

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

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

Doktori (Ph.D.) Értekezés Tézisei

Kovács Anita

Témavezető: Prof. Dr. Lénárd László
Programvezető: Prof. Dr. Lénárd László
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Lénárd László

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR**

Pécs, 2014

1. Bevezetés

Jelen dolgozat tárgya két neuropeptid, az RFRP-1 (Neuropeptide SF) és az RFRP-3 (Neuropeptide VF) táplálékfelvételi és magatartási hatásainak vizsgálata az amygdala egy kitüntetett magcsoportjában a centrális amygdalában (CeA).

A táplálékfelvétel és az energiametabolizmus komplex központi idegrendszeri szabályozásában számos neurotranszmitter és neuropeptid vesz részt. Jelenlegi ismereteink szerint a testsúlyszabályozási zavarok, mint a bulimia nervosa, az anorexia nervosa vagy a testsúly szabályozási zavar másik véglete a túlsúlyosság, illetve elhízás hátterében (túl a pszichológiai tényezőkön, mozgásszegény életmódon stb.) a táplálkozási magatartás szabályozásának és az energia felhasználásban szerepet játszó neurokémiai folyamatoknak a zavara állhat. Ezen idegrendszeri folyamatok jelentős része peptid molekulákon, neuropeptideken keresztül valósul meg. A neuropeptidek az emberi szervezetben a központi idegrendszer különböző struktúráiban, illetve perifériás szövetekben termelődnek. Ezen peptidek hatásukat a periférián és/vagy a központi idegrendszerben található éhség-jóllakottsági rendszereken keresztül fejtik ki. Így bizonyos peptidek fokozzák a táplálékfelvételt (orexigén peptidek), mások viszont azáltal, hogy fokozzák a jóllakottság érzetét, csökkentik a táplálékfelvételt (anorexigének).

Az RFRP-1 és RFRP-3 peptidek az RFamid családhoz tartoznak. Az RFamid családhoz tartozó peptidek közös jellemzője, hogy peptidszekvenciájuk C-terminálisán egy arginin (R), illetve egy fenilalanin (F) aminosav található, innen származik elnevezésük: RFamid peptidek [18]. Az RFamid peptidcsaládon belül 5 csoportot különíthetünk el: neuropeptide FF (PQRFa) csoport [1,49], PrRP csoport [23], LPXRFa (RFRPs) csoport [43,45], kisspeptin csoport [40] és a QRFP (26RFa) csoport [6,20]. A peptidcsaládok számos tagjáról ismert, hogy befolyásolják a táplálékfelvételt [9]. I.c.v. alkalmazást követően a prolactin-releasing peptid és neuropeptid FF anorexigén hatásúnak [29,33], míg a 26 RFa orexigén hatásúnak bizonyult [37]. Korábbi kísérletek alapján megállapították, hogy az RFRP-3 i.c.v. adva fokozza a táplálékfelvételt patkányban [25,32], továbbá az RFRP-1 anorexigén hatású i.c.v. alkalmazva csirkékben [35]. Az RFRP peptideknek két receptora ismeretes, nevezetesen az NPPF-1 és NPPF-2 (NPPF-R). Az RFRP-1 és RFRP-3 peptidek nagy affinitással kötődnek az NPPF-1 receptorhoz, míg gyenge affinitást mutatnak az NPPF-2 receptor iránt [4,10].

A centrális amygdalában kimutatták mindkét peptid jelenlétét, valamint NPPF1 receptorokat is. Ismert, hogy az amygdala a limbicus rendszer részeként jelentős szerepet tölt be a táplálékfelvétel szabályozásában [12,27]. Az amygdala centralis (CeA) részének léziója hypophagiát és testtömeg csökkenést okoz, míg a basolateralis (BLA) rész roncsolása hyperphagiát és testtömegnövekedést eredményez [13-16]. Így a hypothalamus mellett az amygdalában is található egy "éhség-" (CeA) és egy "jóllakottsági-központ" (BLA).

Kísérleteinkben a CeA-ra fókuszáltunk, mivel ezen intraamygdaloid régió bizonyítottan szerepet játszik a táplálékfelvételi magatartás, stressz-válaszok [21, 31, 47] és megerősítési folyamatok [2,5,7] szabályozásában is.

2. Célkitűzések

- 1) Vizsgálataink arra irányultak, hogy az RFamid-típusú peptidek emlős idegrendszerben előforduló képviselői, az RFRP-1 és RFRP-3 a CeA-ba injektálva kifejtnek-e hatást a táplálékfelvételre.
 - a) Vizsgáltuk az RFRP-1 és RFRP-3 táplálékfelvételre gyakorolt hatását ad libitum táplált patkányokban.
 - b) Autoradiográfiás, illetve immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei szerint a centrális amygdala gazdagon ellátott RFamid-típusú peptideket kötő receptorokkal (NPPF1 receptorokkal). Bár a peptidek affinitást mutatnak az NPPF-2 receptor szubtípushoz is, azonban a CeA-ban ezt a receptor szubtípust nem sikerült felfedni. Kísérleteinkben tanulmányoztuk, hogy a táplálékfelvételre gyakorolt hatás specifikus-e, azaz NPPF-receptor antagonistákkal előkezeléssel kivédhető-e?
 - c) Vizsgáltuk, hogy a 24 órás táplálékmegevonás indukálta éhség-hajtóerő, motivációs drive, milyen hatással van az RFRP-1 és RFRP-3 okozta táplálékfelvétel változásra.

