

TDK dolgozat

Kovács Dóra

2023

A hypothalamikus éhség-szabályozó AgRP sejtek hatása a rágcsálók tanulására

Kovács Dóra

Állatorvostudományi Egyetem

Biológia BSc. III. éves hallgató

Témavezető:

Dr. Rácz Bence

Állatorvostudományi Egyetem, Anatómiai és Szövettani Tanszék

Egyetemi tanár

Állatorvostudományi Egyetem

Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	5
Célkitűzés	10
Anyag és módszer	11
A felhasznált kísérleti állatok és tartási körülményük.....	11
Az Intellicage.....	12
Kísérleti elrendezés.....	13
Adatelemzés.....	15
Eredmények.....	16
Habituáció.....	17
Place Learning	19
Reversal Place Learning	21
Következtetések	25
Összefoglaló	28
Summary	29
Köszönetnyilvánítás	30
Irodalomjegyzék.....	31

Rövidítések jegyzéke

AgRP – Aguti-rokon fehérje

AL – Ad libitum

AMP – Adenozin- monofoszfát

ARC - Nucleus arcuatus, hypothalamusban található mag

AgRP^{DTR+/-} - AgRP-ablált heterozigóta (egér)

ATP - Adenozin- trifoszfát

Default – Alapértelmezett fázis a tanulási folyamatok során ivási lehetőség nélkül

DT – Diftéria toxin

DTR – Diftéria toxin receptor

GABA - Gamma-amino-vajsav

NAD – Nikotinamid-adenin-dinukleotid

NPY – Neuropeptid-Y

PCR – Polimeráz- láncreakció

POMC – Pro-opiomelanokortin

PL - Place learning (térbeli tanulás) ivási lehetőséggel

RFID – Rádiófrekvenciás azonosító

RPL – Reverse place learning (fordított térbeli tanulás) ivási lehetőséggel

Trpv1 – Tranziens receptorpotenciál vanilloid-1

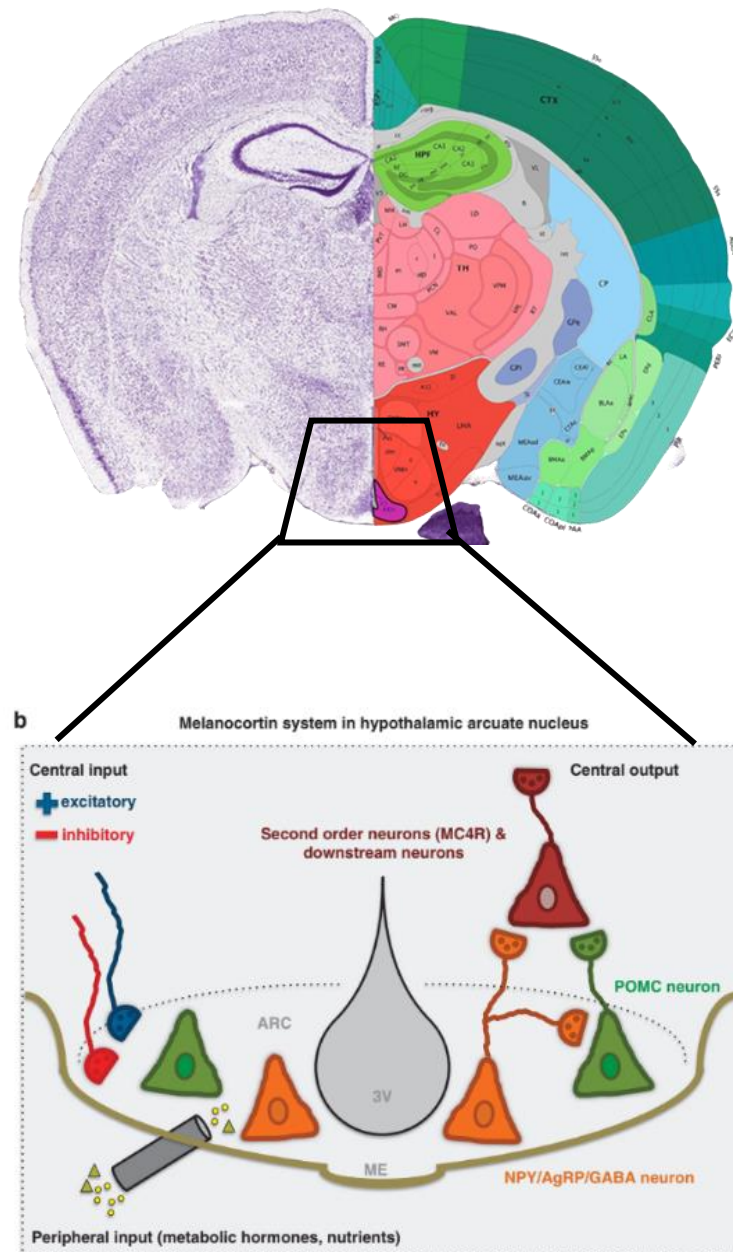
WT – Vad típus (egér)

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A táplálkozás létfontosságú a szervezet tápanyag és energiaellátásához, amelyet sokféle tényező befolyásol. A táplálékfelvétel, táplálkozás és hozzájuk kapcsolódó viselkedés különböző idegi, illetve hormonális hatás alatt áll [1]. A táplálékfelvétel és az energiaanyagcsere szabályozás számos agyterület által vezérelt, legfőbb mediátor azonban a hypothalamus, azon belül is a nucleus arcuatus (ARC). Emellett a szabályozásban részt vesz az agytörzs nucleus tractus solitarius, a paraventricularis thalamus, a nucleus parabrachialis, illetve a ventralis tegmentalis terület [2]. A hypothalamus a központi idegrendszer része, az agy thalamus alatt található régiója, amely számos testi folyamatot kontrolál. A táplálkozási funkciók mellett szerepe van a vérnyomás és pulzus, a megfelelő testhőmérséklet kialakításában, szexuális funkciókra is van hatással, illetve az alvás-ébrenlét ciklust és érzelmi válaszokat is szabályoz. A hypothalamus hormonokat is termel, tehát összeköttetésként szolgál az idegrendszer és az endokrin rendszer között is [3].

A táplálékfelvétel kezdőpontját, a táplálékkeresési folyamatot egy pszichobiológiai élmény indítja be, amit étvágnak nevezünk. A jóllakottság pedig egyfajta elégedettségi érzés, mely lezárja a táplálékfelvételt. A perifériáról felszabaduló hormonok információt szolgáltatnak a szervezet energiaállapotáról, a bélből származó jelek közvetetten az agytörzsi magokon keresztül vagy közvetlenül a vérkeringésen keresztül jutnak el a köztiagy régiójába, a hypothalamusba. Az inzulin a hasnyálmirigy béta-sejtjei által termelt hormon, mely leginkább a glükózra reagál, a táplálékfelvétel csökkentésében játszik szerepet, a leptin pedig a fehérzsírszövet által kiválasztott anyag, mely az inzulinhoz hasonlóan a szervezet tápanyag ellátottságát jelzi [4].

A ghrelin a gyomorban termelődő hormon, mely a gyomor-bél traktus orexigén, azaz táplálékfelvételt serkentő jele. A vérárammal eljutva a hypothalamusban receptorspecifikusan kötődik az ott található AgRP sejtekhez, serkenti ezeknek a gátló neuronoknak a működését. Az AgRP neuronok emelkedett működése gátolja a jóllakottságért felelős melanokortin (POMC) idegsejteket, így előidézve az éhségérzetet [5]. Ezek az idegsejtek szabadítják fel az AgRP-t, emellett az NPY-t valamint gamma-amino-vajsavat (GABA). A POMC neuronok ingerléskor alfa-melanocita stimuláló hormon szabadul fel, mely összefüggésben áll a táplálékfelvétel csökkenésével. A hypothalamus arcuatus magjában ez két neuronpopuláció szabályozza jelentősen az energiahomeosztázist [6], [7], [8].



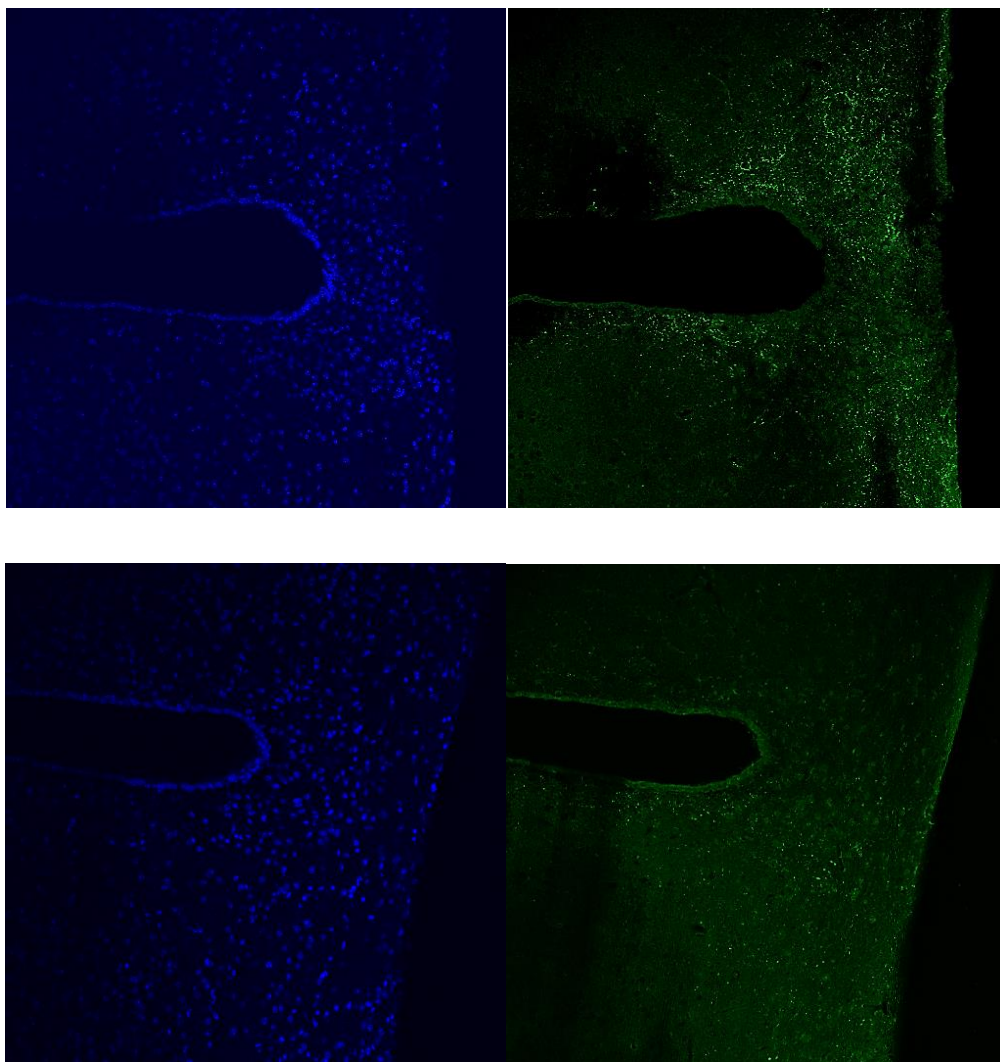
1.ábra Arcuatus mag és az ott található melanocortin rendszer (Forrás: Koch M, Horvath TL (2014) *Molecular and cellular regulation of hypothalamic melanocortin neurons controlling food intake and energy metabolism*)

