékony táplálékfelvételre éheztetett patkányon	40
4.1.4. A DA-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása a folyékony táplálékfelvételre ad libitum táplált állatokban.....	42
4.1.5. Intracerebroventriculáris A-Ghr injekciók hatása a táplálékfelvételre.....	44
4.2. Metabolikus paraméterek mérése	46
4.2.1. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása a vércukorszintre ad libitum táplált állatokban	46
4.2.2. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak akut hatása a szérumban össz-koleszterin, HDL-koleszterin, triglicerid, fehérje, húgysav, insulin és leptin koncentrációra ad libitum táplált állatokban	48
4.3. Magatartási vizsgálatok.....	53
4.3.1. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása open field tesztben.....	53
4.3.2. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása emelt kereszpalló tesztben (elevated plus maze).....	55
4.3.3. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása passzív elhárító tesztben	57
4.3.4. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása Morris féle úsztatási tesztben.....	58
5. EREDMÉNYEINK MEGBESZÉLÉSE.....	60
5.1. Táplálékfelvétel mérés.....	61
5.2. Vércukorszint mérés, metabolikus paraméterek	66
5.3. Magatartási tesztek.....	71
5.3.1. Open field és emelt kereszpalló teszt.....	71
5.3.2. Passzív elhárító teszt	73
5.3.3. Morris féle úsztatási teszt.....	76
6. EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA	79
7. A GHRELIN KLINIKAI JELENTŐSÉGE	81
8. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	82
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	83

10. IRODALOMJEGYZÉK.....	84
11. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK	102
11.1. A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk.....	102
11.2. Egyéb publikációk.....	102
11.3. Konferencia szereplések.....	102

1. Bevezetés

Az elhízást, a túlsúlyosságot és a kóros soványsággal járó állapotokat összefoglaló néven testsúly szabályozási zavaroknak hívhatjuk. Ezek háttérében állhat öröklött vagy szerzett betegség ill. helytelen- egészségtelen táplálkozás, életmód. Ezen testsúly szabályozási zavarokat már napjainkban is óriási és egyre növekvő incidenciájuk miatt népbetegségnek kell tekintenünk. A felnőtt korú lakosság mintegy 1-1%-át érinti a két ismert pszichiatriai megbetegedés az anorexia nervosa és a bulimia nervosa mely zavarok szembetűnő tünete lehet a kóros soványság. Ezen kórképek gyermekkori előfordulása is növekvő incidenciát mutat. A testsúly szabályozási zavarok másik véglete a túlsúlyosság ill. elhízás. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) felmérése szerint a felnőtt korú lakosság kb. 40%-a túlsúlyos, míg az elhízottak aránya meghaladja a 20%-ot. Az iskolás korú gyermekek körében ezen arányszámok 25% ill. 11%. Az elhízás kihat szervezetünk minden egyes szervrendszerére, negatívan befolyásolva azok működését. Gondoljunk csak a mozgásszervi megbetegedésekre, a légzőszervi, metabolikus és a cardiovascularis morbiditásra, mely utóbbi a halálozási listák vezetője. Továbbá az obesitas pszichés következményei is jelentősek, mint például a gyermekkori elhízottak között kimutatható kongnitív funkció romlás. Noha, ezen kóros állapotok háttérében álló neurokémiai (dopaminerg-, noradrenerg-, serotoninerg-, stb.) változások részben ismertek, ennek ellenére még mindig nem kezelhetők teljes sikerrel.

Így tehát, ezen zavarok háttérében álló élettani- kórélettani folyamatok megismerése fontos feladat kell legyen a közeljövő kutatásaiban.

Jelen ismereteink szerint a testsúly szabályozási zavarok háttérében (túl a társadalmi tényezőkön, a helytelen táplálkozáson, mozgásszegény életmódon és más még nem ismert tényezőkön) a táplálkozási magatartás szabályozásának és az energia felhasználásban szerepet játszó neurokémiai folyamatoknak a zavara állhat. Ezen neurokémiai folyamatok jelentős része peptid molekulákon- neuropeptideken keresztül valósul meg. A neuropeptidek az emberi szervezetben a központi idegrendszer különböző struktúráiban és azon kívül, számos perifériás szövetben termelődnek. Ezen peptidek hatása a periférián és/vagy a központi idegrendszerben található éhség-jóllakottsági rendszereken keresztül

juthat érvényre. Vannak köztük olyanok, melyek a táplálékfelvételt fokozzák (orexigén) és vannak melyek csökkentik (anorexigén).

Az előbbieken bemutatott neuropeptidok családjába tartozik a ghrelin is. Mint az a következő fejezetekből kiderül, bár a ghrelin több hatását már ismerjük, azonban számos kérdés tisztázatlan még. Pl.: 1) Pontosan milyen receptoriális mechanizmusok játszanak szerepet a ghrelin hatásainak közvetítésében? 2) A táplálékfelvétel szabályozásában részt vevő agyi struktúrák, mint pl. az amygdala, hogyan játszanak szerepet a ghrelin közvetítette táplálkozási hatásokban? 3) Az egyes agyi struktúrákban azonos vagy eltérő módon befolyásolja-e az acyl-és a desacyl-ghrelin a táplálékfelvételt? 4) A táplálkozási magatartás megváltozása mögött az éhség-jóllakottság érzetének kialakulása vagy egyéb magatartásformák megváltozása áll-e? Eddigi ismereteink azt mutatják, hogy a ghrelin komplex szerepének tisztázása közelebb vihet minket a szervezetben lejátszódó energiaegyensúlyt szabályozó folyamatok megértéséhez, és esetleg olyan terápiás lehetőséghez juttathat minket, ami a testsúly szabályozási zavarok egy részének kezelésében hasznosítható.

1.1. A táplálékfelvétel szabályozása

Kísérleteink középpontjában az éhség-motiválta magatartás vizsgálata állt, így indokoltnak látjuk a táplálékfelvétel szabályozás témakörében végzett több mint fél évszázadnyi kutatás eredményeinek rövid összefoglalását, történeti áttekintését.

Az elmúlt évtizedekben ismereteink sokat gyarapodtak a táplálékfelvétel szabályozásával kapcsolatban. Ismerünk agyi központokat, fontos pályarendszereket, neurotranszmittereket melyek részt vesznek a folyamatban. Azonban meg kell állapítanunk, hogy még sok információ hiányzik melyek e bonyolult, egymással összefüggő, perifériás és központi idegrendszeri szabályozási rendszert érthetővé tennék.

1.1.1. Agyi központok és pályarendszerek

Az egyes központi idegrendszeri területek léziójával ill. ugyanazon területek elektromos ingerlésével nyert információk rávilágítottak egyes agyi területek táplálékfelvétel szabályozásban betöltött szerepére. Így került a köztudatba a hypothalamus (HT) „kettős központ” hipotézise. A laterális HT area (LH) léziója aphagiát, adipsiát majd következményes testtömegcsökkenést okoz, míg a HT ventromediális (VMH) magjának roncsolása hyperphagiához és elhízáshoz vezet [6,99,152,154,251]. Ennek megfelelően, a táplálékfelvétel szabályozásában betöltött szerepük szerint ruházták fel ezeket a struktúrákat „éhség-” (LH) és „jóllakottsági központ” (VMH) jelzővel. A további léziós kutatások egyre több olyan extrahypothalamicus területet tártak fel, melyek részt vesznek a táplálkozási magatartásformák létrejöttében. Ilyen a ventrális tegmentalis area (VTA) [26,90], a substantia nigra [259], a globus pallidus [149,151,159,160,186], a nucleus accumbens (Nacc) [87] és az amygdala (AMY) [78,146,160].

Az agy eltérő területein megismert táplálékfelvétel szabályozásában részt vevő központok felvetették annak lehetőségét, hogy egy komplex szabályozási rendszerről van szó, melyben a megismert struktúrák egymással egy vagy kétirányú kapcsolatban állnak. Ezt követően ezen központok összeköttetések megismerése került a kutatások középpontjába. Így vált ismertté a nigrostriatalis dopaminerg- és a ventralis noradrenerg rendszer. Előbbi az „éhség-pálya”, mely a substantia nigra pars compactájából ered, áthalad a LH-án, a capsula internán és a caudatumban, valamint a putamenben végződik, utóbbi pedig a locus coeruleusból indul és részben a VMH-ban, ill. a HT paraventriculáris (PVN) részében végződik [7,114,168,185,259]. További kutatások eredményeként vált ismertté a mesolimbicus dopamin rendszer, mely a nigrostriatalis dopaminerg rendszer eredése körüli területekből indul, és ugyanúgy áthalad az LH-án, de az area preoptica, a Nacc, az AMY és a cortex területén végződik [72,156,181]. A catecholaminergiás pályákkal kapcsolatos kísérletek eredményei azt sugallják, hogy a dopamin hiány hypophagiát, míg a noradrenalin hiány evést indukál és hízáshoz vezet [158,161,162].

1.1.2. A táplálékfelvétel „sztatikus” szabályozása, a metabolikus paraméterek szerepe

A táplálékfelvétel szabályozó mechanizmusainak vizsgálata az 1940-es években kezdődtek, ekkor keletkeztek az első, mérföldkönek számító teóriák. Brobeck a táplálékfelvétel szempontjából a testhőmérsékletet látta az elsődleges szabályozó tényezőnek (thermosztatikus teória) [31], míg Mayer glukosztatikus [174], Mellinkoff aminosztatikus [178] és Kennedy liposztatikus [124] elképzelése a plazma metabolitok szintjében bekövetkező változás kizárólagosságát hangsúlyozta a szabályozásban. Ezen elméletek egyszerű negatív feedback alapján képelték el a táplálkozási magatartás szabályozását, és nem vették figyelembe a somatosensoros percepciók események (a táplálék és folyadék íze, szaga, látványa stb.) jelentőségét a táplálékfelvétel szabályozásában.

Az előbbi tényezők közül a glukóz szerepe kiemelendő. A véna portaeba injektált glukóz még éhes állaton is csökkentette az evést, valamint megváltoztatta a n. vagus rostjainak tüzelési frekvenciáját [199]. A n. vagus egyes szabad idegvégződése az erek falában érzékenységet mutatnak a vérben lévő glukóz, szabad zsírsav és aminosav koncentrációra. Ezen n. vagus által közvetített perifériás „glukóz információ” a központi idegrendszerbe a nucleus tractus solitarii (NTS) hátsó részébe fut be. Érdekes, hogy az íz információk ugyanezen mag elülső területeire érkeznek. Ezzel párhuzamosan Oomura és munkatársai a központi idegrendszerben, nevezetesen a hypothalamus táplálékfelvétellel kapcsolatos területein multi-barrel elektrofiziológiai technikával olyan idegsejteket találtak melyek glukóz lokális hatására aktivitásuk megváltozásával válaszoltak [206]. Ezen neuronok válaszaik tekintetében két félék voltak: aktivitásukat fokozták ill. aktivitásukat csökkentették glukóz hatására. Előbbiket glukóz-receptív, míg utóbbiakat glukóz-érzékeny (szenzitív) idegsejteknek nevezték el. Kimutatták továbbá, hogy ezen neuronok más, a táplálékfelvétellel kapcsolatba hozható neurokémiai anyagra is érzékenyek mint például az inzulinra, gulkagonra vagy éppen az orexinekre. A későbbiekben sikerült kimutatni ilyen neuronokat a legtöbb táplálékfelvétel-szabályozással kapcsolatba hozható agyi ill. limbikus idegrendszeri struktúrában is. Ma már Oomura, Lénárd, Karádi, Nakano, Aou és munkatársaik eredményei alapján egy glukóz monitorozó idegsejt hálózat képe körvonalazódik, mely átszövi a teljes központi idegrendszert [9,118-120,153,196,204]. A

hálózat egyes agyi területeken elhelyezkedő tagjai hierarchikus rendszerben helyezkednek el. Integrálják a periféria és a központi idegrendszeri információkat és szabályzó efferens hatást gyakorolnak a perifériás metabolikus folyamatokra.

1.1.3. „Brain-Gut” peptidek - A kapcsolat a periféria és a központi idegrendszer között

Bár az elhízás és a táplálkozási zavarok hátterében álló dopaminerg-, serotonerg- és noradrenerg változások már jól ismertek, számos kísérleti adat alapján feltételezhető, hogy a monoaminok mellett még további faktorok is szerepet játszanak a táplálékfelvételi magatartás kialakulásában. Az utóbbi évtizedekben számos olyan hypothalamicus peptidet találtak, melyek szerepet játszanak a táplálékfelvétel és a testtömeg, valamint a táplálékfelvételi magatartás, a tanulási folyamatok és az emóciók létrejöttében. E neuropeptidek általában 3-40 aminosavból állnak, valamint neurotranszmitterként és hormonnaként is funkcionálnak egyszerre. Jellegzetes fordított U-alakú dózis-hatás görbével rendelkeznek, tehát csak bizonyos dózistartományon belül fejtik ki hatásukat. Ma már igen sok olyan neuropeptidet ismerünk, mely centrálisan és perifériásan hatva szabályozza a táplálékfelvételt. Bizonyos peptidek csökkentik (cholecystokinin, leptin [236], gastrin releasing peptid (GRP) [74,264], neuromedin B [142]), mások növelik (galanin [233], neuropeptid Y (NPY) [22], ghrelin [130], orexin [276]) a táplálékfelvételt.

Az úgynevezett brain-gut peptidek a fent említett komplex rendszer centrális és perifériás szabályozásában egyaránt részt vesznek, azaz hatásuk a periférián és a központi idegrendszerben található „éhség”- és „jóllakottság” központokon keresztül, parakrin és endokrin módon is érvényesül. A gastrointestinalis traktusban, főként a gyomorban termelődnek és hatásukat a n. vagus útján, vagy közvetlenül humoralis úton az area postrema keresztül a hypothalamus magjaiban és a NTS-ben fejtik ki. Hatásaik szerteágazóak többek között szabályozzák a táplálékfelvételt, a gastrointestinalis motilitást és a gyomorsav szekréciót.

1.2. Táplálékfelvétel, memória, tanulás

A táplálékfelvételi magatartás egy komplex magatartási forma, mely homeosztaticus értékkel rendelkezik. A háttérben meghúzódó pszichológiai folyamatok szemszögéből vizsgálva a táplálékfelvétel kiváltója a motiváció, ami egy központi idegrendszeri aktivációként értelmezhető, amit a hajtóerő (a magatartást hajtó erő), ún. drive hoz létre [271]. Tehát az éhség motiválta táplálékfelvétel esetében a hajtóerő az éhség. Ugyanakkor az éhség-jóllakottság érzetének kialakulása bonyolult idegrendszeri folyamat, számtalan tényező befolyásolja. Gondoljunk például két szélsőséges esetre: 1) Vasárnapi, családi ebéd. A főétkezéseken túl vagyunk és talán már diszkomfortot is érzünk az elfogyasztott nagymennyiségű tápláléktól, de jön a desszert. Cseppet sem vagyunk éhesek de „muszáj” fogyasztanunk a süteményből. Ebben a példában a táplálékfelvételt már biztos, hogy nem az éhség motiválja, valami más húzódik meg a háttérben. Többek között az ok lehet a sütemény illata, látványa és ezen illathoz, látványhoz társuló emlékek, melyeket korábbi tapasztalataink során raktározunk el (tanultunk meg), mely mind azt sugallja, hogy valami finom dologról van szó. 2) Éhesek vagyunk, nem ettünk 2 napja. Az utcán ránk támad egy vad kutya, az éhségérzetünk helyét a félelem „veszi át”, minden erőnkkel a menekülésre összpontosítunk. A tanulási komponens lehet ebben a szituációban a korábbi tapasztalatokon alapuló félelem a kutyától (vadnak értékeljük). Természetesen itt most nem szólnunk azon tényezők sokaságáról, melyek még befolyásolják viselkedésünket az adott szituációban. Mindkét fent említett szituáció viselkedés lélektana bonyolultabb, de annak mélyre ható elemzése meghaladná e dolgozat terjedelmét. A cél csupán az éhség motiválta magatartás komplexitásának érzékeltetése volt.

A tudományos irodalomban található további bizonyítékokat a tanulás és szociális viselkedés táplálékfelvételt befolyásoló hatására. Wyrwiczka 1974-ben demonstrálta ezt macskákon [275]. Vizsgálatait egy anyamacskán és annak kölykén

végezte. Az anyamacskát jutalmazó elektromos ön-majd később külső- ingerléssel banán evésére szoktatta (a macska alapvetően hús evő állat). Ezt követően a kísérletbe bevonta a kölyköt is, aki az anya példáját követve banánevésbe kezdett, minden külső elektromos-ingerlés nélkül. Sőt ezen tulajdonságát még felnőtt korában is megtartotta, még akkor is ha elérhető lett volna számára a hús, tehát a banánt preferálta. Húst csak akkor evett, ha a banán már elfogyott.

Nyilvánvaló tehát, hogy a táplálékfelvétel, a motiváció, az emóciók és a memória folyamatok valamint a tanulás összefüggő folyamatok. A tanulás drive-redukciós elmélete szerint [109], az éhség mint hajtóerő kivált egy magatartás változást ami során az állat explorálja környezetét és ami során rátalál a táplálékra, elfogyasztja azt így „redukálva” a magatartást kiváltó hajtóerőt. Az elfogyasztott táplálék a jutalom, ami megerősíti a magatartásformát. Az éhség motiválta magatartás során az állat megtanulja hol, miként található táplálékra, mik a különbségek az egyes táplálékok közt (itt válik fontossá azok hedonikus értéke) stb. Bár ezen elméletnek is vannak támadható pontjai (melyeknek tárgyalása meghaladná ezen dolgozat kereteit), de Grastyán egységes tanuláselméletének [91] szemellett tartásával és Carlson, Campbell és Sheffield motiváció-redukcióra tett kiegészítéseivel a mai napig jól használható [37,44].

1.3. Az amygdala

Az alábbiakban az AMY rövid anatómiai, funkcionális anatómiai leírását szeretnénk vázlatosan ismertetni a kísérletek elvégzéséhez és az eredmények értékeléséhez nélkülözhetetlen adatokra szorítkozva. Kiemelve a táplálékfelvétel szabályozásban betöltött szerepét és nagyobb hangsúlyt fektetve a basolaterális mag mint vizsgálataink közvetlen célpontjának szerkezetére és összeköttetéseire.

Az agy temporális lebenyében található ez a számos magból álló, mandula alakú képlet. Korábban a kutatók két nagy magcsoportot különítettek el: a filogenetikailag régebbi corticomediális részt és a filogenetikailag újabb basolaterális részt. Jelen tudásunk szerint az AMY több mint 10 magból áll, ezért újabban amygdala- komplexumról beszélnek

[125,126,138,139,179,180,190,207-209,218,221,225,226]. Ezen mag-komplexum jelenleg 3 részre tagolódik: mély, felszínes, ill. az előbbiekhöz nem sorolható, de az AMY-hoz tartozó magok különíthetők el [216].

Az AMY részeinek fejlettsége az emlősök osztályába tartozó különböző fajokban eltérő. A filogenezis során a centromediális rész és a kérgi magok regressziót, a cortico-basolaterális rész növekedést mutat. A kérgi magok méretbeli redukciója fejlődéstani származásukkal magyarázható. Ugyanis e terület az olfactoros rendszer részének tekinthető, s mivel az olfactoros rendszer filogenetikai redukciója figyelhető meg, érthetővé válik a méretbeli csökkenés [244].

Az AMY számos kétirányú kapcsolattal rendelkezik a kéreg, ill. a kéreg alatti területek felé [163,177,208,221]. A táplálékfelvétel szabályozása szempontjából fontos kimenettel bír a HT és az agytörzs felé. Ugyanakkor visceroszeptív, nociceptív, gustatoros, somatosensoros és auditoros információt kap az agy számos területe felől [146,267].

Az amygdala-komplex basolaterális része (BLA) egy külön szubdivízióját alkotja az AMY-nak és mint basolaterális amygdaloid komplex vagy mint basolaterális magcsoport ismert [42,84]. A BLA egy corticalis eredetű struktúra, számos hasonlóság fedezhető fel ezen magcsoport és az agykéreg között. Például a fő sejttípus a BLA-ban ugyanazon morfológiai jellemzőket mutatja mint a corticalis neuronok [182]. Sőt, fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a BLA-ban vannak a neo-corticalis piramis sejtekkel azonos típusú sejtek [43]. A BLA kétirányú összeköttetésben áll a temporális kéreggel az orbitális kéreggel valamint a mediális és laterális (insula)-prefrontális cortex-el és a hippocampusszal [2,84,232,243]. Krettek és munkatársai autoradiográfiás vizsgálataikban igazolták, hogy a BLA kétirányú kapcsolatban áll a thalamus dorsomediális részével is [136,137]. Továbbá a BLA neuronjainak végződéseit igazolták az LH-ban, és fordítva, a HT elsősorban laterális része de kis mértékben a ventromediális területek is projiciálnak a BLA-ba [134,207,232]. De le kell szögeznünk, hogy az AMY hypothalamicus (hasonlóan az agytörzsi) kapcsolatai elsősorban a centrális magon keresztül valósulnak meg [232]. Ugyanakkor a BLA projekciót küld az AMY centrális magjába, mely mag információt kap az összes többi AMY magtól [135], a HT-től és más agytörzsi vegetatív központoktól [4,25] ily módon összegezve a külvilágból (BLA-n

keresztül) és a belső környezetből származó információkat. Végül ki kell emelnünk, hogy BLA-t inerválja a mesolimbicus dopaminerg rendszer is, melyről tudjuk, hogy jelentős szereppel bír a tanulási és memóriafolyamatok szabályozásában.

1.3.1. Az amygdala táplálékfelvétel és memória folyamatok szabályozásában betöltött szerepének áttekintése

Az előbbieken említett gazdag kétirányú kapcsolatrendszernek köszönhetően az AMY igen sokrétű funkcióval bír. A táplálékfelvétel és testtömeg szabályozása mellett szerepet játszik a memória folyamatokban, a tanulásban, a figyelem fenntartásában, az alvás szerveződésében, sensoros információk emocionális vonatkozásainak szabályozásában, emocionális események feldolgozásában és azok megválaszolásában, valamint a játék, a düh-félelem, a támadás-védekezés és a szexuális magatartásformák szervezésében. Jelen dolgozat keretein belül nem lehetséges ezen sokszínűség részletes, teljes körű leírása, így csak a táplálékfelvétel és a memória folyamatok szabályozásában eddig megismert szerepe kerül tárgyalásra.

Elsőként Klüver és Bucy számoltak be 1939-ben az AMY-t is érintő, temporális lebeny léziót elszenvedett majmokkal végzett kísérleteikről, melynek során az állatok táplálkozási szokása megváltozott [129]. Hasonló hatást értek el macskákban kétoldali AMY léziót követően: az állatok hyperphagiássá váltak, valamint testtömegük 6-8 hétig gyarapodott. Az AMY teljes kiirtása azt eredményezte, hogy a macskák még a romlott ételt is elfogyasztották, sőt az ehetetlen tárgyakat is megkísérelték megenni (omniphagia), mindezt a Klüver-Bucy tünetegyüttes részjelenségeként is értelmezhetjük [51]. A patkányokon végzett kísérletek is hasonló eredményt hoztak, ugyanakkor látszólag

ellentmondó eredményekről is beszámoltak, nevesül az AMY kiterjedt, kétoldali léziója aphagiát és adipsiát eredményezett patkányokban [234].

Ezt követően az 1970-es években Fonberg kutyákkal végzett kísérletei bizonyították, hogy a HT-hoz hasonlóan az AMY-ban is elkülöníthető egy „éhség”- ill. „jóllakottság” központ, tehát az AMY táplálékfelvételi magatartásban betöltött szerepe nem egységes. Kutyákban a centrális mag léziója hypophagiát és testtömeg csökkenést okoz, míg a BLA elpusztítása hyperphagiát és testtömeg növekedést eredményez. [77-79,81-83]. Mindemellett hangsúlyozni kell, hogy az AMY-nak módosító hatása van a HT éhséget- és jóllakottságot szabályozó folyamataira, tehát nem egyenértékű központokról van szó [95,133,184].

A korábbi vizsgálatok eredményeiből jól ismert azon komplex interakciók hálózata, mely a központi idegrendszer, ezen belül is a HT és a periféria között található, s a testtömeg-egyensúly szabályozását végzi. Jól ismert továbbá azon tény, miszerint az érzelmi hatások, változások, melyek a limbicus rendszer struktúráihoz kötöttek, befolyásolják a táplálékfelvételi magatartást. Az AMY- a limbicus rendszer részeként – főként az érzelmi állapot befolyásolása és tanulási folyamatok révén- fontos szerepet játszik a táplálékfelvételi magatartás létrejöttében. Korábban már számos neuropeptidről bebizonyosodott, úgymint az orexin A-ról, a neuromedin C-ről [75] és a GRP-ről [74,150], hogy a központi idegrendszeri hatásaik egy része az AMY-n keresztül valósul meg. Mindemellett immunhisztokémiai vizsgálatok ghrelin tartalmú neuronok végződéseit mutatták ki az AMY-ban [50].

Az AMY jelentős agyi terület a memória folyamatok szabályozásában is. Elsősorban a munkamémória fontos struktúrája. Részt vesz a külvilágból beérkező új információk feldolgozásában, szűrésében, kiemeli az egyedi, az egyén számára releváns ingereket [213]. Azaz a tanulás kezdeti szakaszában van fontos szerepe, és általában azt mondhatjuk, hogy nem vesz részt az emléknymok hosszútávú tárolásában. Lézióját követően az új dolgok megtanulása sérül [128]. Ezzel szemben egyes irodalmi adatok mégis arra utalnak, hogy az erős emocionális reakciókkal társuló, akár pozitív akár negatív élmények kiváltotta hosszútávú memória folyamatok kialakításában az AMY mégis csak szerepet vállal [20,36,86]. Az AMY eltávolítása ill. a BLA vagy az AMY centrális

magjának szelektív léziója rontja az averzív szituációkhoz kötött memória konszolidációt [5,92,123,166,194].

Továbbá, kísérleti adatok támasztják alá, hogy a memória folyamatok szabályozásában részt vevő intraamygdaloid idegsejthálózatok működésének modulálásában számos, a memória kialakulásával ill. retenciójával kapcsolatba hozható neurotranszmitter-neuropeptid rendszer vesz részt. Ilyenek például a cholinerg, noradrenerg, substance P vagy arginin-vasopressin rendszerek. Ezen anyagok intraamygdaloid infúziója módosítja a memória konszolidációt [69-71,141,155].

Végül, az AMY részt vesz a térbeli tanulási folyamatok szabályozásában is. Ez azonban úgy tűnik, hogy az amygdalo-hippocampalis összeköttetés épségéhez kötött. Ezen összeköttetés léziója esetén romlik a kísérleti állatok helytanulási képessége [2,3]. Ugyanakkor, ezen agyi területre injektált d-amfetamin [175] és corticosteroid [224] fokozza a memória retenciót térbeli tanulást vizsgáló magatartási paradigmákban.

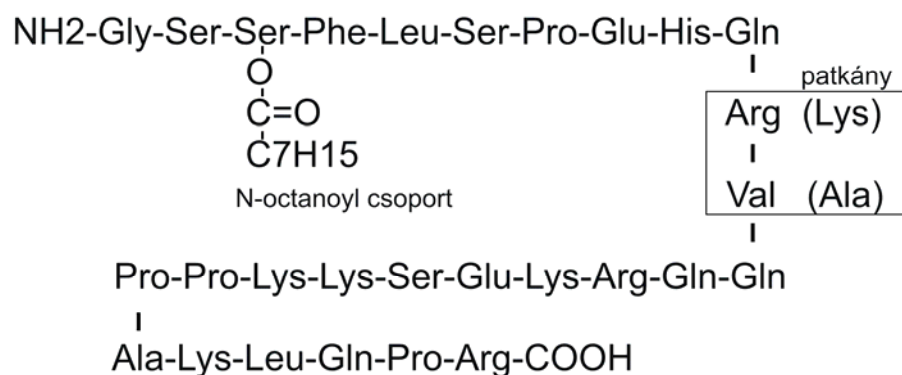
1.4. A ghrelin

1.4.1. A ghrelin felfedezése

Az 1970-es évek végétől kerültek a figyelem középpontjába azon szintetikus peptid analógok (growth hormone releasing peptide [GHRP]-6, GHRP-2, hexarelin), melyek adenohipophysis sejtenyészeten in vitro specifikusan fokozzák a növekedési hormon (GH) szekréciót. A korai humán adatok szerint ezen peptidek (pl. MK-0677) parenterális és per os adagolás során is jelentős GH-szekréciót fokozó hatással bírnak, így GH szekretagógnak (GHS) nevezték el őket [29,67,88]. Miután e molekulák hatásosnak bizonyultak, megindultak a hatás közvetítésében szerepet játszó receptorok azonosítására irányuló vizsgálatok. 1996-ban azonosítottak egy akkor még ismeretlen endogén liganddal rendelkező G-protein kapcsolt receptort, mely specifikusan kötötte e szintetikus molekulákat, ezért a GHS receptor (growth hormone secretagogue receptor [GHS-R]) nevet

kapta [108,217]. Ezt követően megindult a GHS-R endogén ligandjának felkutatása. Elsőként Kojima és munkatársai izolálták az endogén ligandot, melyet ghrelinnek (Ghr) neveztek el [130]. Az identifikálás során egy GHS-R-t expresszáló sejtvonalat alkalmaztak, melyet különféle szövetekből nyert extraktumokkal kezeltek, s melyben a specifikus kötődés jeleként a Ca^{2+} koncentráció változását monitorozták. Nem várt eredményként a legnagyobb intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változást a gyomorszöveti extraktum okozta, így elsőként a 28 aminosavból álló acylált ghrelint (A-Ghr) innen sikerült izolálni, HPLC módszer segítségével. Az A-Ghr-ben egy poszttranszlációs módosulás révén a harmadik pozícióban elhelyezkedő serin aminosavmaradékhoz egy nyolc szénatom hosszúságú zsírsavlánc kapcsolódik észter kötéssel [107] (1. ábra).

Ghrelin (humán):



1. ábra: Az acylált-ghrelin kémiai szerkezete

Ugyanekkor ezen procedúra során azonosították a másik fő formát, a desacyl-ghrelint (DA-Ghr), melyben az előbb említett észterkötés nincs jelen és amelyről korábban azt gondolták, hogy az A-Ghr inaktív bomlásterméke. Ma már tudjuk, hogy ez nem így van, ezen forma is számos élettani hatással rendelkezik, melyek részben megegyeznek részben pedig eltérnek az A-Ghr hatásaitól [46]. Ezenkívül több minor formát is felfedeztek, melyek az eredeti formához hasonlóan aktívak, úgymint az alternatív splicing eredményeként keletkező des-

Gln14-ghrelint, melyben a 14. pozícióban elhelyezkedő CAG kodon által kódolt glutamin hiányzik [106,107]. Továbbá léteznek olyan formák is, melyekben 10 vagy 11 szénatomlánc hosszúságú zsírsavcsoport kapcsolódik észter kötéssel, szintén a harmadik pozíciójú serin aminosavmaradékhoz. A Ghr jelentőségét konzervált alapstruktúrája is alátámasztja: a humán és a patkány forma között mindössze két aminosav eltérés van [130] (1.ábra). Az élőlényekben fellelhető összes Ghr mennyiséget (A-Ghr+DA-Ghr+minor formák) az irodalom totál Ghr-nek nevezi. A továbbiakban ezért a Ghr rövidítés alatt az emlősök szervezetében fellelhető Ghr minden kémiai formáját értjük.

1.4.2. A ghrelin szöveti megoszlása

A Ghr a gyomor fundus nyálkahártyában elhelyezkedő X/A típusú endokrin sejtekben található legnagyobb mennyiségben [58,68]. Kisebb mértékben ugyan, de a vékony- és a vastagbél területén is fellelhetőek Ghr-t termelő sejtek [58,105]. Mindez azt is jelenti, hogy a vérben keringő Ghr nagyobb hányada a gastrointestinalis traktusból származik. Ezt bizonyítja azon kísérlet is, mely során patkányokban a gyomor fundus eltávolítását követően 80 %-kal csökkent a Ghr mennyisége a keringésben. Humán tapasztalatok szerint gastrectomián átesett betegek szérum Ghr koncentrációja 70 %-kal csökkent, egészséges kontroll személyekhez viszonyítva [107,164]. Ugyanakkor a Ghr génje expresszálódik számos más szövetben is: immunhisztokémiai vizsgálatok Ghr tartalmú sejteket mutattak ki a HT internuclearis régiójában, mely a nucleus arcuatus (nARC), a VMH, a dorsomediális mag, valamint a PVN között helyezkedik el [50]. Ezen hypothalamicus területről a ghrelinerg sejtek több irányba is projiciálnak, úgymint a hypophysisbe, a hippocampusba, a nARC-ba, a cortexbe, valamint az AMY-ba is. Ezen kívül a Ghr megtalálható a tüdőben [266], a placentában [93], a vesékben [89,187], az immunrendszer [89] sejtjeiben, valamint a pancreasban [116] is.

1.4.3. A ghrelin hatásai

Mivel vizsgálatainkat az A-Ghr-rel végeztük, ezért elsősorban ezen kémiai forma hatásainak bemutatására szorítkozunk. Az eddigi irodalmi adatok alapján az A-Ghr több homeosztatisz folyamat szabályozásában is meghatározó szerepet tölt be, azonban a Ghr gén knockout egerek vizsgálata során a normál egyedekhez hasonlóan, szintén életképesnek bizonyultak, nem találtak eltérést sem testtömegükben, sem táplálékfelvételüket illetően [247,272]. Az A-Ghr alább ismertetett hatásainak létrejöttéhez esszenciális a harmadik pozícióban lévő acylcsoport jelenléte [11,12,23,33,59,130,237,249,274].

Az A-Ghr első felismert hatása GH szekréció fokozása volt, mely patkány adenohypophysis sejtenyészeten [130], in vivo patkányban [59,237], valamint humán [249] vizsgálatok során is dózisfüggően jelentkezett. Mind a hypophysis, mind a nARC GHRH termelő neuronjai tartalmaznak GHS receptorokat, a GH szekréció stimulálását eredményezve [59,130,274].

Elsőként Okada és munkatársai számoltak be a GHS-ek táplálékfelvételt növelő hatásáról intracerebroventriculáris (i.c.v.) GHRP analóg KP-102 mikroinjekciókat követően [201]. Az A-Ghr felefedezését követően, a táplálékfelvételi kísérletek során szintén a várt hatást eredményezte. Intravénás (i.v.), intraperitoneális (i.p.), valamint i.c.v. mikroinjekciója gyors, azonnal jelentkező táplálékfelvétel növekedést okoz [117,197,256,273], továbbá humán vizsgálatokban fokozza az éhségérzetet is, szerepet játszva ezzel az éhségérzet kialakításában. Preprandiálisan szekréciója megemelkedik, közvetlenül a következő étkezés előtt a legmagasabb, majd postprandiálisan lecsökken [54,257].