- d) Vizsgáltuk az RFRP-1 és RFRP-3 akut táplálékfelvétel változást indukáló hatásának lehetséges egyéb nem specifikus okait: vizsgáltuk az RFRP-1 és RFRP-3 hatását a testhőmérséklet változásra (esetleges hypothermiát vagy hyperthermiát kiváltó hatást), a vízfelvételekre, valamint a magatartási változásokra (különböző magatartásformákat vizsgáltunk: evés, mosakodás, vakaródzás, exploráció, pihenés).
- 2) Tanulmányoztuk a CeA-ba injektált RFRP-1 és RFRP-3 hatását patkányok spontán motoros aktivitására open field tesztben, valamint szorongásra kifejtett hatását emelt keresztpalló tesztben. Fontos volt megvizsgálni, hogy a peptidek befolyásolják-e a lokomóciót, illetve ha anxiogén vagy anxiolitikus hatást indukálnak, akkor az nem specifikus módon a táplálékfelvétel mértékét is befolyásolhatja. Továbbá, NPFF-receptor antagonistákkal próbáltuk igazolni az NPFF1 receptorok szerepét az anxiolitikus vagy anxiogén hatás közvetítésében.
- 3) Vizsgáltuk az RFRP-1 és RFRP-3 esetleges jutalmazó, pozitív megerősítő vagy averzív hatását helypreferencia tesztben. Helypreferencia teszt során, ha az állatok az apparátus egy adott térrészében több időt töltenek, mint a többi részében, azt nemcsak a preferencia kialakulása okozhatja, hanem az lehet hipoaktivitás következménye is, amely magyarázható lehet az anyag szorongáskeltő hatásával. Ezt az előbb említett emelt keresztpalló tesztben vizsgáltuk, illetve a helypreferencia teszt specifikus paramétereit is elemeztük.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteink során 280-320 g testtömegű hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatok két héttel a műtétek előtt kerültek át a tenyészetből a klimatizált állatházunkba, ahol külön ketrecekbe helyeztük el őket. A helyiségben a hőmérséklet 22 ± 1 °C, a relatív páratartalom 50-60 %-os volt. Mesterséges megvilágítást alkalmaztunk, melynek során a napszakok szerinti 12-12 óra sötét és világos periódust biztosítottunk. 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 sztereotaxikus technikával végzett műtétek során rozsdamentes fém vezetőkanülöket bilaterálisan vezettünk be a CeA fölé. A kanülök átmérője 22 gauge (0,7 mm) volt és belső vége a célzott struktúra felett 1 mm-rel helyezkedett el. A célzott terület koordinátáit Paxinos és Watson [36] agyatlasza alapján határoztuk meg: AP: a bregmához viszonyítva -2,3 mm, ML: $\pm 4,1$ mm, DV: -6,5 mm a dura felszínétől számítva.

3.3. Anyagbeadás

Kísérleteink során az RFRP-1 (048-48, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA) 25, 50, 100 és 200 ng (azaz 18,93; 37,8; 75,7; 151,4 pmol) dózist, az RFRP-3 (048-33, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA) 25, 50, 100 és 200 ng (azaz 25,25; 50,5; 100,1; 201,9 pmol) és az NPPF receptor antagonistát RF9 (R4282, Sigma Aldrich Co. trifluoracetát só, a továbbiakban ANT) 20, 25 ng és 50 ng (41,4; 51,8 és 103,6 pmol) dózist használtunk. Az anyagokat 0,15 M-os NaCl-ban oldottuk, a mikroinjekciók térfogata 0,4 μ l volt. Kontroll kezelésként a vehiculumot (0,15 M steril NaCl) alkalmaztuk ugyanabban a térfogatban. Az előbb említett dózisek az egyik agyféltekéhez történt injekciók dózist jelentik, tehát az

állatok a fent említett dózisok kétszeresét kapták, mivel a mikroinjekciók minden esetben kétoldaliak voltak. Közvetlenül a kísérletet megelőzően, az anyagbeadás előtt a dugókat eltávolítottuk a vezetőkanülökből. Az anyagbeadást a krónikusan implantált vezetőkanülbe helyezett beadókanülon (külső átmérő 27 gauge, 0.4 mm) keresztül végeztük. A beadókanül 1 mm-rel túlnyúlt a vezetőkanülon, így elérve a célterületet, az oldat a CeA-ba került. A beadókanült 20 cm-es polietilén csővel 10 ul-es Hamilton fecskendőhöz csatlakoztattuk, mely az oldott anyagokat tartalmazta. A Hamilton fecskendőt Cole-Parmer automata minipumpával (Cole-Parmer, IITC, Life Sci. Instruments, California) működtettük, amelyet úgy programoztunk, hogy 1 percen keresztül folyamatosan, egyenletes tempóban juttassa az anyagot a célterületre. A beadást követően a beadókanült további 1 percig a vezetőkanülben hagytuk, hogy megakadályozzuk az anyag visszafolyását, majd eltávolítása után ismét dugóval zártuk a vezetőkanült. Az ANT előkezelés minden esetben 15 perccel előzte meg az RFRP-1 vagy RFRP-3 mikroinjekciókat. Az injekciókat kézben tartott éber állatoknak adtuk be.

3.4. Táplálékfelvétel mérése

Ad libitum táplált állatokkal végzett kísérletek során a patkányoktól a kísérlet kezdete előtt 1 órával elvettük a szilárd táplálékot, míg a 24 órán keresztül éheztetett állatokkal végzett kísérletek során a mikroinjekciókat megelőző 24 órában és a mérési periódusok ideje alatt a szilárd táplálékot megvontuk. A neofóbia elkerülése végett, két héttel a műtétek előtt az állatokat folyékony táp felvételre, tejivásra (136,45 kJ/100 ml, Milk Quick, Berettyóújfalu) szoktattuk, melyhez egy kalibrált mililiteres beosztású itatótubusból juthattak [11,41,46]. Azon állatokat, melyeknél nem alakult ki egyenletes fogyasztás kizártuk a kísérletből. Vizsgálataink során ml-es pontossággal mértük az akut táplálékfelvételt, a mikroinjekciókat követő első fél órában 5 percenként, majd a 40., 50., 60. percben. A mérés után az állatok újra szilárd táphoz, valamint folyadékhoz juthattak.

3.5. Az állatok magatartásának vizsgálata táplálékfelvételi paradigmában

A vizsgálatok során 25 percen keresztül videokamerával rögzítettük az állatok viselkedését (Panasonic SDR-H85 video camera) az 50 ng RFRP-1, az 50 ng RFRP-3, illetve

a vehiculum CeA-ba injektálását követően. Az állatokat a tápálékfelvételi kísérletekhez hasonlóan a megszokott környezetükben vizsgáltuk. A kísérletek önkontrollosak voltak. Mértük, hogy az állatok a 25 perces megfigyelés 5 perces szakaszaiban mennyi időt töltöttek a folyékony tápfelvétellel, a mosakodási mozgásformával, vakaródzással, pihenéssel, valamint az explorációval.

3.6. Vízfelvétel mérése

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

3.7. Testhőmérséklet mérési kísérletek

Az állatok testhőmérsékletét az anuson keresztül 2.5 cm-re a colonba helyezett 0,1 °C pontosságú digitális hőmérővel (digital clinical thermometer, Kruuse, Cat.no 291103) vizsgáltuk. Az 50 ng RFRP-1, 50 ng RFRP-3, 100 ng RFRP-3, illetve a vehiculum beadása előtt 10 perccel, valamint a kezelések után 10 és 20 perccel mértük az állatok testhőmérsékletét.

3.8. Magatartási tesztek

A magatartási tesztek során az állatok viselkedését jellemző paramétereket a 'Noldus EthoVision Basic' számítógépes program segítségével regisztráltuk (Noldus Information Technology b.v., Wageningen, Hollandia). Ez a program követi és digitálisan rögzíti az állat mozgását az általunk kijelölt területen, on-line és off-line analízisre is lehetőséget ad.