Korábbi vizsgálat kimutatta, hogy az AgRP sejtek aktivációja gátolja a lokális POMC neuronokat az arcuatus magban. Az AgRP és a POMC sejtek nem csak a metabolikus hormonokra reagálnak, hanem a klasszikus neurotranszmitterekre is, mint a gamma-amino-vajsav vagy a glutamát [9]. Az AgRP és POMC sejtek a glükóz homeosztázist és a lipid metabolizmust is szabályozzák, rajtuk inzulin- és leptinreceptorok fejeződnek ki [5]. Egy tanulmány kimutatta, hogy a nem elhízott egerek POMC sejtjeiben az inzulinra adott válasz

ATP-érzékeny káliumcsatornákon keresztül alakul ki [10]. A leptin pedig a fehér zsírszövetből felszabadulva aktiválódik, így csökkenti az AgRP sejtek tüzelési képességét. A neuronok megfelelő működéséhez szükséges, hogy pontos információval rendelkezzenek az elérhető és felhasználható energiamennyiségről. Ehhez az információhoz az adenosin-mono- és trifoszfát (ATP) arányának érzékelésével jutnak hozzá az idegsejtek. Az adenosin-monofoszfát (AMP) aránya az AMP-kináz enzim aktivitásának függvénye. Ha az adenosin-monofoszfát mennyisége megnő, akkor aktiválódik az AMP-kináz, ezáltal zsírsavak és glükóz felvétele indul meg, így megkezdődik az ATP vagyis az energiatermelés, illetve az energiafelhasználás csökkentése az AgRP sejtek működésén keresztül. Ezzel szemben, ha ATP halmozódik fel a POMC sejtek lépnek működésbe, melynek következménye az energiafelhasználás növelése [11].

Az éhség-szabályozó neuronok funkcióinak megfigyelésére egyik legalkalmasabb módszer, ha a működő, illetve a működésképtelen idegsejtek tevékenységét összehasonlítjuk. Olyan, mesterséges genetikai módosításon átesett egereknél lehet ezt az összehasonlítást elvégezni, melyeknek AgRP promóterén egy diftéria toxin receptort (DTR) kódoló gén van. Így a diftéria toxin receptor kizárólag az AgRP sejtek fejezik ki ezekben a transzgenikus egerekben. Ezen állatok esetében a diftéria toxin (DT) szubkután vagy intraperitoneális beadása után a DT specifikusan köt a DT-receptorhoz, majd apoptózist indukál, így az AgRP neuronok szelektíven elpusztulnak (**2. ábra**). Ugyanakkor a vad típusú (WT) állatokra a toxin nincs hatással, ugyanis egerekben nem fejeződik ki a diftéria toxin receptor. A DT, melyet a *Corynebacterium diphtheriae*-ből nyernek ki, a sejtek fehérjeszintézisének erős inhibitora. A DTR transzmembrán doménje kilenc alfa-hélixből áll, ezzel vesz részt a membráninszercióban és a transzlokációban. Receptorkötő doménjét pedig lapított béta-redők alkotják. A baktériumból kivont toxint enyhe tripszinezésnek vetik alá, majd *in vitro* két komponens jön létre az A és a B fragmentum (DT-A és DT-B). A transzgenikus egerek esetében a beinjektált DT a DT-B alegységen keresztül a sejt felszínén toxinreceptorhoz kötődik, majd receptor-mediált endocitózis következtében endoszómán bejut a sejtbe. Ezt követően a DT-A alegység a citoplazmába transzlokálódik, ahol katalizálja a NAD (nikotinamid-adenin-dinukleotid) ADP-ből származó ribóz részének hisztidinmaradékká történő átvitelét a polipeptidláncon, így gátolja a fehérjeszintézist, amely eredményeképpen a sejt elpusztul [12]. Az egerek sejtjei alapvetően nem érzékenyek a diftéria toxinra – az emberi sejtekkel ellentétben - mert a rágsálók sejtjei kevésbé vagy egyáltalán nem kötik a DT-B-t. Így laboratóriumi rágsáló modellen specifikusan célozható és koordinálható a sejtabláció. Ezekben a transzgenikus egerekben 40 ng/testsúly g DT szubkután történő beadása elpusztítja az ARC magban található

AgRP sejteket, ezáltal lehetővé válik az összehasonlítás a vad típusú állatok működő AgRP sejtjeivel.



2.ábra *Arcuatus mag immunhisztokémiai festése a diftéria toxinnal kezelt vad típusú (fent) és AgRP DTR heterozigóta (lent) egér agyban; DAPI (sejtmagfestés, kék), Alexa-488, (zöld, AgRP tartalmú idegrostok). 250x nagyítás, konfokális lézer-szkenning mikroszkópos felvétel, Rácz Bence által készített felvétel.*

Kimutatták, hogy DT receptort az AgRP sejteken tartalmazó újszülött egerekben jelentősen csökkenthető az AgRP közvetítette hatás DT beadást követően, azonban a felnőtt állatok elpusztulnak DT beadást követően, az AgRP sejtabláció következtében kialakuló táplálékfelvétel-csökkenés miatt [13]. Ez azzal magyarázható, hogy az ilyen, genetikailag módosított fiatal állatok, melyeknél 5-8 napos korukig megtörténik a toxin beadása, még

feltehetően képesek alkalmazkodni a normális mennyiségnél kevesebb vagy teljes AgRP neuron-hiányhoz, jelentősen nem befolyásolva a testtömeget és a táplálékfogyasztást. Ezzel szemben a felnőtt állatok táplálékfelvétele leáll az AgRP sejtek kiirtásával, így a tápanyag-felvétel hiánya miatt elpusztul, annak ellenére, hogy rendelkezésre áll a táplálék [14].

Célkitűzés

A táplálékfelvételt egyéb ingerek is befolyásolhatják, különböző fiziológiai és pszichológiai tényezők, mint például érzelem, érzékszervi észlelés és tanulási tapasztalatokon alapuló megismerés. Számos tanulmány kimutatta, hogy egy étel kellemes illata segíti az étvágy kialakulását, beindítja a nyáleválasztást, ezzel a táplálékfelvételt is. Az étvágy, illetve a jóllakottságérzet kialakítását pedig a hypothalamusban található AgRP és POMC neuronok mediálják. Ma már jól ismert, hogy az éhségérzet kialakításán túl, számos, kognitív képességet is jelentősen befolyásolni tudnak ezek a sejtek, de ezen kognitív folyamatok pontos háttere és a közvetett szabályozás mechanizmusa kevésbé ismert.

Célom ezért annak felderítése, hogy vajon befolyásolja-e a csökkent AgRP aktivitás az állat kognitív képességeit, vagyis van-e különbség az újszülöttkorban DT-vel kezelt WT illetve az AgRP-ablált heterozigóta AgRP^{DTR+/-} egerek tanulási ill. memória képességeiben.

Korábbi tanulmányokat alapul véve az a hipotézisünk, hogy az AgRP-hiányos egerek tanulási képességei romlanak vad típusú társaikhoz képest, alátámasztva az AgRP sejtek jelentőségét a kognitív folyamatokban.

Anyag és módszer

A felhasznált kísérleti állatok és tartási körülményük

A kísérletben C57BL/6 vad típusú (WT), illetve heterozigóta $AgRP^{DTR+/-}$ 12 hónapos, nőtény egereket használtunk, amelyek az Állatorvostudományi Egyetem Kísérleti Állatházának tenyészetéből származtak. Születésüket követő 5. napon az állatok genotípustól függetlenül szubkután diftéria toxin injekciót kaptak (Sigma-Aldrich) 50 $\mu\text{g/kg}$ fiziológiás sóoldatban (13,3 $\mu\text{l/g}$) oldva. A kísérletben *ad libitum* (AL) táplált egerek vettek részt. Az állatok genetikai státusát PCR vizsgálattal ellenőrizték a leválasztásukkor (2 hetes korban) vett ~1 mm-es farokmintából. Az állatokat két csoportba osztottuk, a vad típusúakban jelen voltak és normálisan működtek az AgRP sejtek ($n=12$ állat), míg a heterozigóta (HTR - $AgRP^{DTR+/-}$) csoportba ($n=7$ állat, **1. táblázat**) azok az egerek kerültek, amelyeknek újszülött korban az AgRP neuronjaik nagy része elpusztult a diftéria toxin hatására. Az állatokat izoflurán altatásban RFID chippel (TSE System) láttuk el. Az összes állatkísérletet az egyetemi, nemzeti és európai szabályozásnak megfelelően végeztük (állatkísérleti projektengedély száma: PE/EA/216-2/2020).

