

Állatorvostudományi Egyetem
Anatómiai és Szövettani Tanszék

37. OTDK Biológia Szekció

A csökkent AgRP neuron-funkció hatása a testsúlyra, élettartamra és
viselkedésre kalória restriktív egerekben

Készítette: Balkó Eszter Fruzsina
III. évfolyamos állatorvostan-hallgató
Állatorvostudományi Egyetem

Témavezető: Dr. Rác Bence

Budapest, 2023

1 Tartalomjegyzék

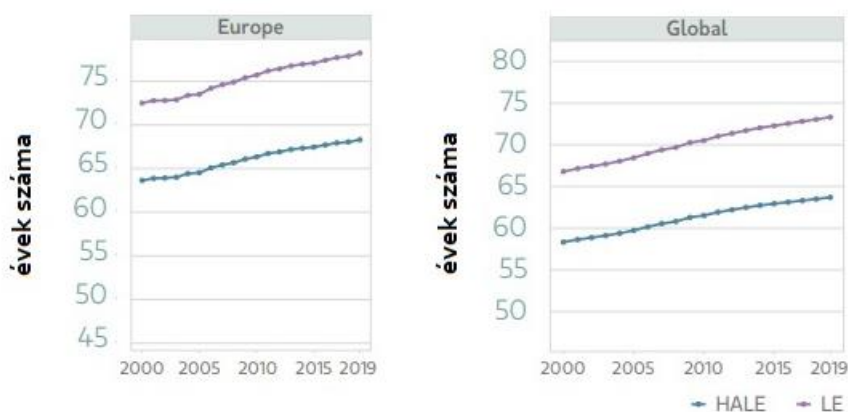
1	Tartalomjegyzék	1
2	Rövidítések jegyzéke	2
3	Bevezetés.....	3
3.1	Kalória-restrikció (CR).....	3
3.2	A táplálékfelvétel központi idegrendszeri szabályozása	4
3.2.1	<i>Az ARC és a melanokortin rendszer.....</i>	<i>5</i>
3.3	Az ArRP ^{DTR} egérmodell	8
3.4	AgRP neuronok viselkedésre gyakorolt hatása	10
3.4.1	<i>Táplálkozási zavarok – anorexia nervosa.....</i>	<i>13</i>
4	Célkitűzések	15
5	Anyag és Módszer	16
5.1	Állatok és kalória restrikció.....	16
5.2	Immunhisztokémia	16
5.3	Viselkedéstesztetek.....	17
5.4	Statisztikai analízis	18
6	Eredmények	19
7	Következtetések	26
8	Összefoglaló.....	30
9	Abstract	31
10	Irodalomjegyzék	32
11	Köszönetnyilvánítás.....	38

2 Rövidítések jegyzéke

ABA – aktivitás alapú anorexia modell (activity based anorexia model)
ADF – váltott napi koplalás (alternate day fasting)
AgRP – agouti related protein
AL – ad libitum
AN – anorexia nervosa
ARC – nucleus arcuatus hypothalami
CART – kokain-amfetamin regulált transzkript
CBR1 – kannabinoid receptor 1
CCK – cholecystokinin
CR – kalória restrikció
DMN – nucleus dorsomedialis hypothalami
DSM-5 – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DTR – diftéria toxin receptor
DTX – diftéria toxin
GABA – γ -amino-vajsav
GLP1 – glükagonszerű peptid 1
HALE – egészségben töltött várható élettartam (healthy life expectancy)
IF – időszakos koplalás (intermittent fasting)
LE –várható élettartam (life expectancy)
LH – lateralis hypothalamus
MeA – medialis amygdala
MSH – melanocyta stimuláló hormon
NPY – neuropeptid Y
POMC – proopiomelanokortin
PVN – nucleus paraventricularis hypothalami
PVT – nucleus paraventricularis thalami
SIRT1-KO – sirtuin-1 knock-out
VTA – ventralis tegmentalis area
WT – vad típus

3 Bevezetés

Az utóbbi néhány évtized során világszerte folyamatosan nőtt az emberek várható élettartama (*life expectancy*, LE). Míg 2000-ben a globális várható élettartam 66,8 év volt, a legfrissebb felmérés alapján 2019-re ez a szám már 73,3-ra emelkedett, ami nagyrészt az egészségügyi ellátás fejlődésének, és a fertőző betegségek sikeresebb kezelésének köszönhető. Ugyanakkor a várható élettartam növekedését csak lassabban követi az egészségben eltöltött idő növekedése („healthy life expectancy”, HALE) (1. ábra). Mindez pedig azt jelenti, hogy bár tovább élünk, ezt az időt mégis kénytelenek vagyunk valamilyen krónikus betegségtől terhelten eltölteni. A betegség-specifikus fókusz helyett ezért egyre nagyobb hangsúly kerül azok megelőzésére, az egészséges öregedésre valamint arra, hogy milyen szerepet tölt be ebben a táplálkozás (Kaeberlein és mtsai., 2015).



1. ábra Várható élettartam és egészségben eltöltött idő változása 2000-2019 között. A WHO mérései alapján Európában és globálisan is növekedett mind az emberek várható élettartama (LE, 60 éves korban), mind az egészségben töltött idő hossza (HALE, 60 éves korban) az elmúlt két évtized során. Ez a növekedés nagyrészt a fertőző betegségek kezelése terén elért fejlődésnek köszönhető. (WHO Global health estimates, 2019)

3.1 Kalória-restrikció (CR)

Míg a modern kalóriadús, ámde tápanyagszegény ételek fogyasztása növeli számos krónikus betegség kockázatát (2-es típusú cukorbetegség, szív- és érrendszeri megbetegedések, elhízás), addig a kalória-restrikcióról számos tanulmány írta le annak pozitív élettani hatásait (Fontana, 2009; Hofer és mtsai., 2022). Az egyik első megfigyelés 1935-ből patkányokból származik, az azóta eltelt évtizedek során azonban számos további állatfajnál mutatták ki a CR élethosszra és egészségre gyakorolt pozitív hatásait (élesztők, rovarok, halak, rágcsálók, főemlősök), és hipotézisek sora igyekezett magyarázatot szolgáltatni ezekre a megfigyelésekre (Fontana, 2009; Masoro, 2005; McDonald & Ramsey, 2010). A CR hatásmechanizmusában szerepet tulajdonítanak többek között a neuroendokrin

rendszer adaptációjának, a gyulladásos folyamatok megelőzésének, a hormetikus válasznak (kismértékű stressz pozitív élettani hatása (Calabrese & Mattson, 2017)) és az oxidatív distressztől való védelemnek (O’Leary, 2022).

Kalória-restrikció alatt hagyományosan a kalóriabevitel egy adott időkereten belüli csökkentését értjük, miközben a szervezet megfelelő makro- és mikrotápanyag ellátása biztosított (Bordone & Guarente, 2005). A kísérletesen alkalmazott CR mértéke 10 és 50% között változik, efelett már káros hatások jelentkezhetnek (Most és mtsai., 2017). Az időszakos koplalás (*intermittent fasting*, IF) a CR egyik formája, egy nem pontosan definiált fogalom, ami különböző periodicitású koplalási időszakokat magába foglaló diétát jelent. Ennek egyik formája a váltott napi éhezés (*alternate day fasting*, ADF), amikor egy koplalási napot egy *ad libitum* (AL) etetési nap követ. Ezzel a módszerrel közel 35%-os CR érhető el, mivel az evési napok nem teljesen kompenzálják a koplalás okozta kalória deficitet (Hofer és mtsai., 2022).

3.2 A táplálékfelvétel központi idegrendszeri szabályozása

A táplálkozás egy komplex, célorientált viselkedés, ahol az éhség és a táplálék tényleges elfogyasztása között különböző agyterületekhez kötődő idegi folyamatok egész sorozata játszódik le. Ha egy állat nem eszik, elpusztul, viszont a túl sok táplálék bevitel sem előnyös, hiszen a következtében kialakuló elhízás, és a velejáró kóros egészségügyi elváltozások szintén rontják a túlélés esélyeit. Mivel éhezéssel a legtöbb állat találkozik élete során a változó természeti feltételek között, így számos olyan metabolikus és viselkedési adaptációs mechanizmus alakulhatott ki a szervezetben, melyek segítik ezen szűkös időszakoknak az átvészelését. Ezzel szemben a tartós táplálékhiány ritka jelenség a természetben, viszont nagyon is jellemző a modern emberi környezetre, ami az elhízás (obezitás) globálisan növekvő számadataiban is megmutatkozik (Swinburn és mtsai., 2011). Az energiaegyensúlyt szabályozó rendszer összetettsége miatt azonban sokszor nem ismertek az elhízás mögötti okok, ahogy az sem, hogy miért gyakoribb az elhízás vagy metabolikus szindróma és 2-es típusú cukorbetegség az egyes mentális betegségekben pl. skizofréniában, depresszióban vagy bipoláris zavarban szenvedők, illetve antidepresszánsokat, antipszichotikumokat szedő betegek körében (Kouidrat és mtsai., 2014; Lee és mtsai., 2016; Newcomer, 2007; Patel és mtsai., 2009).

Ma a DSM-5 már hat különböző formáját különíti el a táplálkozási zavaroknak: anorexia nervosa, bulimia nervosa, falásroham zavar, elkerülő/restriktív táplálékbeviteli zavar, pica (nem ehető dolgok iránti sóvárgás) és kérődzési zavar (Treasure és mtsai., 2020).

Ide tartoznak a legnagyobb halálozási rátájú mentális betegségek is, különös tekintettel az anorexia nervosára, ahol gyakorlatilag minden szervrendszer károsodik, a betegek gyakran szorulnak kórházi kezelésre, magas a visszaesési ráta, vagy más táplálkozási zavar (pl. bulimia) kialakulása (Arcelus és mtsai., 2011; van Eeden és mtsai., 2021). Ahhoz viszont, hogy megértsük, miért kezd el valaki korlátlan mértékben enni, vagy ellenkezőképp, teljesen abbahagyni az evést, elengedhetetlen a táplálkozást szabályozó folyamatok feltérképezése.

3.2.1 Az ARC és a melanokortin rendszer

A táplálkozás központi idegrendszeri szabályozásának alapjait leíró modellek közül ma a legszélesebb körben elfogadott a melanokortin rendszer (Cone, 2005). A hypothalamus alapján, a III. agykamra szomszédságában, rostrocaudalisán a *chiasma opticumtól* egészen a *corpus mamillare*-ig terjedően, közvetlen az *eminentia mediana* mellett helyezkedik el a *nucleus arcuatus* (ARC) (Kalra és mtsai., 1999). Az *eminentia mediana* egyike a cirkumventrikuláris szerveknek, ahol a vér-agy gátnak egy módosult, áteresztőbb formája van jelen, amelynek funkcionális jelentősége, hogy ezen keresztül számos perifériáról érkező humorális szignál képes elérni az ARC-ot (Haddad-Tóvolli és mtsai., 2017). Az ARC-ban elhelyezkedő idegsejtek szerepe ebből kifolyólag a primer szenzoros neuronokéhoz hasonlítható: változatos receptoraik révén képesek a perifériáról érkező, a szervezet energiaállapotáról információt hordozó hormonális és metabolikus szignálokat érzékelni, és ezeket a jeleket az agy többi területe felé közvetíteni (Cone és mtsai., 2001; Waterson & Horvath, 2015).

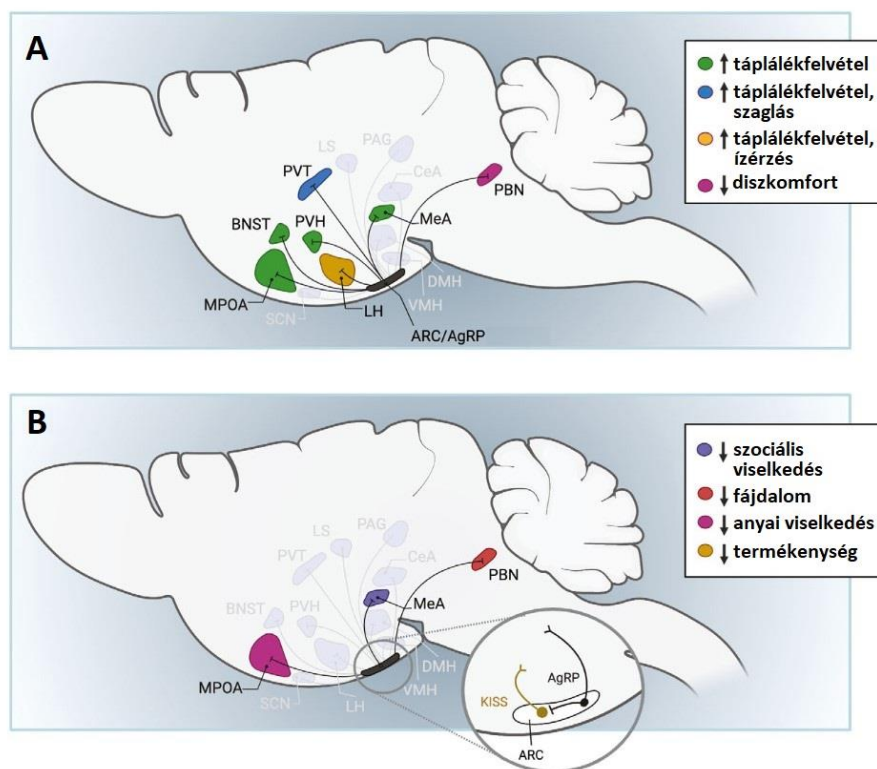
A melanokortin rendszer alapját két, egymással ellentétes hatású idegsejtcsoport képezi: a γ -amino-vajsavat (GABA), neuropeptid Y-t (NPY) és *agouti related proteint* (AgRP) kifejező neuronok (innenről: AgRP neuronok), valamint a proopiomelanokortint (POMC) és kokain-amfetamin regulált transzkriptet (CART) kifejező neuronok (innenről: POMC neuronok) (Abizaid & Horvath, 2008; Cone, 2005). A két egymás közvetlen szomszédságában elhelyezkedő neuroncsoport ellentétes hatást gyakorol a táplálékfelvételre, ahol az AgRP neuronok a táplálékfelvételt stimulálják (orexigén), míg a POMC sejtek a táplálékfelvételt terminálják (anorexigén) (Cowley és mtsai., 2001; Krashes és mtsai., 2011). Az AgRP és POMC neuronok is vetítenek a PVN-be, ahol a POMC neuronokból felszabaduló α -MSH a melanokortin receptorokon hatva gátolja a táplálékfelvételt, míg az AgRP a melanokortin receptorok antagonistájaként gátolja az α -MSH hatását (2. ábra).

Sejtfelszíni receptoraik révén az AgRP és POMC neuronok képesek érzékelni és integrálni a szervezet tápanyag és energiaellátottságáról információval szolgáló szignálokat. A leptin (zsírszövetből származó anorexigén hatású hormon (Pandit és mtsai., 2017)) és az inzulin a zsírraktárak állapotáról, és így a szervezet hosszútávú energiaellátottságáról közvetítenek információt, míg a gyomor-, bélrendszerből érkező hormonok (CCK, GLP1, ghrelin stb.) a táplálékfelvétel aktuális eseményeiről tájékoztatják a központi idegrendszert, és a táplálkozás rövidtávú szabályozásában vesznek részt (Kampe és mtsai., 2000). A leptin anorexigén hatású hormon, így a POMC neuronok aktivációjának kedvez, míg a gyomorból

származó ghrelin az AgRP neuronokat aktiválja, és táplálékfelvételt idéz elő (Chen és mtsai., 2017; Horvath & Abizaid, 2012; Vong és mtsai., 2011).