Ismételt i.c.v. injekciója növeli a testtömeget, mely elsősorban nem a lassan kialakuló GH hatásnak köszönhető, hanem az attól eltérő módon létrejövő táplálékfelvétel növekedésnek, az adipogenesis fokozódásának, valamint a zsírsav oxidációs folyamatok csökkenésének [117,197,256,273]. GH deficiens, úgynevezett törpe patkányokon végzett kísérletek is ezt támasztják alá: a subcutan krónikusan adagolt A-Ghr itt is fokozta a

táplálékfelvételt [256]. Az A-Ghr az első olyan neuropeptid, amely nem csak közvetlenül a központi idegrendszerbe injektálva fejt ki orexigén hatást, hanem - ellentétben a NPY-nal - ezen effektus perifériás adagolásakor is jelentkezik. A perifériás hatás kialakulhat egyrészt a n. vaguson keresztül [60,279], másrészt a keringésbe jutó A-Ghr eljuthat a nARC-ba. Ismert, hogy a nARC sejtjei által termelt NPY, ill. az úgynevezett agouti-related peptid (AgRP) erőteljes orexigén hatású, azaz táplálékfelvételt fokozó neuropeptid [76,188], melyek szekréciója A-Ghr mikroinjekciókat követően fokozódik. Ezen orexigén hatás patkányokban mind éheztetett, mind jóllakott állapotban dóziszfüggően jelentkezett. Immunhisztokémiai vizsgálatok Ghr tartalmú neuronok végződéseit mutatták ki a nARC NPY-t és AgRP-t tartalmazó idegsejtjein [50,117,197]. Továbbá mind a NPY, mind az AgRP ellenes antitestek felfüggesztették az A-Ghr által kiváltott orexigén hatás létrejöttét. Ezért feltételezhető, hogy az i.c.v. injektált A-Ghr táplálékfelvétel fokozó hatása a nARC NPY peptiderg rendszerén keresztül érvényesül. Nakazato és munkatársai anti-Ghr IgG antitestekkel is végeztek vizsgálatokat: dóziszfüggően csökkent az éhezés indukálta táplálékfelvétel mértéke patkányban [197]. Hasonló hatás érhető el a GHS-R antagonistá D-Lys3-GHRP-6 adásakor is. E peptid típusú antagonistával végzett 2 hetes kezeléssorozat után az obes ob/ob leptin deficiens egerekben csökkent a testsúly és euglycaemia alakult ki [13]. GHS-R megtalálható a nARC proopiomelanocortint termelő sejtjein is, melyeken keresztül a corticotropin szekréció csökkentése révén szintén nő a táplálék felvétel [50]. Azonban Saito és munkatársai épp ellentétes hatást észleltek neonatalis csirkéken végzett vizsgálataik során: i.c.v. A-Ghr injekciókat követően csökkent a táplálékfelvétel, mely a corticotropin releasing factor (CRF) antagonistá stressin előkezeléssel felfüggeszthető volt [228]. Humán vizsgálatok szerint igen szoros kapcsolat lehet a Ghr génjének polimorfizmusai, valamint az elhízás kialakulása között [219,258]. Táplálkozási zavarokkal küzdő betegekben a szérumban Ghr koncentrációjának változását figyelték meg. Anorexia nervosában magas Ghr szintek figyelhetők meg, mely megfelelő táplálás, valamint a testsúly visszanyerése során csökken [10,56,210], míg Prader-Willi szindrómában alacsonyabb szérumban Ghr koncentráció értékek jellemzőek [53,64].

A Ghr patho-etiológiai szerepe körvonalazódik a diabetes mellitus (DM) mindkét fő típusának hátterében is. Fiziológiásan negatív korreláció figyelhető meg a plazma Ghr és

inzulin koncentrációk között, valamint a Ghr plazmakoncentrációja és a 2-es típusú DM prevalenciája között [34,220]. Ugyanakkor a Ghr glukóz metabolizmusra ill. inzulin szekrécióra kifejtett hatásait vizsgáló kutatások eredményei ellentmondásosak. A legtöbbjük a Ghr inzulin szekrécióra kifejtett gátlását figyelte meg [32,34], de vannak tanulmányok melyek ezzel ellentétes eredményt találtak [61,147]. Mint azt korábban említettük a Ghr szekréció az éhezés, ill. étkezési szünetek ideje alatt fokozott, míg étkezést követően plazmakoncentrációja csökken. Azonban az 1-es típusú DM-ban a Ghr plazmakoncentrációjának változása a táplálkozás hatására elmarad, a DM diagnózisakor a mérhető Ghr koncentráció szignifikánsan alacsonyabb. A normál negatív korreláció a Ghr és a vércukorszint között csak az inzulin terápia megkezdését követően figyelhető meg [101,242]. A 2-es típusú DM-ban a Ghr alacsony plazmaszintje az elhízással és az inzulinrezisztenciával társul [220]. Bár nem világos, hogy az alacsony Ghr koncentráció oka, rizikó tényezője-e a betegségnek vagy az elhízás okozta kompenzatorikus válasz-folyamat-e [122].

Mivel az A-Ghr legnagyobb mennyiségben a gastrointestinalis rendszerben termelődik, ezáltal rendelkezik itt érvényesülő hatásokkal is, melyek azonban nem kizárólag helyi, közvetlen hatás eredményeképp jönnek létre. I.v. injekcióját követően a gyomorban dóziszfüggően nő mind a gyomorsav szekréció, mind a gastrointestinalis motilitás [15,58,172], azaz potens prokinetikus hatással bír [255]. Ezen hatások vagotomiával, vagy a n. vagus atropinos, ill. kapszaicines kezelésével megszüntethetők [172]. Ugyanakkor ezen effektus lokálisan is létrejöhet, ugyanis GHS-R jelen van a gyomor-bél traktus plexus myentericusában is [170]. Humán vizsgálatok alapján a gyomorürülési idő igen jól korrelál a keringésben mérhető Ghr koncentrációjával [27].

Ismertek a Ghr szív- és érrendszerre kifejtett hatásai is: humán vizsgálatok során egészséges önkéntesekben i.v. bólusban adagolt A-Ghr a vérnyomás és az artériás középnyomás csökkenését eredményezte [192,193], mely hatás az NTS aktiválódásaképp, a n. vagus útján jön létre [167,173].

Bár immunhisztokémiai vizsgálatok ghrelinerg sejtek végződéseit mutatták ki a limbikus rendszer több területén: a hippocampusban, az AMY-ban, a HT-ban, sőt a cortexben is, jelezve ezzel, hogy a Ghr részt vesz más magatartási folyamatok

szabályozásában is, ezidáig a Ghr ezirányú hatásait kevésbé vizsgálták [50]. I.c.v. A-Ghr mikroinjekciók szorongást és memória retentiót idéztek elő [40]. A Ghr memória retenciót fokozó hatása szelektív serotonoin visszavétel gátló (selective serotonin reuptake inhibitor=SSRI) fluoxetine előkezeléssel csökkenthető volt [38]. Továbbá Diano és munkatársai azt igazolták, hogy a keringő Ghr a vér-agy gáton keresztül a hippocampusba jutva, fokozza az ott lévő neuronok dendritikus tüskéin kialakuló szinapszisok számát és a memória folyamatok háttérében meghúzódó „long-term” potenciáció generálását. A Ghr kiváltotta szinaptikus változásokkal párhuzamosan a tértanulás és a memória javulását is megfigyelték. A Ghr génjének célzott „kiütése” a hippocampus CA1 régiójában csökkentette a szinapszisok számát és rontotta a kísérleti állatok teljesítményét a memória tesztekben. Ezen hatás Ghr adásával gyorsan visszafordíthatónak bizonyult [66].

1.4.4. A ghrelin receptorai

A GHS-R a G-protein kapcsolt receptorok családjába tartozó, a sejtek membránjában elhelyezkedő fehérje. Eddig két különböző formáját sikerült cDNS tár segítségével azonosítani, az 1a altípust (GHS-R1a) és az 1b altípust (GHS-R1b) [108]. A GHS-R1a 7 transzmembrán doménnel rendelkező „klasszikus” Gq protein kötő receptor, melyen keresztül a ligand kötődése az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedését okozza. A GHS-R1b típus ugyanazon gén terméke, alternatív splicing eredményeként jön létre és 5 transzmembrán doménnel rendelkezik, jelenleg kevés ismerettel rendelkezünk élettani funkciójáról.

1.4.4.1. GHS-R1a altípus az A-Ghr-t kötő receptor

In situ hibridizációs technikával vizsgálták a GHS-R1a mRNS expresszáldását a központi idegrendszerben. A receptor nagy mennyiségben található meg a HT magjaiban: a nARC-ban, a nucleus suprachiasmaticusban, és a VMH-ban, valamint a tuberomammillaris magban [94,108,197]. Az expresszió megfigyelhető még az adenohypophysisben, a VTA-

ban és a NTS-ban is. Természetesen a periférás szövetek is expresszálják a GHS-R1a-t: jelen van a gyomor-bél traktus neuroendokrin sejtjeiben, a mellékvesékben, a pajzsmirigyben, a pancreasban és a myocardiumban is [89,94,131].

A GHS-R1a igen szoros rokonságban áll más, szintén a brain-gut peptidek családjába tartozó fehérjék receptorával. Ezen peptidek receptorait együttesen „ghrelin receptor szuper-családnak” hívjuk.

A legnagyobb hasonlóság a motilin receptorával, a GPR38 receptorral mutatkozik, továbbá a két peptid is tartalmaz egymással homológ szakaszokat [73,176]. Humán vizsgálatokban a két receptor aminosav sorrendje 52%-os homológiát mutatott egymással [15,65]. A GPR38 receptor nagy mennyiségben található meg a gastrointestinális rendszer elemein kívül a pajzsmirigyben, a csontvelőben és különböző központi idegrendszeri struktúrákban mint pl az AMY-ban is [113,169]. A GPR38 receptor motilin kötése az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedését okozza hasonlóan a GHS-R1a és A-Ghr kapcsolathoz. A motilin képes a GHS-R1a aktiválására, azonban jelenlegi ismereteink szerint az A-Ghr nem kapcsolódik a motilin receptorához.

A receptorcsalád következő tagja a GPR39 receptor, melynek struktúrája szintén nagyfokú hasonlóságot mutat a GHS-R1a-val [176]. Azonban a receptor Zn^{2+} -al történő aktiválása intracelluláris cAMP koncentráció emelkedést okoz [102]. McKee és munkatársai a GPR39 receptor expresszióját detektálták számos perifériás szövetben és központi idegrendszeri területen, így az AMY-ban is [176]. Ugyanakkor a nagyfokú homológia ellenére a pontos kapcsolat a ghrelin-rendszer és a GPR39 receptor között ma még nem ismert. Hasonlóan nem ismert a GPR39 receptor endogén ligandja sem, bár az elmúlt időben megjelent eredmények szerint az obestatin kapcsolódhat ezen receptorhoz, tovább árnyalva a képet. Ugyanis az obestatin a Ghr génben kódolt, alternatív splicing útján létrejövő peptid, mely hatásaiban ellentétesnek bizonyult az A-Ghr hatásaival [278]. Ezzel szemben Lauwers és munkatársai cáfolják az obestatin- GPR39 receptor kapcsolat lehetőségét [144].

A neuromedin U két receptora az NMU-R1 és az NMU-R2 kb. 30%-os homológiát mutat a GHS-R1a-val [30]. NMU-R1 elsősorban a periférián, míg az NMU-R2 a központi idegrendszerben található. Egyik receptor jelenléte sem egyértelmű az AMY-ban, de maga

a Neuromedin U kétség kívül nagy mennyiségben van jelen ezen agyi területen és i.c.v. injekciója ellentétes hatást közvetít mint az A-Ghr [30]. Mindkét receptor ligandkötése az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedésével jár [30]. További figyelemre méltó adat, hogy a neuromedin U a neuromedin receptorok hiányában képes volt aktiválni a GHS-R1b és neurotensin 1 receptor alkotta heterodimer-receptort [248].

A receptor család eddig ismert tagjai közül az utolsó a neurotensin 1 (NT-R1) és 2 (NT-R2) receptorok. Az NT-R1 aktiválódása képes mind az intracelluláris Ca^{2+} , mind pedig a cAMP szint emelésére [265]. Ezzel szemben az NT-R2 intracelluláris másodlagos hírvívője a Ca^{2+} [231]. A GHS-R1a-hoz hasonlóan a NT-R2 esetében is azonosítottak egy alternatív splicing során létrejövő 5 transzmembrán doménnal rendelkező variánst, melynek szerepe jelenleg tisztázatlan [214]. Hasonlóan a „család” eddigi tagjaihoz a neurotensin receptorok megtalálhatók a perifériás szövetekben és a központi idegrendszerben is. Mindkét típusa fellelhető az AMY-ban [265]. A nagyfokú hasonlóság és a hasonló jelátviteli utak ellenére ezidáig az egyetlen tény a ghrelin-rendszer és a neurotensin receptorok közti élettani kapcsolatra a korábban már említésre került GHS-R1b és NT-R1 heterodimerizáció.

A korábban már említett, acyl csoporttal nem rendelkező DA-Ghr nem lép kölcsönhatásba a GHS-R1a altípussal, ellenben kötődik a CRF 2-es típusú receptorához. A DA-Ghr jelen irodalmi adatok szerint részben CRF 2 receptoron keresztül fejt ki az acylált formával ellentétes hatásait, nevezetesen csökkenti a táplálékfelvételt és lassítja a gastrointestinalis motilitást. Az A-Ghr nem lép kölcsönhatásba a CRF 2 receptorral [46]. Összességében azonban megállapíthatjuk, hogy további kutatást igényel mind az acylált, mind a des-acylált forma receptorainak pontos megismerése. Mindemellett a két forma egyaránt gátolja a proliferációt H9c2 cardiomyocytá sejttenyészetben, mely azonban nem expresszálja a GHS-R1a altípust, így a hatás létrejöttében más, eddig ismeretlen GHS-R altípus jelenlétét feltételezik [17].

1.4.4.2. GHS-R1b altípus funkcionális szerepe

Ahogy azt korábban említettük a GHS-R1a alternatív splicing útján létrejövő variánsa a GHS-R1b. Öt transzmembrán doménból áll, melyek megegyeznek a a GHS-

R1a első 5 transzmembrán doménjával. Ezért „megcsonkított”(truncated) receptornak hívjuk. A GHS-R1b-vel transzfektált sejtek nem kötik az A-Ghr-t ill. az egyéb GH secretagóg anyagokat [240]. Ezért korábban funkcionálisan inaktív receptornak tartották. Azonban, mivel számos GHS-R1a-t is expresszáló ill. azt nem expresszáló szövetben azonosították [89] valószínűnek tűnik, hogy ezen receptor altípus is biológiai szereppel bír. Chu és munkatársai HEK-203 sejtenyészeten végzett vizsgálataikban azt találták, hogy a GHS-R1b represszálta a konstitutívan aktív GHS-R1a túlzott expresszióját [47]. Azaz a GHS-R1b mintegy módosította, modulálta a GHS-R1a funkcióját. Takahashi és munkatársai által felismert GHS-R1b és NT-R1 heterodimerizáció [248] felhívja a figyelmet arra, hogy az 1b altípus képes heterodimer képzésére más, teljes értékű G protein kötő receptorokkal, melyek így módon olyan ligandok megkötésére képesek melyre az előtt képtelenek voltak, ill. az újonnan létrejövő receptor heterodimer az eredetitől eltérő jelátviteli utakat indukálhat, erősítve az elképzelést ami szerint az 1b altípus más receptorok működésének módosításán keresztül fejt ki hatását.

2. Célkitűzések

Korábbi kísérletek alapján megállapították, hogy az A-Ghr i.c.v. és az LH-ba adott injekciója patkányban fokozza a táplálékfelvételt, facilitálja a memória folyamatokat, valamint immunhisztokémiai vizsgálatok szerint fokozza a c-fos aktivitást az AMY-ban [202,203]. Az eddigi vizsgálatok zöme csekély és kétes értékű információt nyújt az AMY-ba injektált A-Ghr hatásairól. Az irodalomban nem találtunk adatot arra, hogy a AMY-ba mikroinjektált A-Ghr miként befolyásolja az táplálékfelvételi magatartást és a memória folyamatokat, s hogy ebben milyen receptorok involváltak. Kísérleteinkben az AMY egy jól körülhatárolható magcsoportjára, a BLA-ra fókuszáltunk, mivel ezen intraamygdaloid szubrégió bizonyítottan fontos szerepet játszik mind az éhség motíválta magatartás, mind pedig a memória kialakulás és memória retenció központi idegrendszeri folyamataiban (lsd. külön fejezet).

Mindezekért:

1) vizsgáltuk a BLA-ba injektált A-Ghr táplálékfelvételre gyakorolt hatását ad libitum táplált patkányokban.

a) tanulmányoztuk, hogy a táplálékfelvételre gyakorolt hatás specifikus antagonistá előkezeléssel kivédhető e?

b) vizsgáltuk, hogy a 24 órás éheztetés milyen hatással van az A-Ghr kiváltotta táplálékfelvétel-változásra.

c) összehasonlítottuk a BLA-ba mikroinjektált DA-Ghr és a BLA-ba adott A-Ghr táplálékfelvételre gyakorolt hatását.

d) megvizsgáltuk az i.c.v. injektált A-Ghr táplálékfelvételt befolyásoló hatását.

2) vizsgáltuk a BLA-ba injektált A-Ghr akut hatását az éhség-motíválta magatartás kialakulásával kapcsolatba hozható metabolikus paraméterekre: vércukorszintre, szérum

inzulin-, leptin-, össz-koleszterin-, HDL koleszterin-, triglicerid-, össz-fehérje-, és húgysav koncentrációkra.

3) vizsgáltuk a BLA-ba injektált A-Ghr patkányok spontán motoros aktivitására és szorongásra kifejtett hatását. Előbbit open field tesztben, utóbbit emelt keresztpalló tesztben tanulmányozva.

4) vizsgáltuk a BLA-ba injektált A-Ghr memória kialakulásra, rögzülésre, tanulásra kifejtett hatását passzív elhárító szituációban és térbeli tanulást vizsgáló paradigmában.

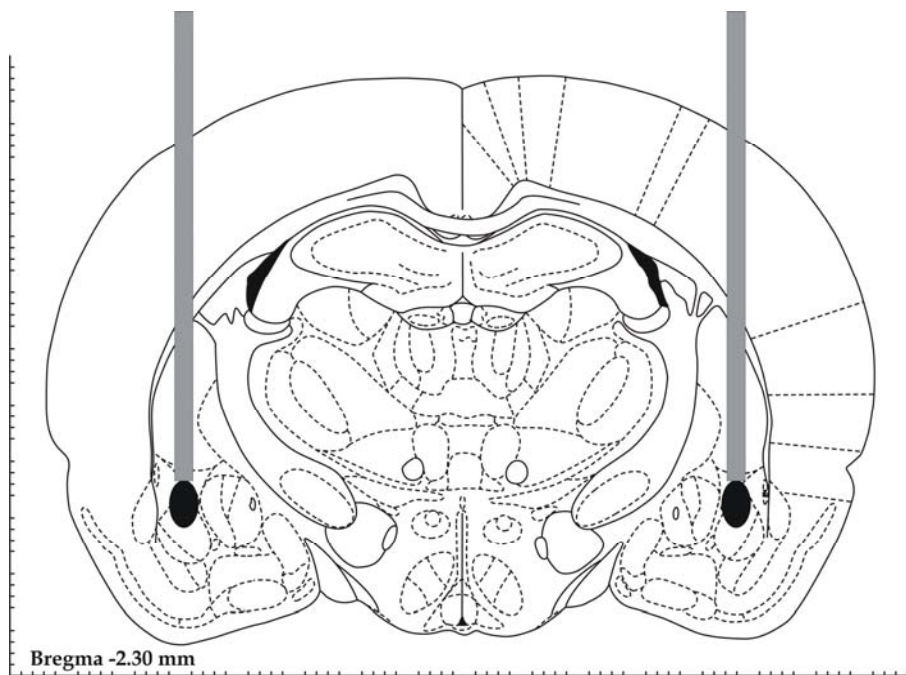
3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinket 280-320 g testtömegű hím Wistar patkányokon végeztük (LATI, Gödöllő). Az állatokat klímatiszál állatházban (22°C), külön ketrecekben helyeztük el. A természetes napszaknak megfelelően 12 óra sötét és 12 óra világos periódust biztosítottunk. A világos periódus reggel 7 órától indult. Víz korlátlanul állt az állatok rendelkezésére, szilárd táp (CRLT/N egységes rágcsálótáp, Charles River Kft., Budapest) azonban csak a kísérlet menetének megfelelően volt elérhető számukra. Az állatok tartásánál és a kísérletek során végig az állatetikai kódex szabályait betartva jártunk el (Pécsi Tudományegyetem ill. European Union Council Directive 86/609/EEC).

3.2. Műtétek

A műtéteket altatásban végeztük. Ehhez Calypsol (ketaminum 80 mg/testtömeg kg) és Seduxen (diazepam 20mg/ testtömeg kg) (Richter Gedeon Rt., Budapest) 4:1 arányú keverékét használtuk, melyet i.p. alkalmaztunk. Sztereotaxikus technikával végzett műtét során fém vezetőkanülöket vezetünk be a BLA fölé, ill. a laterális agykamrákba, a kanülök átmérője 22 gauge (0,7 mm) volt és belső vége a célzott struktúra felett 0,5 mm-rel helyezkedett el (2.ábra). A célzott terület koordinátáit Paxinos és Watson atlasza szerint választottuk meg: BLA: AP: a bregmától -2,3 , ML: 4,8, DV: 6,1 mm a durától számítva. Az i.c.v. mikroinjekciók esetében: AP: a bregmától -1,0 , ML: 1,5, DV: 3 mm a durától számítva. [212].



2. ábra: Patkány agyszelet sematikus képe Paxinos és Watson sztereotaxikus atlasza alapján. A vezető kanülök és a mikroinjekció sematikus ábrázolása.

Ezt követően a vezetőkanülöket az állat koponyaacsontjához rögzítettük rozsdamentes csavarok és fogászati acrylat (Duracryl, Dental, Csehország) segítségével. Végül 27 gague (0,4 mm) átmérőjű dugókkal zártuk le a vezetőkanülök külső végét, megakadályozva ezzel az eltömődésüket. Ezek vége éppen a vezetőkanülök végéig ért. A műtéteket megelőzően és azokat követően is naponta mértük az állatok testtömegét, valamint táplálék- és vízfogyasztásukat.

3.3. A kísérletek menete

Kísérleteinket a műtét utáni felépülési időszakot követően a 7. napon kezdtük meg. Ezen idő alatt az állatok visszanyerték a műtét előtti súlyukat. A táplálékfelvétel szabályozással kapcsolatos kísérletek során a mérési periódus alatt szilárd táp nem állt rendelkezésükre, vízhez azonban korlátlanul hozzájuthattak. Kísérleteink a táplálékfelvétel és vércukorszint mérési vizsgálatok során önkontrollosak voltak, ami azt jelenti, hogy a kísérlet napján a random módon kiválasztott állatcsoport egyikét A-Ghr-rel, a másikat vehiculummal, az A-Ghr vivőanyagával kezeltük, majd a következő kísérleti napon felcseréltük a kezeléseket. Az önkontrollos kísérleti elrendezés választásának több oka is volt. Egyrészt nem állatok rendelkezésre adatok a hatékony dózistartományról, mely így módon szükségessé tette több dózis alkalmazását. A többfajta, eltérő koncentráció sok mikroinjekciót jelent. Egyetlen állat esetében a direkt agyi mikroinjekciók száma maximum kettő lehet, amit az agyállomány különösebb (funkcionális) zavar nélkül „elvisel”. Így módon több dózis használata, a szükséges mikroinjekciók száma egyben nagy állatszámot is jelent. Így, egy más kísérleti elrendezés esetén az eltérő dózisu A-Ghr mikroinjekciós kezelésben részesülő állatcsoportok viszonylag rövid időn belüli (egyidőben) történő injekciózása lehetetlen vállalkozás lett volna. A technikai problémák kiküszöbölésén kívül választásunknak egy sokkal gyakorlatiasabb oka is volt. Nevezetesen az, hogy a táplálékfelvétel mértéke nagy variabilitást mutat patkányról patkányra (hasonlóan az emberhez). Ezt az állatszám növelésével (több tucat csoportonként) lehetett volna megoldani, de ez felvetette volna a korábban említett technikai problémát.

A további metabolikus paraméterek mérése során valamint a memória retenciótanulást vizsgáló kísérleteinkben a klasszikus latin négyzet elrendezést alkalmaztuk, azaz az állatokat random módon csoportokba osztottuk és minden csoport más-más kezelésben részesült a kísérlet menetének megfelelően. Két mikroinjekciót minimum két vizsgálatmentes nap választott el.

3.4. Anyagok, mikroinjekciók

A BLA-ban végzett kísérletekhez A-Ghr-t (1465, Tocris) 25, 50, 100, 250 és 500 ng (7,42; 14,83; 30,16; 74,16 és 148,32 pmol), GHS-R antagonistá [D-Lys³]-GHRP-6-ot (ANT) (1922, Tocris) 15 és 30 ng (14,83 ill. 32,25 pmol) és DA-Ghr-t (2260, Tocris) 25, 50 és 100 ng (7,71; 15,41 és 30,82 pmol) dózisban használtunk. Az anyagokat 0,15 M-os steril NaCl-ben oldottuk. A mikroinjekciók térfogata 0,4 µl volt. Kontrollként a vehiculum (0,15 M steril NaCl) hasonló térfogatú (0,4 µl) injekcióját alkalmaztuk. Az előbb említett dózisok agyféltekénként értendőek. Mivel beadásaink minden esetben kétoldaliak voltak az össz-dózisok a fent említett dózisok kétszeresei voltak. A továbbiakban mind a dolgozat szöveges részében mind pedig az ábrákon az egyoldali dózisokat szerepeltetjük.

Közvetlenül a kísérletet megelőzően a dugókat eltávolítottuk, helyükre 30 gauge (0,4 mm) külső átmérőjű injektort vezettünk, mely 0,5 mm-rel túlnyúlt a vezetőkanülön. Az injektort 20 cm-es polietilén csővel 10 µl-es Hamilton fecskendőhöz csatlakoztattuk. A Hamilton fecskendőt pedig Cole-Parmer automata minipumpával (IITC Inc. Life Sciences Instruments, 200-as modell) működtettük (3.ábra). A táplálkozási kísérletek keretén belül végzett i.c.v. A-Ghr mikroinjekciók esetén a dózisok a következők voltak: 500 ng (148,32 pmol) és 1000 ng (296,64 pmol), az oldatok elkészítése és beadása hasonló módon történt, míg az injekciók térfogata 1 µl volt.

A mikroinjekció időtartama 1 perc volt, ezt követően újabb 1 percet vártunk, majd eltávolítottuk az injektort és dugóval zártuk a kanüloket. Az ANT előkezelések minden esetben 15 perccel előzték meg az A-Ghr mikroinjekciókat, az ANT-ot szintén bilaterálisan a BLA-ba injektáltuk.



3.ábra: A mikroinjekcióhoz használt automata pumpa „működés közben”.

3.5. Táplálékfelvétel mérés

Ad libitum táplált állatokkal végzett kísérletek során a patkányok a kísérlet teljes ideje alatt szabadon fogyaszthattak táplálékot, míg a 24 órát éheztetett állatokkal végzett kísérletek során a mikroinjekciókat megelőző 24 órában és a mérési periódusok ideje alatt a táplálékot megvontuk. A neofóbia elkerülése végett, 14 nappal a kísérletek előtt az állatokat folyékony táp felvételre, tejivásra (136,45 kJ/100 ml, Milk Quick, Berettyóújfalu) szoktattuk, melyhez egy kalibrált milliliteres beosztású tubusból juthattak. Azon állatokat, melyeknél nem alakult ki stabil fogyasztás, kizártuk a kísérletből. Ezen táplálkozási paradigma előnye, hogy biztosítható az azonos ízű és energiatartalmú táplálék minden kísérleti állat esetében, továbbá lehetővé teszi, hogy az állatok megzavarása nélkül, akár 5 perces időintervallumokban leolvasható legyen az aktuális fogyasztás [75,254]. Első héten

délelőtt 9 órától délután 2 óráig kapták az állatok a tejet, hogy hozzászokjanak, s a neofóbia megszűnjön. A műtéteket megelőző 7 napon keresztül, mint később a kísérletek folyamán végig, már csak napi egy órán keresztül állt rendelkezésükre folyékony táp. Vizsgálataink során ml-ben mértük az akut táplálékfelvételt, az injekciókat követő első fél órában 5 percenként, majd a 40., 50., 60. percben. A mérés után az állatok újra ad libitum szilárd táphoz, valamint folyadékhoz juthattak.

3.6. Vércukorszint mérési vizsgálatok

A vércukorszint mérési vizsgálatokat, hasonlóan a táplálékfelvétel mérési kísérletekhez, a patkányok saját ketrecében végeztük és ezek a kísérletek is önkontrollosak voltak. A vércukorszintet ad libitum táplált patkányok farokvénájából vett vérmintából határoztuk meg vércukor mérő elektróda (Glucometer Elite 2000, Bayer) segítségével. A farokvéna megsliccelését követő első vércseppet letöröltük, majd a második vércseppből történt a mérés. Mindösszesen 3 µl vér elegendőnek bizonyult egyetlen méréshez, melyet az elektróda saját kapillaritásánál fogva szívott fel. Az intraamygdaláris mikroinjekciókat megelőzően 10 perccel valamint azt követően 10, 20, 30, 50, 70, 90 és 120 perccel történt mintavételezés. A kísérlet ideje alatt az állatoknak nem állt rendelkezésére sem szilárd sem pedig folyékony táp. Vizet azonban szabadon fogyaszthattak.

3.7. Egyéb metabolikus paraméterek mérése

Ad libitum táplált patkányok vérszérumában mértük az össz-koleszterin, HDL koleszterin, triglicerid, húgysav és össz-fehérje koncentrációt ARKRAY, SPOTCHEM EZSP 4430 (Arkray Technology, Japán) készülék segítségével. Mértük továbbá a szérum inzulin és leptin szintet előre érzékenyített inzulin ill. leptin ELISA kittel (ALPCO Diagnostics, Amerikai Egyesült Államok). A méréshez szükséges mintákat törzsvéresztetéssel nyertük: 20 perccel a kétoldali BLA injekciókat követően (a

táplálékfelvételi kísérleteinkben tapasztalt hatás kezdetének időpontja) az állatokat guillotine-al lefejeztük, a vért kémcsövekbe felfogtuk, vigyázva a minta mechanikai és kémiai sértetlenségére. Az így gyűjtött vért +4 °C-on 1000 fordulat/ perccel 20 percen keresztül centrifugáltuk, majd a felülúszót (szérum) pipettával leszívtuk és a minta további feldolgozásáig -20 °C-on fagyasztottuk. A konkrét mérések során a szérum mintákból 100 µl-t az analizáló automatába pipettáztunk, mely tesztsíkok segítségével specifikus enzimikus reakciót követő fotometrálassal határozta meg az általunk vizsgált anyagok koncentrációit. Az ELISA mérések során az ELISA-lemezek gyártója által előírt lépéseket követtük és a lemezekhez mellékelt gyári oldatokat használtuk.

3.8. Magatartási tesztek

3.8.1. Open field teszt

Tíz perccel a kétoldali intraamygdaloid injekciókat követően a patkányokat egy 60x60x60 cm-es dobozba helyeztük. A doboz alját festett vonalakkal 16 egyenlő méretű négyzetre osztottuk. Öt percen keresztül figyeltük és a doboz fölé erősített videokamerával rögzítettük az állatok viselkedését. Mértük a megtett távolságot és a keresztezések számát. Eredményink analízisét egy speciális számítógépes program, a Noldus cég EthoVision Basic (NEVB) (Noldus Information Technology b.v., Wageningen, The Netherlands) nevű programjának segítségével végeztük. Ez a program követi és digitálisan rögzíti az állat mozgását az általunk kijelölt területen, on-line és off-line analízisre is lehetőséget ad.

3.8.2. Emelt keresztpalló teszt (Elevated plus-maze)

A kísérleti berendezés 2 -2 egymással szemben elhelyezkedő nyitott (50x12 cm) és zárt (50x12x40 cm) karból állt, melyek 1 méterrel a talaj fölött helyezkedtek el. 40 W-os piros fényű (patkány számára nem látható, a videófelvételt mégis lehetővé tévő

megvilágítás) égővel világítottuk meg. Tíz perccel az A-Ghr BLA injekcióját követően a kísérleti állatot az apparátus közepére helyeztük, orral az egyik zárt kar irányába. Ezt követően 5 percig figyeltük és videóra 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. Az értékelés NEVB programmal történt.

3.8.3. Passzív elhárító teszt

Kísérleteinket 2 kompartmentes passzív elhárító apparátusban végeztük. A kísérleti berendezés egy nagyobb (60x60x60 cm), jól megvilágított (100 W-os izzó) és egy kisebb (15x15x15 cm) fedett, sötét dobozból állt, melyeket egy guillotine ajtóval zárható nyílás kötött össze. A kisebb doboz aljára sokkoló rácsot építettünk. Vizsgálataink során a kísérleti állatokat a jól megvilágított doboz közepére helyeztük és mértük azt az időt ami a sötét dobozba való belépésükig telt el (latencia idő). A megfigyelés maximum 3 percig (180 s) tartott. Az első napi *habituáció* során az állatok szabadon mozoghattak az apparátusban. A *kondicionálás* során, amikor az állatok a sötét dobozba léptek a guillotine ajtót bezártuk és elektromos áramütést kaptak (sokk). A kondicionálást gyenge sokkal (0,4 mA) háromszor 1 s-ig végeztük. Az A-Ghr-t a sokk után, a patkányokat a dobozból kivéve injektáltuk a BLA-ba. A kondicionálás után 24 órával, valamint 1 héttel később végeztünk teszteket (Teszt 1, 2), melyek során a sötét (sokkoló) dobozba lépés latencia idejét mértük. Az állatok viselkedését az apparátus fölé helyezett videokamera segítségével rögzítettük. Eredményeink analízisét itt is az NEVB program segítségével végeztük.

3.8.4. Morris féle úsztatási teszt (Morris water maze)

Kísérleteinkhez egy 150 cm átmérőjű, 60 cm magas, kör alakú medencét használtunk, melyet vízzel töltöttünk meg. A vizet színtelen, szagtalan ételfestékkel

festettük meg, hogy azon átlátni ne lehessen. A medence körül jól látható, a tájékozódást segítő tárgyakat helyeztünk el (külső cue). A medencét virtuálisan 4 negyedre osztottuk. Az egyikben (célkvadráns) egy 10x10 cm alapterületű platformot helyeztünk el úgy, hogy annak felszíne a víz szintje alatt 1 cm-el helyezkedjen el (ne legyen látható). Az állatok a medence fala mellől úsztak a fix helyzetű platformra, a starthely ülésenként változott. A patkányok addig maradtak a medencében amíg a platformot meg nem találták. Amelyik állatnak ez 3 perc (180 s) alatt nem sikerült, azt a kísérletvezető helyezte a platformra. Másodperces pontossággal mértük a *céltalálási időt* (mennyi idő alatt találják meg az állatok a platformot). Első nap kétszer úsztak az állatok, majd ezután történtek a mikroinjekciók a BLA-ba. Második nap (kb. 24 óra elteltével) az állatok újra kétszer 3 percig úszhattak mely során ismét a céltalálási időt mértük. Az állatok viselkedését hasonlóan a passzív elhárító tesztnél leírtakhoz, videókamerával rögzítettük és a NEVB programmal értékeltük.