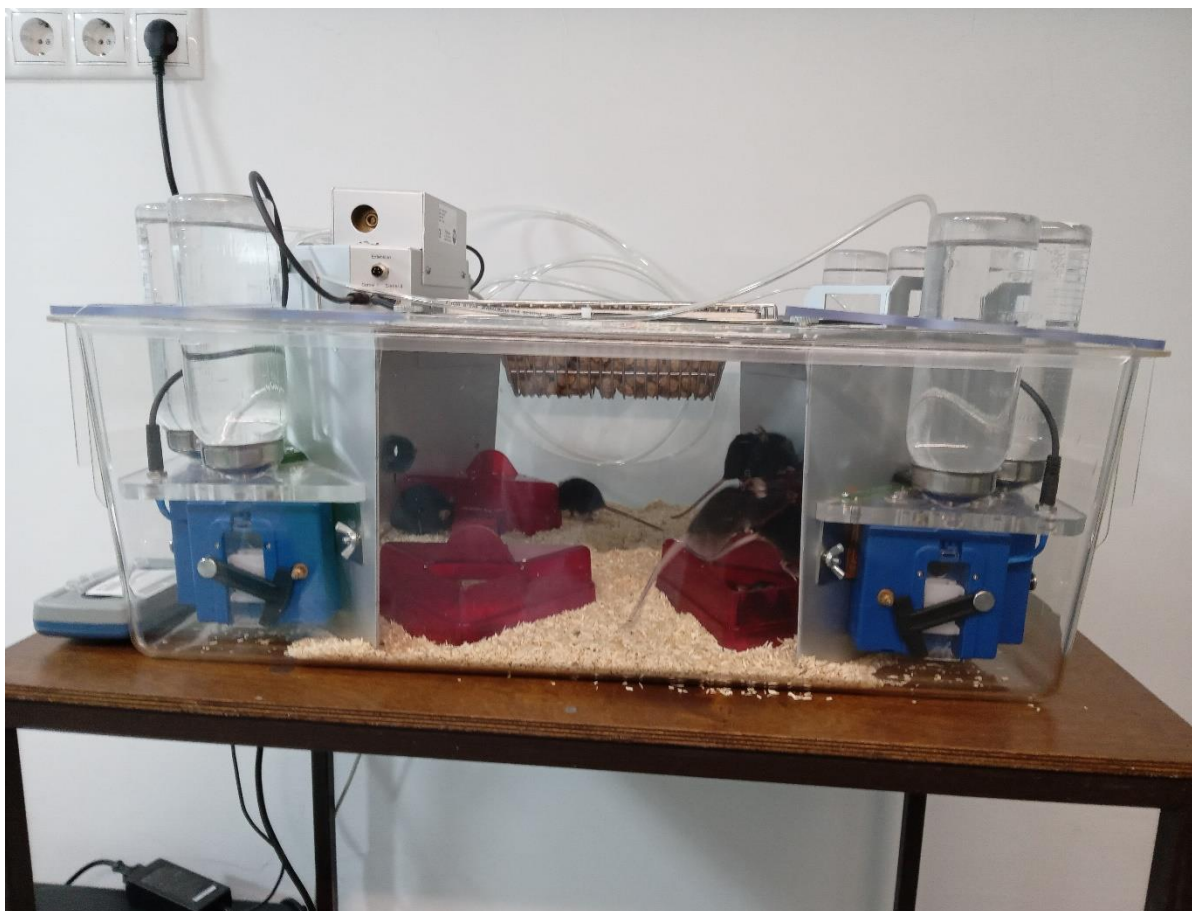
1.táblázat Az egyes állatok azonosítására szolgáló chipszámok és az állatok genetikai háttere

Chip szám	Genotípus (csoport)
900046000259270	HTR
900046000259267	HTR
900046000259202	HTR
900046000259203	HTR
900046000259201	HTR
900046000259209	HTR
900046000259226	HTR
900046000259262	WT
900046000259261	WT
900046000259265	WT
900046000259263	WT
900046000259268	WT
900046000259264	WT
900046000259228	WT
900046000259204	WT
900046000259210	WT
900046000259207	WT
900046000259208	WT
900046000259214	WT

Az Intellicage

Az állatok viselkedésének vizsgálata és az adatgyűjtés az Intellicage (TSE Systems) rendszer használatával történt. Ez egy nagy polikarbonátból készült (felül 58 cm x 40 cm; alul 55 cm x 37,5 cm; 20,5 cm magas) automatizált viselkedésvizsgáló ketrecrendszer, mely a kísérleti egerek eredeti élőhelyének nagy változata (**3. ábra**). Egyszerre akár 16 egér vizsgálatára alkalmas. Mi egyszerre maximum 7 egeret teszteltünk, a csoportok nem keveredtek, tehát először 7 heterozigóta, majd 7 vad típusú, ezután ismét 5 vad típusú egér tartózkodott az IntelliCage-ben. A táplálékhoz a doboz tetején lévő, rácsos etetőn keresztül férhetnek hozzá az állatok. A padlón fészekanyag, illetve 4 egérház található. Minden rendelkezett a hát-nyaki területre injektált rádiófrekvenciás azonosító (RFID) chippel, amelyet egy héttel az IntelliCage ketrecbe kerülés előtt kaptak.

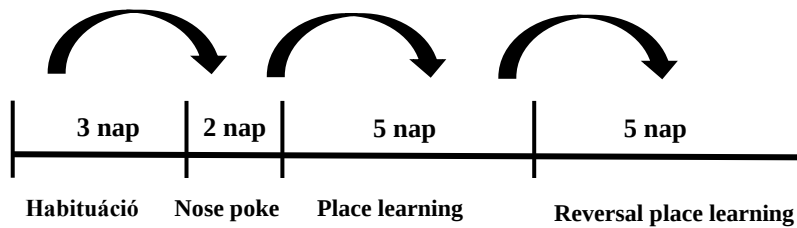
A téglatest formájú „láda” négy sarkában található az RFID antennák, amelyek érzékelik a chippek jelenlétét és az ajtóval zárható itatópalackok csőrei, sarkonként kettő. Ha az egér elhalad a cső alakú antennában, az beolvassa a RFID chip kódját. Minden érzékelő sarok kétfelé van osztva, mindegyikben 1-1 vizespalackkal, tehát összesen a ketrecrendszerben nyolc itató közül választhat az állat, melyeket a csövek falán lévő kerek nyílásokon keresztül tud elérni. Az infravörös szenzorok érzékeli a látogatások (vizitek) számát és időtartamát, az orrbökések (nose poke) számát, valamint a palackok ún. nyalásérzékelőkkel is rendelkezik, így az ivások pontos számát is képesek regisztrálni. Ez a teljesen automatizált rendszer segít kiküszöbölni a zavaró hatásokat és a környezeti, kísérleti változókából származó jelentős stresszt, amelyek befolyásolhatják a különböző viselkedési folyamatokat. Számos kísérleti paradigma, protokoll programozható be, illetve hajtható végre ezzel a rendszerrel. Az adatok folyamatosan rögzítésre kerülnek, amíg az állatok az IntelliCage rendszerben tartózkodnak [15], [16], [17].



3. ábra A működésbe helyezett IntelliCage. A ketrec aljzatán ~1cm vastag nyárfa alom található, négy darab piros házikóval. Jól láthatóak az érzékelőkkel és antennákkal ellátott sarkok (kék objektumok), amelyeket egy-egy, a sarokfal közepén kialakított kerek nyíláson érnek el az állatok (ld. bal felső sarok). A sarkokban található itatópalackokhoz tartozik egy-egy szabályozható ajtó (fehér színű), amelyek nyitását és zárását a programbeállításoknak megfelelően végzi a zár-rendszer (fekete zárószervezet). A bemutatott ábrán a habituációs fázis látható, az ajtók nyitott állapotban vannak és a ketrec minden állat vizitálását, ivását rögzíti valós időben.