Negatív energiaegyensúly esetén tehát, amikor a vércukorszint alacsony, a keringő ghrelin szintje magas (pl. éhezés) az AgRP neuronok aktívak, míg a POMC neuronok csendeselek, és kialakul az éhségérzet. A POMC neuronok viszont táplálékfelvételt is stimulálhatnak β -endorfinon keresztül. Ez történik pl. kannabinoidok hatására, melyek a CB1 receptoron keresztül a POMC neuronok depolarizációját és az AgRP neuronok csendesítését idézik elő dózisfüggő módon (Koch és mtsai., 2015).

A táplálkozás szabályozásában az ARC-on kívül számos más hypothalamikus (LH, DMN, PVN, VMN) és extrahypothalamikus terület is részt vesz, melyekkel az AgRP és POMC neuronok reciprok kapcsolatban állnak (**3. ábra**). Az AgRP neuronok innerválják az amygdalát, a PVT-t, rostjai elérnek rostralisan egészen a medialis preopticus area (MPOA), bed nucleus stria terminalis (BNST) és septum területéig, caudalisan pedig a parabrachialis (PBN) és dorsalis raphe magokig (Broberger és mtsai., 1998; Nilsson és mtsai., 2005). Az ARC AgRP és POMC neuronjai a humorális szignálok mellett számos serkentő és gátló idegi jelet is feldolgoznak, melyek főleg intrahypothalamikus, és sokszor egymással átfedő területekről származnak (Krashes és mtsai., 2014; D. Wang és mtsai., 2015).



3. ábra Az AgRP neuronok kapcsolatrendszere. (A) A táplálékfelvétel szabályozásában részt vevő, AgRP neuronok által beidegzett területek közé tartozik az LH, PVH, bed nucleus striata terminalis (BNST), paraventricularis thalamus (PVT), medialis amygdala (MeA) és medialis preopticus area (MPOA), amelyek stimulálják a táplálékfelvételt, míg a PBN az evéssel kapcsolatos diszkomfort érzetet csökkenti. (B) Az amygdala a félelem és agresszió, az ARC kisszeptint kifejező neuronjai a szaporodás szabályozásában fontosak, míg az MPOA az anyai viselkedésben, a PBN pedig a fájdalom és jóllakottság kialakításában játszik szerepet (Deem és mtsai., 2022 alapján).

3.3 Az ArRP^{DTR} egérmodell

Az AgRP neuronok energiahomeosztázisban betöltött szerepét kérdésessé tette, hogy sem az *Agrp*, sem az *Npy* gén embrionális deléciója nem változtatja meg az állatok táplálékfelvételét vagy testtömegét (Qian és mtsai., 2002). A toxin-receptor mediálta sejt knock-out technika fejlődése a 2000-es évek elején azonban új lehetőségeket nyitott az AgRP neuronok szerepének vizsgálatára. Luquet és munkatársai (2005) embrionális őssejt technikával létrehoztak egy olyan transzgénikus egértörzset, amelyben a humán diftéria toxin receptor cDNS-e az AgRP promotere alatt fejeződik ki (AgRP^{DTR}). Az egerek és patkányok alapvetően rezisztensek a diftéria toxinra (DTX), mivel bennük a diftéria-receptor aminosavcserek miatt képtelen a DTX megkötésére (Mitamura és mtsai., 1995). Ezáltal a transzgén állatokban a diftéria toxinnal specifikusan csak az AgRP neuronokat öli el, az injekció időzítésével pedig kontrollálni lehet a neuronok degenerációjának időpontját is

Attól függően, hogy milyen életkorban kerül a toxin beadásra, különböző hatásról számolnak be: a neonatális korban injektált egerek csökkent AgRP neuronszám mellett is

durva abnormalitások nélkül életben maradnak, habár a testtömegre, táplálékbevitelre vonatkozó adatok nem mindig egybehangzóak (Joly-Amado és mtsai., 2012; Luquet és mtsai., 2005). Azonban, ha felnőtt korban injektálják az egereket, az állatok rövid időn belül drasztikusan lefognak a csökkent táplálékfelvétel következtében, végül egy héten belül el is pusztulnak (Gropp és mtsai., 2005; Luquet és mtsai., 2005). Az állatok halálához vezető pontos okok nem ismertek, de sem az *Agrp*, sem az *Npy* gén deléciója nem okoz szemmel látható fenotípusos változást, míg a *Vgat* (vezikuláris GABA transzporter) deléciója esetén az egerek hipofágiát, testtömegcsökkenést mutatnak, és ghrelinre is elveszítik az érzékenységet (Gropp és mtsai., 2005; Qian és mtsai., 2002; Tong és mtsai., 2008). A táplálékfelvétel radikális csökkenését valószínű nem csupán a melanokortin szignalizáció zavara okozza, mivel annak gátlása az agouti fehérje krónikus expressziója (letális sárga agouti egér, A^y/a) sem menti meg a DTX injektált $A^y;Agrp^{DTR/+}$ egereket.

A neonatális korban diftéria toxinnal injektált $AgRP^{DTR}$ egerek a felnőttekkel szemben nem pusztulnak el a kezelés következtében, aminek a hátterében pontosan nem ismert adaptációs mechanizmusokat feltételeznek. (Luquet és mtsai., 2005; Nilsson és mtsai., 2005; Wu & Palmiter, 2011). Az $AgRP$ neuronok egerekben kb. 3 hetes korra érik el teljes fejlettségüket, viszont már az ennél fiatalabb állatokban is funkcionálnak és fontos szerepet töltenek be az utód-gondozó kapcsolatban (Nilsson és mtsai., 2005; Zimmer és mtsai., 2019). A neonatálisan injektált $AgRP^{DTR}$ egerek metabolikus fenotípusára vonatkozó leírások azonban nem egybehangzóak. Luquet és munkatársai (2005) 4 hónapos korukig vizsgálták a hím egerek testsúlygyarapodását ad libitum diéta mellett, amely időszak alatt az $AgRP^{DTR}$ és WT egerek súlyai hasonlóan változtak. Joly-Amado és munkatársai (2012) azonban azt találták, hogy a pár napos korban injektált $AgRP^{DTR}$ egerek 3 és 5 hónapos koruk között magasabb testtömegre tesznek szert, mint WT társaik, csökkent táplálékbevitelük ellenére (Joly-Amado és mtsai., 2012). Továbbá magasabb testhőmérsékletet, hiperinzulinémiát, csökkent lokomotoros aktivitást és respirációs kvócienszt is megfigyeltek ezeknél az állatoknál (Joly-Amado és mtsai., 2012; Varela & Horvath, 2012).

Az $AgRP$ neuronok kulcsszerepet játszanak az éhezésre adott megfelelő adaptációs válaszokban, valamint az éhezést követő ismételt táplálékfelvételben: éhezés során megnő a plazma ghrelin szint, ami az $AgRP$ neuronok aktivációját és a táplálékfelvételt fokozza. Az $AgRP^{DTR}$ egerek viszont nem növelik a táplálékfelvételüket ghrelin hatására, csak ha magas cukor és zsírtartalmú táppal etetik őket, vagy ha fokozzák a dopaminerg neuronok aktivitását (Denis és mtsai., 2015; Luquet és mtsai., 2007). Ha az állatoknak csak egy 3 órás időablakban adnak enni a világos fázisban, 2 nap múlva az $AgRP^{DTR}$ egerek 10%-os, 4 nap

múlva pedig 30%-os mortalitását figyelték meg. Ezen időszak alatt az AgRP^{DTR} egerek táplálékfelvétele elmarad a kontroll egerekéhez képest, és az azoknál látott lokomotoros aktivitás növekedés sem jelentkezik etetés előtt (Denis és mtsai., 2015; Tan és mtsai., 2014). Amennyiben a 3 órás időablak a sötét fázisra esik, mindez viszont nem látható (Tan és mtsai., 2014). 24 órás éhezést követően az AgRP^{DTR} egerek szintén csökkent táplálékfelvételt mutattak a kontroll állatokhoz képest (Cai és mtsai., 2023). Ha az AgRP^{DTR} egereknek napi 2 órás etetési ablak mellett futókereket is adnak (activity based anorexia modell, ABA), akkor már az első 3 napban drasztikusan lecsökken az állatok táplálékfelvétele, és pár napon belül 100%-os mortalitást mutatnak. Ugyanakkor az állatok nem pusztán az éhezés miatt pusztulhatnak el, mivel a kontroll egerek az AgRP^{DTR} egerek fogyasztotta mennyiségű eledel mellett is túlélnek. Az AgRP^{DTR} egerek mortalitását teljesen megelőzi a magas zsírtartalmú táp etetése (Miletta és mtsai., 2020). Másik egérmodellben, ahol kemogenetikus úton gátolták az AgRP neuronok aktivitását, szintén csökkent táplálékfelvételt tapasztaltak éhezést követően (Denis és mtsai., 2015). Ezekből az eredményekből az látszik, hogy az AgRP neuronok szükségesek az éhezési és táplálkozási periódusok közötti megfelelő váltáshoz, és hiányukban az egerek nem képesek megfelelően adaptálódni a táplálék változó hozzáférhetőségéhez. Ezt a helyzetet modellezi az ADF is, amit kísérleteink során CR protokollként alkalmaztunk, és amelynek hatását még nem vizsgálták az AgRP^{DTR} egérmodellen.

3.4 AgRP neuronok viselkedésre gyakorolt hatása

A táplálékfelvétel egy komplex, célorientált viselkedés, ahol a táplálék fizikai elfogyasztása pusztán egy folyamatnak a végpontja, ami azzal kezdődik, hogy az állat megéhezik (motiváció), elkezd élelem után kutatni (appetitív fázis), megtalálja (megelőző fázis), és el is fogyasztja azt (evési fázis) (Gouveia és mtsai., 2021). Az AgRP neuronok aktivációja kezdetben egy negatív szignál az állat számára: az éhség egy kellemetlen, megszüntetendő állapot, ami arra motiválja az állatot, hogy élelmet keressen (Betley és mtsai., 2015). Kondicionált helypreferencia tesztben az egerek abban a kamrában töltenek több időt, ahol az AgRP neuronokat csendesítik, illetve ha egy ízt az AgRP neuronok optogenetikai stimulációjával asszociálnak, lecsökken az állatok adott íz iránti preferenciája (Betley és mtsai., 2015). Ez az eset akkor áll fenn, ha folyamatosan serkentik az AgRP neuronokat. Az AgRP neuronok aktivációja azonban nemcsak a táplálékfelvételt, de a táplálékkereső viselkedést is fokozza (Krashes és mtsai., 2011), valamint valós idejű információt kapnak a táplálék elérhetőségéről, ízletességéről, és az aktivitásukat már pusztán

a táplálék felfedezése is csökkenti, mielőtt azt egyáltalában elfogyasztaná az állat (Betley és mtsai., 2015; Y. Chen és mtsai., 2015). Ha ezt az időbeli eltolódást a táplálékfelvétel és az AgRP neuronok aktivitásfokozódása között a tesztek során is utánozzák, az AgRP neuronok aktivációja alkalmassá válik egy adott íz vagy eledel iránti preferencia kondicionálására, ami árnyalja a negatív szignál hipotézist. Sőt, ha az állatok táplálék jelenlétében maguknak stimulálhatják az AgRP neuronjaikat, aktívan használni fogják a stimulus kiváltására szolgáló pedált. Ez az operáns tanulás arra utal, hogy az AgRP neuronok aktivációja pozitív szignál az állat számára, amennyiben az AgRP neuronok stimulálását táplálkozás követheti. Ha viszont nincs bent eledel, és az állatok nem asszociálhatták a stimulust az evéssel, akkor nem fogják használni a pedált, vagyis az AgRP neuronok aktivitása alaphól nem pozitív, jutalmazó szignál, csak azzá válik a megfelelő környezetben (Y. Chen és mtsai., 2016).

Az AgRP neuronok szerteágazó kapcsolatrendszerük révén olyan agyterületeket is innerválnak, melyek nem, vagy nem csak a táplálékfelvétel és metabolizmus szabályozásában játszanak szerepet. Ha egy állat éhez, a viselkedésében olyan adaptív változások mennek végbe, melyek segítik az állatot az élelemhez jutásban, akár a saját territórium és fizikai biztonságának feladása árán is. Éhezés esetén az állatok magasabb kockázatot vállalnak a táplálékkeresés során, és kevésbé mutatnak agresszív territoriális viselkedést. Ennek az idegi alapját a medialis amygdalába vetítő AgRP neuronok képezhetik, ahol az NPY1 receptort kifejező neuronok stimulálása a saját terület védelmére irányuló agressziót vált ki (Padilla és mtsai., 2016). Az AgRP tartalmú rostok futnak a VTA-ba is, melyek mennyisége fiatal korban nagyobb, mint felnőttkorban, és amin keresztül az AgRP neuronok részt vesznek a jutalmazó rendszer működésében is. A csökkent AgRP neuron funkcióval rendelkező egereknél (AgRP^{DTR+/-} és AgRP^{SIRT1-KO}) a felderítő viselkedés és kokain-szenzitivitás fokozódását írták le a VTA dopaminerg neuronjainak elektromos tulajdonságainak megváltozása és emelkedett extracelluláris dopaminszint mellett (Dietrich és mtsai., 2012a).

A VTA és AgRP neuronok közötti kapcsolat a dopaminerg rendszer és prefrontális kéreg fejlődésében is kritikus szerepet játszik, és ennek a kapcsolatnak a sérülése fiatal korban a prefrontális kéreg morfológiai, funkcionális elváltozását, valamint a dopaminszignalizáció zavarát okozza AgRP^{SIRT1-KO} egérmódelben (Dietrich és mtsai., 2012a; Stutz és mtsai., 2022). A prefrontális kéreg a tanulás, célorientált viselkedés és kognitív folyamatok meghatározó szereplője, míg a VTA többek között a pozitív-negatív megerősítésben, döntéshozásban, munkamemóriában játszik szerepet. A prefrontális kéreg és VTA így fontos kapcsolódási pontot jelenthetnek az egyes pszichiátriai kórképek (pl.

skizofrénia, anorexia nervosa) és a metabolizmust irányító hypothalamikus hálózatok között (Miller, 2000; Morales & Margolis, 2017). Az AgRP neuronok tartós szinaptikus hatékonyság csökkenést idéznek elő mind a POMC neuronokban, mind a PVH, PBN, PVT, BNST és MeA területén, ami összhangban van az AgRP neuronok táplálékfelvételle gyakorolt hosszantartó hatásával, és ami szerepet játszhat a táplálkozással kapcsolatos tanulási folyamatokban is. Az AgRP^{DTR} egerek csökkent teljesítményt mutatnak a kontextuális és térbeli tanulást vizsgáló teszteken, ahol a táplálék helyét kell megtanulniuk, míg az AgRP neuronok aktiválása pont ellenkezőleg hat, és javítja az állatok teljesítményét (Burnett és mtsai., 2016; C. Wang és mtsai., 2021). Az AgRP neuronok kognitív funkciókra gyakorolt hatásában fontos szerepet játszhat a PVT, mivel pusztán a PVT-be vetítő AgRP neuronok előlése vagy gátlása is elegendő a megfigyelt tanulási deficit megjelenéséhez (C. Wang és mtsai., 2021).