3.9. Adatok kiértékelése

3.9.1. Szövettan

A kísérletek végeztével i.p. urethan (20%) oldattal az állatokat elaltattuk, és először fiziológiás sóoldattal, majd 10%-os formaldehid oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Az eltávolított és fixált agyakból mikrotommal 40 μ m vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket krezil ibolyával festettük meg. Az értékelés fénymikroszkóppal történt, Paxinos és Watson-féle sztereotaxikus atlasz segítségével rekonstruáltuk a kanülok valós helyét [212]. Az eredmények kiértékelése során kizártuk azon állatokat a kísérletből, melyek esetében a kanülok helyzetét nem megfelelő pozícióban találtuk.

3.9.2. Statisztikai kiértékelés

A táplálékfelvétel és vércukorszint mérési vizsgálatok során nyert adatok kiértékeléséhez dózisonként két utas variancia analízist (ANOVA, SPSS Windows 15.0) alkalmaztunk. Mivel ezen kísérleteink önkontrollosak voltak (Isd. 3.3 kísérletek menete fejezet) melyek során az A-Ghr ill. DA-Ghr különböző dózisait, valamint antagonistával kombinált kezeléseket is alkalmaztunk, a kísérletek menete és az állatcsoportok nagy száma miatt az összes dózistartományt együtt kezelő ANOVA-t követően, post hoc tesztekkel nem értékelhettük adatainkat. Mindezt ahol a variancia analízis a kezelés és/vagy a kezelés-idő interakció szignifikáns voltát mutatta, párosított t-próbával hasonlítottuk össze egyes időpontokban ugyanazon állatcsoport eltérő kezeléseket követően nyert adatait. További vizsgálataink esetében a kísérleti elrendezés nem önkontrollos volt, így azok során az eltérő kezeléseken részesült állatcsoportok eredményeinek statisztikai értékelésére egy utas variancia analízist (ANOVA, GraphPad InStat for Windows 3.0) alkalmaztunk melyet követően Student-Newman-Keuls féle többszörös összehasonlító (Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons) post hoc tesztet végeztünk. A szignifikancia szintet minden esetben $p < 0,05$ -nek tekintettük, a szignifikáns értékeket a grafikonokon csillaggal és kettős kereszttel jelöltük.

3.9.3. Az adatok ábrázolása

A táplálékfelvétel és vércukorszint mérési kísérletek során nyert adatok ábrázolása kumulatív diagrammokkal történt. Az ábrákon feltüntetett kontroll értékeknek ugyanazon állatcsoport vehiculum utáni fogyasztását tekintettük. Az ábrázolt értékek minden esetben a kísérletben részt vevő, a szövettani kiértékelést követően „megmaradt” n számú állatnál mért értékek átlagai. A vízszintes tengelyen a táplálékfelvétel ill. vércukorszint mérés időpontjait percben, a függőleges tengelyen a fogyasztott táp mennyiségét ml-ben jelöltük,

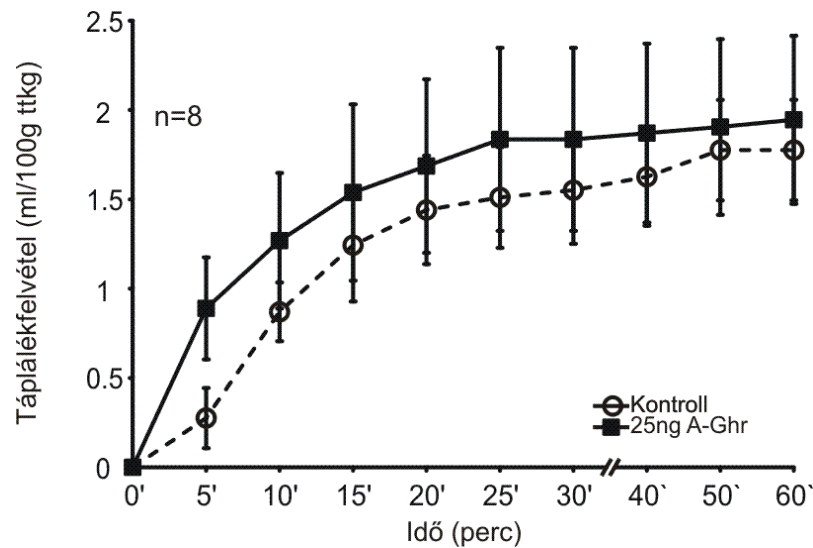
a kísérleti állatok testtömegének 100 grammjára számítva adtuk meg. A vércukorszintet mmol/l-ben fejeztük ki. A további kísérletekben az ábrázolást oszlopdiagrammokkal végeztük. A különböző kezelésben részesült állatcsoportokat különböző oszlopok jelölik. A függőleges tengelyen a mért paramétert, a vízszintes tengelyen a kísérlet metodikájának megfelelő fázist tüntettük fel. Minden ábrán feltüntettük a mérés hibájával korrigált szórást is (átlag \pm S.E.M.).

4. Eredmények

4.1. Táplálékfelvétel mérési vizsgálatok

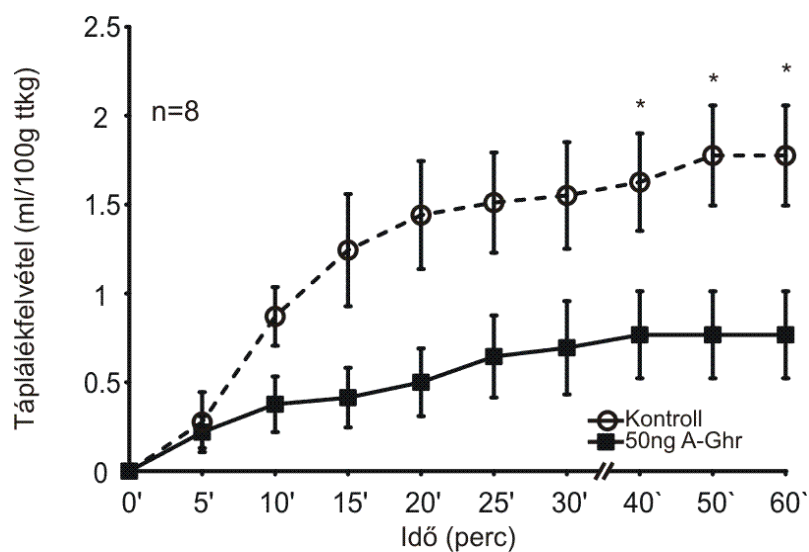
4.1.1. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása a folyékony táplálékfelvételre ad libitum táplált állatokban

Kísérleteink során vehiculum, ill. 25, 50, 100, 250 és 500 ng A-Ghr vezetőkanülön keresztül történő BLA mikroinjekciókat követően 60 percen keresztül mértük a tejfelvételt. 25 ng (7,42 pmol) A-Ghr 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: $F[8,56]=21,110$, $p<0,0001$, kezelés hatása: $F[1,7]=0,428$, $p>0,534$, idő x kezelés: $F[8,56]=0,525$, $p>0,833$, 4. ábra).



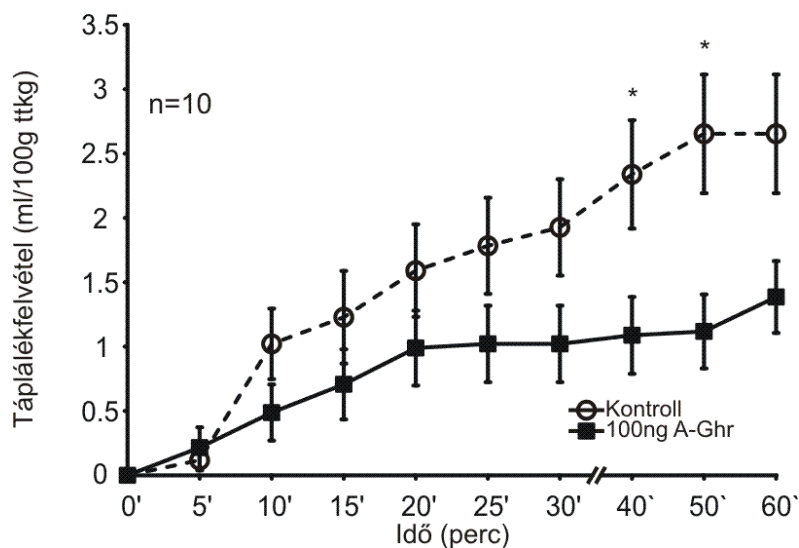
4.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 25 ng A-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az A-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

Megfigyeléseink szerint az 50 ng (14,83 pmol) A-Ghr injekciója szignifikáns táplálékfelvétel csökkenést okozott. ANOVA analízis alapján az idő és a kezelések közti interakció szignifikáns (idő hatása: $F[8,56]=18,442$, $p<0,0001$, kezelés hatása: $F[1,7]=6,714$, $p<0,036$, idő x kezelés: $F[8,56]=2,322$, $p<0,032$) volt. A párosított t-próba eredménye alapján a mérés 40. percétől a mérés végéig tartó szignifikáns táplálékfelvétel redukciónak a kontroll kezelés hatásához képest ($n=8$, $p=0,0195-0,046$, 5. ábra).



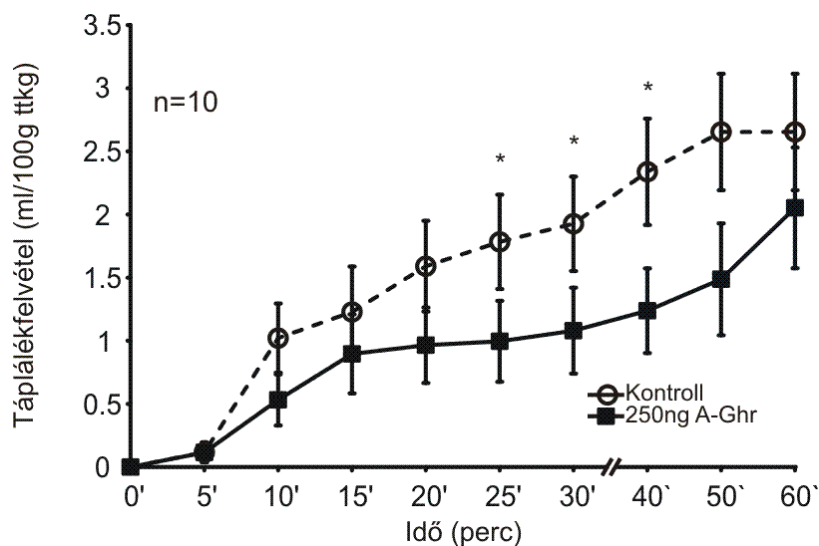
5.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 50 ng A-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris mikroinjekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az A-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik. A csillagok a szignifikancia szintet jelzik: $p<0,05$.

A 100 ng (30,16 pmol) A-Ghr mikroinjekció hasonló hatást eredményezett (ANOVA: idő: $F[8,72]=36,534$, $p<0,0001$, kezelés: $F[1,9]=5,165$, $p<0,049$, idő x kezelés interakció: $F[8,72]=7,453$, $p<0,0001$). Párosított t-próba alapján a 100 ng A-Ghr a 40. és az 50. percben szignifikáns táplálékfelvétel csökkenést idézett elő ($n=10$, $p=0,0119-0,0197$, 6. ábra).



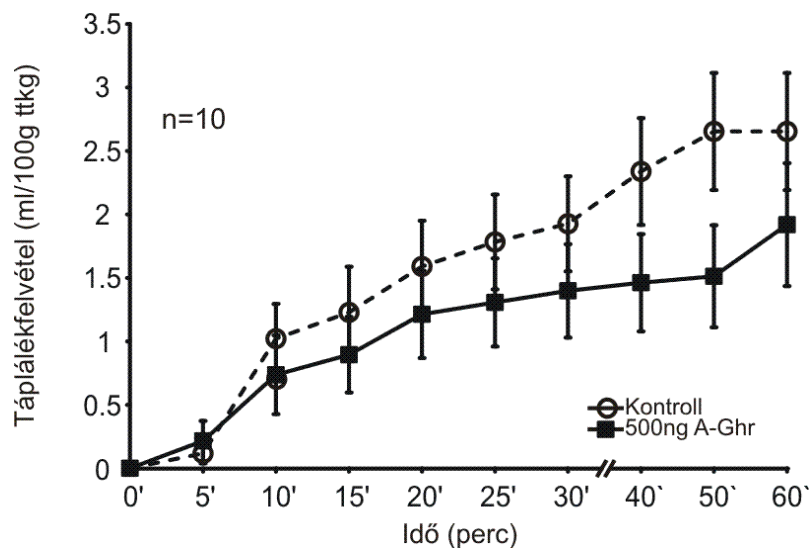
6.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 100 ng A-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az A-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik. A csillagok a szignifikancia szintet jelzik: $p<0,05$.

A 250 ng (74,16 pmol) A-Ghr mikroinfúzióját követően elvégzett variancia analízis az idő ($F[8,72]=29,811$, $p<0,0001$) és az idő x kezelés interakció ($F[8,72]=2,601$, $p<0,015$) szignifikáns hatását mutatta a táplálékfelvételre, míg a kezelés önmaga ($F[1,9]=3,700$, $p=0,087$) nem okozott szignifikáns változást a tejfelvételben. A párosított t-próba azonban azt mutatta, hogy a kontroll kezelésben részesült patkányok szignifikánsan többet ettek a megfigyelés 25., 30. és 40. percében A-Ghr kezelésben részesült társaikhoz viszonyítva ($n=10$, $p=0,029-0,0442$, 7. ábra).



7.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 250 ng A-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az A-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik. A csillagok a szignifikancia szintet jelzik: $p<0,05$.

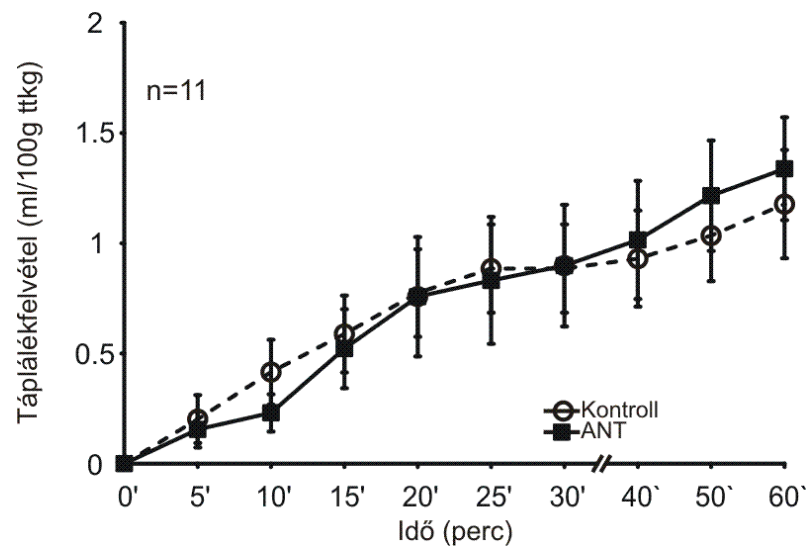
Az 500 ng A-Ghr alkalmazását követően elvégzett ANOVA az idő és az idő-kezelés összefüggésében szignifikáns, míg a kezelés esetében nem szignifikáns hatást mutatott. Az ezt követő párosított t-próbával nem találtunk szignifikáns hatást az eltérő kezelést kapott csoportok között egyetlen időpontban sem (n=10, idő hatása: $F[8,72]=44,741$, $p<0,0001$, kezelés hatása: $F[1,9]=1,241$, $p=0,294$, idő x kezelés: $F[8,72]=2,367$, $p=0,025$, 8.ábra).



8.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 500 ng A-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az A-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

4.1.2. GHS-R antagonist D-Lys3-GHRP-6 mikroinjekcióinak hatása a táplálékfelvételre ad libitum táplált állatokban

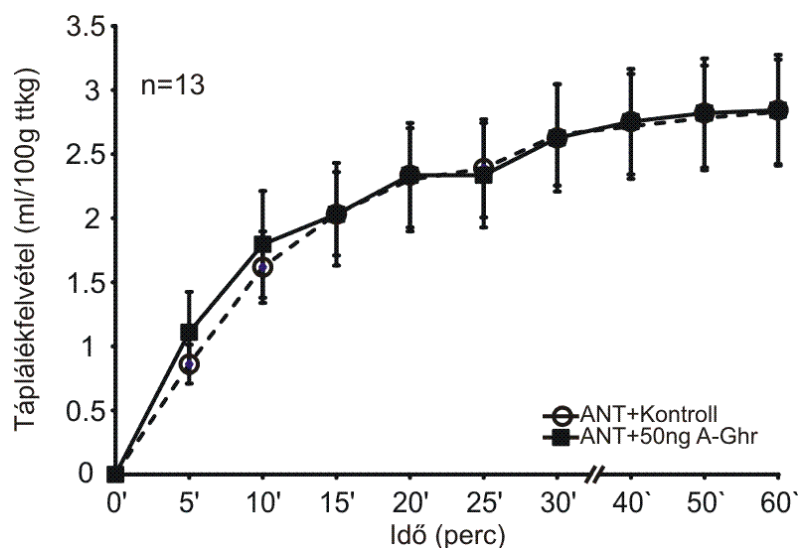
Az A-Ghr okozta anorexigén hatás szubsztrátspecifikusságáról ANT kezeléssel győződünk meg. Elsőként vizsgáltuk 30 ng ANT bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatását. Eredményeink szerint az ANT önmagában alkalmazva nem befolyásolja a táplálékfelvételt (9. ábra).



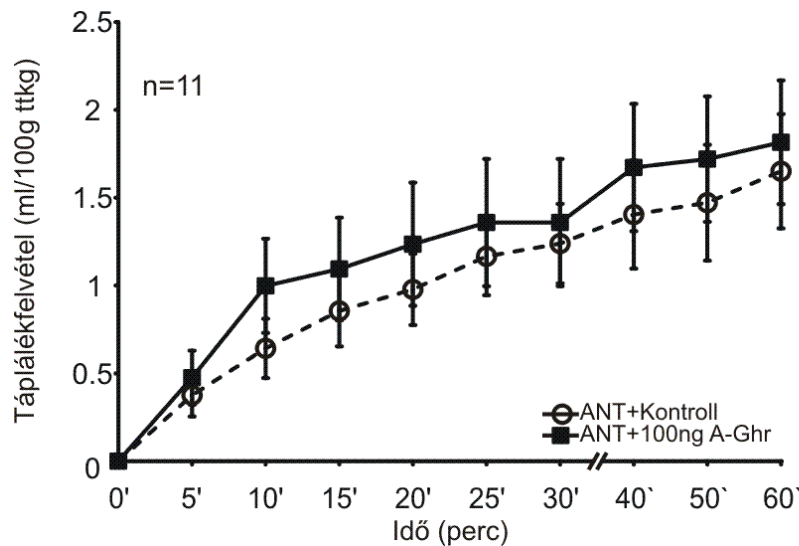
9.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 30 ng ANT vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig a ANT kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

Miután meggyőződünk arról, hogy az ANT mikroinjekció nem okoz változást a kontroll kezeléshez viszonyítva, kombinált kezeléseket kezdtünk. Irodalmi adatok és saját megfigyelések szerint a 15 perces időintervallum, melyet az ANT és az A-Ghr mikroinjekció között hagyunk, elegendő a receptorokhoz való kötődéshez, s az antagonist hatásának kialakulásához.

Vizsgálataink során a korábbi vizsgálatainkban leghatékonyabbnak bizonyult 50 ill. 100 ng (14,83 ill 30,16 pmol) A-Ghr dózissal ekvimoláris, tehát azonos moláris mennyiségű ANT (15 és 30 ng) előkezelés hatását vizsgáltuk. Az ANT előkezelés mindkét esetben kivédte az A-Ghr táplálékfelvétel csökkentő hatását (10. és 11. ábra).



10.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 15 ng ANT + 50 ng A-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az ANT+50 ng A-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

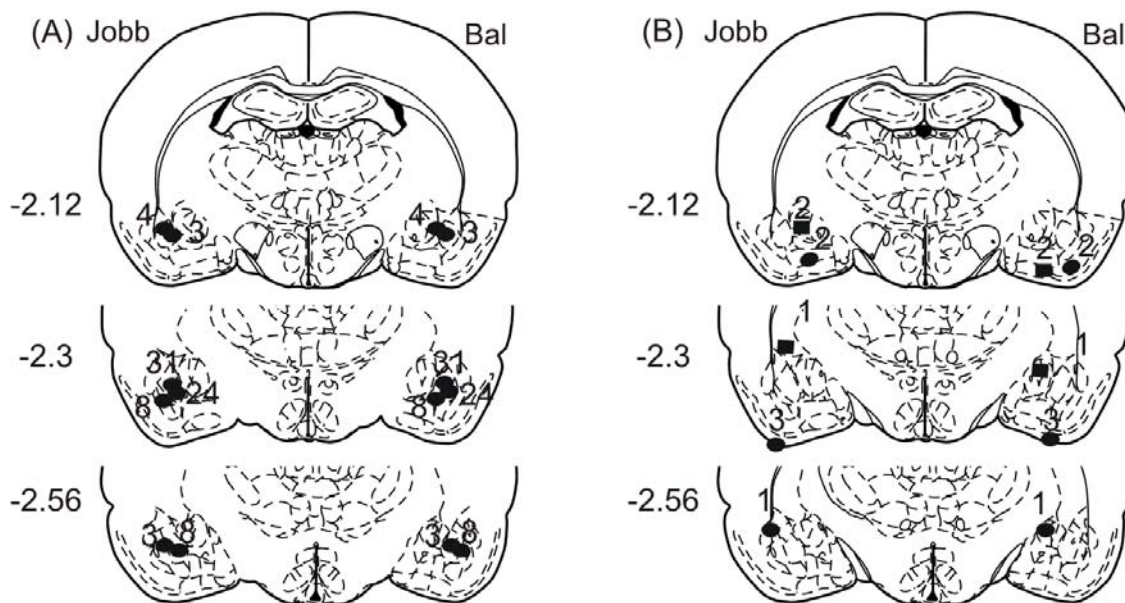


11.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 30 ng ANT + 100 ng A-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az ANT+100 ng A-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

Kísérleteink alapján feltételezhetjük, hogy az A-Ghr hatása az AMY-n belül specifikus, mivel ANT előkezeléssel felfüggeszthető volt.

Az ad libitum táplált állatokkal végzett kísérleteinket követő szövettani feldolgozás során azt tapasztaltuk, hogy a megoperált 90 állatból 9 esetben a kanülök nem a BLA-ban végződtek. Ezen állatok eredményeit a statisztikai értékelésből kizártuk. A kilenc esetből három esetben a kanülök az agyalon szimmetrikusan a liquortérben végződtek. A további hat esetben a kanülök elhelyezkedése aszimmetrikus volt: a bal oldalon a piriform kéregben, az anterior corticalis amygdaloid magban és a centrális amygdaloid magban végződtek; míg jobb oldalon az amygdala centrális magjában, a basomediális amygdaloid magban, a caudatum-putamen régióban és a dorsalis endopiriform magban végződtek. A helyes és a „hibás” pozíciókban történt mikroinjekciók helyeit a 12. ábrán mutatjuk be. A „hibás” mikroinjekciók során egyik esetben sem tapasztaltunk változást a táplálékfelvételben. Mivel a további kísérletekben is hasonlóan jártunk el, nevezetesen a nem megfelelő pozícióban történt mikroinjekciók esetén nyert adatokat nem vettük figyelembe a statisztikai értékelésnél és az itt bemutatott helyes beadási területek

megfelelnek a következő kísérletekben tapasztalt helyes beadási területeknek (kivéve természetesen az i.c.v. injekciókat), így a továbbiakban eltekintünk a részletes szövettani analízis eredményeinek bemutatásától.

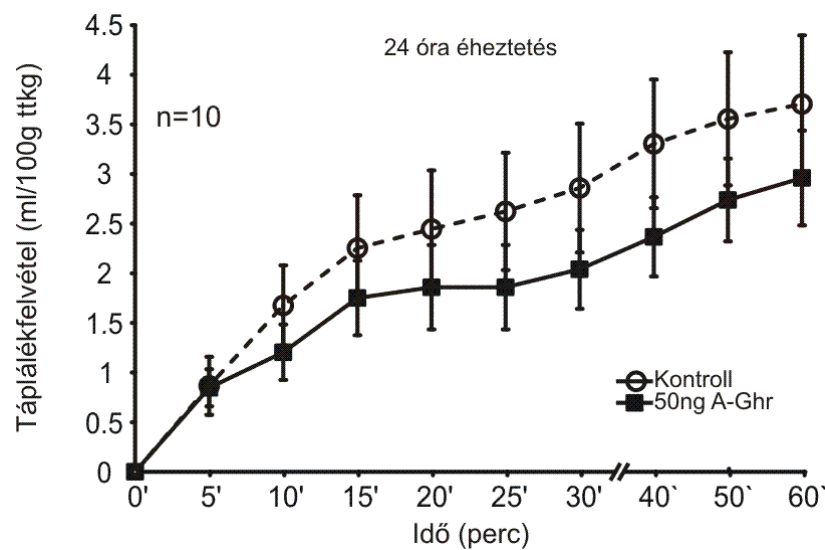


12.ábra: A helyes (A, n=81) és a „hibás” (B, n=9) mikroinjekciók helyeinek sematikus ábrázolása a részletes szövettani analízis eredménye alapján. A számok a diagrammon a bregmától mért anterior-posterior távolságot mutatják mm-ben Paxinos és Watson sztereotaxikus atlaszának megfelelően. Az azonos szimbólumok a (B) ábrán a kanül párokat jelölik. A szimbólumok melletti számok jelentik az állatok számát.

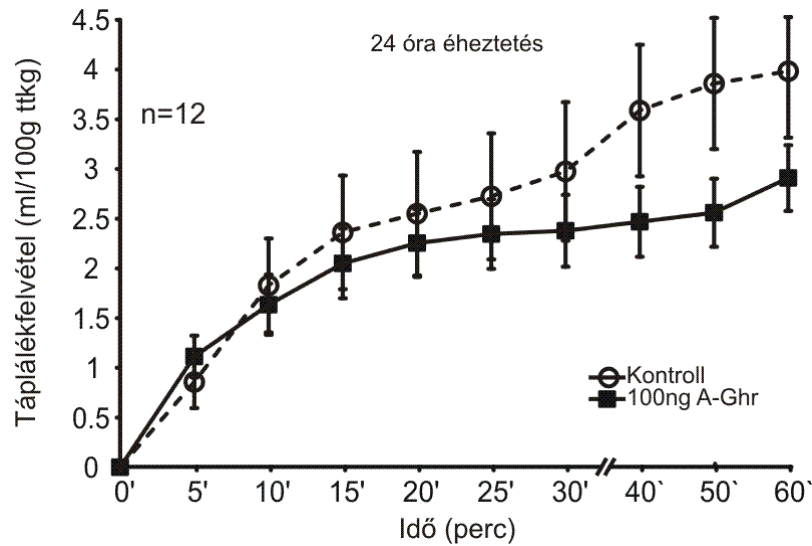
4.1.3. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása a folyékony táplálékfelvételre éheztetett patkányon

Ezt követően megvizsgáltuk, vajon az 50 vagy a 100 ng A-Ghr bilaterális mikroinjekciója befolyásolja-e az előzőleg 24 órát éheztetett állatok táplálékfelvételét is, hiszen esetükben az éhezés egy külön motivációs drive-ot jelent. Az 50 ng A-Ghr

mikroinjekció nem okozott szignifikáns változást (n=10, ANOVA n.s.). A 100 ng A-Ghr kezelést követő ANOVA az idő és az idő-kezelés összefüggésében szignifikáns eltérést mutatott (n=12, idő hatása: $F[8,88]=56,419$, $p<0,0001$, kezelés hatása: $F[1,11]=0,670$, $p=0,431$, idő x kezelés: $F[8,88]=3,141$, $p<0,004$). Az ezt követő párosított t-próba azonban egyetlen mérési időpontban sem igazolta az A-Ghr táplálékfelvétel csökkentő hatását. Eredményeink szerint tehát egyik dózis sem okozott szignifikáns változást a kontroll kezeléshez képest (13. és 14. ábra).



13.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 24 órás éhezést követően 50 ng A-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az A-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

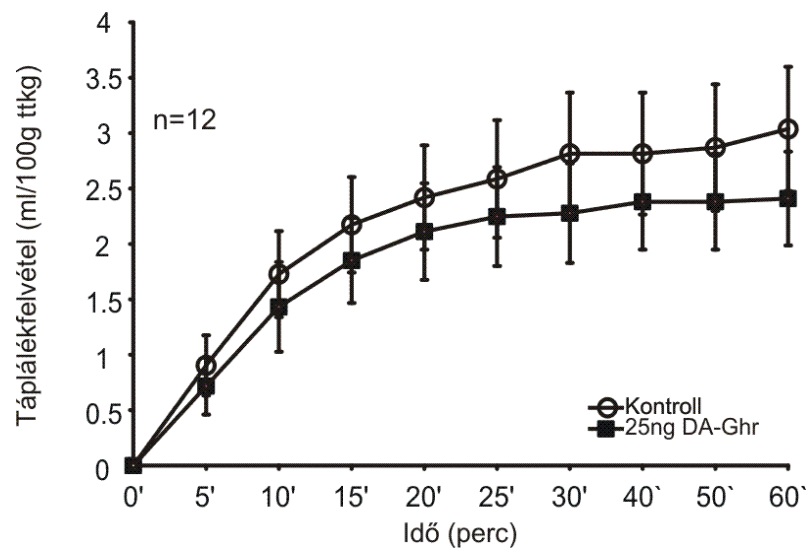


14.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 24 órás éheztetést követően 100 ng A-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az A-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

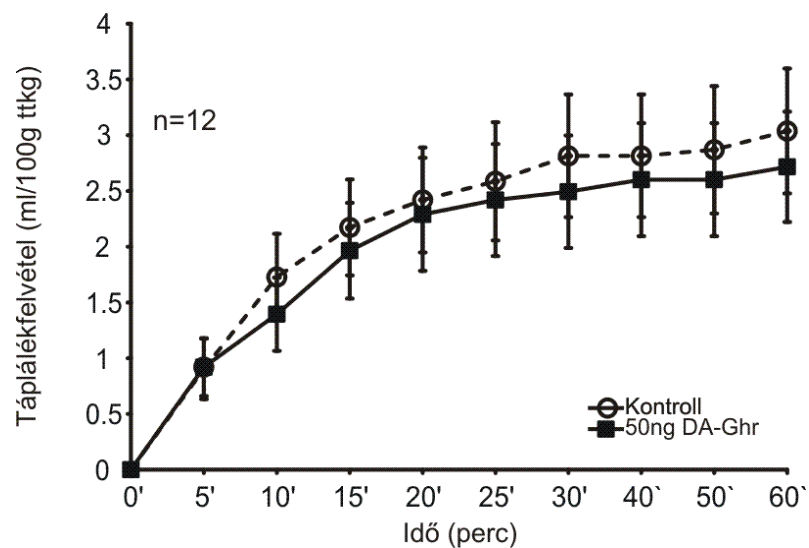
4.1.4. A DA-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása a folyékony táplálékfelvételre ad libitum táplált állatokban

Kísérleteinkben A-Ghr-t használtunk, ezért fontos kiemelni, hogy az A-Ghr-ben lévő posztranszlációs módosulás külső behatásokra igen érzékeny. Hosoda vizsgálatai szerint [104] az A-Ghr-t tartalmazó minta több ciklusban történő lefagyasztása és felolvasztása minden egyes ciklus után szignifikánsan csökkentette a mintában mérhető A-Ghr mennyiségét, míg a DA-Ghr mennyisége nőtt. Az agyszövet gazdag nem specifikus észterázokban, melyek az A-Ghr-t is képesek deacyláció útján DA-Ghr-né bontani, így felmerülhet a kérdés, hogy az általunk tapasztalt hatás nem az A-Ghr deacylációja révén kialakuló DA-Ghr-nek tulajdonítható-e. Ezért külön kísérletben megvizsgáltuk 25 ng, 50 ng és 100 ng DA-Ghr bilaterális BLA mikroinjekciójának hatását a táplálékfelvételre. Ezen dózisok összevethetőek az A-Ghr-el végzett kísérleteinkben használt dózissal. Az

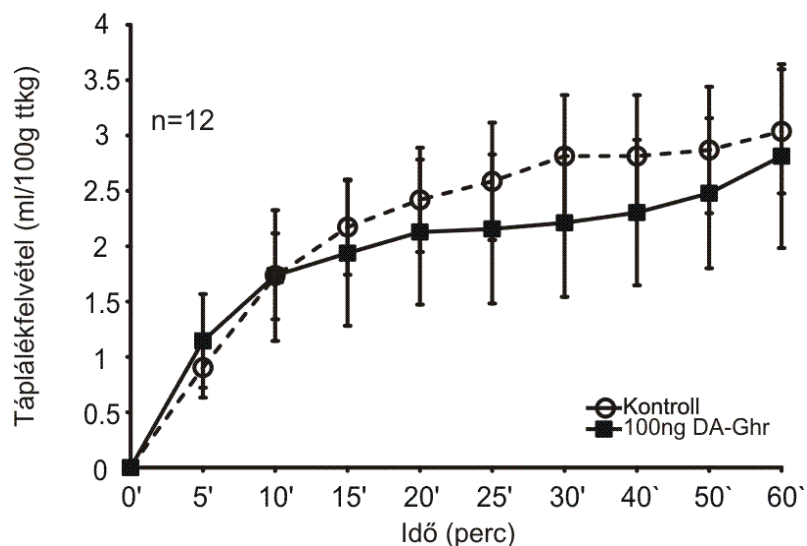
elvégzett variancia analízis egyik dózis esetében sem mutatott szignifikáns változást sem a kezelés, sem pedig a kezelés-idő interakció vonatkozásában (15-17. ábra).



15.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 25 ng DA-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az DA-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.