3.8.1. Open field teszt

Open field tesztben vizsgáltuk az állatok spontán (motoros) aktivitását. Tíz perccel a kétoldali intraamygdaloid injekciókat követően a patkányokat egy 60x60x60 cm-es dobozba helyeztük. A doboz alját 16 egyenlő méretű négyzetre osztottuk. Öt percen keresztül

figyeltük és a doboz fölé erősített videokamerával rögzítettük az állatok viselkedését. Mértük az állatok által megtett távolságot, a keresztezések számát és az állatoknak az open field apparátus centrális areájában töltött idejét [a dobozt centrális (ez jelentette középső négy négyzet területét-ami az egész apparátus 25%-a) és perifériás területre is felosztottuk].

3.8.2. Emelt kereszpalló teszt (Elevated plus-maze test)

Az emelt kereszpalló tesztet egyes anyagok szorongást oldó vagy szorongást keltő hatásának kimutatására használják [24]. A kísérleti apparátus két nyitott (50 cm x 12 cm) és két zárt (50 cm x 12 cm x 40 cm) karból áll, melyek 1 méterrel a talaj fölött kereszt alakban helyezkednek el. A zárt kar oldala 40 cm magas, teteje nyitott. Tíz perccel az intraamygdaláris injekciókat követően a kísérleti állatot az apparátus közepére helyeztük, orral az egyik zárt kar irányába. Ezt követően 5 percig figyeltük és videóval rögzítettük az állatok mozgását. Mértük a zárt karokon, a nyitott karokon és a nyitott karok végein eltöltött időt, valamint a zárt karokra, a nyitott karokra és a nyitott karok végeire történő belépések számát. Mértük továbbá az állatok által 5 perc alatt megtett út teljes hosszát.

3.8.3. Helypreferencia teszt

A helypreferencia tesztet alkalmazzák kémiai anyagok jutalmazó-megerősítő hatásának vizsgálatára [44]. A helypreferencia kimutatására egy 85 cm átmérőjű, 40 cm magas falú, henger alakú apparátust használtunk (amely egy kör alakú 'open field' doboz). A sötétszürke színű doboz alján lévő két fekete vonal az apparátust négy egyenlő nagyságú kvadránsra osztotta. Az állatok térbeli tájékozódását külső vizuális "jelek", ún. "cue"-k segítették, amelyek a kísérletek során végig konstans pozícióban voltak. Vizsgálataink során az apparátust 40 W-os izzóval világítottuk meg. A helypreferencia tesztet négy egymást követő napon végeztük. A kísérlet első napján az állatokat habituáltuk, melynek során az állatokat konstans irányban az apparátus közepére helyeztünk. Ezt követően az állatok 15 percen (900 s) keresztül szabadon mozoghattak az egész doboz területén. Mértük a patkányok által megtett utat és az egyes kvadránsokban töltött időt. A kísérlet második és harmadik napján történt az állatok kondicionálása. Ezeken a napokon az állatokat az anyagbeadáskövetően a kezelő kvadránsba helyeztük. Minden egyes állatnak az apparátus egy olyan kvadránsát

választottuk ki a társításra, amelyben az állat a habituáció során nem a legtöbb, de nem is a legkevesebb időt töltötte. Az állatokat, a bilaterális mikroinjekciót követően azonnal 15 percre a kezelő kvadránsba zártuk egy plexi térelválasztó lap segítségével. A negyedik napon, a teszt során a plexi térelválasztó lapot eltávolítottuk, majd a patkányokat anyagbeadás nélkül az apparátus közepére helyeztük, és 15 percig (900 s) újra szabadon mozoghattak az egész dobozban. Ekkor ismét mértük az egyes kvadránsokban töltött időt. A helypreferencia kiépülésének az volt a kritériuma, hogy az állatok a teszt során szignifikánsan több időt töltsenek a kezelő kvadránsban, mint a habituáció alatt.

3.9. Adatok kiértékelése

3.9.1. Szövettan

A kísérletek befejezését követően az állatokat i.p. uretán (20%) oldattal elaltattuk, és először fiziológiás sóoldattal, majd ezt követően 10%-os formaldehid oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Az eltávolított agyakból egy hét posztfixációs periódust követően mikrotommal 40 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket krezil-ibolyával festettünk meg. Az értékelés fénymikroszkóppal történt, Paxinos és Watson-féle sztereotaxikus [36] atlasz segítségével rekonstruáltuk a kanülok valós helyét. Az eredmények kiértékelése során a statisztikai analízisből kizártuk azon állatokat, amelyek esetében a kanül nem a célterületen volt.

3.9.2. Statisztika

A táplálékfelvétel mérési vizsgálatok során nyert adatok kiértékeléséhez varianciaanalízist (ANOVA with repeated measures, SPSS Windows 18.0) alkalmaztunk. Mivel ezen kísérleteink önkontrollosak voltak, a kísérletek menete és az állatcsoportok nagy száma miatt post hoc tesztekkel nem értékelhettük adatainkat. Mindezért ahol a varianciaanalízis a kezelés és/vagy a kezelés-idő interakció tekintetében szignifikáns eltérést mutatott párosított t-próbával folytattuk az analízist. Párosított t-próbával hasonlítottuk össze az egyes időpontokban ugyanazon állatcsoport eltérő kezeléseket követően nyert adatait. A táplálékfelvétel változással kapcsolatos kísérleteink, így a vízfelvétel-, a táplálékdeprivációs

táplálékfelvétel-, a testhőmérséklet mérési, továbbá az állatok táplálékfelvétel során megfigyelt spontán magatartásának vizsgálata szintén önkontrollosak voltak, így a fent említett statisztikát alkalmaztuk az adatok analízisére. A magatartási tesztek során végzett vizsgálataink nem voltak önkontrollosak. Így az eltérő kezelésekből részesült állatcsoportok eredményeinek statisztikai értékelésére egy-szemponos vagy két-szemponos varianciaanalízist (ANOVA, SPSS Windows 18.0) alkalmaztunk. Ezt követően, szignifikáns különbség esetén Tukey féle post hoc tesztet végeztünk az eredmények további analízisére. A szignifikancia szintet minden esetben $p < 0,05$ -nek tekintettük.

4. Eredmények

4.1. Táplálékfelvételt vizsgáló kísérletek eredményei

4.1.1. Az intraamygdaláris RFRP-1 mikroinjekcióik hatása a táplálékfelvételre

A kísérleteinkben alkalmazott RFRP-1 legalacsonyabb (25 ng), valamint legmagasabb (200 ng) dózisa nem okozott változást a táplálékfelvételben a kontroll kezeléshez képest. Az 50 ng dózisú RFRP-1 mikroinjekciója a mérés kezdetétől a mérés végéig tartó szignifikáns táplálékfelvétel redukciót okozott a kontroll kezelés hatásához képest. A 100 ng RFRP-1 mikroinjekciója esetén a mérés kezdetétől fogva ugyan nem volt szignifikáns a különbség, de táplálékfelvételszökkenési tendencia jelentkezett a kontroll kezeléshez viszonyítva.