Másik megközelítésben, ha az AgRP neuronokat aktiválják táplálékforrás hiányában, az állatok repetitív és sztereotip viselkedéseket kezdenek mutatni, ami pótcselekvésben (mosakodás), vagy az üveggolyó eltemetési tesztben a golyók elérésére irányuló fokozott aktivitásban jelentkezik (Dietrich és mtsai., 2015; Miletta és mtsai., 2020). Mindkét viselkedés jellemző a kényszerbetegségek állatmodelljeire (Alonso és mtsai., 2015). Ugyanakkor az AgRP neuronok aktivációja szorongásoldó hatást mutat különböző viselkedésteszteken (plus maze, open field teszt), ami arra utal, hogy a repetitív viselkedés ettől függetlenül jelentkezik. A táplálékmegvonás vagy kalória restrikció nem képes kiváltani a sztereotip viselkedést, tehát az éhség önmagában szintén nem valószínű kiváltó tényező (Dietrich és mtsai., 2015).

Az egyes pszichiátriai zavarok rekonceptualizálása, mint nem pusztán pszichés, de metabolikus eredetű betegségek is, valamint, hogy az AgRP neuronok a táplálékfelvételen túli viselkedést (jutalom, szorongás, agresszió, félelem, repetitív és sztereotip viselkedési formák) is befolyásolják, felveti annak a lehetőségét, hogy a táplálkozást szabályozó ősi hypothalamikus hálózatok szerepet játszhatnak a metabolikus és pszichiátriai tünetek megjelenésében. Különösen fontos lehet ez a perifériás szövetektől érkező szignálok, és az anyagcserét szabályozó idegrendszeri központok közötti összhang felborulásakor, ami az adott szituációnak nem megfelelő viselkedésben is megnyilvánulhat. Utóbbira példa a táplálkozási zavarok, mint az anorexia nervosa, ahol a betegek annak ellenére sem esznek, hogy túlzott mértékű fizikai aktivitást végeznek (Dietrich és mtsai., 2015; Méquignon és mtsai., 2019). Ezek, és azon megfigyelések miatt, hogy az AgRP neuronok gátlásakor/hiányában az állatok nem képesek megfelelően adaptálódni az éhezési-

táplálkozási periódusok váltakozásához, lehet különösen érdekes az AgRP^{DTR} egerek viselkedésének vizsgálata ADF diéta mellett, ami kutatásunk alapvető fókuszában áll.

3.4.1 Táplálkozási zavarok – anorexia nervosa

A táplálkozási zavarok különböző formái a súlyos mentális betegségek közé tartoznak. Mindegyik formánál megjelenik a testképzavar, abnormális evési mintázatok és kényszeres testsúlykontroll (Schmidt és mtsai., 2016). Az anorexia nervosában (AN) szenvedő betegekre jellemző az elhízástól való rettegés, az ebből fakadó szigorú diétázás, kalória restrikció, amit gyakran kiegészít a túlzott fizikai aktivitás és/vagy hánytató, hashajtó szerek túlhasználata is. Az AN jellemzően pubertás korban jelentkezik, hamarabb mint a bulimia nervosa, és bár nemtől, kortól függetlenül bárkit érinthet, fiatal lányok körében a leggyakoribb. Az alacsony önértékelés, szociális szorongás, anhedónia és kognitív rigiditás mind jellemzői az AN-nak, és hozzájárulnak az emberi kapcsolatok feltöredezéséhez, szociális izolációhoz, amelyek pedig fenntartják az AN jellegzetes tüneteit. Ehhez járul még az a szociokulturális kontextus is, ami szépségideáljaival tovább erősíti a vékony testhez fűződő testképzavart a betegekben. (Treasure és mtsai., 2020)

Az évek során számos állatmodellt hoztak létre az anorexia nervosa kutatására, melyek közül a legtöbbet használt az ABA modell (Scharner & Stengel, 2021). Az ABA lényege, hogy az állatoknak korlátlan hozzáférést biztosítanak futókerékhez, miközben táplálékot csak napi 2 órában kapnak, ami hiperaktivitáshoz és csökkent táplálékfelvételhez vezet az arra érzékeny állatokban (Schalla & Stengel, 2019). Az AgRP^{DTR} egerek ebben a modellben napokon belül elpusztulnak, amit a kalóriabevitelük drasztikus csökkenése előz meg. Viszont nem a csökkent táplálékfelvételt, hanem az energiaraktárak mobilizálásnak zavarát feltételezik az állatok pusztulása mögött, mivel ugyanilyen kalóriabevitel mellett a kontroll egerek még nem pusztulnak el. Az AgRP neuronok aktiválása ebben a modellben nem befolyásolja a kalóriabevitelt, de fokozza az állatok teljesítményét a futókeréken, illetve a kompulzív viselkedést a tesztet követően (Miletta és mtsai., 2020). Ebből a szempontból érdekes, hogy anorexiás betegeknél emelkedett plazma ghrelin és AgRP szintet figyeltek meg, ami negatívan korrelál a betegek kognitív képességeivel (Miljic és mtsai., 2006; Moriya és mtsai., 2006). Továbbá Vink és munkatársai (2001) az *Agrp* gén egy mutációját írták le, ami több mint kétszer olyan gyakori anorexiás betegekben, mint az egészséges kontroll csoportban (Vink és mtsai., 2001). Az AgRP neuronok aktivitásának ABA modellben történő részletesebb elemzésénél kimutatták, hogy míg azokban az egerekben, amik csak kalória restrikción vannak tartva futókerék nélkül, az AgRP neuronok aktivitása

szignifikánsan csökken a táplálkozás megkezdésekor, míg az ABA paradigmában tartott egereknél ez a csökkenés nem látható (Sutton Hickey és mtsai., 2023). Ugyanakkor limitációja az ABA modellnek, hogy akut módon modellezi a testtömegcsökkenést (míg az anorexia krónikus betegség), az állatok nem férhetnek hozzá mindig táplálékhoz, valamint szociális izolációban vannak tartva, ami eltér azoktól a feltételektől, amiben az anorexiás betegek legtöbbször élnek (Sutton Hickey és mtsai., 2023).

Az állatmodellek célja egy adott fajban (ember) előforduló jelenség másik fajon (pl. rágcsálók) történő tanulmányozása. Ilyen értelemben az állatmodellnek analóg tüneteket kell mutatnia a modellezett betegséggel (látszatérvényesség), a betegség kezelésében hatékony eljárásoknak az állatmodellben is enyhíteniük kell a tüneteket (prediktív érvényesség), valamint a tünetek hátterében álló mechanizmusoknak is hasonló természetűnek kell lennie (fogalmi érvényesség) (Belzung & Lemoine, 2011; Willner, 1984). Ugyanakkor jelenleg nincsen engedélyezett gyógyszeres terápia az anorexia kezelésére, és relatíve kevés információ áll rendelkezésre a mögöttes biológiai mechanizmusokról is, ami megnehezíti az anorexia állatmodelleinek értékelését (Zhang & Dulawa, 2021). Számos jel mutat viszont arra, hogy az energiahomeosztázis szabályozása, és különösen az éhségérzetet közvetítő AgRP neuronok szerepet játszhatnak az anorexiára jellemző metabolikus és viselkedéssjegyekben (Méquinion és mtsai., 2019). Az AgRP neuronok viselkedésre és kognitív képességekre gyakorolt hatásának megismerése tehát klinikai jelentőséggel bírhat, és ehhez szolgáltat értékes információt az AgRP^{DTR} egérmodell.

4 Célkitűzések

Kutatásunk célja, hogy pontosabb képet alkossunk az AgRP neuronok komplex, nem táplálkozással kapcsolatos, viselkedésekre gyakorolt hatásáról, illetve hogy karakterizáljuk az AgRP neuronok CR hatásmechanizmusában betöltött szerepét. Ehhez a neonatális kortól kezdődően csökkent AgRP neuron számmal rendelkező AgRP^{DTR} egérmodellt használjuk, és különböző korcsoportokban vizsgáljuk az AL vagy CR diéta hosszútávú hatását a vad típusú és AgRP^{DTR+/-} állatok viselkedésére.

A viselkedésvizsgálatok során alapvetően 3 kérdésre keressük a választ:

1. Az AgRP neuronok neonatális korban történő elölése hatással van-e a felnőtt állatok szorongására, lokomotoros aktivitására, felderítő viselkedésére,
2. Hogyan befolyásolja a CR vagy AL diéta a csökkent AgRP neuron számmal rendelkező egerek viselkedését, és ez változik-e az életkor vagy nem függvényében,
3. Eltér-e az állatok viselkedése a CR csoportban attól függően, hogy éheztetett vagy nem éheztetett napon történik a vizsgálat.

A viselkedésteszt mellett mérjük, hogyan változik hosszútávon a hím és nőstény állatok testtömege kalória restriktio hatására, vagy ha korlátlan hozzáférhetnek a táplálékhoz. Egyes kísérleti csoportokban az állatokat természetes halálukig követjük, és vizsgáljuk az AgRP neuronok csökkent számának, illetve CR-nak az élettartamra gyakorolt hatását.

5 Anyag és Módszer

5.1 Állatok és kalória restrikció

Az egerek hőmérséklet- és páratartalom-szabályozott helyiségben, 12 óra világos (reggel 6-tól este 6-ig) és 12 óra sötét ciklusban, csoportban (3-5 egér/ketrec) voltak tartva. Mind az AL mind a CR egerek standard takarmánytápot kaptak (VRF1, SDS). A CR csoportba tartozó egerektől hétfő-szerda-péntek reggeltől másnap reggelig vettük el a tápot (éheztetési napok). Víz minden állat számára *ad libitum* rendelkezésre állt minden időpontban. A C57BL/6J háttéren tartott AgRP^{DTR} egereket Dr. S. Luquet-tól kaptuk (Université de Paris, Franciaország), a vad típusú egereket a Janvier Labs-tól vásároltuk. A jelen dolgozatban bemutatott viselkedéstesztetekhez nőstény, a többi vizsgálathoz hím és nőstény egereket használtunk. A heterozigóta (DTR+/) és vad típusú (WT) egerek korábban leírt módszer szerint (Luquet és mtsai., 2005) a születésüket követő 5. napon sc. diftéria toxin injekciót kaptak (Sigma-Aldrich) 50 µg/kg fiziológiás sóoldatban (13,3 µl/g) oldva. A vizsgálatok az Állatorvostudományi Egyetemen zajlottak a Pest megyei kormányhivatal engedélyével (engedélyszám: **PE/EA/216-2/2020**). Az egerek súlyát 20 hetes korukig hetente, ezt követően havonta mértük (ME302, Mettler Toledo).

5.2 Immunhisztokémia

Az eutanáziát izoflurános (Isoflutec, 1000 mg/g) kábítást követően Euthasol 40% injekció A.U.V. ip. beadásával végeztük. Az egereket transzkardiális úton, 4%-os (V/V%) paraformaldehiddel perfundáltuk. Az agyakat eltávolítottuk, egy éjszakán át 4%-os paraformaldehidben posztfixáltuk, majd 0,1 M PB-ben tároltuk, másnap vibratómmal (Leica VT 1000S) 50 µm vastag metszeteket készítettünk. A szabadon úszó metszeteket háromszor 5 percig 0,1M PB-vel átmostuk, majd 20 percig 20%-os normál (szamár) szérumban (Jackson ImmunoResearch Laboratories) blokkoltuk. A primer antitesttel (nyúl anti-AgRP, 1:1000, Phoenix Pharmaceuticals) egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Háromszori mosás után a metszeteket 20 percig blokkoltuk 2%-os normál szérumban, majd 1 órán át inkubáltuk a szekunder antitesttel (5:1000, szamár anti-nyúl Alexa488, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Végül a metszeteket háromszor 0,1M PB-ben mostuk, tárgylemezre húztuk és DAPI-val (Fluoroshield, Sigma) lefedtük. A felvételeket konfokális mikroszkóppal (Leica SP2 AOBS) készítettük azonos beállítások mellett. A bemutatott felvételeken a kontrasztot, fényerőt utólag szerkesztettük Adobe

Photoshop CC 2015.5 programban, minden módosítást egységesen alkalmaztuk a teljes képen.

5.3 Viselkedéstesztetek

Az összes viselkedéstesztet egy erre kijelölt helyiségben, azonos körülmények között, félhomályban, délelőtti és kora délutáni órákban végeztük. A tesztdobozokat minden állat után 70%-os alkohollal fertőtlenítettük. A CR egerekkel a négyzet alapú open field és elevated plus maze teszteket koplalási napot (24 óra éhezést) követően, a kör alapú open field és zero maze teszteket „etetési” napot (24 óra *ad libitum* táp) követően végeztük. Az AL egerek minden tesztet megelőzően *ad libitum* kaptak tápot.

Open field tesztek: Az open field teszt egy szorongást és felfedező viselkedést mérő teszt, ahol a négyzet alapú apparátus egy 40x40x40 cm méretű nyitott tetejű plexi doboz (MKI Plexi kft.), aminek a falait kívülről fehér lapokkal átlátszatlaná tettük. A kör alapú apparátus egy 40 cm átmérőjű és 40 cm magas falú, nyitott tetejű plexi doboz (MKI Plexi kft.), amit kívülről fehér öntapadó fóliával átlátszatlaná tettünk. Az állatokat a teszt kezdetén dobozok közepére helyeztük, majd 10 percig rögzítettük a viselkedésüket.

Elevated plus maze teszt: Az elevated plus maze teszt egy szorongást és kockázat felmérő viselkedést mérő teszt. Az apparátus egy megemelt (60 cm-re a talajtól) kereszt alakú palló, 2 nyitott és 2 zárt karral (30 cm hosszú, 7 cm széles), melyek egymással szemben helyezkednek el. A két zárt kart 30 cm magas falak veszik körbe. Az apparátus sötétszürke bevonatú plexiből készült (MKI Plexi kft.). Az állatokat a teszt kezdetén a nyitott és zárt karok találkozásánál a centrumba helyeztük, és 5 percig rögzítettük a viselkedésüket.

Zero maze teszt: Az apparátus egy 40 cm átmérőjű, 5 cm széles gyűrű, ami a földtől 60 cm-re meg van emelve. A gyűrű négy negyedre van osztva, ahol két szemben lévő negyed 30 cm magas falakkal van körbe véve („zárt kar”), a másik két szemben lévő negyed pedig nyitott („nyílt kar”). A zárt karok belső, kör középpontja felé eső fala fekete, az apparátus többi része fehér plexiből készült (MKI Plexi kft.). Az állatokat a teszt kezdetén a nyílt és zárt karok határára helyeztük, majd 5 percig rögzítettük a viselkedésüket.