16.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 50 ng DA-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az DA-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

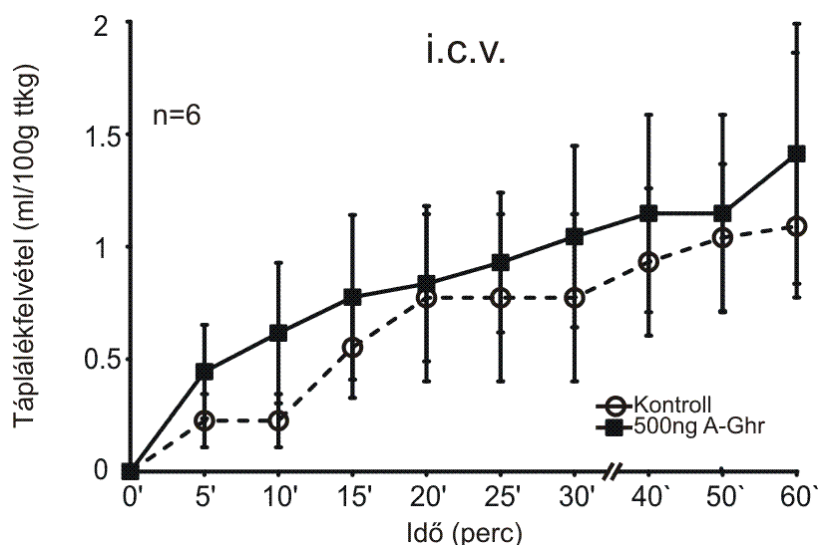


17.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 100 ng DA-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az DA-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

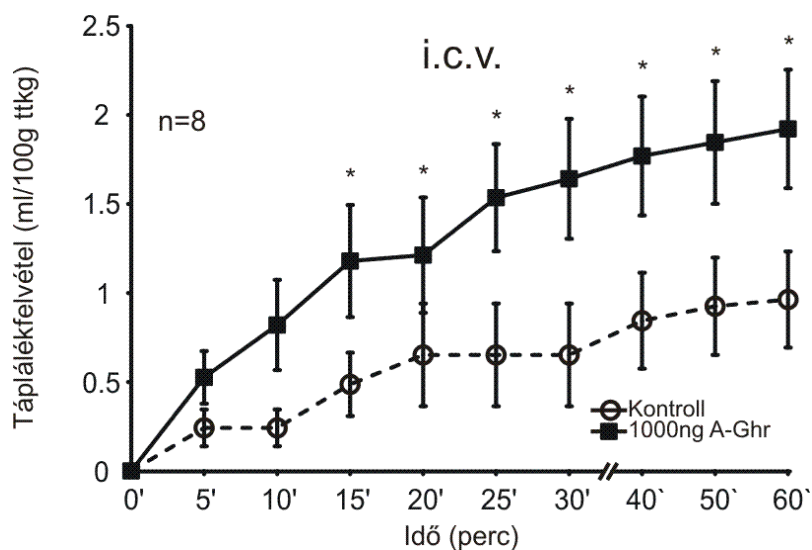
4.1.5. Intracerebroventriculáris A-Ghr injekciók hatása a táplálékfelvételre

Az eddig ismert irodalmi adatok egy része ellentétes az általunk kapott eredményekkel. Ugyanis korábbi vizsgálatokban az i.c.v. injektált A-Ghr táplálékfelvétel növekedést okozott szilárd táp használata esetén [117,197,256,273]. Mindezért indokoltnak láttuk megvizsgálni, hogy az általunk az előző kísérletekben használt ugyanazon mintából származó A-Ghr miként hat a folyékony táplálékfelvételre i.c.v. alkalmazás után. Ehhez a laterális agykamrák dorsalis részébe beültetett kanülökön keresztül 500 ill. 1000 ng A-Ghr-t mikroinjektáltunk bilaterálisan, majd ezt követően mértük a tejfelvételt. Az 500 ng A-Ghr injekciója nem okozott változást a tejfelvételben. ANOVA teszt alapján az 1000 ng A-Ghr

esetén az idő hatása szignifikáns volt ($F:[8,56]=11,646$, $p<0,0001$), valamint a kezelés és ($F[1,7]=9,347$, $p<0,018$) az idő x kezelés interakció ($F[8,56]=2,449$, $p<0,024$) is szignifikáns különbséget mutatott. Az ezt követő párosított t-próba szerint az 1000 ng-os dózis a 15. perctől a mérés végéig tartó szignifikáns táplálékfelvétel növekedést okozott ($n=8$, $p=0,009-0,038$; 18. és 19. ábra).



18.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 500 ng A-Ghr vagy vehiculum i.c.v. injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az A-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

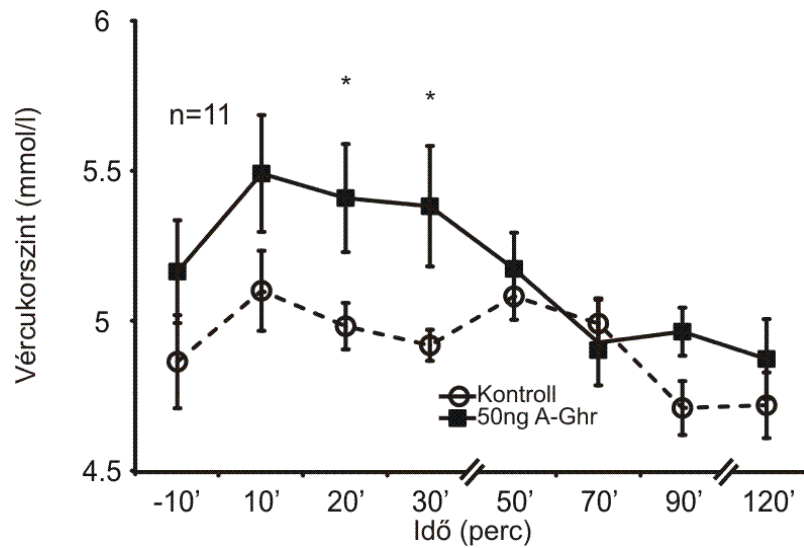


19.ábra: A folyékony táplálékfelvétel változása 1000 ng A-Ghr vagy vehiculum i.c.v. injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az A-Ghr kezeléseket követő táplálékfelvétel átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik. A csillagok a szignifikancia szintet jelzik: $p < 0,05$.

4.2. Metabolikus paraméterek mérése

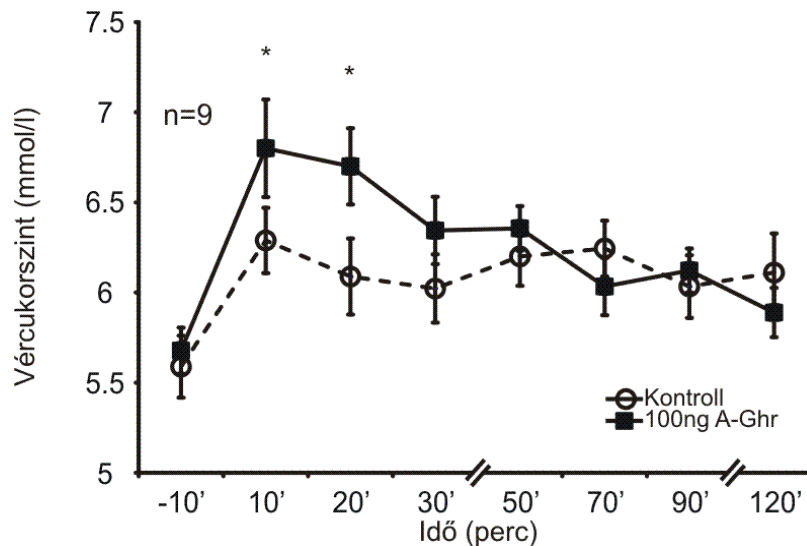
4.2.1. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása a vércukorszintre ad libitum táplált állatokban

Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy az intraamygdaloid A-Ghr hatással van-e a szérum glukóz szintre. Mivel a táplálékfelvétel mérési vizsgálatainkban az éheztetés elfedte az A-Ghr táplálékfelvétel csökkentő hatását, ezért ezen kísérleteket ad libitum táplált állatokon végeztük. A kísérleti procedúra miatt ezen vizsgálatokban nem volt lehetőségünk folyékony táplálékfelvétel mérésére, így a kísérletek ideje alatt táplálék nem állt a patkányok rendelkezésére. Vizet azonban korlátlanul fogyaszthattak. Kísérleteink során vehiculum, ill. a táplálékfelvétel mérési vizsgálatainkban hatékonynak bizonyult 50 és 100 ng A-Ghr vezetőkanülön keresztül történő BLA mikroinjekciókat megelőzően 10 perccel valamint azokat követően 120 percen keresztül mértük a vércukorszintet. Mindkét dózis esetén külön elemeztük a mikroinjekciókat megelőzően mért (-10 perc) vércukorszinteket párosított t-próbával, hogy igazoljuk a kiindulási vércukorszintekben nincs különbség a kontroll ill. az A-Ghr kezelésben részesülő állatok között (50 ng: $p > 0,29$, n.s.; 100 ng: $p > 0,66$, n.s.). Az 50 ng A-Ghr mikroinjekciót követően az ANOVA analízis szignifikáns eltérést mutatott az idő és a kezelés esetében ($n=11$, idő hatása: $F[7,70]=3,713$, $p < 0,002$, kezelés hatása: $F[1,10]=5,111$, $p < 0,047$, idő x kezelés: $F[7,70]=1,204$, $p > 0,312$). Az ezt követő párosított t-próba az A-Ghr vércukorszint emelő hatását igazolta a 20. és a 30. percben (20.ábra, $p=0,03-0,046$).



20.ábra: A vércukorszint változása 50 ng A-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az A-Ghr kezeléseket követő vércukorszint átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik. A csillagok a szignifikancia szintet jelzik: $p < 0,05$.

Megfigyeléseink szerint az 100 ng A-Ghr injekciója szintén szignifikánsan megemelte a vércukorszintet. ANOVA analízis során az idő és az idő-kezelések közti interakció szignifikánsnak mutatkozott (idő hatása: $F[7,56]=6,322$, $p < 0,0001$, kezelés hatása: $F[1,8]=2,979$, $p > 0,123$, idő x kezelés: $F[7,56]=3,593$, $p < 0,003$). A párosított t-próba eredménye alapján a mikroinjekció a 10. és a 20. percben szignifikáns vércukorszint emelkedést okozott a kontroll kezelés hatásához képest ($n=9$, $p=0,011-0,015$, 21. ábra).

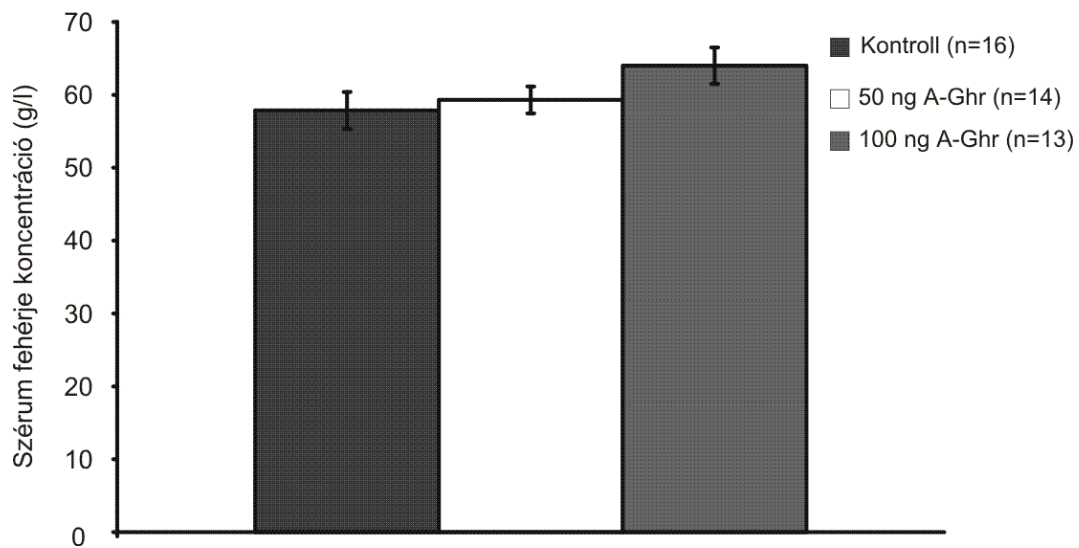


21.ábra: A vércukorszint változása 100 ng A-Ghr vagy vehiculum intraamygdaláris injekciója után. Az üres körök a kontroll-, a fekete négyzetek pedig az A-Ghr kezeléseket követő vércukorszint átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik. A csillagok a szignifikancia szintet jelzik: $p < 0,05$.

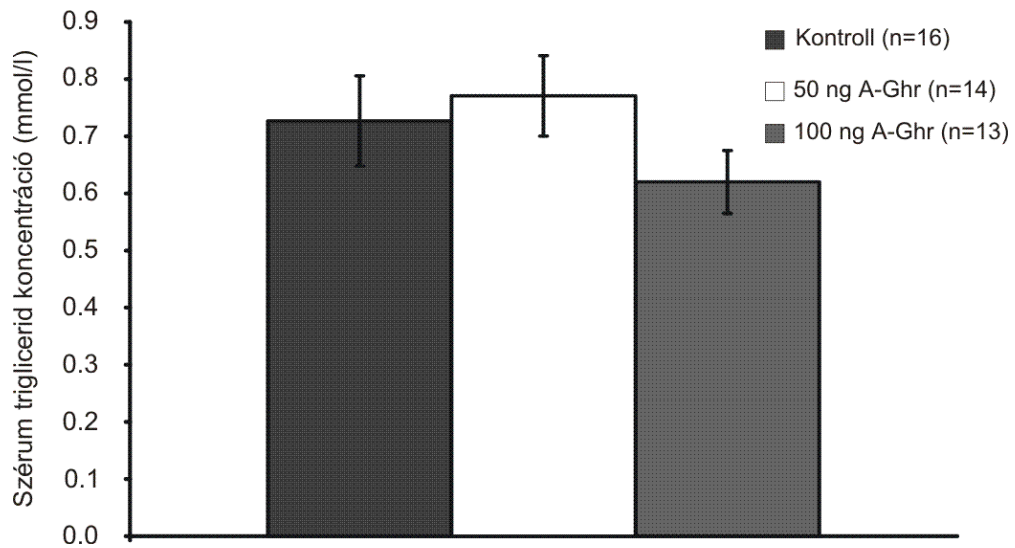
4.2.2. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak akut hatása a szérum össz-koleszterin, HDL koleszterin, triglicerid, fehérje, húgysav, inzulin és leptin koncentrációra ad libitum táplált állatokban

Mivel az A-Ghr változást okozott a vércukorszintben, indokoltnak láttuk megvizsgálni az A-Ghr további lehetséges akut hatását más metabolikus paraméterek vonatkozásában is. Vizsgálataink során olyan anyagok szérum koncentrációit mértük, melyek szerepet játszanak a táplálékfelvétel szabályozásában és/vagy koncentrációjuk jól jellemzi a szervezetben zajló anyagcsere folyamatokat. Méréseinket vehiculum, 50 és 100 ng A-Ghr bilaterális BLA mikroinjekcióját 20 perccel követő tözsvérszűréssel nyert vérmintából végeztük. A 20. percben történő mintavételt azért választottuk, mert az előzetes vércukorszint mérési vizsgálatokban ez az időpont bizonyult az A-Ghr hatás időpontjának, mindkét alkalmazott dózis esetén. Ugyanakkor azt is meg kell jegyeznünk,

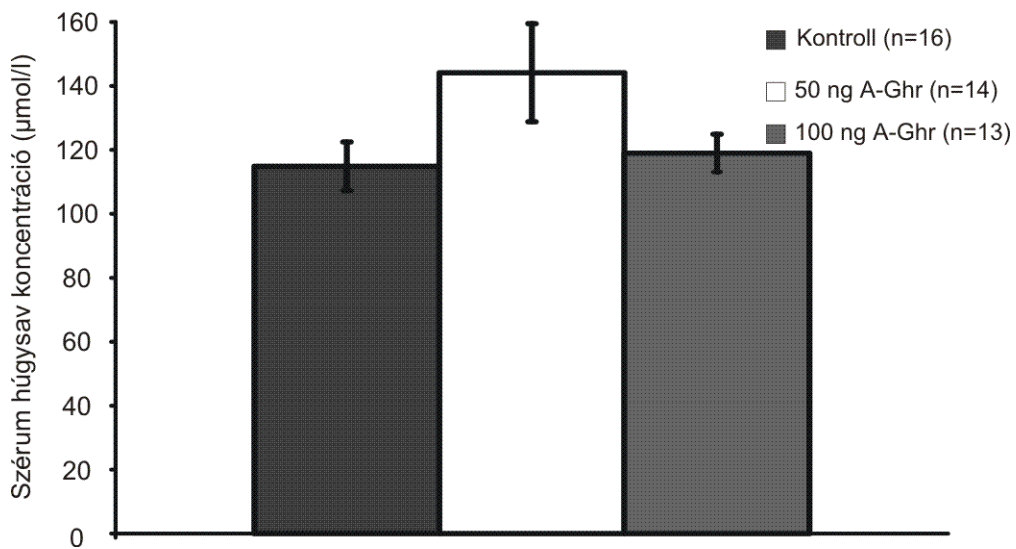
hogy sorozatméréseket nem tudtunk végezni, mert más mérési metodika technikai feltételei nem voltak adottak. Méréseink statisztikai értékelése során az ANOVA analízis nem mutatott szignifikáns változást a szérum össz-fehérje (n=43, $F[2,40]=1,941$, $p>0,1668$, 22.ábra), triglicerid (n=43, $F[2,40]=1,123$, $p>0,3353$, 23.ábra), húgysav (n=43, $F[2,40]=2,320$, $p>0,1114$, 24.ábra) és leptin (n=21, $F[2,18]=0,4421$, $p>0,6495$, 25.ábra) koncentrációkban az A-Ghr-el ill. vehiculummal kezelt csoportokban.



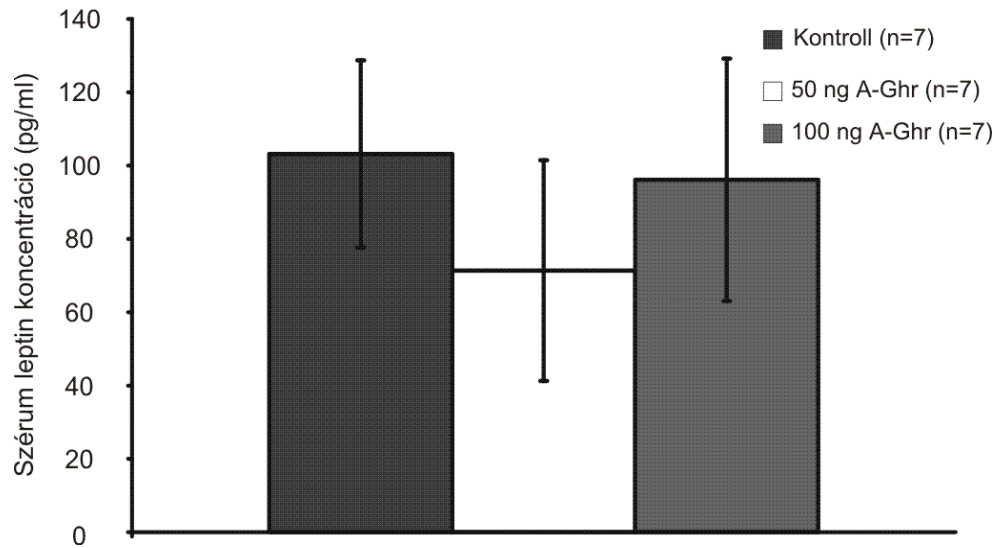
22.ábra: A szérum össz-fehérje koncentráció változása vehiculum, 50 vagy 100 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját követő 20. percben. Az oszlopok a kontroll-, ill. az A-Ghr kezeléseket követő szérum koncentráció átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.



23.ábra: A szérum triglicerid koncentráció változása vehiculum, 50 vagy 100 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját követő 20. percben. Az oszlopok a kontroll-, ill. az A-Ghr kezeléseket követő szérum koncentráció átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

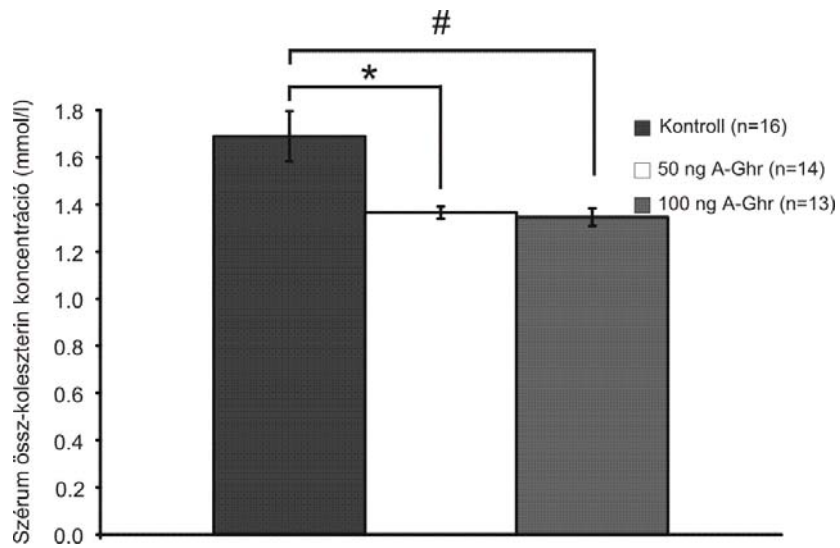


24.ábra: A szérum húgysav koncentráció változása vehiculum, 50 vagy 100 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját követő 20. percben. Az oszlopok a kontroll-, ill. az A-Ghr kezeléseket követő szérum koncentráció átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

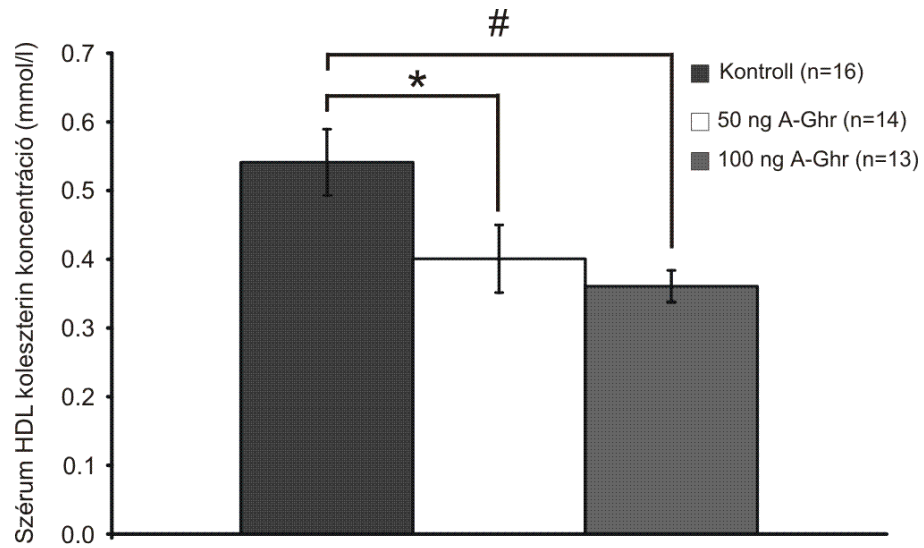


25.ábra: A szérum leptin koncentráció változása vehiculum, 50 vagy 100 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját követő 20. percben. Az oszlopok a kontroll-, ill. az A-Ghr kezeléseket követő szérum koncentráció átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

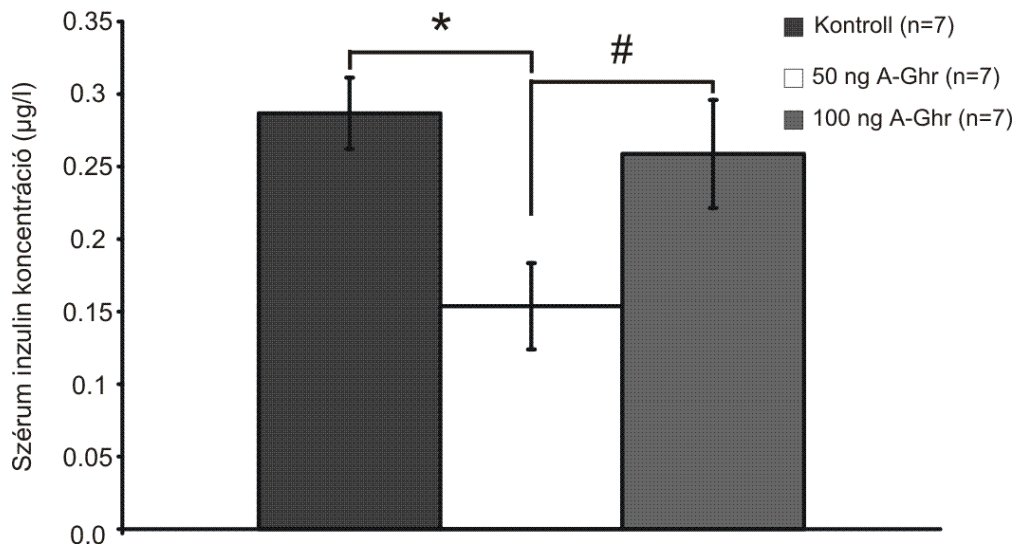
Ugyanakkor a szérum össz-koleszterin ($F[2,40]=7,297$, $p<0,002$), HDL koleszterin ($F[2,40]=4,951$, $p<0,012$) és a szérum inzulin ($F[2,18]=5,112$, $p<0,0175$) mérések során a variancia analízis szignifikáns hatást mutatott a kezelésre vonatkozóan. Az ezt követően elvégzett post hoc teszt megmutatta mely kezelésben részesült állatcsoportok között mutatkozik szignifikáns különbség. A szérum össz-koleszterin szint esetében mind az 50 ng mind pedig a 100 ng A-Ghr kezelésben részesült állatcsoport szérum össz-koleszterin koncentrációja szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult mint a vehiculum kezelésben részesült állatoknál ($n=43$, $q=4,521$ ill. $4,698$, $p<0,01$, 26.ábra). Hasonló eredményre vezetett a post hoc analízis a szérum HDL koleszterin esetében is ($n=43$, $q=3,306$ ill. $4,161$, $p<0,05$, 27.ábra). A szérum inzulin mérés során az 50 ng A-Ghr szignifikáns inzulin koncentráció csökkentő hatását találtuk mind a vehiculum mind pedig a 100 ng A-Ghr-el kezelt állatcsoportokhoz képest ($n=21$, $q=3,386$ ill. $4,289$, $p<0,05$, 28.ábra).



26.ábra: A szérum össz-koleszterin koncentráció változása vehiculum, 50 vagy 100 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját követő 20. percben. Az oszlopok a kontroll-, ill. az A-Ghr kezeléseket követő szérum koncentráció átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik. A szimbólumok a szignifikancia szintet jelzik: *, #: $p < 0,05$.



27.ábra: A szérum HDL koleszterin koncentráció változása vehiculum, 50 vagy 100 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját követő 20. percben. Az oszlopok a kontroll-, ill. az A-Ghr kezeléseket követő szérum koncentráció átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik. A szimbólumok a szignifikancia szintet jelzik: *, #: $p < 0,05$.



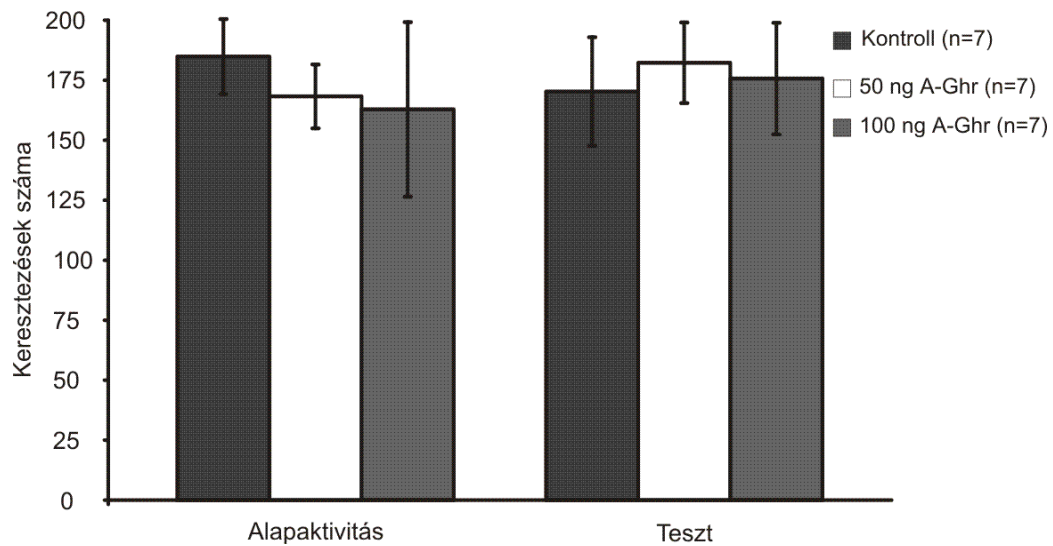
28.ábra: A szérum inzulin koncentráció változása vehiculum, 50 vagy 100 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját követő 20. percben. Az oszlopok a kontroll-, ill. az A-Ghr kezeléseket követő szérum koncentráció átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik. A szimbólumok a szignifikancia szintet jelzik: *, #: $p < 0,05$.

4.3. Magatartási vizsgálatok

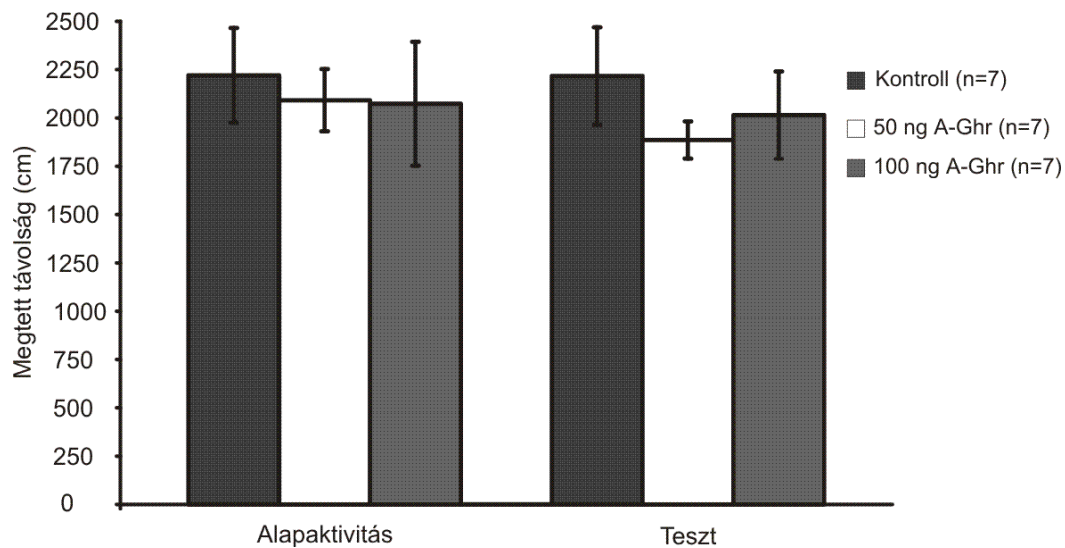
4.3.1. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása open field tesztben

Open field *tesztben* az A-Ghr spontán motoros aktivitásra kifejtett hatását vizsgáltuk. Tíz perccel vehiculum, 50 ng vagy 100 ng A-Ghr bilaterális BLA injekcióját követően 5 perccel keresztül mértük a patkányok által megtett utat és a keresztezések számát, melyek jó indikátorai a motoros aktivitásnak. Az eltérő kezelésben részesült állatcsoportok teszt során kapott adatait összevetettük ill. 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 semmilyen összefüggésben nem találtunk eltérést az állatcsoportok között, sem a

keresztezők számát illetően (ANOVA $F[5,36]=0,1402$, $p=0,9817$, 29.ábra), sem pedig a megtett távolságban (ANOVA $F[5,36]=0,3088$, $p=0,9044$, 30.ábra). Ezen adatok alapján arra következtethetünk, hogy a korábbi kísérleteinkben hatékonynak bizonyult dózistartományban az A-Ghr az állatok általános aktivitására nem volt hatással.



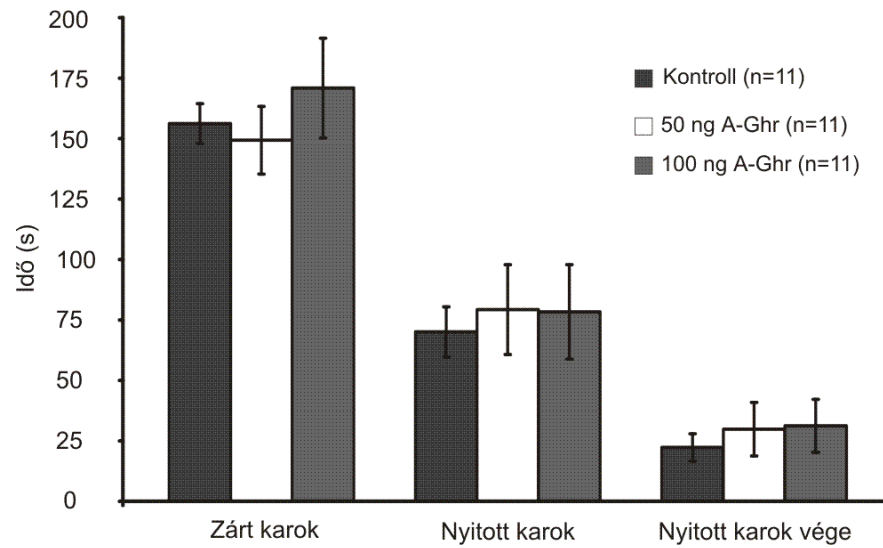
29.ábra: A keresztezők száma vehiculum, 50 ng, 100 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját követően. Az oszlopok a kontroll-, A-Ghr kezeléseket követő átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.



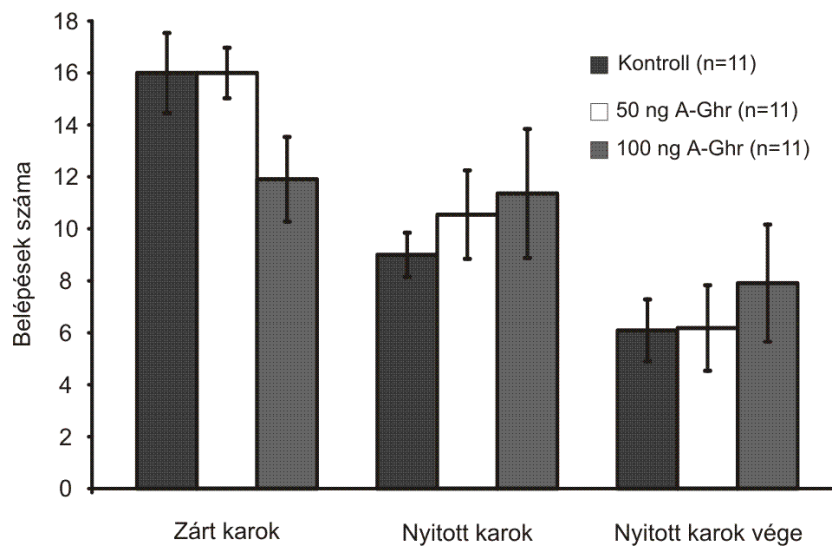
30.ábra: A megtett távolság cm-ben vehiculum, 50 ng, 100 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját követően. Az oszlopok a kontroll-, A-Ghr kezeléseket követő átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

4.3.2. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása emelt keresztpalló tesztben (elevated plus maze)

Emelt keresztpalló tesztben vizsgáltuk az A-Ghr lehetséges szorongást fokozó (anxiogén) ill. szorongás oldó (anxiolitikus) hatását. Tíz perccel vehiculum, 50 ng vagy 100 ng A-Ghr bilaterális BLA injekcióját követően 15 percen keresztül 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. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget egyetlen mért paraméterben sem (eltöltött idő: zárt karokon: $F[2,30]=0,5291$, $p=0,3945$, nyitott karokon: $F[2,30]=0,09278$, $p=0,9117$, nyitott karok végein: $F[2,30]=0,2517$, $p=0,7791$; belépések száma: zárt karokra: $F[2,30]=2,802$, $p=0,076$, nyitott karokra: $F[2,30]=0,4414$, $p=0,6473$, nyitott karok végeire: $F[2,30]=0,3418$, $p=0,7132$). Ezen eredmények azt sugallják, hogy sem az 50 ng sem pedig a 100 ng A-Ghr nem anxiogén (nem okoz szorongást) ill. nem anxiolitikus (nem szorongás oldó) hatású.