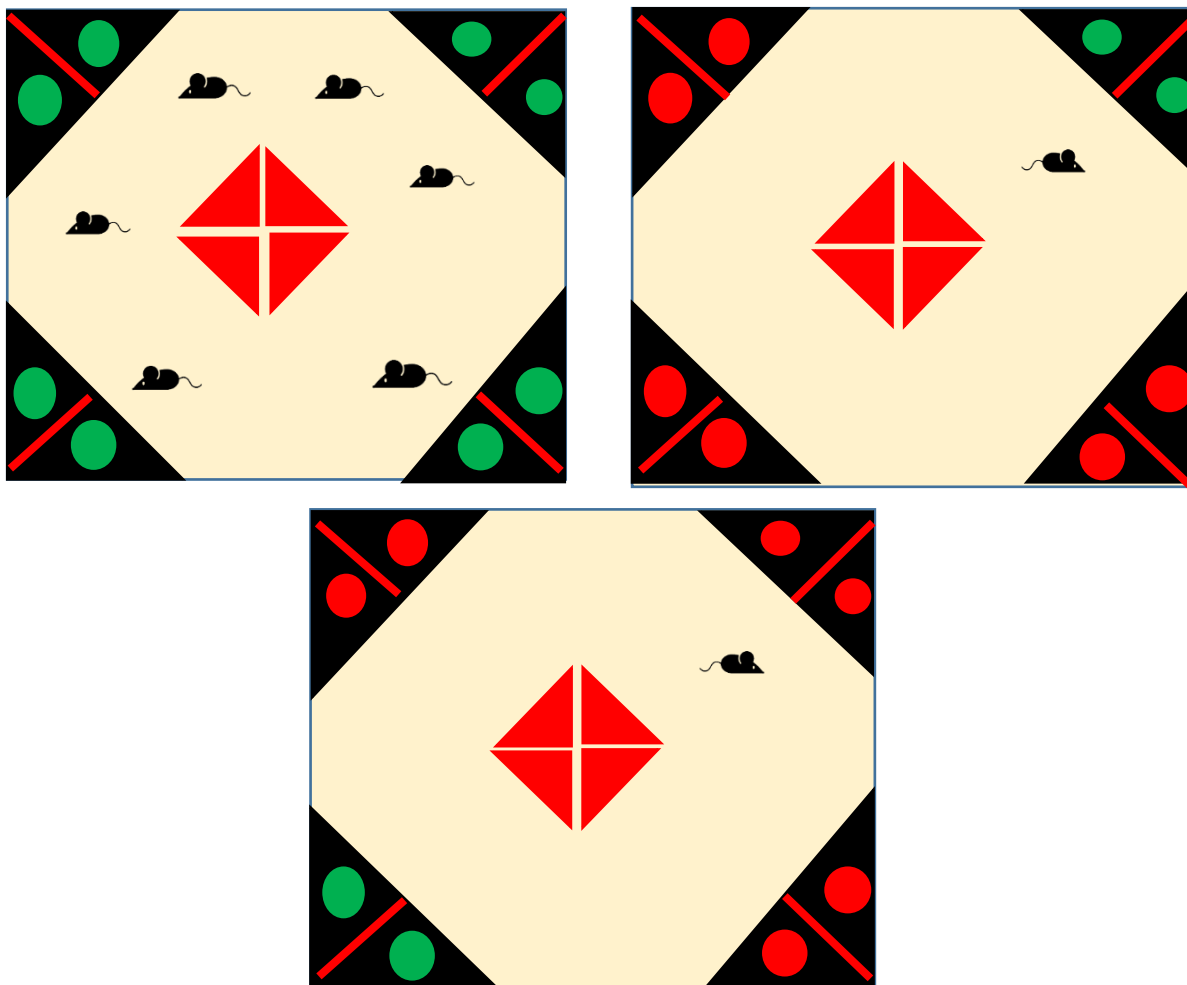
Kísérleti elrendezés

A kísérlet 3 fázisban zajlott. A protokoll első fázisa a megszokási fázis, ún. **habituáció** volt, vagyis amikor az állatok hozzászoknak az új környezetükhöz. Ez három napig tartott, ezt követte az ún. orrbökési tanulás (**nose poke learning**), amikor elsajátították az egerek, hogy az itatókhoz csak akkor férnek hozzá, ha az ajtót megböki az orrukkal. Ezt követte két tanulási fázis, az ún. **place learning** (PL), majd a **reversal place learning** (RPL) 5-5 napig (**4. ábra**).



4.ábra Tanulási képesség vizsgálatának folyamatábrája

A habituációs fázisban minden ajtó nyitva van, így biztosított a szabad hozzáférés a vízhez. Ebben a szakaszban alakul ki a preferencia, hogy az adott egér melyik sarkot választja legszívesebben. Majd az egerek megtaníthatók arra, hogy egy orrbökést (nose poke) hajtsanak végre az ajtóknál, így lehetővé téve a hozzáférést a vízhez. Az ún. nyalómérő pontosan méri az elfogyasztott víz mennyiségét, az időt amíg az állat ott tartózkodik, illetve az orrbökések számát. Az ezután következő place learning fázis kezdetén beprogramozzuk a rendszerbe, hogy a 4 sarok közül csak egyben (lehetőleg a korábbi preferenciájától legtávolabbi sarokban) férjen vízhez az állat. Itt az ún. *Default* mód során nem nyílik ki az itató, míg a *PL* mód esetén az orrbökés végrehajtását követően felnyílik az ajtó és tudnak inni az állatok. A PL fázissorán naponta 2x2 órában nyíltak az ajtók és tudtak a megfelelő itatóhoz férni az állatok. A place learning fázis 5 napja után következett a reversal place learning (RPL), ahol a sarokiosztást átlósan ismét megváltoztattuk, és ismét az eredeti preferenciának megfelelő sarokban fért az állat az itatópalackokhoz.



5.ábra Kísérlet fázisainak sematikus ábrázolása: habituáció (bal fent), place learning (jobb fent), reversal place learning(alsó); zöld= engedélyezett ivás, piros= nem engedélyezett ivás

Adatelemzés

Az adatsorok elemzését, leíró statisztikákat az Excel program segítségével végeztem. Az eredmények szemléltetésére vonaldiagrammokat készítettem Excelben. A szignifikanciavizsgálathoz az R programnyelvet használtam RStudio környezetben [18]. A csoportok összehasonlítására varianciaelemzést (ANOVA) alkalmaztam. A módszer alkalmazhatóságának feltételei minden esetben teljesültek. A csoportok páronkénti összehasonlítását pedig a Tukey-próbával végeztem. Továbbá korrelációs tesztet folytattam a változókra.

Eredmények

A hippocampusz-függő kognitív tanulás mérésére a korábban leírtak szerint adaptált tesztelési sémát végeztünk. A menetrend három fázisból áll: hozzászoktatás (habituáció), helytanulás (PL) és fordított PL (RPL). Összességében mindkét csoport gyorsan alkalmazkodott az új környezethez.

A felfedező viselkedés csökkent és a látogatások időtartama, valamint a látogatásonkénti nyalások száma idővel nőtt, majd kissé visszaesett, ami a ketrec elrendezésének megértését jelzi. Az általános viselkedés tekintetében **(6. ábra)** apró változásokat észleltünk, amelyek az AgRP^{DTR+/-} csoportban kezdetben rövidebb látogatási időt mutattak, majd a harmadik napra vizitek időtartama az AgRP^{DTR+/-} csoportban jelentősen megnőtt, meghaladva így a WT csoport átlagos látogatási idejét. **(6. C ábra)** Az ivási viselkedés már kezdetben is különbözött a két csoport között, ugyanis a WT egerek sokkal többet ittak, illetve azon vizitek száma, amikor ivás is történt szintén magasabb volt mint az AgRP^{DTR+/-} csoportban **(6. D ábra)**. Azonban a harmadik napra mindkét csoportban csökkent mind az ivások száma, mind az ivással töltött vizitek száma. Összességében ezek az eredmények azt jelzik, hogy az AgRP hiánya megváltoztatta a spontán viselkedést és/vagy a felfedezési mintákat az egerekben.

Ezután a térbeli tanulási képességet vizsgáltuk. A PL és RPL fázisok során az állatoknak két kétórás időintervallumon belül a négy egyénileg kijelölt sarok közül az egyikhez kellett hozzáférniük ivás céljából. Alaphelyzetben a Default fázis során a WT csoport magasabb számú helyes látogatást mutatott, mely fennmaradt mind az 5 nap alatt. A PL fázissorán pedig míg alaphelyzetben a WT magasabb helyes látogatási számot mutatott, a második naptól kezdve az AgRP^{DTR+/-} egerek többször vizitelték helyesen mint a WT csoport. Az adatok összehasonlítása azt mutatta, hogy mind az AgRP^{DTR+/-}, mind a WT állatok képesek voltak megtanulni a feladatot az adott időkereten belül **(7. ábra)**. Egy nap elteltével a PL fázissorán a AgRP^{DTR+/-} állatok 51,17% (95%-os konfidenciaintervallum [CI: 40,58-68,68]) helyes látogatást mutattak, szemben a WT egerek 42,77% (95%-os konfidenciaintervallum [CI: 39,95-59,41]) helyes látogatásával; ez a hatás azonban nem maradt fenn a későbbi napokon, ami összességében nem szignifikáns csoport főhatást ($p = 0,703$) és nem szignifikáns csoport $\times$ idő kölcsönhatást ($p = 0,674$) eredményezett. A RPL fázisban, ahol a sarkokat átlósan osztottuk újra, az AgRP^{DTR+/-} és a kontroll egerek ismét összehasonlíthatóan teljesítettek (csoport fő hatás: $p = 0,813$) **(7. ábra)**.

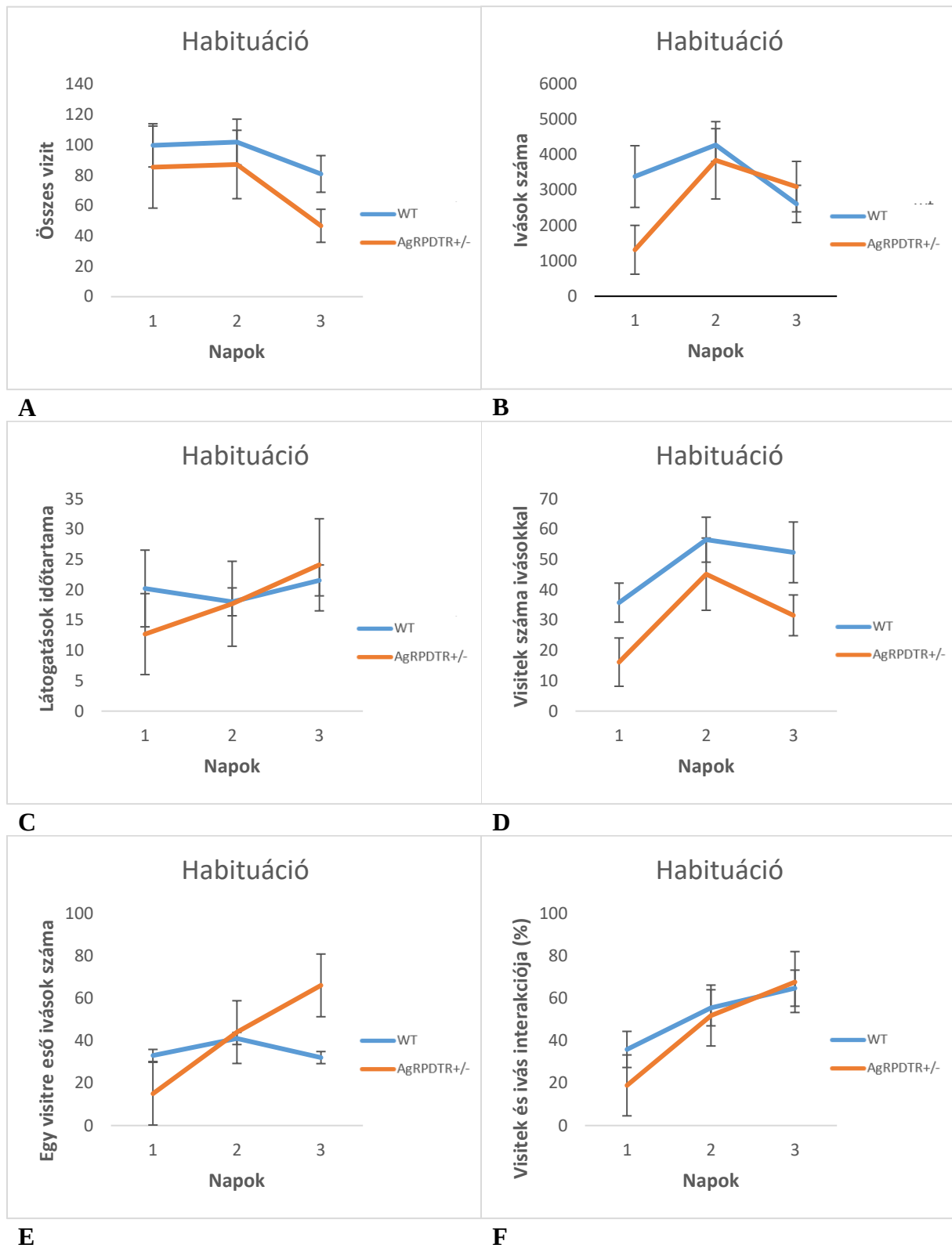
Az alábbiakban az egyes tanulási fázisokban történt összehasonlító vizsgálatok részletes elemzését mutatom be.