A viselkedéstesztetek elemzését az ANY-maze Video Tracking szoftverrel végeztük (7.20 verzió Stoelting Co.) az apparátusok fölé helyezett kamerával (Logitech BRIO) rögzített felvételeken. Az open field teszteknel az apparátust virtuálisan két zónára osztottuk: centrum (teszt Doboz területének középső 25%-a, négyzet vagy kör alakban a teszt Doboz alakjának megfelelően) és periféria (a doboz alapterületének 75%-a, a doboz falai mentén). A plus maze tesztnel nyitott kar, zárt kar és centrum zónákat határoztunk meg az apparátus

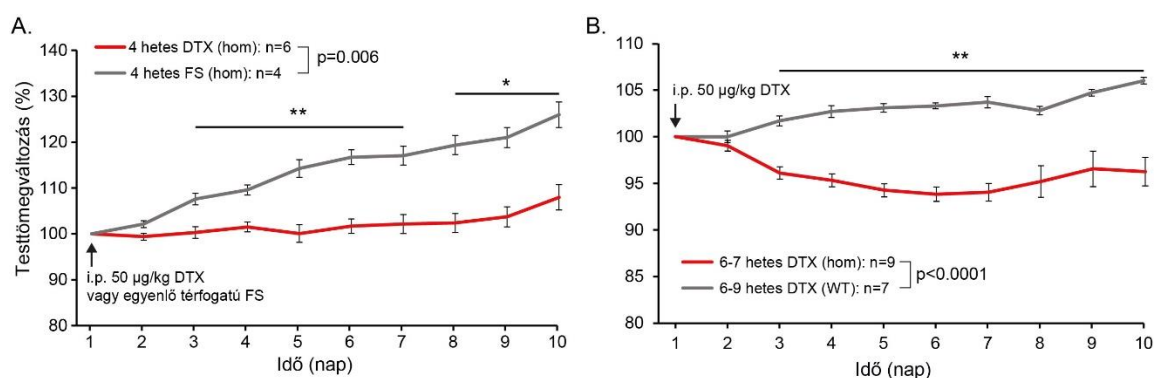
felépítésének megfelelően, a zero maze teszteknel az apparátust nyitott és zárt karokra osztottuk. Minden tesztnél elemeztük az egyes zónákban eltöltött időt, megtett távot, a zónába történő belépések számát és a teljes megtett távot. Zónaátlépésnek azt vettük, ha az állat testének 55%-a már a zónán belül volt (ez megfelel annak, ha az állat mellső két lábával átlépi a zónahatárt), és azt vettük zóna-elhagyásnak, ha az állat testének kevesebb mint 45%-a volt határon belül.

5.4 Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai kiértékelését az SPSS 25.0 (IBM Corp, Armonk, New York USA) programmal végeztük, az adatok vizualizálása excel (Microsoft 365, verzió: 2306) és Adobe Illustrator 2022 segítségével történt. A viselkedésvizsgálatoknál a varianciák homogenitását először a Levene teszt segítségével teszteltük ($p > 0.05$), majd parametrikus varianciaanalízist alkalmaztunk. Két csoport összehasonlítására Student-féle t-tesztet használtunk, a diéta és genotípus szerinti összehasonlításoknál két szempontos ANOVA-t alkalmaztunk Bonferroni korrekcióval. A kiugró értékeket mutató állatokat a viselkedésvizsgálatoknál elfogadott módon eltávolítottuk (átlag $\pm 2 \cdot SD$). A testtömegek egyes időpontokban történő összehasonlítására ismételt méréses ANOVA-t alkalmaztunk páronkénti összehasonlítással és Bonferroni korrekcióval. A túlélés-analízisekhez a Kaplan-Meier görbék összevetéséhez a Mantel-Cox (log rank) tesztet használtuk. A fluoreszcens intenzitás kvantifikálása ImageJ programban (NIH, 1.53k) történt, és minden felvétel esetén meghatároztunk egy optimális küszöbértéket a háttér fluoreszcencia kiszűrésére (Crowe & Yue, 2019). A fluoreszcens intenzitások összehasonlítására Student-féle t-tesztet használtunk.

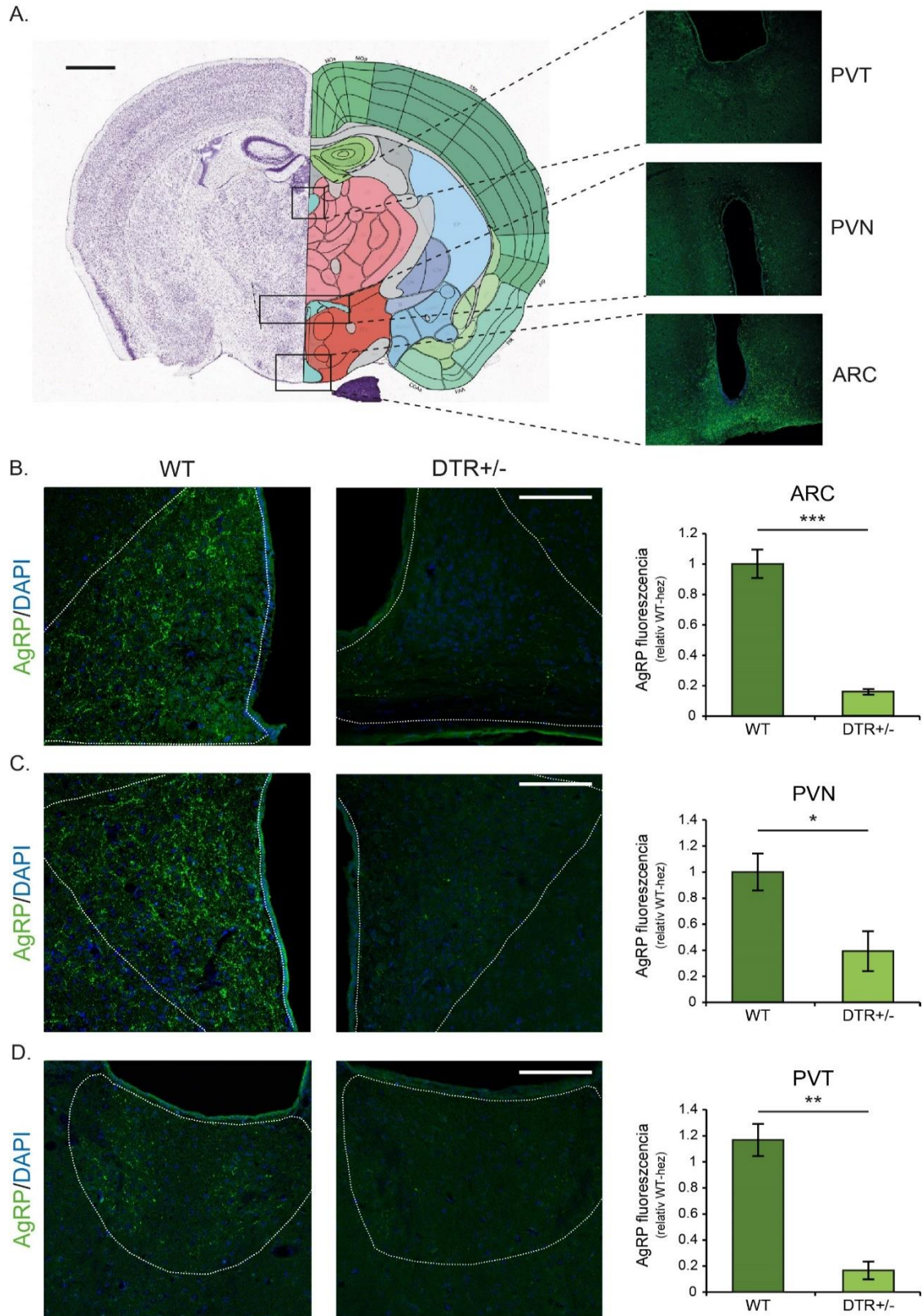
6 Eredmények

Az AgRP^{DTR} egérmodell tesztelése végett 4 és 6 hetes, a diftéria toxin receptorra homozigóta egereket injektáltunk DTX-al (**4. ábra**). Korábbi eredményeink és más kutatócsoportok publikáció azt mutatták, hogy az AgRP neuronok felnőtt korban történő elölése gyors fogyáshoz, végül halálhoz vezet (Luquet és mtsai., 2005; Wu és mtsai., 2009). Kísérletünk egyik célja az volt, hogy meghatározzunk egy szűkebb időablakot a neonatális és felnőttkor (10 hét<) között, amikor az AgRP neuronok elvesztése még kompenzálható. Ennek érdekében először 4 hetes homozigóta (AgRP^{DTR/DTR}) egereket injektáltunk DTX-al és fiziológiás sóoldattal (FS kontroll), és azt tapasztaltuk, hogy a DTX-al injektált egerek az oltást követő több, mint egy hétben nem híztak, míg a kontroll csoport ez idő alatt folyamatosan hízott (ismételt mérés ANOVA, $F_{1,8}=13.53$, $p=0.006$) (**4. A**). Ezt követően 6 hetes homozigóta egereket injektáltunk DTX-al, melyekről korábban már leírták, hogy elpusztulnak diftéria kezelés hatására. Hogy kizárjuk a diftéria toxin esetleges nem specifikus toxikus hatását, WT egereket is injektáltunk a toxinnal. Meglepő módon azonban itt is csak egy átmeneti, ámde szignifikáns fogyást láttunk a homozigóta állatoknál, míg a WT állatok továbbra is híztak (ismételt mérés ANOVA, $F_{1,14}=64.92$, $p<0.0001$) (**4. B**).



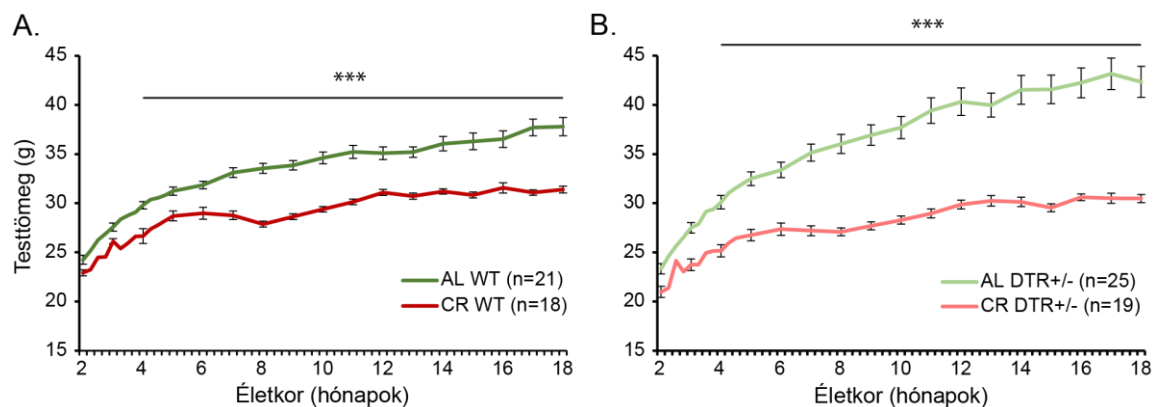
4. ábra A diftéria toxin (DTX) átmeneti stagnálást (4 hetes egerek, A.), illetve csökkenést (6 hetes egerek B.) okoz a homozigóta állatok (AgRP^{DTR/DTR}) testtömeggyarapodásában. A feltüntetett adatok átlagértékek $\pm$ SE, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ismételt mérés ANOVA és páronkénti összehasonlítás Bonferroni korrekcióval.

Annak érdekében, hogy igazoljuk az AgRP tartalmú rostok eltűnését az AgRP^{DTR} egerekben a neonatális kori DTX injekció hatására, immunhisztokémiai festést végeztünk vad típusú (kontroll) és heterozigóta állatok agyán (**5. ábra**). Megmértük a fluoreszcens intenzitást az ARC-ban (**5A,B**), ahol az AgRP neuronok is találhatóak, illetve a PVN és PVT területén (**5A,C,D**), melyeket intenzíven innerválnak az AgRP tartalmú rostok. Mindhárom területen szignifikáns csökkenést találtunk az AgRP immunpozitív rostok mennyiségében, ami igazolja a toxin kezelés hatásosságát (kétmintás t-próba, ARC: $p<0.0001$, PVN: $p=0.019$, PVT: $p=0.006$).



5. ábra Koronális egér agy metszet a hypothalamus arcuatus magjának magasságában (lépték: 1000 μ m, mouse.brain-map.org) (A) Reprezentatív AgRP immunjelölés és a fluoreszcens jel kvantifikálása felnőtt WT (bal oldali képek) és DTR+/- (jobb oldali képek) állat hypothalamusának arcuatus (B) és paraventricularis magjából (C), valamint a paraventricularis thalamusból (D). Az állatok neonatális korban 50 μ g/kg DTX injekciót kaptak sc. Kétmintás t-próba * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$. A feltüntetett adatok átlagértékek $\pm$ SE (n=3-3, nőstény és hím állatok), lépték = 100 μ m

Az AgRP neuronok neonatális korban történő elölése ellentétes hatással van a hím egerek testtömegére AL és CR diéta mellett, míg a nőstények testtömegét nem befolyásolja. A WT és DTR+/- genotípusú hím (6. ábra) és nőstény állatok (7. ábra) testtömegének az alkalmazott diéta (AL vagy CR) függvényében történő változását 2 és 18 hónapos koruk között ismételt mérések ANOVA-val hasonlítottuk össze. A kalória restrikción tartott egerek minden csoportban szignifikánsan alacsonyabb testtömegre tettek szert, mint az AL etetett társaik (♀DTR+/-: $F_{1,69}=13.44$, $p=0.0005$; ♀WT: $F_{1,59}=6.17$, $p=0.016$; ♂DTR+/-: $F_{1,42}=50.45$, $p<0.0001$; ♂WT: $F_{1,37}=45.89$, $p<0.0001$). Ugyanakkor a hím DTR+/- egereknél ez a különbség a CR és AL etetett állatok között kétszer akkora, mint a WT állatoknál (lásd 1. táblázat), míg a nőstényeknél mindkét genotípusnál hasonló mértékű a különbség az AL és CR etetett egerek testtömegei között (2. táblázat).

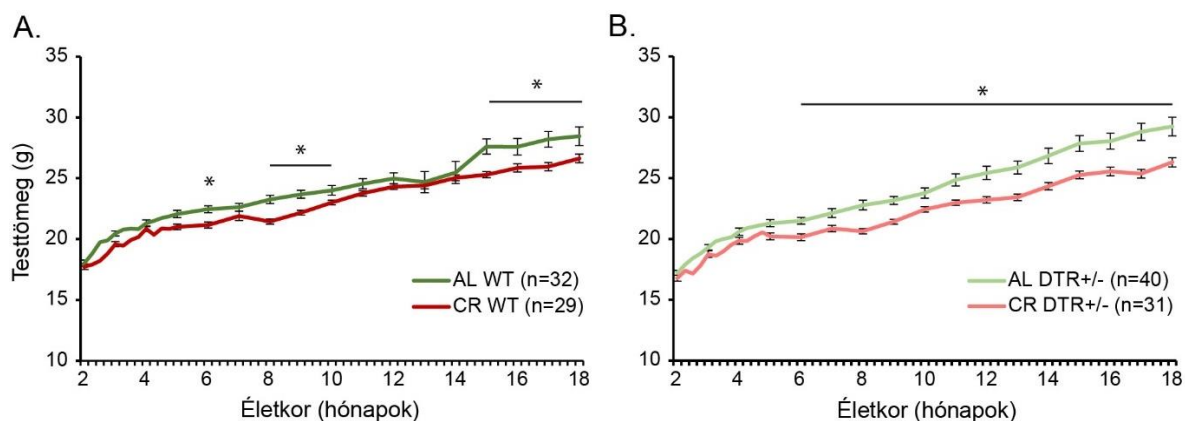


6. ábra A hím vad típusú (A) és heterozigóta (B) egerek testtömegének (g) változása az alkalmazott diéta (AL vagy CR) szerint az idő függvényében. A feltüntetett adatok átlagértékek +/- SE, *** $p<0.0001$ ismételt mérések ANOVA páronkénti összehasonlítás Bonferroni korrekcióval.