4.1.2. Az intraamygdaláris RFRP-3 mikroinjekcióik hatása a táplálékfelvételre

Vizsgálatainkban az 50 ng és a 100 ng RFRP-3 mikroinjekciók szignifikáns táplálékfelvétel csökkenést okoztak. Az RFRP-3 mindkét dózisa a mérés kezdetétől a mérés végéig tartó szignifikáns táplálékfelvétel redukciót okozott a kontroll kezelés hatásához képest. A 25 ng és a 200 ng RFRP-3 mikroinjekciója nem okozott változást a táplálékfelvételben.

4.1.3. Az intraamygdaláris NPF-receptor antagonistá RF9 mikroinjekciók hatása a táplálékfelvételre

Az RFRP-1 okozta anorexiogén hatás szubsztrátspecifikusságáról antagonistá előkezeléssel győződünk meg. Elsőként a 20 ng és 50 ng ANT mikroinjekcióinak hatását tanulmányoztuk a táplálékfelvételre. Eredményeink szerint sem az alacsonyabb, sem a magasabb dózisú RF9 önmagában alkalmazva nem változtatta meg a táplálékfelvétel dinamikáját. Ezt követően kombinált kezeléseket kezdtünk. Irodalmi adatok és saját megfigyeléseink szerint a 15 perces időintervallum, melyet az ANT és az RFRP mikroinjekciók között hagytunk, elegendő a receptorokhoz való kötődéshez, s az antagonistá hatásának kialakulásához. Vizsgálataink során az előző kísérletekben hatásosnak bizonyult 50 ng RFRP-1, illetve 50 ng RFRP-3 és 100 ng RFRP-3 dózissal ekvimoláris mennyiségű ANT (20, 25 és 50 ng) előkezelés hatását vizsgáltuk. Mind az RFRP-1, mind az RFRP-3 okozta táplálékfelvétel redukció eliminálható volt antagonistá előkezelések alkalmazásával.

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

Kísérleteinkben megvizsgáltuk, vajon az RFRP peptid bilaterális mikroinjekciója befolyásolja-e az előzőleg 24 órát éheztetett állatok táplálékfelvételét is. Megfigyeléseink szerint a 24 órán át táplálékdeprivált patkányok 50 ng RFRP-1 peptiddel való kezelése nem okozott szignifikáns változást a táplálékfelvételben. Ezzel szemben az 50 ng RFRP-3 kezelés a mérés 10. percétől a mérés végéig tartó szignifikáns táplálékfelvétel redukciót okozott a kontroll kezelés hatásához képest. A nagyobb dózisú (100 ng) RFRP-3 kezelés nem okozott változást a táplálékfelvételben.

4.1.5. Az intraamygdaláris RFRP-1 és RFRP-3 mikroinjekciók hatása a vízfelvételre

Kísérleteinkben folyékony táplálékfelvételi paradigmát alkalmaztunk. Mivel a folyékony táplálékfelvétel és a vízfelvétel hasonló motoros viselkedést igényel, ezért szükségesnek éreztük, hogy kísérleteinkben külön megvizsgáljuk a peptid hatását a vízfelvételre. Eredményeink szerint sem az 50 ng RFRP-1, sem pedig a 50 ng RFRP-3 vagy 100 ng RFRP-3 mikroinjekciója nem volt hatással a patkányok vízfelvételére.

4.2. Az állatok magatartásának vizsgálata táplálékfelvételi paradigmában

Sem az RFRP-1, sem az RFRP-3 kezelések hatására nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes viselkedési formákat illetően. A kontroll kezeléshez képest az RFRP-3, illetve RFRP-1 kezelés esetén az állatok táplálékfelvétellel töltött ideje az első 10 percben csökkent, de nem érte el a szignifikáns szintet. Az RFRP-1 és RFRP-3 kezelés hatására kialakuló táplálékfelvétel redukció nem magyarázható a viselkedési formák megváltozásával.

4.3. A testhőmérsékletet vizsgáló kísérletek eredményei

Jól ismert, hogy a testhőmérsékletbeli változások befolyásolhatják a táplálékfelvételt, ezért megvizsgáltuk az RFRP kezelések hatását a testhőmérsékletre.

4.3.1. Az intraamygdaláris RFRP-1 mikroinjekciók hatása a testhőmérsékletre

Az 50 ng RFRP-1 kezelés nem volt hatással a patkányok testhőmérsékletére a mikroinjektálást követő 20 percben, tehát e paraméter változása nem lehet oka a táplálékfelvételben bekövetkezett redukciónak.

4.3.2. Az intraamygdaláris RFRP-3 mikroinjekciók hatása a testhőmérsékletre

Az RFRP-3 kezelések (50 ng RFRP-3, 100 ng RFRP-3) hatására egyik mérési időpontban sem volt különbség a testhőmérsékletben, tehát a táplálékfelvétel csökkenés oka nem a testhőmérséklet változásban keresendő.

4.4. Magatartási kísérletek eredményei

4.4.1. Az intraamygdaláris RFRP-1 mikroinjekciók hatása open field tesztben

Az RFRP-1 bilaterális mikroinjekciója nem befolyásolta az állatok spontán motoros aktivitását open field tesztben. Az 50 ng RFRP-1, valamint a vehiculum kezelésben részesült állatcsoport teszt során kapott adatait összehasonlítottuk az egy nappal a mikroinjekciókat megelőzően végzett mérés során felvett megtett út hosszával és a keresztezések számával,

azaz az alapaktivitással. Továbbá az anxiogén”-szerű” hatás kimutatására használt paramétert, az open field apparátus centrális areájában töltött időt szintén összehasonlítottuk a különféle kezelésben részesült állatcsoportoknál. Az eredmények statisztikai értékelése során semmilyen összefüggésben nem találtunk eltérést az állatcsoportok között.

4.4.2. Az intraamygdaláris RFRP-3 mikroinjekcióinak hatása open field tesztben

Ezen kísérleteinkben vizsgáltuk az 50 ng RFRP-3, illetve 100 ng RFRP-3 kezelés hatását az állatok spontán motoros aktivitásra open field tesztben. A különféle kezelésben részesült csoportoknál a mikroinjekciót követő alapaktivitást hasonlítottuk össze az előző napi alapaktivitással. Mértük a megtett távolságot, a keresztezések számát, valamint az open field apparátus centrális areájában töltött időt. A mért paramétereket illetően nem találtunk szignifikáns eltérést az egyes csoportok közt.