31.ábra: Az emelt keresztpalló kitüntetett részein eltöltött idő vehiculum, 50 ng, 100 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját követően. Az oszlopok a kontroll-, A-Ghr kezeléseket követő átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

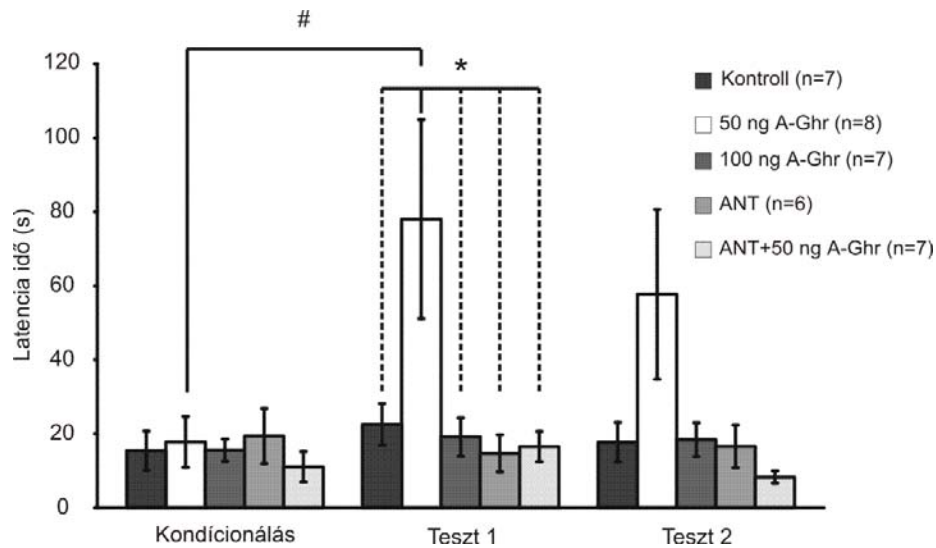


32.ábra: Belépések száma vehiculum, 50 ng, 100 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját követően. Az oszlopok a kontroll-, A-Ghr kezeléseket követő átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

4.3.3. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása passzív elhárító tesztben

Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekciója jelentős változást okozott passzív elhárításos tanulásban. A teljes kísérlet variancia analízise szignifikáns hatást mutatott ($F[14,90]=2.975$, $p<0.0009$). Az ANOVA szintén szignifikáns hatást mutatott mikor a mikroinjekciókat 24 órával követő teszt (Teszt 1) adatait vetettük össze ($F[4,30]=3.764$, $p<0.0135$), ugyanakkor az egy héttel a kondicionálást követő teszt (teszt 2) eredményeinek értékelésekor nem mutatkozott szignifikáns eltérés ($F[4,30]=2.655$, $p>0.0522$). A post hoc analízis azt mutatta hogy az 50 ng A-Ghr kétoldali BLA injekciója szignifikánsan növelte a latencia időt (33.ábra) passzív elhárító tesztben 24 órával a kondicionálás után (Teszt 1; $q=5.590$, $p<0.01$).

Egy héttel az elektromos sokkot követően (Teszt 2) az 50 ng A-Ghr hatása kiemelkedő maradt, de nem érte el a szignifikancia szintjét. Az eltérő kezelésben részesült állatcsoportok adatainak összehasonlítása az A-Ghr kezelést követően 24 órával azt mutatta, hogy az 50 ng A-Ghr kezelésben részesült állatoknak szignifikánsan több időre volt szükségük, hogy belépjenek a sötét dobozba, ahol az elektromos sokkot kapták ($q=4.976-5.510$, $p<0.05$). A 100 ng A-Ghr és az ANT önmagában hatástalan volt. Az 50 ng A-Ghr tanulást fokozó hatása bilaterális BLA ANT előkezeléssel meggátolható volt (lsd.: 50 ng A-Ghr hatása összevetve ANT+50 ng A-Ghr kezelt állatok eredményeivel a teszt 1-ben: $q=5.510$, $p<0.05$).

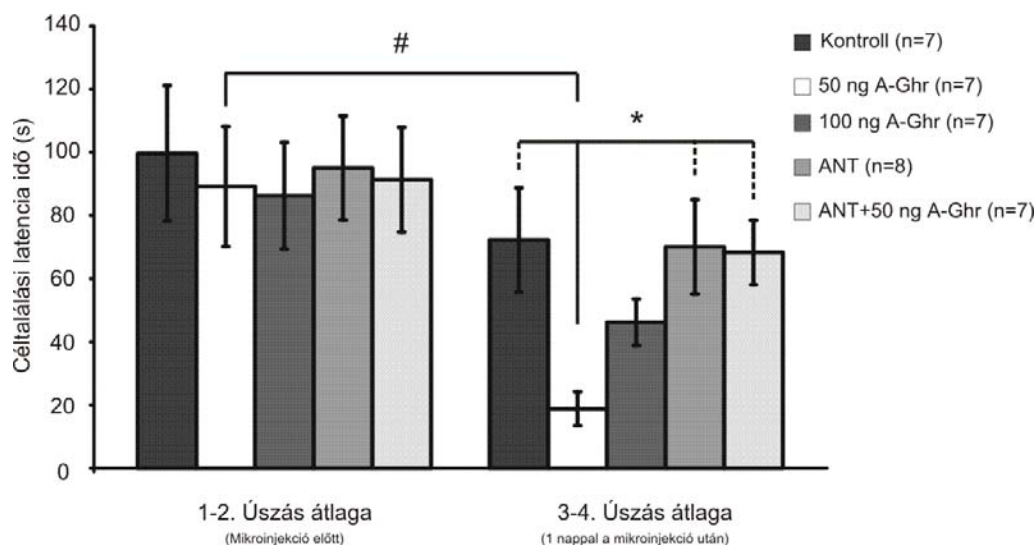


33.ábra: A latencia idő változása vehiculum, 50 ng, 100 ng A-Ghr, ANT, ANT+50 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját 24 órával (Teszt 1) és 1 héttel (Teszt 2) követően. Az oszlopok a kontroll-, A-Ghr, ANT ill. kombinált ANT+A-Ghr kezeléseket követő latencia idő átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik. A szimbólumok a szignifikancia szintet jelzik:*,#: $p < 0,05$.

4.3.4. Az A-Ghr bilaterális intraamygdaláris mikroinjekcióinak hatása Morris féle úsztatási tesztben

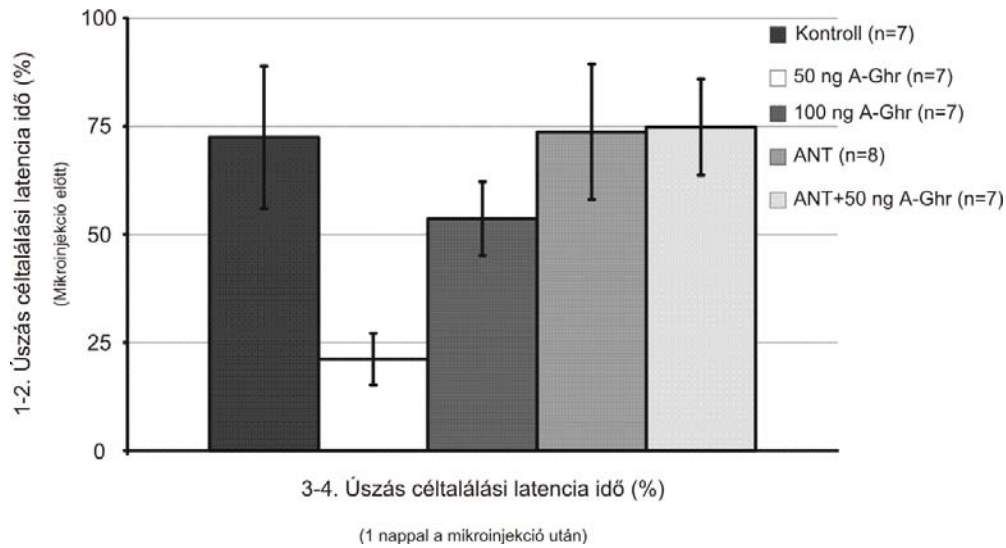
A teljes kísérlet variancia analízise azt mutatta, hogy a BLA-ba mikroinjektált A-Ghr szignifikáns változást okozott a Morris féle úsztatási tesztben vizsgált helytanulásban ($F[9,134]=2.631$, $p < 0.0078$). Szintén szignifikáns eredményre jutottunk mikor 24 órával a mikroinjekciókat követő két úszás (3. és 4. úszás átlaga) átlagaiból nyert eredményeket vetettük össze ($F[4,67]=3.642$, $p < 0.0096$), míg a kezelések előtti két úszás (1. és 2. úszás átlaga) eredményeinek variancia analízise önmagában nem mutatott statisztikailag jelentős eltérést ($F[4,67]=0.082$, $p > 0.9876$). A post hoc analízis azt mutatta, hogy az 50 ng A-Ghr kezelést kapott állatcsoport (n=7) céltalálási latencia ideje (platform megtalálásához szükséges idő) szignifikánsan csökkent a kezelést követően ($q=4.528$, $p < 0.05$, 31.ábra).

Sőt, az eltérő kezelésben részesült állatcsoportok mikroinjekció utáni (3. és 4. úszás átlaga) adatainak összevetéséből kitűnik, hogy az 50 ng A-Ghr kezelt állatoknak szignifikánsan kevesebb időre volt szükségük a platform megtalálásához mint a vehiculum, ANT vagy az ANT+50 ng A-Ghr kezelt állatoknak ($q=4.106-4.430$, $p<0.05$, 34.ábra). A 100 ng A-Ghr és az ANT kezelés önmagában hatástalannak bizonyult. Az 50 ng A-Ghr tanulást fokozó hatása ANT előkezeléssel eliminálható volt. (50 ng A-Ghr kezelt állatok 3. és 4. úszásának átlaga vs. ANT+50 ng A-Ghr kezelt állatok 3. és 4. úszásainak átlaga: $q=4.106$, $p<0.05$).



34.ábra: A céltalálási latencia idő vehiculum, 50 ng, 100 ng A-Ghr, ANT, ANT+50 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját megelőzően (1-2. úszás átlaga) és azt követően 24 órával (3-4. úszás átlaga). Az oszlopok a kontroll-, A-Ghr, ANT ill. kombinált ANT+A-Ghr kezeléseket kapott állatcsoportok céltalálási latencia idő átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik. A szimbólumok a szignifikancia szintet jelzik: *, #: $p<0,05$.

A kísérlet során mindegyik csoport mutatott tanulási tendenciát. Az 50 ng A-Ghr kezelést kapott állatcsoportnak a kezelést követően mindössze a mikroinjekció előtti céltalálási latencia idő 21,5 %-ra volt szüksége a platform megtalálásához, ez a többi csoport esetében 53-74 % volt (35.ábra).



35.ábra: A latencia idő változása százalékosan feltüntetve („tanulás mértéke”) vehiculum, 50 ng, 100 ng A-Ghr, ANT, ANT+50 ng A-Ghr intraamygdaláris injekcióját 24 órával követően. Az oszlopok a kontroll-, A-Ghr, ANT ill. kombinált ANT+A-Ghr kezeléseket követő latencia idő % átlag \pm S.E.M. értékeit tükrözik.

5. Eredményeink megbeszélése

5.1. Táplálékfelvétel mérés

Számos kísérleti eredmény támasztja alá, hogy az AMY esszenciális szerepet játszik az éhség motíválta magatartás szabályozásában [51,74,75,79,80,95,161,162]. Az AMY különböző területeinek léziója során mind hypophagia [79,95,133], mind pedig hyperphagia [81] megfigyelhető. Fonberg szerint [77] az AMY dosomediális-centrális része az éhség, míg basolaterális része a jóllakottság érzetének kialakulásában vesz részt. Ismert, hogy a BLA noradrenalin- vagy dopamin-specifikus mikroléziója csökkenti ezen agyi terület noradrenalin tartalmát ill. dopamin koncentrációját. Előbbi hyperphagiához és testsúly gyarapodáshoz vezet, míg ugyanezen terület dopamin tartalmának csökkenése hypophagiat

és testsúly csökkenést okoz [162]. Majomkísérletekben íz-érzékeny neuronokat detektáltak az AMY laterális-basolaterális területein [121,235], továbbá ezen neuronok catecholaminok, morfin és acetilkolin mikroiontoforézisére is válaszkésztséget mutattak [157,195]. Táplálkozási kondicionálás megerősítési periódusa alatt a dopamin és noradrenalin érzékeny neuronok jellemző aktivitás mintázatot mutattak, mely mintázat specifikus antagonisták adásával megszüntethető volt [195]. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a BLA részt vesz a táplálkozás asszociált motivációk és a külső kémiai információk integrációjában. A BLA információt kap a temporális, orbitális, mediális-prefrontális kéregből és a hippocampusból [2,243] és információt küld az AMY centrális magja felé. A centrális és az interkaláris AMY magok pedig információt kapnak más AMY magok felől, így módon megalkotva az AMY fő input-output rendszerét a ventrális amygdalofugális pályán és a stria terminalison keresztül. Az AMY kétirányú kapcsolatban áll a HT-al [205] és az agytörzsel mely információt kap fontos vegetatív működéseket szabályozó központoktól, mint a n. vagus dorsalis motoros magja, az NTS és a parabrachialis mag felől [103]. Ezen régiók úgy ismertek mint a táplálkozással kapcsolatos vegetatív funkciók modulátorai és az íz- pályarendszer fontos átkapcsoló állomásai. Az AMY-ban különböző orexigén és anorexigén peptidek és peptid receptorok jelenlétét igazolták. Míg például a bombesin vagy a bombesin szerű peptidek, mint a gastrin releasing peptid és a neuromedin C mikroinjekciója jóllakottságot okozott az AMY-ban [74,75,263], addig az orexin A fokozta a táplálékfelvételt [200]. Habár ezidáig GHS-R jelenlétét nem sikerült igazolni az AMY-ban, ghrelinerg neuronok végződéseit azonosították ezen agyi területen [50,85]. Sőt, a HT-ba injektált A-Ghr c-Fos overexpressziót eredményezett az AMY-ban [202,203]. Eredményeink azt mutatják, hogy az A-Ghr mikroinjekciója a BLA-ba szignifikáns, tranzienst folyékony táplálék felvétel csökkenést okoz az 50-250 ng dózistartományban. A legalacsonyabb és a legmagasabb dózisok (25 ng és 500 ng) hatástalanok voltak, mutatva a jól ismert fordított U alakú dózis-hatás összefüggést, mely nagyon gyakran megfigyelhető különböző neuropeptidek alkalmazása során [74,111]. Az 50-250 ng dózistartományban az A-Ghr hatása specifikusnak bizonyult, mivel GHS-R antagonistával eliminálható volt. Eredményeink az elsők, melyek az A-Ghr folyékony táplálékfelvétel csökkentő hatásáról számolnak be a BLA-ban [254]. Eredményeink azonban szemben állnak az irodalomban

eddig fellelhető adatokkal [16,202,253,256,273]. Nevezetesen azokban a kísérletekben, melyekben az A-Ghr-t i.c.v. vagy direkt intrahypothalamicusan injektálták az A-Ghr szilárd táplálékfelvétel növelő hatását figyelték meg [16,253,256,273]. Az általunk alkalmazott hatékony A-Ghr koncentrációk pikomolos (14,84-72,2 pmol/0,4 μ l) tartományba estek, ez magasabb mint a vérplazmában mérhető fiziológiás koncentráció (20 fmol/ml) [143], de sokkal alacsonyabb (fele- egyhuzada), mint a korábbi agyi mikroinjekciós kísérletekben alkalmazottaké (0,3-3,0 nmol; 1000-10000 ng) amikor a táplálékfelvétel növekedését tapasztalták [41,202].

Eredményeink értelmezésének egy másik érdekes aspektusa az általunk alkalmazott folyékony táplálékfelvételi paradigma. A tej bevitel során az ivás és az evés mint magatartási minták keverednek egymással. Érdekes megemlítenünk, hogy Hashimoto és munkatársai a vízfelvétel csökkenését és a táplálékfelvétel növekedését tapasztalták Ghr i.c.v. injekcióját követően [98]. Ismereteink szerint az intracerebrális A-Ghr mikroinjekció hatását eddig nem vizsgálták folyékony táplálékfelvételi paradigmában. Ezért külön kísérletsorozatban tanulmányoztuk az i.c.v. injektált A-Ghr hatását a folyékony táplálékfelvételi paradigmában. Ezeket a kísérleteket az intraamygdaloid A-Ghr kezelések okozta táplálékfelvétel változások kontroll vizsgálatának szántuk. Amint azt eredményink mutatják az A-Ghr (1000 ng/oldal) i.c.v. injekciója növelte a folyékony táplálékfelvételt. Ez teljesen egybevág a korábbi i.c.v. beadásokon alapuló eredményekkel [16,253,273] melyeket szilárd táplálék felvételének mérésével végeztek. Másrészről viszont szemben áll az A-Ghr BLA injekciója által okozott táplálékfelvétel csökkenéssel. Ez az ellentmondás feloldható az i.c.v. A-Ghr injekciók lehetséges hatáshelyének magyarázatával. Fontos kiemelni a különbséget az i.c.v. és egy jól körülírt agyi terület célzott mikroinjekcióinak hatásai között. Az i.c.v. injekció esetében az alkalmazott neuropeptid diffúziós sebessége nagyobb a cerebrospinális folyadékban mint az agyi parenchymában, így az A-Ghr az agykamra viszonylag nagy felszínén szétterjed mielőtt bekerülne az agyállományba. 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 (A-Ghr esetén ez nem ismert) is. A mi kísérleteinkben az i.c.v. beültetett kanülök meglehetősen távol voltak az AMY-tól. A diffúzió miatt minél távolabb van egy adott agyi

terület, ott annál kisebb a beadott anyag koncentrációja. Ezért feltételezhetjük, hogy az i.c.v. injektált A-Ghr azon GHS receptorokhoz kötődött melyek az agykamra falához közelebb helyezkedtek el, valamint koncentrációja fokozatosan csökkent az agyi parenchymában. Következésképpen tehát az A-Ghr koncentrációja a távoli BLA-ban nagyon alacsony volt (ha volt egyáltalán). Ezzel szemben, az A-Ghr célzott BLA mikroinjekciója esetén a neuropeptid a lokális, elérhető GHS receptorokhoz tud kötni és módosíthatja a lokális neuronhálózatok működését.

Fontos tudnunk, hogy Ghr tartalmú neuronokat írtak le a hypothalamicus nucleus arcuatusban és a periventriculáris területeken közel a 3. agykamra falához, a dorsális, ventrális és periventriculáris magvak között és a PVN-ben is [50,132]. Ezek a Ghr tartalmú neuronok efferens rostokat küldenek az NPY és AgRP tartalmú neuronokhoz és stimulálják ezen orexigén peptidek felszabadulását [132]. Az A-Ghr i.c.v. injekciója NPY-t termelő neuronokban c-Fos expressziót indukál és növeli NPY mRNS mennyiségét a nucleus arcuatusban és az AgRP mRNS mennyiségét a HT-ban. Immunohisztikémiai vizsgálatok azt igazolták, hogy ghrelinerg neuronok rostjai direkt módon végződnek NPY/AgRP neuronokon [50]. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Ghr táplálékfelvétel fokozó hatását az NPY/AgRP neuronok stimulálása révén fejti ki a HT-ban, serkentve a termelését és a szekrécióját ezen orexigén peptideknek mind i.c.v. mind pedig direkt PVN mikroinjekciók után [132]. A Ghr táplálékfelvételre kifejtett hatása gátolható volt anti-NPY, anti-AgRP antitestek és NPY Y1 receptor szelektív antagonistákkal i.c.v. adásával [112,145]. Ezen adatok ismeretében tehát levonhatjuk azt a következtetést, hogy a perifériásan vagy az i.c.v. alkalmazott Ghr fokozza a táplálékfelvételt NPY és/vagy a AgRP rendszeren keresztül [132]. A saját i.c.v. kísérleteinkben az A-Ghr-t a laterális agykamrákba injektáltuk ami diffúzó útján elérhette az arcuatus-periventriculáris régiót, így váltva ki táplálékfelvételt. Carlini és munkatársainak egy publikációjában írt konklúziója [41] szintén alátámasztja az általunk talált különbséget a táplálékfelvételben az A-Ghr i.c.v. ill. BLA injekcióit követően. Nevezetesen, véleményük szerint, az i.c.v. alkalmazott A-Ghr az agykamra falához közel eső GHS receptorok számos szubpopulációját aktiválhatja, míg a direkt intracerebrális mikroinjekció csak az adott agyi területen jelenlévő receptorokat aktiválja [41].

Vizsgálatainkban a GHS-R antagonistá D-Lys3-GHRP-6 előkezelés meggátolta az A-Ghr táplálékfelvétel csökkentő hatását a BLA-ban. A D-Lys3-GHRP-6 egy specifikus GHS-R antagonistá ami nem szelektív a GHS-R 1a vagy 1b altípusokra. Halem és munkatársai [96] egy új GHS-R 1a specifikus antagonistáról számoltak be (BIM-28163), mely az A-Ghr GH szekréciót fokozó hatását felfüggesztette ugyan, azonban a táplálékfelvételi kísérletekben várt antagonizáló hatása elmaradt, sőt az A-Ghr-hez hasonlóan fokozta azt. Mindez arra utalhat, hogy a táplálékfelvételi folyamatok szabályozásában eddig ismeretlen GHS-R altípus is szerepet játszhat. Az irodalomban a GHS-R 1a altípuson kívül említést csak a GHS-R 1b típusról tesznek. Ezen forma élettani funkciójáról azonban eddigi keveset tudunk (Isd. külön fejezetben).

Tovább árnyalja a receptorális hatásmechanizmus képét az a kísérleti eredmény, miszerint újszülött csirkék esetében az A-Ghr táplálékfelvétel csökkenést okozott, mely CRF antagonistá astressin kezeléssel kivédhető volt. Mindez azt sugallja, hogy az A-Ghr a HT-ban nem csak a NPY-t tartalmazó neuronokat aktiválja, hanem fokozza a CRF szekrécióját, azaz a hypophysis-mellékvese tengely működését is, ezáltal egy szorongásos állapot alakulhat ki, táplálékfelvétel csökkenést eredményezve [228]. Ezen elképzelést azonban cáfolják azon irodalmi adatok, melyek szerint patkányban az A-Ghr nem képes CRF receptorhoz kapcsolódni [46]. A desacylált forma azonban képes kapcsolódni a CRF receptor 2-es típusához [46], mely megtalálható az AMY-ban is [165,261]. Mivel az A-Ghr poszttranszlációs észterifikációja nagyon érzékeny [104] és az agyszövet nem specifikus észterázokat tartalmaz, így felmerül a lehetősége annak, hogy az általunk tapasztalt hatás az A-Ghr deacylációja során létrejött DA-Ghr által közvetített. Kísérleteinkben azonban igazoltuk, hogy az azonos folyékony táplálékfelvételi paradigmában, az A-Ghr kezelésekkal összevethető dózistartományban (25, 50 ill. 100 ng) a DA-Ghr bilaterális BLA injekciója nem befolyásolta a táplálékfelvételt. Így a CRF 2 receptor szerepe az A-Ghr táplálékfelvétel csökkentő hatásának közvetítésében valószínűtlen.

Érdekes továbbá megemlíteni azt is, hogy a GHS-R relatíve nagy szekvencia-homológiát mutat más peptidek mint a motilin, neurotensin, neuromedin U receptoraival (Isd. külön fejezet) [15,65]. Ezen receptorok nagy koncentrációban fordulnak elő az AMY-

ban. [169]. Nem zárhatjuk ki azt a feltételezést, hogy az A-Ghr táplálékfelvétel csökkentő hatása részben ezen receptorokon keresztül valósulna meg.

Külön kísérletekben vizsgáltuk a 24 órás éheztetés hatását a BLA-ba injektált A-Ghr táplálékfelvétel csökkentő hatására. Jól ismert, hogy táplálékmegevonást követően fokozódik az éhség-hajtóerő (drive). Éheztetés hatására kezdetben nő a kísérleti állatok táplálék felkutatásra kifejtett aktivitása, ami a fokozott explorációban ill. fokozott motoros aktivitásban nyilvánul meg. Másrészt azt is ismerjük, hogy éhezés során a szérumban nő a keringő Ghr koncentráció (mind az A-Ghr, mind pedig a DA-Ghr). Vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy az éhség fokozásával a korábban hatékonyan bizonyult 50 és 100 ng A-Ghr táplálékfelvétel csökkentő hatása megszűnt. Azaz a fokozott éhség-motiváció ellensúlyozta az A-Ghr szatiációs hatását. Mindez arra utal, hogy a BLA-ba injektált A-Ghr az éhség-motíválta magatartás modulálásában vesz részt.

Eredményeink azt igazolják, hogy a BLA-ba injektált A-Ghr adott dózistartományon belül táplálékfelvétel csökkenést okoz. Ezen hatás GHS-R-on keresztül valósul meg, mivel GHS-R antagonistá D-Lys3-GHRP6-al kivédhető, azonban az A-Ghr pontos hatása a GHS-R altípusokon nem ismert, és más, eddig nem ismert receptor-mechanizmusok sem zárhatók ki. Az A-Ghr okozta táplálékfelvétel redukció függ az éhség-jóllakottság állapotától és éheztetés hatására megszűnik. Mivel az A-Ghr i.c.v. injekciója növelte, de BLA injekciója csökkentette a táplálékfelvételt, az feltételezhető, hogy az i.c.v. alkalmazott A-Ghr a NPY/AgRP úton hat, míg a BLA-ba adott A-Ghr más mechanizmusokon keresztül fejt ki hatását.

5.2. Vércukorszint mérés, metabolikus paraméterek

Kísérleteinkben mértük a vércukorszintet sorozatméréseket végezve, valamint törsvéresztetéssel nyert vérmintából a szérum össz-fehérje, triglicerid, össz-koleszterin, HDL koleszterin, húgysav, inzulin és leptin koncentrációkat. Ezen mért paraméterek közül eltérést találtunk a vércukorszintben, az inzulin, össz-koleszterin és HDL koleszterin plazmakoncentrációjában.

A plazma metabolitok regulálta mechanisztikus táplálékfelvétel szabályozási teóriák mára jelentősen módosultak, kiegészültek (Brobeck thermosztikus [31], Mayer glukosztikus [174], Mellinkoff aminosztatikus [178] és Kennedy liposztikus [124] teóriája, lsd. külön fejezet). Ugyanakkor hangsúlyoznunk kell, hogy az anyagcserében résztvevő nutriensek (lipidek, fehérjék, glukóz) kulcsszerepet játszanak a táplálékfelvétel szabályozásában. Maga az éhség-motíválta magatartás egy, a központi idegrendszerben és a periférián lejátszódó komplex, számos mediátort magában foglaló szabályozási folyamat végeredménye. Az evést megelőzően a szervezet már felkészül a táplálék felvételére. Ez a fázis a táplálékfelvétel cephalicus (preprandiális) fázisa, mely során az afferens szenzoros információk a külvilágból a központi idegrendszerbe jutnak és ott a belső környezetből származó afferens inputokkal integrálódva kialakítják a táplálékfelvételhez vezető éhség hajtóerőt. Ezt követi maga a magatartás megvalósulása az evés vagy másnéven prandiális fázis, melyben fontos szerepet játszanak a gastrointestinális rendszerből a központi idegrendszerbe jutó szignálok. Ezen szignálok forrása egyrészt a gyomor-bélrendszer mechanoreceptorai, melyek érzékelik a bevitt táplálék mennyiségét, és a kemoreceptorok, melyek a minőségi összetételről tájékoztatnak. A táplálékfelvétel utolsó fázisa a postprandiális fázis, melynek fő szabályzója a felszívódott nutriensek maguk [28].

Ezen szabályozási rendszerben különösen fontos a vércukorszint szerepe. A vércukorszint egy adott tartományon belül szigorúan szabályozott. Az eddig ismert egyetlen hormon mely a vércukorszintet csökkenti az inzulin. Az inzulint az endokrin pancreas (Langerhans szigetek β sejtjei) termeli. Az inzulin elválasztás szabályozása igen komplex folyamat, melynek néhány részletét ismerjük, de teljes valójában még nem feltárt. A megnövekedett vércukorszintről biztosan tudjuk, hogy inzulin elválasztást indukál. Azonban a táplálkozás megkezdése során az inzulin szekréció azonnal megkezdődik, noha még a táplálékból történő glukóz felszívódás és vércukorszint emelkedés nem tapasztalható. Ez az inzulin elválasztás cephalicus fázisa, mely az oro-pharyngealis régióba kerülő táplálék kiváltotta vegetatív reflex által szabályzott és a n. vagus útján valósul meg [245]. Az inzulin szekréció előfeltétele a β sejtek membránjának depolarizáció okozta fokozott Ca^{2+} permeabilitása. Az így megemelkedő intracelluláris Ca^{2+} koncentráció iniciálja az inzulin tartalmú vesiculák kiürülését.

Radio-immuno-assay vizsgálatokkal bebizonyosodott, hogy a Ghr minden formája megtalálható a hasnyálmirigyben. Azonban ellentmondásos kísérleti eredmények születtek a Ghr termelő Langerhans szigetsejtek vizsgálataiban során. Egyes vizsgálatok az α sejtek, mások a β sejtek Ghr termelését igazolták, míg megint mások az ϵ szigetsejteket ill. eddig nem azonosított sejt típusokat tesznek felelőssé a Ghr termeléséért [61,268,269]. A foetalis fejlődés során a pancreas Ghr termelése fokozatosan változik [45]. A Ghr-t expresszáló pancreas sejtek száma nagy (az összes endokrin sejt kb 10%-a) a gestáció közepétől egészen a korai posztnatális korig, majd születést követően csökken. További vizsgálatok azonosították a GHS-R eddig ismert mindkét altípusát (GHS-R 1a és 1b) is a pancreasban. A két altípus közül az 1a altípusról tudjuk, hogy az A-Ghr kötődése intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést indukál az IP3 mediálta jelátviteli úton keresztül [171]. Mindez azt sugallná, hogy a Ghr (A-Ghr) kötődése funkcionálisan aktív receptorához az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelése révén inzulin szekréciót indukálna. A kísérletes tapasztalatok azonban ellentmondásosak. Egyes szerzők az A-Ghr inzulin szekréciót gátló, mások az inzulin szekréciót serkentő hatásáról számoltak be [1,61,147,222]. Hogy mi állhat az eltérő megfigyelések háttérében, azt ma még nem tudjuk pontosan. Lehetséges, hogy az eltérő metodikákból adódó különbségekről van szó, vagy esetleg eddig nem ismert receptorális mechanizmusok lehetnek a felelősek, például a GHS-R 1b altípus heterodimerizációs képessége és az így létrejövő ligand és/vagy jelátviteli utak szintjén megvalósuló eltérő szabályozás. Tudjuk, hogy a glukóz csökkenti a keringő A-Ghr koncentrációját [127] és növeli az inzulin szekréciót. Az inzulin szintén gátolja az A-Ghr elválasztást [127]. Úgy tűnik tehát, hogy a glukóz szérumban koncentrációja fontos tényező az A-Ghr hatásában. Date és munkatársai számoltak be arról, hogy az A-Ghr stimulálta az inzulin szekréciót Langerhans sejt kultúrában a tápoldat normálisnál magasabb cukorszintje esetén és nem befolyásolta azt egy alacsonyabb glukóz koncentráció jelenlétékor [61].

A májban és a vesékben zajló glukoneogenesis fontos része a glukóz homeosztasisnak. A glukoneogenesis sebesség meghatározó enzime a Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), melynek transzkripcióját az inzulin gátolja [191]. Patkány májsejt tenyészetben az inzulin PEPCK gátló hatását az A-Ghr visszafordította, és mivel a Ghr receptorának mRNS-ét mind a májszövetben mind pedig a

vesékben kimutatták, lehetséges, hogy az A-Ghr szerepet játszik az in vivo glukoneogenesisben. Továbbá ismert a glukagon vércukorszint szabályozásban és a Langerhans szigeteken belüli inzulin szekréció szabályozásában betöltött szerepe. A glukagon növeli a máj glukóz leadását és az endokrin pancreas intrinsic szabályozásában direkt módon a β sejteken fokozza az inzulin elválasztását, de indirekt módon a δ sejtek somatostatin elválasztásának indukálása révén gátolja is azt. Salehi és munkatársai vizsgálták az A-Ghr hatását in vitro izolált β szigetsejt tenyészetben és in vivo egérben. In vitro vizsgálataikban állandó glukóz koncentráció mellett változó koncentrációjú Ghr kezeléseket követően mérték a glukagon és inzulin koncentrációkat. Az inzulin elválasztást az alacsony koncentrációjú Ghr (1-100 pmol/l) kezelés csökkentette, míg a 0,1-1 μ mol/l koncentrációjú Ghr oldat alkalmazása fokozta. Fix Ghr koncentráció mellett (100 nmol/l, ami korábban fokozta az inzulin elválasztást) változtatva a glukóz koncentrációját (0-20 mmol/l), a növekvő glukóz koncentráció mellett növekvő inzulin és glukagon elválasztást detektáltak. In vivo kísérleteikben a 10 nmol/kg Ghr i.v. injekciója 6 perccel a beadást követően az inzulin koncentráció csökkenését és a plazma glukóz koncentráció emelkedését okozta, de nem mutatkozott változás a glukagon koncentrációban. Ellenben 40 nmol/kg Ghr injekciót követően 15 és 40 perccel megnövekedett inzulin, glukagon és glukóz koncentrációt mértek [230]. Lehetséges tehát, hogy az A-Ghr-nek szérumban glukóz koncentráció függő hatásai vannak az inzulin ill. glukagon elválasztásra. A szérumban glukóz koncentráció összefügg a táplálékfelvétellel, mint azt korábban tárgyaltuk. Tudjuk, hogy a keringő Ghr koncentráció az étkezési szünetekben (két év között) nő és a táplálék elfogyasztását követően lecsökken. Étkezési szünetekben a normál vércukorszintet a májból kiáramló glukóz tartja fenn. Ilyenkor az inzulin szekréció gátlása és a glukoneogenesis serkentése célszerű biokémiai folyamatok. Ellenben étkezéskor a vércukorszint nő amikor az inzulin szekréció fokozása és a glukoneogenesis gátlása az adaptív fiziológiai folyamatok.