Habituáció

A habituáció során a vizitek átlagos száma a három nap alatt végig alacsonyabb volt az AgRP^{DTR+/-} egereknél, mint a WT-nál. Mindkét csoport esetében az második napon a vizitek száma nem változott jelentősen az előző naphoz képest, míg a harmadik napra mindkét csoport jóval kevesebbet tartózkodott az érzékelősarkokban (**6. A ábra**). A vizitekben a csoportok között az első és a második napon nem volt szignifikáns különbség ($p = 0,6113$, $p = 0,5795$), azonban a harmadik napon a vizitek számában nagyobb különbség volt detektálható a csoportok között ($p = 0,0742$).

Kezdetben AgRP^{DTR+/-} egerek jóval kevesebbet ittak, ivások átlagos száma 1312 volt, ezzel szemben a WT-nál 3381 ivást érzékelt a nyalómérő, majd második napra mindkét csoportban több vizet fogyasztottak az állatok, a harmadik napra pedig mindkét csoportban csökkent az ivások átlagos száma az AgRP^{DTR+/-} egerek 3097-szer, a WT-k pedig 2608-szor ittak. A Tukey teszt eredményei alapján a csoportok között nem volt különbség az első, a második, illetve a harmadik napon sem. A vizitek átlagos időtartamában különbség figyelhető meg. Amíg az AgRP^{DTR+/-} csoport állatai egyre több időt töltöttek az érzékelősarkokban, addig a WT-aknál az egy vizitre eső időtartam csökkent (**6. C ábra**). Viszont a vizitek időtartama nem függött szignifikánsan a csoporttól ($p = 0,798$), és az egyes napok között sem figyelhető meg szignifikáns különbség.

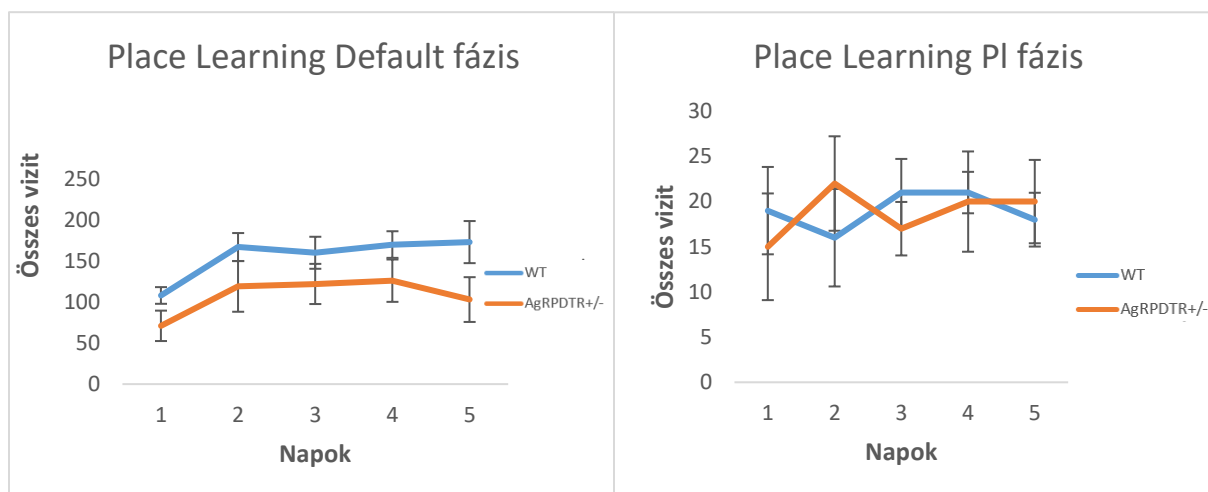
A habituáció első napján az AgRP^{DTR+/-} csoportban 18%-ban fordult elő ivás a vizitek során, ez a harmadik napra 67%-ra nőtt. Míg a WT csoportban kezdetben 35% volt az interakció a vizitek és az ivás között, a második napon 55%-ban fordult elő ivás a vizitek során, és ez a harmadik napra pedig a WT csoport kisebb arányban ivott a látogatások során az AgRP^{DTR+/-} csoporthoz képest, ekkor az a vizitek és az ivás interakciója 64% volt (**6. F ábra**).



6. ábra *AgRP^{DTR+/-}* és *WT* csoport összehasonlítása a habituáció során: vizitek száma (A), ivások száma (B), látogatások időtartama (C), ivást is tartalmazó vizitek száma (D), egy vizitre eső ivások száma (E), vizitek és ivás interakciója (F)

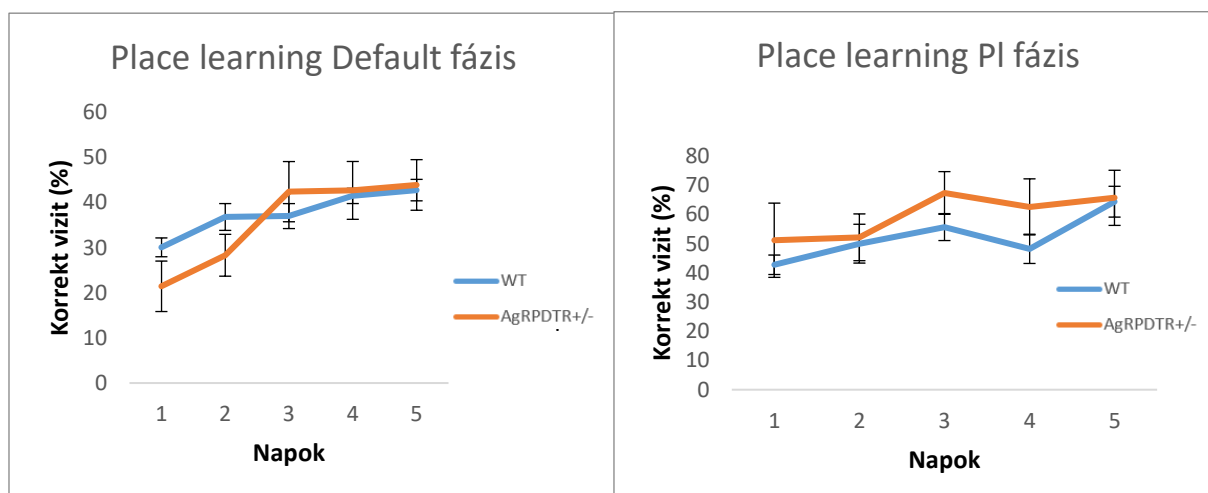
Place Learning

A korrelációs teszt alapján kapcsolat figyelhető meg az ivások száma és a vizitek száma között, az ivások száma és a napok száma között, az ivások száma és a csoport változó között, illetve korreláció van az ivások száma és a modul változó között, mely a PL és a Default fázisokat írja le. A térbeli tanulási fázis, vagyis a Place Learning két fázisban zajlott, a Default fázisban az egerek nem ihattak, míg a PL fázis két kétórás időtartam volt, mikor engedélyeztük az állatoknak a folyadékfogyasztást. Mindkét esetben feljegyeztük a helyes látogatások arányát. A Default fázis során az AgRP^{DTR+/-} egerek jóval kevesebbet vizitáltak mint a WT csoport. A második napon mindkét csoportban emelkedett a vizitek száma, mely a harmadik és a negyedik napon körülbelül konstans értéken volt, az AgRP^{DTR+/-} csoportban a ötödik napon az állatok kevesebbszer látogattak az érzékelősarkokba (7. A ábra). Az első nap a helyes látogatásokban szignifikáns különbség ($p = 0.0494$) volt detektálható a két csoport között, azonban ez a későbbi napokra már nem mondható el. A korrekt vizitek százalékos aránya kezdetben nagyban különbözött a két csoport között, majd a napok során a WT és az AgRP^{DTR+/-} csoportban is emelkedett, végül az ötödik napon a két csoport görbéje összeért (7. C ábra). A PL fázis során az összes vizit száma ingadozó volt, egyszer az egyik, másszor a másik csoport tartózkodott többet az érzékelő sarkokban (7. B ábra). Azonban a helyes látogatásokban már megfigyelhető, hogy kezdetben a WT csoport tagjai találták meg átlagosan magasabb számban a helyes sarkokat, míg a második naptól kezdve az AgRP^{DTR+/-} egerek látogatták meg többször a helyes érzékelősarkokat. Illetve a helyes látogatások aránya a AgRP^{DTR+/-} csoportban végig magasabb volt, mint a WT csoportban (7. D ábra). Azonban egyik napon sem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között (p -értékek: 0,5164 (1.nap) ; 0,7493 (2.nap); 0,6283 (3.nap); 0,5501 (4.nap); 0,5445 (5.nap)). Mindkét csoport esetén a korrekt vizitek aránya 40% és 70% között ingadozott, az ötödik napon mindkét csoportban 65% eséllyel találták meg az állatok a számukra kiosztott helyes sarkot. Továbbá a PL fázis során, helyes érzékelősarokba látogatások esetén detektáltuk az ivások számát. Ebben az esetben azt figyeltük meg, hogy az AgRP^{DTR+/-} csoport többször ivott, mint a WT-ú állatok, amikor a korrekt vizit történt a PL fázis során (7. G ábra).