4.4.3. Az intraamygdaláris RFRP-1 mikroinjekciók hatása emelt keresztpalló tesztben

A CeA-ba adott RFRP-1 szorongásoldó hatásának bizonyult. Az 50 ng dózisú RFRP-1 hatására szignifikánsan nőtt a nyitott karon, valamint a nyitott kar végén töltött idő, és az ott megtett út, a kezelés ugyanakkor az állatok általános aktivitását nem változtatta meg. A nagyobb dózisú (100 ng) RFRP-1 hatására ugyanakkor nem változott az állatok viselkedése az emelt keresztpalló teszt során. Az 50 ng RFRP-1 anxiolitikus hatása specifikus, mivel NPPF receptor antagonistá RF9 előkezeléssel eliminálható volt.

4.4.4. Az intraamygdaláris RFRP-3 mikroinjekciók hatása emelt keresztpalló tesztben

Az emelt keresztpalló tesztet elvégeztük a CeA-ba adott RFRP-3 szorongást fokozó (anxiogén) vagy szorongás oldó (anxiolitikus) hatásának tesztelésére is. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget egyetlen mért paraméterben sem. Ezen eredmények azt sugallják, hogy sem az 50 ng, sem pedig a 100 ng dózisú RFRP-3 nem indukál sem anxiogén, sem anxiolitikus hatást.

4.4.5. Az *intraamygdaláris RFRP-1 mikroinjekciók hatása helypreferencia tesztben*

Kimutattuk, hogy a CeA-ba mikroinjektált RFRP-1 pozitív megerősítő hatású. Az 50 ng dózisú RFRP-1 hatására szignifikánsan nőtt a kezelő kvadránsban töltött idő, míg a 100 ng-os dózis nem befolyásolta az állatok viselkedését. Az antagonistá önmagában szintén hatástalan volt. Az 50 ng RFRP-1 pozitív megerősítő hatását bilaterális antagonistá előkezelés felfüggesztette.

4.4.6. Az *intraamygdaláris RFRP-3 mikroinjekciók hatása helypreferencia tesztben*

A CeA-ba adott RFRP-3-at nem találtuk pozitív megerősítő hatásának helypreferencia tesztben. A kis dózisú (50 ng) RFRP-3 hatására nem változott a kezelő kvadránsban töltött idő. A 100 ng RFRP-3 kezelésben részesült csoport valamivel kevesebb időt töltött a kezelő kvadránsban, a különbség azonban nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet.

5. Diszkusszió

5.1. Táplálékfelvételt vizsgáló kísérletek megvitatása

A CeA-ban mind RFRP-1, mind RFRP-3 immunreaktív rostokat mutattak ki, továbbá a peptidek egyik receptorát, az NPF1 receptor jelenlétét is igazolták [4,30,50,51]. **Táplálékfelvétel mérési vizsgálataink azt igazolják, hogy az 50 ng dózisú RFRP-1 injektálása a CeA-ba szignifikáns folyékony táplálékfelvétel csökkenést okoz. Az RFRP-1 hatása specifikusnak bizonyult, mivel NPF1 receptor antagonistával (RF9) eliminálható volt. Az RFRP-3 esetében eredményeink azt mutatják, hogy a CeA-ba történő injektálása szignifikáns folyékony táplálékfelvétel csökkenést okoz az 50-100 ng dózistartományban. Az RFRP-3 anorexigén hatása specifikus, mivel NPF1 receptor antagonistá RF9 alkalmazásával eliminálható volt. Ezek az első eredmények, melyek az RFRP-1 és RFRP-3 táplálékfelvétel csökkentő hatásáról számolnak be a CeA-ban.** Eredményeink azonban szemben állnak az irodalomban eddig fellelhető eredményekkel. Nevezetesen, Johnson és munkatársai, valamint Murakami és munkatársai által végzett kísérletekben az RFRP-3 i.c.v. injektálása táplálékfelvétel növekedést okozott [25,32].

Az általunk alkalmazott hatékony dózistartomány pikomolos tartományba (50.5-101.1 pmol/0.4ul) esett, ez sokkal alacsonyabb, mint az agykamrába történő injektálások során használt dózisok (505 - 1010 pmol/5ul), melyeknél a peptid orexigén hatásáról számoltak be. Fontos tudni, hogy nagyszámú RFRP-3 immunreaktív neuront találtak az arcuatus magban, a DMH-ban, a dorzális mammilláris magban és a periventrikuláris területeken a 3. agykamra falához közel [28,42,51]. Az RFRP-3 neuronok efferens rostokat küldenek a VMN-ba, az LH-ba az MCH és orexin sejtekhez, valamint az arcuatus magba mind az NPY immunreaktív, mind a POMC immunreaktív sejtekhez. Ezen projekciók szerepének vizsgálatára irányuló elektrofiziológiai kísérletek felfedték, hogy az RFRP-3 gátolja a POMC neuronok aktivitását és csökkenti a kisszeptin okozta POMC neuronok tüzelési aktivitását (excitációját) egérben [17]. A táplálékfelvételt gátló (anorexigén) sejtek, mint pl. a POMC neuronok gátlása eredményezheti a táplálékfelvétel növekedését, ez magyarázhatja az RFRP-3 orexigén hatását. Feltételezhető, hogy az RFRP-3 i.c.v. adását követő táplálékfelvételt fokozó hatás az NPY/POMC rendszeren keresztül valósul meg. A CeA-ba injektált RFRP-3 pedig más mechanizmuson keresztül fejt ki hatását. Továbbá fontos kiemelni a különbséget az i.c.v. alkalmazás és egy jól körülhatárolt agyi struktúra célzott mikroinjekciójának hatásai között. Az i.c.v. injekció esetében az alkalmazott neuropeptid diffúziós sebessége nagyobb a liquorban, mint az agyi parenchymában, így az RFRP-3 az agykamra viszonylag nagy felszínén szétterjed, mielőtt bekerülne az agyszövetbe. Ezért, véleményünk szerint, az i.c.v. injekció egy jóval általánosabb hatást okoz, mint a lokális mikroinjekció. Továbbá a hatás függ a receptor denzitástól és a peptid féléletidejétől is (ezen peptidek esetében ez nem ismert). Feltételezhetjük, hogy az i.c.v. injektált RFRP-3 azon NPPF receptorokhoz kötődött, melyek az agykamra falához közelebb helyezkedtek el, valamint koncentrációja fokozatosan csökkent az agyi parenchymában. Ezzel szemben az RFRP-3 CeA-ba történő injektálása során a lokális, elérhető NPPF receptorokhoz tud kötődni és ily módon befolyásolja a lokális neuronhálózatok működését.