Klinikai vizsgálatainkban összehasonlítottuk orális glukóz tolerancia teszt során az elhízott, ill. normál súlyú gyermekek A-Ghr szintjeit. Eredményeink szerint az elhízott gyermekekben a várt A-Ghr koncentráció csökkenés elmaradt, s tartósan magas A-Ghr

koncentráció volt mérhető. Feltételezhető, hogy ezen változás mint adaptív mechanizmus jelentkezik, s a testtömeg normalizálódása során megszűnik [143].

Ismeretes továbbá az a tény is, hogy a gyomor eltávolítása emberben és állatkísérletes modellekben is az inzulin szekréció csökkenéséhez vezet [229,246]. A Ghr-t legnagyobb mennyiségben a gyomor nyálkahártya endokrin sejtjei termelik [130]. Gastrectomiát követően a keringő Ghr koncentráció megközelítőleg a műtét előtti koncentráció felére csökken [148,164]. Ez szintén a Ghr inzulin szekréciót fokozó hatását sugallná, de meg kell említenünk, hogy a gastrointestinalis rendszer és benne a gyomor, hormonálisan nagyon aktív szerv. Számtalan hormont termel, melyek jelentős részéről tudjuk, hogy befolyásolja az inzulin elválasztását (gastrin, cholecystokinin, secretin, stb). Így a gyomor eltávolítás okozta endokrin pancreas funkciójában bekövetkező változásokat egyetlen peptidnek tulajdonítani nem volna helyénvaló. A tény, hogy a Ghr fő forrása a gastrointestinalis rendszer és megtalálható a központi idegrendszerben is azt mutatja, hogy szerepe lehet a periféria és a központi idegrendszer között megvalósuló „komunikációban”, azaz perifériás szignálként részt vehet a központi idegrendszeri folyamatok kialakulásában, a periférián lezajló élettani változások regulálásában. Régóta tudjuk, hogy a központi idegrendszer befolyásolja a perifériás metabolikus folyamatokat a vegetatív idegrendszeren keresztül. A brain –gut peptidek, mint a Ghr, ezen szerepe több módon is megvalósulhat: 1) a periférián felszabaduló Ghr direkt módon átlépve a vér- agy gáton eljut a központi idegrendszer egyes elemeihez [19], 2) a periférián felszabaduló Ghr a vegetatív idegrendszer afferens rostjait használva juttatja információját az agyi központokba [60,100,227] és 3) a központi idegrendszer egyes területein maguk a neuronok termelnek Ghr-t [50] és az ott in situ termelt peptid vesz részt a lokális neuronhálózatok működésének szabályozásában, módosítva ez által az agyműködést. A paraszimpatikus információkat a májhoz és a pancreashoz a n. vagus rostjai szállítják, míg a szimpatikus rostok a n. splanchnicussal érik el ezen területeket. 1931-ben már egy összefoglaló jellegű közlemény jelent meg a n. vagus inzulin szekrécióra kifejtett hatásait tárgyalva, amikor az inzulin maga „még csupán csak 10 éves volt” [48]. Ez a közlemény alapvetően a n. vagus inzulin szekréciót fokozó hatásáról számolt be [48]. Az inzulin erős enzim induktor és gátló hatásai révén gyakorlatilag az emlős szervezet minden szövetének anyagcseréjét befolyásolja.

Azonban Clark vizsgálatai során felvetette annak lehetőségét, hogy a n. vagusban futó egyes rostok esetleg gátló hatást fejthetnek ki az inzulin elválasztásra [48] hasonlóan a sympatikus idegrendszer aktiválódásához [57].

Az A-Ghr i.c.v. injekciója fokozta a c-Fos expressziót a vagus dorsalis motoros magjában és stimulálta a gyomorsav szekréciót ami arra utal, hogy az A-Ghr aktiválja a vagus rendszert [62]. Továbbá a vagotómia meggátolta az A-Ghr táplálékfelvételt és GH elválasztást fokozó hatását [8,60]. Azonban a bazális Ghr koncentrációt a n. vagus átmetszése nem befolyásolta. Másrészt viszont az éhezés kiváltotta plazma Ghr koncentráció emelkedést a subdiaphragmatikus vagotómia ill. atropin kezelés megszüntette [270]. Az A-Ghr i.c.v. injekciója csökkentette a perifériás sympatikus idegrendszeri aktivitást [173,241,277].

Az AMY és a vegetatív idegrendszer kapcsolata is ismert. Az AMY erős kétirányú anatómiai összeköttetésben áll számos agytörzsi területtel, például a locus ceruleus, nucleus parabrachialis, HT vagy a n. vagus dorsalis motoros magjával, melyekről vegetatív preganglionáris neuronok rostjai indulnak [221,232].

Vizsgálatainkban 50 és 100 ng A-Ghr mikroinjekcióját követően mérve a vércukorszintet azt találtuk, hogy ad libitum táplálált, normoglikémiás patkányokban mind az 50 ng mind pedig a 100 ng A-Ghr BLA injekciója emelte a vércukorszintet, miközben a kisebbik dózis esetén az inzulin szérumszintjének csökkenését is detektálhattuk. Ez a vércukorszint növekedés mindkét dózis esetében megelőzte a szignifikáns táplálékfelvétel csökkenést. Ebből arra következtethetünk, hogy a BLA-ba juttatott A-Ghr okozta akut és tranziens vércukorszint emelkedés jóllakottsági szignálként hatva átmeneti táplálékfelvétel csökkenést okozhat. A megemelkedett vércukorszintek mindkét alkalmazott dózis esetében a normál tartományon belül voltak, bár kétségtelen hogy a 100 ng A-Ghr dózisa esetén a kiindulási vércukorszintek magasabbak voltak. Ezért fontos kiemelnünk, hogy a kiindulási vércukorszintek nem az éhgyomri vércukorszinteket jelölik, hiszen a mérési időszakokat megelőzően az állatok ad libitum táplálkozhattak. Ezen különbség tehát adódhat a kísérleteket megelőző eltérő mértékű táplálékfelvételtől és az így kialakult eltérő glikémiás állapotból. Ezért indokolt lehet a kísérletek elvégzése orális glukóztolerancia teszttel, amikor az állatok glikémiás állapota közel azonos.

Azonban az eddigieknél is szerényebbek az ismereteink a központi idegrendszer és a periférián zajló lipoprotein anyagcsere összefüggéseiről. Egy lehetséges mechanizmus az eddig tárgyalt központi idegrendszer módosította inzulin szekréció okozta változások. Az inzulin bizonyosan részt vesz a lipoprotein metabolizmus szabályozásában is. Növeli a koleszterin és így a HDL koleszterin szintézisét a májban, többek között a HMG CoA reductáz enzim aktivitásának fokozása révén [198]. Továbbá, Seto és munkatársai igazolták, hogy az AMY-ba injektált inzulin [238] vagy glukagon [239] megváltoztatja a máj metabolikus aktivitását, ami érinti a koleszterin szintézisét is. Ezen hatás a stria terminalis épségéhez kötött, mivel az adott terület léziója esetén a hatás nem volt kiváltható. Ha feltételezzük tehát, hogy az euglikémiás patkányban az A-Ghr az inzulin szekréciót csökkenti, akkor ennek következménye lehet a májban zajló lipoprotein szintézis csökkenése is [223], mely magyarázhatja az A-Ghr mindkét általunk alkalmazott dózisának intraamygdaláris mikroinjekcióit követően tapasztalt plazma össz-koleszterin és HDL koleszterin koncentrációk csökkenését.

5.3. Magatartási tesztek

5.3.1. Open field és emelt keresztpalló teszt

Mind a passzív elhárító teszt mind pedig a Morris féle úsztatási teszt a memória kialakulást és memória retenciót vizsgáló magatartási paradigma. Ugyanakkor, az A-Ghr kísérleti állatok spontán motoros aktivitására, motoros képességére és szorongására kifejtett hatásának ismerete elengedhetetlen e tesztek értékeléséhez. Ezért előbb a motoros aktivitásra kifejtett hatását open field tesztben majd a szorongásra kifejtett hatását emelt keresztpalló tesztben vizsgáltuk meg.

Az open field tesztben mérhető motoros aktivitás megváltozása hatással lehet mind a passzív elhárításos, mind a Morris féle úsztatási tesztben mérhető tanulás latencia idejére. A motoros aktivitás meglassulása a latencia idők növekedéséhez vezethet, ami passzív

elhárító tesztben a memória retenció fokozódásának, míg az úsztatási tesztben a tanulás romlásának hamis következtetéséhez vezethet. A motoros aktivitás fokozódása pedig nehezen megjósolható, de jelentős hatással lehet a latenciaidőkre, így befolyásolva a tesztek értékelhetőségét.

Korábban az open field teszt a habituáció jelenségének vizsgálatára volt használatos. Az új környezethez való habituáció az egyik legalapvetőbb tanulási forma. Ugyanazon környezetbe történő ismételt „behelyezés” okozta explorációs magatartás csökkenés a memória kialakulás fontos jele [252,262]. Ugyanakkor, amennyiben az állatot habituáltuk a környezethez, az ezt követő farmakológiai ágens alkalmazása alkalmas a kísérleti állatok spontán motoros aktivitásának vizsgálatára. Ezért a patkányokat először hozzászoktattuk (habituáltuk) a viszonylag egyszerű (ingerszegény) környezethez (open field doboz), hogy a habituáció jelensége által hordozott memória retenció ne zavarja vizsgálatunk célját. Ezt követően rögzítettük az állatok alapaktivitását a már megszokot környezetben. Majd egyetlen A-Ghr mikroinjekció akut hatását vizsgáltuk egyetlen tesztben. Ebben a szituációban az állatok által megtett út és a doboz aljára festett négyzetek keresztezésének száma jól jellemzi a lokomóciót.

Irodalmi adatok az A-Ghr open field tesztben mérhető hatásával kapcsolatosan többfélék, részben ellentmondóak. Egyes szerzők azt tapasztalták, hogy az A-Ghr i.c.v. injekciója fokozta a keresztezések és az ágaskodások (rearing: mikor az állat két hátsó lábára áll, jellemző viselkedésforma az exploráció során) számát [115], mások ugyanakkor nem találtak változást a lokomócióban [40]. Tang-Christensen és munkatársai, pedig arról számoltak be, hogy az A-Ghr i.c.v. injekcióját követően 10 órával egy ún. késői csökkenést tapasztaltak a lokomócióban, azonban valószínűleg ezen csökkent aktivitás háttérében az A-Ghr okozta fokozott táplálékbevitel állhat [250]. Ezek a kísérletek i.c.v. mikroinjekciók voltak, melyek hatása jóval általánosabb, mint az általunk használt direkt agyi mikroinjekció és az A-Ghr alkalmazott dózisa minden esetben meghaladta az általunk, a direkt agyi beadások során használt dózist, annak sokszorososa volt (0,5-5 μg ill. 0,3-3 nmol).

Vizsgálatainkban nem találtunk változást a lokomócióban az akut 50 ng vagy 100 ng A-Ghr mikroinjekciók hatására.

Az emelt keresztpalló teszt alkalmas egy kémiai anyag szorongásra kifejtett hatásának vizsgálatára. A patkányok természetes viselkedésüknél fogva több időt töltenek az apparátus biztonságos, zárt karjain [52]. A szorongás keltő (anxiogén) anyagok növelik a normál tendenciát, azaz az averziót a nyitott karokkal szemben. Így az állat több időt tölt a zárt karokon, mozgása is erre a területre koncentrálódik, azaz a nyitott karokra történő belépések száma is csökken. Az anxiolitikus (szorongás csökkentő) anyagok hatására az állat kimeréskedik a nyitott karokra, sőt annak végeire is, többször lép ki és több időt tölt ott el. A rendelkezésünkre álló kevés adat szerint az i.p. vagy i.c.v. alkalmazott A-Ghr csökkenti a nyitott karokra történő kilépések számát és az ott eltöltött időt is, így anxiogén hatásának bizonyult [14,40]. Kísérletinkben azonban a BLA-ba injektált 50 vagy 100 ng dózisu A-Ghr nem befolyásolta a mért paramétereket, sem anxiogén, sem anxiolitikus hatást nem fejtett ki.

Eredményink alapján elmondhatjuk, hogy az intraamygdaláris A-Ghr az általunk alkalmazott dózisban nincs hatással a patkányok spontán motoros aktivitására, sem pedig a szorongásra. Így a passzív elhárító szituációban tapasztalt latenciaidő növekedés és a Morris féle úsztatási tesztben tapasztalt céltalálási latenciaidő csökkenés nem magyarázható az állatok lokomóciójában bekövetkezett változással és szorongás szintjének A-Ghr hatására bekövetkező megváltozásával. Így a tapasztalt hatások az A-Ghr memória kialakulást és retenciót moduláló hatásával magyarázhatók.

5.3.2. Passzív elhárító teszt

A két kompartmentes passzív elhárító teszt egy széleskörben használt vizsgálati módszer a memória kialakulás és rögzülés vizsgálatára. A passzív elhárító szituáció magában foglal egy kondicionált félelmi komponenst, mely jelentős emocionális változástokat idéz elő a kísérleti állatokban. A „passzív” azt jelenti, hogy a kísérleti szituációban az állatnak valamit nem kell megtennie ahhoz, hogy elkerülje a kellemetlen stimulust. Gyakorlatilag a szituáció egy jutalmazó-megerősítéses tanulásként is értelmezhető, ahol a megerősítés (jutalom) a büntetés elkerülése. Az elhárító magatartásban

bekövetkező „romlás” magyarázható emocionális változásokkal, kognitív funkciók zavarával vagy a megerősítés, a memória kialakulás, ill. retenció zavarával [232]. Ezen magatartási paradigmának legalább két kritikus pontja van, nevezetesen az elektromos sokk erejének optimalizálása és a mikroinjekciók megfelelő időzítése. Korábbi kísérleteink és az irodalmi adatok alapján két lehetőség adott a sokkolás erejét tekintve. Használhatunk gyenge (0,4 mA) erősségű, vagy erős (1 mA vagy nagyobb) elektromos sokkot. Abból a célból, hogy elkerüljük az állatok elektromos sokk okozta „lefagyását”(freezing-behaviour) és, hogy minimalizáljuk a fájdalmi komponenst (inkább egy kellemetlen mintsem egy erős, nagyon fájdalmas inger akartunk alkalmazni) kísérleteinkben a gyenge elektromos sokkot használtuk. Az ilyen kísérleti kondíciók mellett végzett vizsgálatok alkalmasak a tanulási tendencia és az A-Ghr lehetséges megerősítő hatásának vizsgálatára. Továbbá hangsúlyoznunk kell, hogy az erős elektromos sokk használata sokkal megfelelőbb a memória retenció vizsgálatára de egyáltalán nem alkalmas a memória kialakulás tanulmányozására [49,260]. A gyenge elektromos sokk azonban alkalmas mind a memória kialakulás mind pedig a memória retenció vizsgálatára.

A mikroinjekciók időzítését illetően, az A-Ghr elektromos sokk utáni alakulását választottuk [110]. Ezáltal kiküszöböltük az esetleges fájdalmas inger ill. egyéb nem specifikus változók (például az A-Ghr esetében eddig nem vizsgált, de ki nem zárható analgetikus hatás) A-Ghr által kiváltott tanulásra kifejtett hatását.

Ismert, hogy az AMY részt vesz az emóciók, tanulás, megerősítés és memória folyamatok kialakulásában és szabályozásában. Az AMY teljes eltávolítása [166,194] ill. a BLA vagy az ACE szelektív léziója [5,92,123] rontja a kísérleti állatok teljesítményét passzív elhárító szituációban.

Carlini és munkatársai számoltak be először arról, hogy az A-Ghr i.c.v. injekciója képes megváltoztatni a memória folyamatokat [40]. Tanulmányukban az A-Ghr i.c.v. alkalmazása dózis függő módon fokozta a memória retenciót “step down” tesztben. Ebben a kísérleti szituációban az állatnak egy kisméretű platformon kell megmaradnia, ha a platformról lelép elektromos sokkkal büntetik. Ezen a ponton újra ki kell hangsúlyoznunk azt a tényt, hogy alapvető különbség mutatkozik az i.c.v injekció és a direkt intracerebrális injekció hatása között [254]. Ahogy azt már korábban is említettük (előző fejezet) az i.c.v

alkalmazás sokkal “általánosabb” hatást fejthet ki mint a lokális agyi beadás, hiszen a diffúciónak köszönhetően minél távolabb van az adott agyi terület a beadás helyétől annál kisebb lesz ott a beadott anyag koncentrációja. Más kísérletekben azt találták, hogy az A-Ghr intrahippocampális, intraamygdaloid vagy a raphe dorsalisba adott injekciója fokozta a memóriát elhárításos szituációban [41]. Diano és munkatársai mérték az A-Ghr hatását a hippocampális szinaptikus plaszticitásra, a térbeli tanulásra, az averzív szituációhoz kötött tanulásra és az új tárgyak felismerésének képességéhez kötött tanulásra. Eredményeik azt mutatták, hogy az A-Ghr i.c.v. vagy szisztémás mikroinjekciója növelte a dendritikus tuskéken a szinapszisok számát és a poszt szinaptikus potenciáció (long term potentiation) kialakulását, miközben a kísérleti állatok jobban teljesítettek az említett magatartási tesztekben. Továbbá azt is megfigyelték, hogy a Ghr génkiütött egerek új tárgy felismerésének képességéhez kötött tanulása elmaradt egészséges társaikhoz képest [66]. Az A-Ghr szerepét a tárgyfelismerési memória kialakulásában további adatok is alátámasztják, nevezetesen, hogy a csökkent tárgyfelismerési memória visszafordítható A-Ghr akut i.c.v. infúziójával [39]. Mindezen bizonyítékokat figyelembe véve kijelenthetjük, hogy az A-Ghr biztosan hatással bír a memóriafolyamatokra. Legjobb ismereteink szerint, a korábban említett egyetlen kivétellel, ezidáig nem volt kísérleti bizonyíték az intraamygdaloid A-Ghr esetleges passzív elhárításos tanulást befolyásoló hatására. Abban az egyetlen kivételben [41] a szerzők azt találták, hogy az intraamygdaloid A-Ghr memória retenciót okozott “step down” tesztben. Ebben a kísérleti szituációban az állatok mozgása erősen korlátozott, gátolt. Ez a szituáció önmagában nagyobb stresszt jelent annak ellenére, hogy a kísérletben alkalmazott elektromos sokk gyenge volt (0,4 mA). Továbbá, ebben a kísérletben a célzott agyi terület az AMY elülső része volt, nem pedig a BLA, valamint meg kell jegyeznünk, hogy a szerzők által leírt sztereotaxikus koordináták alapján a mikroinjekciók inkább intracerebroventriculárisak voltak mint intraamygdalárisak. A mi kísérleteinkben a célzott agyi terület a BLA volt, mely kétségkívül részt vesz a félelem és a félelem alapú tanulás, memória kialakulásában és szabályozásában

Kísérleteinkben használt hatásos A-Ghr koncentráció 50 ng azaz 14,84 pmol/0,4 μ l volt, ami sokkal több mint a plazmában mérhető fiziológiás koncentráció (20 fmol/ml) [143], de sokkal alacsonyabb mint a korábbi direkt agyi beadások során alkalmazott

mennyiségek (0,3-3,0 nmol; 1000-10000 ng), melyek alkalmazása során az A-Ghr memória retenciót okozó hatását passzív elhárító szituációban megfigyelték [41].

Eredményeink bizonyítják, hogy averzív szituációban az intraamygdaloid A-Ghr fokozza a tanulási folyamatokat és a memóriát. Ez a hatás specifikus, mivel ekvimoláris mennyiségű ANT előkezeléssel kivédhető. Ugyanakkor további vizsgálatok szükségesek, hogy feltárják az intraamygdaloid A-Ghr tanulási mechanizmusokra kifejtett hatásának részleteit.

5.3.3. Morris féle úsztatási teszt

A Morris féle úsztatási teszt egy elfogadott tér-tanulást vizsgáló metodika. Alapvetően eltér az előbb tárgyalt passzív elhárításos tanulástól. A Morris féle úsztatási teszt során az állat tanulási folyamatait külső jelek, térbeli tájékozódást segítő szimbólumok, tárgyak szabályozzák. A szituáció az állat aktív közreműködését igényli. Az „aktív” azt jelenti az állatnak valamit meg kell tennie, hogy kikerüljön a számára nem kívánatos szituációból. Ugyanis a patkányok jól úsznak, de a megpihenés lehetősége nélkül hamar kellemetlenné válik számukra a szituáció. Azaz hasonlóan a passzív elhárításos tanuláshoz itt is fellelhető egy averzív komponens, bár jóval gyengébb. A teszt ily módon egy aktív elhárításos tanulásként is értelmezhető, amiben a kísérleti apparátusban elhelyezett platform megtalálása, azon való megpihenés értelmezhető mint a megerősítéshez vezető jutalom. A Morris féle úsztatási tesztben a patkányok rossz vagy „túl jó” teljesítményének oka lehet az alkalmazott kémiai ágens motoros aktivitást deprimáló vagy fokozó hatása, melyet a mikroinjekció megfelelő időzítésével, úszás utáni injekciókkal (post trial injection) küszöbölhetünk ki és természetesen az úszás sebességének, esetleg a megtett út hosszának mérésével kontrollálhatunk. Az úszás utáni injekciók alkalmazása megfelelő módszer, mivel ismert, hogy a memória rögzülés folyamata időben később történik az úszáshoz (platform megtalálásához) képest. Így esetünkben a patkányok térbeli tanulási tesztben történő teljesítményét a memória

kialakulása és retenciója ill. az ezeket befolyásoló emocionális és kongnitív változások határozzák meg [35].

Ahogy azt korábban részletesen diszkutáltuk Carlini és munkatársai voltak az elsők, akik az A-Ghr memóriafolyamatok szabályozásában betöltött szerepét felvetették [40]. Később Diano és társai tanulmányozták az A-Ghr hatását. Vizsgálataikban a szisztémásan ill. i.c.v. adott A-Ghr a hippocampusba jutva, mely struktúra szerepe a tératanulási folyamatokban vitathatatlan, fokozta a tératanulást. Az A-Ghr a hippocampusban lévő neuronokhoz kötődött és fokozta a dendritikus szinapszisok számát valamint a memóriafolyamatok hátterében álló elektrofiziológiai jelenség, a poszt szinaptikus potenciáció kialakulását [66].

Ezen eredmények azért is jelentősek, mert ugyan az AMY szerepe a tanulási és memóriafolyamatok szabályozásában [5,92,123,166,194] ill. speciálisan a tératanulás szabályozásában [224] bizonyított, úgy tűnik a tératanulásra gyakorolt hatása függ az amygdalo-hippocampális kapcsolatok épségétől. Az AMY és a hippocampus közötti anatómiai kapcsolatra utaló vizsgálati eredmények már az 1970-es, 80-as években megszülettek [232]. A funkcionális kapcsolat lehetőségét Mishkin vetette fel, amikor majmokban a megjegyzés képességének károsodását figyelte meg kombinált AMY és hippocampus léziót követően [183]. Aggleton és munkatársai arra az eredményre jutottak, hogy az AMY léziója önmagában nem változtatja meg a patkányok tanulási képességét forced-choice térváltoztatási tesztben, csak egy enyhe, az új ételekkel és környezettel szembeni neofóbia növekedés tapasztalható. Ellenben, az AMY és a hippocampus kombinált léziója rontotta a tératanulást és csökkentette a neofóbiát [3]. Később Roozendhal és munkatársai arról számoltak be, hogy a BLA szelektív léziója gátolta a hippocampusba adott glükokortikoidok hatását úsztatási tesztben. [224]. További bizonyítékként szolgál az AMY tératanulásban betöltött szerepére, hogy a d-amfetamin úszás utáni (post-trial) intraamygdaloid injekciója facilitálta a memória retenciót úszási tesztben [211].

Mivel az NMDA receptorok jól ismert, fontos szerepet játszanak a térbeli tanulási folyamatokban, lehetséges, hogy az A-Ghr okozta fokozott NMDA receptor funkció felelős a megfigyelt fokozott térbeli tanulásért. Az NMDA-Ghr rendszerek közti kapcsolatot támasztja alá az a megfigyelés, miszerint az NMDA receptorokon keresztül megvalósuló

hatékony GH szekréció GHS-R antagonistá D-Lys3-GHRP-6-al blokkolható volt [66,215].

Ismereteink szerint eddig senki sem tanulmányozta az intraamygdaloid A-Ghr lehetséges hatását a térbeli tanulásra. Vizsgálataink agyi célpontja a BLA volt, mely terület vitathatatlanul részt vesz az averzív komponenset tartalmazó szituációkhoz kötött tanulás és memóriefolyamatok kialakulásában és szabályozásában. A Morris féle úszási teszt averzív, emocionális és kognitív komponenseket is tartalmazó tanulási paradigma. Továbbá, averzív szituációban, mint az akut pszichés stressz, fokozott Ghr génexpresszió detektálható a gyomornyálkahártya endokrin sejtjeiben, ami a keringő Ghr koncentráció emelkedéséhez vezet [140]. A keringő Ghr a vér-agy gáton át belépve a központi idegrendszerbe direkt módon vagy a perifériás vegetatív afferensek segítségével, indirekt módon fejtheti ki hatását.

A hatékony dózis a Morris féle úszási tesztben hasonlóan a passzív elhárító szituációban tapasztaltakhoz az 50 ng (14,84 pmol)/0,4 µl/oldal A-Ghr volt.

Eredményeink azt mutatják, hogy az A-Ghr részt vesz a térbeli tanulás AMY-hoz kötött folyamatainak facilitálásában. Ez specifikus hatás, mert ekvimoláris mennyiségű ANT előkezeléssel felfüggeszthető volt.

6. Eredményeink összefoglalása

Eredményeink azt igazolják, hogy:

1) az A-Ghr a BLA-ba injektálva akut, dóziszfüggő, átmeneti táplálékfelvétel csökkenést okozott ad libitum táplált patkányokban, mely ANT előkezeléssel felfüggeszthető volt.

2) 24 órás éheztetést követően az A-Ghr mikroinjekciója nem okozott változást a táplálékfelvételben, ami arra utal, hogy az AMY-ba injektált A-Ghr hatására megvalósuló táplálékfelvétel csökkenés függ az éhség-jóllakottság állapotától.

3) a DA-Ghr BLA mikroinjekciója az A-Ghr kezeléseinkkel összevethető dózistartományban nem befolyásolta a táplálékfelvétel mértékét. Ez azt sugallja, hogy az általunk tapasztalt táplálékfelvétel csökkenés az A-Ghr hatására jött létre és nem az A-Ghr gyors deacylációja következtében az agyszövetben képződött DA-Ghr felelős a kialakult hatásért.

4) az A-Ghr i.c.v. mikroinjekciója, hasonlóan az irodalmi adatokhoz, fokozta a táplálékfelvételt. Ezen két ellentétes hatás rámutat a kevésbé specifikus i.c.v. beadás és a direkt agyi területre történő mikroinjekciók közti fontos különbségre.

5) a szignifikáns táplálékfelvétel csökkenést időben megelőzte a vércukorszint emelkedése és az inzulin plazmakoncentrációjának csökkenése, ami oka lehet a táplálékfelvétel csökkenésnek. Az A-Ghr BLA injekciója csökkentette a keringő össz-koleszterin és HDL koleszterin koncentrációját. Ezen változások lehetséges mechanizmusa az HT vegetatív központjaiból kiinduló vegetatív efferensek intraamygdaloid A-Ghr injekciók okozta aktivitás változása, mely az AMY és a HT anatómiai kapcsolatrendszerén keresztül valósulhat meg (lsd. 1.3. fejezet). Ezen efferensek azután a pancreas hormontermelését és a máj metabolikus folyamatait befolyásolva létrehozhatják az említett változásokat.

6) Magatartási kísérleteinkben, két különböző paradigmában igazoltuk, hogy az intraamygdaloid ghrelinerg mechanizmusok részt vesznek a memória-folyamatok szabályozásában, a hatás GHS-R specifikus ANT-al felfüggeszthető volt.

7) A memória kialakulását és a memória retencióját jellemző latencia idő változások nem magyarázhatók a spontán motoros aktivitás vagy szorongásra kifejtett hatással, mivel open field és emelt keresztpalló tesztben nem találtunk erre utaló változásokat.

Az A-Ghr hatásmechanizmusának pontos ismerete, a receptorális mechanizmusok, az eltérő agyi területeken létrehozott eltérő változások magyarázata azonban további kísérleteket tesznek szükségessé. Azt reméljük, hogy kísérleteink eredményei segítenek miként egyrészt az A-Ghr komplex hatásának megismerésében, másrészt a központi idegrendszer modulálásában szerepet játszó neuropeptid-mechanizmusok feltérképezésében.

7. A ghrelin klinikai jelentősége

Az A-Ghr felfedezését követően az alap kutatások és a klinikai vizsgálatok középpontjába került. Humán vizsgálatokban a szérumban A-Ghr koncentrációja negatív korrelációt mutat a testtömeggel. Azon betegekben, akik anorexia nervosában, vagy tumoros cachexiában szenvednek, magas A-Ghr értéket mértek, míg elhízott betegekben és bulimia nervosában alacsonyabban [24,55,97]. Változik továbbá a szérumban A-Ghr koncentrációk változásának kinetikája e betegekben. Míg egészséges egyéneknél a táplálékfelvétel hatására az A-Ghr szintje csökken, éhezéskor pedig nő, addig anorexia nervosában eltűnik ez az étkezés indukálta csökkenés. A genetikai alapon kialakuló elhízás egyik jó példája a Prader-Willi szindróma, melyre a már gyermekkorban kialakuló GH deficiencia, hyperphagia és a következményes testtömeg növekedés jellemző. Ellentétben az elhízás többi formájával, itt igen magas Ghr koncentrációk mérhetőek, mely a hyperphagia egyik alapja lehet [53,64]. Inszulin rezisztenciában és 2-es típusú diabetesben szintén csökkent Ghr szintet találtak [220]. Ugyanakkor streptozotocin indukálta diabeteses patkányokban magas értékek mérhetőek, ami valószínűleg a kialakuló negatív energiaháztartásnak is köszönhető, s inzulin kezelésre megszűnik [1]. Mindez azt sugallja, hogy az A-Ghr fontos szerepet játszik egyes betegségek pathogenesisében, ezért a Ghr-el kapcsolatos ismeretek bővülése a jövőben segítséget nyújthat kialakulásuk pontosabb megértésében, esetleg diagnosztizálásában, valamint terápiájában is. Bízható klinikai adatok alapján tervezik Ghr alkalmazását GH hiányos állapotok kezelésében [18,63]. Továbbá az elhízás kezelésében megkísérelnék a közeljövőben A-Ghr ellenes antitestek használatát [21], anorexia nervosa esetében pedig A-Ghr-t alkalmaznának [189]. Patkány modellen végzett vizsgálatok szerint erős prokinetikus hatása révén alkalmas lehet postoperatív ileus kialakulásának preventív kezelésére is [255].

Bár az elmúlt évek során számos információ gyűlt össze a Ghr élettani ill. betegségekben játszott patho-etiológiai szerepéről, még mindig sok az ismeretlen tényező. Reményeink szerint a Ghr élettani szerepének jobb megértését célzó vizsgálatainkkal hozzá

tudunk járulni a fent említett betegségek molekuláris hátterének jobb megértéséhez és az említett terápiás lehetőségek gyakorlatban való megvalósulásához és új terápiás lehetőségek kidolgozásához.

8. Rövidítések jegyzéke

A-Ghr: acylált ghrelin

GRP: gastrin releasing peptide

AgRP: agouti-related peptide

AMY: amygdala

ANT: antagonista (D-Lys3-GHRP-6)

nARC: nucleus arcuatus

DA-Ghr: desacyl-ghrelin

BLA: basolaterális amygdala

CRF: corticotropin releasing factor

Ghr: a szervezetben található teljes ghrelin mennyiség

GHRP: growth hormon releasing peptide

GHS: növekedési hormon szekretagóg

GHS-R: növekedési hormon szekretagóg receptor

HT: hypothalamus

i.c.v.: intracerebroventricularis

i.p.: intraperitonealis

i.v.: intravénás

LH: laterális hypothalamus

NPY: neuropeptid Y

PVN: nucleus paraventricularis

VMH: ventromediális hypothalamus

VTA: ventralis tegmentalis area

Nacc: nucleus accumbens

NTS: nucleus tractus solitarii

GH: növekedési hormon

DM: diabetes mellitus

PEPCK: phosphoenolpyruvat carboxykinase

NEVB: Noldus EthoVision Basic szoftver

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, **dr. Lénárd László** akadémikusnak, a PTE ÁOK Élettani Intézet vezetőjének, hogy munkámat figyelemmel kísérte. Külön köszönettel tartozom hasznos tanácsaiért, szakmai és emberi támogatásáért.

Köszönet illeti közvetlen munkatársaimat, **dr. László Kristóf** egyetemi tanársegédet a kísérletek kivitelezésében és azok szakmai értékelésében nyújtott segítségéért, **Bendl Zsuzsanna és Schulteisz Anna** laboratóriumi asszisztensnőket a kísérletek során nyújtott technikai segítségükért ill. a szövettani munkák magas szintű kivitelezéséért. Köszönöm segítségét és támogatását **dr. Karádi Zoltán** egyetemi tanárnak.

Végül köszönöm mindazoknak akik az évek során hasznos tanácsaikkal, észrevételeikkel segítették munkámat.