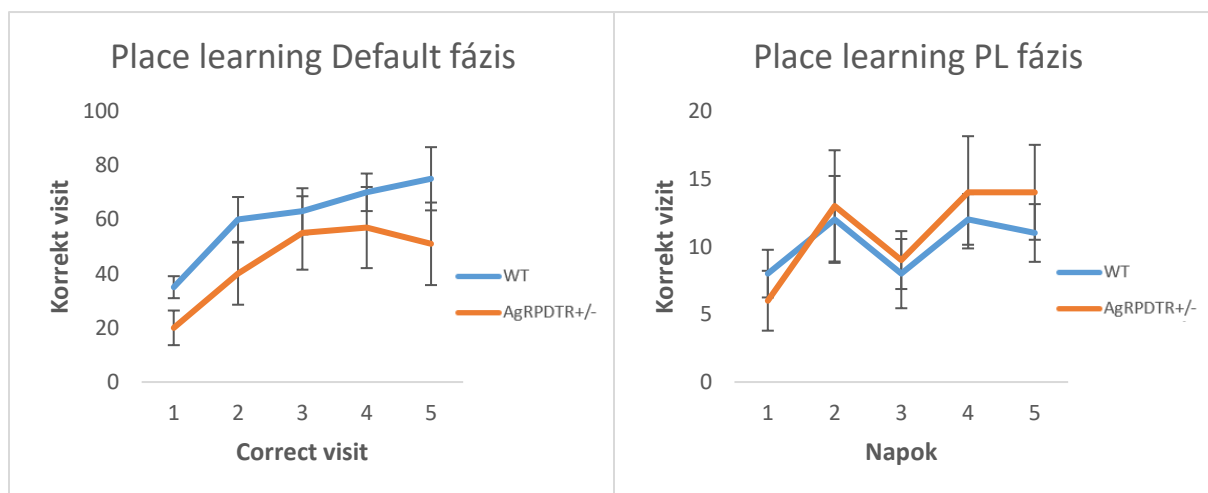
A

B



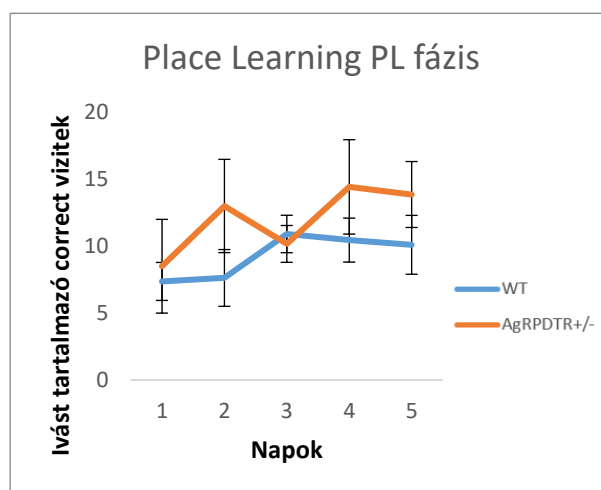
C

D



E

F



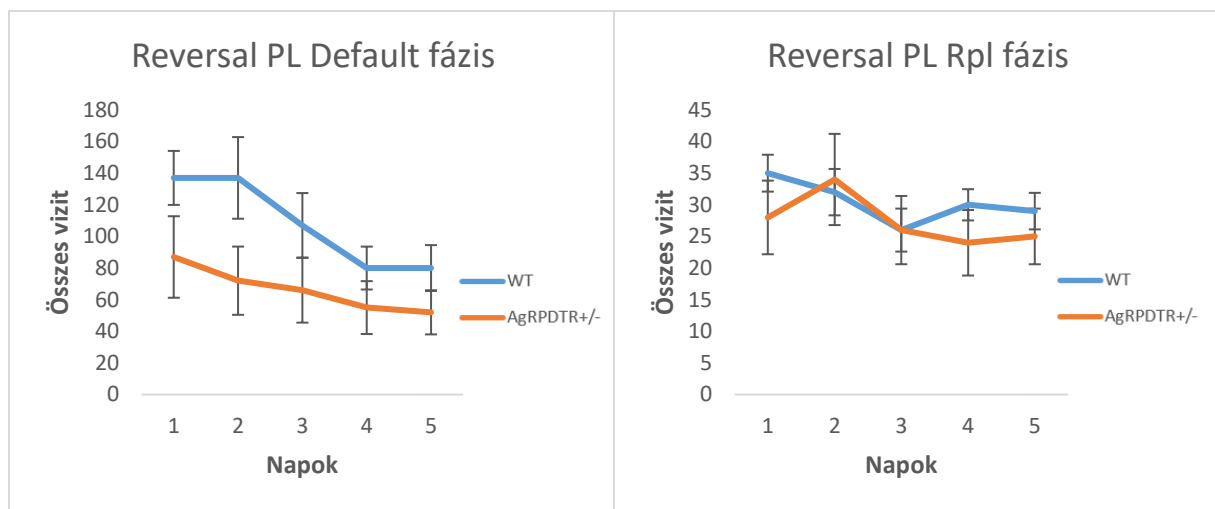
G

7.ábra A két csoport összehasonlítása a Place Learning során(balra Default, jobbra PL fázis): vizitek száma (A, B), helyes látogatások százalékos aránya (C, D), helyes látogatások száma (E, F), ivást tartalmazó vizitek száma PL fázissorán (G)

Reversal Place Learning

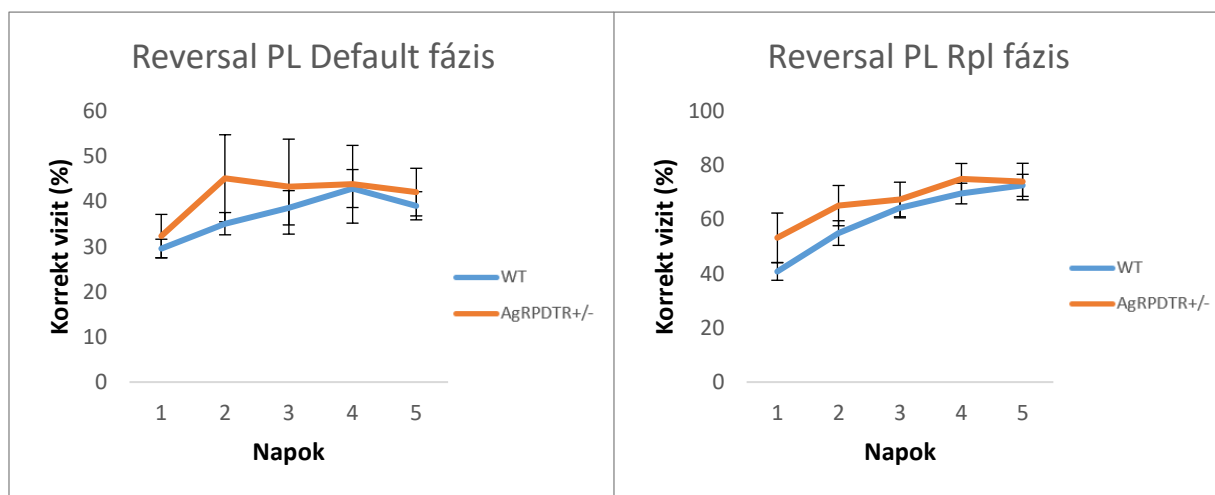
A Place Learning-et követte a Reversal Place Learning, ahol a sarkokat átlósan újraosztottuk, így az eredeti preferenciának megfelelően fértek az állatok az itatópalackokhoz. Ez a tanulási szakasz is két fázisban zajlott, a Default fázisban az egerek nem ihattak, míg a RPL fázis kétszer kétórás időtartam volt, mikor engedélyeztük az állatoknak a folyadékfogyasztást. Mindkét esetben feljegyeztük a helyes látogatások arányát. A Default fázis során az AgRP^{DTR+/-} csoport összes vizitjeinek száma jóval a WT csoport görbéje alatt haladt. A második napon a WT csoport azonos számban látogatott az érzékelősarkokba, mint az ezt megelőző napon, míg az AgRP^{DTR+/-} csoportban jelentősen csökkent a vizitek száma, mely a harmadik és a negyedik napon mindkét csoportban csökkent. Az ötödik napon ez az érték konstans maradt a WT csoportban, míg az AgRP^{DTR+/-} állatok esetén tovább csökkent. Vagyis az AgRP^{DTR+/-} egerek az idő előrehaladtával egyre kevesebbszer látogattak az érzékelősarkokba a Default fázis során, míg a WT csoport görbájén két plató is megfigyelhető (**8. A ábra**). Az első nap a helyes látogatásokban közel szignifikáns különbség ($p = 0.0818$) volt detektálható a két csoport között, azonban ez a későbbi napokra már nem mondható el. A korrekt vizitek százalékos aránya kezdetben elég hasonló volt a két csoport esetén, a WT egerek 29%-ban, az AgRP^{DTR+/-} csoport tagjai pedig 32%-ban látogattak a helyes érzékelősarkokba. A WT csoportban a negyedik napig folyamatosan emelkedett a korrekt vizitek aránya, míg az AgRP^{DTR+/-} csoportban a második és az ötödik nap között viszonylag konstans maradt a helyes

látogatások aránya(45-42% között mozgott). Végül az ötödik napra egy kis visszaesés volt megfigyelhető mindkét csoport esetén (**8. C ábra**). A RPL fázissorán a összes vizit száma rendkívül ingadozó volt, az AgRP^{DTR+/-} egerek a második napon többet vizitáltak, mint az ezt megelőző napon, azonban ezután jelentősen lecsökkent a látogatások száma. A WT csoportban pedig a harmadik napig folyamatosan csökkent a vizitek száma, majd a harmadik naptól kezdve egy kis emelkedés volt megfigyelhető (**8. B ábra**). Szignifikáns különbség egyik napon sem volt detektálható a két csoport között. Megfigyeltük a helyes látogatások arányát, a kísérlet ezen szakaszának 5 napja alatt végig az AgRP^{DTR+/-} csoport tagjai látogattak magasabb arányban a számukra kijelölt helyes sarokba, viszont az ötödik napon a két csoport görbéje szinte összeért. Azonban egyik napon sem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között (p-értékek: 0,8827 (1.nap); 0,5409 (2.nap); 0,9673 (3.nap); 0,3340 (4.nap); 0,4487 (5.nap)). Mindkét csoport esetén a korrekt vizitek aránya 40% és 75% között ingadozott, az ötödik napra mindkét csoportban ~73% eséllyel találták meg az állatok a számukra kiosztott helyes sarkot. Valamint megfigyeltük azt is, hogy az állatok milyen számban ittak, amikor a helyes érzékelősarkot látogatták meg. Ekkor azt figyeltük meg, hogy az AgRP^{DTR+/-} állatok többször ittak, amikor a korrekt vizit történt a RPL fázis során, mint a WT-ú állatok (**8. G ábra**).