1. táblázat A hím AL vagy CR etetett WT és DTR+/- genotípusú egerek átlagos testtömege (g) havonként, illetve a havonkénti átlagos különbségek az AL és CR egerek testsúlyában.

Testtömeg (g)

Életkor (hónap)		2	3	4	5	6	7	8	9	
WT	AL	24,2	27,6	29,8	31,2	31,8	33,1	33,5	33,9	
	CR	22,9	26,1	26,7	28,7	29,0	28,8	27,9	28,6	
	Δ	1,3	1,4	3,1	2,5	2,9	4,4	5,7	5,2	
DTR+/-	AL	23,3	27,5	30,1	32,5	33,4	35,1	36,0	36,9	
	CR	21,0	23,8	25,1	26,8	27,4	27,2	27,1	27,7	
	Δ	2,4	3,7	4,9	5,7	6,0	7,9	8,9	9,2	
		10	11	12	13	14	15	16	17	18
WT	AL	34,6	35,2	35,1	35,2	36,1	36,3	36,5	37,7	37,8
	CR	29,4	30,1	31,1	30,7	31,2	30,8	31,6	31,1	31,4
	Δ	5,2	5,1	4,0	4,5	4,9	5,5	5,0	6,6	6,4
DTR+/-	AL	37,7	39,4	40,3	40,0	41,5	41,6	42,2	43,2	42,3
	CR	28,3	29,0	29,9	30,2	30,1	29,5	30,6	30,5	30,5
	Δ	9,4	10,5	10,4	9,7	11,4	12,0	11,6	12,7	11,9



7. ábra A nőstény vad típusú (A) és heterozigóta (B) egerek testtömegének (g) változása az alkalmazott diéta (AL vagy CR) szerint az idő függvényében. A feltüntetett adatok átlagértékek +/- SE, * $p < 0.05$ ismételt mérések ANOVA páronkénti összehasonlítás Bonferroni korrekcióval.

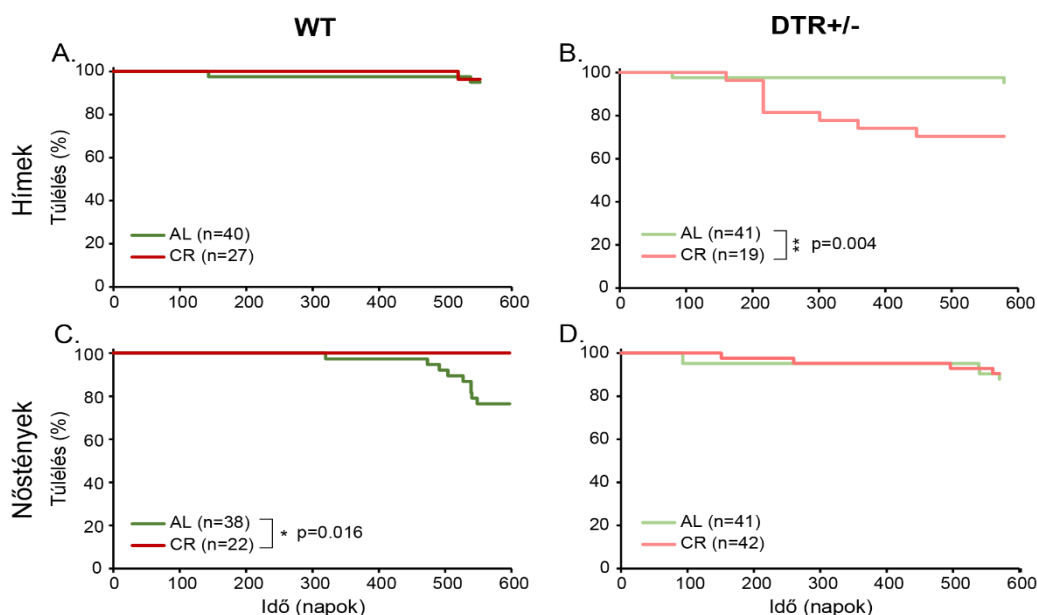
2. táblázat A nőstény AL vagy CR etetett WT és DTR+/- genotípusú egerek átlagos testtömege (g) havonként, illetve a havonkénti átlagos különbségek az AL és CR egerek testsúlyában.

Testtömeg (g)

Életkor (hónap)		2	3	4	5	6	7	8	9	
WT	AL	18,0	20,5	21,3	22,1	22,5	22,6	23,3	23,7	
	CR	17,7	19,6	20,9	21,0	21,2	21,9	21,4	22,2	
	Δ	0,3	0,9	0,5	1,1	1,3	0,7	1,8	1,5	
DTR+/-	AL	17,2	19,3	20,6	21,3	21,5	22,1	22,8	23,2	
	CR	16,9	18,9	20,0	20,3	20,2	20,8	20,7	21,4	
	Δ	0,4	0,5	0,7	1,0	1,3	1,3	2,1	1,7	
		10	11	12	13	14	15	16	17	18
WT	AL	24,0	24,6	25,0	24,7	25,5	27,6	27,6	28,2	28,5
	CR	23,0	23,8	24,3	24,4	25,0	25,3	25,9	26,0	26,6
	Δ	1,0	0,8	0,7	0,3	0,4	2,3	1,7	2,2	1,8
DTR+/-	AL	23,8	24,9	25,4	25,9	26,8	27,8	28,0	28,8	29,2
	CR	22,4	23,0	23,3	23,5	24,4	25,3	25,6	25,5	26,4
	Δ	1,3	1,9	2,1	2,4	2,4	2,6	2,4	3,4	2,8

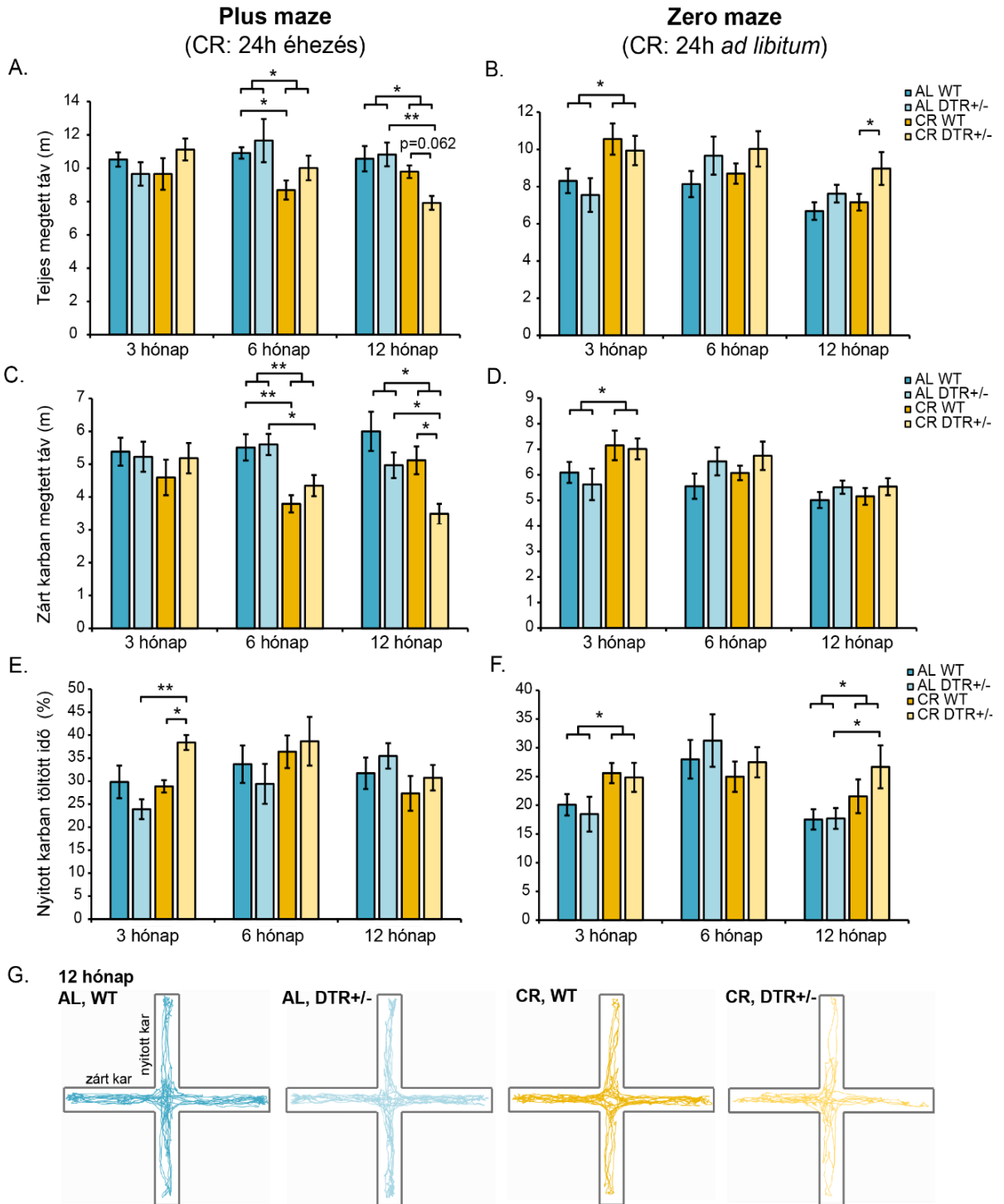
Kísérleteink részeként az állatok egy részét természetes halálukig követjük, ahol azt vizsgáljuk, hogy az alkalmazott diéta (CR vagy AL) és az AgRP neuronok megléte vagy hiánya hogyan befolyásolja az állatok élettartamát (8. ábra). Habár az állataink nagy része még él, néhány különbség már így is kirajzolódni látszik a csoportok között. A nőstény WT CR egereknél másfél év alatt nem volt elhullás, amikor a WT AL etetett egereknek 23.53%-a ugyanennyi idő alatt már elpusztult, ami szignifikáns különbséget jelent a két csoport között ($\chi^2(1)=5.86$, $p=0.016$) (8C). A nőstény DTR+/- állatok ezzel szemben hasonló elhullási arányt mutatnak mind AL, mind CR diéta esetén (AL: 12.13%-os, CR: 9.53%-os elhullás, $\chi^2(1)=0.15$, $p=0.701$) (8D). A hímeknél a WT állatoknál nincsen szignifikáns különbség a CR és AL diétán tartott egerek pusztulási arányai között (AL: 5.0%-os, CR: 3.7%-os elhullás, $\chi^2(1)=0.06$, $p=0.803$). A hím WT állatoknál látott kevés pusztulás

összhangban áll a hímek hosszabb várható élettartamával C57BL/6 egereknél **(8A)**. A hím CR DTR+/- állatoknál folyamatosan voltak elhullások a másfél év alatt, ami szignifikánsan több, mint AL diéta esetén (CR: 29.43%, AL: 4.66%-os elhullás, $\chi^2(1)=8.51$, $p=0.004$) **(9B)**.



8. ábra A genotípus (WT vagy DTR+/-) és diéta (AL vagy CR) hatása az élettartamra Kaplan-Meier görbéken ábrázolva. Hím (A, B) és nőstény (C, D) vad típusú egerek.

Kísérleteink egyik célja, hogy megvizsgáljuk az AgRP neuronok neonatális korban történő elölésének hatását az egerek viselkedésére. A különböző életkorú (fiatal felnőtt 3 hónapos, felnőtt 6 és 12 hónapos) egerekkel szorongást mérő plus maze és zero maze teszteket végeztünk **(3. táblázat)**. Habár azt vártuk, hogy az éhezés hatására a CR egerek több időt fognak tölteni a nyitott karokban és többet fognak mozogni, ez a hatást csak a 3 hónapos egereknél jelent meg konzekvensen, és ott is a 24 órás *ad libitum* etetést követő zero maze teszten (teljes megtett táv (m): $F_{1,34}=7.72$, $p=0.009$ **(9B)**; zárt karban megtett táv (m): $F_{1,34}=5.98$, $p=0.020$ **(9D)**; nyitott karban töltött idő (%): $F_{1,34}=5.31$, $p=0.027$ **(9F)**). Ezzel szemben a 6 és 12 hónapos csoportokban a plus maze teszten pont az éheztetett CR egerek voltak azok, akik kevesebbet mozogtak, mint az AL etetett társaik (teljes megtett táv (m): 6 hónap: $F_{1,31}=7.00$, $p=0.013$; 12 hónap: $F_{1,46}=7.87$, $p=0.007$ **(9A)**; zárt karban megtett távra (m): 6 hónap: $F_{1,31}=19.00$, $p=0.0001$; 12 hónap: $F_{1,46}=5.83$, $p=0.020$ **(9C)**), a nyitott karban töltött időben viszont nem volt különbség **(9E)**. A 12 hónapos csoportban elsősorban az éheztetett DTR+/- egerek voltak azok, akik szignifikánsan kevesebbet mozogtak, mint az AL etetett DTR+/- társaik (teljes megtett táv (m): $p=0.003$ **(9A)**; zárt karban megtett táv (m): $p=0.039$ **(9C)**), vagy akár a szintén éheztetett WT egerek (zárt karban megtett táv (m): $p=0.031$ **(9C)**). Utóbbi különbség viszont a zero maze teszten 24 óra *ad libitum* etetés után nem látható **(9B,D)**.

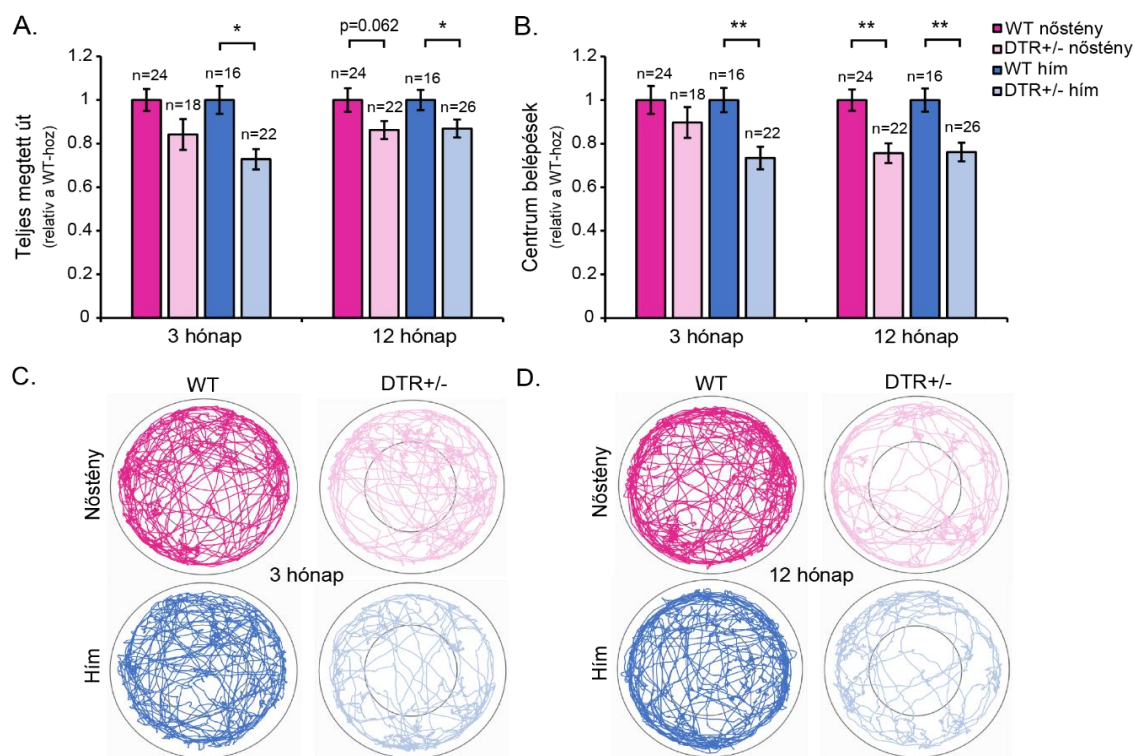


9. ábra A CR hatása az egerek lokomotoros aktivitására és szorongására 24 órás éhezést (plus maze), vagy 24 óra *ad libitum* táplálást követően (zero maze) 3, 6 és 12 hónapos nőstény állatokban. Az állatok által a teszt időtartama alatt megtett teljes táv (m) (A, B), zárt karokban megtett táv (C, D), és a nyitott karokban töltött idő (E, F). Reprezentatív útvonalábra egy-egy 12 hónapos nőstény AL vagy CR diétán levő WT és DTR+/- egér tesztjéről (G). A feltüntetett adatok átlagértékek $\pm$ SE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ két szempontos ANOVA páronkénti összehasonlítás Bonferroni korrekcióval.