Eredményeinkhez hasonló adatokat mutatnak mind kinetikájában, mind az RFRP-3 specifikus hatásában azon vizsgálatok, melyek szerint az RFRP-3 (VPNLPQRF-NH2-aminosavszekvenciájú humán RFRP-3) táplálékfelvétel csökkentő hatást fejt ki csirkékben. Az RFRP-3 anorexigén hatása rövid idejű (60 percig szignifikáns), a vízfelvételeire nincs hatása [8]. Csirkékben i.c.v. injektálva a neuropeptid FF (NPPF, amely szekvenciáját

tekintve a legközelebb áll a RFRP peptidekhez) ugyancsak anorexigén hatású, azonban a hatás hosszabb ideig tart, mint az RFRP-3 esetében. Feltételezik, hogy az RFRP-3 és az NPF2 anorexigén hatása az NPF2 receptorok két eltérő altípusán közvetítődik. Az NPF2 sokkal nagyobb affinitással kötődik az NPF2 receptorhoz, mint az NPF1 receptorhoz [38]. Az NPF2 anorexigén hatása NPF2 receptoron keresztül közvetítődik, míg az RFRP-3 nagyobb affinitást mutat az NPF1 receptorhoz, valószínűleg anorexigén hatását ezen receptoron fejt ki [4,30]. Ezen eredmények azt sugallják, hogy az NPF2-es receptor közvetítette hatás erőteljesebb és hosszabb ideig tart, míg az NPF1 közvetítette hatás tranziensebb [8]. Ez az eredmény egyezést mutat a mi eredményeinkkel, melyek szerint az RFRP-1 és RFRP-3 táplálékfelvételt csökkentő hatása az NPF1 receptoron keresztül érvényesül, ezért tranziensebb, míg i.c.v. adva patkányban mindkét receptoron közvetítődhet a hatás.

Külön kísérletekben vizsgáltuk a 24 órás depriváció hatását a CeA-ba injektált RFRP-1 és RFRP-3 táplálékfelvétel csökkentő hatására. A kísérletek során különbséget figyeltünk meg az RFamid-típusú peptidek hatásában. A 24 órás éheztetést követően az RFRP-1 mikroinjekciója nem okozott változást a táplálékfelvételben, ami arra utal, hogy az **AMY-ba injektált RFRP-1 hatására megvalósuló táplálékfelvétel redukció függ az éhség-jóllakottsági állapottól. Ellenben az 50 ng dózisú RFRP-3 mikroinjekciója a 24 órás éheztetést követően is szignifikáns táplálékfelvétel redukciót okozott. Ez esetben tehát az RFRP-3 képes volt az egy napos táplálékdepriváció által kiváltott éhség hajtóerő (fokozott éhség motiváció) ellenére is anorexigén hatást kifejteni.**

Továbbá vizsgáltuk az RFRP-1 és RFRP-3 akut táplálékfelvétel változást indukáló hatásának lehetséges egyéb nem specifikus okait. Vizsgálataink szerint az RFRP-1 és RFRP-3 anorexigén hatását a beadást követő 5-25 percben fejt ki, ekkor **vizsgáltuk a peptidek vízfelvétele, illetve testhőmérsékletre gyakorolt hatását.** A peptid kezelésekre hatására ezekben a paraméterekben nem következett be változás, vagyis **a peptidek okozta táplálékfelvétel redukció nem hozható összefüggésbe a vízfelvétel megváltozásával, illetve a testhőmérsékletben bekövetkező változásokkal.**

Az evéssel kapcsolatos magatartást analizáló kísérleteinkben a táplálékfelvételt mérő kísérletekhez hasonlóan szignifikáns mértékű táplálékfelvétel csökkenést tapasztaltunk. Ugyanakkor **sem az RFRP-1, sem az RFRP-3 mikroinjektálását követően nem változott**

az állatok által a különböző magatartásformákkal (mosakodás, vakaródzás, exploráció, pihenés) töltött idő. Megállapíthatjuk, hogy az RFamid-típusú peptidek indukálta táplálékfelvétel csökkenés nem tulajdonítható ezen magatartási formákban történő változásoknak.

5.2. Magatartási vizsgálatok

1. Az Open field teszt az általános motoros aktivitás vizsgálatára alkalmas paradigma. A CeA-ba mikroinjektált RFRP-1 és RFRP-3 hatásának vizsgálata az állatok motoros aktivitására több szempontból is fontos volt számunkra. Egyrészt azt tanulmányoztuk, hogy az RFRP-1 és RFRP-3 táplálékfelvételt csökkentő hatása nem magyarázható-e az állatok motoros aktivitásbeli változásával (hypoaktivitásával). Másrészt, helypreferencia tesztben kimutattuk, hogy az RFRP-1 pozitív megerősítő hatású, azaz az állatok több időt tartózkodnak egy adott térrészben. Ez esetleg szintén magyarázható lenne az állatok hypoaktivitásával. Kaewwongse és munkatársai [26] arról számoltak be, hogy az agykamrába injektált RFRP-1 hatására csökkent az állatok által az open field apparátus centrális areájában töltött idő, ugyanakkor a peptid kezelés nem befolyásolta a lokomóciót, valamint az RFRP-3 hatására szintén csökkent az e kezelésben részesült állatok open-field centrális areában töltött ideje, illetve csökkent az állatok motoros aktivitása is. **Eredményeink szerint a CeA-ba injektált RFRP-1-nek és RFRP-3-nak az általunk alkalmazott dózisokban nincs hatása a patkányok lokomotoros aktivitására, valamint a centrális areában töltött időre sem.**

2. Az emelt keresztpalló tesztek eredményei alapján a CeA-ba injektált RFRP-1 szorongásoldó hatásúnak bizonyult. A kis dózisu (50 ng) RFRP-1 hatására nőtt a nyitott karon, valamint a nyitott kar végén töltött idő és az ott megtett út. Az anxiolitikus hatás közvetítésében valószínűleg NPFF1 receptorok játszanak szerepet. Ugyanakkor a mi kísérleteinkben az RFRP-3 a CeA-ba injektálva nem volt sem szorongásoldó, sem szorongáskeltő hatású. Irodalmi adatok szerint az RFRP-3 nagy dózisu i.c.v. alkalmazása anxiogén hatású. Feltehetően e hatás kialakulásában stresszhormonok felszabadulása (ACTH, CRH) játszhat szerepet. Az RFRP-1 szorongásoldó hatásának kialakulásában szerepet játszhat a CRH-val, oxytocinnal, szerotoninnal és a benzodiazepinnekkel való kölcsönhatás.