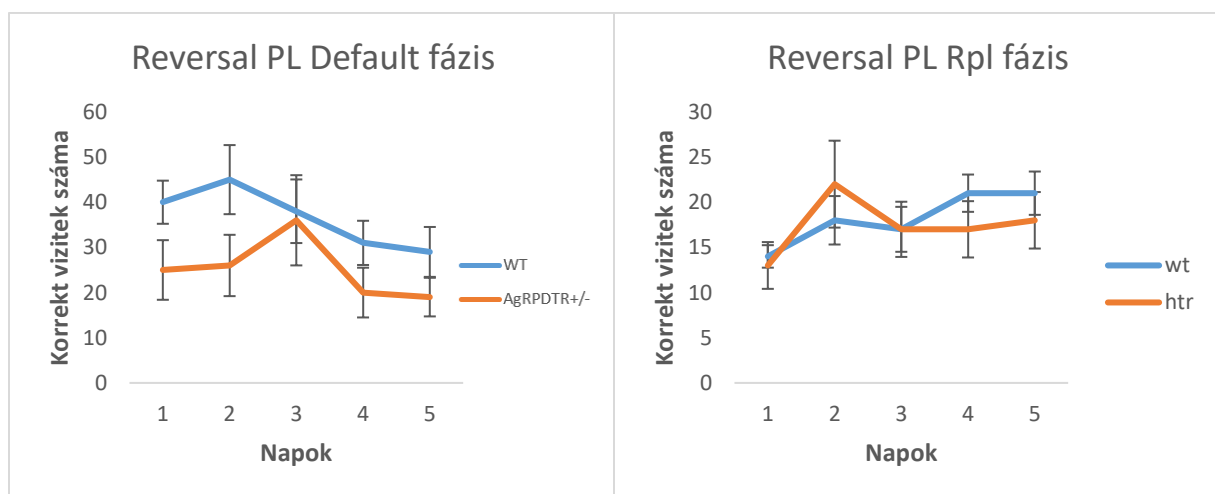
A

B



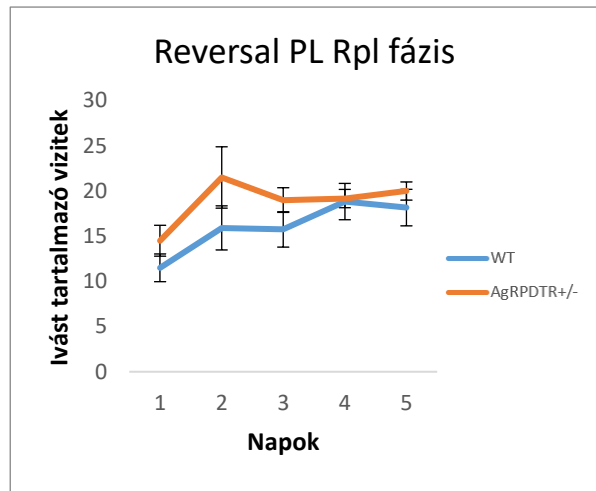
C

D



E

F



G

8.ábra $AgRP^{DTR+/-}$ és WT összehasonlítása a *Reversal Place Learning* során (balra Default, jobbra RPL fázis): vizitek száma (A, B), helyes látogatások százalékos aránya (C, D), helyes látogatások száma (E, F), ivást tartalmazó vizitek száma RPL fázis során (G)

Következtetések

Az én munkám volt az első, amely az AgRP-hiányos egerek tanulási viselkedését vizsgálta. Azt már korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az AgRP neuronok nemcsak az éhségérzetet befolyásolják a táplálkozás során, hanem az állat egyéb viselkedési folyamatait is. Az azonban, hogy befolyásolják-e a térbeli tanulást, kevésbé ismert.

A hypothalamus AgRP neuronjairól ismert, hogy kulcsfontosságúak a táplálkozási viselkedésben, azonban több tanulmány is foglalkozik azzal, hogy ezek az idegsejtek más összetett viselkedéseket is irányítanak. Az AgRP neuronok által kiváltott sztereotip viselkedések csökkent szorongással párosulnak. Az AgRP idegsejtek a szubkortikális területek széles skálájára projektálnak, ez a komplex csatlakozás azt jelzi, hogy az AgRP sejtek képesek a viselkedést széles körben modulálni [19], [21], [22], [23].

Többek között a viselkedés változásainak vizsgálatára egy olyan kutatást folytattak olyan transzgenikus egerekkel, melyek kizárólag az AgRP sejtjeikben expresszálnak a Trpv1 kationcsatornát, amelyet az exogén agonista kapszaicin aktivál [20]. A kapszaicin pedig növeli az AgRP neuronok tüzelési sebességét. A kísérlet során az állatok aktivitását figyelték meg táplálék jelenlétében, illetve hiányában. Megállapították, hogy táplálék jelenlétében az AgRP neuronok szelektív aktivációja statisztikailag nem változtatta meg az állatok általános aktivitását, azonban az AgRP-Trpv1 egerekben táplálkozást váltott ki. Hipotézisük az volt, hogy az AgRP neuronok aktiválása pozitív hatással van a táplálkozással kapcsolatos kognitív képességekre. Eszerint, az éhség táplálkozást beindító, illetve azt leállító aspektusai mellett az AgRP sejtek szelektív aktiválása specifikus és jellemző, ismétlődő sztereotip viselkedést eredményezett [21]. A cikk szerzői azt feltételezték, hogy az AgRP neuronok aktiválásával kialakult éhségérzet szorongásos állapotot generál az egerekben, melyre teszt sorozatot is végeztek. Azonban hipotézisükkel ellentétben azt tapasztalták, hogy az AgRP sejtek aktiválása a legtöbb viselkedési tesztben szorongásoldó hatású volt. Megfigyeléseik arra utalnak, hogy az AgRP neuronok különböző alpopuláció különböző funkciókat látnak el, azonban ennek vizsgálatára további vizsgálatok szükségesek. Az adatok arra is engednek következtetni, hogy ezek az ősi agyi régiókban található neuroncsoportok szerepet játszanak bizonyos pszichiátriai kórképekben, így az AgRP neuronok szerepe megkerülhetetlen pl. az anorexia nervosa etiológiájára [21].

Egy korábbi tanulmányban azt is kimutatták, hogy az AgRP idegsejtek befolyásolhatják a motivációs állapotokat. Felfedezték, hogy az AgRP neuronokban a DNS-metiláció szabályozza a fizikai aktivitást. Ez a jelenség valószínűleg egy sor *downstream* változástól függ, amelyeknek háttere még ismeretlen. A fizikai aktivitás bonyolult kapcsolatban áll az energiafelhasználással, a kísérlet során vizsgált egerek aktivitása csökkent, ennek alapvető okára nem derült fény [22].

Egy másik vizsgálat során annak érdekében, hogy megállapíthassák a neuronális aktivitás változásai és a táplálékjelek észlelése közötti kapcsolatot, megtanították egereknek, hogy fényjelet társítsanak az táplálékhoz való hozzáféréshez. Az eredményeik arra utalnak, hogy létezik egy nagyon fontos neurobiológiai mechanizmus, melynek következtében a homeosztatikus hiányállapotok elősegíthetik a táplálékszerzési, illetve vízfelvételre irányuló feladatok tanulását [23]. Azonban ennek a folyamatnak a szabályozása és háttere még nem pontosan tisztázott.

Az én vizsgálataim során során AgRP-hiányos ($\text{AgRP}^{\text{DTR+/-}}$) egerek térbeli tanulási képességét vizsgáltam, amelynek során a tanulás alapjául szolgáló motivációt vízfelvétel korlátozásával értük el. Eddigi eredményeim szerint marginális a különbség a WT és az $\text{AgRP}^{\text{DTR+/-}}$ egerek tanulási képességei között *ad libitum* etetés során. A habituáció során az $\text{AgRP}^{\text{DTR+/-}}$ egerek aktivitása azonban jelentősen és szignifikánsan alacsonyabb volt, lassabban szoktak hozzá új környezetükhöz. A látogatások időtartama az $\text{AgRP}^{\text{DTR+/-}}$ csoportban a napok előrehaladtával folyamatosan emelkedett, míg a WT csoportban szinte konstans maradt, vagy kis mértékben nőtt a habituáció három napja alatt, ezzel szemben a felfedező viselkedés csökkent, mely a ketrec elrendezésének megértését jelzi. A place learning Default valamint reversal place learning Default fázisai alatt is végig alacsonyabb volt AgRP-hiányos egerek aktivitása. Míg a tényleges tanulási szakaszokban a két csoport aktivitása nem különült el ilyen élesen. A PL fázissorán mindkét csoport aktivitása ingadozó volt, azonban átlagosan itt is az $\text{AgRP}^{\text{DTR+/-}}$ egerek aktivitása volt alacsonyabb. Valamint az RPL fázissorán a második nap kivételével szintén az $\text{AgRP}^{\text{DTR+/-}}$ állatok voltak kevésbé aktívak. Ennek ellenére a place learning Default fázisának első, illetve második napjának kivételével a korrekt vizitek aránya az $\text{AgRP}^{\text{DTR+/-}}$ csoportban magasabb volt, mint a WT csoportban. Valamint az ivást is tartalmazó helyes látogatások száma is az $\text{AgRP}^{\text{DTR+/-}}$ csoportban volt magasabb mind a PL, mind a RPL fázisok alatt. Tehát az AgRP-hiányos egerek alacsonyabb aktivitással, vagyis kevesebb vizittel magasabb arányban látogattak a számukra kijelölt helyes érzékelősarokba, ami meglepő módon arra utal, hogy az $\text{AgRP}^{\text{DTR+/-}}$ egerek hatékonyabban tanulták meg melyik

sarokban tudnak inni. Fontos azonban ezeket az eredményeket óvatosan értelmezni, mivel az alacsony állatszám egyelőre csak az egyes csoportokra jellemző trendekre hívja fel a figyelmet, azonban számos esetben statisztikailag szignifikáns különbség hiányában további vizsgálatok szükségesek a két csoport közötti eltérés megállapítására. Az azonban kijelenthető, hogy az AgRP sejtek hiányában az egerek aktivitásában, felfedező ill. térbeli tanulási viselkedésében - még ha csak trendszerű – változások következnek be, amelyek további vizsgálatát tervezzük folytatni. Fontos végül azt is kiemelni, hogy az általam vizsgált állatok *ad libitum* etetés során kerültek vizsgálatra, amely diéta nem feltétlenül közvetíti hatékonyan az AgRP neuronok hiánya során esetlegesen bekövetkező kognitív változásokat. Ezért már elkezdtem a kalória-restríciós diéta mellett történő egércsoportok vizsgálatát is az Intellicage rendszerrel, amely reményeink szerint markánsabban és hatékonyabban tudja az AgRP sejtek kognitív folyamatokban játszott szerepét felfedni.