3. táblázat A plus maze és zero maze tesztekben részt vett nőtény egerek száma az egyes csoportokban.

Diéta	Genotípus	3 hónap	6 hónap	12 hónap
AL	WT	15	9	17
	DTR+/-	9	5	13
CR	WT	9	10	11
	DTR+/-	9	8	14

A plus maze és zero maze tesztek mellett kétféle (kör és négyzet alapú) open field tesztet is végeztünk, ami az állatok szorongását és felfedező viselkedését mérő teszt. Az AL etetett WT és DTR+/- állatok összehasonlításában azt láttuk, hogy a hím DTR+/- állatok 3 és 12 hónapos korukban is alacsonyabb lokomotoros aktivitást mutattak (3 hónap: $t_{29,0}=2.25$, $p=0.032$; 12 hónap: $t_{34,6}=2.16$, $p=0.038$) (**10A,C,D**), és az open field centrum zónájába is kevesebbszer léptek be (3 hónap: $t_{29,1}=2.92$, $p=0.007$; 12 hónap: $t_{32,3}=3.25$, $p=0.003$) (**10B,C,D**). A nőtényeknél azonban csak a 12 hónapos csoportban láttunk szignifikáns különbséget a WT és DTR+/- állatok között a centrumba való belépések számában ($t_{32,3}=3.25$, $p=0.003$). Bár a 12 hónapos nőtény DTR+/- egerek is kevesebbet mozogtak, mint WT társaik, ez nem érte el az 5%-os szignifikancia szintet ($t_{40,8}=1.92$, $p=0.062$).



10. ábra Az AgRP neuronok neonatális elölésének hatása az egerek felderítő viselkedésére és szorongására open field teszten AL diéta mellett. A 3 és 12 hónapos nőtény, illetve hím állatok által teljesített út (A), és a centrum zónába történő belépések száma (B) a kétféle (kerek és négyzetes) open field teszt során. Reprezentatív útvonalábrák a 3 és 12 hónap hím és nőtény egerek tesztjeiről (C, D). A feltüntetett adatok a WT állatokhoz normalizált átlagértékek +/- SE, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ Student-féle t-teszt.

7 Következtetések

Az AgRP neuronok táplálékfelvételben betöltött kritikus szerepére a figyelmet Luquet és munkatársai (2005) kísérletei hívták fel, akik az AgRP^{DTR+/-} egérmodell létrehozásával az AgRP neuronokat bármely életkorban specifikusan előlhetővé tették DTX beadásával. A felnőtt egerek a toxin beadását követően teljesen felhagytak a táplálkozással, és egy héten belül eredeti testtömegük több, mint 20%-át elvesztették, ahol a kísérletet állattól okokból befejezték. Ezzel szemben a neonatálisan injektált egerek túlélnek, és felnőtt korban sem mutatnak durva abnormalitásokat (Luquet és mtsai., 2005). A mi eredményeink is alátámasztják, hogy a neonatálisan injektált egerek túlélnek, miközben a DTX hatására közel 80%-al csökken az AgRP immunpozitív rostok mennyisége a hipotalamuszban. Szerettük volna viszont pontosabban behatárolni, hogy mi az az életkor miután az AgRP neuronok elvesztése már letális az állatokra nézve. Azt tapasztaltuk, hogy sem a 4, sem a 6 hetes egerek nem pusztulnak el a DTX hatására. A 4 hetes egerek súlygyarapodás pusztán stagnál, míg a 6 hetes egerek egy átmeneti, ámde szignifikáns testtömegcsökkenést mutatnak. Ugyanez a DTX-el injektált WT egereknél nem látható, ami pedig kizárja a nemrég felvetett, diftériának tulajdonított nem specifikus toxicitást is (Cai és mtsai., 2023). A 6 hetes állatoknál a DTX injekciót más tanulmányokban már letálisnak találtak, bár megjegyzendő, hogy az állatokat az eredeti testtömegük 80%-nak elértekor terminálták, míg nálunk 77%-ról is visszahíztak állatok (Wu, Howell, & Palmiter, 2008; Wu és mtsai., 2009). Azonban mi korábban egy éves állatokkal reprodukáltuk a Luquet és mtsai. (2005) által 10 hét körüli egereknél leírt gyors fogyást, ahol az egerek olyan állapotba kerültek 20%-os fogyás körül, hogy a kísérletet be kellett fejeznünk. Ezek alapján valószínűnek tűnik, hogy a ~8-10 hetes kor lehet az, amikor az AgRP neuronok elvesztése már nem kompenzálható. Habár az AgRP neuronok ~3 hetes korra teljesen kifejlődnek (Nilsson és mtsai., 2005), később is történnek átrendeződések a kapcsolatrendszerükben. Utóbbira példa, hogy az AgRP neuronok az újszülött és peripubertás korú állatokban intenzíven innerválják a VTA-t, ami azonban felnőtt állatokban már nem látható (Dietrich és mtsai., 2012a). Továbbá ismert, hogy az AgRP neuronok a VTA-val való kapcsolataikon keresztül hatással vannak a prefrontális kéreg fejlődésére is, ami az egyik legkésőbb kifejlődő agyterület, és ennek végpontja rágszálókban szintén erre az 1-2 hónapos korra tehető (Kolk & Rakic, 2022). Ha kiderülne, hogy ez a két esemény – a VTA-ba futó rostok eltűnése és a DTX letális hatása – egymással kapcsolatban áll, annak fontos implikációi lehetnének akár az anorexia nervosa etiológiájára nézve is.

Kísérleteink során 18 hónapon át követtük a neonatális korban injektált egerek testsúlygyarapodását és azt találtuk, hogy a hím DTR+/- egerek AL diéta mellett magasabb, míg CR diéta mellett alacsonyabb testtömegre tesznek szert, mint WT társaik, ahol egyes AL etetett egerek a koruknak és nemüknek megfelelő normál testsúly másfélszeresét is elérik. A hím AL etetett DTR+/- egerek elhízását Joly-Amado és mtsai. (2012) is leírták, azonban a CR hatását ők nem vizsgálták, így az is új megfigyelés, hogy a DTR+/- egerek CR mellett alacsonyabb testtömeget érnek el, mint WT társaik. Ezzel szemben a nőstényeknél nem láttunk lényeges különbséget a DTR+/- és WT egerek testsúlyai között, sem AL sem CR diéta mellett, ami az AgRP neuronok eltérő jelentőségét jelzi a két nemből. Egy nemrég megjelent tanulmány szintén ivari különbségről számol be a táplálékfelvétel és testtömeg tekintetében olyan állatoknál, amelyek AgRP neuronjaiban a lipid metabolizmus és β -oxidáció zavart (Zagmutt és mtsai., 2023). Megjegyzendő, hogy a nőstény WT és DTR+/- egerek CR hatására sem fogytak le olyan mértékben, mint a hímek. A kísérleteinkben az állatokat a tágabb értelemben vett CR egyik formájának, periodikus éhezésnek (IF) tettük ki, ahol egy héten 4 napon AL ehettek az egerek, míg 3 napon teljesen megvontuk tőlük a táplálékot. Mivel ebben a CR paradigmában nem százalékosan csökkentettük az egerek rendelkezésére álló táplálékot, így pontosan nem tudjuk mennyit ettek az állataink. A szakirodalomban a 2:1 arányú IF-t tekintik izokalorikus diétának, míg az 1:1 IF - amit gyakorlatilag mi is alkalmazunk - ~80%-os CR-nak feleltethető meg, mivel egy nap alatt nem esznek 2x annyit az egerek (K.-H. Kim és mtsai., 2017; R. Y. Kim és mtsai., 2019). Azonban a mi adataink arra utalnak, hogy a hím és nőstény egerek eltérő módon alkalmazkodnak az IF-hez, tekintve hogy a nőstény állatok nem fogytak le jelentősen, ellentétben a hímekkel. Egyúttal az AgRP neuronok neonatális előlése is csak a hímek testtömegében okozott jelentős eltérést, míg a nőstény egerek testtömegét nem befolyásolta sem AL, sem CR diéta mellett. Ismert, hogy az ösztadiol közvetve az AgRP neuronokon keresztül fejti ki anorexigén hatását a nőstény állatok ciklusa során (Olofsson és mtsai., 2009), illetve az AgRP neuronok szorosan együttműködnek a kisspeptin 1-et kifejező neuronokkal, és ezáltal a hypothalamus-hipofízis-gonád tengellyel (Padilla és mtsai., 2017). Azonban, hogy a testsúlyokban megfigyelt ivari különbségek a nemi hormonok hatásának a következménye vagy sem, további kutatást igényelne, ahogy azt sem tudjuk jelenleg megítélni, hogy a hímeknél megfigyelt alacsonyabb testtömeg IF mellett azok csökkent táplálékbevitelére vezethető-e vissza.

A hím DTR+/- egerek a kísérleteinkben CR diétán alacsonyabb testtömeget értek el, mint a WT társaik, és az elhullás is szignifikánsan nagyobb volt a fiatal állatoknál, mint a

többi csoportban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az AgRP neuronok hiányában ezek az állatok nem képesek megfelelően alkalmazkodni a CR jelentette kihíváshoz. Hasonló következtetésre jutottak azokban a kísérletekben is, ahol az egereknek egy pár órás időablakban adtak enni naponta, vagy 24 órán át éhezettették az állatokat. Az AgRP neuronok hiányában az egerek jobban lefogytak, lassabban kezdtek el hízni, kevesebbet ettek és megnövekedett mortalitást mutattak (Cai és mtsai., 2023; Tan és mtsai., 2014). Utóbbi pedig pont az ellenkezője a CR jól dokumentált, élethosszot növelő hatásának, ami a mi eredményeinkből is kitűnni látszik a nőstény WT egereknél. Bár a CR évtizedek óta foglalkoztatja a tudósokat, a pozitív élettani hatásai mögött húzódó hatásmechanizmusok a mai napig nem tisztázottak. Mivel az éhségérzet CR mellett, és az energiaegyensúly beállta után sem csökken vagy szűnik meg (Hambly és mtsai., 2007), így feltételezik, hogy a CR hatásában az éhség, és az ezt jellemző neuroendokrin változások meghatározó szerepet töltenek be (Chiba és mtsai., 2002). Mivel az AgRP neuronok a táplálékfelvétel és éhség fő irányítói a melanokortin rendszeren keresztül (Cone, 2005), illetve azon kívül is (Aponte és mtsai., 2011; Wu, Howell, Cowley, és mtsai., 2008), valamint az éhezés során végbemenő metabolikus adaptációkat, a szénhidrát és lipidanyagcsere közötti váltást is ők koordinálják (Varela & Horvath, 2012), így kézenfekvő a feltételezés, hogy a CR hatásmechanizmusában is döntő szerepet játszanak (Deros és mtsai., 2016). Utóbbi mellett szólna az is, ha az AgRP neuronok hiányában az állatok CR mellett sem élnének tovább, mint az AL diétán tartott társaik, ami egyelőre a mi adatainkból is kitűnni látszik.

A szűkös táplálékforrás, az éhezés olyan kihívás, amivel a természetben minden állat találkozhat, így evolúciós szempontból létfontosságú volt, hogy kialakuljanak az ehhez megfelelő metabolikus és viselkedésbeli alkalmazkodási mechanizmusok. Kísérleteink során kíváncsiak voltunk, hogy az AgRP neuronok anyagcsere-adaptációkban betöltött szerepe mellett (Varela & Horvath, 2012), befolyásolják-e az éhezés esetén megfigyelhető viselkedésbeli változásokat is. A CR egy jól ismert hatása, hogy növeli az állatok lokomotoros aktivitását (Siegfried és mtsai., 2003), különösen nappal, míg az éjjeli aktivitását inkább csökkenti (Williams és mtsai., 2002). Ez a lokomotoros aktivitás növekedés viszont a mi eredményeinknél egyedül a 3 hónapos zero maze teszteken jelenik meg, amikor az állatok a megelőző 24 órában *ad libitum* ehettek. A 6 és 12 hónapos CR állatok, különösen a DTR $\pm$ genotípusúak a plus maze teszten 24 órás éhezést követően viszont már egyértelműen kevesebbet mozogtak, mint az AL etetett társaik. CR alatt azonban a legtöbbször bizonyos százaléknál táplálékmegvonást értenek, és nem periodikus koplalást, amit mi is alkalmazunk, és aminek viselkedésre gyakorolt hatását kevesen vizsgálták, és ami

esetleg magyarázhatja, miért nem látjuk a CR szorongásoldó és lokomotoros aktivitást növelő hatását. Ahol pedig vizsgálták az IF szorongásra gyakorolt hatását, ugyancsak ellentmondó eredményekre jutottak a különböző tesztek esetén (Carteri és mtsai., 2021). Ami azonban látszik a mi eredményeinkből, hogy az állatok eltérően viselkednek 24 órás koplalást, vagy 24 óra AL etetést követően CR mellett. A csökkent lokomotoros aktivitás csak az éhezést követő plus maze teszten jelent meg a 6 és 12 hónapos CR csoportokban, míg az AL etetést követő zero maze teszten nem láttunk különbséget a megtett távban a csoportok között.

Mivel egyre több adat utal arra, hogy az AgRP neuronok a táplálékfelvételen túl is befolyással vannak az állatok viselkedésére, kíváncsiak voltunk, hogy az AgRP neuronok neonatális előlése miként hat a nőstény és hím DTR+/- egerek felderítő viselkedését az open field teszten. Korábbi eredmények nem mutattak különbséget a nőstény DTR+/- és WT egerek lokomotoros aktivitásában ezen a teszten (Dietrich és mtsai., 2012b), amit a mi eredményeink is megerősítenek mind a 3, mind a 12 hónapos csoportban. Ezzel szemben a hím DTR+/- állatok szignifikánsan kevesebbet mozogtak a teszt során függetlenül az életkoruktól. Mivel ez a különbség a lokomotoros aktivitásban már a 3 hónapos korcsoportban is megjelent, ahol a hím WT és DTR+/- egerek testtömegében még nincsen jelentős különbség, így nem valószínű, hogy a DTR+/- egerek a magasabb testtömegük miatt mozognának kevesebbet. Szintén különbséget találtunk a centrum zónába való belépések számában, ahol a DTR+/- állatok inkább a doboz falai mentén fedezték fel a teret, és ez a nőstény DTR+/- egereknél is megfigyelhető volt. Ezek az eredmények pont az ellenkezőjét mutatják annak, amit az AgRP^{Sirt1-KO} egereknél írtak le, ahol az állatok többet mozogtak az open field teszten, mint WT társaik (Dietrich és mtsai., 2012b).