10. Irodalomjegyzék

- [1] E. Adeghate and A.S. Ponery, Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats, *J Neuroendocrinol* 14 (2002) 555-560.
- [2] J.P. Aggleton, A description of the amygdalo-hippocampal interconnections in the macaque monkey, *Exp Brain Res* 64 (1986) 515-526.
- [3] J.P. Aggleton, H.S. Blindt and J.N. Rawlins, Effects of amygdaloid and amygdaloid-hippocampal lesions on object recognition and spatial working memory in rats, *Behav Neurosci* 103 (1989) 962-974.
- [4] D.G. Amaral, R.B. Veazey and W.M. Cowan, Some observations on hypothalamo-amygdaloid connections in the monkey, *Brain Res* 252 (1982) 13-27.
- [5] C. Ambrogi Lorenzini, C. Bucherelli, A. Giachetti, L. Mugnai and G. Tassoni, Effects of nucleus basolateralis amygdalae neurotoxic lesions on aversive conditioning in the rat, *Physiol Behav* 49 (1991) 765-770.
- [6] B.K. Anand, Brobeck, J.R., Localization of "feeding center" in the hypothalamus of the rat, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77 (1951) 323-324.
- [7] N.E. Anden, Dahlstrom, A., Fuxe, K. and Larsson, K., Functional role of the nigro-neostriatal dopamine neurons, *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 24 (1966) 263-274.
- [8] P.L. Andrews and G.J. Sanger, Abdominal vagal afferent neurones: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction, *Curr Opin Pharmacol* 2 (2002) 650-656.
- [9] S. Aou, Y. Oomura, L. Lenard, H. Nishino, A. Inokuchi, T. Minami and H. Misaki, Behavioral significance of monkey hypothalamic glucose-sensitive neurons, *Brain Res* 302 (1984) 69-74.
- [10] H. Ariyasu, K. Takaya, T. Tagami, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Suda, T. Koh, K. Natsui, S. Toyooka, G. Shirakami, T. Usui, A. Shimatsu, K. Doi, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa and K. Nakao, Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans, *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 4753-4758.
- [11] E. Arvat, L. Di Vito, F. Broglio, M. Papotti, G. Muccioli, C. Dieguez, F.F. Casanueva, R. Deghenghi, F. Camanni and E. Ghigo, Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans, *J Endocrinol Invest* 23 (2000) 493-495.
- [12] E. Arvat, M. Maccario, L. Di Vito, F. Broglio, A. Benso, C. Gottero, M. Papotti, G. Muccioli, C. Dieguez, F.F. Casanueva, R. Deghenghi, F. Camanni and E. Ghigo, Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone, *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 1169-1174.
- [13] A. Asakawa, A. Inui, T. Kaga, G. Katsuura, M. Fujimiya, M.A. Fujino and M. Kasuga, Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice, *Gut* 52 (2003) 947-952.

- [14] A. Asakawa, A. Inui, T. Kaga, H. Yuzuriha, T. Nagata, M. Fujimiya, G. Katsuura, S. Makino, M.A. Fujino and M. Kasuga, A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice, *Neuroendocrinology* 74 (2001) 143-147.
- [15] A. Asakawa, A. Inui, T. Kaga, H. Yuzuriha, T. Nagata, N. Ueno, S. Makino, M. Fujimiya, A. Niiijima, M.A. Fujino and M. Kasuga, Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin, *Gastroenterology* 120 (2001) 337-345.
- [16] M. Bagnasco, G. Tulipano, M.R. Melis, A. Argiolas, D. Cocchi and E.E. Muller, Endogenous ghrelin is an orexigenic peptide acting in the arcuate nucleus in response to fasting, *Regul Pept* 111 (2003) 161-167.
- [17] G. Baldanzi, N. Filigheddu, S. Cutrupi, F. Catapano, S. Bonisconi, A. Fubini, D. Malan, G. Baj, R. Granata, F. Broglio, M. Papotti, N. Surico, F. Bussolino, J. Isgaard, R. Deghenghi, F. Sinigaglia, M. Prat, G. Muccioli, E. Ghigo and A. Graziani, Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT, *J Cell Biol* 159 (2002) 1029-1037.
- [18] R. Baldelli, X.L. Otero, J.P. Camina, O. Gualillo, V. Popovic, C. Dieguez and F.F. Casanueva, Growth hormone secretagogues as diagnostic tools in disease states, *Endocrine* 14 (2001) 95-99.
- [19] W.A. Banks, M. Tschop, S.M. Robinson and M.L. Heiman, Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure, *J Pharmacol Exp Ther* 302 (2002) 822-827.
- [20] M.G. Baxter and E.A. Murray, The amygdala and reward, *Nat Rev Neurosci* 3 (2002) 563-573.
- [21] H.E. Bays, Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets, *Obes Res* 12 (2004) 1197-1211.
- [22] B. Beck, A. Stricker-Krongrad, A. Burlet, J.P. Nicolas and C. Burlet, Influence of diet composition on food intake and hypothalamic neuropeptide Y (NPY) in the rat, *Neuropeptides* 17 (1990) 197-203.
- [23] M.A. Bednarek, S.D. Feighner, S.S. Pong, K.K. McKee, D.L. Hreniuk, M.V. Silva, V.A. Warren, A.D. Howard, L.H. Van Der Ploeg and J.V. Heck, Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a, *J Med Chem* 43 (2000) 4370-4376.
- [24] S. Bellone, A. Rapa, D. Vivenza, N. Castellino, A. Petri, J. Bellone, E. Me, F. Broglio, F. Prodam, E. Ghigo and G. Bona, Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood, *J Endocrinol Invest* 25 (2002) RC13-15.
- [25] J.F. Bernard, M. Alden and J.M. Besson, 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* 329 (1993) 201-229.
- [26] B. Blatt, Lyon, M., The interrelationship of forebrain and midbrain structures involved in feeding behavior, *Acta Neurol Scand* 44 (1968) 576-595.
- [27] W.A. Blom, A. Lluch, S. Vinoy, A. Stafleu, R. van den Berg, J.J. Holst, F.J. Kok and H.F. Hendriks, Effects of gastric emptying on the postprandial ghrelin response, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 (2006) E389-395.

- [28] J. Blundell, Pharmacological approaches to appetite suppression, *Trends Pharmacol Sci* 12 (1991) 147-157.
- [29] C.Y. Bowers, Growth hormone-releasing peptide (GHRP), *Cell Mol Life Sci* 54 (1998) 1316-1329.
- [30] P.J. Brighton, P.G. Szekeres and G.B. Willars, Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles, *Pharmacol Rev* 56 (2004) 231-248.
- [31] J.R. Brobeck, Food intake as a mechanism of temperature regulation, *Zale J. Biol. Med.* 20 (1948) 545-552.
- [32] F. Broglio, E. Arvat, A. Benso, C. Gottero, G. Muccioli, M. Papotti, A.J. van der Lely, R. Deghenghi and E. Ghigo, Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans, *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 5083-5086.
- [33] F. Broglio, A. Benso, C. Castiglioni, C. Gottero, F. Prodam, S. Destefanis, C. Gauna, A.J. van der Lely, R. Deghenghi, M. Bo, E. Arvat and E. Ghigo, The endocrine response to ghrelin as a function of gender in humans in young and elderly subjects, *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003) 1537-1542.
- [34] F. Broglio, C. Gottero, A. Benso, F. Prodam, S. Destefanis, C. Gauna, M. Maccario, R. Deghenghi, A.J. van der Lely and E. Ghigo, Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans, *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003) 4268-4272.
- [35] J. Bures, O. Buresova and J. Huston, *Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior.*, second edition. New York/Amsterdam. Elsevier Science Publishers. (1983).
- [36] L. Cahill, Modulation of long term memory storage in humans emotional arousal: adrenergic activation and the amygdala. In: *The amygdala: a functional analysis.*, Oxford University Press, New York (2000) 424-445.
- [37] B.A. Campbell and F.D. Sheffield, Relation of random activity to food deprivation, *J Comp Physiol Psychol* 46 (1953) 320-322.
- [38] V.P. Carlini, R.C. Gaydou, H.B. Schioth and S.R. de Barioglio, Selective serotonin reuptake inhibitor (fluoxetine) decreases the effects of ghrelin on memory retention and food intake, *Regul Pept* 140 (2007) 65-73.
- [39] V.P. Carlini, A.C. Martini, H.B. Schioth, R.D. Ruiz, M. Fiol de Cuneo and S.R. de Barioglio, Decreased memory for novel object recognition in chronically food-restricted mice is reversed by acute ghrelin administration, *Neuroscience* 153 (2008) 929-934.
- [40] V.P. Carlini, M.E. Monzon, M.M. Varas, A.B. Cragnolini, H.B. Schioth, T.N. Scimonelli and S.R. de Barioglio, Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats, *Biochem Biophys Res Commun* 299 (2002) 739-743.
- [41] V.P. Carlini, M.M. Varas, A.B. Cragnolini, H.B. Schioth, T.N. Scimonelli and S.R. de Barioglio, Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin, *Biochem Biophys Res Commun* 313 (2004) 635-641.
- [42] J. Carlsen and L. Heimer, The basolateral amygdaloid complex as a cortical-like structure, *Brain Res* 441 (1988) 377-380.

- [43] J. Carlsen and L. Heimer, The projection from the parataenial thalamic nucleus, as demonstrated by the Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) method, identifies a subterritorial organization of the ventral striatum, *Brain Res* 374 (1986) 375-379.
- [44] N.R. Carlson, *Psychology. The science of behaviour.*, 748 Allyn and Bacon Inc. Boston, London, Sydney, Toronto (1987).
- [45] J.P. Chanoine and A.C. Wong, Ghrelin gene expression is markedly higher in fetal pancreas compared with fetal stomach: effect of maternal fasting, *Endocrinology* 145 (2004) 3813-3820.
- [46] C.Y. Chen, A. Inui, A. Asakawa, K. Fujino, I. Kato, C.C. Chen, N. Ueno and M. Fujimiya, Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats, *Gastroenterology* 129 (2005) 8-25.
- [47] K.M. Chu, K.B. Chow, P.K. Leung, P.N. Lau, C.B. Chan, C.H. Cheng and H. Wise, Over-expression of the truncated ghrelin receptor polypeptide attenuates the constitutive activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by ghrelin receptors but has no effect on ghrelin-stimulated extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity, *Int J Biochem Cell Biol* 39 (2007) 752-764.
- [48] G.A. Clark, The influence of the vagus nerves on the secretions of insulin, *J Physiol* 73 (1931) 297-304.
- [49] W. Classen and C. Mondadori, Facilitation or inhibition of memory by morphine: a question of experimental parameters, *Experientia* 40 (1984) 506-509.
- [50] M.A. Cowley, R.G. Smith, S. Diano, M. Tschop, N. Pronchuk, K.L. Grove, C.J. Strasburger, M. Bidlingmaier, M. Esterman, M.L. Heiman, L.M. Garcia-Segura, E.A. Nillni, P. Mendez, M.J. Low, P. Sotonyi, J.M. Friedman, H. Liu, S. Pinto, W.F. Colmers, R.D. Cone and T.L. Horvath, The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis, *Neuron* 37 (2003) 649-661.
- [51] L.F. Crovetti, Mancia M., M. Mariotti, M. Porrini, P. Spinnler, G. Testolini, Food intake after amygdaloid lesions in the rats, *Nutr. Res.* 15 (1995) 565-570.
- [52] A.P. Cruz, F. Frei and F.G. Graeff, Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze, *Pharmacol Biochem Behav* 49 (1994) 171-176.
- [53] D.E. Cummings, K. Clement, J.Q. Purnell, C. Vaisse, K.E. Foster, R.S. Frayo, M.W. Schwartz, A. Basdevant and D.S. Weigle, Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome, *Nat Med* 8 (2002) 643-644.
- [54] D.E. Cummings, J.Q. Purnell, R.S. Frayo, K. Schmidova, B.E. Wisse and D.S. Weigle, A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans, *Diabetes* 50 (2001) 1714-1719.
- [55] D.E. Cummings, D.S. Weigle, R.S. Frayo, P.A. Breen, M.K. Ma, E.P. Dellinger and J.Q. Purnell, Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery, *N Engl J Med* 346 (2002) 1623-1630.
- [56] U. Cuntz, E. Fruhauf, R. Wawarta, M. Tschop, C. Folwaczny, R. Riepl, P. Lehnert, M. Fichter and B. Otto, A role for the novel weight-regulating hormone ghrelin in anorexia nervosa, *Am Clin Lab* 21 (2002) 22-23.

- [57] D.L. Curry, Reflex inhibition of insulin secretion: vagus nerve involvement via CNS, *Am J Physiol* 247 (1984) E827-832.
- [58] Y. Date, M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M.S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa and M. Nakazato, Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans, *Endocrinology* 141 (2000) 4255-4261.
- [59] Y. Date, N. Murakami, M. Kojima, T. Kuroiwa, S. Matsukura, K. Kangawa and M. Nakazato, Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats, *Biochem Biophys Res Commun* 275 (2000) 477-480.
- [60] Y. Date, N. Murakami, K. Toshinai, S. Matsukura, A. Nijima, H. Matsuo, K. Kangawa and M. Nakazato, The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats, *Gastroenterology* 123 (2002) 1120-1128.
- [61] Y. Date, M. Nakazato, S. Hashiguchi, K. Dezaki, M.S. Mondal, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, T. Arima, H. Matsuo, T. Yada and S. Matsukura, Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion, *Diabetes* 51 (2002) 124-129.
- [62] Y. Date, M. Nakazato, N. Murakami, M. Kojima, K. Kangawa and S. Matsukura, Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion, *Biochem Biophys Res Commun* 280 (2001) 904-907.
- [63] R. Deghenghi, F. Broglio, M. Papotti, G. Muccioli and E. Ghigo, Targeting the ghrelin receptor: orally active GHS and cortistatin analogs, *Endocrine* 22 (2003) 13-18.
- [64] A. DelParigi, M. Tschop, M.L. Heiman, A.D. Salbe, B. Vozarova, S.M. Sell, J.C. Bunt and P.A. Tataranni, High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome, *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 5461-5464.
- [65] I. Depoortere, Motilin and motilin receptors: characterization and functional significance, *Verh K Acad Geneesk Belg* 63 (2001) 511-529.
- [66] S. Diano, S.A. Farr, S.C. Benoit, E.C. McNay, I. da Silva, B. Horvath, F.S. Gaskin, N. Nonaka, L.B. Jaeger, W.A. Banks, J.E. Morley, S. Pinto, R.S. Sherwin, L. Xu, K.A. Yamada, M.W. Sleeman, M.H. Tschop and T.L. Horvath, Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance, *Nat Neurosci* 9 (2006) 381-388.
- [67] S.L. Dickson, A.R. Bailey and G. Leng, Growth hormone (GH) secretagogues and neuroendocrine regulation of GH secretion, *Growth Horm IGF Res* 9 Suppl A (1999) 89-91.
- [68] C. Dornonville de la Cour, M. Bjorkqvist, A.K. Sandvik, I. Bakke, C.M. Zhao, D. Chen and R. Hakanson, A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control, *Regul Pept* 99 (2001) 141-150.
- [69] V. Dumery and D. Blozovski, Development of amygdaloid cholinergic mediation of passive avoidance learning in the rat. I. Muscarinic mechanisms, *Exp Brain Res* 67 (1987) 61-69.
- [70] M.E. Ellis, Manipulation of the amygdala noradrenergic system impairs extinction of passive avoidance, *Brain Res* 324 (1984) 129-133.

- [71] M.E. Ellis and R.P. Kesner, The noradrenergic system of the amygdala and aversive information processing, *Behav Neurosci* 97 (1983) 399-415.
- [72] M.R.Y. Fallon J. H., Catecholamine innervation of the basal forebrain. Topography of the dopamine projection to the neostriatum, *J. Comp. Neurol.* 180 (1978) 545-580.
- [73] S.D. Feighner, C.P. Tan, K.K. McKee, O.C. Palyha, D.L. Hreniuk, S.S. Pong, C.P. Austin, D. Figueroa, D. MacNeil, M.A. Cascieri, R. Nargund, R. Bakshi, M. Abramovitz, R. Stocco, S. Kargman, G. O'Neill, L.H. Van Der Ploeg, J. Evans, A.A. Patchett, R.G. Smith and A.D. Howard, Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system, *Science* 284 (1999) 2184-2188.
- [74] E. Fekete, J. Vigh, E.E. Bagi and L. Lenard, Gastrin-releasing peptide microinjected into the amygdala inhibits feeding, *Brain Res* 955 (2002) 55-63.
- [75] E.M. Fekete, E.E. Bagi, K. Toth and L. Lenard, Neuromedin C microinjected into the amygdala inhibits feeding, *Brain Res Bull* 71 (2007) 386-392.
- [76] J.S. Flier, Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic, *Cell* 116 (2004) 337-350.
- [77] E. Fonberg, Amygdala functions within the alimentary system, *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 34 (1974) 435-466.
- [78] E. Fonberg, The amygdaloid body and its significance in the appetitive and emotional behavior in animals, *Acta Physiol Pol*, 25 (1974) 93-139.
- [79] E. Fonberg, Aphagia, produced by destruction of the dorsomedial amygdala in dogs, *Bull Acad Pol Sci Biol* 14 (1966) 719-722.
- [80] E. Fonberg, The effect of hypothalamic and amygdalar lesions on alimentary behavior and thermoregulation, *J Physiol (Paris)* 63 (1971) 249-251.
- [81] E. Fonberg, Hyperphagia produced by lateral amygdalar lesions in dogs, *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 31 (1971) 19-32.
- [82] E. Fonberg, The instrumental alimentary-avoidance differentiation in dogs, *Acta Biol Exp (Warsz)* 28 (1968) 363-373.
- [83] E. Fonberg, The normalizing effect of lateral amygdalar lesions upon the dorsomedial amygdalar syndrome in dogs, *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 33 (1973) 449-466.
- [84] J.L. Fudge and A.B. Emiliano, The extended amygdala and the dopamine system: another piece of the dopamine puzzle, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 15 (2003) 306-316.
- [85] L. Galas, N. Chartrel, M. Kojima, K. Kangawa and H. Vaudry, Immunohistochemical localization and biochemical characterization of ghrelin in the brain and stomach of the frog *Rana esculenta*, *J Comp Neurol* 450 (2002) 34-44.
- [86] M. Gallagher and P.C. Holland, The amygdala complex: multiple roles in associative learning and attention, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 11771-11776.
- [87] R. Galosi, A. Hajnal and L. Lenard, Nucleus accumbens and body weight regulation: neurochemical lesions, *Neurobiology (Bp)* 5 (1997) 67-70.

- [88] E. Ghigo, E. Arvat, F. Broglio, R. Giordano, L. Gianotti, G. Muccioli, M. Papotti, A. Graziani, G. Bisi, R. Deghenghi and F. Camanni, Endocrine and non-endocrine activities of growth hormone secretagogues in humans, *Horm Res* 51 Suppl 3 (1999) 9-15.
- [89] S. Gnanapavan, B. Kola, S.A. Bustin, D.G. Morris, P. McGee, P. Fairclough, S. Bhattacharya, R. Carpenter, A.B. Grossman and M. Korbonits, The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans, *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 2988.
- [90] A.J. Gold, Bedrak, E., Heat stress and NaCl consumption in the rat, *Life Sci*, 6 (1967) 2519-2526.
- [91] E. Grastyán, Szabó, I., Molnár, P., Kolta, P., Rebound, reinforcement and selfstimulation, *Comm. Behav. Biol* (1968) 235-266.
- [92] S.P. Grossman, L. Grossman and L. Walsh, Functional organization of the rat amygdala with respect to avoidance behavior, *J Comp Physiol Psychol* 88 (1975) 829-850.
- [93] O. Gualillo, J. Caminos, M. Blanco, T. Garcia-Caballero, M. Kojima, K. Kangawa, C. Dieguez and F. Casanueva, Ghrelin, a novel placental-derived hormone, *Endocrinology* 142 (2001) 788-794.
- [94] X.M. Guan, H. Yu, O.C. Palyha, K.K. McKee, S.D. Feighner, D.J. Sirinathsinghji, R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg and A.D. Howard, Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues, *Brain Res Mol Brain Res* 48 (1997) 23-29.
- [95] A. Hajnal, P. Sandor, G. Jando, I. Vida, A. Czurko, Z. Karadi and L. Lenard, Feeding disturbances and EEG activity changes after amygdaloid kainate lesions in the rat, *Brain Res Bull* 29 (1992) 909-916.
- [96] H.A. Halem, J.E. Taylor, J.Z. Dong, Y. Shen, R. Datta, A. Abizaid, S. Diano, T.L. Horvath and M.D. Culler, A novel growth hormone secretagogue-1a receptor antagonist that blocks ghrelin-induced growth hormone secretion but induces increased body weight gain, *Neuroendocrinology* 81 (2005) 339-349.
- [97] T.K. Hansen, R. Dall, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, J.S. Christiansen and J.O. Jorgensen, Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity, *Clin Endocrinol (Oxf)* 56 (2002) 203-206.
- [98] H. Hashimoto, H. Fujihara, M. Kawasaki, T. Saito, M. Shibata, H. Otsubo, Y. Takei and Y. Ueta, Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats, *Endocrinology* 148 (2007) 1638-1647.
- [99] S.W. Heterington, The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions, *Am J Physiol* 136 (1942) 609-617.
- [100] A.K. Hewson and S.L. Dickson, Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats, *J Neuroendocrinol* 12 (2000) 1047-1049.
- [101] C. Holdstock, J. Ludvigsson and F.A. Karlsson, Abnormal ghrelin secretion in new onset childhood Type 1 diabetes, *Diabetologia* 47 (2004) 150-151.
- [102] B. Holst, K.L. Egerod, E. Schild, S.P. Vickers, S. Cheetham, L.O. Gerlach, L. Storjohann, C.E. Stidsen, R. Jones, A.G. Beck-Sickinger and T.W. Schwartz, GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin, *Endocrinology* 148 (2007) 13-20.

- [103] D.A. Hopkins and G. Holstege, Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat, *Exp Brain Res* 32 (1978) 529-547.
- [104] H. Hosoda, K. Doi, N. Nagaya, H. Okumura, E. Nakagawa, M. Enomoto, F. Ono and K. Kangawa, Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples, *Clin Chem* 50 (2004) 1077-1080.
- [105] H. Hosoda, M. Kojima, H. Matsuo and K. Kangawa, Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue, *Biochem Biophys Res Commun* 279 (2000) 909-913.
- [106] H. Hosoda, M. Kojima, H. Matsuo and K. Kangawa, Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor, *J Biol Chem* 275 (2000) 21995-22000.
- [107] H. Hosoda, M. Kojima, T. Mizushima, S. Shimizu and K. Kangawa, Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing, *J Biol Chem* 278 (2003) 64-70.
- [108] A.D. Howard, S.D. Feighner, D.F. Cully, J.P. Arena, P.A. Liberato, C.I. Rosenblum, M. Hamelin, D.L. Hreniuk, O.C. Palyha, J. Anderson, P.S. Paresse, C. Diaz, M. Chou, K.K. Liu, K.K. McKee, S.S. Pong, L.Y. Chaung, A. Elbrecht, M. Dashkevich, R. Heavens, M. Rigby, D.J. Sirinathsinghji, D.C. Dean, D.G. Melillo, A.A. Patchett, R. Nargund, P.R. Griffin, J.A. DeMartino, S.K. Gupta, J.M. Schaeffer, R.G. Smith and L.H. Van der Ploeg, A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release, *Science* 273 (1996) 974-977.
- [109] C.L. Hull, *Principles of behaviour.*, Appleton-Century-Crofts, New York (1943).
- [110] J.P. Huston and C.C. Mueller, Enhanced passive avoidance learning and appetitive T-maze learning with post-trial rewarding hypothalamic stimulation, *Brain Res Bull* 3 (1978) 265-270.
- [111] J.P. Huston and M.S. Oitzl, The relationship between reinforcement and memory: parallels in the rewarding and mnemonic effects of the neuropeptide substance P, *Neurosci Biobehav Rev* 13 (1989) 171-180.
- [112] A. Inui, Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach, *Nat Rev Neurosci* 2 (2001) 551-560.
- [113] D.M. Jacobowitz, T.L. O'Donohue, W.Y. Chey and T.M. Chang, Mapping of motilin-immunoreactive neurons of the rat brain, *Peptides* 2 (1981) 479-487.
- [114] D.M. Jacobowitz, Palkovits, M., Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. I. Forebrain (telencephalon, diencephalon), *J Comp Neurol* 157 (1974) 13-28.
- [115] M. Jaszberenyi, E. Bujdoso, Z. Bagosi and G. Telegdy, Mediation of the behavioral, endocrine and thermoregulatory actions of ghrelin, *Horm Behav* 50 (2006) 266-273.
- [116] H. Kageyama, H. Funahashi, M. Hirayama, F. Takenoya, T. Kita, S. Kato, J. Sakurai, E.Y. Lee, S. Inoue, Y. Date, M. Nakazato, K. Kangawa and S. Shioda, Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas, *Regul Pept* 126 (2005) 67-71.

- [117] J. Kamegai, H. Tamura, T. Shimizu, S. Ishii, H. Sugihara and I. Wakabayashi, Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats, *Diabetes* 50 (2001) 2438-2443.
- [118] Z. Karadi, B. Faludi, L. Lenard, A. Czurko, C. Niedetzky, I. Vida and H. Nishino, Glucose-sensitive neurons of the globus pallidus: II. Complex functional attributes, *Brain Res Bull* 37 (1995) 157-162.
- [119] Z. Karadi, Y. Oomura, H. Nishino, T.R. Scott, L. Lenard and S. Aou, Complex attributes of lateral hypothalamic neurons in the regulation of feeding of alert rhesus monkeys, *Brain Res Bull* 25 (1990) 933-939.
- [120] Z. Karadi, Y. Oomura, H. Nishino, T.R. Scott, L. Lenard and S. Aou, Responses of lateral hypothalamic glucose-sensitive and glucose-insensitive neurons to chemical stimuli in behaving rhesus monkeys, *J Neurophysiol* 67 (1992) 389-400.
- [121] Z. Karadi, T.R. Scott, Y. Oomura, H. Nishino, S. Aou and L. Lenard, Complex functional attributes of amygdaloid gustatory neurons in the rhesus monkey, *Ann N Y Acad Sci* 855 (1998) 488-492.
- [122] A. Katsuki, H. Urakawa, E.C. Gabazza, S. Murashima, K. Nakatani, K. Togashi, Y. Yano, Y. Adachi and Y. Sumida, Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus, *Eur J Endocrinol* 151 (2004) 573-577.
- [123] E.D. Kemble, Tapp, J. T., Passive and active avoidance performance following small amygdaloid lesions in rats., *Physiol Behav* 3 (1968) 713-718.
- [124] G.C. Kennedy, The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat, *Proc. Roy. Soc.* 140 (1953) 578-592.
- [125] G.A. Kevetter and S.S. Winans, Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the "vomeronasal amygdala", *J Comp Neurol* 197 (1981) 81-98.
- [126] G.A. Kevetter and S.S. Winans, Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. II. Efferents of the "olfactory amygdala", *J Comp Neurol* 197 (1981) 99-111.
- [127] S.W. Kim, K.W. Kim, C.S. Shin, J. Park do, K.S. Park, B.Y. Cho, H.K. Lee and S.Y. Kim, Acylated ghrelin secretion is acutely suppressed by oral glucose load or insulin-induced hypoglycemia independently of basal growth hormone secretion in humans, *Horm Res* 67 (2007) 211-219.
- [128] R.W.a.D.P. Kimble, Effect of amygdaloid lesions on retention of an avoidance response in overtrained and nonovertrained rats, *Psychonom. Sci.* 6 (1966) 9-10.
- [129] H.B. Klüver, and Bucy, P.C., Preliminary analysis of function of the temporal lobes in monkeys., *Arch. Neurol. Psychiatry* 42 (1939) 979-1000.
- [130] M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo and K. Kangawa, Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach, *Nature* 402 (1999) 656-660.
- [131] M. Kojima, H. Hosoda and K. Kangawa, Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor, *Horm Res* 56 Suppl 1 (2001) 93-97.
- [132] M. Kojima and K. Kangawa, Ghrelin: structure and function, *Physiol Rev* 85 (2005) 495-522.

- [133] R. Korczynski and E. Fonberg, Instrumental reactions and food and water intake in medial amygdala rats, *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 36 (1976) 667-685.
- [134] J.E. Krettek and J.L. Price, Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat, *J Comp Neurol* 178 (1978) 225-254.
- [135] J.E. Krettek and J.L. Price, A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections, *J Comp Neurol* 178 (1978) 255-280.
- [136] J.E. Krettek and J.L. Price, A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex, *Brain Res* 67 (1974) 169-174.
- [137] J.E. Krettek and J.L. Price, Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat, *J Comp Neurol* 172 (1977) 723-752.
- [138] J.E. Krettek, Price, J.L., Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat., *J. Comp. Neurol.* 178 (1978) 225-254.
- [139] J.E. Krettek, Price, J.L., Projection from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat., *J. Comp. Neurol.* 172 (1977) 687-722.
- [140] E. Kristensson, M. Sundqvist, M. Astin, M. Kjerling, H. Mattsson, C. Dornonville de la Cour, R. Hakanson and E. Lindstrom, Acute psychological stress raises plasma ghrelin in the rat, *Regul Pept* 134 (2006) 114-117.
- [141] F. Laczi, O. Gaffori, E.R. De Kloet and D. De Wied, Arginine-vasopressin content of hippocampus and amygdala during passive avoidance behavior in rats, *Brain Res* 280 (1983) 309-315.
- [142] E.E. Ladenheim, J.E. Taylor, D.H. Coy, T.S. Carrigan, A. Wohn and T.H. Moran, Caudal hindbrain neuromedin B-preferring receptors participate in the control of food intake, *Am J Physiol* 272 (1997) R433-437.
- [143] E. Lanyi, K. Csernus, E. Erhardt, K. Toth, B. Urban, L. Lenard and D. Molnar, Plasma levels of acylated ghrelin during an oral glucose tolerance test in obese children, *J Endocrinol Invest* 30 (2007) 133-137.
- [144] E. Lauwers, B. Landuyt, L. Arckens, L. Schoofs and W. Luyten, Obestatin does not activate orphan G protein-coupled receptor GPR39, *Biochem Biophys Res Commun* 351 (2006) 21-25.
- [145] C.B. Lawrence, A.C. Snape, F.M. Baudoin and S.M. Luckman, Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers, *Endocrinology* 143 (2002) 155-162.
- [146] J.E. LeDoux, P. Cicchetti, A. Xagoraris and L.M. Romanski, The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning, *J Neurosci* 10 (1990) 1062-1069.
- [147] H.M. Lee, G. Wang, E.W. Englander, M. Kojima and G.H. Greeley, Jr., Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations, *Endocrinology* 143 (2002) 185-190.
- [148] D. Lehto-Axtelius, D. Chen, V.V. Surve and R. Hakanson, Post-gastrectomy osteopenia in the rat: bone structure is preserved by retaining 10%-30% of the oxyntic gland area, *Scand J Gastroenterol* 37 (2002) 437-443.

- [149] L. Lénárd, Sex-dependent body weight loss after bilateral 6-hydroxydopamine injection into the globus pallidus, *Brain Res* 128 (1977) 559-568.
- [150] L. Lénárd, É., Fekete, É., Bagi, Intra-amygdaloid microinjection of gastrin releasing peptide and neuromedin C inhibits feeding, *J. Physiol* 526 (2000) 166-167.
- [151] L. Lénárd, I., Szabó, Karádi, Z., Z., Hahn, Pallidal mechanisms and feeding behavior, *Ady. Physiol. Sci.* 17 (1981).
- [152] L. Lénárd, G. Jandó, Z. Karádi, A. Hajnal and P. Sándor, Lateral hypothalamic feeding mechanisms: iontophoretic effects of kainic acid, ibotenic acid and 6-hydroxydopamine, *Brain Res Bull* 20 (1988) 847-856.
- [153] L. Lenard, Z. Karadi, B. Faludi, A. Czurko, C. Niedetzky, I. Vida and H. Nishino, Glucose-sensitive neurons of the globus pallidus: I. Neurochemical characteristics, *Brain Res Bull* 37 (1995) 149-155.
- [154] L. Lénárd, Z. Karadi, G. Jando, H. Yoshimatsu, A. Hajnal, P. Sandor and Y. Oomura, Feeding and body weight regulation after 6-OHDA application into the preoptic area, *Brain Res Bull* 27 (1991) 359-365.
- [155] L. Lénárd and E. Kertes, Influence of passive avoidance learning by substance P in the basolateral amygdala, *Acta Biol Hung* 53 (2002) 95-104.
- [156] L. Lénárd, Nauta, W.J.H., Neostriatal and limbic projection of cell group A8, *Neuroscience Lett.* S70 (1979).
- [157] L. Lenard, Y. Oomura, Y. Nakano, S. Aou and H. Nishino, Influence of acetylcholine on neuronal activity of monkey amygdala during bar press feeding behavior, *Brain Res* 500 (1989) 359-368.
- [158] L. Lénárd, P. Sandor, A. Hajnal, G. Jando, Z. Karadi and Y. Kai, Sex-dependent body weight changes after iontophoretic application of kainic acid into the LH or VMH, *Brain Res Bull* 26 (1991) 141-148.
- [159] L. Lénárd, J. Sarkisian and I. Szabo, Sex-dependent survival of rats after bilateral pallidal lesions, *Physiol Behav* 15 (1975) 389-397.
- [160] L. Lénárd, Sarkisian, J. and Szabó, I., Sex-dependent survival of rats after bilateral pallidal lesions, *Physiol Behav* 15 (1975) 389-397.
- [161] L. Lénárd, Z. Hahn, Amygdalar noradrenergic and dopaminergic mechanisms in the regulation of hunger and thirst motivated behavior, *Brain Res.* 233 (1982) 115-132.
- [162] L. Lénárd, Z. Hahn, Z. Karádi, Body weight changes after neurochemical manipulations of lateral amygdala: Noradrenergic and dopaminergic mechanisms, *Brain Res.* 249 (1982) 95-101.
- [163] C.M.a.S. Leonard, J.W.. Origin and distribution of the amygdalofugal pathways in the rat: an experimental neuroanatomical study, *J Comp Neurol* 141 (1971) 313-329.
- [164] F. Leonetti, G. Silecchia, G. Iacobellis, M.C. Ribauda, A. Zappaterreno, C. Tiberti, C.V. Iannucci, N. Perrotta, V. Bacci, M.S. Basso, N. Basso and U. Di Mario, Different plasma ghrelin levels after laparoscopic gastric bypass and adjustable gastric banding in morbid obese subjects, *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003) 4227-4231.

- [165] C. Li, J. Vaughan, P.E. Sawchenko and W.W. Vale, Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression, *J Neurosci* 22 (2002) 991-1001.
- [166] K.C. Liang, J.L. McGaugh, J.L. Martinez, Jr., R.A. Jensen, B.J. Vasquez and R.B. Messing, Post-training amygdaloid lesions impair retention of an inhibitory avoidance response, *Behav Brain Res* 4 (1982) 237-249.
- [167] Y. Lin, K. Matsumura, M. Fukuhara, S. Kagiya, K. Fujii and M. Iida, Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats, *Hypertension* 43 (2004) 977-982.
- [168] O. Lindvall, Bjorklund, A., Moore, R.Y. and Stenevi, U., Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex, *Brain Res* 81 (1974) 325-331.
- [169] M. Liu, L. Dong and W.Y. Zhu, Distribution and role of motilin receptor in the amygdala of rats, *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 25 (2005) 1100-1104.
- [170] I.D. Luo Xu, Tomasetto C., Zandecki M., Tang M., Timmermans J.P. Peeters T.L., Evidence for the presence of motilin, ghrelin and the motilin and ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus, *Regulatory peptides* 124 (2005) 119-125.
- [171] M.M. Malagon, R.M. Luque, E. Ruiz-Guerrero, F. Rodriguez-Pacheco, S. Garcia-Navarro, F.F. Casanueva, F. Gracia-Navarro and J.P. Castano, Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes, *Endocrinology* 144 (2003) 5372-5380.
- [172] Y. Masuda, T. Tanaka, N. Inomata, N. Ohnuma, S. Tanaka, Z. Itoh, H. Hosoda, M. Kojima and K. Kangawa, Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats, *Biochem Biophys Res Commun* 276 (2000) 905-908.
- [173] K. Matsumura, T. Tsuchihashi, K. Fujii, I. Abe and M. Iida, Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits, *Hypertension* 40 (2002) 694-699.
- [174] J. Mayer, Regulation of energy intake and body weight. The glucostatic theory and the lipostatic hypothesis., *Ann. N.Y. Acad Sci.* 63 (1955) 15-43.
- [175] R.J. McDonald, Q. Lo, A.L. King, T.D. Wasiak and N.S. Hong, Empirical tests of the functional significance of amygdala-based modulation of hippocampal representations: evidence for multiple memory consolidation pathways, *Eur J Neurosci* 25 (2007) 1568-1580.
- [176] K.K. McKee, C.P. Tan, O.C. Palyha, J. Liu, S.D. Feighner, D.L. Hreniuk, R.G. Smith, A.D. Howard and L.H. Van der Ploeg, Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors, *Genomics* 46 (1997) 426-434.
- [177] W.R. Mehler, Subcortical afferent connections of the amygdala in the monkey, *J Comp Neurol* 190 (1980) 733-762.
- [178] S.M. Mellinkoff, Frankland, M., Boyle, D. and Greipel, M., Relationship between serum amino acid concentration and fluctuation in appetite
J. Appl. Physiol. 8 (1956) 535-538.