3. Helypreferencia teszt során a kisebb dózisú RFRP-1 pozitív megerősítő hatásának bizonyult. A jutalmazó hatás közvetítésében feltehetően a CeA-ban megtalálható NPPF1 receptorok játszanak szerepet. Az RFRP-1 pozitív megerősítő hatása specifikus, mivel NPPF receptor antagonistával eliminálható volt. A helypreferencia teszt során kiértékelésre került lokomotoros aktivitást jelző paraméterek (megtett távolság, belépések száma) nem változtak a kezelések hatására, tehát a helypreferencia kialakulása nem hozható összefüggésbe anxiogén hatás kialakulásával, sőt emelt keresztpalló tesztben igazoltuk, hogy az RFRP-1 kezelés anxiolitikus hatású. A CeA, a limbikus rendszer részeként fontos szerepet játszik a memória folyamatok szabályozásában [22,34] és a megerősítésben [2,5,7] és ismert, hogy ezen struktúra viszonylag gazdag NPPF1 receptorokban [3,10]. A központi idegrendszeren belül RFRP-1 immunreaktív elemek több olyan olyan agyi struktúrában is előfordulnak, melyeknek szerepük van a jutalmazó hatások közvetítésében, többek közt a striatumban, HT-ban, AMY-ban, VTA-ban, valamint a Nacc-ben [19,39,51]. Az RFRP-1 két receptortípusa szintén megtalálható ezeken a területeken [4,10,30,48]. Valószínűsítjük, hogy az RFRP-1 CeA-ban kialakult pozitív megerősítő hatásának közvetítésében, a mezolimbikus dopaminerg rendszerrel való kölcsönhatás is szerepet játszhat. További kísérletek szükségesek az RFRP-1 hatásainak pontosabb és részletesebb megismerésére, valamint a DA-nal való esetleges interakcióinak feltérképezésére.

6. Összegzés

Összefoglalásként, eredményeink ismeretében elmondhatjuk, hogy a CeA-ba injektált RFRP peptidek bizonyosan szerepet játszanak a táplálékfelvételi és magatartási folyamatok szabályozásában. Mind az RFRP-1, mind az RFRP-3 a CeA-ba injektálva anorexigén hatású, de az RFRP-3 táplálékfelvétel csökkentő hatása kifejezettebb, szélesebb dózistartományban effektív, továbbá az éhség fokozásakor (depriváció alkalmazása után) is csökkenti a táplálékfelvételt. Igazoltuk, hogy az RFRP-1 a CeA-ba injektálva anxiolitikus hatású, továbbá helypreferencia tesztben igazoltuk pozitív megerősítő hatását. Noha mindkét peptid ugyanarról a génről szintetizálódik, az eltérő hatásokért a különböző aminosavszekvenciájuk (ami már a C-terminálisukban is megnyilvánul) lehet a felelős. Az RFRP peptidek hatásmechanizmusának pontosabb megismeréséhez további kísérleteket tervezünk, egyrészt

más antagonisták alkalmazását tervezzük a receptorális mechanizmusok és interakciók felderítése érdekében, másrészt vizsgálni szeretnénk az RFRP peptidek kölcsönhatásait a dopaminerg rendszerrel. Bár ezek még az első alapkutatási eredmények a CeA-ban e peptideket illetően, reméljük, hogy ezen eredmények hozzájárulnak a központi idegrendszeri folyamatok, a humán táplálkozási és magatartási zavarok mechanizmusának pontosabb megértéséhez.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Allard M, Labrousse S, Nosjean A, Laguzzi R, Mechanisms Underlying the Cardiovascular Responses to Peripheral Administration of NPF in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995. 274(1): p. 577-83.
- [2] Baxter MG, Murray EA, The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosc*, 2002. 3(7): p. 563-573.
- [3] Beaulieu S, Di Paolo T, Cote J, Barden N, Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. *Neuroendocrinology*, 1987. 45: p. 37-46.
- [4] Bonini JA, Jones KA, Adham N, Forray C, Artymyshyn R, Durkin MM, Smith KE, Tamm JA, Boteju LW, Lakhani PP, Raddatz R, Yao WJ, Ogozalek KL, Boyle N, Kouranova EV, Quan Y, Vaysse PJ, Wetzel JM, Branchek TA, Gerald C, Borowsky B, Identification and Characterization of Two G Protein-coupled Receptors for Neuropeptide FF. *J Biol Chem*, 2000. 275(50): p. 39324-31.
- [5] Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt B, Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2002. 26(3): p. 321-352.
- [6] Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, Do-Rego JC, Vandesande F, Llorens-Cortes C, Costentin J, Beauvillain JC, Vaudry H, Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003. 100: p. 15247-15252.
- [7] Chevrette J, Stellar JR, Hesse GW, Markou A, Both the shell of the nucleus accumbens and the central nucleus of the amygdala support amphetamine self-administration in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2002. 71(3): p. 501-507.
- [8] Cline MA, Bowden CN, Calchary WA, Layne JE, Short-Term Anorexigenic Effects of Central Neuropeptide VF are Associated with Hypothalamic Changes in Chicks. *Journal of Neuroendocrinology*, 2008. 20(8): p. 971-977.
- [9] Dockray GJ, The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Exp Physiol*, 2004. 89(3): p. 229-35.
- [10] Elshourbagy NA, Ames RS, Fitzgerald LR, Foley JJ, Chambers JK, Szekeres PG, Evans NA, Schmidt DB, Buckley PT, Dytko GM, Murdock PR, Milligan G, Groarke DA, Tan KB, Shabon U, Nuthulaganti P, Wang DY, Wilson S, Bergsma DJ, Sarau HM, Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 2000. 275(34): p. 25965-71.
- [11] Fekete E, Bagi EE, Toth K and Lenard L, Neuromedin C microinjected into the amygdala inhibits feeding. *Brain Res Bull*, 2007. 71: p. 386-392.