Összefoglaló

Egy szervezet működéséhez elengedhetetlen a tápanyagok pótlása és az energiaellátás, melyet a táplálkozás folyamata során tesz meg az élőlény. A táplálékfelvétel és az energiaanyagcsere szabályozás több agyterület által is befolyásolt, azonban a legfőbb mediátor a hypothalamus nucleus arcuatus régiója. Az itt található AgRP és POMC neuronok felelősek az éhségérzet kialakításáért, illetve gátlásáért. A táplálékfelvételt, illetve a táplálékkeresési folyamatot egy pszichobiológiai élmény az étvágy indítja be, és egy elégedettségi érzés zárja le, melyet jóllakottségnek nevezünk. A gyomorban termelődő ghrelin receptorspecifikusan kötődik az AgRP sejtekhez, melyek gátolják a jóllakottségért felelős melanocortin idegsejtek működését, így indukálva az éhség érzetet. Ismert, hogy az éhség érzet kialakításán túl ezen idegsejtek számos kognitív képességet is tudnak befolyásolni, azonban ennek szabályozása és háttere még nem ismert. Kutatásomat egereken végzem, munkám célja annak megállapítása, hogy az AgRP sejtek valóban hatással vannak-e az állatok tanulási képességére, memóriájára. A vizsgálat elvégzéséhez az egereket két csoportba soroltuk. Az egyik csoportba olyan állatok kerültek, melyekben normálisan működtek az AgRP sejtek, a másikkban pedig azon egerek kerültek besorolásra, melyekben újszülött korban az AgRP sejtek nagy részét kiirtottuk, így vizsgálhatóvá vált a tanulási különbség a két csoport között. A kutatás alapjául szolgált az ún. IntelliCage, mely rádiófrekvenciás azonosító chip alapján képes volt adatokat gyűjteni az állatok ketrecben folytatott tevékenységéről. A két csoport közötti különbség detektálására varianciaelemzést (ANOVA) folytattam. Az én kutatásom az első, mely AgRP-hiányos egerek térbeli tanulási képességeit vizsgálja. Eredményeink szerint *ad libitum* diéta esetében jól detektálható, trendszerű változások figyelhetők meg az AgRP-hiányos egerek felfedező és tanulási viselkedésében, amelyek pontos természetét és mibenlétét további vizsgálatokkal szükséges a jövőben kutatni.

Summary

Replenishment of nutrients and supply of energy is essential for the functioning of an organism, which is done through the process of feeding. The regulation of food intake and energy metabolism is influenced by several brain areas, but the main mediator is the nucleus arcuatus region of the hypothalamus. The AgRP and POMC neurons located here are responsible for the sensation of hunger and satiety. The food intake and food-seeking process is triggered by a psychobiological experience of appetite and terminated by a feeling of satisfaction, called satiety. Ghrelin, produced in the stomach, binds receptor-specifically on AgRP cells, which inhibit the melanocortin neurons responsible for satiety, thus inducing the sensation of hunger. It is known that in addition to inducing hunger, these neurons can also affect a number of cognitive abilities, but the regulation and background of this is not yet known. My experiments were carried out in mice, and the aim of my work is to determine whether AgRP cells do indeed affect the learning and memory abilities of these animals. To carry out the study, mice were divided into two groups. One group consisted of animals with normal AgRP cell function, and the other group consisted of mice in which most of the AgRP cells were eliminated in neonatal age so that the learning difference between the two groups could be investigated. The studies were carried out using a so-called IntelliCage system, which was able to collect data on the animals' activities in the cage using a radio frequency identification chip. An analysis of variance (ANOVA) was performed to detect any learning differences between the two groups. Our results show that there are well-detectable, trend-like changes in the exploratory and learning behavior of AgRP-deficient mice on an *ad libitum* diet, however the exact nature and characteristics of these subtle changes require further investigation in the future.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Rác Bencének a kutatásban nyújtott mindenre kiterjedő segítségének a kutatás tervezésében és szakmai irányításában, illetve köszönöm Prof. Sótonyi Péternek, hogy munkámat az Anatómiai és Szövettani Tanszéken végezhettem. Nagyon hálás vagyok Prof. Horváth Tamás kutatóprofesszornak, hogy vizsgálataimat az általa vezetett kutatócsoport által létrehozott kísérleti állatok felhasználásával és szakmai iránymutatásával végezhettem. Valamint köszönet illeti az Állatorvostudományi Egyetem Állatházának dolgozóit, a kísérletben részt vett állatok gondozásában való közreműködésért. Illetve köszönöm Balkó Eszter tanácsait és lelki támogatását. Továbbá köszönettel tartozom Berekméri Eszternek az adatok statisztikai elemzése során nyújtott technikai segítségért.

Irodalomjegyzék

1. Waterson MJ, Horvath TL (2015) Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metabolism* 22:962–970. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.026>
2. Thomas MA, Xue B (2018) Mechanisms for AgRP neuron-mediated regulation of appetitive behaviors in rodents. *Physiol Behav* 190:34–42. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.10.006>
3. Puelles L, Martinez-de-la-Torre M, Bardet S, Rubenstein JLR (2012) Chapter 8 - Hypothalamus. In: Watson C, Paxinos G, Puelles L (eds) *The Mouse Nervous System*. Academic Press, San Diego, pp 221–312
4. Costa DG, Almeida C, Cavadas C, Carmo-Silva S (2022) A look on food intake and satiety: from humans to rodent models. *Nutrition Reviews* 80:1942–1957. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuac010>
5. Iovino M, Messana T, Lisco G, Mariano F, Giagulli VA, Guastamacchia E, Pergola GD, Triggiani V Neuroendocrine Modulation of Food Intake and Eating Behavior. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 22:1252–1262
6. Onaka T, Takayanagi Y (2019) Role of oxytocin in the control of stress and food intake. *J Neuroendocrinol* 31:e12700. <https://doi.org/10.1111/jne.12700>
7. Volkow ND, Wang G-J, Baler RD (2011) Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends in Cognitive Sciences* 15:37–46. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.11.001>
8. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci* 14:351–355. <https://doi.org/10.1038/nn.2739>
9. Dietrich MO, Horvath TL (2013) Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 36:65–73. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.12.005>
10. Koch M, Horvath TL (2014) Molecular and cellular regulation of hypothalamic melanocortin neurons controlling food intake and energy metabolism. *Mol Psychiatry* 19:752–761. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.30>
11. Activation of hypothalamic AgRP and POMC neurons evokes disparate sympathetic and cardiovascular responses | *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.00411.2020>. Accessed 1 Dec 2022
12. Saito M, Iwawaki T, Taya C, Yonekawa H, Noda M, Inui Y, Mekada E, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K (2001) Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nature Biotechnology* 19:746–750. <https://doi.org/10.1038/90795>
13. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD (2005) NPY/AgRP Neurons Are Essential for Feeding in Adult Mice but Can Be Ablated in Neonates. *Science* 310:683–685. <https://doi.org/10.1126/science.1115524>
14. Rother E, Shanabrough M, Borok E, Xu A, Janoschek R, Buch T, Plum-Mörschel L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh G, Horvath T, Brüning J (2005) Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nature neuroscience* 8:1289–91. <https://doi.org/10.1038/nn1548>
15. Iman IN, Yusof NAM, Talib UN, Ahmad NAZ, Norazit A, Kumar J, Mehat MZ, Jayabalan N, Muthuraju S, Stefaniuk M, Kaczmarek L, Muzaimi M (2021) The IntelliCage System: A Review of Its Utility as a Novel Behavioral Platform for a Rodent Model of Substance Use Disorder. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 15:

16. Kiryk A, Janusz A, Zglinicki B, Turkes E, Knapska E, Konopka W, Lipp H-P, Kaczmarek L (2020) IntelliCage as a tool for measuring mouse behavior – 20 years perspective. *Behavioural Brain Research* 388:112620. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112620>
17. Winslow W, McDonough I, Tallino S, Decker A, Vural AS, Velazquez R (2021) IntelliCage Automated Behavioral Phenotyping Reveals Behavior Deficits in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease Associated With Brain Weight. *Front Aging Neurosci* 13:720214. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.720214>
18. R: The R Project for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>. Accessed 13 Oct 2023
19. AgRP neuronal activity across feeding-related behaviours - Gouveia - 2021 - *European Journal of Neuroscience* - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ejn.15498>. Accessed 18 Oct 2023
20. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
21. Dietrich MO, Zimmer MR, Bober J, Horvath TL (2015) Hypothalamic Agrp Neurons Drive Stereotypic Behaviors beyond Feeding. *Cell* 160:1222–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.024>
22. MacKay H, Scott CA, Duryea JD, Baker MS, Laritsky E, Elson AE, Garland Jr. T, Fiorotto ML, Chen R, Li Y, Coarfa C, Simerly RB, Waterland RA (2019) DNA methylation in AgRP neurons regulates voluntary exercise behavior in mice. *Nat Commun* 10:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13339-3>
23. Berrios J, Li C, Madara JC, Garfield AS, Steger JS, Krashes MJ, Lowell BB (2021) Food cue regulation of AGRP hunger neurons guides learning. *Nature* 595:695–700. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03729-3>