- [179] M.M. Mesulam and E.J. Mufson, Insula of the old world monkey. I. Architectonics in the insulo-orbito-temporal component of the paralimbic brain, *J Comp Neurol* 212 (1982) 1-22.
- [180] M.M. Mesulam and E.J. Mufson, Insula of the old world monkey. III: Efferent cortical output and comments on function, *J Comp Neurol* 212 (1982) 38-52.
- [181] M.C.F. Micelli M.O., Effect of putative satiety peptides on feeding and drinking behaviour in golden hamsters, *Behav. Neurosci.* 99 (1985) 1192-1207.
- [182] O.E. Millhouse and J. DeOlmos, Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala, *Neuroscience* 10 (1983) 1269-1300.
- [183] M. Mishkin, Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus, *Nature* 273 (1978) 297-298.
- [184] G.J. Mogenson, , Karger, Basel, Changing views of the role of the hypothalamus in the control of ingestive behaviors., (1974) 268-293pp.
- [185] K.E. Moore, Von Voigtlander, P.F., The release of H³ -dopamine from cat brain following electrical stimulation of the substantia nigra and caudate nucleus, *Neuropharmacology* 10 (1971) 733-741.
- [186] P.J. Morgane, Electrophysiological studies of feeding and satiety centres in the rat, *Am. J. Physiol*, 201 (1961) 838-844.
- [187] K. Mori, A. Yoshimoto, K. Takaya, K. Hosoda, H. Ariyasu, K. Yahata, M. Mukoyama, A. Sugawara, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa and K. Nakao, Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin, *FEBS Lett* 486 (2000) 213-216.
- [188] G.J. Morton and M.W. Schwartz, The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis, *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5 (2001) S56-62.
- [189] G. Muccioli, M. Tschop, M. Papotti, R. Deghenghi, M. Heiman and E. Ghigo, Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity, *Eur J Pharmacol* 440 (2002) 235-254.
- [190] E.J. Mufson and M.M. Mesulam, Insula of the old world monkey. II: Afferent cortical input and comments on the claustrum, *J Comp Neurol* 212 (1982) 23-37.
- [191] M. Murata, Y. Okimura, K. Iida, M. Matsumoto, H. Sowa, H. Kaji, M. Kojima, K. Kangawa and K. Chihara, Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells, *J Biol Chem* 277 (2002) 5667-5674.
- [192] N. Nagaya, M. Kojima, M. Uematsu, M. Yamagishi, H. Hosoda, H. Oya, Y. Hayashi and K. Kangawa, Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280 (2001) R1483-1487.
- [193] N. Nagaya, K. Miyatake, M. Uematsu, H. Oya, W. Shimizu, H. Hosoda, M. Kojima, N. Nakanishi, H. Mori and K. Kangawa, Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure, *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 5854-5859.
- [194] J.A. Nagel and E.D. Kemble, Effects of amygdaloid lesions on the performance of rats in four passive avoidance tasks, *Physiol Behav* 17 (1976) 245-250.

- [195] Y. Nakano, L. Lenard, Y. Oomura, H. Nishino, S. Aou and T. Yamamoto, Functional involvement of catecholamines in reward-related neuronal activity of the monkey amygdala, *J Neurophysiol* 57 (1987) 72-91.
- [196] Y. Nakano, Y. Oomura, L. Lenard, H. Nishino, S. Aou, T. Yamamoto and K. Aoyagi, Feeding-related activity of glucose- and morphine-sensitive neurons in the monkey amygdala, *Brain Res* 399 (1986) 167-172.
- [197] M. Nakazato, N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa and S. Matsukura, A role for ghrelin in the central regulation of feeding, *Nature* 409 (2001) 194-198.
- [198] D. Nelson and M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edition (2008).
- [199] A. Nijjima, Glucose-sensitive afferent nerve fibres in the hepatic branch of the vagus nerve in the guinea-pig, *J Physiol* 332 (1982) 315-323.
- [200] B.U. O. Hangodi, E.E. Bagi, E.M. Fekete, K. Tóth and L. Lenard, Orexin-A microinjection mediated food and water intake are antagonized by selective Orexin-1 receptor antagonist in the bed nucleus of stria terminalis., *International Congress Series* 1291 (2006) 141-144.
- [201] K. Okada, S. Ishii, S. Minami, H. Sugihara, T. Shibasaki and I. Wakabayashi, Intracerebroventricular administration of the growth hormone-releasing peptide KP-102 increases food intake in free-feeding rats, *Endocrinology* 137 (1996) 5155-5158.
- [202] P.K. Olszewski, M.K. Grace, C.J. Billington and A.S. Levine, Hypothalamic paraventricular injections of ghrelin: effect on feeding and c-Fos immunoreactivity, *Peptides* 24 (2003) 919-923.
- [203] P.K. Olszewski, D. Li, M.K. Grace, C.J. Billington, C.M. Kotz and A.S. Levine, Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus, *Peptides* 24 (2003) 597-602.
- [204] Y. Oomura, Glucose as a regulator of neuronal activity, *Adv Metab Disord* 10 (1983) 31-65.
- [205] Y. Oomura, T. Ono and H. Ooyama, Inhibitory action of the amygdala on the lateral hypothalamic area in rats, *Nature* 228 (1970) 1108-1110.
- [206] Y. Oomura, T. Ono, H. Ooyama and M.J. Wayner, Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus, *Nature* 222 (1969) 282-284.
- [207] O.P. Ottersen, Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat: II. Afferents from the hypothalamus and the basal telencephalon, *J Comp Neurol* 194 (1980) 267-289.
- [208] O.P. Ottersen, 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* 202 (1981) 335-356.
- [209] O.P. Ottersen, Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase, *J Comp Neurol* 205 (1982) 30-48.
- [210] B. Otto, U. Cuntz, E. Fruehauf, R. Wawarta, C. Folwaczny, R.L. Riepl, M.L. Heiman, P. Lehnert, M. Fichter and M. Tschop, Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa, *Eur J Endocrinol* 145 (2001) 669-673.

- [211] M.G. Packard, L. Cahill and J.L. McGaugh, Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 8477-8481.
- [212] G. Paxinos and C.R. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, New York Second edition (1986).
- [213] M.A. Peinado-Manzano, The role of the amygdala and the hippocampus in working memory for spatial and non-spatial information, *Behav Brain Res* 38 (1990) 117-134.
- [214] A. Perron, P. Sarret, L. Gendron, T. Stroh and A. Beaudet, Identification and functional characterization of a 5-transmembrane domain variant isoform of the NTS2 neurotensin receptor in rat central nervous system, *J Biol Chem* 280 (2005) 10219-10227.
- [215] L. Pinilla, M.L. Barreiro, M. Tena-Sempere and E. Aguilar, Role of ghrelin in the control of growth hormone secretion in prepubertal rats: interactions with excitatory amino acids, *Neuroendocrinology* 77 (2003) 83-90.
- [216] A. Pitkanen, V. Savander and J.E. LeDoux, Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala, *Trends Neurosci* 20 (1997) 517-523.
- [217] S.S. Pong, L.Y. Chaung, D.C. Dean, R.P. Nargund, A.A. Patchett and R.G. Smith, Identification of a new G-protein-linked receptor for growth hormone secretagogues, *Mol Endocrinol* 10 (1996) 57-61.
- [218] L.J. Porrino, A.M. Crane and P.S. Goldman-Rakic, Direct and indirect pathways from the amygdala to the frontal lobe in rhesus monkeys, *J Comp Neurol* 198 (1981) 121-136.
- [219] S. Poykko, O. Ukkola, H. Kauma, M.J. Savolainen and Y.A. Kesaniemi, Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for Type 2 diabetes and hypertension in a random sample of middle-aged subjects, *Diabetologia* 46 (2003) 455-458.
- [220] S.M. Poykko, E. Kellokoski, S. Horkko, H. Kauma, Y.A. Kesaniemi and O. Ukkola, Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes, *Diabetes* 52 (2003) 2546-2553.
- [221] J.L. Price and D.G. Amaral, An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala, *J Neurosci* 1 (1981) 1242-1259.
- [222] M.K. Reimer, G. Pacini and B. Ahren, Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse, *Endocrinology* 144 (2003) 916-921.
- [223] M. Romon, P. Thomas-Desrousseaux, R. Beuscart, P. Fossati, G. Sezille and J. Jaillard, [Insulin and the metabolism of lipoproteins], *Ann Endocrinol (Paris)* 44 (1983) 77-81.
- [224] B. Roozendaal and J.L. McGaugh, Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats, *Eur J Neurosci* 9 (1997) 76-83.
- [225] F.T. Russchen, Amygdalopetal projections in the cat. I. Cortical afferent connections. A study with retrograde and anterograde tracing techniques, *J Comp Neurol* 206 (1982) 159-179.
- [226] F.T. Russchen, Amygdalopetal projections in the cat. II. Subcortical afferent connections. A study with retrograde tracing techniques, *J Comp Neurol* 207 (1982) 157-176.

- [227] J. Ruter, P. Kobelt, J.J. Tebbe, Y. Avsar, R. Veh, L. Wang, B.F. Klapp, B. Wiedenmann, Y. Tache and H. Monnikes, Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats, *Brain Res* 991 (2003) 26-33.
- [228] E.S. Saito, H. Kaiya, T. Tachibana, S. Tomonaga, D.M. Denbow, K. Kangawa and M. Furuse, Inhibitory effect of ghrelin on food intake is mediated by the corticotropin-releasing factor system in neonatal chicks, *Regul Pept* 125 (2005) 201-208.
- [229] A. Salehi, D. Chen, R. Hakanson, G. Nordin and I. Lundquist, Gastrectomy induces impaired insulin and glucagon secretion: evidence for a gastro-insular axis in mice, *J Physiol* 514 (Pt 2) (1999) 579-591.
- [230] A. Salehi, C. Dornonville de la Cour, R. Hakanson and I. Lundquist, Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice, *Regul Pept* 118 (2004) 143-150.
- [231] P. Sarret, L. Gendron, P. Kilian, H.M. Nguyen, N. Gallo-Payet, M.D. Payet and A. Beaudet, Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells, *J Biol Chem* 277 (2002) 36233-36243.
- [232] M. Sarter and H.J. Markowitsch, Involvement of the amygdala in learning and memory: a critical review, with emphasis on anatomical relations, *Behav Neurosci* 99 (1985) 342-380.
- [233] R.R. Schick, S. Samsami, J.P. Zimmermann, T. Eberl, C. Endres, V. Schusdziarra and M. Classen, Effect of galanin on food intake in rats: involvement of lateral and ventromedial hypothalamic sites, *Am J Physiol* 264 (1993) R355-361.
- [234] N.B. Schwartz, Kling, A., The effects of amygdaloid lesions on feeding, grooming and reproduction in rats, *Acta Neuroveg.* 26 (1962) 12-34.
- [235] T.R. Scott, Z. Karadi, Y. Oomura, H. Nishino, C.R. Plata-Salaman, L. Lenard, B.K. Giza and S. Aou, Gustatory neural coding in the amygdala of the alert macaque monkey, *J Neurophysiol* 69 (1993) 1810-1820.
- [236] R.J. Seeley, G. van Dijk, L.A. Campfield, F.J. Smith, P. Burn, J.A. Nelligan, S.M. Bell, D.G. Baskin, S.C. Woods and M.W. Schwartz, Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats, *Horm Metab Res* 28 (1996) 664-668.
- [237] L.M. Seoane, S. Tovar, R. Baldelli, E. Arvat, E. Ghigo, F.F. Casanueva and C. Dieguez, Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats, *Eur J Endocrinol* 143 (2000) R7-9.
- [238] K. Seto, H. Saito, N. Edashige, T. Kawakami, K. Yoshimatsu, C. Horiuchi and M. Kawakami, Influence of microinjection of insulin into amygdala on acetate metabolism in liver slices of rabbit, *Exp Clin Endocrinol* 86 (1985) 233-236.
- [239] K. Seto, H. Saito, H. Kaba, M. Kondo, K. Kitaoka, K. Yoshida, A. Tamai and M. Kawakami, Influence of microinjection of glucagon into the amygdala on hepatic acetate metabolism in rabbits, *Exp Clin Endocrinol* 93 (1989) 69-72.
- [240] R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg, A.D. Howard, S.D. Feighner, K. Cheng, G.J. Hickey, M.J. Wyvratt, Jr., M.H. Fisher, R.P. Nargund and A.A. Patchett, Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion, *Endocr Rev* 18 (1997) 621-645.

- [241] T. Soeki, I. Kishimoto, D.O. Schwenke, T. Tokudome, T. Horio, M. Yoshida, H. Hosoda and K. Kangawa, Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and prevents early left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294 (2008) H426-432.
- [242] L. Soriano-Guillen, V. Barrios, A. Lechuga-Sancho, J.A. Chowen and J. Argente, Response of circulating ghrelin levels to insulin therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus, *Pediatr Res* 55 (2004) 830-835.
- [243] L. Stefanacci and D.G. Amaral, Topographic organization of cortical inputs to the lateral nucleus of the macaque monkey amygdala: a retrograde tracing study, *J Comp Neurol* 421 (2000) 52-79.
- [244] H. Stephan, Andy, O.J., Quantitative comparison of the amygdala in insectivores and primates, *Acta Anat (Basel)* 98 (1977) 130-153.
- [245] J.H. Strubbe, Central nervous system and insulin secretion, *Neth J Med* 34 (1989) 154-167.
- [246] T. Sudo, K. Ishiyama, M. Takemoto, M. Kawamura, H. Umemura, S. Shiraha, T. Kuyama, T. Suzuki and T. Tobe, Pancreatic endocrine function after total gastrectomy and truncal vagotomy, *Am J Surg* 144 (1982) 539-544.
- [247] Y. Sun, S. Ahmed and R.G. Smith, Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite, *Mol Cell Biol* 23 (2003) 7973-7981.
- [248] K. Takahashi, C. Furukawa, A. Takano, N. Ishikawa, T. Kato, S. Hayama, C. Suzuki, W. Yasui, K. Inai, S. Sone, T. Ito, H. Nishimura, E. Tsuchiya, Y. Nakamura and Y. Daigo, The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer, *Cancer Res* 66 (2006) 9408-9419.
- [249] K. Takaya, H. Ariyasu, N. Kanamoto, H. Iwakura, A. Yoshimoto, M. Harada, K. Mori, Y. Komatsu, T. Usui, A. Shimatsu, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa and K. Nakao, Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans, *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000) 4908-4911.
- [250] M. Tang-Christensen, N. Vrang, S. Ortmann, M. Bidlingmaier, T.L. Horvath and M. Tschop, Central administration of ghrelin and agouti-related protein (83-132) increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats, *Endocrinology* 145 (2004) 4645-4652.
- [251] P. Teitelbaum, Epstein, A.N., The lateral hypothalamic syndrome: Recovery of feeding and drinking after lateral hypothalamic lesions, *Psychol. Rev.* 69 (1962) 74-90.
- [252] C.M. Thiel, C.P. Muller, J.P. Huston and R.K. Schwarting, High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments, *Neuroscience* 93 (1999) 243-251.
- [253] A. Torsello, V. Locatelli, M.R. Melis, S. Succu, M.S. Spano, R. Deghenghi, E.E. Muller and A. Argiolas, Differential orexigenic effects of hexarelin and its analogs in the rat hypothalamus: indication for multiple growth hormone secretagogue receptor subtypes, *Neuroendocrinology* 72 (2000) 327-332.
- [254] K. Toth, K. Laszlo, E.E. Bagi, E. Lukacs and L. Lenard, Effects of intraamygdaloid microinjections of acylated-ghrelin on liquid food intake of rats, *Brain Res Bull* 77 (2008) 105-111.

- [255] L. Trudel, C. Tomasetto, M.C. Rio, M. Bouin, V. Plourde, P. Eberling and P. Poitras, Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282 (2002) G948-952.
- [256] M. Tschop, D.L. Smiley and M.L. Heiman, Ghrelin induces adiposity in rodents, *Nature* 407 (2000) 908-913.
- [257] M. Tschop, R. Wawarta, R.L. Riepl, S. Friedrich, M. Bidlingmaier, R. Landgraf and C. Folwaczny, Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels, *J Endocrinol Invest* 24 (2001) RC19-21.
- [258] O. Ukkola, E. Ravussin, P. Jacobson, E.E. Snyder, M. Chagnon, L. Sjostrom and C. Bouchard, Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans, *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 3996-3999.
- [259] U. Ungerstedt, . Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system, *Acta Physiol Scand Suppl*, 367 (1971) 95-122.
- [260] H.G. Van Oyen, N.E. Van De Poll and J.P. De Bruin, Sex, age and shock-intensity as factors in passive avoidance, *Physiol Behav* 23 (1979) 915-918.
- [261] K. Van Pett, V. Viau, J.C. Bittencourt, R.K. Chan, H.Y. Li, C. Arias, G.S. Prins, M. Perrin, W. Vale and P.E. Sawchenko, Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse, *J Comp Neurol* 428 (2000) 191-212.
- [262] M.R. Vianna, L.A. Izquierdo, D.M. Barros, M.M. de Souza, C. Rodrigues, M.K. Sant'Anna, J.H. Medina and I. Izquierdo, Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning, *Braz J Med Biol Res* 34 (2001) 233-240.
- [263] J. Vigh, L. Lénárd and E. Fekete, Bombesin microinjection into the basolateral amygdala influences feeding behavior in the rat, *Brain Res* 847 (1999) 253-261.
- [264] J. Vigh, L. Lénárd, E. Fekete and I. Hernadi, Bombesin injection into the central amygdala influences feeding behavior in the rat, *Peptides* 20 (1999) 437-444.
- [265] J.P. Vincent, J. Mazella and P. Kitabgi, Neurotensin and neurotensin receptors, *Trends Pharmacol Sci* 20 (1999) 302-309.
- [266] M. Volante, E. Fulcheri, E. Allia, M. Cerrato, A. Pucci and M. Papotti, Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung, *J Histochem Cytochem* 50 (2002) 1013-1021.
- [267] G.V. Wallenstein and M.E. Hasselmo, Functional transitions between epileptiform-like activity and associative memory in hippocampal region CA3, *Brain Res Bull* 43 (1997) 485-493.
- [268] N. Wierup, H. Svensson, H. Mulder and F. Sundler, The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas, *Regul Pept* 107 (2002) 63-69.
- [269] N. Wierup, S. Yang, R.J. McEvelly, H. Mulder and F. Sundler, Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells, *J Histochem Cytochem* 52 (2004) 301-310.
- [270] D.L. Williams, H.J. Grill, D.E. Cummings and J.M. Kaplan, Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin, *Endocrinology* 144 (2003) 5184-5187.

- [271] Woodworth, Experimental Psychology, Holt Rinehart and Winston, New York (1954).
- [272] K.E. Wortley, K.D. Anderson, K. Garcia, J.D. Murray, L. Malinova, R. Liu, M. Moncrieffe, K. Thabet, H.J. Cox, G.D. Yancopoulos, S.J. Wiegand and M.W. Sleeman, Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference, Proc Natl Acad Sci U S A 101 (2004) 8227-8232.
- [273] A.M. Wren, C.J. Small, C.R. Abbott, W.S. Dhillo, L.J. Seal, M.A. Cohen, R.L. Batterham, S. Taheri, S.A. Stanley, M.A. Ghatei and S.R. Bloom, Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats, Diabetes 50 (2001) 2540-2547.
- [274] A.M. Wren, C.J. Small, H.L. Ward, K.G. Murphy, C.L. Dakin, S. Taheri, A.R. Kennedy, G.H. Roberts, D.G. Morgan, M.A. Ghatei and S.R. Bloom, The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion, Endocrinology 141 (2000) 4325-4328.
- [275] W. Wyrwicka, Eating banana in cats for brain stimulation reward, Physiol Behav 12 (1974) 1063-1066.
- [276] A. Yamanaka, T. Sakurai, T. Katsumoto, M. Yanagisawa and K. Goto, Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight, Brain Res 849 (1999) 248-252.
- [277] T. Yasuda, T. Masaki, T. Kakuma and H. Yoshimatsu, Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats, Neurosci Lett 349 (2003) 75-78.
- [278] J.V. Zhang, P.G. Ren, O. Avsian-Kretchmer, C.W. Luo, R. Rauch, C. Klein and A.J. Hsueh, Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake, Science 310 (2005) 996-999.
- [279] W. Zhang, T.R. Lin, Y. Hu, Y. Fan, L. Zhao, E.L. Stuenkel and M.W. Mulholland, Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus, J Physiol 559 (2004) 729-737.

11. Publikációs jegyzék

11.1. A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk

K. Tóth, K. László, É. E. Bagi, E. Lukács, L. Lénárd: Effect of intraamygdaloid microinjections of acylated-ghrelin on liquid food intake. Brain Research Bull. 77 (2008) 105-111. **IF: 2,281**

K. Tóth, K. László, E. Lukács, L. Lénárd: Intraamygdaloid microinjection of acylated-ghrelin influences passive avoidance learning. Behavioural Brain Research 202 (2009) 308-311. **IF: 3,171**

K. Tóth, K. László, L. Lénárd: Role of intraamygdaloid acylated-ghrelin in spatial learning. Brain Research Bull. 2009, Submitted. **IF: 2,281**

É. Lányi, K. Csernus, É. Erhardt, **K. Tóth**, B. Urbán, L. Lénárd and D. Molnár: Plasma levels of active ghrelin during an oral glucose tolerance test in obese children. Eur. Journal of Endocrinological Investigation, Vol.30, No. 2, (February 2007) 133-137.
IF: 2,021

11.2. Egyéb publikációk

É. Fekete, É. E. Bagi, **K. Tóth** and L. Lénárd: Neuromedin C microinjected into the amygdala inhibits feeding. Brain Research Bull. 71 (2007) 386-392. **IF: 1,943**

Bagi, É.E., É. Fekete, **K. Tóth**, L. Lénárd: Angiotensinergic mechanism regulating NaCl and fluid balance in the zona incerta. Proceeding J. Physiology London, 2005.

O. Hangodi, B. Urbán, E. E. Bagi, E. M. Fekete, **K. Tóth** and L. Lénárd: Orexin-A microinjection mediated food and water intake are antagonized by selective orexin-1 receptor antagonist in the bed nucleus of stria terminalis. Int. Congress Series, 2005. Proceeding.

Tóth K., Lukács E., László K., Bagi E. E., Lénárd L.: Effects of intraamygdalar injection of ghrelin on liquid food and water intake. Clinical Neuroscience 59 (1 suppl.), 66.

Bagi É., **Tóth K.**, Truta-Feles K., Lénárd L.: Angiotensinergic regulation of salt hunger in the zona incerta of rat brain. Acta Physiologica Hungarica, 92(3-4): 261, 2005.

Tóth K., Bagi É., Lénárd L.: Effects of ghrelin injected into the amygdala on food intake of rats. Acta Physiologica Hungarica, 92(3-4): 317, 2005.

Tóth K., László K., Lukács E., Lénárd L.: Intra-amygdaloid ghrelinergic mechanisms in different learning paradigms. Acta Physiologica Hungarica, 94(4): 398, 2007.

László K., **Tóth K.**, Bárdosi R., Oláh-Várady K., Kertes E., Lénárd L.: The role of neurotensin in Morris water maze and passive avoidance paradigm. Acta Physiologica Hungarica, 94(4): 369, 2007.

11.3. Konferencia absztraktok

É. Fekete, L. Lénárd, É. E. Bagi and **K. Tóth**: Effect of intraamygdalar gastrin releasing peptide and neuromedin B on food intake and blood glucose level in rats. Abstract of the 66th Joint Meeting of the Hungarian physiological Society, Szeged (Hungary), Abstract book, p:64, 2001.

É. Fekete, É. E. Bagi, D. H. Coy, **K. Tóth** and L. Lénárd: Elimination of feeding suppression effect of gastrin releasing peptide (GRP) by selective GRP receptor antagonist in the amygdala. Abstracts of the International Behavioral Neuroscience Society, Capri (Italy), Vol.11., p:34, 2002.

Fekete É., Bagi É. E., **Tóth K.**, Lénárd L.: A bombesin típusú peptidek intraamygdaláris mikroinjekciójának hatása a patkány táplálékfelvételére és vércukorszintjére. Magyar Viselkedés-Élettani Konferencia, Budapest, november 14, 2002.

É. Fekete, É. E. Bagi, **K. Tóth** and L. Lénárd: Intraamygdaloid microinjection of neuromedin C influences feeding behavior. Abstract of the 4th International Congress of Pathophysiology, Budapest (Hungary), 2002.

Tóth K., Bányai D.: Neuromedin B intraamygdaláris injekciójának hatása patkány táplálékfelvételére. Tudományos Diákköri Konferencia (házi), Pécs 2002. Előadás. Első helyezés.

Bányai D., **Tóth K.**: A zona incertába adott angiotenzin II és III mikroinjekciók hatása patkányok ivási magatartására. Tudományos Diákköri Konferencia (házi), Pécs 2002. Előadás. Második helyezés.

Tóth K.: Neuromedin B intraamygdaláris injekciójának hatása patkány táplálékfelvételére. Dékáni Pályamunka, 2002. Első helyezés.

Tóth K.: Intraamygdaláris Neuromedin B és Neuromedin C injekciók hatása patkány táplálékfelvételére. Tudományos Diákköri Konferencia (házi), Pécs 2003. Előadás. Második helyezés. Továbbjutás az Országos Diákköri Konferenciára.

Tóth K.: Intraamygdaláris Neuromedin B és Neuromedin C injekciók hatása patkány táplálékfelvételére. Marosvásárhelyi Magyar Orvostanhallgatók X. Tudományos Diákköri Konferencia, Marosvásárhely (Románia, Erdély), 2003. április 3-6. Előadás.

Bagi É. E., Fekete É., Bányai D., **Tóth K.**, Lénárd L.: A zona incerta angiotenzinergias mechanizmusainak szerepe a szomjúság-motiválta magatartás szabályozásában. A MÉT LXVII. Vándorgyűlése, Pécs, E33, p.:31, 2003.

Bagi É. E., Trotta-Feles K., **Tóth K.**, Lénárd L.: A szervezet sóhátságának és vízháztartásának angiotenzinergias szabályozása patkány zona incertában és amygdalában. A MÉT LXVIII. Vándorgyűlése, Debrecen, 2004. Június 7-9. Előadás.

Bagi É. E., Fekete É., **Tóth K.**, Truta-Feles K., Lénárd L.: Sóhátságot és folyadék háztartást szabályozó angiotenzinerg mechanizmusok a központi idegrendszerben. A MITT XI. Kongresszusa, Pécs, 2005. Január 25-29. Előadás. Absztrakt könyv E:22.

Hangodi O., Urbán B., Bagi É. E., Fekete É., **Tóth K.**, Lénárd L.: Effects of orexin-A microinjections into the bed nucleus of stria terminalis on food and water intake are antagonized by selective orexin-1 receptor antagonist SB334867. A MITT XI. Kongresszusa, Pécs, 2005. Január 25-29. Poszter. Absztrakt könyv p.:A 111.

Tóth K., Bagi É., Lénárd L.: Ghrelin intraamygdaláris injekciójának hatása patkány táplálékfelvételére. MÉT LXIX. Vándorgyűlése, Budapest, 2005. június 2-4. Előadás. Absztrakt könyv E.:54.

Bagi É., **K. Tóth**, K. Truta-Feles, L. Lénárd: A sóhátság központi idegrendszeri angiotenzinerg szabályozása patkány zona incertában. A MÉT LXIX. Vándorgyűlése, Budapest. E55, p.: 49, 2005.

Lénárd, L., O. Hangodi, E. Bagi, B. Urban, E. Fekete, **K. Tóth**: Orexin-1 receptors mediate food and water intake related effects of Orexin-A in the bed nucleus of stria terminalis. Ann. Congress of IBNS, Santa Fe, New Mexico, Abstr. of IBNS, Vol: 14, p.: 50, 2005.

O. Hangodi, B. Urbán, E. E. Bagi, E. M. Fekete, **K. Tóth** and L. Lénárd: Selective orexin-1 receptor antagonist (SB 334867) antagonizes the effects of orexin-A on food and water intake in the bed nucleus of stria terminalis. The 4th Neuroscience Workshop in Kyushu, Fukuoka (Japan), 2005. Poster.

Tóth K., Lukács E., László K., Bagi E. E., Lénárd L.: Effects of intraamygdalar injection of ghrelin on liquid food and water intake. International IBRO Workshop, Budapest, 2006. Poster. Abstract book p.:94.

Tóth K., László K., Lukács E., Bagi E. E., Lénárd L.: Intraamygdaláris ghrelin mikroinjekció hatása patkány táplálékfelvételére és spontán motoros aktivitására. MÉT 70. Vándorgyűlése, Szeged, 2006. Előadás.

László K., Kertes E., **Tóth K.**, Oláhné Várady K., Táros Sz., Lénárd L.: A neurotensin és a neurotensin-1 receptor antagonist (SR 48692) szerepe a pozitív megerősítésben. MÉT 70. Vándorgyűlése, Szeged, 2006. Előadás.

K. Tóth, K. László, É.E. Bagi, L. Lénárd: Ghrelinergic effect on feeding and spontaneous motor activity of rats in the amygdala. FENS, Vienna, 2006. Poster.

K. László, E. Kertes, **K. Tóth**, K. Oláh-Várady, É.E. Bagi, Sz. Táros, L. Lénárd: The role of neurotensin in positive reinforcement. FENS, Vienna, 2006. Poster.

Tóth K., László K., Lukács E., Lénárd L.: Effects of intraamygdaloid ghrelin on passive avoidance learning. A MITT XII. Kongresszusa, Szeged, 2007. Január 25-27. Poszter.

K. László, **K. Tóth**, E. Kertes, K. Oláh-Várady, R. Bárdosi, L. Lénárd: Effect of neurotensin in amygdaloid learning mechanisms. A MITT XII. Kongresszusa, Szeged, 2007. Január 25-27. Poszter.

Tóth K., Lukács E., László K., Bagi É. E., Lénárd L.: Intraamygdaloid acylated ghrelin causes food intake decrease. European Congress of Obesity 2007, Satellita: Táplálkozás, Metabolizmus és az Agy, Tihany, Hungary, Április 25-27. Poszter.

Lénárd L., Fekete É., **Tóth K.**, Hangodi O., Bagi É. E., László K., Urbán B.: Anorexigenic and orexigenic peptides influence feeding related regulation in the amygdaloid body. European Congress of Obesity 2007, Satellita: Táplálkozás, Metabolizmus és az Agy, Tihany, Hungary, Április 25-27. Előadás.

Tóth K., László K., Lukács E., Lénárd L.: Intraamygdaláris ghrelinerg mechanizmusok vizsgálata különböző tanulási paradigmákban. A Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése, Pécs, június 6-8, 2007. Előadás C.4.2.

László K., **Tóth K.**, Bárdosi R., Oláh-Várady K., Kertes E., Lénárd L.: Neurotensin hatásainak vizsgálata Morris féle úsztatási tesztben és passzív elhárító szituációban. A Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése, Pécs, június 6-8, 2007. Előadás C.4.4.

K. **Tóth**, E. Lukács, K. László, L. Lénárd: Role of intraamygdaloid acylated-ghrelin in learning. Programme of European Neuroscience Schools, Advanced Course in Neuroplasticity. PENS Blackwell Summer School 2007. September 5-11, 2007, Rome, Italy. Poster.

Tóth K., László K., Lukács E., Lénárd L.: Effect of acylated ghrelin on learning and memory processes in the amygdala. Meeting of European Brain and Behaviour Society, September 15-19, 2007. Trieste, Italy. Poster.

Tóth K., Lukács E., László K., Lénárd L.: Acylated-ghrelin microinjection into the amygdaloid body elevates blood glucose level and decreases food intake. International IBRO Workshop, Debrecen, Hungary, Jan. 23-26, 2008. Poster. Abstract book p.:47.

K. László, **K. Tóth**, R. Bárdosi, Á. Molnár, E. Kertes, K. Oláh-Várady, L. Lénárd: Enhancement of passive avoidance learning by Neurotensin injected into the rat central nucleus of amygdala. International IBRO Workshop, Debrecen, Hungary, Jan. 23-26, 2008. Poster. Abstract book p.:36.

K. László, R. Bárdosi, L. Péczely, Á. Molnár, Sz. Sánta, E. Kertes, K. Oláh-Várady, **K. Tóth**, L. Lénárd: Significance of the neurotensin-dopamine interactions in the reinforcement. 72nd Joint Meeting of the Hungarian Physiological Society, Debrecen, Hungary, Jun 4-6, 2008. Oral Presentation. Abstract book p.:86.

Tóth K., László K., Lukács E., Lénárd L.: Blood glucose increasing and food intake decreasing effects of intraamygdaloid ghrelin. 72nd Joint Meeting of the Hungarian Physiological Society, Debrecen, Hungary, June 4-6, 2008. Oral Presentation. Abstract book p.:127.

Laszlo K., Bardosi R., Molnar A., Santa S., **Toth K.**, Kertes E., Olah-Varady K. and Lenard L.: Effects of neurotensin and D2 dopamine receptor antagonist in amygdaloid reinforcing mechanisms. 6th FENS, Abstr., vol.4, 093.5, 2008.

Toth K., Laszlo K., Lukacs E. and Lenard L.: Intraamygdaloid acylated-ghrelin potentiates place- and avoidance learning. 6th FENS Abstr., vol.4, 158.30, 2008.

László K., Molnár Á., **Tóth K.**, Péczely L., Kertes E., Lénárd L.: The Role of Neurotensin and Dopamine Interaction in Spatial Learning Mechanism, MITT XIII. Kong.. MTA Székház, Budapest, 2009.

Tóth K., László K., Lukács E., Lénárd L.: Microinjections of ghrelin into the amygdaloid body enhance memory processes. MITT XIII. Kong.. MTA Székház, Budapest, 2009.