- [12] Fornberg E, Delgado JMR, Avoidance and alimentary reactions during amygdala stimulation. *J Neurophysiol*, 1961. 24: p. 651-654.
- [13] Fonberg E, Amygdala functions within the alimentary system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1974. 34: p. 435-466.
- [14] Fonberg E, Aphagia, produced by destruction of the dorsomedial amygdala in dogs. *Bull Acad Pol Sci Biol*, 1966. 14: p. 719-722.
- [15] Fonberg E, Hyperphagia produced by lateral amygdalar lesions in dogs. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1971. 31: p. 19-32.
- [16] Fonberg E, The normalizing effect of lateral amygdalar lesions upon the dorsomedial amygdalar syndrome in dogs. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1973. 33: p. 449-466.
- [17] Fu LY, van den Pol AN, Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci*, 2010. 30: p. 10205-10219.
- [18] Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S, Recent advances in mammalian RFamide peptides: The discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides*, 2006. 27(5): p. 1073-1086.
- [19] Fukusumi S, Habata Y, Yoshida H, Iijima N, Kawamata Y, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Kitada C, Shintani Y, Suenaga M, Onda H, Nishimura O, Tanaka M, Ibata Y, Fujino M, Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2001. 1540(3): p. 221-232.
- [20] Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, Shintani Y, Hinuma S, Fujino M, A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *The Journal of biological chemistry* 2003. 278: p. 46387-46395.
- [21] Grijalva CV, Levin ED, Morgan M, Roland B and Martin FC, Contrasting effects of centromedial and basolateral amygdaloid lesions on stress-related responses in the rat. *Physiol Behav Neurosci*, 1990. 48: p. 495-500.
- [22] Grossman SP, Grossman L, Walsh L, Functional organization of the rat amygdala with respect to avoidance behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 1975. 88: p. 829-850.
- [23] Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H, Fujino M, A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 1998. 393: p. 272-276.
- [24] Hogg S, A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996. 54: p. 21-30.
- [25] Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS, Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Hormones and Behavior*, 2007. 51(1): p. 171-180.
- [26] Kaewwongse M, Takayanagi Y, Onaka T, Effects of RFamide-related peptide (RFRP)-1 and RFRP-3 on oxytocin release and anxiety-related behaviour in rats. *J Neuroendocrinol*, 2011. 23(1): p. 20-27.
- [27] Klüver H and Bucy PC, Preliminary analysis of function of the temporal lobes on monkeys. *Arch Neurol Psychiatry*, 1939. 42: p. 979-1000.
- [28] Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R, Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *PNAS*, 2006. 103(7): p. 2410-2415.
- [29] Lawrence CB, Ellacott KL, Luckman SM, PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling. *Endocrinology*, 2002. 143(2): p. 360-367.
- [30] Liu Q, Guan XM, Martin WJ, McDonald TP, Clements MK, Jiang Q, Zeng Z, Jacobson M, Williams DL Jr, Yu H, Bomford D, Figueroa D, Mallee J, Wang R, Evans J, Gould R, Austin CP, Identification and Characterization of Novel Mammalian Neuropeptide FF-like Peptides That Attenuate Morphine-induced Antinociception. *J Biol Chem*, 2001. 276(40): p. 36961-36969.

- [31] Moreira CM, Masson S, Carvalho MC, Brandão ML, Exploratory behaviour of rats in the elevated plus-maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and central amygdaloid nuclei. *Brain Research Bulletin*, 2007. 71(5): p. 466-474.
- [32] Murakami M, Matsuzaki T, Iwasa T, Yasui T, Irahara M, Osugi T, Tsutsui K, Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *Journal of Endocrinology*, 2008. 199 (1): p. 105-112.
- [33] Murase T, Arima H, Kondo K, Oiso Y, Neuropeptide FF reduces food intake in rats. *Peptides*, 1996. 17(2): p. 353-354.
- [34] Nagel JA, Kemble ED, Effects of amygdaloid lesions on the performance of rats in four passive avoidance tasks. *Physiol Behav Neurosci*, 1976. 17: p. 245-250.
- [35] Newmyer BA, Cline MA, Neuropeptide SF is associated with reduced food intake in chicks. *Behavioural Brain Research*, 2009. 205(1): p. 311-314.
- [36] Paxinos G, Watson C, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 2nd edition. New York, Academic Press, 1986.
- [37] Primeaux SD, Blackmon C, Barnes MJ, Braymer HD, Bray GA, Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats. *Peptides*, 2008. 29(11): p. 1994-2000.
- [38] Quelven I, Roussin A, Zajac JM, Comparison of pharmacological activities of Neuropeptide FF1 and Neuropeptide FF2 receptor agonists. *European Journal of Pharmacology*, 2005. 508(1-3): p. 107-114.
- [39] Rizwan MZ, Porteous R, Herbison AE, Anderson GM, Cells expressing RFamide-related peptide-1/3, the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone orthologs, are not hypophysiotropic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology*, 2009 150(3): p. 1413-1420.
- [40] Roaa J, Aguilera E, Dieguez C, Pinillaa L, Tena-Sempere M, New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2008. 29(1): p. 48-69.
- [41] Tóth K, László K, Bagi EE, Lukács E and Lénárd L, Effects of intraamygdaloid microinjections of acylated-ghrelin on liquid food intake of rats. *Brain Res Bull*, 2008. 77: p. 105-111.
- [42] Tsutsui K, Ubuka T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Discovery, progress and prospect. *General and Comparative Endocrinology*, 2012. 177(3): p. 305-314.
- [43] Tsutsui K, Ukena K, Hypothalamic LPXRF-amide peptides in vertebrates: Identification, localization and hypophysiotropic activity. *Peptides*, 2006. 27(5): p. 1121-1129.
- [44] Tzschentke TM, Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol*, 1998. 56: p. 613-672.
- [45] Ukena K and Tsutsui K, A new member of the hypothalamic RF-amide peptide family, LPXRF-amide peptides: structure, localization, and function. *Mass Spectrom Rev*, 2005. 24: p. 469-486.
- [46] Vígth J, Lénárd L, Fekete É, Hernádi I, Bombesin injection into the central amygdala influences feeding behavior in the rat. *Peptides*, 1999. 20(4): p. 437-444.
- [47] Werka T, Skar J, Ursin H, Exploration and avoidance in rats with lesions in amygdala and piriform cortex. *J Comp Physiol Psychol*, 1978 92(4): p. 672-681.
- [48] Wu CH, Tao PL, and Huang EY, Distribution of neuropeptide FF (NPFF) receptors in correlation with morphine-induced reward in the rat brain. *Peptides*, 2010. 31(7): p. 1374-1382.
- [49] Yang HY, Fratta W, Majane EA, and Costa E, Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(22): p. 7757-7761.

- [50] Yano T, Iijima N, Hinuma S, Tanaka M, Ibata Y, Developmental expression of RFamide-related peptides in the rat central nervous system. *Developmental Brain Research*, 2004. 152(2): p. 109-120.
- [51] Yano T, Iijima N, Kakihara K, Hinuma S, Tanaka M, Ibata Y, Localization and neuronal response of RFamide related peptides in the rat central nervous system. *Brain Research*, 2003. 982(2): p. 156-167.

8. Publikációs jegyzék

I. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

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

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

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

II. Egyéb publikációk

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

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

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

III. Konferenciaszereplések és absztraktok

László, K., **Kovács, A.**, Lacy, G.D., Ollmann, T., Péczely, L., Kertes, E., Karádi, Z.: The role of intraamygdaloid oxytocin in reinforcing mechanisms. *FEPS 2014 Congress Budapest, Hungary, August 27-30, 2014.*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Kovács, A., László, K., Bencze, N., Zhizhina, O., Ollmann, T., Péczely, L., Lénárd, L.: Effects of intraamygdaloid microinjections of RFRP peptides in conditioned place preference test. *14th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society. Budapest, Hungary, January 17-19, 2013.*

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

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

Kovács, A., László, K., Bencze, N., Zagoracz, O., Ollmann, T., Péczely, L., Lénárd, L.: Effects of RFRP peptides microinjections into the central nucleus of amygdala in conditioned place preference test. II. Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, Hungary, May 15-17, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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