Összességében elmondható, hogy bár az AgRP neuronok neonatális korban történő előlése mellett is az állatok életképesek, szaporodnak, az utódaikat felnevelik (Phillips & Palmiter, 2008), mégis több abnormalitást is mutatnak: a hím AgRP^{DTR} egerek AL diéta mellett felnőtt korukra jelentősen elhízhatnak, míg CR mellett jobban lefognak és nagyobb mortalitást mutatnak, mint a WT egerek. Habár a nőstény DTR+/- állatok testsúlyában nem mutatkozik különbség, a CR-re adott viselkedésbeli válaszukban, valamint az open field teszten mutatott felderítő viselkedésükben a nőstények is eltérnek a kontroll állatoktól. A CR csak a hím egereknél eredményezett jelentős testtömegesökkenést, ami arra utal, hogy a nőstény és hím állatok eltérő mértékben és módon alkalmazkodnak a periodikus éhezéshez, ami fontos szempontot jelenthet az ilyen diétával végzett kísérletek eredményeinek értelmezésekor.

8 Összefoglaló

A hipotalamikus agouti-related peptidet (AgRP) és neuropeptid Y-t (NPY) kifejező neuronok kritikus szerepet játszanak az éhségérzet kialakításában. Az AgRP neuronok kizárólag a hypothalamus arcuatus magjában találhatók, és a POMC neuronokkal együtt a táplálékfelvétel és energiaháztartást szabályozó ún. melanokortin rendszer alapját képezik. Az AgRP neuronok viselkedésre gyakorolt hatása azonban kevésbé tisztázott, és esetlegesen fontos kapcsolódási pontot jelenthet különböző mentális betegségekkel, táplálkozási zavarokkal, mint az anorexia nervosa is. Kísérleteinkben a neonatális kortól csökkent AgRP neuronszámmal rendelkező AgRP^{DTR} egérmodellt vizsgáltuk *ad libitum* és kalória restrikció (CR) diéta mellett. Az állatokkal viselkedésteszteket végeztünk, hogy felderítsük, milyen hatással vannak az AgRP neuronok az állatok felderítő viselkedésére és szorongására. Mivel ezek a neuronok elsősorban éhezés és negatív energiaegyensúly esetén aktívak, így vizsgáltuk a normál, és csökkent mennyiségű AgRP neuronnal rendelkező állatok CR-hoz való alkalmazkodását is. A CR-ról számos tanulmány kimutatta, hogy sikeresen alkalmazható az öregedési folyamatok lassítására, és az élethossz megnövelésére. Tekintve az AgRP neuronok éhezésben játszott szerepét, kísérleteinkben azt a hipotézist is megvizsgáljuk, hogy az AgRP neuronok elengedhetetlenek a CR kedvező élettani hatásainak megjelenéséhez. Eredményeink az AgRP neuronok egy korábban ismeretlen ivarspecifikus szerepére utalnak az éhezési periódosukhoz való metabolikus és viselkedésbeli alkalmazkodásban.

9 Abstract

Neurons expressing hypothalamic agouti-related peptide (AgRP) and neuropeptide Y (NPY) play a crucial role in the development of hunger. AgRP neurons are located exclusively in the arcuate nucleus of the hypothalamus and together with POMC neurons form the basis of the melanocortin system: a set of CNS circuits regulating food intake and energy balance. However, the impact of AgRP neurons on complex, non-feeding related behaviour is less understood and could potentially represent an important link to various mental disorders, such as anorexia nervosa. Using the AgRP^{DTR} mouse model we performed various behavioural tests to study the effects of neonatal AgRP neuronal ablation on exploratory behaviour and anxiety. As AgRP neurons are primarily active during negative energy balance and starvation-like states, we also examined the ability of animals with impaired AgRP neuronal function to adapt to a CR regimen. Several studies have shown that CR can be successfully implemented to slow down ageing processes and increase lifespan. Considering the role of AgRP neurons in energy balance regulation, we also test the hypothesis that AgRP neurons are essential for the beneficial effects of CR. Our results indicate that perturbation of AgRP neuronal function can lead to sex-dependent changes in metabolic and behavioural adaptation to CR.

10 Irodalomjegyzék

- Abizaid, A., & Horvath, T. L. (2008). Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regulatory Peptides*, 149(1–3), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.10.006>
- Alonso, P., López-Solà, C., Real, E., Segalàs, C., & Menchón, J. M. (2015). Animal models of obsessive-compulsive disorder: Utility and limitations. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11, 1939–1955. <https://doi.org/10.2147/NDT.S62785>
- Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nn.2739>
- Arcelus, J., Mitchell, A. J., Wales, J., & Nielsen, S. (2011). Mortality Rates in Patients With Anorexia Nervosa and Other Eating Disorders: A Meta-analysis of 36 Studies. *Archives of General Psychiatry*, 68(7), 724–731. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.74>
- Belzung, C., & Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: Focus on anxiety disorders and depression. *Biology of Mood & Anxiety Disorders*, 1, 9. <https://doi.org/10.1186/2045-5380-1-9>
- Betley, J. N., Xu, S., Cao, Z. F. H., Gong, R., Magnus, C. J., Yu, Y., & Sternson, S. M. (2015). Neurons for hunger and thirst transmit a negative-valence teaching signal. *Nature*, 521(7551), Article 7551. <https://doi.org/10.1038/nature14416>
- Bordone, L., & Guarente, L. (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: Understanding longevity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrm1616>
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., & Hökfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 15043–15048.
- Burnett, C. J., Li, C., Webber, E., Tsaousidou, E., Xue, S. Y., Brüning, J. C., & Krashes, M. J. (2016). Hunger-Driven Motivational State Competition. *Neuron*, 92(1), 187–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.032>
- Cai, J., Chen, J., Ortiz-Guzman, J., Huang, J., Arenkiel, B. R., Wang, Y., Zhang, Y., Shi, Y., Tong, Q., & Zhan, C. (2023). AgRP neurons are not indispensable for body weight maintenance in adult mice. *Cell Reports*, 42(7), 112789. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112789>
- Calabrese, E. J., & Mattson, M. P. (2017). How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0013-z>
- Carteri, R. B., Menegassi, L. N., Feldmann, M., Kopczynski, A., Rodolphi, M. S., Strogulski, N. R., Almeida, A. S., Marques, D. M., Porciúncula, L. O., & Portela, L. V. (2021). Intermittent fasting promotes anxiolytic-like effects unrelated to synaptic mitochondrial function and BDNF support. *Behavioural Brain Research*, 404, 113163. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113163>
- Chen, S.-R., Chen, H., Zhou, J.-J., Pradhan, G., Sun, Y., Pan, H.-L., & Li, D.-P. (2017). Ghrelin receptors mediate ghrelin-induced excitation of agouti-related protein/neuropeptide Y but not pro-opiomelanocortin neurons. *Journal of Neurochemistry*, 142(4), 512–520. <https://doi.org/10.1111/jnc.14080>
- Chen, Y., Lin, Y.-C., Kuo, T.-W., & Knight, Z. A. (2015). Sensory Detection of Food Rapidly Modulates Arcuate Feeding Circuits. *Cell*, 160(5), 829–841. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.033>
- Chen, Y., Lin, Y.-C., Zimmerman, C. A., Essner, R. A., & Knight, Z. A. (2016). Hunger neurons drive feeding through a sustained, positive reinforcement signal. *eLife*, 5, e18640. <https://doi.org/10.7554/eLife.18640>
- Chiba, T., Yamaza, H., Higami, Y., & Shimokawa, I. (2002). Anti-aging effects of caloric restriction: Involvement of neuroendocrine adaptation by peripheral signaling. *Microscopy Research and Technique*, 59(4), 317–324. <https://doi.org/10.1002/jemt.10211>
- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, 8(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nn1455>
- Cone, R. D., Cowley, M. A., Butler, A. A., Fan, W., Marks, D. L., & Low, M. J. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 25 Suppl 5, S63–67. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801913>
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D., & Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836), 480–484. <https://doi.org/10.1038/35078085>
- Crowe, A. R., & Yue, W. (2019). Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio-Protocol*, 9(24), e3465. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3465>

- Deem, J. D., Faber, C. L., & Morton, G. J. (2022). AgRP neurons: Regulators of feeding, energy expenditure, and behavior. *The FEBS Journal*, 289(8), 2362–2381. <https://doi.org/10.1111/febs.16176>
- Denis, R. G. P., Joly-Amado, A., Webber, E., Langlet, F., Schaeffer, M., Padilla, S. L., Cansell, C., Dehouck, B., Castel, J., Delbès, A.-S., Martinez, S., Lacombe, A., Rouch, C., Kassis, N., Fehrentz, J.-A., Martinez, J., Verdié, P., Hnasko, T. S., Palmiter, R. D., ... Luquet, S. (2015). Palatability Can Drive Feeding Independent of AgRP Neurons. *Cell Metabolism*, 22(4), 646–657. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.011>
- Deros, D., Mitchell, S. E., Green, C. L., Chen, L., Han, J.-D. J., Wang, Y., Promislow, D. E. L., Lusseau, D., Speakman, J. R., & Douglas, A. (2016). The effects of graded levels of calorie restriction: VI. Impact of short-term graded calorie restriction on transcriptomic responses of the hypothalamic hunger and circadian signaling pathways. *Aging*, 8(4), 642–661. <https://doi.org/10.18632/aging.100895>
- Dietrich, M. O., Bober, J., Ferreira, J. G., Tellez, L. A., Mineur, Y. S., Souza, D. O., Gao, X.-B., Picciotto, M. R., Araújo, I., Liu, Z.-W., & Horvath, T. L. (2012a). AgRP neurons regulate development of dopamine neuronal plasticity and nonfood-associated behaviors. *Nature neuroscience*, 15(8), 1108–1110. <https://doi.org/10.1038/nn.3147>
- Dietrich, M. O., Bober, J., Ferreira, J. G., Tellez, L. A., Mineur, Y. S., Souza, D. O., Gao, X.-B., Picciotto, M. R., Araújo, I., Liu, Z.-W., & Horvath, T. L. (2012b). AgRP neurons regulate development of dopamine neuronal plasticity and nonfood-associated behaviors. *Nature Neuroscience*, 15(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nn.3147>
- Dietrich, M. O., & Horvath, T. L. (2009). GABA Keeps Up an Appetite for Life. *Cell*, 137(7), 1177–1179. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.002>
- Dietrich, M. O., & Horvath, T. L. (2013). Hypothalamic control of energy balance: Insights into the role of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 36(2), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.12.005>
- Dietrich, M. O., Zimmer, M. R., Bober, J., & Horvath, T. L. (2015). Hypothalamic AgRP Neurons Drive Stereotypic Behaviors beyond Feeding. *Cell*, 160(6), 1222–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.024>
- DiPatrizio, N. V., & Simansky, K. J. (2008). Activating Parabrachial Cannabinoid CB₁ Receptors Selectively Stimulates Feeding of Palatable Foods in Rats. *The Journal of Neuroscience*, 28(39), 9702–9709. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1171-08.2008>
- Fontana, L. (2009). The scientific basis of caloric restriction leading to longer life. *Current Opinion in Gastroenterology*, 25(2), 144–150. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32831ef1ba>
- Gao, Q., & Horvath, T. L. (2007). Neurobiology of Feeding and Energy Expenditure. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 367–398. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094324>
- Gouveia, A., de Oliveira Beleza, R., & Steculorum, S. M. (2021). AgRP neuronal activity across feeding-related behaviours. *The European Journal of Neuroscience*, 54(10), 7458–7475. <https://doi.org/10.1111/ejn.15498>
- Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A. W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., Barsh, G. S., Horvath, T. L., & Brüning, J. C. (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nature Neuroscience*, 8(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nn1548>
- Haddad-Tóvolli, R., Dragano, N. R. V., Ramalho, A. F. S., & Velloso, L. A. (2017). Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 224. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00224>
- Hambly, C., Mercer, J. G., & Speakman, J. R. (2007). Hunger Does Not Diminish Over Time in Mice Under Protracted Caloric Restriction. *Rejuvenation Research*, 10(4), 533–542. <https://doi.org/10.1089/rej.2007.0555>
- Hofer, S. J., Carmona-Gutierrez, D., Mueller, M. I., & Madeo, F. (2022). The ups and downs of caloric restriction and fasting: From molecular effects to clinical application. *EMBO Molecular Medicine*, 14(1), e14418. <https://doi.org/10.15252/emmm.202114418>
- Horvath, T., & Abizaid, A. (2012). Ghrelin and the central regulation of feeding and energy balance. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16(9), 617. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.105580>
- Horvath, T. L. (2006). Synaptic Plasticity in Energy Balance Regulation. *Obesity*, 14, 228S–233S. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.314>
- Horvath, T. L., Naftolin, F., Kalra, S. P., & Leranth, C. (1992). Neuropeptide-Y innervation of beta-endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: A light and electron microscopic double immunostaining analysis. *Endocrinology*, 131(5), 2461–2467. <https://doi.org/10.1210/endo.131.5.1425443>
- Joly-Amado, A., Denis, R. G. P., Castel, J., Lacombe, A., Cansell, C., Rouch, C., Kassis, N., Dairou, J., Cani, P. D., Ventura-Clapier, R., Prola, A., Flamment, M., Foufelle, F., Magnan, C., & Luquet, S. (2012).

- Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning. *The EMBO Journal*, 31(22), 4276–4288. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.250>
- Kaeberlein, M., Rabinovitch, P. S., & Martin, G. M. (2015). Healthy aging: The ultimate preventative medicine. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6265), 1191–1193. <https://doi.org/10.1126/science.aad3267>
- Kalra, S. P., Dube, M. G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T. L., & Kalra, P. S. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews*, 20(1), 68–100. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.1.0357>
- Kampe, J., Tschöp, M., Horvath, T. L., & Widmer, P. (2000). Neuroendocrine Integration of Body Weight Regulation. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E. A. McGee, ... D. P. Wilson (Szerk.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279040/>
- Kim, K.-H., Kim, Y. H., Son, J. E., Lee, J. H., Kim, S., Choe, M. S., Moon, J. H., Zhong, J., Fu, K., Lenglin, F., Yoo, J.-A., Bilan, P. J., Klip, A., Nagy, A., Kim, J.-R., Park, J. G., Hussein, S. M., Doh, K.-O., Hui, C., & Sung, H.-K. (2017). Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage. *Cell Research*, 27(11), 1309–1326. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.126>
- Kim, R. Y., Lee, J. H., Oh, Y., Sung, H.-K., & Kim, K.-H. (2019). Assessment of the Metabolic Effects of Isocaloric 2:1 Intermittent Fasting in Mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 153. <https://doi.org/10.3791/60174>
- Koch, M., Varela, L., Kim, J. G., Kim, J. D., Hernández-Nuño, F., Simonds, S. E., Castorena, C. M., Vianna, C. R., Elmquist, J. K., Morozov, Y. M., Rakic, P., Bechmann, I., Cowley, M. A., Szigeti-Buck, K., Dietrich, M. O., Gao, X.-B., Diano, S., & Horvath, T. L. (2015). Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature*, 519(7541), Article 7541. <https://doi.org/10.1038/nature14260>
- Kolk, S. M., & Rakic, P. (2022). Development of prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 47(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01137-9>
- Kouidrat, Y., Amad, A., Lalau, J.-D., & Loas, G. (2014). Eating disorders in schizophrenia: Implications for research and management. *Schizophrenia Research and Treatment*, 2014, 791573. <https://doi.org/10.1155/2014/791573>
- Krashes, M. J., Koda, S., Ye, C., Rogan, S. C., Adams, A. C., Cusher, D. S., Maratos-Flier, E., Roth, B. L., & Lowell, B. B. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1424–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI46229>
- Krashes, M. J., Shah, B. P., Madara, J. C., Olson, D. P., Strohlic, D. E., Garfield, A. S., Vong, L., Pei, H., Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Liberles, S. D., & Lowell, B. B. (2014). A Novel Excitatory Paraventricular Nucleus to AgRP Neuron Circuit that Drives Hunger. *Nature*, 507(7491), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature12956>
- Lee, S. H., Paz-Filho, G., Mastronardi, C., Licinio, J., & Wong, M.-L. (2016). Is increased antidepressant exposure a contributory factor to the obesity pandemic? *Translational Psychiatry*, 6(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.25>
- Luquet, S., Perez, F. A., Hnasko, T. S., & Palmiter, R. D. (2005). NPY/AgRP Neurons Are Essential for Feeding in Adult Mice but Can Be Ablated in Neonates. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1115524>
- Luquet, S., Phillips, C. T., & Palmiter, R. D. (2007). NPY/AgRP neurons are not essential for feeding responses to glucoprivation. *Peptides*, 28(2), 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.08.036>
- Masoro, E. J. (2005). Overview of caloric restriction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(9), 913–922. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.03.012>
- McDonald, R. B., & Ramsey, J. J. (2010). Honoring Clive McCay and 75 Years of Calorie Restriction Research. *The Journal of Nutrition*, 140(7), 1205–1210. <https://doi.org/10.3945/jn.110.122804>
- Méquinion, M., Foldi, C. J., & Andrews, Z. B. (2019). The Ghrelin-AgRP Neuron Nexus in Anorexia Nervosa: Implications for Metabolic and Behavioral Adaptations. *Frontiers in Nutrition*, 6, 190. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00190>
- Miletta, M. C., Iyilikci, O., Shanabrough, M., Šestan-Peša, M., Cammisa, A., Zeiss, C. J., Dietrich, M. O., & Horvath, T. L. (2020). AgRP neurons control compulsive exercise and survival in an activity-based anorexia model. *Nature Metabolism*, 2(11), 1204–1211.
- Miljic, D., Pekic, S., Djurovic, M., Doknic, M., Milic, N., Casanueva, F. F., Ghattei, M., & Popovic, V. (2006). Ghrelin Has Partial or No Effect on Appetite, Growth Hormone, Prolactin, and Cortisol Release in Patients with Anorexia Nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(4), 1491–1495. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2304>

- Miller, E. K. (2000). The prefrontal cortex and cognitive control. *Nature Reviews. Neuroscience*, 1(1), 59–65. <https://doi.org/10.1038/35036228>
- Mitamura, T., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., & Mekada, E. (1995). Diphtheria Toxin Binds to the Epidermal Growth Factor (EGF)-like Domain of Human Heparin-binding EGF-like Growth Factor/Diphtheria Toxin Receptor and Inhibits Specifically Its Mitogenic Activity (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1015–1019. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.3.1015>
- Morales, M., & Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental area: Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(2), 73–85. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- Moriya, J., Takimoto, Y., Yoshiuchi, K., Shimosawa, T., & Akabayashi, A. (2006). Plasma agouti-related protein levels in women with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*, 31(9), 1057–1061. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.06.006>
- Most, J., Tosti, V., Redman, L. M., & Fontana, L. (2017). Calorie restriction in humans: An update. *Ageing Research Reviews*, 39, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.005>
- Newcomer, J. W. (2007). Metabolic syndrome and mental illness. *The American Journal of Managed Care*, 13(7 Suppl), S170-177.
- Nilsson, L., Johansen, J. E., Schalling, M., Hökfelt, T., & Fetissov, S. O. (2005). Maturation of the hypothalamic arcuate agouti-related protein system during postnatal development in the mouse. *Developmental Brain Research*, 155(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.01.009>
- O’Leary, K. (2022). Health benefits of calorie restriction. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/d41591-022-00036-w>
- Olofsson, L. E., Pierce, A. A., & Xu, A. W. (2009). Functional requirement of AgRP and NPY neurons in ovarian cycle-dependent regulation of food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15932–15937. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904747106>
- Padilla, S. L., Qiu, J., Nestor, C. C., Zhang, C., Smith, A. W., Whiddon, B. B., Rønnekleiv, O. K., Kelly, M. J., & Palmiter, R. D. (2017). AgRP to Kiss1 neuron signaling links nutritional state and fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), 2413–2418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621065114>
- Padilla, S. L., Qiu, J., Soden, M. E., Sanz, E., Nestor, C. C., Barker, F. D., Quintana, A., Zweifel, L. S., Rønnekleiv, O. K., Kelly, M. J., & Palmiter, R. D. (2016). AgRP Neural Circuits Mediate Adaptive Behaviors in the Starved State. *Nature neuroscience*, 19(5), 734–741. <https://doi.org/10.1038/nn.4274>
- Pandit, R., Beerens, S., & Adan, R. a. H. (2017). Role of leptin in energy expenditure: The hypothalamic perspective. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 312(6), R938–R947. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00045.2016>
- Patel, J. K., Buckley, P. F., Woolson, S., Hamer, R. M., McEvoy, J. P., Perkins, D. O., Lieberman, J. A., & CAFE Investigators. (2009). Metabolic profiles of second-generation antipsychotics in early psychosis: Findings from the CAFE study. *Schizophrenia Research*, 111(1–3), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2009.03.025>
- Phillips, C. T., & Palmiter, R. D. (2008). Role of Agouti-Related Protein-Expressing Neurons in Lactation. *Endocrinology*, 149(2), 544–550. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1153>
- Qian, S., Chen, H., Weingarth, D., Trumbauer, M. E., Novi, D. E., Guan, X., Yu, H., Shen, Z., Feng, Y., Frazier, E., Chen, A., Camacho, R. E., Shearman, L. P., Gopal-Truter, S., MacNeil, D. J., Van der Ploeg, L. H. T., & Marsh, D. J. (2002). Neither Agouti-Related Protein nor Neuropeptide Y Is Critically Required for the Regulation of Energy Homeostasis in Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 22(14), 5027–5035. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.14.5027-5035.2002>
- Schalla, M. A., & Stengel, A. (2019). Activity Based Anorexia as an Animal Model for Anorexia Nervosa—A Systematic Review. *Frontiers in Nutrition*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2019.00069>
- Scharner, S., & Stengel, A. (2021). Animal Models for Anorexia Nervosa—A Systematic Review. *Frontiers in Human Neuroscience*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnhum.2020.596381>
- Schmidt, U., Adan, R., Böhm, I., Campbell, I. C., Dingemans, A., Ehrlich, S., Elzakkars, I., Favaro, A., Giel, K., Harrison, A., Himmerich, H., Hoek, H. W., Herpertz-Dahlmann, B., Kas, M. J., Seitz, J., Smeets, P., Sternheim, L., Tenconi, E., Elburg, A. van, ... Zipfel, S. (2016). Eating disorders: The big issue. *The Lancet Psychiatry*, 3(4), 313–315. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00081-X](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00081-X)
- Shafiee, F., Aucoin, M. G., & Jahanian-Najafabadi, A. (2019). Targeted Diphtheria Toxin-Based Therapy: A Review Article. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02340>
- Siegfried, Z., Berry, E. M., Hao, S., & Avraham, Y. (2003). Animal models in the investigation of anorexia. *Physiology & Behavior*, 79(1), 39–45. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00103-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00103-3)
- Sternson, S. M., & Eiselt, A.-K. (2017). Three Pillars for the Neural Control of Appetite. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 401–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-104948>

- Stutz, B., Waterson, M. J., Šestan-Peša, M., Dietrich, M. O., Škarica, M., Sestan, N., Racz, B., Magyar, A., Sotonyi, P., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Matyas, F., Stojilkovic, M., & Horvath, T. L. (2022). AgRP neurons control structure and function of the medial prefrontal cortex. *Molecular Psychiatry*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01691-8>
- Sutton Hickey, A. K., Duane, S. C., Mickelsen, L. E., Karolczak, E. O., Shamma, A. M., Skillings, A., Li, C., & Krashes, M. J. (2023). AgRP neurons coordinate the mitigation of activity-based anorexia. *Molecular Psychiatry*, 28(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01932-w>
- Swinburn, B. A., Sacks, G., Hall, K. D., McPherson, K., Finegood, D. T., Moodie, M. L., & Gortmaker, S. L. (2011). The global obesity pandemic: Shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*, 378(9793), 804–814. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60813-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60813-1)
- Tan, K., Knight, Z. A., & Friedman, J. M. (2014). Ablation of AgRP neurons impairs adaption to restricted feeding. *Molecular Metabolism*, 3(7), 694–704. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.07.002>
- Tong, Q., Ye, C.-P., Jones, J. E., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature neuroscience*, 11(9), 998–1000.
- Treasure, J., Duarte, T. A., & Schmidt, U. (2020). Eating disorders. *The Lancet*, 395(10227), 899–911. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30059-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30059-3)
- van Eeden, A. E., van Hoeken, D., & Hoek, H. W. (2021). Incidence, prevalence and mortality of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Current Opinion in Psychiatry*, 34(6), 515–524. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000739>
- Varela, L., & Horvath, T. L. (2012). AgRP neurons: A switch between peripheral carbohydrate and lipid utilization. *The EMBO Journal*, 31(22), 4252–4254. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.287>
- Vink, T., Hinney, A., van Elburg, A. A., van Goozen, S. H., Sandkuijl, L. A., Sinke, R. J., Herpertz-Dahlmann, B. M., Hebebrand, J., Remschmidt, H., van Engeland, H., & Adan, R. A. (2001). Association between an agouti-related protein gene polymorphism and anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*, 6(3), 325–328. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000854>
- Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S., & Lowell, B. B. (2011). Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron*, 71(1), 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.028>
- Wang, C., Zhou, W., He, Y., Yang, T., Xu, P., Yang, Y., Cai, X., Wang, J., Liu, H., Yu, M., Liang, C., Yang, T., Liu, H., Fukuda, M., Tong, Q., Wu, Q., Sun, Z., He, Y., & Xu, Y. (2021). AgRP neurons trigger long-term potentiation and facilitate food seeking. *Translational Psychiatry*, 11(1), 11. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01161-1>
- Wang, D., He, X., Zhao, Z., Feng, Q., Lin, R., Sun, Y., Ding, T., Xu, F., Luo, M., & Zhan, C. (2015). Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2015.00040>
- Waterson, M. J., & Horvath, T. L. (2015). Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metabolism*, 22(6), 962–970. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.026>
- Williams, T. D., Chambers, J. B., Henderson, R. P., Rashotte, M. E., & Overton, J. M. (2002). Cardiovascular responses to caloric restriction and thermoneutrality in C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(5), R1459–R1467. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00612.2001>
- Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, 83(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/BF00427414>
- Wu, Q., Boyle, M. P., & Palmiter, R. D. (2009). Loss of GABAergic Signaling by AgRP Neurons to the Parabrachial Nucleus Leads to Starvation. *Cell*, 137(7), 1225–1234. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.022>
- Wu, Q., Howell, M. P., Cowley, M. A., & Palmiter, R. D. (2008). Starvation after AgRP neuron ablation is independent of melanocortin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2687–2692. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712062105>
- Wu, Q., Howell, M. P., & Palmiter, R. D. (2008). Ablation of neurons expressing agouti-related protein activates fos and gliosis in postsynaptic target regions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(37), 9218–9226. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2449-08.2008>
- Wu, Q., & Palmiter, R. D. (2011). GABAergic signaling by AgRP neurons prevents anorexia via a melanocortin-independent mechanism. *European Journal of Pharmacology*, 660(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.110>
- Xu, A. W., Kaelin, C. B., Morton, G. J., Ogimoto, K., Stanhope, K., Graham, J., Baskin, D. G., Havel, P., Schwartz, M. W., & Barsh, G. S. (2005). Effects of Hypothalamic Neurodegeneration on Energy Balance. *PLOS Biology*, 3(12), e415. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030415>

- Zagmutt, S., Mera, P., González-García, I., Ibeas, K., Romero, M. del M., Obri, A., Martin, B., Esteve-Codina, A., Soler-Vázquez, M. C., Bastias-Pérez, M., Cañes, L., Augé, E., Pelegri, C., Vilaplana, J., Ariza, X., García, J., Martínez-González, J., Casals, N., López, M., ... Serra, D. (2023). CPT1A in AgRP neurons is required for sex-dependent regulation of feeding and thirst. *Biology of Sex Differences*, 14(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13293-023-00498-8>
- Zhan, C., Zhou, J., Feng, Q., Zhang, J., Lin, S., Bao, J., Wu, P., & Luo, M. (2013). Acute and Long-Term Suppression of Feeding Behavior by POMC Neurons in the Brainstem and Hypothalamus, Respectively. *Journal of Neuroscience*, 33(8), 3624–3632. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013>
- Zhang, J., & Dulawa, S. C. (2021). The Utility of Animal Models for Studying the Metabo-Psychiatric Origins of Anorexia Nervosa. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 711181. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.711181>
- Zimmer, M. R., Fonseca, A. H. O., Iyilikci, O., Pra, R. D., & Dietrich, M. O. (2019). Functional Ontogeny of Hypothalamic AgRP Neurons in Neonatal Mouse Behaviors. *Cell*, 178(1), 44-59.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.026>

11 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Rác Bencének a munkám során nyújtott folyamatos támogatását, a belém vetett bizalmat, és mindazt a sok élményt, amivel az elmúlt két évben diákkörösként gazdagodhattam.

Köszönöm Dr. Mátyás Ferencnek és Dr. Barsy Boglárkának a folyamatos szakmai és emberi támogatásukat, valamint a viselkedésvizsgálatok kivitelezésében és analízisében nyújtott rengeteg segítségüket.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Horváth Tamásnak és Prof. Dr. Sótonyi Péter tanszékvezető úrnak, hogy lehetővé tették a kutatómunka kivitelezését. Köszönöm Dr. Kapiller Mátyásnak, Kóródy Zitának és Nagy Gergőnek a viselkedésteszt elvégzésében nyújtott segítségüket, és a kísérleti állatok gondozásában nyújtott áldozatos munkájukat. Köszönöm Dénes Lillának és Nagy Barbarának a laboratóriumi munkákban való segítségüket és türelmüket, hogy megtanítottak a különböző technikák, eszközök helyes használatára.

Nem utolsó sorban pedig szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy mindig mellettem állnak és támogatnak.

JELLEN TDK DOLGOZATBAN BEMUTATOTT EREDMÉNYEK „AZ INNOVÁCIÓS ÉS TECHNOLÓGIAI MINISZTERIUM **ÚNKP-23-2** KÓDSZÁMÚ ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁGI PROGRAMJÁNAK A NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS ALAPBÓL FINANSZÍROZOTT SZAKMAI TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT.”



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL