

Az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) szerepe a központi idegrendszer anyai adaptációjában

Doktori értekezés

Dr. Lékó András Hugó

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Dobolyi Árpád, DSc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók:

Dr. Csáki Ágnes, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Gereben Balázs, DSc., tudományos tanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Oláh Imre, DSc., nyugalmazott egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Vereczki Viktória, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Hrabovszky Erik, DSc., tudományos tanácsadó

Budapest
2017

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	8
1.1. Az anyai viselkedés idegrendszeri háttere patkányokban	8
1.1.1. Hormonális változások szerepe az anyai viselkedés kialakításában	10
1.1.2. Az anyai viselkedés központi idegrendszeri centruma, a medialis preoptikus area (MPOA).....	11
1.1.3. Az anyai viselkedést szabályozó egyéb neuronális hálózatok és működésük.....	15
1.1.3.1. A defenzív kör működése szűz nőstényekben	15
1.1.3.2. A defenzív kör gátlása anyáknban.....	16
1.1.3.3. Az anyai kör célorientált viselkedésekért felelős része – az MPOA és a mezolimbikus dopaminerg rendszer kapcsolata.....	16
1.1.3.4. A kyphosis, mint egy speciális anyai viselkedés szabályozása - az MPOA és PAG kapcsolata.....	18
1.2. A prolaktin szabályozása és funkciói	19
1.2.1. A prolaktin jellemzése	19
1.2.2. A prolaktin hatásai	20
1.2.2.1. Prolaktin szerepe az emlőmirigyben	20
1.2.2.2. A prolaktin metabolikus hatásai.....	21
1.2.2.3. Prolaktin hatása a fertilitásra	21
1.2.2.4. Prolaktin szerepe az anyai neurogenesisben	21
1.2.2.5. Prolaktin hatása a stresszválásra	22
1.2.3. A prolaktin szekréciója	22
1.2.3.1. A hipotalamo-hipofizeális dopaminerg rendszer	23
1.2.3.2. A prolaktin feedback mechanizmusa és megváltozása a laktáció során.....	25
1.2.3.3. A TIDA sejtek működését szabályozó faktorok	27
1.2.3.4. Létezik-e prolaktin releasing faktor (PRF)?	28
1.3. Az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1).....	29
1.3.1. IGF-1 a központi idegrendszerben	29
1.3.2. IGF-1 neuroendokrin funkciói	30
1.3.3. Az IGF-1 aktiválta intracelluláris jelátviteli utak.....	32
1.3.4. Az Inzulinszerű növekedési faktor 3-as típusú kötőfehérjéje (IGFBP-3)	34
1.3.4.1. Az IGFBP-3 szerkezete	34
1.3.4.2. Az IGFBP-3 és az anyai adaptáció lehetséges kapcsolata.....	34
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	37

3. MÓDSZEREK	39
3.1. Kísérleti állatok.....	39
3.2. Preoptikus terület mikrodisszekciója	41
3.3. RT-PCR (reverse transcriptase – polymerase chain reaction)	41
3.4. Hisztológiai módszerek.....	42
3.4.1. In situ hibridizációs hisztokémia (ISHH)	42
3.4.3. Immunhisztokémia és in situ hibridizációs hisztokémia kombinációja.....	43
3.4.3. Mikroszkópia és képfeldolgozás.....	44
3.4.4. Az in situ hibridizációs jel denzitometriás analízise	44
3.5. Műtéti technikák	44
3.5.1. Agykamrai (icv.) kanül és ozmotikus minipumpa beültetése.....	44
3.5.2. Kanül beültetése a vena jugularisba	45
3.5.3. Vérvételezés szoptatás előtt és alatt	46
3.6. Viselkedésvizsgálatok.....	46
3.6.1. Spontán anyai viselkedés	46
3.6.2. Kölyök-visszahordási teszt.....	47
3.6.3. Emelt keresztpalló teszt	47
3.7. Hormon mérések.....	48
3.7.1. Prolaktin radio-immuno-assay (RIA)	48
3.7.2 IGF-1 ELISA.....	48
3.8. Primer mediobasalis hipotalamikus sejt kultúrák előállítása.....	48
3.9. Western blot analízis.....	49
3.10. Statisztikai analízis.....	50
4. EREDMÉNYEK	51
4.1. Az IGFBP-3-ra vonatkozó microarray eredmények validálása	51
4.1.1. A preoptikus terület microarray vizsgálatánál tapasztalt IGFBP-3 expresszió fokozódás ellenőrzése kvantitatív RT-PCR-rel.....	51
4.1.2. Az IGFBP-3 expresszió helyének és mértékének vizsgálata a preoptikus területen in situ hibridizációs hisztokémiával (ISHH).....	52
4.2. Az IGF-1 anyai motivációra való hatása	53
4.2.1. IGF-1, illetve IGFBP-3-inhibitor agykamrába adagolásának hatása az anyai motivációra	53

4.2.2. A szorongás-szerű viselkedés és a motoros aktivitás vizsgálata	55
4.3. IGF-1 laktációra kifejtett hatása	56
4.3.1. IGF-1 hatása a szoptatás indukálta prolaktin szekrécióra	56
4.3.2. Az IGF-1 hatás hátterében álló lehetséges mechanizmusok.....	58
4.3.2.1. IGFBP-3 expresszió a tuberoinfundibularis dopaminerg (TIDA) sejtekben	58
4.3.2.2. A TIDA sejtek IGFBP-3 expressziója laktáló és deprivált anyákban.....	59
4.3.2.3. IGF-1 hatása a TIDA sejtek TH expressziójára in vivo	61
4.3.2.4. IGF-1 hatása a TIDA sejtek TH expressziójára in vitro	63
4.3.2.5. IGF-1 hatása a TH enzim foszforilációjára in vitro.....	63
4.4. Az IGF-1 szérumbeli koncentrációjának változása a laktációval összefüggésben	65
4.4.1. IGF-1 koncentráció változása a szoptatással és az általa indukált prolaktinnal összefüggésben	65
4.4.1.1. IGF-1 és prolaktin koncentráció változása szoptatás során	65
4.4.1.2. A szérum IGF-1 szint korrelációja a prolaktinszinttel szoptatás során.....	66
4.4.2. IGF-1 beadás hatása perifériás IGF-1 koncentrációra	67
4.4.2.1. Krónikus IGF-1 beadás hatása a szoptatás indukálta IGF-1 emelkedésre	67
4.4.2.2. Akut IGF-1 beadás hatása a szoptatás indukálta IGF-1 emelkedésre	69
5. MEGBESZÉLÉS.....	71
5.1. Az IGFBP-3 indukciója anyákban	71
5.2. Az általunk vizsgált IGF-rendszer szerepe az anyai motiváció szabályozásában.....	72
5.3. IGF-rendszer laktációt befolyásoló hatásának mechanizmusa	74
5.4. Az IGF-1 szérumbeli koncentrációjának változásai a laktációval összefüggésben	78
6. KÖVETKEZTETÉSEK	82
7. ÖSSZEFOGLALÓ	83
8. SUMMARY	84
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	85
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	98
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	99

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

16HO – terhesség 16. napján	BNST – bed nucleus of the stria terminalis
hisztarektomizált és ovarektomizált nőstény	BSA – bovine serum albumin
3V – 3. agykamra	CA1 – cornu ammonis 1
ABC – avidin-biotin complex	CBG – corticosterone binding globuline
ac – commisura anterior (anterior commissure)	CCD – charge coupled device (töltés csatolt eszköz)
ACTH – adrenokortikotrop hormon	Cdk5 – ciklin dependens kináz-5
ACSF – artificial cerebrospinal fluid	CP – caudate putamen
AHA – elülső hipotalamikus area (anterior hypothalamic area)	Creb –cAMP response element binding protein
AHN – nucleus hypothalamicus anterior (anterior hypothalamic nucleus)	Crebbp – Creb binding protein
ALS – acid labile subunit	CRH – kortikotrop releasing hormon
ANOVA – varianciaanalízis (analysis of variance)	D2R – 2-es típusú dopamin receptor
AOB – bulbus olfactorius accesorius (accessory olfactory bulb)	DA - dopamin
AP – antero-posterior	DAB - diaminobenzidin
AP-1 – aktivátor protein-1	Dat – dopamin transzporter
Arc – nucleus arcuatus	DB – Broca-féle diagonális köteg (Broca's diagonal band)
ATP – adenzin trifoszfát	DEPC – dietil-pirokarbonát
AU – arbitrary unit	dmArc – dorsomedialis nucleus arcuatus
AVP – arginin-vazopresszin	DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
AVPV – anteroventralis periventricularis	DMSO – dimetil-szulfoxid
BAD – Bcl-2 asszociált apoptózis agonista	dpi – dots per inch (pont per hüvelyk)
Bcl-2 – B cell lymphoma 2	Drd4 – D4-es típusú dopamin receptor
BLA – basolateralis amygdala	DTT – ditiotreitól
BMA – basomedialis amygdala	DV – dorsalis - ventralis
	ECL – enhanced chemiluminescence (erősített kemilumineszcencia)
	E. coli – Escherichia coli

EDTA – etilén–diamin-tetraecetsav	IGF-1R – inzulinszerű növekedési faktor-1 receptor (insulin-like growth factor-1 receptor)
EIF4E – 4E eukarióta transzláció iniciációs faktor	IGFBP-3 – inzulinszerű növekedési faktor 3-as típusú kötőfehérjéje (insulin-like growth factor binding protein-3)
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay	IgG – immunoglobulin G
EPSP – excitátoros posztzinaptikus potenciál (excitatory postsynaptic potential)	IRS1 – inzulin receptor szubsztrát (insulin receptor substrate)
ERK – extracelluláris szignál regulált kináz	ISHH – in situ hibridizációs hisztokémia (in situ hybridization histochemistry)
ER- α – α -típusú ösztrogén receptor (estrogen receptor α)	Jak2 – Janus kináz 2 (Janus kinase 2)
f - fornix	Kiss1- kisspeptin 1 gén
FOXO – Forkhead box-O	Km – Michaelis-Menten konstans
GABA – γ -aminovajsav (γ -aminobutyric acid)	LDL – low density lipoprotein
GAPDH – glicerin aldehid 3-foszfát dehidrogenáz	L-DOPA – L-3,4-dihidroxifenilalanin (L-3,4-dihydroxyphenylalanin)
GH – növekedési hormon (growth hormone)	LG – licking grooming
GHRH – növekedési hormon releasing hormon (growth hormone-releasing hormone)	LH – luteinizáló hormon
GLUT2 – 2-es típusú glukóz transzporter (glucose transporter 2)	LRP2 – 2-es típusú LDL receptor
GnRH – gonadotropin releasing hormon	LTP – long term potentiation
Grb-2 – growth factor receptor bound-2	MAPK – mitogén aktivált protein kináz (mitogen activated protein kinase)
HK – high kyphosis	MCH – melanin concentrating hormone
HPA – hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely (hypothalamo-hypophysis-adrenal axis)	MeA – medialis amygdala
icv. - intracerebroventricularis	MEK – mitogén aktiválta protein kináz
IGF-1 – inzulinszerű növekedési faktor-1 (insulin like growth factor-1)	ML – medial - lateralis
	MMP-9 – mátrix metalloproteáz-9
	MPA – medialis preoptikus area dorsolateralis része
	mPFC – medialis prefrontalis cortex
	MPN – nucleus preopticus medialis
	MPOA – medialis preoptikus area

mTOR – mammalian target of rapamycin	PSD-95 – postsynaptic density protein - 95
NAs – nucleus accumbens shell régió	PTH2-R – 2-es típusú parathormon receptor
NPY – neuropeptid-Y	PVN – nucleus paraventricularis
Nurr1 – nuclear receptor related -1	Raf1 – rapidly accelerating fibrosarcoma kinase
OB – bulbus olfactorius (olfactory bulb)	RAS – Rat sarcoma
och – chiasma opticum (optic chiasm)	RIA – radioimmuno - assay
P/S – penicillin/streptomycin	RIPA - radio-immunoprecipitáció
PACAP – hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)	RP3V – 3. agykamra körüli periventricularis régió (periventricular region of the 3rd ventricle)
PAG – periakveduktális szürkeállomány (periaqueductal grey)	RT-PCR – reverz transzkriptáz – polimeráz láncreakció (reverse transcriptase polymerase chain reaction)
PB – foszfát puffer (phosphate buffer)	S6K1 – S6 kináz-1
PBS – foszfát puffer oldat (phosphate buffer solution)	sc. - subcutan
PCR – polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)	SDS – nátrium-dodecyl szulfát (sodium dodecyl sulphate)
PGE2 – prosztaglandin E2	SHBG – sexual hormone binding globulin
PHDA – periventricularis-hipofízeális dopaminerg	Shc – Src és kollagén homológ
PI3K – foszfatidil-inozitol 3 kináz	SN – supinate nursing
PIL – posterior intralaminaris komplexum	SON – nucleus supraopticus
PKA – protein kináz-A	SOS-1 – son of sevenless -1
PN – pronate nursing	SSC – saline sodium citrate
PNMT – feniletanolamin-N-metiltranszferáz	STAT – signal transducer and activator of transcription
POMC – proopiomelanokortin	Streptavidin-HRP – tormaperoxidáz (horseradish-peroxidase)
ppMCH – prepro melanin-concentrating hormone	SVZ – zona subventricularis
PRF – prolaktin releasing faktor	TH – tirozin-hidroxiláz
PRL - prolaktin	THDA – tuberohipofízeális dopaminerg
PRLR – prolaktin receptor	

TIDA – tuberoinfundibularis
dopaminerg

TIP39 – 39 aminosavas
tuberoinfundibularis peptid
(tuberoinfundibular peptide of 39
residues)

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

TNE – Trisma, NaCl, EDTA puffer

TRH – tireotropin releasing hormon

TRIS – tris(hidroximetil)aminometán

TSH – tiroidea-stimuláló hormon

VIP – vazoaktív intesztinális polipeptid

VMN – nucleus ventromedialis

VP – ventralis pallidum

VTA - ventralis tegmentalis area

1. BEVEZETÉS

Az anyaság jelentős szülés utáni viselkedésbeli, illetve élettani változásokkal jár és a megváltozott helyzethez a központi idegrendszernek is alkalmazkodnia kell. Ezt nevezzük a központi idegrendszer anyai adaptációjának, amely patkányban, mint modellállatban, kiválóan vizsgálható. Egy komplex neuronhálózat felelős ezért, melynek kulcseleme a hipotalamuszban található medialis preoptikus area és arcuatus mag. Előbbi az anyai viselkedésben, míg utóbbi a laktáció szabályozásában játszik központi szerepet. Hipotézisünk az volt, hogy az ezen agyterületeken utódgondozás során megváltozott expressziót mutató inzulinszerű növekedési faktor (IGF) rendszer – IGF-1 és annak legjelentősebb, 3-as típusú kötőfehérjéje (IGFBP-3) – szerepet játszik az anyai adaptáció szabályozásában.

1.1. Az anyai viselkedés idegrendszeri háttére patkányokban

Az utódgondozás fontos része a reprodukciónak, a zavartalan anyai viselkedés elsősorban az egészséges utódok felnevelése miatt fontos. Emellett humán klinikai vonatkozása is van, ugyanis az ebben az időszakban jelentkező, anyákat érintő kórképek gyakoriak és nagyon súlyosak is lehetnek. Az enyhe depresszióval és szorongással járó ún. posztpartum blues, vagy baby blues 3 naptól 6 hétig is tarthat, az anyák akár 80%-át is érintve. Ennél ritkább, de így is jelentős az anyák 10-15%-nál megjelenő posztpartum depresszió. A skála véglete az 1000-ból kb. egy anyánál megjelenő súlyos pszichózis (Pawluski és mtsai. 2017). Ilyenkor a nők nem csak magukban, hanem gyermekükben is kárt tehetnek. Ezen kórképek hatásos kezelése még nem ismert, többek között ezért is fontos az anyai magatartás szabályozásának és kialakulásának megértése, amiben a patkányok kiváló modellként szolgálnak.

A patkánykölykök éretlenül születnek, mozogni önállóan nem tudnak és a testhőmérsékletüket sem képesek szabályozni. Ezért az anya fészket épít, amelyben a kölykök tartózkodhatnak, és ott gondozza őket. Föléjük hajolva egy jellegzetes óvó-védő testtartást vesz fel, nyalogatja-tisztogatja az anogenitális régiójukat, amennyiben pedig a kölykök a fészektől távolabb kerülnek, visszahordja oda őket egyenként. Ezenkívül az anyák félelemérzete csökken, megnő folyadék- és táplálékfelvételük és agresszívvá válnak a betolakodókkal szemben. Ezzel ellentétben a szűz nőstények a

kölykökkel szemben elkerülő, sokszor agresszív, támadó viselkedést mutatnak. Tehát az apró, magatehetetlen, segítségre szoruló kölyök, mint inger két teljesen ellentétes reakciót képes kiváltani, attól függően, hogy anyaállatról, vagy terhességen még nem átesett szűz nőstényről van szó. Az anyai viselkedés idegrendszeri szabályozása ezért remek példája a szociális viselkedést irányító neuronális hálózatok plaszticitásának. Az idegrendszer alkalmazkodását eme megváltozott helyzethez nevezzük anyai adaptációnak.

A központi idegrendszer anyai adaptációjának kialakulásában a terhesség végével megjelenő hormonális változások játszanak kulcsszerepet. A patkány vemhessége során a progeszteron koncentrációja végig magas, az ösztrogéné alacsony, azonban szüléskor ez megfordul. A prolaktin szintje a vemhesség első felében még magas, napi rendszerességgel szekréciós csúcsok jelentkeznek, majd a vemhesség második felében minimális prolaktin koncentráció mellett a placentáris laktogének szintje emelkedik meg egészen a szülésig. Azonban az anyai viselkedés a szülés utáni (posztpartum) időszakban akkor is fennmarad, amikor ezek a hormonok már nem tudnak jelentős hatást kifejteni. A szüléskor még magas ösztradiol/progeszteron hányados már azelőtt lecsökken, amikor még az anyai motiváció igen magas szintű. Sőt, amikor az anyai viselkedés a legerőteljesebb, az ovariális eredetű szteroidok szintje kifejezetten alacsony (Bridges 2015). A patkányok esetében a posztpartum időszak 21 napos és két nagyobb szakaszra osztható. A korai és késői posztpartum időszak közti határ a 11. nap. Előbbiben a kölykök még kisebbek és tehetetlenebbek, ezért az anyai motiváció magas szintű, a laktáció és az általa okozott metabolikus terhelés az anya számára még kevésbé jelentős. A késői időszakban az anyai motiváció már csökken és a kölykök gondozása, táplálása, nagymértékű laktáció kerülnek előtérbe. Ebből kifolyólag az anyai motiváció és viselkedés a korai posztpartum időszakban, míg a laktáció és az általa okozott metabolikus-endokrin változások a későbbiben vizsgálhatóak jobban. A hormonok mellett a kölykök felől jövő szomatoszenzoros ingerek is nagyon fontos szerepet játszanak az anyai magatartás fenntartásában. Amennyiben szülés után közvetlenül elveszük az anyáktól a kölyköket (deprivált anyák), a 7. posztpartum napra jelentősen lecsökken az anyai viselkedés kölykök jelenlétében, a 10. napon pedig már a szűz nőstényekhez hasonló magatartást tapasztalhatunk, amellet hogy a laktáció is megszűnik (Orpen és Fleming 1987). A szűz nőstényekben is kialakulhat anyai viselkedés, amennyiben huzamosabb ideig kölykök közelében tartózkodnak, ezt nevezzük anyai szenzitizációnak. A nőstény eleinte elkerüli a kölyköket, 3-4 nap után

már elviseli a közelségüket és 7 nap után el is kezdi gondozni őket (Rosenblatt 1967). Tehát más tényezők felelősek az anyai magatartás vemhesség alatti indukciójáért, és mások annak a kölykök hatására bekövetkező fenntartásáért.

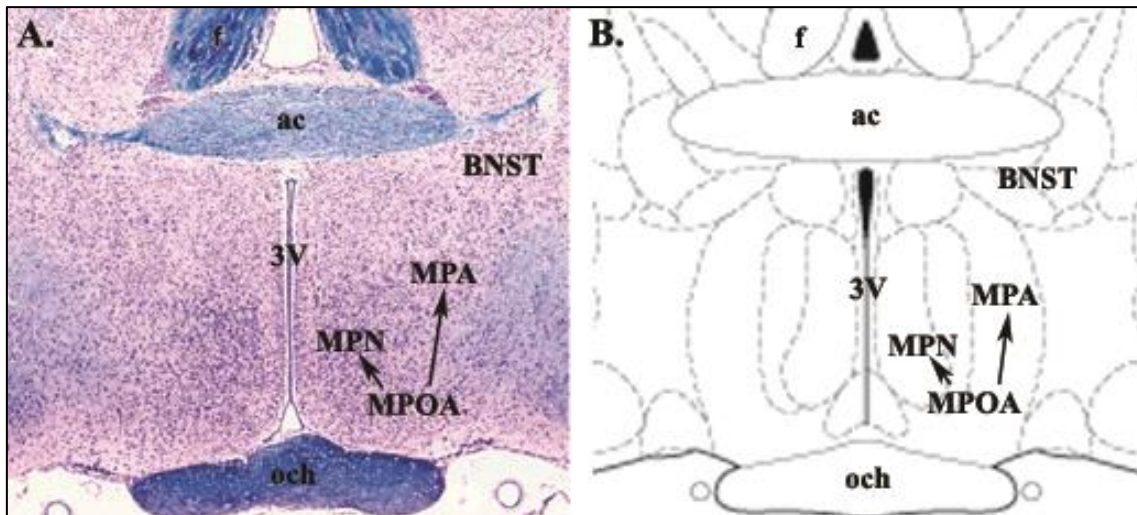
1.1.1. Hormonális változások szerepe az anyai viselkedés kialakításában

Az egyik legfontosabb hormonális változás a terhesség végén a progeszteron szint jelentős csökkenése és ezzel egyidejűleg az **ösztadiol** és laktogén (placentáris laktogének, illetve prolaktin) szintek emelkedése. Az ösztadiol nagyon fontos tényező az anyai viselkedés beindításában, a gesztáció 16. napján elvégzett hisztarektómia és ovariectomia (16HO) után beadott ösztadiol-benzoát 48 óra elteltével anyai viselkedést indukált, továbbá szűz nőstényeknek subcutan (s.c.) adagolva ugyanez a hatás következett be (Bridges 2015, Siegel és Rosenblatt 1975). Az ösztadiol hatását vélhetőleg az α -típusú ösztrogén receptoron (ER- α) fejt ki a központi idegrendszeri anyai adaptáció szempontjából lényeges területeken. A **progeszteron** szint, mint említettem jelentősen lecsökken a terhesség végén. Időzítő-előkészítő szerepe van, minél hosszabb ideig van magas szinten, annál érzékenyebb lesz az anya a kölykök felől jövő ingerekre, amikor hirtelen lecsökken ez a magas szint. Ugyanakkor az ösztadiol által elősegített anyai viselkedést képes gátolni a progeszteron (Numan 1978, Siegel és Rosenblatt 1975). A **prolaktin**, illetve vemhes anyákban a **placentáris laktogének** nem csak az anyai magatartást kialakulását segítik elő, hanem elengedhetetlenek hozzá. Prolaktint szekretáló agyalapi mirigy implantátumot helyezve a vese tokjába, hipofizektomizált, gonadektomizált, terhességnek megfelelő progeszteron-ösztadiol kezeléssel átesett szűz nőstényekben stimulálta az anyai viselkedést, amire hipofízis és prolaktin hiányában a szteroid kezelés nem volt képes (Bridges és mtsai. 1985). Hipofizektómia nélkül, a D2 receptor antagonistá bromokriptinnel gátolva a prolaktin szekréciót, az előbb említett modellben gátolni tudták az anyai viselkedést (Bridges és Ronsheim 1990). Szüléskor és azt követően jelentős változást mutat az **oxytocin** szint is. Vaginocervicalis stimuláció, illetve szoptatási inger hatására aktiválódnak a hipotalamusz paraventriculáris (PVN) és supraopticus (SON) magjának oxytocin neuronjai. A hipofízis hátsó lebenyéből a keringésbe jutó oxytocin segíti a méhizomzat és az emlőmirigy csatornáinak összehúzódását, azonban a vér-agy gáton való nehézkes átjutása miatt a központi idegrendszerre nincs hatással. A paraventriculáris mag sejtjei azonban számos agyterületre küldenek oxytocin rostokat, így neurotranszmitterként érdemes foglalkoznunk most az oxytocinnal. Az oxytocin fontos szerepére mutat rá az,

hogy anyáknak közvetlenül szülés után icv. beadott oxytocin receptor antagonisták megakadályozza (van Leengoed és mtsai. 1987), míg ovarektomizált szűz nőstényeknek centrálisan adagolt oxytocin elősegíti az anyai viselkedés kialakulását. Az antagonisták hatásában 5 nappal a szülés után már nem működik, ezzel is igazolva, hogy az oxytocinnak az anyai viselkedés indukciójában fontos szerepe van (Fahrbach és mtsai. 1985, Pedersen és mtsai. 1982).

1.1.2. Az anyai viselkedés központi idegrendszeri centruma, a medialis preoptikus area (MPOA)

Az eddig említett hormonoknak – laktogének, ösztadiol, oxytocin – a terhesség végén / szüléskor van szerepük az anyai adaptáció megindításában, később annak fenntartásában a kölykök felől jövő szenzoros ingerek, elsősorban szomatoszenzoros bemenetek játszanak főszerepet. Azaz a hormonális hatások aktiválnak egy olyan agyi hálózatot, amely a kölykök felől jövő ingerekre immáron nem averzív reakcióval, hanem gondoskodással válaszol. Ennek a hálózatnak a központi eleme a hipotalamusz medialis preoptikus areája (MPOA), amely a hipotalamusz rostrális régiójának medialis részén található, a harmadik agykamrától a periventrikuláris preoptikus terület választja el. Két fő része különíthető el, a ventromedialisabb elhelyezkedésű nucleus preopticus medialisra (MPN) és a dorsolateralis area preopticus medialisra (MPA). Az MPN-en belül további három szubdivízió, centralis, lateralis és medialis különíthető el. Funkcionális szempontból még az MPOA-hoz köthető a tőle dorsolateralisan elhelyezkedő nucleus interstitialis striae terminalis (BNST), ami szintén szerepet játszik az anyai viselkedés szabályozásában (1. ábra).



1. ábra: A medialis preoptikus terület neuroanatómiája patkányban

Luxol Fast Blue festéssel (A) kék színnel láthatók a myelinizált rostok, míg krezilbolyával a sejtek. A rostralis hipotalamusz medialis preoptikus areája (MPOA) két főbb részre osztható, a ventromedialis nucleus preopticus medialisra (MPN) és a dorsolateralis medialis preoptikus areára (MPA). Az MPOA-hoz funkcionálisan kapcsolódik a nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) (Dobolyi 2009). 3V – 3. agykamra, ac – commissura anterior, och – chiasma opticum

Ezeken a területeken a neuronok jelentős része aktiválódik anyákban a c-Fos expresszió mintázatának 3 dimenziós vizsgálata alapján (Renier és mtsai. 2016). Az MPOA elektromos vagy az axonokat érintetlenül hagyó nagyobb területű excitotoxikus laesiója megszünteti az anyai viselkedést (Numan és mtsai. 1988), dorsalis részének, az MPA-nak kisebb kiterjedésű kétoldali károsodása pedig a fészeképítést és a kölykök visszahordását zavarta meg (Jacobson és mtsai. 1980). Az MPOA kulcsszerepét igazolja, hogy az itt található galanin sejtek genetikai ablációja megszüntette az anyai viselkedést, a kölykök visszahordását a fészekbe és agresszív reakciót váltott ki anyákból kölykök jelenlétében, valamint optogenetikus aktivációja hímeiben megszüntette az agressziót és kölykökkel szembeni gondoskodó viselkedést vont maga után (Wu és mtsai. 2014). Az MPN medialis szubdivíziójában írtak le kizárólag a posztpartum időszakban ppMCH-t (prepro-melanin-koncentráló hormon) expresszáló sejteket, amelyek MCH (melanin-koncentráló hormon) immunreaktivitást is mutatnak (Knollema és mtsai. 1992). A ppMCH mRNS és MCH mennyisége fokozatosan növekszik a laktáció előrehaladtával, maximumát a szülés utáni 19. napon éri el. A medialis MPN MCH sejtjei az anteroventralis periventricularis, periventricularis

magokba és a ventromedialis hipotalamusz ventrolateralis szubdivíziójába projiciálnak és reprodukív funkciókat, illetve az anyai motivációt képesek befolyásolni (Rondini és mtsai. 2010). Mivel az MCH szintje a kölykök elválasztásához közeledve növekszik meg jelentősen, ezért valószínű, hogy az anyai motiváció csökkenésében játszik szerepet a késői posztpartum időszakban. Ezt támasztja alá, hogy beadása az MPOA-ba megnöveli a kölykök fészekbe visszahordásához szükséges időt, illetve a fészeképítést is megzavarja (Benedetto és mtsai. 2014).

Az anyai viselkedésre tekinthetünk úgy, mint egy motiváló tényező által kiváltott cselekvésre, melynek célja a jutalom – esetünkben a kölyök - elérése, ezért is beszélhetünk anyai motivációról. Az anyai viselkedésnek ez alapján van egy célorientált, motiváló tényező megszerzésére irányuló része, ez a kölykök megkeresése és visszahordása a fészekbe, illetve egy élvezeti / fogyasztási része, melynek során a testközelben lévő kölykök felől jövő ingerekre folyamatosan és reflexből gondoskodással válaszol az anya. Tehát míg a visszahordás egy célorientált viselkedés, a kölykök nyalogatása, véde-óvása fogyasztói viselkedésnek tekinthető (Numan 2015). A célorientált rész vizsgálható a kondicionált helypreferencia teszttel, melynek során két – az állat számára is megkülönböztethető – egymás közt átjárható doboz egyikében kölykökkel tartózkodik az anya több napon keresztül, majd a tesztfázis során a két most már üres doboz közül inkább azt választja, amelyben a kölykökkel tartózkodott. Az MPOA mindkét aspektusban kulcsszerepet játszik, ugyanis gátlása megszünteti a visszahordást, és a kondicionált helypreferenciát (Mattson és Morrell 2005, Pereira és Morrell 2010), illetve a gondoskodó viselkedést is.

Az MPOA az a valószínűleg legfontosabb idegrendszeri központ, ahol a már említett hormonok képesek kifejteni anyai viselkedést elősegítő hatásukat. Amennyiben az MPOA-ba adtak be centrálisan ösztradiolt, azonnal megjelent az anyai viselkedés. Ezzel szemben más hipotalamikus területekre injektálva 2-3 nap késést figyeltek meg (Numan és mtsai. 1977). Az ösztradiol az anyai magatartás kialakulásának szempontjából fontos gének transzkripcióját segíti elő: az oxytocin receptor expresszióját növeli, érzékenyvé téve ezáltal az MPOA-t az oxytocin hatásra (Champagne és mtsai. 2001, Young és mtsai. 1998), ezenkívül a Fos expressziót is fokozza. A prolaktin anyai viselkedésre kifejtett hatásának támadáspontja is az MPOA, mint azt prolaktin lokális beadásával kimutatták (Bridges és mtsai. 1990). Szintén megmutatták, hogy prolaktin receptorok találhatóak az MPOA-ban és expressziójuk megnő a laktáció alatt (Dobolyi és mtsai. 2014), továbbá prolaktin injektálása fokozza

az intracelluláris jelátvitelle szempontjából fontos STAT5 foszforilációját is az MPOA neuronjainak nagy részében (Brown és mtsai. 2011, Brown és mtsai. 2010). Prolaktin receptor antagonistájának kétoldali beadása az MPOA-ba pedig késlelteti az anyai viselkedés megjelenését szűz nőstényekben mintegy 2 nappal (Bridges és mtsai. 2001). A prolaktin rendkívül fontos szerepére mutat rá azon újabb vizsgálat is, melyben a prolaktin receptorok szelektív, akut kiütése problémamentes terhesség és szülés után a kölykök teljes negligálását okozta, olyan mértékben, hogy a kölykök el is pusztultak (Brown és mtsai. 2017). A szoptatás is elősegíti az anyai motivációt. A tejkilövellési reflex és a szoptatás indukálta prolaktin szekréció pályájának egy fontos pontja található a talamusz posterior intralaminaris komplexumában (PIL), ahová a perifériáról, a kölykök felől jövő ingerek érkeznak. Ezen a területen található egy sejtszórt, amely 39 aminosavból álló tuberoinfundibularis peptidet (TIP39) expresszál. Ezek a neuronok nem csak az arcuatus magba vetülnek, hogy a szoptatás indukálta prolaktin szekrécióban részt vállaljanak, hanem az MPOA-ba is, ezáltal kapcsolatot teremtve a szoptatás és az anyai viselkedés között. Receptorának, a parathormon 2-es receptornak (PTH2-R) az antagonistája a preoptikus területre beadva negatívan befolyásolja a kondicionált helypreferenciát anélkül, hogy a prolaktin szintet befolyásolná, amelynek szoptatás indukálta emelkedése elmarad, ha az antagonistát az arcuatus magba injektálják (Cservenak és mtsai. 2010, Cservenak és mtsai. 2013, Palkovits és mtsai. 2010). A szoptatási inger más úton is befolyásolhatja az MPOA működését: a paraventriculáris mag (PVN) magnocelluláris szubdivíziójának arginin-vasopresszin (AVP) sejteinek génexpressziós aktivitása szoptatáskor megemelkedik és az MPOA-ban AVP szabadul fel az anyai viselkedéshez köthetően, valamint a V1a típusú AVP receptor expressziója is növekszik az MPOA-ban. A V1a receptor blokkolása pedig az anyai agressziót csökkenti (Bosch és mtsai. 2010). Tehát a hormonális hatásoknak – ösztadiol, prolaktin, oxytocin, TIP39 -, amelyek az anyai adaptációt elősegítik, mind az MPOA-ban van a fő támadáspontja.

A neuroendokrin hatások mellett a kölykök felől jövő szomatoszenzoros ingerek is aktiváló hatással vannak a MPOA neuronjaira. A speciális ultrahullámhosszú tartományba eső akusztikus hallási ingerek és a szaglási ingerek is serkentő bemenetét képezik a preoptikus területnek (Hashimoto és mtsai. 2001, Okabe és mtsai. 2013). Az MPOA-ban, anyákban számos gén expressziója megváltozik. A már említett Fos, prolaktin receptor mellett az MCH, 4-es típusú dopamin receptor (Drd4), dopamin transzporter (Dat), μ -1-es típusú opioid receptor, 2A típusú szerotonin receptor, amylin,

illetve a jelen disszertáció fő témáját jelentő IGFBP-3 (inzulinszerű növekedési faktor 3-as típusú kötőfehérjéje) expressziója is jelentősen megváltozik (Akbari és mtsai. 2013, Dobolyi 2009, Driessen és mtsai. 2014). A kölykökkel való kontaktus és folyamatos ingerek, illetve a hormonális hatások tehát képesek megváltoztatni egyes gének expresszióját. Ezen epigenetikus hatásokat különböző enzimek közvetítik a genom felé. A hiszton-acetilázok acetyl csoportok hozzáadásával semlegesítik a pozitív töltésű hisztonfehérjéket, és ezáltal gyengítik kötődésüket a negatív töltésű DNS-hez. Így a kromatin fellazul és a transzkripciós faktorok könnyebben hozzáférnek. Ezzel ellentétesen hatnak a hiszton deacetyl-transzferázok és a DNS-metiltranszferázok, amik a citozinhoz kapcsolnak metilcsoportot. A kromatin újrendeződése tehát a már korábban említett génextpressziós változásokhoz vezet. A MPOA neuronjaihoz érkező hormonális és neuronális ingerek a kölykökkel való kontaktus következtében gyakrabban ismétlődnek és sejten belüli jelátviteli utakat aktiválnak, melyeknek végállomása olyan hiszton-acetilázok aktiválása, mint a Creb-binding-protein (Crebbp). Így képesek a szomatoszenzoros ingerek és a hormonális változások sejtszinten egy komplex magatartásformát aktiválni és fenntartani (Dobolyi és mtsai. 2014).

1.1.3. Az anyai viselkedést szabályozó egyéb neuronális hálózatok és működésük

1.1.3.1. A defenzív kör működése szűz nőstényekben

Ahogy korábban említettem, a szűz nőstényekre patkányokban a kölykök elkerülése, elutasítása jellemző. Ezt az averziót egy összetett neuronhálózat működése okozza, amelyet nevezhetünk defenzív körnek is. Ezt a kört a kölykök felől jövő szag-ingerek képesek aktiválni. Ezt támasztja alá, hogy olyan szűz nőstényekben, amelyeknek szaglását kiiktatták, a szenzitizációhoz szükséges idő 7 napról 2 napra csökkent. Szülés után ellenben a kölykök felől jövő szagok már pozitív reakciót váltanak ki, nem pedig elkerülést. Ezek a szaginformációk a fő- és járulékos szaglógumókból serkentő rostokon a medialis amygdalába (MeA) jutnak. A MeA több hipotalamikus magba is projiciál: ventralis divíziója az MPOA-ba, illetve az anterior és ventromedialis hipotalamikus magokba (AHN, VMN). Szűz nőstényekben a MeA-ból eredő rostok az ipsilaterális AHN-t és VMN-t aktiválják, ezeken a területeken meg is nő a Fos expresszió kölykök jelenlétében (Sheehan és mtsai. 2001). Az AHN-ből és VMN-ből a középgyagban található periaqueductális szürkeállományba (PAG) továbbítódik az információ, ez a terület lesz felelős az elkerülő-ellenséges válaszáért a kölykökkel

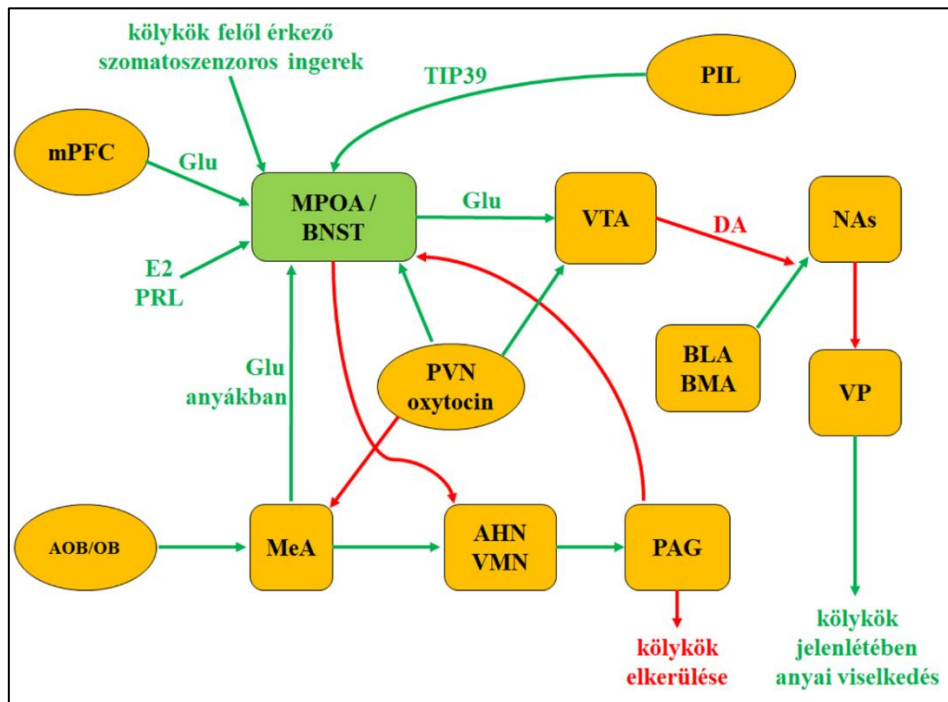
szemben, melyet az innen eredő leszálló rostok indítanak be, illetve az innen felszálló rostok az MPOA-ba jutva gátolják annak működését (Rizvi és mtsai. 1992). (2. ábra)

1.1.3.2. A defenzív kör gátlása anyákban

Szülés után a defenzív kör gátlás alá kerül és a kölykök felől jövő ingerek egy anyai viselkedést kiváltó neuronális hálózaton keresztül kerülnek feldolgozásra, amelyet az egyszerűség kedvéért nevezzünk anyai körnek. A terhesség végén, szüléskor jelentkező hormonális változások átalakítják az MPOA működését, amely terület neuronális efferenseinek egyik célja a defenzív kör gátlása. Ezt támasztja alá, hogy a dorsalis MPOA anyákban aktiválódó idegsejtjei közt szép számmal találhatóak GABAerg, gátló sejtek (Lonstein és De Vries 2000), illetve az MPOA dorsolaterális része projiciál a PAG-ba (Rizvi és mtsai. 1992). Azonban nem csak az MPOA képes gátolni a defenzív kört: a PVN oxytocinerg sejtjei sokfelé vetülnek az agyban, köztük az amygdalába is, amely fontos pontja a defenzív körnek (Numan 2015). (2. ábra)

1.1.3.3. Az anyai kör célorientált viselkedésekért felelős része – az MPOA és a mezolimbikus dopaminerg rendszer kapcsolata

Az MPOA több irányból is kap az anyai viselkedés szempontjából fontos aktiváló bemenetet. A PVN-ből oxytocinerg és a MeA-ból glutamáterg rostok, a PIL-ből származó TIP39 axonok és a medialis prefrontalis cortexből (mPFC, patkányban infralimbikus kéreg) jövő glutamáterg afferensek mind az anyai kör aktivációját segítik elő. Az MPOA anyákban aktiválódó sejtjei glutamáterg rostokat küldenek a ventralis tegmentalis area (VTA) dopaminerg sejtjeihez (Geisler és mtsai. 2007, Numan és Numan 1997), amelyeket a PVN-ből jövő oxytocinerg bemenetekkel szinkronban serkentenek (Shahrokh és mtsai. 2010). Ez a serkentés pedig egy nagyobb mértékű dopamin felszabaduláshoz vezet a nucleus accumbens shell régiójában (NAs) (Champagne és mtsai. 2004). Az itteni dopaminerg végződések axo-axonikus szinapszisokban gátolják D1 receptorokon keresztül a basomedialis és basolaterális amygdalából érkező, NAs GABAerg sejtjeit aktiváló glutamáterg rostokat, ezáltal a NAs ventralis pallidumra (VP) kifejtett gátló hatása megszűnik és a VP anyai viselkedésért felelős kimeneti neuronjainak működése felszabadul a gátlás alól (Numan és mtsai. 2005, Numan és mtsai. 2005). Ennek a hálózatnak van kulcsszerepe az anyai viselkedés fenntartásában és anyai memória kialakulásában is (Numan 2015). (2. ábra)



2. ábra: az anyai viselkedést szabályozó neuronhálózatok

Zöld vonalak – serkentés, piros vonalak - gátlás

Szűz nőstényekben a kölyök felől jövő szaginformációk a fő- és járulékos szaglógumókból (OB és AOB) serkentő rostokon a medialis amygdalába (MeA) jutnak, ami az anterior és ventromedialis hipotalamikus magokba (AHN, VMN) projiciál. Az AHN-ből és VMN-ből a közepagyban található periakveduktális szürkeállományba (PAG) továbbítódik az információ, ez a terület gátolja a medialis preoptikus area (MPOA) és nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) működését és felelős az elkerülő–ellenséges válaszáért a kölyökkel szemben.

Anyákban MeA aktiválni tudja az MPOA-t, így a szagingerek anyai viselkedést váltanak ki. A kölyök felől érkező szomatoszenzoros ingerek, a hormonális hatások (oxytocin, prolaktin - PRL, ösztadiol – E2), a talamusz posterior intralaminaris komplexumából (PIL) származó TIP39 és a mediális prefrontális kéregből (mPFC) jövő glutamáterg afferensek is aktiválják az MPOA / BNST-t. Innen induló glutamáterg efferensek a PVN oxytocinerg rostjaival együtt aktiválják a ventralis tegmentalis area dopaminerg sejtjeit, amelyek a nucleus accumbens shell (NAs) régiójában gátolják a basolateralis és basomedialis amygdalából (BLA, BMA) érkező aktiváló afferenseket. Ezáltal a ventralis pallidum (VP) felszabadul a gátlás alól és megjelenhet a kölyök jelenlétében az anyai viselkedés. Mindemellett az MPOA / BNST gátolja az AHN-t és VMN-t, azaz az elkerülő viselkedéshez vezető neuronhálózatot.

1.1.3.4. A kyphosis, mint egy speciális anyai viselkedés szabályozása - az MPOA és PAG kapcsolata

Kimutatták, hogy a PAG ventrolateralis része felelős a patkány anyák jellegzetes, kyphosisnak nevezett gondozó tartásáért, melyben domború háttal és nyújtott végtagokkal hajolnak kölykeik fölé. A kyphosis eredetileg a gerinc anatómiai domborulatát jelenti, melynek ellentéte a lordosis, azaz a homorulat. A patkányok a gondozó testtartás felvételekor domborítják gerincüket, ezért is nevezzük ezt kyphosisnak. Ez az anyai magatartás korábban már említett fogyasztói / élvezeti aspektusának legjellemzőbb viselkedésformája. Amennyiben egy laesio a ventrolateralis PAG-ot érinti, a kyphosis megszűnik, viszont a célorientált anyai magatartásformák, mint például a kölykök visszahordása a fészekbe, megmaradnak (Lonstein és Stern 1997). Az MPOA neuronjainak egy része gátolni képes a VTA-t (Tobiansky és mtsai. 2013), így elképzelhető, hogy az MPOA egyik sejtpopulációja aktiválja a ventrolateralis PAG-ot és gátolja a VTA-t, ezáltal csökkentve a célorientált anyai magatartást és serkentve a fogyasztóit, egy másik pedig pont az ellenkezőjét teszi.

1.2. A prolaktin szabályozása és funkciói

A szülés után nem csak az anyai viselkedés jelenik meg, hanem a szoptatás is megkezdődik. A laktáció és az ehhez szükséges nagyobb mértékű prolaktin szekréció az egyik legfontosabb posztpartum élettani változás, amihez szükség van a központi idegrendszer anyai adaptációjára. A prolaktin hat az anya központi idegrendszerére és egész szervezetére, elősegítve a megváltozott állapothoz való alkalmazkodást.

1.2.1. A prolaktin jellemzése

A prolaktin egy polipeptid hormon, amelyet elsősorban az elülső hipofízis lebeny laktotróf sejtjei szekretálnak. A patkányban 197, az emberben 199 aminosavból álló lánc alkotja a prolaktinmolekulát, amelyen belül három, ciszteinek között fennálló diszulfidhíd is van. Az aminosavlánc 50%-a α -hélixbe rendeződik, a többi része pedig hurkokat alkot. Az elülső hipofízis lebeny sejtjeinek 20-50%-át teszik a laktotróf sejtek, arányuk természetesen függ az egyed szexuális-élettani állapotától. Patkányban ezek a sejtek lateroventralisan helyezkednek el, mintegy a középső lebenyhez kapcsolódó gyűrűt formálva. Nem csak a laktotróf sejtek képesek azonban prolaktint szekretálni, hanem a mammoszomatotróf sejtek is, amelyek egy átmeneti populáció, ugyanis növekedési hormont is termelnek és ösztrogén hatására laktotróffokká differenciálódnak (Freeman és mtsai. 2000). Prolaktin az agyban több helyen is termelődik, expressziója kolokalizációt mutat a β -típusú ösztrogén receptorral és így befolyásolható a gonadaliszteroidok által, ovariectomia csökkenti, míg ösztrogénkezelés növeli mennyiségét (DeVito és mtsai. 1992, DeVito és mtsai. 1991). A hipotalamuszban több területen is leírtak prolaktint: paraventriculáris, periventriculáris, arcuatus, supraopticus magokban, illetve az MPOA-ban (Grattan és Kokay 2008). A placenta a prolaktinhoz hasonló placentáris laktogént termel, míg a decidua a terhesség korai fázisában egy J-típusú prolaktinszerű proteint és mindkettő képes kötődni a prolaktin receptorához, így azzal hasonló hatásokat kifejteni. A decidua mellett, terhességen kívül a patkányok myometriumban is képződik prolaktin, érdekesség, hogy amíg előbbi esetben a progeszteron serkentő, itt gátló hatást fejt ki a prolaktin termelésére. Szoptató patkány anyák emlőjének epitheliumsejtjeiben is szintetizálódik prolaktin, ez a tejbe kerülve elsősorban a kölykök neuroendokrin- és immunrendszerének fejlődését segíti. Ezenkívül a limfocitákban is írtak le prolaktin expressziót, azonban ennek élettani jelentősége egyelőre nem ismert (Freeman és mtsai. 2000).

1.2.2. A prolaktin hatásai

A prolaktin receptor (PRLR) egy transzmembrán receptor, amely extracelluláris, intracelluláris és transzmembrán domainnel rendelkezik. A prolaktin PRLR dimerhez kötődése indítja be különböző, az intracelluláris domainhez kötődő tirozin-kinázok foszforilációját. Az így aktivált Janus-asszociált kináz 2 (Jak2) foszforilálja a receptorhoz vonzott STAT-ot, amely dimert képezve a sejtmagba transzlokálódik, hogy ott befolyásolja a transzkripciót. A prolaktin hatásait sejten belül leginkább a STAT5a és 5b közvetítik (Trott és mtsai. 2012). A PRLR nagyon sokféle szövetben és sejten expresszálódik: csontban, zsírszövetben, emésztőcsatornában, nemi szervekben, bőrben, immunrendszerben, a hipofízisben és az agyban. A központi idegrendszerbe a keringésben jelen lévő prolaktin többféleképpen is bejuthat. A mediobasalis hipotalamuszba, ahol elsősorban a hipotalamusz-prolaktin tengely feedback szabályozásában van szerepe, a vér-agy gát hiányossága révén tud eljutni. Más agyi régiók eléréséhez viszont először át kell jutnia a vér-liquor gáton. A plexus choroideus epithelsejtjei expresszálják PRLR-t, így egy még pontosabban nem ismert mechanizmus segítségével a prolaktin a vérből rajtuk keresztül a liquorba juthat. A PRLR expressziója a plexus choroideusban folyamatosan emelkedik a terhesség, majd a laktáció során és a kölykök elválasztása után egy héttel a megtermékenyítés előtti szintre esik vissza (Augustine és mtsai. 2003). A prolaktin rendkívül sokrétű hatásainak van egy közös funkciója, segíteni az anya egész szervezetének alkalmazkodni az anyasághoz, egyszóval a prolaktin a szervezet anyai adaptációját segíti elő (Grattan 2015). Az anyai viselkedésben játszott szerepéről már korábban írtam, így most ezen kívüli fontos hatásaival foglalkozom a következőkben.

1.2.2.1. Prolaktin szerepe az emlőmirigyben

A hormon nevét onnan kapta, hogy a laktációt segíti elő, így kézenfekvő, hogy legfontosabb az emlőt érintő hatása: az emlőmirigy fejlődésében, a lactogenesisben és a galactopoiesisben játszik fontos szerepet. Elengedhetetlen az emlőmirigy lobulusainak és alveolusainak fejlődésében a terhesség idején. A szérumban alap prolaktin szintje emelkedik a terhesség késői fázisában, csúcsát a szülés környékén éri el, majd fokozatosan csökken a posztpartum időszakban. Az emlő epitheliumsejtjeinek differenciálódását segíti elő a prolaktin, így ezek a sejtek képesek lesznek a

lactogenesisre, szerkezetük megváltozik, polarizálódnak és tejben lévő fehérjéket kezdenek termelni (Trott és mtsai. 2012). Amennyiben szülés előtt bromokriptinnel gátolták a prolaktin szekréciót teheneekben, a szülés körüli prolaktin csúcs elmaradt, ugyanígy a szülés utáni első 10 napban a szoptatás indukálta prolaktin szekréció is, valamint a tejhozam is 45%-al csökkent (Akers és mtsai. 1981). Szülés után a galactopoiesisben, azaz a szoptatás által elősegített, korábban megalapozott, tejlérválasztás és tejhozam fenntartásában van szerepe a prolaktinnak.

1.2.2.2. A prolaktin metabolikus hatásai

A prolaktin terhesség során, illetve a posztpartum időszakban is szerepet játszik a glukóz homeosztázisban, illetve a testsúly- és táplálkozás szabályozásában. Fokozza az inzulin és a 2-es típusú glukóz transzporter (GLUT2) expresszióját a Langerhans-szigetek β -sejtjeiben, ezáltal elősegíti a glukóz indukálta inzulin szekréciót. Amennyiben a terhesség során ez az adaptáció elmarad, az gesztációs diabetes kialakulásához vezethet (Grattan 2015). A terhességhez, majd a szoptatáshoz is jelentős táplálékfelvétel-növekedés, hiperfágia társul, ennek létrejöttében szintén fontos a prolaktin hatása. Ezen időszakokban a neuropeptid Y (NPY) expressziója fokozódik, míg a pro-opiomelanocortin (POMC) és a leptin receptoré csökken az arcuatus magban (Ladyman és mtsai. 2010). A prolaktin orexigén hatását a PVN-en keresztül fejtheti ki, ugyanis erre a területre beadva jelentősen fokozza a táplálékfelvételt (Sauve és Woodside 2000).

1.2.2.3. Prolaktin hatása a fertilitásra

A hyperprolactinaemia mind nőkben, mind férfiakban lehetséges oka az infertilitásnak. Emberben és patkányban, ebben az esetben az LH pulzusok amplitudója és frekvenciája is lecsökken. A rostralis periventrikuláris területen (RP3V) található kisspeptin neuronok felelősek a pulzatis GnrH szekréció szabályozásáért, amely az említett LH pulzusokat indukálja. PRLR-t kimutattak a kisspeptin sejteken, sőt azt is, hogy a prolaktin csökkentette a Kiss1 gén expresszióját (Grattan 2015).

1.2.2.4. Prolaktin szerepe az anyai neurogenesisben

Felnőtt agyban néhány helyen lehetséges csak neurogenesis, ezek közül az egyik a szubventrikuláris zóna (SVZ), amely az oldalkamra mellett helyezkedik el. Az SVZ-

ben képződött új sejtek a rostralis migrációs útvonalon keresztül érik el a bulbus olfactoriust. Ennek patkányokban kitüntetett szerepe van, mivel a szaglás nagyon fontos a tájékozódásban és az anyai gondozó magatartásban is. Az SVZ-ben nem expresszálódik PRLR, viszont a terhesség kezdetén, napi kétszer jelentkező szérumszintű prolaktin csúcsok gátlásával a terhesség során bekövetkező itteni neurogenesis gátolódik. A prolaktin tehát valamilyen indirekt mechanizmussal hat. A prolaktin indukálta terhességi neurogenesis elmaradása pedig a szülés utáni időszakban megnövekedett szorongással és az anyai viselkedés zavarával jár (Larsen és Grattan 2012).

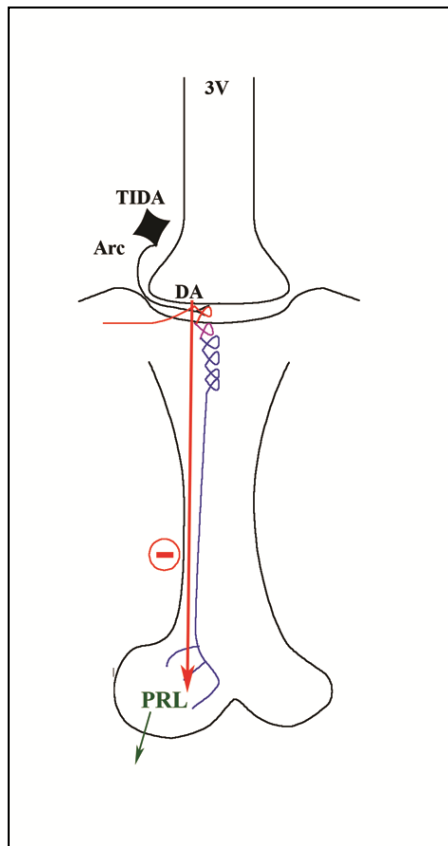
1.2.2.5. Prolaktin hatása a stresszválaszra

A szülés körüli és utáni időszakban érzelmi, valamint fizikai stresszorokra a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely által adott hormonális válasz és a szimpatikus idegrendszer aktivációja nagymértékben lecsökken, egyfajta szorongásmentes általános nyugalom jellemző a szervezetre. Prolaktin mind akut, mind krónikus icv. beadása szűz nőstényekben csökkentette a stressz indukálta ACTH és kortikoszteron szekréciót, illetve a restraint stresszre adott választ. Ezt a centrális amygdala aktivációjának és a PVN CRH expressziójának csökkentésével érte el (Donner és mtsai. 2007). Ezzel szemben a PRLR down regulációja a HPA tengely stresszválaszának gátlás alóli felszabadulását okozta szoptató anyákban (Torner és mtsai. 2001).

1.2.3. A prolaktin szekréciója

A prolaktin szekréciójának szabályozása több szempontból is eltér a többi adenohipofízisből felszabaduló hormonétól. Egyrészt elsősorban gátló hatás alatt áll, nem ismert klasszikus serkentő, hipotalamikusan eredetű hormon, azaz valamilyen prolaktin releasing faktor (PRF), úgy mint a gonadotropin hormonok esetében a GnRH, a növekedési hormonnál a GHRH, vagy a TSH esetén a TRH. Az agyalapi mirigy laktotróf sejtjei egy folyamatos, tónusos gátlás alatt állnak, ennek hiányában jóval magasabb lenne a prolaktin szekréció mértéke. Tehát a prolaktin koncentrációját a vérben leginkább ennek a gátló hatásnak a kiiktatásával, vagy fokozásával lehet szabályozni. Az is különbség a többi hipofízeális hormonhoz képest, hogy a prolaktin hipotalamikusan eredetű szabályozó faktora a dopamin, azaz egy katekolamin neurotranszmitter, nem valamilyen peptid jellegű hipotalamikusan eredetű hormon. Végül pedig

mivel a prolaktin célszerve nem egy endokrin szerv, ezért a klasszikus hormon mediálta feedback kör sem úgy működik, mint más elülső hipofízis által szekretált hormonok esetében. Itt egyetlen, rövidre zárt visszacsatolás ismert: a szekretált prolaktin maga hat a hipotalamuszra, szabályozva ezzel saját felszabadulását a laktotróf sejtekből (Grattan és Kokay 2008). (3. ábra)



3. ábra: a prolaktin (PRL) szekréció szabályozása

A prolaktin termeléséért és szekréciójáért a hipofízis laktotróf sejtei felelősek. Ezek a sejtek folyamatos gátlás alatt állnak az arcuatus mag (Arc) tuberoinfundibularis dopaminerg (TIDA) neuronjai által a portális keringésbe szekretált dopamin (DA) révén. Magasabb prolaktin szekréció a gátlás alóli felszabadulás által érhető el. A TIDA neuronok a 3. agykamra (3V) két oldalán a nucleus arcuatus dorsomedialis részén találhatók.

1.2.3.1. A hipotalamo-hipofizeális dopaminerg rendszer

A hipotalamuszban több dopaminerg sejtcsoport is található. Az A11-es a posterior hipotalamuszban, A12-es az arcuatus magban, A13 a zona incertában, A14 a periventrikuláris magban és A15 a laterális és ventralis hipotalamuszban. Ezek közül az

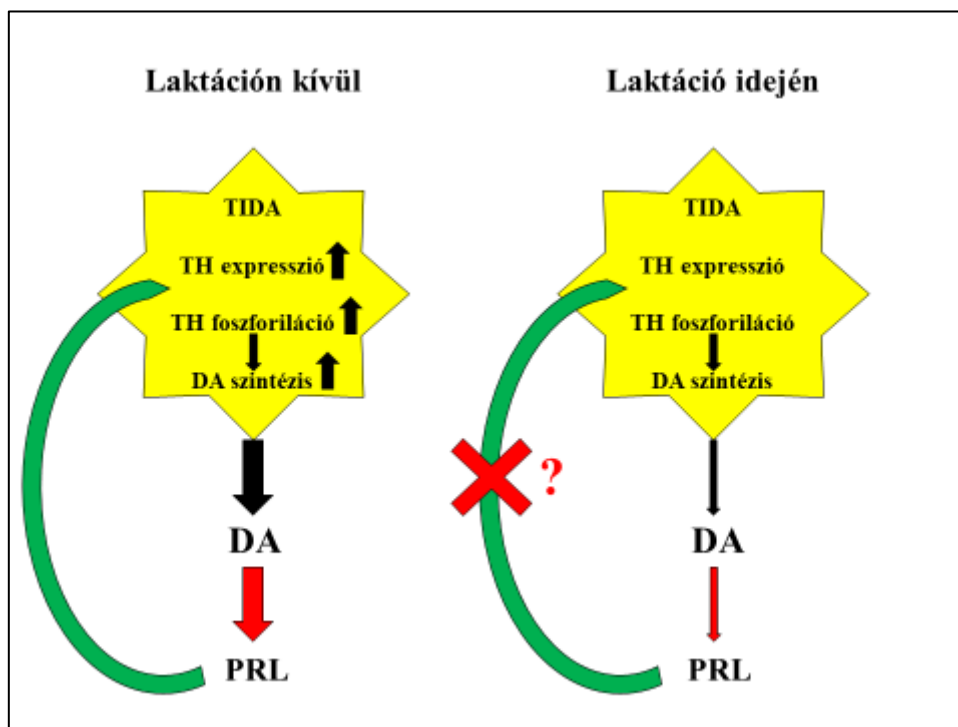
A12 és A14 vesz részt a prolaktin szekréció szabályozásában. Köztük további három csoportot különböztethetünk meg: a tuberoinfundibularis dopaminerg neuronokat (TIDA), a tuberohipofizeális dopaminerg neuronokat (THDA) és a periventriculáris hipofizeális dopaminerg neuronokat (PHDA). A TIDA neuronok sejtteste a nucleus arcuatus dorsomedialis szubdivíziójában helyezkednek el és axonjaik az eminentia mediana külső zónájában végződnek, hogy ott ürítsék neuroszekréciójukat, a dopamint az arteria hypophysealis superior kapillárisainak perivaszkuláris terébe. A dopamint ezután a hosszú portális erek szállítják az adenohipofízisbe, ahol a laktotróf sejtek prolaktin szekrécióját gátolják. A THDA sejtek a rostralis arcuatus magban elhelyezkedve küldik axonjaikat az agyalapi mirigy hátsó lebenyébe és pars intermediájába, a PHDA sejtek axonjai pedig kizárólag az utóbbi területen végződnek. A neurohipofízisbe szekretált dopamint az arteria hypophysealis inferior ágai, a kis portális erek szállítják az adenohipofízisbe, tehát szerepük ugyanaz, mint a TIDA sejteknek, viszont jelentőségük a prolaktin szekréció szabályozásában elenyésző. Azt nem tudjuk, hogy az avaszkuláris pars intermediában található idegvégződésekkel felszabaduló dopamin hogyan befolyásolja a prolaktin felszabadulást (Ben-Jonathan és Hnasko 2001). A TIDA neuronok elektrofiziológiai vizsgálata során jelentős oszcilláció figyelhető meg, hiperpolarizált („down”) és depolarizált („up”) állapotok váltják egymást, egy ilyen down-up ciklus 20 másodpercig tart. A depolarizált fázisban 4 Hz-es spontán tüzelési frekvencia figyelhető meg. Mindemellett a TIDA sejtek egymás közötti gap junction-ök segítségével szinkronizálhatják működésüket. Ennek a fázisos aktivációnak szerepe az lehet, hogy az egymást követő depolarizált állapotok során megnövekszik a Ca^{2+} koncentráció az eminentia medianában lévő axonterminálisokban és a dopamintartalmú vezikulák kiürítése erőteljesebb mértékben történhet meg egy-egy újabb depolarizáció alkalmával. Ezáltal maximalizálható a portális keringésbe juttatott dopamin mennyisége, amely egyenletesen magas tud maradni, mivel a fázisosságot megszüntíti a neurovaszkuláris kapcsolat (Lyons és Broberger 2014). A laktotróf sejteknek spontán aktivitásuk van, nincs szükségük hipotalamikusan eredetű aktivációra, feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákon keresztül történő Ca^{2+} beáramlás stimulálja a prolaktin szekréciót. G_i fehérje típusú jelátvitelhez kapcsolt 2-es típusú dopaminreceptor található (D_2R) a laktotróf sejtek felszínén, ezen keresztül fejti ki hatását a dopamin: másodperceken belül hiperpolarizálja a membránt és ezáltal felfüggeszti a Ca^{2+} beáramlást, órák alatt csökkenti az adenilát cikláz aktivitást és

ennek következtében a prolaktin expressziót, hosszú távon pedig a laktotróf sejtek osztódását (Ben-Jonathan és Hnasko 2001).

1.2.3.2. A prolaktin feedback mechanizmusa és megváltozása a laktáció során

Ahogy azt már a korábbiakban említettem, a hipotalamusz-prolaktin hormonális tengely egyetlen feedback mechanizmusa a prolaktin által a TIDA sejtekre kifejtett negatív visszacsatolás. PRLR található ezeken a sejteken, és prolaktin beadására fokozódik a tirozin-hidroxiláz enzim (TH) expressziója, az eminentia medianában a dopamin metabolizmus, illetve a dopamin szekréciója a portális keringésbe. Dopamin 2 receptor agonista bromocriptin beadása esetén viszont csökken a vér prolaktinszintje és a TIDA sejtek dopamin termelése, TH expressziója (Arbogast és Voogt 1991, Lookingland és mtsai. 1987). A TH-re kifejtett hatás azért fontos, mert ez az enzim a katekolamin szintézis első és egyben sebesség meghatározó lépése. A TH mennyiségét expressziója határozza meg leginkább, aktivitását pedig foszforilációja szabályozza. A patkányok TH enzime 4 különböző helyen foszforilálható: a Ser8, 19, 31 és 40 pozíciókban. Jelentős hatása az enzim működésére a Ser31 és 40 foszforilációjának van. A Ser31-et az ERK1/2 és a Cdk5 (ciklin dependens kináz-5), a Ser40-t a PKA, illetve a MAPK (mitogén aktiválta protein kináz) foszforilálja. A Ser31 foszforilációja növeli a TH enzim stabilitását, az általa katalizált tirozin – L-DOPA átalakulás sebességét, valamint a reakcióhoz szükséges tetrahidrobiopterin szubsztrátra vonatkozó K_m -et is csökkenti (Daubner és mtsai. 2011, Tekin és mtsai. 2014). A prolaktin egyrészt a protein kináz A és C mediálta intracelluláris jelátviteli útvonalakon keresztül foszforilációval aktiválja a TH enzimet és ezáltal fokozza a dopaminszintézist, valamint hosszabb távú hatásként a TH expresszióját is a STAT5b mediálta jelátvitel segítségével (Ma és mtsai. 2005). A TIDA sejtek tüzelési mintázatát is megváltoztatja a prolaktin hatás, ugyanis másodpercek alatt négyszeresére emeli a tüzelési frekvenciát, egyfajta tónusos aktivációt előidézve a már említett fázisos helyett, amely egy még nagyobb mértékű dopamin felszabadulást idéz elő (Lyons és Broberger 2014). Ez a feedback mechanizmus egészen a terhesség késői szakaszáig fennmarad. Terhesség alatt a hipofízis által szekretált prolaktin mennyisége ugyan csökken, viszont a placentáris laktogének is képesek aktiválni a TIDA sejteket. Szülés után azonban, a laktáció alatt folyamatosan egyfajta fiziológiás hyperprolactinaemia jellemző, szoptatás indukálta prolaktin szekréciós hullámokkal. Tehát a feedback mechanizmus nem működik a laktáció idején. A TIDA sejtekben kevesebb dopamin képződik, mivel a TH

expressziója és foszforiláció által történő aktivációja az eminentia medianában jelentősen csökken. Ugyanakkor ezek a neuronok ugyanolyan érzékenyek maradnak elektrofiziológiai szempontból a prolaktinra, csak a tüzelésük nincs szinkronban a portális keringésbe leadott dopamin mennyiségével, jóval kevesebb dopamint szekretálnak, mint azelőtt (Romano és mtsai. 2013). Az továbbra is kérdés, hogy egyrészt mi okozza a TH enzim expressziójának és aktivációjának csökkenését. Másrészt, ha a TIDA sejtek dopaminszekrécións képessége eleve alacsony, hogyan jön létre a szoptatási inger hatására egy gyors prolaktin csúcs, elég-e a dezinhibíció vagy szükség van egy prolaktin releasing faktorra. (4. ábra)



4. ábra: a prolaktin (PRL) feedback mechanizmusa

Amikor nincs laktáció, a prolaktin serkenti a TIDA neuronokban a tirozin-hidroxiláz enzim (TH) expresszióját és foszforiláció általi aktivációját, amely nagyobb mennyiségű dopamin (DA) szintézishez és szekréciónhoz vezet, így felerősödik a hipofízis prolaktin szekréciónjának gátlása. Ez a negatív feedback mechanizmus azonban eddig ismeretlen okból nem működik a laktáció idején, ez az oka a folyamatosan fennálló fiziológias hyperprolactinaemiának.

1.2.3.3. A TIDA sejtek működését szabályozó faktorok

Ahogy korábban említettem, a központi idegrendszerben a prolaktin szekréciót elsősorban indirekt módon, a TIDA sejtekre hatva képesek befolyásolni különböző faktorok. A norepinefrin, illetve epinefrin közvetítette adrenerg modulációnak a stressz-indukálta prolaktin felszabadulásban lehet szerepe, ugyanis a TIDA neuronok sejttestén phenyletanolamin-N-metiltranszferázt (PNMT) tartalmazó idegvégződések találhatók (Hrabovszky és Liposits 1994). A szerotonin szintén a prolaktin szekréciót segíti elő, a nucleus raphe dorsalisból eredő szerotoninerg rostok közvetetten, a hipotalamusz paraventriculáris magján keresztül hatnak gátlólag a dopaminerg sejtekre (Bagdy 1996). A hisztamin intracerebroventrikuláris injekciója megemeli a prolaktin szintet, direkt hatását H₂-receptorokon keresztül fejt ki, míg a preszinaptikus H₃-receptorokon más neurotranszmitterek hatását modulálja. Az arcuatus mag dopaminerg neuronjai rendelkeznek μ és κ opioid receptorokkal, továbbá megfigyelték, hogy a naloxon elnyomja az ovuláció előtti prolaktin hullámot és csökkenti a laktáló anyák prolaktinszintjét. Ez mind arra enged következtetni, hogy az endogén opioidok gátló hatást fejtenek ki a TIDA sejtekre, ezáltal közreműködve a preovulációs, a szoptatás- és a stressz indukálta prolaktin felszabadulásban (Freeman és mtsai. 2000). Galanint tartalmazó axonok is végződnek a TIDA neuronokon, gátló hatást kifejtve azokra, csökkentik a felszabaduló dopamin mennyiségét (Nordstrom és mtsai. 1987). A már említett TIP39 egy neurotranszmitter, a PTH2-R egyetlen ismert endogén agonistája. A TIP39-et tartalmazó idegvégződések és a PTH2-R-ral rendelkező neuronok érintkeznek és egybeesést mutatnak egymással a többek közt a hipotalamusz arcuatus magjában (Faber és mtsai. 2007). Kimutatták, hogy patkány anyákban, kölykök jelenlétében a talamusz posterior intralaminaris komplexumában (PIL) található TIP39-sejtek aktiválódnak és projiciálnak az arcuatus magba, ahol PTH2-R-okon hatnak, melyek által valószínűleg TIDA sejteket gátló interneuronokat aktiválnak, így segítve a prolaktin felszabadulást. A PTH2-R gátlása megszünteti a szoptatás indukálta prolaktin szekréciót (Cservenak és mtsai. 2010). Az előbbiekkal ellentétben az acetilkolin, a PACAP (pituitary adenylyl-cyclase activating polypeptide), a kalcitonin, a neuropeptid Y (NPY), a bombezin, az angiotenzin és a neurotenzin (utóbbi aktivitása laktációkor erősödik, mediátor szerepet betöltve a prolaktin feedback mechanizmusában) stimulálja a TIDA neuronokat, ezáltal gátolva a prolaktin szekréciót (Freeman és mtsai. 2000). Az oxytocin, amelynek a laktációban és az anyai viselkedésben is fontos szerepe van, előbbiben a tejkilövellésnél, érdekes módon szintén

a TIDA sejteket aktiválja, depolarizálja őket, előidézve ezzel a prolaktin szekréció gátlását (Briffaud és mtsai. 2015).

1.2.3.4. Létezik-e prolaktin releasing faktor (PRF)?

A legtöbb faktor, amely a prolaktin szekréciót szabályozza, indirekt módon teszi ezt, a TIDA neuronokra hatva, azonban néhány a hipofízis prolaktin termelését közvetlenül is képes serkenteni. Az ösztadiol a laktotróf sejtekre hat, fokozza a prolaktin expresszióját. Egy klasszikus releasing faktornak viszont a hipotalamuszban kéne termelődni és onnan szekretálódni a portális keringésbe, majd serkenteni a laktotróf sejtek működését. Több lehetséges PRF-et is vizsgáltak már, úgymint a TRH-t, oxytocint, galanint, vagy a vazóaktív intestinalis polipeptidet (VIP). Utóbbi nem emlősökben az elsődleges PRF és emlősökben is fokozza a prolaktin szekréciót, valamint mind a hipotalamuszban, mind a hipofízisben jelen van. Azonban releasing faktornak mégsem nevezhetjük, ugyanis nincs nagyobb koncentrációban jelen a portális keringésben, mint bárhol másutt a vérben, továbbá szintje nem emelkedett akkor, amikor a prolaktin szekréció jelentősebb. Dopamin receptor antagonistá alkalmazásával ellenben elérhető a szoptatás által indukálthoz hasonló prolaktin csúcs, ami arra utal, hogy inkább a TIDA sejtek gátlása, mint egy még fel nem fedezett PRF felelős a laktációhoz kapcsolódó magas prolaktin szintért (Grattan 2015).

1.3. Az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1)

Az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) egy evolúciós szempontból ősi peptid, amelynek sejtek túlélését, osztódását, szövetek gyógyulását elősegítő hatása régóta ismert. A vérben keringő IGF-1 elsődleges forrása a máj, melyben a növekedési hormon (GH) hatására képződik és szabadul fel, így vállalva főszerepet a növekedési hormon tengelyben. Mindazonáltal IGF-1 egyéb perifériás szövetekben is termelődik GH hatására, így a májból származó IGF-1 a keringő mennyiségnek mintegy 70%-át adja (Yakar és mtsai. 1999). Fontos szerepe van abban is, hogy kapcsolatot teremt a növekedési hormon tengely és más neuroendokrin rendszerek, mint például a hipotalamo-hipofizeális-gonád tengely, illetve a prolaktin felszabadulás – laktáció között. Hatását az IGF-1 az IGF1-receptoron (IGF-1R) keresztül fejt ki, ez egy tirozin-kináz típusú, sejt felszínen található receptor. Az IGF-1 az extracelluláris térben, illetve a keringésben a 6 IGF kötőfehérje (IGF binding protein – IGFBP) valamelyikéhez kötött állapotban van jelen. A májban termelődött IGF-1 több, mint 99%-a IGFBP-hez kötődik, ezen belül is 75-90%-ban az IGFBP-3-hoz. Az IGFBP-k nagyobb affinitással kötik meg az IGF-1-et, mint az IGF-1R, befolyásolva ezzel az utóbbi kettő interakcióját, amely az IGFBP-3 esetében az IGF-1 hatásainak gyengítését jelenti.

1.3.1. IGF-1 a központi idegrendszerben

Az utóbbi években került látótérbe az IGF-1 központi idegrendszeri szerepe. Az agyban neuronok és gliasejtek is kifejezik az IGF-1-et (Fernandez és Torres-Aleman 2012), főleg a születés körüli időszakban a kéreg, hippocampus, kisagy, agytörzs, hipotalamusz és gerincvelő területén (Bach és mtsai. 1991), majd felnőttkorban is hasonló mintázatban, csak jóval kisebb mennyiségben. Ugyanakkor az IGF-1 receptor (IGF-1R) expressziója ennél jelentősebb, ami a perifériáról származó IGF-1 központi idegrendszeri hatására utal. A keringő IGF-1 képes átjutni a vér-liquor gáton a plexus choroideusban található IGF-1R és LDL receptor related protein 2 (LRP2) segítségével (Fernandez és Torres-Aleman 2012). A vér-agy gáton való átjutás az adott agyterület neuronjainak aktivitásától is függ. Az aktív szinapszisokból glutamát szabadul fel, aminek következtében bizonyos vazoaktív mediátorok (PGE₂, ATP, arachidonsav származékok) mennyisége megnő a neurovaszkuláris egységben. Ezek a mediátorok stimulálják az érfalban található MMP-9-et, amely lehasítja az IGFBP-3-at a vérben

keringő IGF-1-ről, így a biológiailag hozzáférhető IGF-1 szintje megemelkedik, kötődhet receptorához és ezáltal a lumenből az ér bazolaterális felszínére juthat át. Ez a mechanizmus segíti az IGF-1 szintjének növekedését aktív agyterületeken (Nishijima és mtsai. 2010). Az IGF-1 központi idegrendszeri hatásai igen sokrétűek. Sejtszinten befolyásolja a szinaptikus neurotranszmissziót. Akut IGF-1 beadás 40%-al növeli az EPSP-t a hippocampus CA1 régiójában (Ramsey és mtsai. 2005), alacsony szérumszintű IGF-1 szintű génmódosított egerekben teljes mértékben hiányzik az LTP a hippocampusban (Trejo és mtsai. 2007), ellenben az IGF-1 erősíti az LTP-t vad típusú, felnőtt patkányok hippocampusában és medialis prefrontalis kérgében (Burgdorf és mtsai. 2015). A szinaptikus struktúrára is hatással van: növeli a synapsin 1 és PSD-95 expresszióját (Corvin és mtsai. 2012), fokozza a magas feszültségfüggő Ca-csatornák aktivációját és közvetlen hatással van az L és N típusú Ca-csatornák ionáramlására (Xing és mtsai. 2006). IGF-1 géniült egérben ezzel szemben abnormális a synaptotagmin és a synaptophysin eloszlása és szintje, rövidebbek a dendritok, kisebb a dendritikus tüskék sűrűsége (Dyer és mtsai. 2016). Az IGF-1 központi idegrendszeri hatásainak klinikai vonatkozása is van. Az agy fejlődésében fontos szerepet játszik, erre utal az embrionális és magzati korban magas expressziós szintje. Ebből kifolyólag terápiás lehetőségként merül fel olyan betegségekben, melyek a központi idegrendszerben a neuronok közti kapcsolatok kóros fejlődésével járnak. Az IGF-1 rendelkezik gyors és hosszú távú antidepresszáns-szerű hatásokkal is, melynek hátterében az állhat, hogy növeli a szinaptikus kapcsolatok erősségét a hippocampusban és a medialis prefrontalis kéregben, megkönnyíti a plaszticitást a hippocampusban (Burgdorf és mtsai. 2015). Antidepresszáns-szerű hatásait állatkísérletekben már kimutatták erőltetett úszástartással és szukróz preferencia teszttel is (Duman és mtsai. 2009). Mindezt alátámasztja, hogy a szérumszintű IGF-1 szint pozitív hangulati állapotokkal pozitívan, míg a depresszió súlyosságával negatívan korrelál (Burgdorf és mtsai. 2015). Végül érdemes megemlíteni, hogy az IGF-1-nek fontos szerepe van az Alzheimer-kór patogenezisében is: védelmet nyújt mind a tau hiperfoszforilációja, mind a β -amyloid felhalmozódása ellen. Mindezek alapján érthető, hogy az IGF-1 nem csak a központi idegrendszer fejlődése során, hanem felnőtt korban is jelentős hatással van az idegsejtek működésére.

1.3.2. IGF-1 neuroendokrin funkciói

Az IGF-1 hipotalamo-hipofizeális rendszerre kifejtett hatása több neuroendokrin szabályozási tengelyt is érint, funkcionális kapcsolatot teremtve köztük. Mint korábban

már említettem az IGF-1 elsősorban, mint a növekedési hormon tengely része ismert, GH hatására termelődik főleg a májban, így a GH hatásainak közvetítője a periféria felé. Fontos szerepet tölt be terhesség során is, ugyanis az anyából a magzathoz jutó IGF-1 elengedhetetlen a magzat fejlődéséhez. Azonban a növekedési hormon tengelyben nemcsak mint közvetítő, hanem mint hosszú távú negatív feedback modulátor is részt vesz: az agyalapi mirigyen és a hipotalamuszon keresztül hatva csökkenti a GH szekréciónak. Feltehetőleg a hipofízis szomatotróp sejtjein lévő IGF-1 receptorokon keresztül gátolja azok működését, ugyanis ezek szelektív kiütése a vérben lévő GH szintjének emelkedéséhez vezet (Gahete és mtsai. 2011, Yamasaki és mtsai. 1991). Az agyalapi mirigy GH szekréciónak legfőbb szabályozója a hipotalamusz anterior periventrikuláris magjából származó gátló hatású szomatosztatin, illetve az arcuatus magból származó serkentő hatású GH releasing hormon (GHRH). Az IGF-1 ezen neuronokra is hatással van, ezáltal a hipotalamusz szintjén is negatív feedback szabályozást valósít meg. Agykamrába (icv.) történő beadása patkányokban csökkenti a GH pulzatilis szekréciónak amplitúdóját (Abe és mtsai. 1983, Tannenbaum és mtsai. 1983), emellett fokozza a szomatosztatin és csökkenti a GHRH expresszióját (Sato és Frohman 1993). Emberben is megfigyelték, hogy IGF-1 adására a GH pulzusok frekvenciája csökkent, amiből az ezért felelős hipotalamikus GHRH gátlására következtethetünk (Steyn és mtsai. 2016).

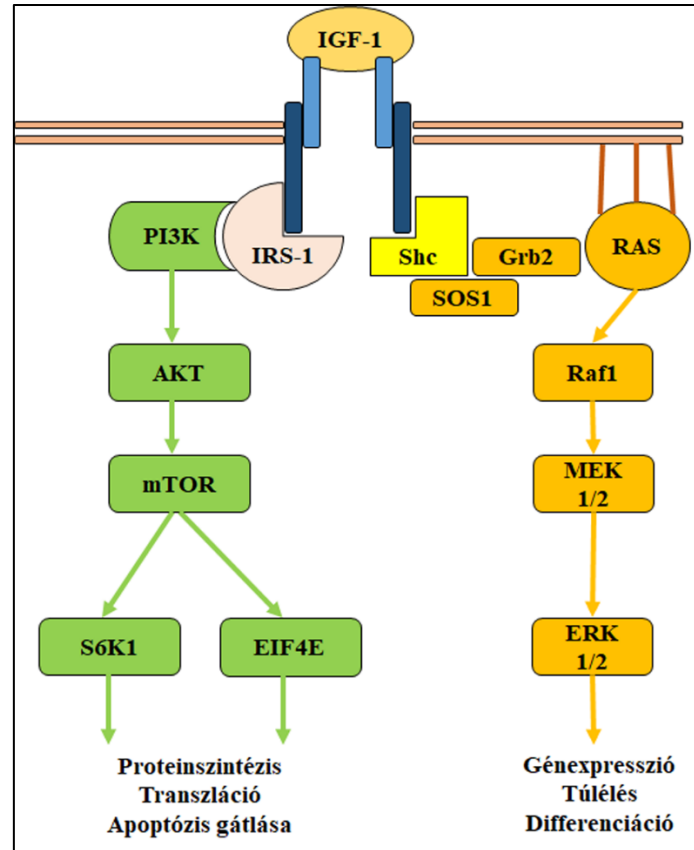
A hipotalamuszban nem csak a szomatotróp, hanem a gonadotróp tengely működésére is hatással van az IGF-1, kapcsolatot teremtve ezáltal a két neuroendokrin tengely között, mely kapcsolatnak pubertáskor komoly jelentősége van, amikor a szervezet növekedését-fejlődését kell összehangolni a nemi éréssel. Egyfelől a gonadotropin releasing hormont (GnRH) expresszáló sejteken, a hipotalamusz preoptikus területén, vannak IGF-1 receptorok (Wolfe és mtsai. 2014). Az IGF-1 *in vitro* serkenti a GnRH expressziót (Anderson és mtsai. 1999), valamint az IGF-1 receptor egy antagonistával (JB1) történő gátlása *in vivo* csökkenti a GnRH sejtek aktivitását (Sun és mtsai. 2011). Másfelől az IGF-1 serkenti prepubertális időszakban az anteroventralis periventrikuláris (AVPV) területen található kisspeptin neuronok kisspeptin expresszióját (Hiney és mtsai. 2009). A nemi érésben és a pubertás alatt tehát fontos szerepet játszik az IGF-1, kimutatták, hogy icv. beadása sietteti a pubertás kezdetét is (Hiney és mtsai. 1996). Ezzel összhangban a pubertás időszakában jelentősen emelkedett a hipotalamusz IGF-1 expressziója, míg a reprodukzív öregedéskor ez nagymértékben lecsökken (Wolfe és mtsai. 2014).

A GH és az IGF-1 összefüggésben van a laktációval is. Prolaktin hiányában a tejhozam felére csökken, teljes lepadást GH és prolaktin együttes megvonásával lehet elérni (Madon és mtsai. 1986). A GH szükséges a normál tejtermeléshez, a tápanyagok beépítésének és a kiválasztó sejtek aktivitásának serkentésével (Etherton és Bauman 1998), valamint emberben is fokozza a tejelválasztást (Milsom és mtsai. 1992). Ennek megfelelően a szoptatás GH szekréciót indukál és ez a GHRH gátlásával blokkolható (Terry és mtsai. 1977, Wehrenberg és Gaillard 1989). Az IGF-1 a hipofízisben a laktotróf sejteken lévő receptorán keresztül hatva serkenti a prolaktin felszabadulást és a sejtek túlélését (Fruchtman és mtsai. 2000, Fruchtman és mtsai. 2002), valamint az emlőmirigyben fokozza a tejelválasztást, gátolja a lobulo-alveoláris epithelsejtek apoptózisát a késői laktációs periódusban (Hadsell és mtsai. 2002, Prosser és Davis 1992, Prosser és mtsai. 1996). Ezenkívül az IGF-1-ről sejt kultúrában kimutatták, hogy serkenti a Stat5 termelődését, ami a prolaktin által aktivált intracelluláris jelátviteli út kulcseleme (Yang és mtsai. 2000). Az IGF-1 szérumszintjét a szoptatással összefüggésben eddig még nem vizsgálták, ugyanakkor valószínűsíthető valamilyen emelkedés, mert egyfelől a GH szekréciója is fokozódik, másfelől a prolaktin is képes serkenteni a máj IGF-1 termelését (Murphy és mtsai. 1988).

1.3.3. Az IGF-1 aktiválta intracelluláris jelátviteli utak

Az IGF-1 hatásait a sejt felé, mint korábban említettem az IGF-1R közvetíti. Ez egy tirozin-kináz típusú sejt felszíni receptor, amely diszulfidhidakkal összekapcsolt $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer struktúrából áll. Az α -alegységek a sejt felszínen kívül, az IGF-1 megkötéséért felelősek, míg a β -alegységek az intracelluláris tirozin-kináz aktivitású domáinok (Czech 1989). IGF-1 kötődése az α -alegységhez, a β -alegységek autofoszforylációját váltja ki, amelynek a következménye két fontos sejt belüli jelátviteli útvonal aktivációja. Az egyik a PI3K/mTOR/AKT1 útvonal (foszfatidilinozitol-3 kináz/mammalian target of rapamycin/szerin-treonin specifikus protein-kináz AKT), a másik MAPK/ERK kaszkád (mitogén aktivált protein kináz/extracelluláris szignál regulált kináz). A PI3K aktiválja az AKT kinázt, amelynek következménye az mTOR aktiválása. Ez utóbbi elősegíti a transzlációt az S6-kináz-1 (S6K1) és az 4E eukarióta transzláció iniciációs faktor 1 (EIF4E) segítségével, így járul hozzá a sejt túléléséhez és a sejt váz átalakulásához. Az S6K1 a sejt által gátolja a Bcl-2-asszociált apoptózis agonista (BAD) gátló foszforilációjával, míg az AKT1 aktiválódása a FOXO apoptotikus útvonal gátlásához vezet. A RAS-Raf1-MEK1/2-

ERK1/2 útvonalon keresztül sejtmotilitást, -túlélést és -osztódást elősegítő gének expresszióját képes elősegíteni az IGF-1 (5. ábra) (Costales és Kolevzon 2016, Dyer és mtsai. 2016).



5. ábra: Az IGF-1 által aktivált intracelluláris jelátviteli útvonalak

Az IGF-1 kötődése receptorához többféle sejten belüli jelátviteli útvonalat aktivál, melyeken keresztül a génexpresszióra, translációra, protein szintézisre, valamint a túlélésre, differenciációra és apoptózisra ki tudja fejteni hatását (Costales és Kolevzon 2016).

AKT: szerin-treonin specifikus protein-kináz AKT; EIF4E: ERK 1/2: extracelluláris szignál regulált kináz; Grb2: growth factor receptor bound-2; IRS-1: inzulin-receptor szubsztrát 1; MEK 1/2: mitogén aktivált protein kináz; mTOR: mammalian target of rapamycin; PI3K: foszfatidilinozitol-3 kináz; Raf1: rapidly accelerating fibrosarcoma kinase protein; S6K1: S6-kináz-1; Shc: Src és kollagén homológ; SOS-1: son of sevenless-1;

1.3.4. Az Inzulinszerű növekedési faktor 3-as típusú kötőfehérjéje (IGFBP-3)

Az IGFBP-3 egy hármas komplexben köti az IGF-1-et az ún. acid-labile subunittal (ALS) együtt. Ez a hármas komplex modulálja az IGF-1 hatásait, befolyásolva a szabad-effektív IGF-1 mennyiségét, IGF-1 raktárként is funkcionál, valamint az IGF-1 féléletidejét jelentősen megnöveli. Ezenkívül az IGF-1R-al is képes interakcióba lépni, gátolva ezzel a ligand kötődését a receptorához.

1.3.4.1. Az IGFBP-3 szerkezete

A humán IGFBP-3 28,7 kDa tömegű és 264 aminosavból áll. Egy tasakként képzelhető el, amely az IGF-1-et a belsejében megköti és körbeveszi. Három domain különíthető el: N-terminális domain, középső régió és C-terminális domain. Az N-terminális domain 87 aminosavból áll, ebből 12 cisztein alkot 6 diszulfidhidat. Ez a domain felelős elsősorban az IGF-1 kötésért és szerkezete ennek a leginkább hasonló a többi IGFBP-hez. A középső régió 95 aminosavat tartalmaz, ez a leginkább különböző a többi IGFBP-hez képest, itt hatnak a poszttranszlációs módosítások. Három glikozilációs hely található itt, a módosítás 40-43 kDa-ra növeli a protein méretét, továbbá negatívan hat az IGFBP-3 sejtfelülettel kialakítható kölcsönhatásaira, a foszforiláció pedig megnöveli az IGF-1-hez való affinitást. Ebben a régióban hatnak az IGFBP-proteázok, amelyek a protein degradálásával az IGF-1 felszabadulását segítik elő. A C-terminális domain is ciszteinben gazdag, 3 diszulfidhíddal, illetve az N-terminálishoz hasonlóan felelős az IGF-1 kötésért, így kialakul a már említett tasakforma. A merev diszulfidhidak nagyon fontosak az IGF-1 megkötésénél, ezenkívül a C-terminális domain a középrégióval együtt az IGF-1 receptorkötő régióját akadályozzák térbeli elhelyezkedésükkel. Az ALS-hoz való kötődésnél is ez a régió játszik kulcsszerepet (Firth és Baxter 2002, Jogie-Brahim és mtsai. 2009, Ranke 2015).

1.3.4.2. Az IGFBP-3 és az anyai adaptáció lehetséges kapcsolata

Az anyai adaptáció kulcsszerepet játszó szabályozó központja a korábbiakban már említett medialis preoptikus area, ahol a szülés után jelentős génexpressziós változások történnek. Kutatócsoportunk hipotézise egy korábbi vizsgálat során az volt, hogy az anyákban megváltozott expressziót mutató gének szerepet játszanak a központi idegrendszer anyai adaptációjában. A hipotézis bizonyításának első lépéseként egy microarray vizsgálatot végzett kutatócsoportunk (Dobolyi 2009), hogy megtudják mely gének expressziója változik meg jelentősen az MPOA-ban laktáló anyákban a már

korábban említett deprivált anyákhoz képest, melyeknek kölykeit a szülés után azonnal elvették és emiatt nem történt meg az anyai adaptáció. Ezen állatok a vizsgálat időpontjában már nem laktáltak, és nem mutattak utódgondozó viselkedést sem. Ennek a vizsgálatnak az eredményeit újraértékeljük és összehasonlítottuk egy hasonló microarray kísérlettel (Driessen és mtsai. 2014). Összesen 21 olyan gén volt laborunk microarray eredményei közt, amely magasan szignifikáns változást mutatott ($p < 0,007$), a legnagyobb, 25-szörös változást az islet amyloid polipeptid, azaz amylin mutatta, expressziója laktáló anyákban jóval magasabb volt. Az amylin, mint új, anyai adaptációban fontos szerepet játszó neuropeptidet sikerült leírni (Szabo és mtsai. 2012). További 5 gén expressziója 2-4-szeresére emelkedett laktáló anyákban és ezek közül az IGFBP-3 volt az, amelyet a másik kutatócsoport microarray vizsgálata során is kimutattak, mint fontos, megnövekedett expressziójú gént (1. táblázat).

1. táblázat: A preoptikus terület microarray vizsgálata során magasan szignifikáns változást mutató gének

Azokat a géneket mutatja a táblázat, amelyeknek expressziója $p < 0,007$ szignifikanciájú különbséget mutatott laktáló és deprivált anyák preoptikus területeinek összehasonlításakor. A legnagyobb mértékű változást az amylin (islet amyloid polipeptid) mutatta, rajta kívül még 5 gén expressziója mutatott 2-4-szeres növekedést laktáló anyákban. Az IGFBP-3 esetében egy másik kutatócsoport is változást tapasztalt.

p	Változás mértéke	Géntermék neve	RefSeq	UniGene kód
0,00001	25,732	islet amyloid polypeptide	NM_012586	Rn.11394
0,00015	0,466	similar to RNA binding motif protein 3	XM_001063211	Rn.18057
0,00016	0,422	aldo-keto reductase family 1, member B7	NM_053781	Rn.32702
0,00031	0,469	S100 calcium-binding protein A4	NM_012618	Rn.504
0,00034	0,442	microtubule-associated protein tau	NM_017212	Rn.2455
0,00045	0,415	similar to macrophage scavenger receptor 2	XM_001067252	Rn.76819
0,00050	0,438	procollagen, type III, alpha 1	NM_032085	Rn.3247
0,00052	0,465	similar to aldo-keto reductase family 1, member C19	XM_001062695	Rn.16371
0,00052	0,392	similar to ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 6	XM_001056025	Rn.8484
0,00059	0,359	KiSS-1 metastasis-suppressor	NM_181692	Rn.66008
0,00060	0,490	hypothetical protein	XM_001066258	Rn.139226
0,00069	0,367	calbindin 3, (vitamin D-dependent calcium binding protein)	NM_012521	Rn.9974
0,00084	0,373	asialoglycoprotein receptor 1 (hepatic lectin)	NM_012503	Rn.44300
0,00144	0,401	similar to procollagen, type I, alpha 1	XM_001081230	Rn.2953
0,00200	2,653	ELL associated factor 2	NM_172047	Rn.20681
0,00207	3,720	dopamine receptor 4	NM_012944	Rn.10159
0,00277	0,415	similar to Paired mesoderm homeobox protein 2 (PRX-2) (Paired-related homeobox protein 2)	XM_001079701	Rn.93004
0,00281	2,186	insulin-like growth factor binding protein 3	NM_012588	Rn.26369
0,00537	2,473	follistatin	NM_012561	Rn.162557
0,00546	0,439	ring finger protein 141	NM_001001800	Rn.127990
0,00685	2,152	selectin, endothelial cell	NM_138879	Rn.10359

Ezért az IGFBP-3-at és a tőle működésben nem elválasztható IGF-1-et, tehát az IGF-1 – IGFBP-3 rendszert választottuk kutatásaink tárgyául. *Hipotézisünk így a következőként írható le: Az IGF-rendszer szerepet játszik a központi idegrendszer anyai adaptációjában.*

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Az IGFBP-3-ra vonatkozó microarray eredmények validálása

- a.) Az IGFBP-3 esetében a microarray során a preoptikus területen jelentkező mRNS szint emelkedés igazolható-e kvantitatív RT-PCR-rel, tekintettel a microarray-k során nagy számban előforduló fals pozitív eredményekre?
- b.) Az IGFBP-3 laktáló anyákban emelkedett preoptikus expressziója hol lokalizálódik a microarray-hez és RT-PCR-hez használt disszekált területen belül?

2. IGF-1 anyai motivációra való hatása

- a.) Van-e hatása IGF-1 vagy IGFBP-3-inhibitor agykamrába adagolásának az anyai motivációra?
- b.) Az anyai motiváció változásai együtt járnak-e a szorongás-szerű viselkedés és a motoros aktivitás IGF-1 kezelés hatására történő megváltozásával?

3. Az IGF-1 laktációra kifejtett hatása

- a.) IGF-1 prolaktin szekrécióra kifejtett hatásának vizsgálata anyapatkányokban
Hatással van-e a krónikus IGF-1 kezelés a szoptatás által kiváltott szérumszint emelkedésre?
- b.) Az IGF-1 hatás háttérében álló lehetséges mechanizmusok elemzése
Az IGF-rendszer fontos eleme, az IGFBP-3 expresszálódik-e a prolaktin szekréciót szabályozó tuberoinfundibuláris dopaminerg (TIDA) sejtekben?
Változik-e az IGFBP-3 expressziója a laktációval összefüggésben a TIDA sejtekben?
Hogyan hat az IGF-1 a TIDA neuronok működését meghatározó tirozin-hidroxiláz enzim expressziójára *in vivo* és *in vitro*?
Hogyan hat az IGF-1 a tirozin-hidroxiláz enzim aktivitását meghatározó foszforilációjára *in vitro*?

4. Az IGF-1 szérumbeli koncentrációjának változása a laktációval összefüggésben

- a.) IGF-1 koncentráció vizsgálata a szoptatással és az általa indukált prolaktinnal összefüggésben
Hogyan változik a szérumszint IGF-1 szint szoptatás hatására anyáállatokban?
Van-e összefüggés a prolaktin és az IGF-1 szintek között a szoptatás során?

b.) IGF-1 beadás perifériás IGF-1 koncentrációra kifejtett hatásának vizsgálata

Milyen hatása van az akut és a krónikus intracerebroventrikuláris IGF-1 beadásnak a szoptatás során bekövetkező IGF-1 szérumszint változásokra?

3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Állatkísérleteinket a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóságának 44009/2013-as engedélyével végeztük. Összesen 112 db, 250-300 g súlyú, nőstény Wistar patkányt használtunk fel kutatásainkhoz (2. táblázat). Az állatokat laboratóriumi körülmények között tartottuk, vízhez és patkánytáphoz való szabad hozzáféréssel, automata fény- és hőmérsékletszabályozási viszonyok között (21-23 °C, 06:30-18:30 világos, 18:30-06:30 sötét periódus). A kísérletek előtt ketrecenként hármásával voltak elhelyezve, majd pároztatás céljából két nőstény és egy hím volt együtt 7 napon keresztül. Ezek után a potenciálisan vemhes anyákat, majd a kölykeiket gondozó anyákat, illetve deprivált anyákat is egyéni ketrecekben tároltuk. Anesztéziához az ozmotikus minipumpák, agykamrai, illetve jugularis kanülök beültetése, valamint perfúzió előtt 0,3 ml/300 g ketamint (67 mg/ttkg) és 0,2 ml/300 g xylazint (13 mg/ttkg) tartalmazó keveréket alkalmaztunk intramuscularisan beadva.

2. táblázat: Az egyes általunk elvégzett kísérletek során felhasznált állatok

A táblázat az egyes vizsgálatok során felhasznált állatok számát, típusát (laktáló vagy deprivált anya; kezelt vagy kontroll), a vizsgálathoz szükséges egyes kísérletek metodikáját, valamint azt tartalmazza, hogy a születés utáni hányadik napon került sor az adott kísérletre.

Vizsgálat	Állatok száma	Születés utáni nap	Kísérlet metodikája
IGFBP-3 mRNS szint mérése a preoptikus területen	9 laktáló és 8 deprivált anya	11.	RT-PCR
IGFBP-3 expresszió helyének és mértékének vizsgálata a preoptikus területen és a nucleus arcuatusban	6 laktáló és 6 deprivált anya	11.	In situ hibridizációs hisztokémia (ISHH)
IGF-1 hatása az anyai motivációra	36 laktáló anya: 10 ACSF, 10 IGF-1, 8 NBI-31772 és 8 DMSO kezelt	2.	ozmotikus minipumpák beültetése
		4-9.	spontán anyai viselkedés vizsgálata
		6.	kölyök visszahordási teszt
		7.	emelt keresztpalló teszt
IGF-1 hatása a szoptatás indukálta prolaktin, illetve IGF-1 szekrécióra és a TIDA sejtek TH expressziójára	15 laktáló anya: 8 ACSF és 7 IGF-1 kezelt	2.	ozmotikus minipumpák beültetése
		13.	jugularis kanülök beültetése
		14.	vérvétel prolaktin és IGF-1 méréshez
		14.	6 ACSF és 6 IGF-1 kezelt anyánál: TH ISHH
IGFBP-3-at és TH-et expresszáló sejtek kolokalizációjának vizsgálata a nucleus arcuatusban	5 laktáló anya	11.	IGFBP-3 ISHH és TH immunhisztokémia
Szoptatás hatása az IGF-1 koncentrációra	14 laktáló anya	13.	jugularis kanülök beültetése
		14.	vérvétel prolaktin és IGF-1 méréshez
Akut IGF-1 beadás hatása a szoptatás indukálta IGF-1 és prolaktin szekrécióra	13 laktáló anya: 6 ACSF és 7 IGF-1 kezelt	2-4.	Icv. kanülök beültetése
		13.	Jugularis kanülök beültetése
		14.	vérvétel prolaktin és IGF-1 méréshez

3.2. Preoptikus terület mikrodisszekciója

A szülés utáni 11. napon eltávolítottuk 9 laktáló és 8 olyan anya agyát mikrodisszekció céljából, amelyeknek kölykeit elvettük azonnal szülés után (2. táblázat). Mint azt már a bevezetőben említettem, a 11. napon már egyáltalán nem figyelhető meg anyai viselkedés, illetve laktáció a deprivált anyákban, ezzel szemben a kölykeiket gondozó anyákban az anyai motiváció és szoptatás is ekkor, a posztpartum időszak közepén, magas szinten van. A preoptikus területet disszekáltuk borotvapenge segítségével a következő határoknál: koronálisan a chiasma opticum előtt, illetve 2 mm-re ettől caudalisan, továbbá horizontalisan a commissura anterior felett, végül saggitalisan 2 mm-re a középvonaltól. A minta így nem csak a preoptikus területet, hanem a Broca-féle diagonalis köteget, commissura anteriort, tractus opticust és a ventralis pallidumot is tartalmazta. A disszekált szövetet azonnal szárazjégen fagyasztottuk le, majd -80°C-on tároltuk.

3.3. RT-PCR (reverse transcriptase – polymerase chain reaction)

A teljes RNS-t Trizol® reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével izoláltuk a fagyasztott preoptikus mintákból, illetve a lizált primer hipotalamikus sejtkultúrákból. Az izolált RNS koncentrációját 2 µg/µl-re egyenlítettük ki hígítással, majd deoxiribonukleáz I enzimmel kezeltük (Invitrogen). Ezután Superscript II reverz transzkriptáz kit segítségével (Invitrogen) cDNS-t szintetizáltunk a gyártó utasításainak megfelelően, amit 10x-ére hígítottunk ki és 2,5 µl-t használtunk fel belőle templátként a PCR reakcióban. A PCR reakció során SYBR Green festéket (Sigma, St. Louis, MO, USA) és iTaq DNS polimerázt (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) alkalmaztunk és 12,5 µl összmenyiségekben végeztük el a következő körülmények között: 3 perc 95°C-on, majd 35 fél perc 95°C-os és 60°C-os, illetve 1 perc 72°C-os inkubációból álló ciklus. Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) használtunk housekeeping génként. A következő primereket használtuk: ACAGCCAGCGCTACAAAGTT és GCGGTATCTACTGGCTCTGC az IGFBP-3-hoz, GCTACCGAGAGGACAGCATC és GCACCATAAGCCTTCAGCTC a TH-hoz, illetve TGCCACTCAGAAGACTGTGG és GTCCTCAGTGTAGCCCAGGA a GAPDH-hoz. Az áttörési ciklusszámokat (Ct) az alapvonalhoz igazított amplifikációs görbe alapján kaptuk meg. A GAPDH-hoz viszonyított értékeket a következő képlettel

számoltuk ki: $\log(Ct_{(GAPDH)} - Ct_{(IGFBP3 \text{ or } TH)})$. Az eredmények statisztikai összehasonlítását kétmintás t-próba segítségével végeztük el.

3.4. Hisztológiai módszerek

3.4.1. In situ hibridizációs hisztokémia (ISHH)

Az in situ hibridizációs hisztokémiát kutatócsoportunk korábbi gyakorlatának megfelelően végeztük (Dobolyi 2009, Vincze és mtsai. 2010). A következő primerpárok segítségével hipotalamikus cDNS-t amplifikáltunk PCR reakcióval, az IGFBP-3 esetében: A: ACAGCCAGCGCTACAAAGTT és GCGGTATCTACTGGCTCTGC, illetve B: CCTTGTTGGAGACCCTGGTA és TCACACCCTGTATTGCCAGA, valamint TH esetében: GCTACCGAGAGGACAGCATC és GCACCATAAGCCTTCAGCTC. A PCR reakció termékét (amplikont) gélelektroforézissel megfuttattuk, hogy ellenőrizzük bázispárhossza megfelel-e az előre számított értéknek. A gélből kitisztított cDNS-t TOPO TA klónozó vektorokba ültettük, melyeket kémiai transzformálással alkalmassá tett E. coli baktériumokba juttattunk (TOPO TA Cloning Kit®, Invitrogen). A baktériumokból a próbákat tartalmazó plazmidokat kitisztítottuk a PureLink Plasmid Miniprep Kit® (Invitrogen) segítségével. A tisztított plazmidokat használtuk egy következő PCR reakció templátjaként, melyben IGFBP-3-ra illetve TH-re specifikus primerpárokat alkalmaztunk melyek tartalmazták a T7 RNS polimeráz felismerő helyet is. Végül az így keletkezett cDNS probe-okat szekvenálással ellenőriztük. 6 laktáló, primipara patkány anya és 6 korban egyező deprivált anya agyát a szülés utáni 11. napon, valamint 6 IGF-1 és 6 ACSF kezelt kontroll anya agyát a 14. napon távolítottuk el (2. táblázat). A szövetet azonnal lefagyasztottuk szárazjégen, majd -80°C -on tároltuk. Az in situ hibridizációs hisztokémiához $12\ \mu\text{m}$ vastagságú metszeteket készítettünk koronális síkban kriosztát segítségével (CM3050 S, Leica Biosystems, Nußloch, Németország) $+3,5\ \text{mm}$ és $-6\ \text{mm}$ között a bregmához képest, amiket pozitívan töltött lemezekre vettünk fel (Superfrost Ultra Plus®, Thermo Scientific, Watham, MA, USA). A lemezeket kiszáritásuk után -80°C -on tároltuk felhasználásukig. Hibridizáláshoz előkezeltük a metszeteket: 4%-os formaldehidben 10 percig fixáltuk, 2x5 percet mostuk PBS-ben, majd 10 percre ecetsav-anhidridet tartalmazó trietanolaminba tettük a lemezeket (1,3 l trietanolaminban 3,25 ml ecetsav-anhidrid). Ezután 2xSSC-be, majd desztillált vízbe mártottuk néhányszor. Végül egy etil-alkohol felszálló töménységi sor következett (70%, 80%, 95%, 100%). A

hibridizációhoz a cDNS probe-okból antiszenz, ³⁵S-UTP-vel radioaktívan jelölt RNS probe-okat készítettünk a MAXI Script® transzkripció kit (Ambion, Austin, TX, USA) segítségével. Radioaktivitásuk méréséhez 5 ml szcintillációs folyadékot és 1 µl RNS probe-ot kevertünk össze. Ezt később olyan hígításban vittük fel a metszetekre, hogy tárgylemezenként a beütésszám percenként 1 millió legyen. Ez alapján hibridizációs oldatot készítettünk a radioaktívan jelölt RNS probe-ból, nukleinsav mixből, DEPC kezelt vízből, 5M-os DTT-ből, 10%-os SDS-ből, 10%-os NTS-ből, illetve hibridizációs pufferből (1M TRIS-HCl, 250mM EDTA, 4M NaCl, 100% formamid, 50% dextranszulfát, 50x Denhardt oldat). Ebből az oldatból 80 µl-t tettünk egy lemezre, lefedtük, majd nedves kamrában hibridizáltuk egy éjszakán át 65°C-os hőmérsékleten. Ezt követő napon leoldottuk a fedőlemezeket 4xSSC-ben, majd a metszeteket DTT-t is tartalmazó 4xSSC-ben mostuk több alkalommal. Ezután a maradék egyszálú RNS-t RNáz A puffer (200 ml 5M NaCl, 20 ml 1M pH 7,6 TRIS, 1 ml 0,5M pH 8,0 EDTA, 4 ml 40 mg/ml RNase A (Sigma)) hozzáadásával bontottuk le. A pufferben történt inkubáció végeztével 2x, 1x SSC-ben, majd DTT-t is tartalmazó 0,5x és 0,1x SSC-ben mostuk a metszeteket. Végül a mosást felszálló alkoholsor zárta (1 perc 70%-os, 80%-os, 90%-os, 95%-os, 100%-os alkoholban). A metszeteket autoradiográfiás emulzióba merítettük (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) majd 3 hétig 4 °C fokon tároltuk sötétben. A metszeteket Kodak Dektol developer-rel hívtuk elő, majd Kodak fixálóval fixáltuk, egyenként Giemsa-val festettük végül lefedtük Cytoseal 60-al (Stephens Scientific, Riverdale, NJ).

3.4.3. Immunhisztokémia és in situ hibridizációs hisztokémia kombinációja

A szülés utáni 11. napon disszekáltuk 5 laktáló anya agyát, majd a belőlük készült metszeteket in situ hibridizációs hisztokémia és immunhisztokémia kombinációjának vetettük alá (2. táblázat). IGFBP-3 probe-bal történő hibridizáció után lebontottuk a maradék egyszálú RNS-t, illetve elvégeztük a megfelelő mosási lépéseket, majd a felszálló alkoholsor és autoradiográfiás emulzióba mártás előtt nedves kamrákban TH immunhisztokémiához használtuk fel a metszeteket. Először 3%-os Bovine Serum Albumin-ban (BSA) inkubáltuk a lemezeket, majd egérben termelt TH-elleni primer antitesttel (1:1000 hígítás, MAB5280, Chemicon®, EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Ezután lóban termelt egér IgG elleni szekunder antitesttel kezeltük a metszeteket (1:1000 hígítás, Vector Laboratories®, Burlingame, CA, USA) egy órán keresztül, valamint ABC komplexszel 2 órán keresztül (1:500 hígítás, Vector

Laboratories®). Végül 0,1 M koncentrációjú foszfát pufferben (PB) oldott 0,02 %-os 3,3-diaminobenzidinnel (DAB, Sigma) és 0,003 %-os hidrogén-peroxiddal tettük láthatóvá az antitesttel jelölt sejteket. Az immunhisztokémiai festés végeztével felszálló alkoholsor, majd emulzióba mártás, előhívás, végül lefedés következett.

3.4.3. Mikroszkópia és képfeldolgozás

A metszeteket egy Olympus BX60 típusú, sötétlátóteres kondenzorral is felszerelt fénymikroszkóppal vizsgáltuk meg. A képeket SPOT Xplorer digitális CCD kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) segítségével, 4-40x objektívvel, 2048 x 2048 pixeles felbontásban. A képeket Adobe Photoshop CS 8.0 programmal szerkesztettük meg a „Szintek” és „Színezet/Telítettség” funkciók alkalmazásával. A képek teljes felbontását a végső változatokig megőriztük, amelyek 300 dpi felbontásra állítottunk be.

3.4.4. Az in situ hibridizációs jel denzitometriás analízise

Sötétlátóteres mikroszkópos felvételeket készítettünk, 10x-es vagy 4x-es objektívet használva azokról a metszetekről, amelyeken az IGFBP-3 illetve TH hibridizációs jel a legerősebb volt az MPOA-ban, arcuatus magban, paraventricularis magban és a zona incertában. Minden képet két részre osztottunk úgy, hogy az egyik rész az autoradiográfiás jelet tartalmazza, a másik pedig mint háttér-kontroll szolgáljon. A pixelszámot kiszámoltuk a külön-külön a két területen az ImageJ 1.47 v (National Institutes of Health, USA) programmal. A két érték közti különbséget (jelölt rész – háttér) használtuk az IGFBP-3 és TH mRNS hibridizációs jel mértékének kvantálására. A két csoport egyes agyterületeinek denzitásait kétmintás t-próba segítségével hasonlítottuk össze.

3.5. Műtéti technikák

3.5.1. Agykamrai (icv.) kanül és ozmotikus minipumpa beültetése

Az IGF-1 és IGFBP-3 anyai motivációra kifejtett hatásának vizsgálatához szülés utáni második napon 4 csoportra osztottuk a patkány anyákat: icv. ACSF-el (n=10), ACSF-ben oldott IGF-1-el (n=10), illetve 1% DMSO-t tartalmazó ACSF-ben oldott NBI-31772-vel (IGFBP ligand inhibitor) (n=8) és 1% DMSO-t tartalmazó ACSF-el (n=8) kezelendőkre. A laktációra való hatást vizsgálatához 2 csoportra osztottuk az

anyákat: icv. ACSF-el (n=8) és ACSF-ben oldott IGF-1-el kezeltre (n=7) (2. táblázat). Ozmotikus minipumpákat (ALZET® Micro-Osmotic Pump Model 2002, Durect™, Cupertino, CA, USA), melyek 14 napon keresztül folyamatos és egyenletes adagolást biztosítanak, töltöttünk fel ACSF-el (147 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH=7,2), IGF-1-el (4 µg/µl, 48 µg/nap; Peptide Sciences™, USA), NBI-31772-vel (1,66 µg/µl, 19,92 µg/nap; Merck, Darmstadt, Németország) és DMSO-val (1%, ACSF-ben oldva; Sigma Aldrich). A pumpákat egy subcutan tasakban helyeztük el a hát bőre alatt, így az állatok nem tudták azt sem fogukkal, sem lábaikkal roncsolni. Ezután agykamrába vezethető kanülökhöz (ALZET® Brain Infusion Kit, Durect) csatlakoztattuk a pumpákat és gondoskodtunk a rendszer légmentességéről. A kanül beültetéséhez elaltattuk az állatokat, majd rögzítettük őket a stereotaxiás készülékben. A koponya fölött elmetstettük a bőrt, majd egy kb. 1 mm átmérőjű lyukat fűrtünk a koponya bal oldalába, a bal oldalkamra fölé, amelynek felkereséséhez a következő koordinátákat használtuk: AP -0,5 mm, ML 1,4 mm, DV 3,6 mm. Miután a lyukba bevezettük a kanült az oldalkamra eléréséhez szükséges mélységben, mikroszavarral és cranioplasticus cementtel rögzítettük a koponyához. A műtét után a lehetséges fertőzések elkerülése végett 5 napon keresztül Tardomyocel® comp. III antibiotikumot (0,1 ml/ttkg, Bayer, Leverkusen, Németország) kaptak az állatok sc.

Az akut IGF-1-beadás hatásának vizsgálatához felhasznált 13 laktáló patkány anyába a szülés utáni 4. napon ültettük be az icv. kanült (ALZET®) (2. táblázat). Ezután a 8. naptól kezdve naponta 15 percet játszottunk az állatokkal a karunkon járattva őket, hogy az ember közeli jelenléte az icv. beadás során minél stresszmentesebb legyen számukra. A szoptatás alatti vérvétel napján a kölykök visszaadása előtt közvetlenül, 5 perc alatt egyenletesen és lassan IGF-1-et (0,2 µg/µl, összesen 5 µl 5 perc alatt; n=7) vagy ACSF-et (5 µl 5 perc alatt; n=6) adtunk be icv. Ezáltal a szoptatás kezdete után 20-30 perccel érhetette el célpontját a beadott IGF-1 és így a szoptatás indukálta hormonszint változások csúcspontján fejthette ki hatását.

3.5.2. Kanül beültetése a vena jugularisba

A szülés utáni 13. napon, ketamin-xylazin anesztézia (lsd. korábban) mellett 25 mm hosszú steril polietilén kanüloket ültettünk be patkány anyákba. A nyak ventralis oldalán a középvonaltól jobbra metszést ejtettünk a bőrön, mely caudalisan a kulcscsontig húzódott. Tompán preparálva felkerestük a v. jugularist és elválasztottuk a

környező szövetektől egy szakaszon. Cranialisan elkötöttük az eret, majd ez alatt metszést ejtettünk, amibe óvatosan bevezettük a műanyag kanült, amelyet stabilizáló buboréka fölött szintén elkötéssel rögzítettünk az ér belsejében. Ezt az elkötést a mellizomhoz varrtuk további biztosítás céljából. A hát közepén, a lapockák között vezettük ki a fiziológiás sóoldatban oldott heparinnal (1:10 hígítás) feltöltött kanült, amelynek szabad végét egy keskeny fémdugóval zártuk le.

3.5.3. Vérvételezés szoptatás előtt és alatt

A kanül beültetését követő napon vért vettünk az állatoktól, hogy a szoptatás által kiváltott prolaktin, illetve IGF-1 szérumszint-változást megmérjük. Először mielőtt 4 órára elvettük a kölyköket anyjuktól, másodszer a négy óra izoláció után, közvetlenül a kölykök visszaadása előtt, majd 5, 10, 15, 30 és 60 perccel a kölykök visszaadása, azaz a gondozás kezdete után. Minden alkalommal 0,3 ml vért vettünk le és ugyanennyi fiziológiás sóoldatban oldott heparinnal (1:10 hígítás) pótoltuk a folyadékvesztéséget. A vérmintákat 4°C-on 10 percig centrifugáltuk 12.000 g sebességgel, majd a felülúszót - 20°C-on tároltuk a prolaktin-, illetve IGF-koncentráció méréséig.

3.6. Viselkedésvizsgálatok

3.6.1. Spontán anyai viselkedés

36, ozmotikus minipumpával és hozzá kapcsolt icv. kanüllel felszerelt, laktáló patkány anya viselkedését vizsgáltuk Fodor és mtsai. módszerének alapján (Fodor és mtsai. 2012). Az ozmotikus minipumpa beültetése után 1 nap felépülési időt kaptak az állatok, majd a szülés utáni 4. naptól kezdve, 5 napon keresztül vizsgáltuk spontán anyai viselkedésüket naponta három alkalommal, 60 percen keresztül. Kétszer világosban (8:00-9:00, illetve 13:00-14:00), egyszer sötétben (19:30-20:30). Ez alatt a 60 perc alatt 3 percenként figyeltük meg egy-egy anya viselkedését, ami így óránként 20, összesen 5 nap alatt 300 megfigyelést jelentett. Kódokkal jelöltük, milyen viselkedést végeztek az anyák a megfigyelés pillanatában a következők közül: high kyphosis (HK): az anya kinyújtott végtagokkal és görbült háttal a kölykök fölé hajol; licking-grooming (LG): az anya nyalogatja-tisztogatja a kölyköket; prone nursing (PN): az anya gondozza a kölyköket, de csak fekszik rajtuk, nem veszi fel a kyphosis védelmező pozícióját; supine nursing (SN): az anya gondozza a kölykeket, de csak passzívan, az oldalán vagy hátán fekve teszi ezt; fészken kívül (0): az anya fészken kívül van, nincs kontaktus a

kölykökkel. A kapott adatok alapján kiszámoltuk az egyes viselkedések százalékos arányát az összes megfigyelésen belül.

3.6.2. Kölyök-visszahordási teszt

Ugyanazokon a laktáló patkány anyákon, melyeken a spontán anyai viselkedést is vizsgáltuk, a szülés utáni 6. napon kölyök-visszahordási tesztet végeztünk el. Ekkor még a kölykök nem képesek önállóan visszamászni a fészekbe, ezért volt érdemes ezt az időpontot választani. A kölyök visszahordási teszt során a kölyköket 10 percre elválasztottuk anyjuktól és távol tőle, egy másik ketrecben helyeztük el őket. A 10 perc leteltével 3 kölyköt visszatettünk az anyai ketrec különböző sarkaiba távol a fészektől, majd 5 percen keresztül vizsgáltuk mennyi idő telik el az első kölyök felvételéig, illetve az utolsó kölyök fészekbe történő visszahordásáig. Mivel a visszahordás általában bőven 2 perc alatt megtörtént, ezért a kölykeiket nem visszahordó anyák esetében 3 percet adtunk meg visszahordási időnek, csökkentve ezzel a szórást, amit egy 5 perces érték megadása okozott volna.

3.6.3. Emelt keresztpalló teszt

Az ozmotikus minipumpával felszerelt laktáló patkány anyákon a spontán anyai viselkedés, illetve a kölyök-visszahordás vizsgálata mellett a szülés utáni 7. napon emelt keresztpalló tesztet is elvégeztünk. A keresztpalló fekete műanyagból készült, 80 cm-re föld feletti karokkal, a karok szélessége 15 cm, hossza 50 cm, a középső négyzetes terület 15x15 cm és a zárt kar falai 70 cm magasak. Minden állat tesztelése előtt a pallók felületeit vízzel és alkohollal mostuk le, majd megszártottuk. A patkány anyákat a középső négyzetes területre helyeztük fejjel a zárt kar felé, majd 5 percig vizsgáltuk viselkedésüket. A nyílt karokban töltött idő százalékos arányát számoltuk ki az 5 percen belül, illetve a nyílt karba lépések arányát az összes zárt vagy nyílt karba történő belépéshez képest (belépés: az állat testének legalább 2/3-a az adott karban helyezkedik el), a szorongás-szerű viselkedés indikátoraként, valamint a belépések számát a mozgékonyág mérésének céljából.

3.7. Hormon mérések

3.7.1. Prolaktin radio-immuno-assay (RIA)

A szérum prolaktin koncentrációjának mérését a Cservenák és mtsai. által leírtak alapján radio-immuno-assay (RIA) módszer segítségével végeztük el (Cservenák és mtsai. 2013). A chloramine-T módszert alkalmaztuk a jodinációhoz, illetve protein A-t (BactASorb, Human Rt, Gödöllő, Magyarország) a kötött és szabad hormon elkülönítéséhez. Az adatok összegyűjtéséhez, valamint a görbére illesztéshez szükséges számításokhoz LKB Wallac 1272 CliniGamma gépet illetve szoftvert használtunk (PerkinElmer®, Waltham, MA, USA). Az assay-eken belüli variancia 10%-os, az assay-k közötti pedig 14%-os volt. Minden mintát duplikátumban mértünk le.

3.7.2 IGF-1 ELISA

A szérum IGF-1 koncentrációjának méréséhez IGF-1 Rat ELISA Kit-et használtunk (Invitrogen™). Először 100 µl mintát, illetve a standard hígítási sor egyes tagjait mértünk be a megfelelő wellékbe, majd az egész plate-t 2,5 órán keresztül inkubáltuk, amit 1 órán keresztül 80x hígítású biotinilált antitesttel, majd 200x-os hígítású Streptavidin-HRP-vel 45 percen keresztül való inkubáció követett. Az előhívás TMB Substrate-tal történt sötétben 30 percig, ezt STOP oldattal állítottuk le. Végül ELISA plate olvasó segítségével mértük meg az abszorbanciát, amit a program segítségével a standard hígítási sor görbéjéhez képest koncentrációknak feleltettünk meg.

3.8. Primer mediobasalis hipotalamikus sejtkultúrák előállítása

Összesen 30, patogénmentes, újszülött Wistar-patkányt (Charles-River Laboratories, Wilmington, MA, USA) dekapitáltunk tízes csoportokban a születésük után, majd a mediobasalis hipotalamuszt izoláltuk. A szövetblokkokat azonnal jéghideg médiumba tettük, amely 2% B27-et, 49% Dulbecco's modified Eagle's medium-ot, 49% F12 médiumot és penicillin-streptomycint tartalmazott (DMEM-F12-B27-P/S, Gibco®, Life Technologies). Ezután ebben a médiumban először homogenizáltuk és centrifugáltuk a szövetet 4 percig 3000 rpm sebességgel, majd a felülúszót eltávolítottuk és 2 ml 0,1 % DMEM-ben hígított Trypsint adtunk a pellethez. Ebben 4 percig, 37°C-os vízfürdőben inkubáltuk a szöveti homogenizátumot, majd 2 ml 0,5% DNÁzt és 1% BSA-t tartalmazó DMEM-P/S oldatot adtunk hozzá, összekevertük és 4 percig 3000

rpm sebességgel centrifugáltuk. Ezután ismét leszívtuk a felülúszót, 2 ml DMEM-F12-B27-P/S-el kevertük össze a pelletet és 4 percig 3000 rpm sebességgel centrifugáltuk. Ezt a lépést kétszer is megismételtük, majd az így kapott pelletet DMEM-F12-B27-P/S-ben oldottuk fel, úgy hogy a koncentráció $3,9 \times 10^5$ sejt/ml legyen. Ebből 0,5 ml-t illetve 1 ml-t ültettünk ki polilizinnel bevont wellékbe, végül a plate-ket 37°C-os 5% CO₂-os levegőjű inkubátorba helyeztük. Az inkubátorban töltött első 24 óra után a médium felét wellenként lecseréltük kontroll DMEM-F12-B27-P/S médiumra illetve ebben oldott 25 µg/ml koncentrációjú IGF-1-re (PeptideSciences®). A médium felét minden nap kicseréltük a leírt módon és 5. napon használtuk fel a sejteket további vizsgálatokhoz. A kísérletek 4 nap kezelés után történő kivitelezése egyrészt az in vitro tenyésztés szempontjából volt előnyös, másrészt az ozmotikus minipumpás in vivo kezelésnél is 4 nap után jelentkezett az anyai motivációra kifejtett hatás.

3.9. Western blot analízis

A sejt kultúrák IGF-1 vagy kontroll kezelése után eltávolítottuk a médiumot, ezután kétszer foszfát pufferrel (PB) mostuk, majd RIPA lízis pufferrel (1 M Na-ortovanadát, 1 M NaF, Triton X100, TNE puffer: Trisma, EDTA, NaCl, pH = 7,4) és proteáz inhibitorral (40 µl proteáz inhibitor / 1 ml RIPA) kevertük össze a sejteket pipettahegy segítségével. Az utóbbi RIPA + proteáz inhibitor oldatban gyűjtöttük össze a sejteket a plate-ből és 4°C-on, 16000 rpm-mel centrifugáltuk őket. Ezt követően megmértük az egyes minták protein koncentrációit és 1 µg/µl-re egyenlítettük ki, majd Laemmli-puffert (1% bromofenol kék, 1,5 M Trisma, 99,5% glicerol, Na-dodecil szulfát, β-merkaptóetanol) adtunk hozzá és 90°C-on melegítettük 5 percen keresztül. Gélben történő futtatás után a fehérjéket membránra (0,45 µm polivinil-difluorid, Amersham™ Hybond™, Life Sciences) vittük át, amit 2 órán keresztül 3%-os BSA oldatban blokkoltuk. Ezután primer antitestekkel kezeltük a membránokat 24 órán keresztül (1:1000, nyúlban termelt anti-Ser31-foszfo-TH, SAB4300674, Sigma; 1:10000, nyúlban termelt anti-Ser40-foszfo-TH, T9573, Sigma; 1:1000, nyúlban termelt anti-TH, AB152, Millipore; 1:2000, egérben termelt anti-β-III-tubulin, T8578, Sigma) és szekunderrel 1 órán keresztül (1:10000, peroxidáz jelölt kecskében termelt anti-nyúl vagy anti-egér IgG; Jackson Immuno Research). Az előhíváshoz a membránokhoz Clarity™ Western ECL szubsztrátot adtunk (Bio-Rad), majd ChemiDoc™ MP (Bio-Rad) készülékkel detektáltuk a kemilumineszcens jelet. Végül a sávok intenzitását

ImageLab (Bio-Rad) program segítségével számítottuk ki. A foszfo-TH - TH intenzitások arányát a következőképpen számoltuk ki: (foszfo-TH intenzitás/ β -III-tubulin intenzitás)/(TH intenzitás/ β -III-tubulin intenzitás), majd a kapott értékeket kétmintás t-teszttel hasonlítottuk össze.

3.10. Statisztikai analízis

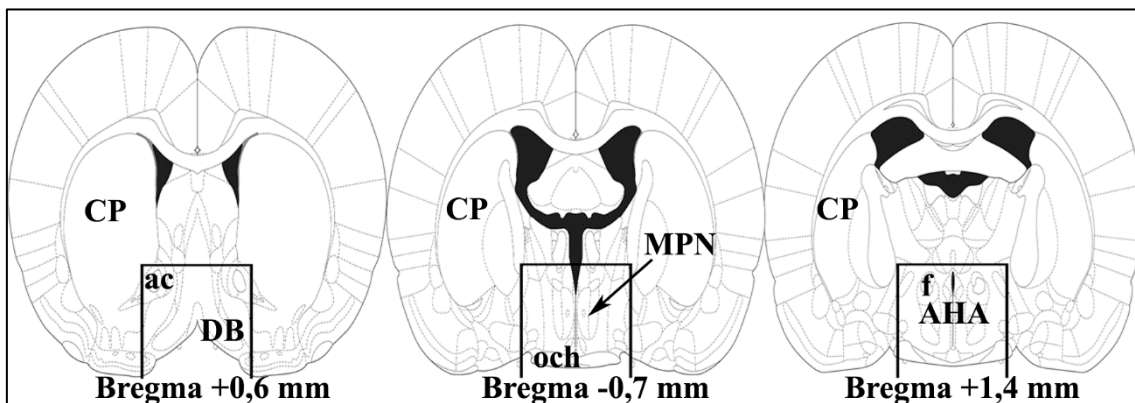
A statisztikai elemzést STATISTICA 13.2 program (Dell Inc., Round Rock, TX, USA) segítségével végeztük el. A normalitást Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. Az RT-PCR eredmények, in situ hibridizációs szignál denzitások, emelt keresztpalló tesztek, spontán anyai viselkedés vizsgálat, kölyök visszahordási teszt, kölykök 1 óra szoptatás alatti súlyváltozása és a Western Blot intenzitások összehasonlításakor kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Az IGF-1 kezelés szoptatás indukálta prolaktin, illetve IGF-1 szekrécióra kifejtett hatásának elemzésekor kétszemponos ismételt méréses varianciaanalízist és Newman-Keuls post-hoc tesztet alkalmaztunk. A varianciák homogenitását Levene-teszttel ellenőriztük. A szoptatás hatását az IGF-1 szekrécióra egyszemponos ismételt méréses varianciaanalízissel és Dunnett-féle post-hoc analízissel vizsgáltuk. A szoptatás alatti szérum prolaktin és IGF-1 szintek korrelációját Spearman-féle rangkorrelációval elemeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az IGFBP-3-ra vonatkozó microarray eredmények validálása

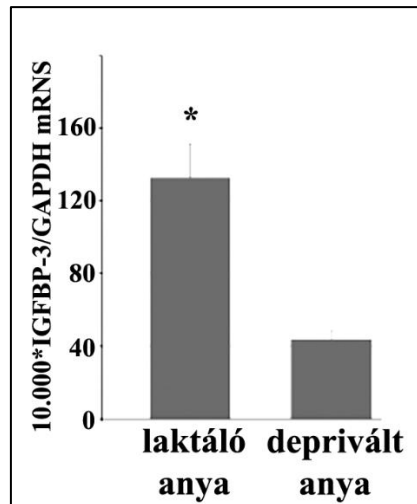
4.1.1. A preoptikus terület microarray vizsgálatánál tapasztalt IGFBP-3 expresszió fokozódás ellenőrzése kvantitatív RT-PCR-rel

Tekintettel a microarray eredmények között esetlegesen felmerülő nagyszámú fals pozitív adatra, igazolnunk kellett, hogy valós az IGFBP-3 esetében tapasztalt több, mint kétszeres emelkedés laktáló anyákban. Ezért 9 laktáló és 8 deprivált anyából disszekáltuk a preoptikus területet (6. ábra) RT-PCR-hez, amely során sikerült szignifikánsan magasabb IGFBP-3 mRNS szintet kimutatnunk laktáló anyákban deprivált anyákhoz képest. Az IGFBP-3 mRNS szint ($10000 \cdot \text{IGFBP-3 mRNS szint}/\text{GAPDH mRNS szint}$) $134,28 \pm 19,90$ volt laktáló anyákban és $42,86 \pm 5,71$ deprivált anyákban, miközben a GAPDH mRNS szintjében nem volt különbség a két csoport között. (7. ábra)



6. ábra: a disszekált preoptikus terület

A disszekált preoptikus terület határai coronalisan a chiasma opticum (och) előtt, 2 mm-re ettől caudalisan, horizontalisan a comissura anterior (ac) felett, végül saggitalisan 2 mm-re a középvonaltól. A minta így nem csak a preoptikus területet, hanem a Broca-féle diagonális köteget (DB), comissura anteriort (ac), tractus opticust és a ventralis pallidumot is tartalmazta. AHA – anterior hipotalamikus area, f – fornix, CP – caudatus putamen, MPN – nucleus preopticus medialis

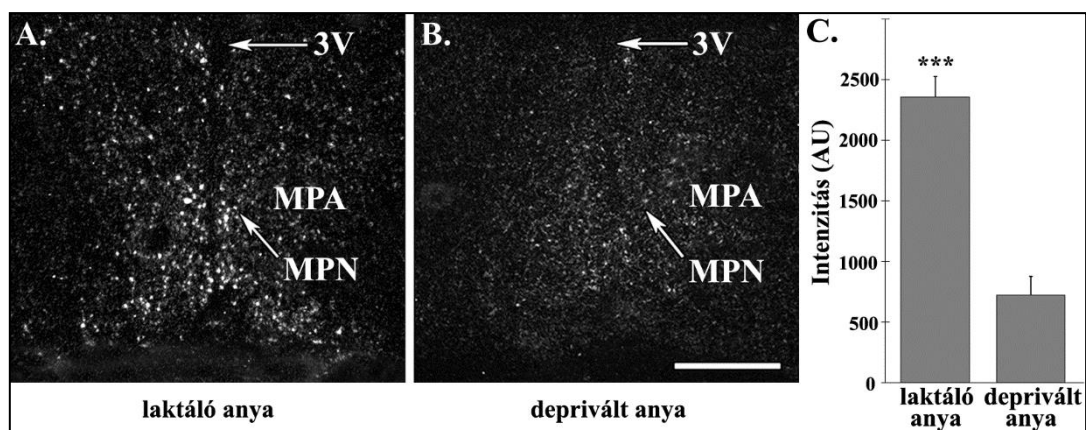


7. ábra: IGFBP-3 expresszió változása a preoptikus területen

RT-PCR-rel szignifikánsan magasabb IGFBP-3 mRNS expressziót sikerült kimutatni laktáló anyákban (n=9) deprivált anyákhoz (n=8) képest. *: $p < 0,05$

4.1.2. Az IGFBP-3 expresszió helyének és mértékének vizsgálata a preoptikus területen in situ hibridizációs hisztokémiával (ISHH)

Miután RT-PCR-el sikerült igazolnunk a microarray során tapasztalt fokozott IGFBP-3 expressziót a preoptikus területen, megvizsgáltuk azt, hogy hol találhatóak az IGFBP-3-at laktáló anyákban nagyobb mértékben expresszáló sejtek. Ehhez ISHH-t használtunk, két különböző, nem-átfedő szekvenciákat tartalmazó in situ hibridizációs probe-al, melyek ugyanazt az eloszlási mintázatot mutatták, ezzel igazolva a kapott jel specificitását IGFBP-3-ra. Az autoradiográfiás jel a medialis preoptikus areában (MPOA), azon belül is a nucleus preopticus medialisban (MPN) volt a legerősebb (8. ábra A-B). A jel denzitásának kvantálása megmutatta, hogy laktáló anyákban jóval magasabb volt az IGFBP-3 mRNS szint, mint depriváltakban, ez is igazolta a microarray és RT-PCR eredményeket. A denzitometriás intenzitás $2357,4 \pm 168,8$ AU volt a laktáló anyák MPOA-jában és $719,5 \pm 157,92$ AU a depriváltaknál (8. ábra C).



8. ábra: IGFBP-3 in situ hibridizációs hisztokémia a preoptikus területen

A-B: A sötét látótérrel készült felvételeken a fehér jel mutatja az IGFBP-3 mRNS elhelyezkedését, a radioaktívan jelölt in situ hibridizációs probáknak köszönhetően. A 3. agykamra (3V) két oldalán, medialis preoptikus magban (MPN) lokalizálódnak túlnyomórészt az IGFBP-3-at expresszáló sejtek. MPA – dorsolateralis medialis preoptikus area. A lépték 400 μ m-t jelöl.

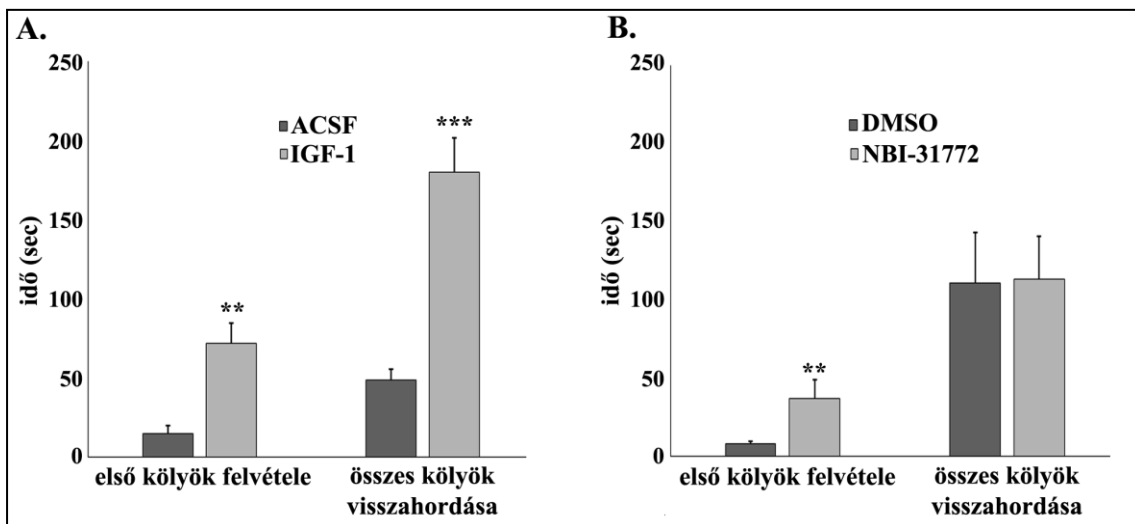
C: A denzitometriás analízis eredményét ábrázoló diagram azt mutatja, hogy laktáló anyákban szignifikánsan magasabb intenzitású hibridizációs jelet detektáltunk a medialis preoptikus areában (n = 6-6). Az intenzitás arbitrary unit-ban (AU) van kifejezve. ***: $p < 0,001$

4.2. Az IGF-1 anyai motivációra való hatása

4.2.1. IGF-1, illetve IGFBP-3-inhibitor agykamrába adagolásának hatása az anyai motivációra

Az IGF-rendszer anyai motivációra kifejtett hatását a következőképpen vizsgáltuk: IGF-1-et, valamint egy IGFBP-3 ligand inhibitor (NBI-31772) icv. adtunk be patkány anyáknak kanülhöz csatlakoztatott ozmotikus minipumpa segítségével. Az ozmotikus minipumpát, amely folyamatos, lassú adagolást biztosít, a szülés utáni 2. napon ültettük be patkány anyákba. Az anyák egy csoportját IGF-1-el kezeltük, az ő kontrolljaikat ACSF-el (n=10, mindkét csoportban), míg egy másik csoportot 1%-os dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldott NBI-31772-vel, kontrolljaikat 1%-os DMSO-val (n=8, mindkét csoportban). A DMSO ACSF-ben volt feloldva. A szülés utáni 6. napon kölyök visszahordási tesztet végeztünk az állatokkal és jelentősen megnyúlt időket mértünk az IGF-1-el, illetve NBI-31772-vel kezelt csoportoknál. 4-5-ször hosszabb időbe telt a kezelt anyáknak a kontrollokhöz képest, hogy az első kölyköt visszavigyék

a fészekbe (IGF-1: $71,9 \pm 12,9$ s, ACSF: $15,3 \pm 4,7$ s ($p < 0,01$); NBI-31772: $36,6 \pm 11,9$ s, 1% DMSO: $7,8 \pm 1,5$ s). Az összes kölyök visszahordása pedig 3,7-szer hosszabb ideig tartott az IGF-1-el kezelt anyáknál, mint az ACSF-el kezeltéknél, azonban az NBI-31772-vel kezeltéknél ebben nem volt különbség a kontrollokhöz képest (IGF-1: $180,2 \pm 21,6$ s, ACSF: $48,9 \pm 6,7$ s ($p < 0,001$); NBI-31772: $113 \pm 27,6$ s, 1% DMSO: $111 \pm 32,3$ s) (9. ábra). A szülés utáni 4. naptól kezdve 5 napon keresztül vizsgáltuk az állatok spontán anyai viselkedését, amelyet 5 viselkedési forma százalékos aránya alapján írtunk le: high kyphosis, licking/grooming, prone nursing, supine nursing, mother out of the nest. Az anyákat naponta 3 alkalommal 1-1 órán keresztül figyeltük, óránként 20 megfigyelést végezve és nem találtunk különbséget az egyes csoportok spontán anyai magatartása között (3. táblázat).



9. ábra: IGF-1 és IGFBP-3 inhibitor (NBI-31772) hatása a kölyök visszahordására

A-B: Laktáló anyák agykamrájába a szülést követő 2. naptól kezdve ozmotikus minipumpák segítségével folyamatosan adagoltunk ACSF-et ($n=10$), vagy DMSO-t ACSF-ben oldva ($n=8$) kontrollként, illetve IGF-1-et ($4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ACSF-ben oldva; $n=10$) és NBI-31772-t ($1,66 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ DMSO-ACSF-ben oldva; $n=8$).

A: Az IGF-1 agykamrai beadása szignifikánsan növelte az első kölyök felvételéhez és az összes kölyök visszahordásához szükséges időt. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

B: Az IGFBP-3 ligand inhibitor NBI-31772-vel történt kezelés az első kölyök felvételéhez szükséges időt növelte meg szignifikánsan.

3. táblázat: a kezelt és kontroll állatok spontán anyai viselkedése

A szülés utáni 4. és 9. nap között az állatok spontán anyai viselkedéséről mutat adatokat a táblázat. A százalékok az egyes viselkedésformák arányát jelzik a napi 60, összesen 300 megfigyelésen belül.

	ACSF	IGF-1	DMSO	NBI-31772
high kyphosis (%)	26 ± 2.34	21.43 ± 2.22	23.8 ± 1.98	23 ± 2.68
licking/grooming (%)	7.03 ± 0.54	5.13 ± 0.73	6 ± 0.84	7.96 ± 1.43
prone nursing (%)	21.14 ± 8.15	21.71 ± 7.91	24.62 ± 15.46	20.22 ± 5.24
supine nursing (%)	5.23 ± 4.17	7.17 ± 5.4	7.76 ± 7.91	6.8 ± 4.56
fészken kívül (%)	42 ± 3.08	45.71 ± 3.1	39 ± 5.08	44.9 ± 4.72

4.2.2. A szorongás-szerű viselkedés és a motoros aktivitás vizsgálata

Az állatokat a szülés utáni 7. napon emelt keresztpalló tesztnek vetettük alá, hogy megvizsgáljuk: kezelés hatására történik-e valamilyen változás a szorongás-szerű viselkedésükben, vagy motoros aktivitásukban. A belépések számában, mint a motoros aktivitás indikátorában, nem volt különbség a kezelt és kontroll csoportok között, továbbá egyik kezelés sem okozott változást a nyílt karba lépések százalékos arányában, amely a szorongás-szerű viselkedés markere (4. táblázat).

4. táblázat: A kezelt és kontroll állatok emelt keresztpalló tesztben nyújtott teljesítménye

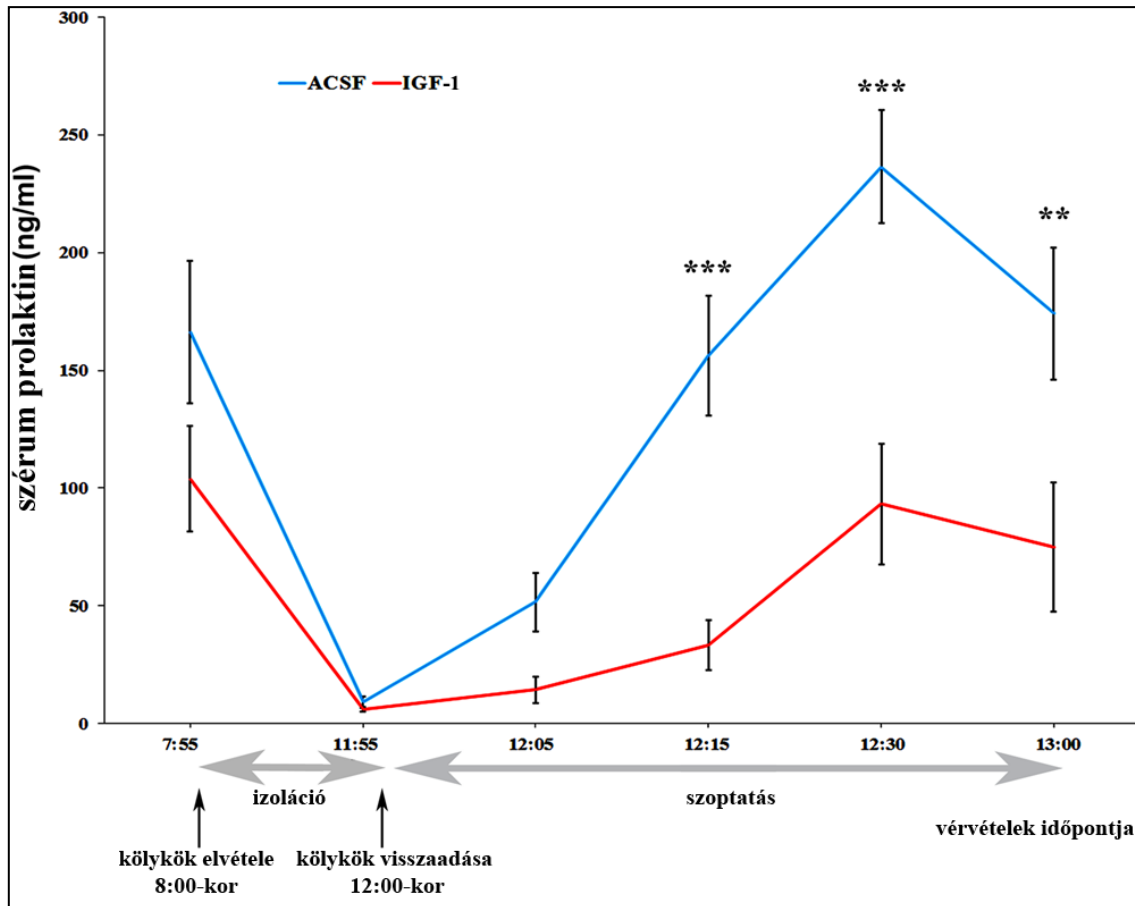
A szülés utáni 7. napon emelt keresztpalló tesztet végeztünk velük. A táblázat az összelépésszámot, azaz az állatok helyváltoztatásának gyakoriságát mutatja az 5 perces vizsgálat alatt, valamint a nyílt karba lépések százalékos arányát az összes belépéshez viszonyítva, azaz milyen arányban választotta az állat a nyílt kart a zárt helyett.

	ACSF	IGF-1	DMSO	NBI-31772
belépések száma	10.57 ± 2.01	11.4 ± 1.65	12 ± 1.78	11 ± 1.58
nyílt karba lépések (%)	46.33 ± 3.24	36.36 ± 6	46.66 ± 4.51	45.22 ± 5.07

4.3. IGF-1 laktációra kifejtett hatása

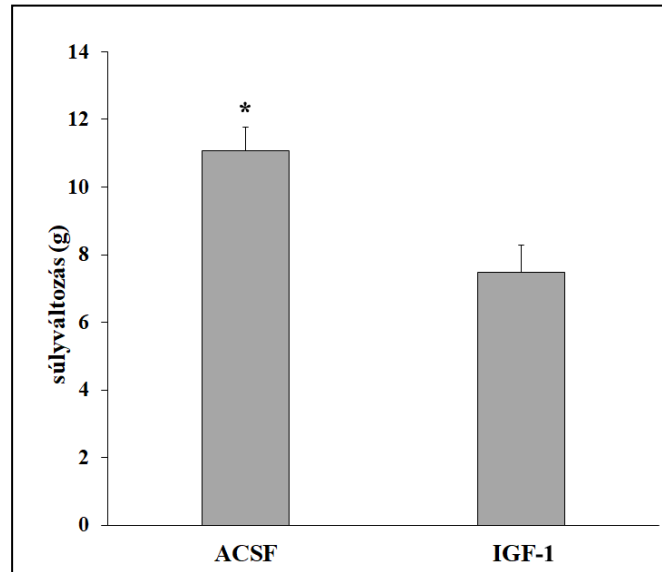
4.3.1. IGF-1 hatása a szoptatás indukálta prolaktin szekrécióra

Az IGF-1 anyai motivációra kifejtett hatása után az anyai adaptáció másik fontos elemét, a laktációt vizsgáltuk, annak is kulcspontját, a szoptatás indukálta prolaktin szekréciót. Agykamrába adagoltunk IGF-1-et (n=7), illetve kontrollként ACSF-et (n=8) ozmotikus minipumpák segítségével ugyanabban a kísérleti elrendezésben, mint az anyai motiváció vizsgálatakor. A szoptatás indukálta szérums prolaktin szint változásokat a szülés utáni 14. napon vizsgáltuk. A kölykök 4 órára történő izolációja előtt mért prolaktin koncentrációk $166,3 \pm 0,3$ és $103,96 \pm 22,35$ ng/ml voltak az ACSF, illetve IGF-1 kezelt csoportokban. A 4 órás szeparáció végére a prolaktin koncentráció egy nagyon alacsony, bazális szintre csökkent: $9,35 \pm 2,07$ és $5,96 \pm 0,74$ ng/ml-t mértünk közvetlenül a kölykök visszaadása előtt. Miután a kölyköket visszaadtuk anyjuknak, azonnal megkezdődött a szoptatás, amely gyors szérums prolaktinszint emelkedést okozott. A kölykök visszaadása után 5, 15, 30, 60 perccel a következő koncentrációkat mértük (ng/ml-ben): $51,59 \pm 14,44$; $156,14 \pm 25,42$; $236,45 \pm 23,94$; $174,1 \pm 27,94$ az ACSF-kezelt anyákban, valamint $14,44 \pm 5,67$; $33,17 \pm 10,63$; $93,2 \pm 25,73$ és $75,06 \pm 27,4$ az IGF-1-kezelt anyákban. Az IGF-1 hatását szoptatás indukálta prolaktin szekrécióra kétszemponos ismételt méréses varianciaanalízissel elemeztük. A kezelés hatása szignifikáns volt ($p < 0,001$; $F=33,85$), az idő-kezelés interakció ($p < 0,01$; $F=3,34$) és az eltelt idő hatása is ($p < 0,001$; $F=17,69$). Az idő, mint szempont a szoptatást jelentette, ugyanis az idő elteltével ennek megléte változott. A második időpontban már 4 órája nem szoptattak az anyák, kölykeiktől elkülönítve voltak, viszont a harmadik időpontban 5, a negyedikben 15, az ötödikben 30, a hatodikban 60 perce szoptatták kölykeiket. Így a második és a korábbi illetve későbbi időpontok közötti szignifikáns eltérésért a szoptatás tehető felelőssé. Newman-Keuls post-hoc analízist alkalmaztunk, hogy azonosítsuk azokat az időpontokat, amikor különbség van az IGF-kezelt és kontroll csoportok között: 15, 30 és 60 perccel a kölykök visszaadása, azaz a szoptatás kezdete után szignifikánsan alacsonyabb volt a kezelt anyák prolaktin szintje. Tehát a statisztikai elemzés megmutatta, hogy az IGF-1 jelentősen csökkenteni tudja a szoptatás indukálta prolaktin szekréciót (10. ábra). Ezt támasztja alá az IGF-kezelt anyák kölykeinek kisebb mértékű súlygyarapodása 1 óra szoptatás alatt: $7,5 \pm 1,8$ g, szemben az ACSF-kezelték $11,1 \pm 1,4$ g súlyával (11. ábra).



10. ábra: IGF-1 hatása a szoptatás indukálta prolaktin szekrécióra

Prolaktinmérés céljából hat alkalommal vettünk vért az állatoktól a szülés utáni 14. napon: először 5 perccel a kölykök elvétele előtt; másodszer mielőtt a kölyköket visszaadtuk 4 óra izoláció után az anyjuknak; harmadik, negyedik, ötödik és hatodik alkalommal pedig 5, 15, 30 és 60 perccel a kölykök visszaadása (azaz a szoptatás kezdete) után. A diagram ennek megfelelően a szérumból a prolaktin koncentrációkat mutatja IGF-1-el kezelt (n=7, piros) és kontroll anyákban (n=8, kék) az elválasztás és szoptatás során. A vízszintes tengely a vérvételek időpontjait mutatja, az egyes pontok közötti távolság nem arányos a köztük eltelt idővel. A tengely alatt szürke nyilak jelzik az izoláció és szoptatás periódusait. A kezdeti időpontban az IGF-1 kezelt állatok szérumból a prolaktin koncentrációja valamivel alacsonyabb volt, viszont ez a különbség Newman-Keuls post hoc teszttel elemezve nem volt szignifikáns. Az izoláció egyformán alacsony szintre csökkentette a prolaktin koncentrációját mindkét csoportban. Ezt követően a szoptatás alatt jelentősen emelkedni kezdett a prolaktin koncentráció, azonban az IGF-1 kezelés szignifikánsan gyengítette ezt az indukciót, ez a hatás 15, 30 és 60 percnél is látható különbséget eredményezett (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$)



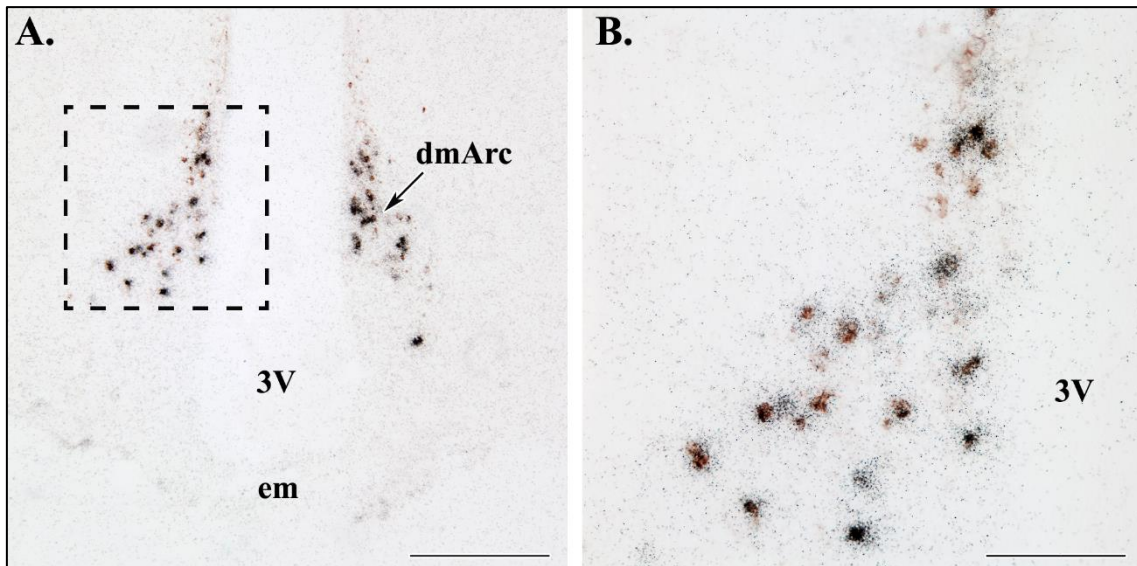
11. ábra: Kölykök súlyváltozása egy óra szoptatás alatt

A kölykök 4 órát anyjuktól izolálva töltöttek, majd amikor visszatértek, megkezdődött a szoptatás. Megmértük az almok súlyát az anyához visszaadás előtt, majd egy óra elteltével. Az így mért különbséget mutatja a diagram és látható, hogy az IGF-1 kezelt anyák kölykeinek súlya szignifikánsan kisebb mértékben emelkedett a szoptatás hatására. *: $p < 0,05$

4.3.2. Az IGF-1 hatás hátterében álló lehetséges mechanizmusok

4.3.2.1. IGFBP-3 expresszió a tuberoinfundibularis dopaminerg (TIDA) sejtekben

A bevezetőben már említettem, hogy a prolaktin szekréció fő szabályozói hipotalamikusan az arcuatus mag dorsomedialis szubdivíziójában található TIDA neuronok, melyeknek legfőbb immunhisztokémiai markere a tirozin-hidroxiláz (TH). Megvizsgáltuk, hogy ezek a sejtek laktáló anyákban expresszálják-e az IGF-rendszer fontos elemét, az IGF-1-et funkcionálisan inaktív komplexben megkötni képes IGFBP-3-at, ezért kombináltuk a TH immunhisztokémiát IGFBP-3 *in situ* hibridizációs hisztokémiával (ISHH). Nagymértékű kolokalizációt találtunk: a TIDA neuronok 67,3%-a tartalmazott IGFBP-3-at és az IGFBP-3 neuronok 85,9%-ának volt pozitív a TH immunreaktivitása ($n=5$). Ez azt mutatja, hogy a prolaktin szekréciót szabályozó TIDA sejtek expresszálják az IGF-1-et szekvesztrálni és ezáltal hatását semlegesíteni képes IGFBP-3-at (12. ábra).

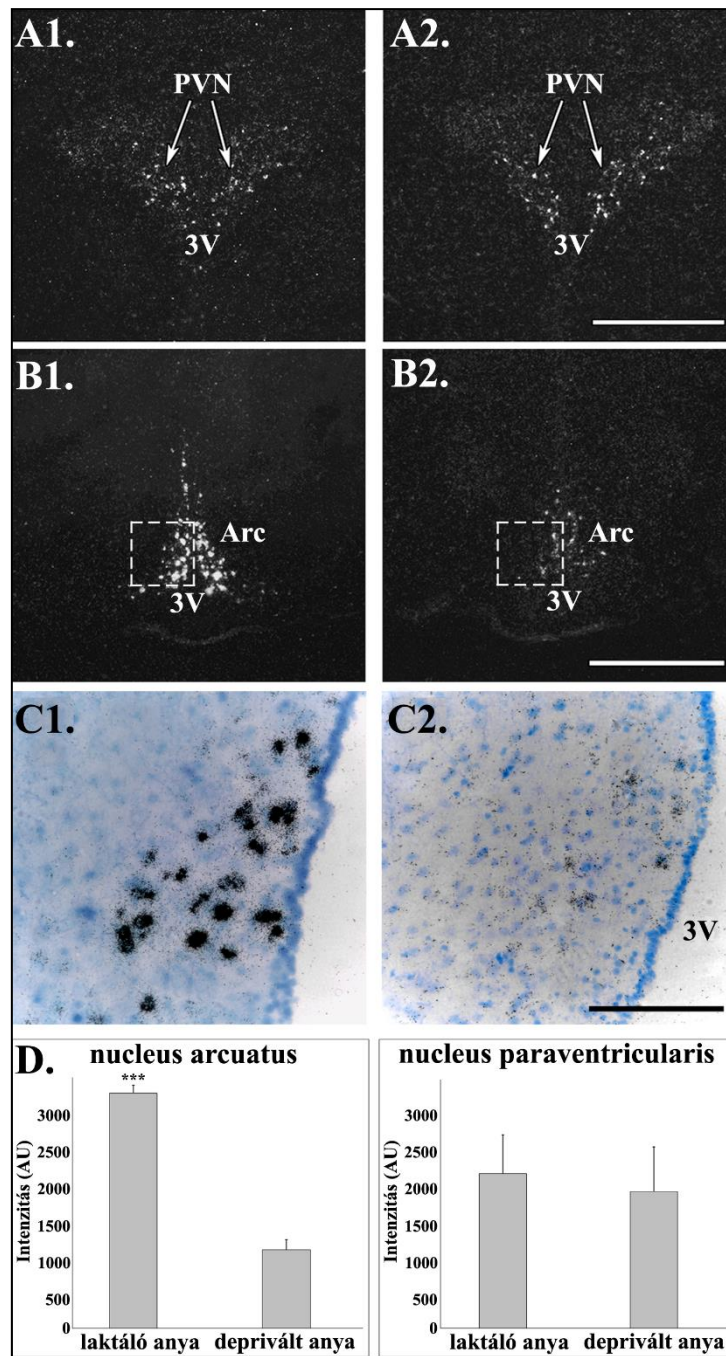


12. ábra: IGFBP-3 in situ hibridizációs hisztokémia és TH immunhisztokémia kombinációja a dorsomedialis nucleus arcuatusban (dmArc)

A-B: Az IGFBP-3 mRNS-re specifikus radioaktívan jelzett probe kötődési helyeit mutatják a fekete szemcsék, míg a TH immunopozitív sejtek barna színűek. Azt láthatjuk, hogy az arcuatus mag dorsomedialis szubdivíziójában a TH enzim és az IGFBP-3 mRNS nagymértékben kolokalizációt mutat, azaz a TH pozitív sejtek IGFBP-3-at expresszálnak. 3V – 3. agykamra; em – eminentia mediana. Lépték az A részen 400 μm a B részen 100 μm .

4.3.2.2. A TIDA sejtek IGFBP-3 expressziója laktáló és deprivált anyákban

In situ hibridizációs hisztokémiát alkalmaztunk, hogy megvizsgáljuk van-e különbség TIDA-sejtek IGFBP-3 expressziójában laktáló és deprivált anyák között ($n=6$, mindkét csoportban). A nucleus arcuatus dorsomedialis szubdivíziójának ISHH jele jóval erősebb volt laktáló anyákban és ezt a szignifikáns különbséget a denzitás kvantálása is alátámasztotta. A paraventricularis magban is találtunk feltűnő jelet, azonban itt nem tapasztaltunk különbséget a két csoport között. A denzitometriás intenzitás az arcuatus magban 3187 ± 104 AU volt laktáló anyák, míg 1066 ± 132 AU deprivált anyák esetében, ezzel szemben a paraventricularis magban $2102,2 \pm 523,9$ AU és $1856 \pm 606,1$ voltak az értékek (13. ábra).



13. ábra: IGFBP-3 expresszió a nucleus arcuatusban (Arc) és paraventricularisban (PVN)

A-B: Az in situ hibridizációs hisztokémiáról készült sötétlátóteres felvételeken a fehér pontok jelzik az IGFBP-3 mRNS lokalizációját a nucleus paraventricularisban (PVN) és arcuatusban (Arc). A PVN-ben hasonló a jel intenzitása laktáló (A1) és deprivált anyáknak (A2). Ezzel szemben az arcuatus magban jóval erősebb expresszió látható laktáló anyáknak (B1), mint depriváltaknak (B2).

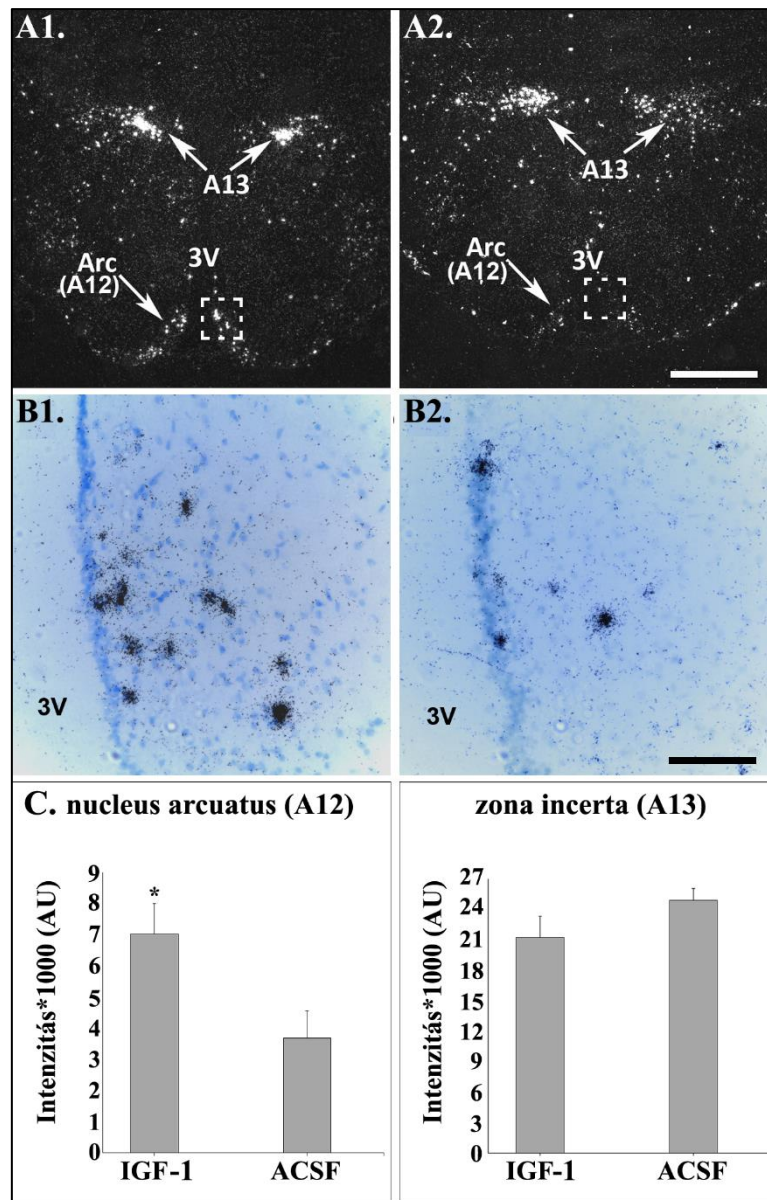
C: A nagy nagyítású világos látóteres felvételeken a B1-B2 képeken bekeretezett terület látható. A fekete pontok az egyes autoradiográfiás szemcséknek felelnek meg az arcuatus mag dorsomedialis szubdivíziójában. Laktáló anyákban (C1) egyértelműen erősebb jel látható, mint depriváltakban (C2).

D: A denzitometriás analízis kimutatta, hogy az IGFBP-3 in situ jel intenzitása szignifikánsan magasabb volt laktáló anyákban a depriváltakhoz képest a nucleus arcuatusban, amíg a PVN-ben nincs különbség. ***: $p < 0,001$

3V – 3. agykamra. Lépték: A és B 800 μm , illetve C esetében 200 μm .

4.3.2.3. IGF-1 hatása a TIDA sejtek TH expressziójára in vivo

Mivel tudjuk, hogy a TH enzim a dopaminszintézis sebesség-meghatározó eleme és mennyisége illetve aktivitása alapvetően befolyásolja a TIDA sejtek által szekretált dopamin mennyiségét, megvizsgáltuk milyen hatással van az IGF-1 agykamrai beadása az enzim expressziójára a TIDA neuronokban (A12 sejtcsoport). ISHH-t alkalmaztunk, hogy a TH expresszió szintjét megmérjük az A12 dopaminerg sejtcsoportban és a zona incertában, amely szintén dopaminerg sejteket (A13 sejtcsoport) tartalmaz, de a laktáció szabályozásában nem vesz részt. A hibridizációs jel sokkal erősebb volt az ozmotikus minipumpa segítségével 12 napon keresztül IGF-1-el kezelt állatok arcuatus magjában, mint az ACSF kezeltékében ($n=6$, mindkét csoportban). Ugyanakkor a zona incerta jelintenzitásában nem volt különbség a két csoport között. A denzitometriás intenzitás az arcuatus magban kétszerese volt az IGF-1 kezeltékben a kontrollokhöz képest: $6990,5 \pm 980,4$ AU és $3667,5 \pm 858,6$ AU. A zona incertában nem tapasztaltunk eltérést: $21185,5 \pm 2074,5$ AU és $24844,3 \pm 1160,4$ AU. (14. ábra)



14. ábra: TH expresszió IGF-1-kezelt és kontroll állatok nucleus arcuatusában (A12) és zona incertájában (A13)

IGF-1-el (n=6) és ACSF-el (n=6), mint kontrollal icv. folyamatosan kezelt laktáló anyák agyában vizsgáltuk meg in situ hibridizációs hisztokémiával a TH expressziót.

A: A sötétlátóteres felvételeken láthatjuk, hogy a TH expresszió (fehér pontok) jelentős volt a zona incertában (A13-as dopaminerg sejtcsoport) és a nucleus arcuatusban (A12-es dopaminerg sejtcsoport), viszont utóbbi területen az IGF-kezelt anyákban (A1) lényegesen nagyobb mértékű volt a kontrollokhoz (A2) képest.

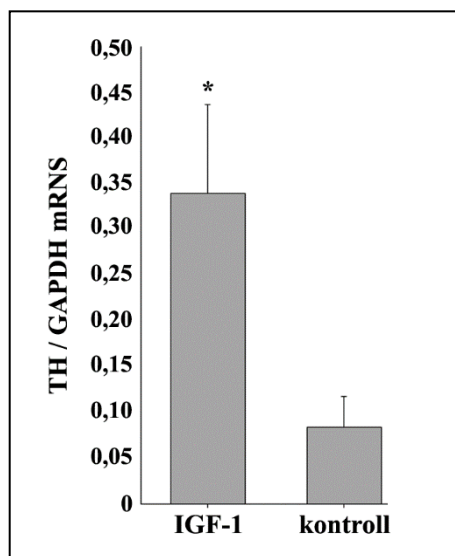
B: A nagy nagyítású világos látóteres felvételeken az A1-A2 képen bekeretezett dorsomedialis arcuatus magot láthatjuk. Az autoradiográfiás szemcsék (fekete pontok) sűrűsége jóval magasabb kezelt anyákban (B1), mint kontrollokban (B2).

C: A jelintenzitás kvantifikálásánál az arcuatus magban IGF-1 hatására kétszeresére emelkedett expressziót tapasztaltunk, míg a zona incertában nem volt különbség a két csoport között. *: $p < 0,05$

3V – 3. agykamra. Lépték: A 1 mm és B 100 μm

4.3.2.4. IGF-1 hatása a TIDA sejtek TH expressziójára *in vitro*

Mediobasalis hipotalamikus sejt kultúrákat készítettünk újszülött patkányokból, amelyeket 4 napon keresztül IGF-1-et tartalmazó (12,5 $\mu\text{g/ml}$) illetve kontroll médiumban tartottunk. Valós idejű RT-PCR-el megvizsgálva láthattuk, hogy az IGF-1 kezelés szignifikánsan fokozta a TH mRNS expressziót. A TH mRNS szint a GAPDH mRNS szintjének arányában kifejezve $0,34 \pm 0,1$ volt IGF-1 kezelt és $0,08 \pm 0,03$ kontroll kultúrákban (15. ábra).



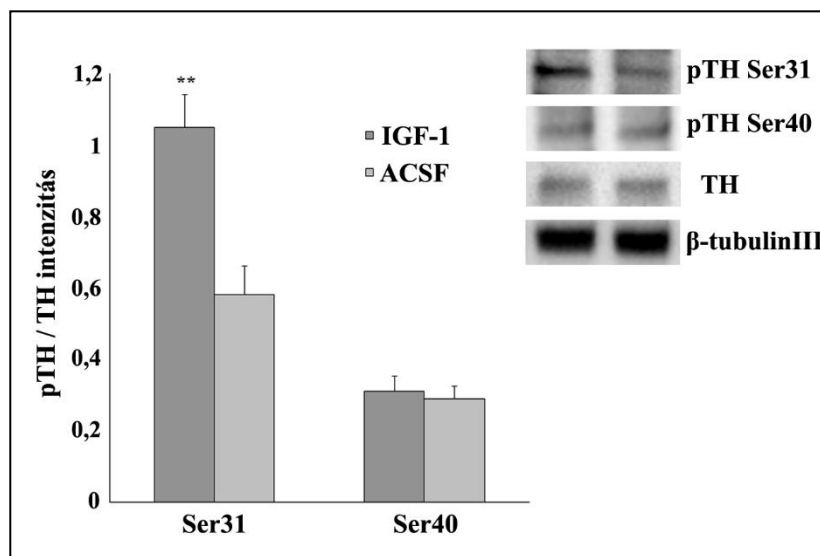
15. ábra: IGF-1 hatása a mediobasalis hipotalamusz TH expressziójára *in vitro*

Mediobasalis hipotalamikus sejt kultúrák ($n = 4-4$) TH expresszióját mértük meg RT-PCR-el. A 4 napon keresztül tartó IGF-1 kezelés (12,5 $\mu\text{g/ml}$) kb. négyszeresére emelte a TH expressziót, amit a diagramon a GAPDH arányában ábrázoltunk. *: $p < 0,05$

4.3.2.5. IGF-1 hatása a TH enzim foszforilációjára *in vitro*

A mediobasalis hipotalamikus sejt kultúrákat kontroll médiumban tenyésztettük 4 napon keresztül, majd az 5. napon egyik csoportjukat 30 percig IGF-1-et tartalmazó médiumban tartottuk (12,5 $\mu\text{g/ml}$), a másikat pedig kontroll médiumban. A 30 perces

időtartamot azért választottuk, mert a szoptatás indukálta prolaktin szekréció esetén is ennyi idő után jelentkezett a markáns IGF-1 hatás. Ezután Western Blot analízisnek vetettük alá a kultúrákat, foszfo-TH-re specifikus antitesteket használva. A Ser31-es és Ser40-es foszforilációs helyet vizsgáltuk, a Ser31-nél IGF-1 hatására nagyobb mértékű foszforiláció következett be, míg Ser40-nél nem volt szignifikáns különbség a két csoport között. Az eredményeket a foszfo-TH intenzitások TH intenzitáshoz való arányában adtuk meg. Ser31: $1,05 \pm 0,09$ az IGF-1 kezelt és $0,58 \pm 0,08$ a kontroll kultúrákban. Ser40: $0,31 \pm 0,04$ az IGF-1 kezelt és $0,29 \pm 0,03$ a kontroll kultúrákban (16. ábra).



16. ábra: A TH enzim foszforilációja IGF-1 kezelés hatására *in vitro*

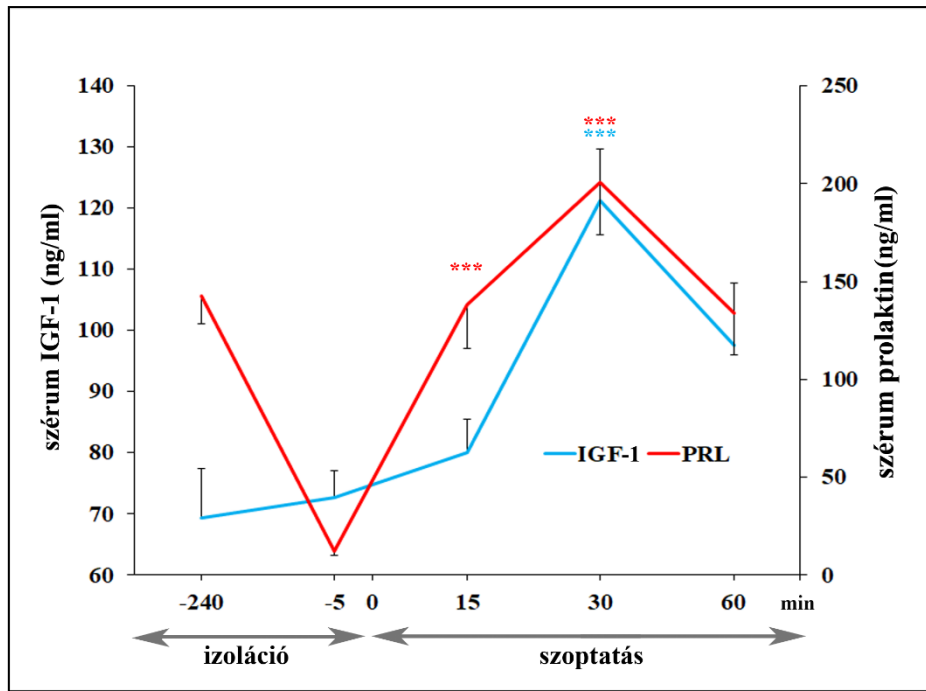
A mediobasalis hipotalamikus sejt kultúrák sejtjeit 30 perc IGF-1-et tartalmazó (n=6) illetve kontroll médiumban (n=6) történő inkubáció után lizáltuk és foszforilációs helyre specifikus antitestekkel megmértük a TH foszforilációját a Ser31-es és 40-es helyen Western Blot analízissel. A diagramon látható eredmények azt mutatják, hogy a 31-es helyen az IGF-1-kezelés fokozott foszforilációt okozott, ezzel szemben a 40-es helyen nem volt változás. **: $p < 0,01$

4.4. Az IGF-1 szérumbeli koncentrációjának változása a laktációval összefüggésben

4.4.1. IGF-1 koncentráció változása a szoptatással és az általa indukált prolaktinnal összefüggésben

4.4.1.1. IGF-1 és prolaktin koncentráció változása szoptatás során

Laktáló anyák (n=14) szérum IGF-1 és prolaktin koncentrációit mértük meg szülés utáni 14. napon: a kölykök 4 óra hosszú izolációja előtt, a kölykök visszaadása előtt, majd 15, 30 és 60 perccel a visszaadás után. A kölykök elválasztása előtt az IGF-1 koncentráció $69,38 \pm 8,1$ ng/ml és a prolaktin $142,86 \pm 14,3$ ng/ml volt. A kölykök izolációja nem volt hatással az IGF-1 szintre, ami $72,63 \pm 4,39$ ng/ml volt az izoláció végén, ezzel szemben a prolaktin a korábban tapasztaltakhoz hasonlóan nagyon alacsony szintre csökkent: $12,46 \pm 2,3$ ng/ml. A kölykök visszaadása után azonnal megkezdődött a szoptatás, ami a prolaktin koncentráció gyors emelkedését váltotta ki, amely már 15 perc után szignifikáns volt és 30 perc után érte el csúcspontját (ng/ml-ben): $138,16 \pm 22,33$ (15 perc után), $200,98 \pm 27,28$ (30 perc után) és $133,83 \pm 21,08$ (60 perc után). Az IGF-1 koncentráció szintén szignifikáns emelkedést mutatott a szoptatás hatására (ng/ml-ben): $79,98 \pm 5,56$; $121,18 \pm 8,53$ és $97,65 \pm 10,08$. Egyszempontos, ismételt méréses varianciaanalízissel elemezve az eredményeket, kimutatható hogy a szoptatás hatással volt az IGF-1 koncentrációra ($F=10,8$ és $p < 0,001$), amely 30 perccel a kölykök visszatérése után érte el maximumát ($p < 0,001$; Dunnett-féle post hoc analízis) (17. ábra).

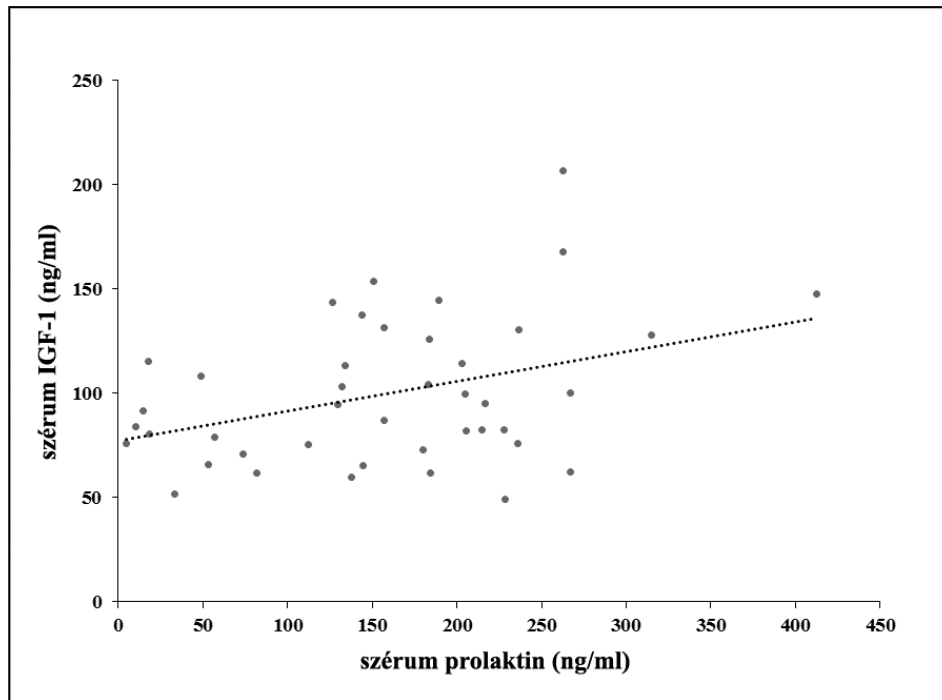


17. ábra: Szoptatás indukálta IGF-1 és prolaktin szekréció

A diagram az izoláció és szoptatás fázisai alatt mért IGF-1 és prolaktin szinteket mutatja. Öt alkalommal történt vérvétel, ezt ábrázolja a vízszintes tengely nem időarányosan: a kölykök elvétele előtt, a kölykök visszaadása előtt 5 perccel, majd 15, 30 és 60 perccel a kölykök visszatérése, azaz a szoptatás kezdete után. Az IGF-1 koncentrációja nem változott az izoláció alatt, míg a prolaktiné egy nagy alacsony szintre csökkent. A szoptatás egy szignifikáns emelkedést okozott a prolaktinnál már 15 perc, az IGF-1 esetében 30 perc elteltével. ***: $p < 0,001$

4.4.1.2. A szérum IGF-1 szint korrelációja a prolaktinszinttel szoptatás során

A kölykök visszaadása után megkezdődő szoptatás jelentős IGF-1 szérumszint emelkedést indukált, amelynek lefutása egyezett a prolaktinéval. Ezért megvizsgáltuk, hogy van-e korreláció a két hormon koncentrációja között a szoptatás során. Spearman-féle rangkorrelációval szignifikáns eredményt kaptunk ($p < 0,05$), a korrelációs koefficiens 0,29 volt (18. ábra).



18. ábra: a szérum IGF-1 és prolaktin koncentráció korrelációja

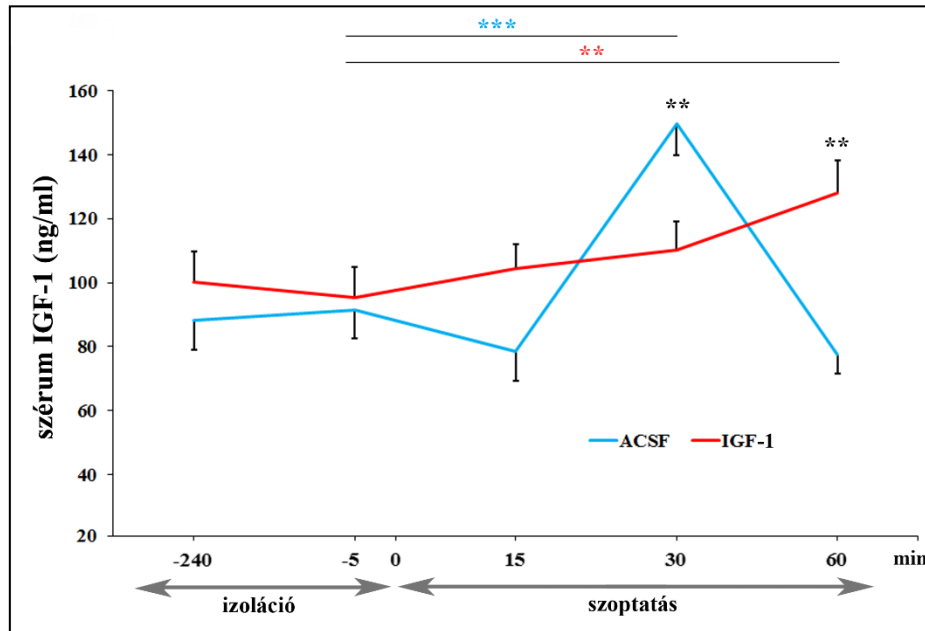
A pontfelhő diagram azon vérvételi minták prolaktin és IGF-1 koncentrációit mutatja, amelyeket 15, 30 és 60 perccel a szoptatás kezdete után vettünk le. Szignifikánsan pozitív korrelációt találtunk a két hormon értékei között.

4.4.2. IGF-1 beadás hatása perifériás IGF-1 koncentrációra

4.4.2.1. Krónikus IGF-1 beadás hatása a szoptatás indukálta IGF-1 emelkedésre

Anyák egy csoportjának (n=7) IGF-1-et adagoltunk icv., ozmotikus minipumpák felhasználásával, egy másik csoport (n=7) pedig kontrollként ACSF-et kapott. A minipumpákat a szülés utáni 2. napon ültettük be és csatlakoztattuk kanülökhöz, majd a 14. napon mértük meg a szoptatás indukálta IGF-1 szinteket, a korábban leírtakhoz hasonló módon és a következő eredményeket kaptuk (ng/ml-ben): 88,31±9,46; 91,32±8,7; 78,5±9,14; 149,74±9,97; 77,51±6,05 a kontroll csoportban és 100,33±9,49; 95,34±9,53; 104,3±7,57; 110,13±9,03; 128,07±10,16 az IGF-1-el kezelt csoportban. Az eredményeket kétszemponos, ismételt méréses varianciaanalízissel elemezve kimutattuk, hogy mind a szoptatás ($p < 0,001$), mind a kezelés ($p < 0,001$) szignifikáns hatással volt a szérum IGF-1 koncentrációra. Newman-Keuls post-hoc analízissel arra jutottunk, hogy míg a kontroll csoportban 30 perc után szignifikánsan magasabb volt a szérum IGF-1 szintje a szoptatás előtti értékhez képest ($p < 0,001$), addig a kezelt csoportban jelentős késés - maximum 60 perc után - és egy jóval enyhébb, kevésbé

szignifikáns emelkedés ($p < 0,05$) volt észlelhető. Ennek megfelelően 30 perc után a kontroll csoport koncentrációja volt magasabb ($p < 0,01$), 60 perc után a kezelt csoporté ($p < 0,01$) (19. ábra).

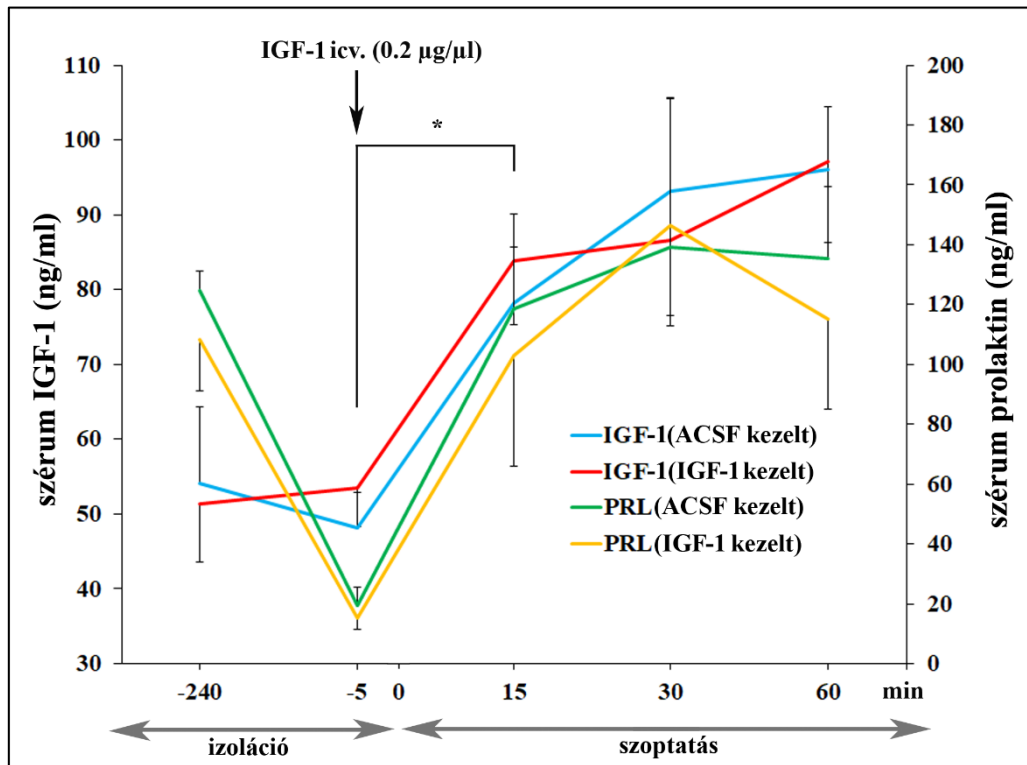


19. ábra: Krónikus icv. IGF-1 beadás hatása a szoptatás indukálta IGF-1 szekrécóra

A diagram az IGF-1 anyák IGF-1 szérumszintjeit mutatja az izoláció és szoptatás periódusai alatt. A vízszintes tengelyen az 5. vérvétel időpontját láthatjuk nem időarányosan elhelyezve. A születés utáni 2. naptól tartó krónikus icv. IGF-1 beadás megszüntette a szoptatás indukálta IGF-1 szekréciónak csúcsát, ami az ACSF-et kapott kontrollok esetében 30 percenél tapasztalható. A diagram fölött látható kék csillagok jelölik a kontroll csoport esetében a szoptatás kezdete előtt és 30 perc szoptatás után mért IGF-1 koncentrációk közötti szignifikáns különbséget. A 30 perces érték fölötti fekete csillagok azt mutatják, hogy ebben az időpontban a kontrollok IGF-1 koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a kezelt állatokénál. A kezelt állatokban 60 perc után szignifikánsan magasabb volt a szérumszintje a szoptatás kezdete előtti (piros csillagok a diagram fölött) és a kontroll csoport ugyanazon időpontbeli értékénél (fekete csillagok). **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

4.4.2.2. Akut IGF-1 beadás hatása a szoptatás indukálta IGF-1 emelkedésre

A hosszú időtartamú, folyamatos IGF-1 beadás után a gyors, akut IGF-1 hatást vizsgáltuk meg. IGF-1-et (n=7), illetve ACSF-et (n=6) adtunk be icv. 5 perccel a kölykök visszaadása, azaz a szoptatás kezdete előtt és megmértük a szérumban a prolaktin és IGF-1 szinteket a korábban már említett elrendezésben. Az eredményeket kétutas, repeated-measures ANOVA-val értékelve nem találtunk szignifikáns különbséget a szoptatás indukálta IGF-1, illetve prolaktin szintekben a két csoport között. Mindkét csoportban 15 perccel a kölykök visszaadása után jelentősen emelkedtek a hormonszintek. A szérumban IGF-1 koncentrációk a következők voltak (ng/ml-ben): 51,4±7,79; 53,54±5,25; 83,82±8,44; 86,66±10,14 és 97,12±10,82 IGF-1 kezelt anyákban, valamint 54,09±10,21; 48,2±4,65; 78,16±7,55; 93,16±12,47 és 96,06±8,33 a kontroll csoportban. A szérumban prolaktin koncentrációk a következők voltak (ng/ml-ben): 108,16±17,2; 15,25±3,92; 102,87±36,92; 146,4±33,53; 115,2±29,98 IGF-1-el kezeltekben és 124,68±6,33; 19,48±6,03; 118,42±31,97; 139,15±49,55; 135,48±23,84 a kontrollokban (20. ábra).



20. ábra: akut IGF-1 icv. beadás hatása a szoptatás indukálta IGF-1 és prolaktin szekrécióra

A diagram a szérumból a prolaktin és IGF-1 koncentrációját mutatja az izolációs és szoptatási periódusok alatt. A vízszintes tengelyen a vérvételek időpontjai láthatók, nem időarányosan ábrázolva. A kölykök visszaadása előtt 5 perccel IGF-1-et ($0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), illetve ACSF-et adtunk be icv. az anyáknak. A kezelés sem a prolaktin sem az IGF-1 koncentrációkra nem volt hatással, a szoptatás mindkét hormonnál 15 perc elteltével szignifikáns emelkedést okozott, mind a kezelt, mind a kontroll csoportban, és a magas koncentráció 60 percig fennmaradt. *: $p < 0,05$

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az IGFBP-3 indukciója anyákban

Az IGFBP-3 egyike volt annak az 5 génnek, amelynek expressziója szignifikánsan emelkedett volt laktáló anyák preoptikus területén deprivált anyákhoz képest kutatócsoportunk egy korábbi microarray kísérletében és ugyanerre az eredményre jutott egy másik vizsgálat is (Dobolyi 2009, Driessen és mtsai. 2014). Mivel a microarray vizsgálatok során nagy a fals pozitív eredmények aránya (Wang és mtsai. 2003), RT-PCR-el megmértük az IGFBP-3 mRNS szinteket laktáló és deprivált anyákban a preoptikus területen. A microarray eredményt sikerült validálni, ugyanis az IGFBP-3 expressziója háromszoros volt laktáló anyákban a depriváltakhoz képest. Emellett ISHH-val is sikerült igazolnunk az IGFBP-3 expresszió fokozódását a medialis preoptikus areában (MPOA), pontosabban azon belül a nucleus preopticus medialisban (MPN) (Leko és mtsai. 2017). Mint már korábban ismertettem, az MPOA fontos az anyai adaptáció szabályozásában, ezért jogosan feltételezhattük, hogy az IGFBP-3 megemelkedett expressziója szerepet játszik a központi idegrendszer anyai adaptációjában. Az IGFBP-3 mRNS-t kifejező neuronok legnagyobb denzitásban az MPN-ben található, annak is centralis és medialis, 3. agykamrához közelebbi részén. Ezen a területen jelentősen megnő az aktív neuronok száma szülés után, illetve szűz nőstényekben is kölykök jelenlétében, ugyanakkor nem ez a legaktívabb régió az anyai gondozás során az MPOA-n belül (Tsuneoka és mtsai. 2013). Az MPN centralis területe bemenetét a hipotalamusz periventricularis zónájából, a limbikus rendszer felől, a felszálló noradrenerg rostokból és a bed nucleus of stria terminalisból (BNST) kapja (Simerly és Swanson 1986), ez utóbbi az MPOA mellett szintén fontos szerepet tölt be az anyai adaptáció szabályozásában. Számos helyre projiciál, többek közt az anteroventralis periventricularis, anterior periventricularis, paraventricularis és arcuatus magokba, a hipotalamusz ventromedialis és dorsomedialis magjába, a PAG-ba, BNST-be és VTA-ba (Simerly és Swanson 1988), tehát olyan helyekre, amelyek az anyai viselkedést szabályozó neuronhálózatok részei. A periventricularis és arcuatus magokban találhatóak a hipofízis prolaktin szekrécióját szabályozó dopaminerg neuronok, a paraventriculáris mag szintén neuroendokrin szempontból fontos a magno- és parvocelluláris sejtjei miatt (AVP, oxytocin, CRH), a ventromedialis hipotalamuszmag a bevezetőben említett defenzív anyai neuronhálózat része, a PAG a

kyphosis kivitelezésében fontos, a VTA pedig a mezolimbikus dopaminerg rendszer részeként az anyai viselkedés célorientált aspektusában játszik kulcsszerepet.

5.2. Az általunk vizsgált IGF-rendszer szerepe az anyai motiváció szabályozásában

Az IGF-1 anyai motivációra kifejtett hatását vizsgáltuk a továbbiakban, ezért IGF-1-et, illetve egy IGFBP ligand inhibitor, NBI-31772-t adagoltunk icv. folyamatosan, ozmotikus minipumpa segítségével. Ezáltal a szabad, effektív IGF-1 mennyiségét növeltük meg direkt módon, illetve indirekt úton, kötőfehérjének gátlásával. Az NBI-31772 nagyobb affinitással tud kötődni az IGFBP-hez, felszabadítva az IGF-1-et a funkcionálisan inaktív komplexből (Malberg és mtsai. 2007). Ez a módszer a preoptikus területen laktáló anyákban nagyobb mértékben termelődő IGFBP-3-at tudta semlegesíteni, rávilágítva a megnövekedett expresszió lehetséges szerepére. Az NBI-31772 nem IGFBP-3-ra specifikus IGFBP-inhibitor, ugyanakkor az extracelluláris térben az IGF-1 döntő részét az IGFBP-3 köti meg, ezért használhattuk az IGFBP-3 szerepének vizsgálatára ezt az inhibitor. Hosszú ideig tartó centrális beadással folyamatosan magas IGF-1 koncentrációt és biológiai hozzáférhetőséget tudtunk biztosítani a hipotalamuszban és habár az IGF-1 képes átjutni a vér-agy gáton, mi nem alkalmaztunk perifériás beadást, mivel az paradox módon képes csökkenteni a központi idegrendszeri IGF-1 szintet (Trueba-Saiz és mtsai. 2017). Az elnyújtott, krónikus kezelés segítségével a hosszabb látenciájú, neuroplasztikus hatások is vizsgálhatóak voltak. Amíg az akut centrális IGF-1, illetve NBI-31772 beadásnak szorongáscsökkentő (anxiolitikus) és antidepresszáns hatásai vannak (Hoshaw és mtsai. 2008, Malberg és mtsai. 2007), addig a folyamatos adagolás a neuronok, például dopaminerg sejtek túlélésére és plaszticitására hat (Mysoet és mtsai. 2015, Quesada és mtsai. 2008). Vizsgálataink során nem is észleltük ezeket az anxiolitikus hatásokat, mivel az emelt keresztpalló tesztben egyik kezelés sem befolyásolta a nyílt karba lépések százalékos arányát, ami a szorongás mértékének fontos markere (Leko és mtsai. 2017).

A kezelések a kölyök visszahordási tesztben növelték mind az első kölyök felvételéig, mind az összes kölyök fészekbe való visszahordásáig eltelt időt (Leko és mtsai. 2017). Ezek az eredmények azt jelentik, hogy az IGF-1 csökkentette az anyai motivációt, mivel a kölyök visszahordása, mint célorientált viselkedés az anyai

motiváció indikátora és az anyai adaptáció fontos eleme (Bridges 2015). Ugyanakkor a spontán anyai viselkedés vizsgálatokor kiderült, hogy az anyai viselkedés egyéb elemeit nem befolyásolta a kezelés, illetve az emelt keresztpalló teszt eredményei azt mutatták, hogy az állatok motoros aktivitása és szorongás-szerű viselkedése sem változott meg (Leko és mtsai. 2017). Az, hogy a kölyök-visszahordás károsodása nem járt együtt a spontán anyai viselkedés és gondozás csökkenésével, az anyai magatartás ezen két elemének egymástól elkülönült szabályozásával magyarázható. Már régen kimutatták, hogy az MPOA dorsolateralis kapcsolatainak szelektív roncsolása csak a kölyök visszahordását zavarta meg (Terkel és mtsai. 1979). A középső posztpartum időszakban, a 12.-21. nap között figyelhető meg, hogy míg a visszahordás gyorsasága fokozatosan csökken, egyéb gondozó viselkedési formák változatlan intenzitást mutatnak. Ezt magyarázhatná egyszerűen az is, hogy az idősebb, önállóbb helyváltoztatásra képes kölyköknek nincs szüksége az anyjuk segítségére a fészekbe való visszajutáshoz, így nem érkeznek felőlük olyan ingerek, amik a visszahordást irányító neuronhálózatok működését fenntartanak (Numan 2015). Azonban egy érdekes vizsgálat más szempontokra mutatott rá: Na-csatorna gátló, jelátviteli aktivitást csökkentő bupivacain beadása az MPOA-ba a szülés utáni 7. napon gyengítette, míg a 14. napon fokozta a visszahordást (Pereira és Morrell 2009). Azt is kimutatták, hogy a nyúltvelő A1, A2 katekolaminerg sejtcsoportjaiból az MPOA-ba érkező noradrenerg rostok gátolják a kölyök visszahordását, így valószínűleg a középső-késő posztpartum időszakokban e rostok működésének gátlása vezetett az előbb említett motivációfokozódáshoz (Smith és mtsai. 2012). Tehát amíg a noradrenerg neurotranszmisszió erősödik a szülést követő második héttől kezdve és ez fokozatosan csökkenti a kölyök visszahordásának intenzitását, addig a gondozó viselkedés változatlan marad. Az is felmerül az eredményeink értelmezése során, hogy az IGF-1 beadásnak, illetve az IGF-1 szintet indirekt módon emelő NBI-31772 beadásának miért nem volt szorongáscsökkentő hatása az emelt keresztpalló tesztben, holott az irodalom alapján ezt várhattuk volna (Malberg és mtsai. 2007). Az anyai adaptáció során csökken a szorongás, ez főleg az első posztpartum héten figyelhető meg és a kölyök közelségével, a feléjük jövő szenzoros ingerekkel és az anyai motivációval van összefüggésben. (Lonstein 2005). A kölyök jelenléte az MPOA már említett noradrenerg afferenseinek gátlásával teszi lehetővé, hogy az MPOA és a BNST kifejtse GABAerg gátló hatását a szorongást elősegítő amygdalára és PVN-re (Lonstein 2007, Pawluski és mtsai. 2017). Az IGF-1 anxiolitikus hatását vélhetőleg semlegesítette kísérleteink során az anyai motivációt

csökkentő hatás, amely az anyai adaptációval járó szorongáscsökkenést gyengítette. Amíg a szülés körüli hormonális változások elsősorban az anyai viselkedést irányító, bevezetőben ismertetett neuronhálózatok működését indítják be az MPOA-n keresztül, más kevésbé feltérképezett faktorok felelősek az anyai viselkedés fenntartásáért a posztpartum időszakban (Bridges 2015). Az általunk vizsgált IGF-rendszer valószínűleg ez utóbbiak közé tartozik és egy új elemet jelent az anyai adaptáció központi idegrendszeri szabályozásában.

Felmerül a kérdés, hogy az IGF-1 min keresztül fejt ki anyai motivációt csökkentő hatását a központi idegrendszerben. Az IGF-1 egy alapvetően aktiváló tulajdonságú faktor, így valószínűsíthető, hogy egy anyai viselkedést gátló sejttípus működését serkenti az MPOA-ban. Erre a szerepre kézenfekvő lehetőségnek tűnnek a bevezetőben már említett MCH-neuronok. Az IGF-1-at expresszáló sejtek az MPN-ben az MCH sejtekhez nagyon hasonló lokalizációt mutatnak és ezen sejtek MCH termelésének a feltételezett szerepe az anyai motiváció csökkentésében van a posztpartum időszak végéhez közeledve. Az MCH beadásának ráadásul nagyon hasonló hatásai voltak az IGF-1 beadáshoz, ugyanis az anyai adaptáció elemei közül csak a kölyök visszahordást befolyásolta jelentősen (Benedetto és mtsai. 2014). Ezek alapján elképzelhetőnek tartjuk, hogy az IGF-1, illetve az IGF-1-inhibitor beadás az MCH sejtek működését segítve csökkentette az anyai motivációt. Laktáló anyákban viszont fokozódik ezekben a sejtekben az IGF-1 expressziója, amely szekvesztrálni képes a perifériáról vagy más hipotalamikus területekről származó IGF-1-et, semlegesítve ezáltal az IGF-1 MCH-sejteket serkentő, anyai motivációt gyengítő hatásait (21. ábra).

5.3. IGF-rendszer laktációt befolyásoló hatásának mechanizmusa

Az anyai adaptáció során létrejövő élettani változások egyik legfontosabb eleme a laktáció, ezért különösen fontosnak tartottuk annak vizsgálatát, hogy az IGF-1 milyen hatással van rá. Rágcsálókban a laktációt a kölykök felől jövő ingerek irányítják, a szoptatás jelentős emelkedést vált ki a szérum prolaktin koncentrációjában (Cservenak és mtsai. 2010). Az ACSF-el kezelt kontroll anyákban sikerült megfigyelnünk ezt a szoptatás indukálta kiugró mértékű prolaktin szekréciót. Ezzel szemben az IGF-1-kezelt állatoknál ez a prolaktinszint emelkedés szignifikánsan kisebb volt, az IGF-1 jelentősen csökkentette a szoptatás indukálta prolaktin szekréciót. A kölykök egy óra szoptatás alatti súlynövekedése is kisebb volt, ami az alacsonyabb prolaktinszint okozta csökkent

tejtermelés következménye. Az, hogy az IGF-1 hipotalamikusan szinten befolyásolni tudja a prolaktin szekréciót, új eredménynek tekinthető (Leko és mtsai. 2017). Korábban az IGF-1 hatását reprodukciós folyamatokra más aspektusokból mutatták meg. A hipofízis szintjén az IGF-1-nek van ismert hatása a laktációra, itt a laktotróf sejtek differenciálódását és osztódását serkenti (Hikake és mtsai. 2009, Stefaneanu és mtsai. 1999). Mindemellett az IGF-1 szerepére a reprodukciós neuroendokrin funkciók hipotalamikusan szabályozásában már korábbi kutatások is rámutattak, a gonadotropin-releasing hormont (GnRH) termelő sejtek működését befolyásolja. IGF-1 beadása a GnRH szekréciót serkentette (Hiney és mtsai. 1996, Hiney és mtsai. 2009), míg antagonizálása csökkentette a pozitív ösztadiol feedback-et és az általa kiváltott luteinizáló hormon (LH) hullámokat (Sun és mtsai. 2011, Todd és mtsai. 2007).

A laktáció esetén – a kölyök-visszahordáshoz hasonlóan – azt tapasztaltuk, hogy az IGF-1 az anyai adaptációval szemben hat, csökkenti a prolaktin szintet szoptatás során, ezért a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a prolaktin szekréciót hipotalamikusan szabályozó TIDA neuronok kifejezik-e az IGFBP-3-at, ugyanis az IGF-1 anyai motivációra kifejtett hatásának elemzésekor láthattuk, hogy az IGFBP-3 nagyon fontos szerepet játszott. *In situ* hibridizációs hisztokémiát kombináltunk TH immunhisztokémiával és sikerült kimutatnunk, hogy a TH pozitív TIDA neuronok expresszálnak IGFBP-3-at (Leko és mtsai. 2017). A tirozin-hidroxiláz enzim a katekolamin szintézis első lépésében tirozin - L-DOPA átalakulást katalizálja és az egész szintézis sebesség meghatározó lépése. Az L-DOPA-ból ezután a DOPA dekarboxiláz enzim dopamint hoz létre. Tehát a dopaminerg sejtekben TH és DOPA dekarboxiláz is jelen van. Ez azt is jelenti, hogy egy TH pozitív sejt nem feltétlenül dopaminerg. Az arcuatus magban található olyan TH pozitív sejtek, amelyekben nincs DOPA-dekarboxiláz, ezeket L-DOPA sejteknek nevezzük. Azonban tudjuk, hogy ezek a sejtek a ventrolateralis szubdivízióban vannak és nagyrészt GHRH pozitívak, a dorsomedialis szubdivízióban viszont túlnyomórészt olyan neuronok találhatóak, amik TH mellett DOPA-dekarboxilázt is tartalmaznak, azaz dopaminszintézis történik (Ershov és mtsai. 2002, Komori és mtsai. 1991, Zoli és mtsai. 1993). Így elhelyezkedésük alapján valószínűsíthetjük, hogy a TH sejtek, amelyek IGFBP-3-at expresszálnak, dopaminerg sejtek, tuberoinfundibularis dopaminerg neuronok. A lokalizációs arányokból az látszott, hogy nem minden TIDA sejt expresszál IGFBP-3-at (67,3%), azonban a nucleus arcuatus dorsomedialis szubdivíziójában megjelenő IGFBP-3 expresszió szinte kizárólag a TIDA sejtekhez köthető (85,9%) (Leko és mtsai. 2017).

Ahhoz, hogy alátámasszuk hipotézisünket, miszerint az általunk vizsgált IGF-rendszer szerepet játszik a laktáció hipotalamikus szabályozásában, amellelt hogy kimutattuk az IGFBP-3 expressziót a TIDA sejtekben, tanulmányoznunk kellett változik-e ez az expresszió a laktációval összefüggésben. Ehhez *in situ* hibridizációs hisztokémiát használtunk, laktáló és deprivált patkány anyákat hasonlítottunk össze. Sikerült leírunk IGFBP-3 expressziót a nucleus arcuatus mellett a PVN-ben, ráadásul előbbiben szignifikánsan nagyobb mértékben expresszálódott az IGFBP-3 laktáló anyákban, míg a PVN-ben az expresszió mértéke nem függött a laktációtól (Leko és mtsai. 2017). A keringésből származó IGF-1 el tudja érni a hipotalamusz sejtjeit, a PVN-ben ki is tudták mutatni a perifériáról származó radiokativan jelölt IGF-1-et (Reinhardt és Bondy 1994). Emellelt az arcuatus magban és a PVN-ben is jelen van az IGF-1R által aktivált sejten belüli útvonal egyik kulcseleme az IRS-1 (Baskin és mtsai. 1993). A PVN-ben azt is kimutatták, hogy az oxytocin és vazopresszin sejtek expresszálnak IGF-1-et, sőt IGF-1 immunpozitívak is, illetve autokrin/parakrin hatásokat tud itt kifejteni az IGF-1 (Zhou és mtsai. 1999). A PVN területén tehát indokolható az IGFBP-3, mint IGF-1-et befolyásoló faktor jelenléte, azonban eredményeink szerint az IGFBP-3 szintje nincs a laktációval összefüggésben. A dorsomedialis arcuatus mag TIDA sejtjeiben ezzel szemben laktáció során nagyobb mértékben expresszálódik IGFBP-3, feltételezésünk szerint azért, hogy az IGF-1 prolaktin szekréciót csökkentő hatásait semlegesítse.

Ezek után azt vizsgáltuk meg, hogy az IGF-1 hogyan hat a TIDA neuronok működésére és ezáltal közvetetten a prolaktin szekrécióra, milyen sejt szintű folyamatok állhatnak az IGF-1 laktációt hipotalamikus szinten csökkentő hatása mögött. Az IGF-1 kötődése receptorához annak autofoszforilációjához vezet, ami sejten belüli jelátviteli utakat indít be. Legfontosabb a Ras-ERK1/2 és PI3K-Akt útvonalak aktiválása. Az IGF-1 a dopaminerg neuronok túlélését is ezen a két útvonalon keresztül segíti, ezt elsősorban eddig a nigrostriatalis dopaminerg rendszerben vizsgálták (Ayadi és mtsai. 2016, Quesada és mtsai. 2008). IGF-1 génterápia nőstény patkányok hipotalamikus dopaminerg diszfunkcióját is képes volt kezelni, csökkentve ezáltal az ennek következtében megjelenő hiperprolaktinémiát és növelve a TH pozitív neuronok számát (Herenu és mtsai. 2007, Schwerdt és mtsai. 2017). Mi arra az eredményre jutottunk, hogy az IGF-1 fokozta a TH expressziót a TIDA sejtekben laktáló anyákba ozmotikus minipumpa segítségével *icv.* adagolva, illetve *in vitro* is hasonló hatást tapasztaltunk primer mediobasalis hipotalamikus sejt kultúrákban (Leko és mtsai. 2017). Az IGF-1-ről

már kimutatták, hogy chromaffin sejtekben növeli a TH mennyiségét, azonban ez a hatás a hipotalamusz dopaminerg sejtjeinél eddig nem volt ismert (Dahmer és mtsai. 1991, Hwang és Choi 1995). Az IGF-1 kötődése receptorához aktiválja a Ras-ERK1/2 intracelluláris jelátviteli útvonalat és az ERK a Nurr1 (nuclear-receptor related 1), illetve az AP-1 (activator-protein-1) segítségével tudja erősíteni a TH gén transzkripcióját (Tekin és mtsai. 2014, Zhang és mtsai. 2007). Emellett az IGF-1 a TH foszforilációját is fokozta a Ser31-es foszforilációs helyen *in vitro*, növelve ezzel az enzim aktivitását. Ebből arra következtethetünk, hogy az IGF-1 az ERK1/2 útvonal aktiválásával fokozta a TH enzim működését. Foszforilációs helyekre specifikus antitesteket használtunk a Western Blot analízisnél és jelintenzitásukat a TH-hez képest fejeztük ki. Az eredményekből látható, hogy a Ser31-es foszfo-TH mennyisége közel azonos volt a TH-el, míg a Ser40-nél sokkal jelentősebb volt. Ezenkívül az IGF-1 kezelés szignifikánsan emelte a Ser31-nél foszforilált TH mennyiségét a sejt kultúrákban. Ezáltal a TIDA sejtekben nagyobb mennyiségű dopamin termelődhet IGF-1 hatására. Ez egy gyors, dopaminerg sejteket aktiváló hatása az IGF-1-nek, amit eddig még nem mutattak ki (Leko és mtsai. 2017).

A TH enzim expressziójának és foszforilációjának nagyon fontos szerepe van a laktációs hiperprolaktinémia fenntartásában és a szoptatás indukálta prolaktin szekrécióban. A prolaktin negatív visszacsatolást képes megvalósítani, azáltal hogy serkenti a TIDA sejtek működését: növeli a TH expresszióját, fokozza a sejtek tüzelési frekvenciáját és ennek következményeként a dopamin felszabadulást a portális keringésbe. Laktáció idején a prolaktin ugyanúgy tudja emelni a TIDA neuronok tüzelési frekvenciáját, azonban ez nem jár dopamin felszabadulással, a negatív feedback elmarad. A sejtek elektrofiziológiájában és dopamin szekréciós apparátusában nincs változás a laktációhoz köthetően (Romano és mtsai. 2013), viszont a dopaminszintézis jóval kisebb mértékű. Laktáció alatt a TH expressziója és foszforilációja mellett az általa szintetizált L-DOPA mennyisége is jelentősen csökken, 4 óra szeparáció a kölyköktől azonban mindhárom értéket megemeli (Demarest és mtsai. 1983, Feher és mtsai. 2010, Wang és mtsai. 1993). Tehát a szoptatás során tapasztalt kisebb mennyiségű dopaminszekréció a TH enzim alacsonyabb expressziójának és aktivitásának a következménye. Ezáltal a hipofízis prolaktin szekréciója felszabadul a gátlás alól és a magasabb prolaktinszint nem képes negatív visszacsatolást megvalósítani, így szoptatás hatására jelentősen megemelkedhet a prolaktin

koncentráció a vérben. Az IGF-1 a TH expresszió fokozásával és foszforiláció általi aktivációjával tudja a szoptatás indukálta prolaktin szekréciót csökkenteni (21. ábra).

5.4. Az IGF-1 szérumbeli koncentrációjának változásai a laktációval összefüggésben

További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogyan változik a szérum IGF-1 koncentrációja a szoptatás alatt. Az IGF-1 képes átjutni a vér-agy gáton és hatni a hipotalamuszban. Ezt a hatást képes az ott termelődött IGFBP-3 lokális szinten befolyásolni. Kimutattuk, hogy az IGF-1 serkenti a TIDA sejtek működését és ezáltal csökkenti a szoptatás indukálta prolaktin szekréciót, ezt a hatását az IGF-1-nek pedig ki kell védeni. Így az volt a hipotézisünk, hogy azért van szükség az emelkedett IGFBP-3 expresszióra, mert az IGF-1 szintje is változik laktáció során.

Feltételezésünknek megfelelően kísérleteink során elsőként sikerült leírunk a szoptatás indukálta IGF-1 szekréciót, amely 30 perc után éri el csúcspontját (Leko és mtsai. 2017). Habár laktáló és nem laktáló anyák szérum IGF-1 szintje között nincs számottevő különbség (Escalada és mtsai. 1997), a kölykök 4 óra hosszú izolációja után elkezdődő szoptatás egy jelentős, hullámszerű IGF-1 szekréciót vált ki, amely maximumát 30 perc után éri el, és 60 perc után lecseng. Ez az időbeli lefolyás nagyon hasonlít a szoptatás indukálta prolaktin szekrécióra és találtunk is szignifikáns pozitív korrelációt a két hormon szérumbeli koncentrációi között a szoptatás során (Leko és mtsai. 2017). A szérumszint gyors emelkedésének forrása a máj lehet, ugyanis ez a szerv termeli a keringő IGF-1 70%-át (Yakar és mtsai. 1999). A szoptatás kétféle módon is képes indirekt úton indukálni az IGF-1 szekréciót. Egyrészt a szoptatás a GHRH serkentésével GH szekrécióhoz vezet (Terry és mtsai. 1977, Wehrenberg és Gaillard 1989), ami fokozza az IGF-1 felszabadulást és termelődést, másrészt a prolaktin is képes ugyanerre a májban (Murphy és mtsai. 1988). A szoptatás indukálta IGF-1 szekréciónak élettani jelentősége is lehet tekintettel a bevezetőben említett laktotróf sejteket, illetve az emlőmirigy lobulo-epithelialis sejtjeit érintő pozitív hatásaira.

A szoptatás indukálta IGF-1 szekréció háttérében álló lehetséges szabályozó mechanizmusokat is megvizsgáltuk. Hosszabb időn keresztül folyamatosan adagoltunk IGF-1-et icv., ozmotikus minipumpa segítségével, ahogy tettük azt korábbi kísérleteink során. Ez a krónikus IGF-1 beadás gyakorlatilag megszüntette a szoptatás indukálta

IGF-1 szérumszint-emelkedést (Leko és mtsai. 2017). Bár 60 perc után szignifikánsan magasabb volt az IGF-1 koncentráció, mint a szoptatás kezdetekor, kérdéses hogy ez az emelkedés biológiailag is szignifikáns-e, azaz a szoptatás indukálta csúcs csak megkésett, vagy pedig ez csak egy fiziológiás ingadozás következménye. A 60 percnél későbbi hatások feltérképezéséhez további kísérletek szükségesek. A krónikus IGF-1 adagolás kifejthette ezt a hatást a GH vagy a prolaktin szekréció csökkentésén keresztül is. A növekedési hormon tengelyen belül az IGF-1 negatív visszacsatolással hat a GH-ra. 2 órával a kísérletek előtt icv. beadva csökkenti a GH pulzusok amplitúdóját (Abe és mtsai. 1983), illetve egy héten keresztül icv. adagolva a hipotalamuszban csökkenti a GHRH és fokozza a szomatosztatin expresszióját (Sato és Frohman 1993), így közvetetten csökkenti a GH szekréciót. Azt pedig saját kísérleteinkből tudjuk, hogy az IGF-1 csökkenti a szoptatás-indukálta prolaktin szekréciót is (Leko és mtsai. 2017).

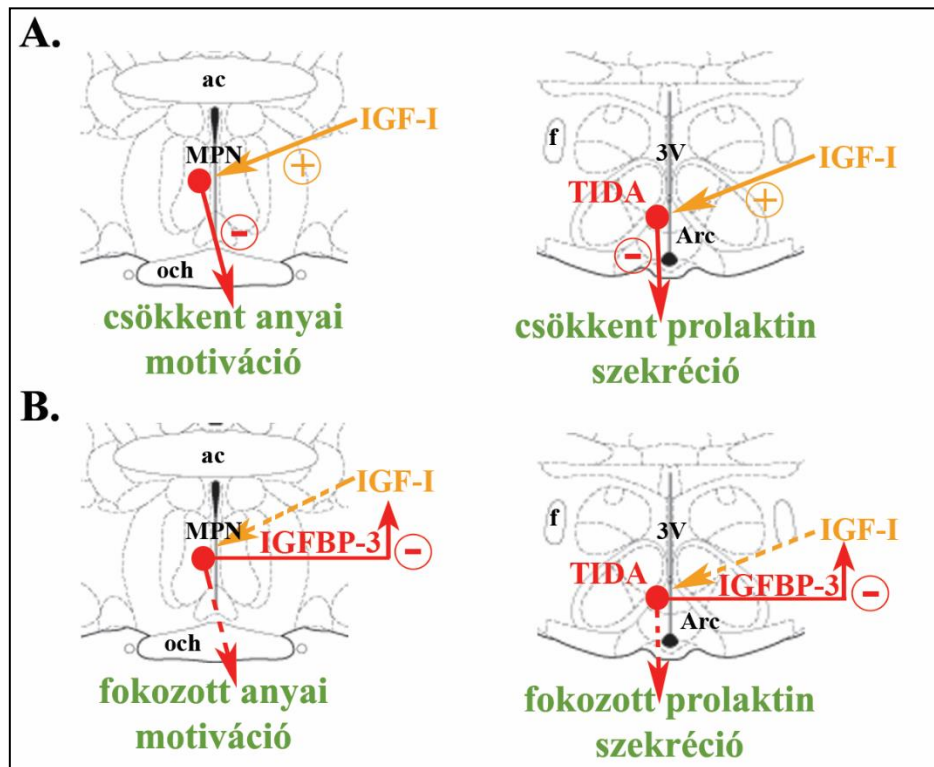
Az IGF-1 beadása közvetlenül a szoptatás kezdete előtt ezzel szemben hatástalannak bizonyult: nem hatott a szoptatás indukálta IGF-1 és prolaktin szekrécióra. Ennek oka az lehet, hogy az IGF-1 génexpressziós szinten fejtette ki hatását mind a GHRH-ra és szomatosztatinra, mind pedig a TH enzimre és általuk közvetve a GH és prolaktin szekrécióra. Ennek a hatásnak a megjelenéséhez pedig túl rövid idő állt rendelkezésre. Mindemellett a szoptatás indukálta IGF-1 és prolaktin szekréció görbéje más lefutást mutatott még a kontroll állatokban is, mint icv. beadás nélkül, vagy krónikus beadás esetén. Már 15 perccel a szoptatás kezdete után szignifikáns emelkedést tapasztaltunk mindkét hormon esetében és ez a magas szint megmaradt 60 perc után is (Leko és mtsai. 2017). Ezt a görbék lefutásában tapasztalt különbséget magyarázhatja az akut icv. beadás okozta stressz: meg kell fogni az állatokat, változik a liquor mennyisége rövid idő alatt. A stressz fokozhatja a prolaktin szekréciót (Freeman és mtsai. 2000), ami a kortikoszteronnal együtt hozzájárulhat az IGF-1 szint magas tartásához 60 percnél hosszabb ideig.

Tehát a szoptatás akár a prolaktin, akár a GH szekréció fokozásán keresztül indukálhatja az IGF-1 szérumbeli koncentrációjának emelkedését. Ezt a centrálisan, krónikusan adagolt IGF-1 képes gátolni vagy a TIDA sejtek dopamintermelésére hatva a prolaktin közvetett gátlásával, vagy pedig a GH-ra hatva negatív visszacsatolással. A szoptatás következtében tapasztalható magasabb IGF-1 szérumszint kedvező hatással van a hipofízis laktotróf sejteinek prolaktintermelésére, illetve az emlőmirigy tejelválasztására, vérkeringésére és lobulo-alveolaris epithelsejtjeinek túlélésére. A hipotalamuszban azonban a TIDA neuronokban serkentené a TH enzim expresszióját és

foszforiláció általi aktiválódását, ezáltal a dopamintermelést, ami viszont a hipofízis prolaktin szekrécióját gátolná. Ennek a hatásnak a kivédéséhez van feltehetőleg szükség laktáció során nagyobb mennyiségű IGFBP-3 expresszióra a TIDA sejtekben (21. ábra).

Ez a hipotézis egy különleges neuroendokrin szabályozási formára világít rá: neuronok képesek egy adott hormon rájuk irányuló hatásait gátolni oly módon, hogy megnövelik kötőfehérjéjének kifejeződését. Más hormonok esetén is vannak hasonló megfigyelések a hipotalamuszban. A kortikoszteroid-kötő globulin (CBG) képes befolyásolni a stresszhormon működését (Jirikowski és mtsai. 2007, Sivukhina és Jirikowski 2014). A nemi hormonok kötőfehérjéjének (sexual hormone binding globulin – SHBG) is ismert a központi idegrendszeri jelenléte (Herbert és mtsai. 2005). Expressziója a hipotalamuszban a reproduktív állapotnak megfelelően változik, így szerepe lehet az ovariális szteroidok centrális hatásainak befolyásolásában (Sendemir és mtsai. 2006).

Eredményeink tehát a laktáció és anyai viselkedés szabályozásának olyan, eddig nem ismert elemére mutatnak rá, amely által közelebb juthatunk a bevezető során említett, anyai magatartást érintő, diszfunkcionális anyai adaptációval járó kórképek sikeres klinikai kezeléséhez.



21. ábra: a laktáció és anyai motiváció IGF-rendszer általi szabályozásának lehetséges modellje

A: Szűz nőstényekben és deprivált anyákban a hipotalamikus, vagy keringésből származó IGF-1 fokozza anyai motivációt gátló, feltehetőleg MCH-neuronok MCH expresszióját a preoptikus területen és a TH enzim expresszióját, illetve foszforiláció általi aktiválását a TIDA neuronokban. Így ezek a sejtek több MCH-t, vagy dopamint termelnek, ami gátolja az anyai motivációt és a prolaktin szekréciót

B: Laktáló anyákban az MCH és TIDA neuronokban emelkedik az IGFBP-3 expressziója, ami semlegesíteni tudja az IGF-1 hatásait. Az IGF-1 MCH- és TIDA stimuláló hatásai megszűnnek, ennek következtében az MCH és dopamin termelés csökken, így az anyai motiváció és a prolaktin szekréció felszabadulhat a gátlás alól. A szoptatás alatt hiába emelkedik meg az IGF-1 szint a keringésben, a hatásokat semlegesíteni tudja a nagyobb mértékben termelődő IGFBP-3.

ac – commissura anterior, Arc – nucleus arcuatus, f – fornix, MPN – nucleus preopticus medialis, och – chiasma opticum, 3V – 3. agykamra

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Anyákban fokozódik az IGFBP-3 expressziója a medialis preoptikus areában, illetve az arcuatus mag dorsomedialis szubdivíziójában. RT-PCR-el igazoltuk a preoptikus területről származó microarray eredményeket, ISHH-val pedig lokalizáltuk a megnövekedett IGFBP-3 expressziót a nucleus preopticus medialisba és az arcuatus mag TIDA neuronjaiba.
2. IGF-1, valamint IGFBP-3 antagonistá elnyújtott idejű centrális beadása növelte a kölykök visszahordásához szükséges időt, azaz csökkentette az anyai motivációt. A hatás specifikus volt az anyai motivációra, ugyanis a spontán anyai viselkedést, a szorongás-szerű viselkedést és az általános aktivitást nem befolyásolta.
3. Hosszú ideig tartó IGF-1 kezelés csökkentette a szoptatás indukálta prolaktin szekréciót.
4. Az IGF-1 a TIDA sejtekben serkenti a dopaminszintézis szempontjából kulcsfontosságú TH enzim expresszióját *in vivo* és *in vitro*. Emellett fokozza az enzim aktiváló hatású foszforilációját a Ser31-es helyen *in vitro*.
5. Elsőként sikerült leírunk a szoptatás indukálta IGF-1 szekréciót. Az IGF-1 szérumbeli koncentrációja jelentős emelkedést mutat a szoptatás kezdetétől és 30 perc után éri el csúcsát, szignifikáns korrelációt mutatva a prolaktinnal. Elnyújtott idejű centrális IGF-1 beadás megszüntette ezt az indukciót. Ezzel ellentétben az akut, rövid idővel a szoptatás előtt történt IGF-1 beadás nem volt hatással sem a prolaktin, sem az IGF-1 szekrécióra.

7. ÖSSZEFOGLALÓ

A szülés utáni, ún. anyai adaptáció során az idegrendszer alkalmazkodik a megváltozott állapothoz, ennek következményei jelentős viselkedésbeli és élettani változások, amelyek patkányban, mint modellállatban kiválóan vizsgálhatóak. Mindezekért egy komplex neuronhálózat felelős, aminek kulcspontjai az anyai motiváció esetében a medialis preoptikus area (MPOA), míg laktációnál az arcuatus mag. Újraértékelve kutatócsoportunk preoptikus területéről származó korábbi microarray vizsgálatának eredményeit, hipotézisünk az volt, hogy az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) szerepet játszik a központi idegrendszer anyai adaptációjában. Az IGF 3-as típusú kötőfehérjének (IGFBP-3) - amely a legfontosabb kötőfehérje és gátolni képes az IGF-1 hatásait - a microarray során tapasztalt expresszió növekedését az anyai motiváció szempontjából főszerepet játszó MPOA-ban sikerült igazolnunk RT-PCR-el, emellett a medialis preoptikus magba (MPN) lokalizáltuk az IGFBP-3-at kifejező sejteket. IGF-1 és egy IGFBP-3 ligand inhibitor (NBI-31772) elnyújtott idejű centrális beadása növelte a kölykök fészekbe történő visszahordásának idejét, azaz specifikusan csökkentette az anyai motivációt. Az IGF-1 beadás emellett a szoptatás indukálta prolaktin szekréciót is szignifikánsan csökkentette, aminek következménye volt a kölykök kisebb mértékű súlygyarapodása egy óra szoptatás alatt. A prolaktin szekréciót hipotalamikusan szinten az arcuatus mag dorsomedialis részén található tuberoinfundibularis dopaminerg (TIDA) neuronok szabályozzák, amelyekről kimutattuk, hogy laktáló anyákban jóval nagyobb mennyiségben expresszálják az IGFBP-3-at közvetlenül a szülés után kölykeiktől elválasztott (deprivált) anyákhoz képest. Az IGF-1 fokozta ezekben a sejtekben a dopamintermelésben kulcsszerepet játszó tirozin-hidroxiláz (TH) enzim expresszióját, akárcsak *in vitro* vizsgálataink során primer mediobasalis hipotalamikusan sejt kultúrában, ahol az enzim foszforiláció általi aktiválását is serkentette. Elsőként sikerült leírni a szoptatás indukálta IGF-1 szekréciót, amely korrelál a prolaktinével. A szérumban IGF-1 szint 30 perccel a szoptatás kezdete után éri el csúcsát, a hosszú idejű centrális IGF-kezelés pedig gátolja ezt a hullámot. Az akut IGF-1 beadásnak ezzel szemben nem volt hatása egyik hormon szoptatás indukálta változásaira sem. Tehát szoptatás során emelkedik a szérumban IGF-1 koncentrációja és ez centrálisan az anyai adaptáció ellen fejthet ki hatást, feltételezhetően ezért emelkedik meg az IGFBP-3 expressziója az arcuatus magban és a MPOA-ban.

8. SUMMARY

Postpartum physiological and behavioral changes in the mother are important part of the reproduction and the central nervous system has to accommodate to these severe changes. This accommodation is called as maternal adaptation of the central nervous system. It is organized by complex neuronal circuits including the medial preoptic area (MPOA) and arcuate nucleus which are responsible for maternal motivation and lactation, respectively. We re-evaluated our previous microarray study of the preoptic area comparing lactating and pup-deprived rat dams (mothers whose pups were taken away right after delivery) and hypothesized that insulin-like growth factor-1 (IGF-1) could play a role in maternal adaptation of the central nervous system. We succeed in validating the results of the microarray study with RT-PCR, because IGF binding protein-3 (IGFBP-3) – which is the major carrier protein of IGF-1 and can inhibit its effects by sequestration - showed higher expression in MPOA of lactating mothers and its mRNA was localized to the medial preoptic nucleus (MPN) with in situ hybridization histochemistry. Prolonged intracerebroventricular (icv.) administration of IGF-1 and an IGFBP-3 ligand inhibitor (NBI-31772) lengthened the pup-retrieval time which means a specific reduce in maternal motivation. Furthermore, IGF-1 administration decreased suckling-induced prolactin release and consequently the weight gain of pups during 60 minutes of suckling. Prolactin secretion is under the hypothalamic control of tuberoinfundibular (TIDA) neurons of dorsomedial arcuate nucleus and we showed the maternal induction of IGFBP-3 expression in these cells. IGF-1 elevated the expression of tyrosine-hydroxylase (TH) in TIDA neurons *in vivo* which is important because TH is the rate-limiting enzyme of dopamine synthesis. In addition, we discovered the same induction and increased activation of TH by phosphorylation according to IGF-1 administration with *in vitro* experiments in primary mediobasal hypothalamic cell cultures. Our novel finding was the description of suckling-induced IGF-1 release, which correlates with prolactin, reaches its maximum 30 minutes after the start of suckling and is diminished by prolonged icv. IGF-treatment. However, acute IGF-1 administration had no effect on suckling-induced changes of these two hormones. In conclusion, IGF-1 serum level is increased during suckling, which would inhibit maternal adaptation in the central nervous system. IGFBP-3 induced in MPOA and arcuate nucleus may be able to counteract this action of IGF-1 by possibly sequestering it from the extracellular space.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Abe H, Molitch ME, Van Wyk JJ, Underwood LE (1983) Human growth hormone and somatomedin C suppress the spontaneous release of growth hormone in unanesthetized rats. *Endocrinology* 113(4): 1319-1324.

Akbari EM, Shams S, Belay HT, Kaiguo M, Razak Z, Kent CF, Westwood T, Sokolowski MB, Fleming AS (2013) The effects of parity and maternal behavior on gene expression in the medial preoptic area and the medial amygdala in postpartum and virgin female rats: A microarray study. *Behav Neurosci* 127(6): 913-922.

Akers RM, Bauman DE, Capuco AV, Goodman GT, Tucker HA (1981) Prolactin regulation of milk secretion and biochemical differentiation of mammary epithelial cells in periparturient cows. *Endocrinology* 109(1): 23-30.

Anderson RA, Zwain IH, Arroyo A, Mellon PL, Yen SS (1999) The insulin-like growth factor system in the GT1-7 GnRH neuronal cell line. *Neuroendocrinology* 70(5): 353-359.

Arbogast LA, Voogt JL (1991) Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta. *Endocrinology* 128(2): 997-1005.

Augustine RA, Kokay IC, Andrews ZB, Ladyman SR, Grattan DR (2003) Quantitation of prolactin receptor mRNA in the maternal rat brain during pregnancy and lactation. *J Mol Endocrinol* 31(1): 221-232.

Ayadi AE, Zigmond MJ, Smith AD (2016) IGF-1 protects dopamine neurons against oxidative stress: association with changes in phosphokinases. *Exp Brain Res* 234(7): 1863-1873.

Bach MA, Shen-Orr Z, Lowe WL, Jr., Roberts CT, Jr., LeRoith D (1991) Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 10(1): 43-48.

Bagdy G (1996) Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in 5-HT1A, 5-HT2A and 5-HT2C receptor-mediated oxytocin, prolactin and ACTH/corticosterone responses. *Behav Brain Res* 73(1-2): 277-280.

Baskin DG, Sipols AJ, Schwartz MW, White MF (1993) Immunocytochemical detection of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in rat brain: colocalization with phosphotyrosine. *Regul Pept* 48(1-2): 257-266.

Ben-Jonathan N, Hnasko R (2001) Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22(6): 724-763.

Benedetto L, Pereira M, Ferreira A, Torterolo P (2014) Melanin-concentrating hormone in the medial preoptic area reduces active components of maternal behavior in rats. *Peptides* 58: 20-25.

Bosch OJ, Pfortsch J, Beiderbeck DI, Landgraf R, Neumann ID (2010) Maternal behaviour is associated with vasopressin release in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *J Neuroendocrinol* 22(5): 420-429.

Bridges R, Rigerio B, Byrnes E, Yang L, Walker A (2001) Central infusions of the recombinant human prolactin receptor antagonist, S179D-PRL, delay the onset of maternal behavior in steroid-primed, nulliparous female rats. *Endocrinology* 142(2): 730-739.

Bridges RS (2015) Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Front Neuroendocrinol* 36: 178-196.

Bridges RS, DiBiase R, Loundes DD, Doherty PC (1985) Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science* 227(4688): 782-784.

Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE (1990) Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(20): 8003-8007.

Bridges RS, Ronsheim PM (1990) Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior. *Endocrinology* 126(2): 837-848.

Briffaud V, Williams P, Courty J, Broberger C (2015) Excitation of tuberoinfundibular dopamine neurons by oxytocin: crosstalk in the control of lactation. *J Neurosci* 35(10): 4229-4237.

Brown RS, Herbison AE, Grattan DR (2011) Differential changes in responses of hypothalamic and brainstem neuronal populations to prolactin during lactation in the mouse. *Biol Reprod* 84(4): 826-836.

Brown RS, Kokay IC, Herbison AE, Grattan DR (2010) Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J Comp Neurol* 518(1): 92-102.

Brown RSE, Aoki M, Ladyman SR, Phillipps HR, Wyatt A, Boehm U, Grattan DR (2017) Prolactin action in the medial preoptic area is necessary for postpartum maternal nursing behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Burgdorf J, Zhang XL, Colechio EM, Ghoreishi-Haack N, Gross A, Kroes RA, Stanton PK, Moskal JR (2015) Insulin-Like Growth Factor I Produces an Antidepressant-Like Effect and Elicits N-Methyl-D-Aspartate Receptor Independent Long-Term Potentiation of Synaptic Transmission in Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol* 19(2).

Champagne F, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ (2001) Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12736-12741.

Champagne FA, Chretien P, Stevenson CW, Zhang TY, Gratton A, Meaney MJ (2004) Variations in nucleus accumbens dopamine associated with individual differences in maternal behavior in the rat. *J Neurosci* 24(17): 4113-4123.

Corvin AP, Molinos I, Little G, Donohoe G, Gill M, Morris DW, Tropea D (2012) Insulin-like growth factor 1 (IGF1) and its active peptide (1-3)IGF1 enhance the expression of synaptic markers in neuronal circuits through different cellular mechanisms. *Neurosci Lett* 520(1): 51-56.

Costales J, Kolevzon A (2016) The therapeutic potential of insulin-like growth factor-1 in central nervous system disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 63: 207-222.

Czech MP (1989) Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* 59(2): 235-238.

Cservenak M, Bodnar I, Usdin TB, Palkovits M, Nagy GM, Dobolyi A (2010) Tuberoinfundibular peptide of 39 residues is activated during lactation and participates in the suckling-induced prolactin release in rat. *Endocrinology* 151(12): 5830-5840.

Cservenak M, Szabo ER, Bodnar I, Leko A, Palkovits M, Nagy GM, Usdin TB, Dobolyi A (2013) Thalamic neuropeptide mediating the effects of nursing on lactation and maternal motivation. *Psychoneuroendocrinology* 38(12): 3070-3084.

Cservenák M, Szabó TR, Bodnár I, Lékó A, Palkovits M, Nagy GM, Usdin TB, Dobolyi A (2013) Thalamic neuropeptide mediating the effects of nursing on lactation and maternal motivation. *Psychoneuroendocrinology* 38(12): 3070-3084.

Dahmer MK, Hart PM, Perlman RL (1991) Insulin-like growth factor-I enhances tyrosine hydroxylase activation in bovine chromaffin cells. *J Neurochem* 57(4): 1347-1353.

Daubner SC, Le T, Wang S (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* 508(1): 1-12.

Demarest KT, McKay DW, Riegler GD, Moore KE (1983) Biochemical indices of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity during lactation: a lack of response to prolactin. *Neuroendocrinology* 36(2): 130-137.

DeVito WJ, Avakian C, Stone S, Ace CI (1992) Estradiol increases prolactin synthesis and prolactin messenger ribonucleic acid in selected brain regions in the hypophysectomized female rat. *Endocrinology* 131(5): 2154-2160.

DeVito WJ, Stone S, Avakian C (1991) Stimulation of hypothalamic prolactin release by veratridine and angiotensin II in the female rat: effect of ovariectomy and estradiol administration. *Neuroendocrinology* 54(4): 391-398.

Dobolyi A (2009) Central amylin expression and its induction in rat dams. *J Neurochem* 111(6): 1490-1500.

Dobolyi A, Grattan DR, Stolzenberg DS (2014) Preoptic inputs and mechanisms that regulate maternal responsiveness. *J Neuroendocrinol* 26(10): 627-640.

Donner N, Bredewold R, Maloumy R, Neumann ID (2007) Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur J Neurosci* 25(6): 1804-1814.

Driessen TM, Eisinger BE, Zhao C, Stevenson SA, Saul MC, Gammie SC (2014) Genes showing altered expression in the medial preoptic area in the highly social maternal phenotype are related to autism and other disorders with social deficits. *BMC Neurosci* 15: 11.

Duman CH, Schlesinger L, Terwilliger R, Russell DS, Newton SS, Duman RS (2009) Peripheral insulin-like growth factor-I produces antidepressant-like behavior and contributes to the effect of exercise. *Behav Brain Res* 198(2): 366-371.

Dyer AH, Vahdatpour C, Sanfeliu A, Tropea D (2016) The role of Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) in brain development, maturation and neuroplasticity. *Neuroscience* 325: 89-99.

Ershov PV, Ugrumov MV, Calas A, Krieger M, Thibault J (2002) Differentiation of tyrosine hydroxylase-synthesizing and/or aromatic L-amino acid decarboxylase-synthesizing neurons in the rat mediobasal hypothalamus: quantitative double-immunofluorescence study. *J Comp Neurol* 446(2): 114-122.

Escalada J, Sanchez-Franco F, Velasco B, Cacicedo L (1997) Regulation of growth hormone (GH) gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of insulin-like growth factor-I, somatostatin, and GH-releasing hormone. *Endocrinology* 138(8): 3435-3443.

Etherton TD, Bauman DE (1998) Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev* 78(3): 745-761.

Faber CA, Dobolyi A, Sleeman M, Usdin TB (2007) Distribution of tuberoinfundibular peptide of 39 residues and its receptor, parathyroid hormone 2 receptor, in the mouse brain. *J Comp Neurol* 502(4): 563-583.

Fahrbach SE, Morrell JI, Pfaff DW (1985) Possible role for endogenous oxytocin in estrogen-facilitated maternal behavior in rats. *Neuroendocrinology* 40(6): 526-532.

Feher P, Olah M, Bodnar I, Hechtl D, Bacsokay I, Juhasz B, Nagy GM, Vecsernyes M (2010) Dephosphorylation/inactivation of tyrosine hydroxylase at the median eminence of the hypothalamus is required for suckling-induced prolactin and adrenocorticotrop hormone responses. *Brain Res Bull* 82(1-2): 141-145.

Fernandez AM, Torres-Aleman I (2012) The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* 13(4): 225-239.

Firth SM, Baxter RC (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23(6): 824-854.

Fodor A, Klausz B, Pinter O, Daviu N, Rabasa C, Rotllant D, Balazsfi D, Kovacs KB, Nadal R, Zelena D (2012) Maternal neglect with reduced depressive-like behavior and blunted c-fos activation in Brattleboro mothers, the role of central vasopressin. *Horm Behav* 62(4): 539-551.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80(4): 1523-1631.

Fruchtman S, Jackson L, Borski R (2000) Insulin-like growth factor I disparately regulates prolactin and growth hormone synthesis and secretion: studies using the teleost pituitary model. *Endocrinology* 141(8): 2886-2894.

Fruchtman S, McVey DC, Borski RJ (2002) Characterization of pituitary IGF-I receptors: modulation of prolactin and growth hormone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(2): R468-476.

Gahete MD, Cordoba-Chacon J, Anadumaka CV, Lin Q, Bruning JC, Kahn CR, Luque RM, Kineman RD (2011) Elevated GH/IGF-I, due to somatotrope-specific loss of both IGF-I and insulin receptors, alters glucose homeostasis and insulin sensitivity in a diet-dependent manner. *Endocrinology* 152(12): 4825-4837.

Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS (2007) Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* 27(21): 5730-5743.

Grattan DR (2015) 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol* 226(2): T101-122.

Grattan DR, Kokay IC (2008) Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 20(6): 752-763.

Hadsell DL, Bonnette SG, Lee AV (2002) Genetic manipulation of the IGF-I axis to regulate mammary gland development and function. *J Dairy Sci* 85(2): 365-377.

Hashimoto H, Saito TR, Furudate S, Takahashi KW (2001) Prolactin levels and maternal behavior induced by ultrasonic vocalizations of the rat pup. *Exp Anim* 50(4): 307-312.

Herbert Z, Gothe S, Caldwell JD, Bernstein HG, Melle C, von Eggeling F, Lewis J, Jirikowski GF (2005) Identification of sex hormone-binding globulin in the human hypothalamus. *Neuroendocrinology* 81(5): 287-293.

Herenu CB, Cristina C, Rimoldi OJ, Becu-Villalobos D, Cambiaggi V, Portiansky EL, Goya RG (2007) Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Ther* 14(3): 237-245.

Hikake T, Hayashi S, Iguchi T, Sato T (2009) The role of IGF1 on the differentiation of prolactin secreting cells in the mouse anterior pituitary. *J Endocrinol* 203(2): 231-240.

Hiney JK, Srivastava V, Nyberg CL, Ojeda SR, Dees WL (1996) Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology* 137(9): 3717-3728.

Hiney JK, Srivastava VK, Pine MD, Les Dees W (2009) Insulin-like growth factor-I activates KiSS-1 gene expression in the brain of the prepubertal female rat. *Endocrinology* 150(1): 376-384.

Hoshaw BA, Hill TI, Crowley JJ, Malberg JE, Khawaja X, Rosenzweig-Lipson S, Schechter LE, Lucki I (2008) Antidepressant-like behavioral effects of IGF-I produced by enhanced serotonin transmission. *Eur J Pharmacol* 594(1-3): 109-116.

Hrabovszky E, Liposits Z (1994) Adrenergic innervation of dopamine neurons in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 182(2): 143-146.

Hwang O, Choi HJ (1995) Induction of gene expression of the catecholamine-synthesizing enzymes by insulin-like growth factor-I. *J Neurochem* 65(5): 1988-1996.

Jacobson CD, Terkel J, Gorski RA, Sawyer CH (1980) Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behavior: retrieving and nest building in the rat. *Brain Res* 194(2): 471-478.

Jirikowski GF, Pusch L, Mopert B, Herbert Z, Caldwell JD (2007) Expression of corticosteroid binding globulin in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat* 34(1-2): 22-28.

Jogie-Brahim S, Feldman D, Oh Y (2009) Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease. *Endocr Rev* 30(5): 417-437.

Knollema S, Brown ER, Vale W, Sawchenko PE (1992) Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic Acid and Peptide expression in lactating rats. *J Neuroendocrinol* 4(6): 709-717.

Komori K, Fujii T, Nagatsu I (1991) Do some tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the human ventrolateral arcuate nucleus and globus pallidus produce only L-dopa? *Neurosci Lett* 133(2): 203-206.

Ladyman SR, Augustine RA, Grattan DR (2010) Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. *J Neuroendocrinol* 22(7): 805-817.

Larsen CM, Grattan DR (2012) Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors. *Brain Behav Immun* 26(2): 201-209.

Leko AH, Cservenak M, Dobolyi A (2017) Suckling induced insulin-like growth factor-1 (IGF-1) release in mother rats. *Growth Horm IGF Res* 37: 7-12.

Leko AH, Cservenak M, Szabo ER, Hanics J, Alpar A, Dobolyi A (2017) Insulin-like growth factor I and its binding protein-3 are regulators of lactation and maternal responsiveness. *Sci Rep* 7(1): 3396.

Lonstein JS (2005) Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. *Horm Behav* 47(3): 241-255.

Lonstein JS (2007) Regulation of anxiety during the postpartum period. *Front Neuroendocrinol* 28(2-3): 115-141.

Lonstein JS, De Vries GJ (2000) Maternal behaviour in lactating rats stimulates c-fos in glutamate decarboxylase-synthesizing neurons of the medial preoptic area, ventral bed nucleus of the stria terminalis, and ventrocaudal periaqueductal gray. *Neuroscience* 100(3): 557-568.

Lonstein JS, Stern JM (1997) Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c-fos and electrolytic lesion studies in lactating rats. *J Neurosci* 17(9): 3364-3378.

Lookingland KJ, Jarry HD, Moore KE (1987) The metabolism of dopamine in the median eminence reflects the activity of tuberoinfundibular neurons. *Brain Res* 419(1-2): 303-310.

Lyons DJ, Broberger C (2014) TIDAL WAVES: Network mechanisms in the neuroendocrine control of prolactin release. *Front Neuroendocrinol* 35(4): 420-438.

Ma FY, Grattan DR, Goffin V, Bunn SJ (2005) Prolactin-regulated tyrosine hydroxylase activity and messenger ribonucleic acid expression in mediobasal hypothalamic cultures: the differential role of specific protein kinases. *Endocrinology* 146(1): 93-102.

Madon RJ, Ensor DM, Knight CH, Flint DJ (1986) Effects of an antiserum to rat growth hormone on lactation in the rat. *J Endocrinol* 111(1): 117-123.

Malberg JE, Platt B, Rizzo SJ, Ring RH, Lucki I, Schechter LE, Rosenzweig-Lipson S (2007) Increasing the levels of insulin-like growth factor-I by an IGF binding protein inhibitor produces anxiolytic and antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology* 32(11): 2360-2368.

Mattson BJ, Morrell JI (2005) Preference for cocaine- versus pup-associated cues differentially activates neurons expressing either Fos or cocaine- and amphetamine-regulated transcript in lactating, maternal rodents. *Neuroscience* 135(2): 315-328.

Milsom SR, Breier BH, Gallaher BW, Cox VA, Gunn AJ, Gluckman PD (1992) Growth hormone stimulates galactopoiesis in healthy lactating women. *Acta Endocrinol (Copenh)* 127(4): 337-343.

Murphy LJ, Tachibana K, Friesen HG (1988) Stimulation of hepatic insulin-like growth factor-I gene expression by ovine prolactin: evidence for intrinsic somatogenic activity in the rat. *Endocrinology* 122(5): 2027-2033.

Mysoet J, Dupont E, Bastide B, Canu MH (2015) Role of IGF-1 in cortical plasticity and functional deficit induced by sensorimotor restriction. *Behav Brain Res* 290: 117-123.

Nishijima T, Piriz J, Duflot S, Fernandez AM, Gaitan G, Gomez-Pinedo U, Verdugo JM, Leroy F, Soya H, Nunez A, Torres-Aleman I (2010) Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron* 67(5): 834-846.

Nordstrom O, Melander T, Hokfelt T, Bartfai T, Goldstein M (1987) Evidence for an inhibitory effect of the peptide galanin on dopamine release from the rat median eminence. *Neurosci Lett* 73(1): 21-26.

Numan M (1978) Progesterone inhibition of maternal behavior in the rat. *Horm Behav* 11(2): 209-231.

Numan M (2015) *Neurobiology of Social Behavior - Toward an understanding of the prosocial and antisocial brain*, Elsevier - Academic Press, (Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo), 172-173

Numan M, Corodimas KP, Numan MJ, Factor EM, Piers WD (1988) Axon-sparing lesions of the preoptic region and substantia innominata disrupt maternal behavior in rats. *Behav Neurosci* 102(3): 381-396.

Numan M, Numan MJ (1997) Projection sites of medial preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis neurons that express Fos during maternal behavior in female rats. *J Neuroendocrinol* 9(5): 369-384.

Numan M, Numan MJ, Pliakou N, Stolzenberg DS, Mullins OJ, Murphy JM, Smith CD (2005) The effects of D1 or D2 dopamine receptor antagonism in the medial preoptic area, ventral pallidum, or nucleus accumbens on the maternal retrieval response and other aspects of maternal behavior in rats. *Behav Neurosci* 119(6): 1588-1604.

Numan M, Numan MJ, Schwarz JM, Neuner CM, Flood TF, Smith CD (2005) Medial preoptic area interactions with the nucleus accumbens-ventral pallidum circuit and maternal behavior in rats. *Behav Brain Res* 158(1): 53-68.

Numan M, Rosenblatt JS, Komisaruk BR (1977) Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 91(1): 146-164.

Okabe S, Nagasawa M, Kihara T, Kato M, Harada T, Koshida N, Mogi K, Kikusui T (2013) Pup odor and ultrasonic vocalizations synergistically stimulate maternal attention in mice. *Behav Neurosci* 127(3): 432-438.

Orpen BG, Fleming AS (1987) Experience with pups sustains maternal responding in postpartum rats. *Physiol Behav* 40(1): 47-54.

Palkovits M, Usdin TB, Makara GB, Dobolyi A (2010) Tuberoinfundibular peptide of 39 residues- immunoreactive fibers in the zona incerta and the supraoptic decussations terminate in the neuroendocrine hypothalamus. *Neurochem Res* 35(12): 2078-2085.

Pawluski JL, Lonstein JS, Fleming AS (2017) The Neurobiology of Postpartum Anxiety and Depression. *Trends Neurosci* 40(2): 106-120.

Pedersen CA, Ascher JA, Monroe YL, Prange AJ, Jr. (1982) Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. *Science* 216(4546): 648-650.

Pereira M, Morrell JI (2009) The changing role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior across the postpartum period: facilitation followed by inhibition. *Behav Brain Res* 205(1): 238-248.

Pereira M, Morrell JI (2010) The medial preoptic area is necessary for motivated choice of pup- over cocaine-associated environments by early postpartum rats. *Neuroscience* 167(2): 216-231.

Prosser CG, Davis SR (1992) Milking frequency alters the milk yield and mammary blood flow response to intra-mammary infusion of insulin-like growth factor-I in the goat. *J Endocrinol* 135(2): 311-316.

Prosser CG, Davis SR, Farr VC, Lacasse P (1996) Regulation of blood flow in the mammary microvasculature. *J Dairy Sci* 79(7): 1184-1197.

Quesada A, Lee BY, Micevych PE (2008) PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol* 68(5): 632-644.

Ramsey MM, Adams MM, Ariwodola OJ, Sonntag WE, Weiner JL (2005) Functional characterization of des-IGF-1 action at excitatory synapses in the CA1 region of rat hippocampus. *J Neurophysiol* 94(1): 247-254.

Ranke MB (2015) Insulin-like growth factor binding-protein-3 (IGFBP-3). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29(5): 701-711.

Reinhardt RR, Bondy CA (1994) Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology* 135(5): 1753-1761.

Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, Autry AE, Kadiri L, Umadevi Venkataraju K, Zhou Y, Wang VX, Tang CY, Olsen O, Dulac C, Osten P, Tessier-Lavigne M (2016) Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell* 165(7): 1789-1802.

Rizvi TA, Ennis M, Shipley MT (1992) Reciprocal connections between the medial preoptic area and the midbrain periaqueductal gray in rat: a WGA-HRP and PHA-L study. *J Comp Neurol* 315(1): 1-15.

Romano N, Yip SH, Hodson DJ, Guillou A, Parnaudeau S, Kirk S, Tronche F, Bonnefont X, Le Tissier P, Bunn SJ, Grattan DR, Mollard P, Martin AO (2013) Plasticity of hypothalamic dopamine neurons during lactation results in dissociation of electrical activity and release. *J Neurosci* 33(10): 4424-4433.

Rondini TA, Donato J, Jr., Rodrigues Bde C, Bittencourt JC, Elias CF (2010) Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin-concentrating hormone during lactation. *J Chem Neuroanat* 39(1): 51-62.

Rosenblatt JS (1967) Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science* 156(3781): 1512-1514.

Sato M, Frohman LA (1993) Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology* 133(2): 793-799.

Sauve D, Woodside B (2000) Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Res* 868(2): 306-314.

Schwerdt JI, Lopez-Leon M, Console GM, Brown OA, Morel GR, Spinedi E, Goya RG (2017) Rejuvenating Effect of Long-Term Insulin-Like Growth Factor-I Gene Therapy in the Hypothalamus of Aged Rats with Dopaminergic Dysfunction. *Rejuvenation Res.*

Sendemir E, Herbert Z, Caldwell JD, Jirikowski GF (2006) Changes of sex hormone-binding globulin/SHBG expression in the hypothalamo-hypophyseal system of rats during pregnancy, parturition and lactation. *Horm Metab Res* 38(4): 219-224.

Shahrokh DK, Zhang TY, Diorio J, Gratton A, Meaney MJ (2010) Oxytocin-dopamine interactions mediate variations in maternal behavior in the rat. *Endocrinology* 151(5): 2276-2286.

Sheehan T, Paul M, Amaral E, Numan MJ, Numan M (2001) Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience* 106(2): 341-356.

Siegel HI, Rosenblatt JS (1975) Hormonal basis of hysterectomy-induced maternal behavior during pregnancy in the rat. *Horm Behav* 6(3): 211-222.

Siegel HI, Rosenblatt JS (1975) Progesterone inhibition of estrogen-induced maternal behavior in hysterectomized-ovariectomized virgin rats. *Horm Behav* 6(3): 223-230.

Simerly RB, Swanson LW (1986) The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 246(3): 312-342.

Simerly RB, Swanson LW (1988) Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 270(2): 209-242.

Sivukhina EV, Jirikowski GF (2014) Adrenal steroids in the brain: role of the intrinsic expression of corticosteroid-binding globulin (CBG) in the stress response. *Steroids* 81: 70-73.

Smith CD, Holschbach MA, Olsewicz J, Lonstein JS (2012) Effects of noradrenergic alpha-2 receptor antagonism or noradrenergic lesions in the ventral bed nucleus of the stria terminalis and medial preoptic area on maternal care in female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 224(2): 263-276.

Stefaneanu L, Powell-Braxton L, Won W, Chandrashekar V, Bartke A (1999) Somatotroph and lactotroph changes in the adenohypophyses of mice with disrupted insulin-like growth factor I gene. *Endocrinology* 140(9): 3881-3889.

Steyn FJ, Tolle V, Chen C, Epelbaum J (2016) Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion. *Compr. Physiol.* 6(2): 687-735.

Sun Y, Todd BJ, Thornton K, Etgen AM, Neal-Perry G (2011) Differential effects of hypothalamic IGF-I on gonadotropin releasing hormone neuronal activation during steroid-induced LH surges in young and middle-aged female rats. *Endocrinology* 152(11): 4276-4287.

Szabo ER, Cservenak M, Dobolyi A (2012) Amylin is a novel neuropeptide with potential maternal functions in the rat. *Faseb j* 26(1): 272-281.

Tannenbaum GS, Guyda HJ, Posner BI (1983) Insulin-like growth factors: a role in growth hormone negative feedback and body weight regulation via brain. *Science* 220(4592): 77-79.

Tekin I, Roskoski R, Jr., Carkaci-Salli N, Vrana KE (2014) Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. *J Neural Transm (Vienna)* 121(12): 1451-1481.

Terkel J, Bridges RS, Sawyer CH (1979) Effects of transecting lateral neural connections of the medial preoptic area on maternal behavior in the rat: nest building, pup retrieval and prolactin secretion. *Brain Res* 169(2): 369-380.

Terry LC, Saunders A, Audet J, Willoughby JO, Brazeau P, Martin JB (1977) Physiologic secretion of growth hormone and prolactin in male and female rats. *Clin Endocrinol (Oxf)* 6 Suppl: 19s-28s.

Tobiansky DJ, Roma PG, Hattori T, Will RG, Nutsch VL, Dominguez JM (2013) The medial preoptic area modulates cocaine-induced activity in female rats. *Behav Neurosci* 127(2): 293-302.

Todd BJ, Fraley GS, Peck AC, Schwartz GJ, Etgen AM (2007) Central insulin-like growth factor 1 receptors play distinct roles in the control of reproduction, food intake, and body weight in female rats. *Biol Reprod* 77(3): 492-503.

Torner L, Toschi N, Pohlinger A, Landgraf R, Neumann ID (2001) Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J Neurosci* 21(9): 3207-3214.

Trejo JL, Piriz J, Llorens-Martin MV, Fernandez AM, Bolos M, LeRoith D, Nunez A, Torres-Aleman I (2007) Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol Psychiatry* 12(12): 1118-1128.

Trott JF, Schennink A, Petrie WK, Manjarin R, VanKlompberg MK, Hovey RC (2012) Triennial Lactation Symposium: Prolactin: The multifaceted potentiator of mammary growth and function. *J Anim Sci* 90(5): 1674-1686.

Trueba-Saiz A, Fernandez AM, Nishijima T, Mecha M, Santi A, Munive V, Aleman IT (2017) Circulating Insulin-Like Growth Factor I Regulates Its Receptor in the Brain of Male Mice. *Endocrinology* 158(2): 349-355.

Tsuneoka Y, Maruyama T, Yoshida S, Nishimori K, Kato T, Numan M, Kuroda KO (2013) Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse. *J Comp Neurol* 521(7): 1633-1663.

van Leengoed E, Kerker E, Swanson HH (1987) Inhibition of post-partum maternal behaviour in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. *J Endocrinol* 112(2): 275-282.

Vincze C, Pál G, Wappler EA, Szabó ER, Nagy ZG, Lovas G, Dobolyi A (2010) Distribution of mRNAs encoding transforming growth factors- β 1,-2, and-3 in the intact rat brain and after experimentally induced focal ischemia. *Journal of Comparative Neurology* 518(18): 3752-3770.

Wang HJ, Hoffman GE, Smith MS (1993) Suppressed tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic system during lactation. *Endocrinology* 133(4): 1657-1663.

Wang X, Hessner MJ, Wu Y, Pati N, Ghosh S (2003) Quantitative quality control in microarray experiments and the application in data filtering, normalization and false positive rate prediction. *Bioinformatics* 19(11): 1341-1347.

Wehrenberg WB, Gaillard RC (1989) Neuroendocrine mechanisms regulating growth hormone and prolactin secretion during lactation. *Endocrinology* 124(1): 464-467.

Wolfe A, Divall S, Wu S (2014) The regulation of reproductive neuroendocrine function by insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1). *Front Neuroendocrinol* 35(4): 558-572.

Wu Z, Autry AE, Bergan JF, Watabe-Uchida M, Dulac CG (2014) Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behaviour. *Nature* 509(7500): 325-330.

Xing C, Yin Y, He X, Xie Z (2006) Effects of insulin-like growth factor 1 on voltage-gated ion channels in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 1072(1): 30-35.

Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(13): 7324-7329.

Yamasaki H, Prager D, Gebremedhin S, Melmed S (1991) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) attenuation of growth hormone is enhanced by overexpression of pituitary IGF-I receptors. *Mol Endocrinol* 5(7): 890-896.

Yang J, Kennelly JJ, Baracos VE (2000) The activity of transcription factor Stat5 responds to prolactin, growth hormone, and IGF-I in rat and bovine mammary explant culture. *J Anim Sci* 78(12): 3114-3125.

Young LJ, Wang Z, Donaldson R, Rissman EF (1998) Estrogen receptor alpha is essential for induction of oxytocin receptor by estrogen. *Neuroreport* 9(5): 933-936.

Zhang T, Jia N, Fei E, Wang P, Liao Z, Ding L, Yan M, Nukina N, Zhou J, Wang G (2007) Nurr1 is phosphorylated by ERK2 in vitro and its phosphorylation upregulates tyrosine hydroxylase expression in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 423(2): 118-122.

Zhou X, Herman JP, Paden CM (1999) Evidence that IGF-I acts as an autocrine/paracrine growth factor in the magnocellular neurosecretory system: neuronal synthesis and induction of axonal sprouting. *Exp Neurol* 159(2): 419-432.

Zoli M, Agnati LF, Tinner B, Steinbusch HW, Fuxe K (1993) Distribution of dopamine-immunoreactive neurons and their relationships to transmitter and hypothalamic hormone-immunoreactive neuronal systems in the rat mediobasal hypothalamus. A morphometric and microdensitometric analysis. *J Chem Neuroanat* 6(5): 293-310.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Az értekezés témájában megjelent publikációk

Leko AH, Cservenak M, Szabo ER, Hanics J, Alpár A, Dobolyi A (2017) Insulin-like growth factor I and its binding protein-3 are regulators of lactation and maternal responsiveness. *Sci Rep.* 7:3396. **IF: 4,259**

Lékó AH, Cservenák M, Dobolyi Á. (2017) Suckling induced insulin-like growth factor-1 (IGF-1) release in mother rats. *Growth Horm IGF Res.* 37:7-12 **IF: 1,828**

2. Egyéb, az értekezéshez fel nem használt publikációk

Cservenák M, Szabó ÉR, Bodnár I, **Lékó A**, Palkovits M, Nagy GM, Usdin TB, Dobolyi A. (2013) Thalamic neuropeptide mediating the effects of nursing on lactation and maternal motivation. *Psychoneuroendocrinology* 38:3070-3084 **IF: 5.591**

Cservenák M, Keller D, Kis V, Fazekas EA, Öllös H, **Lékó AH**, Szabó ÉR, Renner É, Usdin TB, Palkovits M, Dobolyi Á. (2017) A thalamo-hypothalamic pathway that activates oxytocin neurons in social contexts in female rats. *Endocrinology* 158(2):335-348 **IF: 4,286**

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek és mentoromnak, Dr. Dobolyi Árpádnak a több, mint 6 éve tartó fáradhatatlan odafigyelésért, iránymutatásért és azért, hogy saját idejét és energiáját nem kímélve, nagy türelemmel segítette tudományos munkámat, ezzel mind szakmai mind emberi szempontból követendő példát állítva elém.

Hálával tartozom tanításáért a Neuromorfológiai Labor korábbi és a Humán Agyszövet Bank vezetőjének, Palkovits Mikós Professzor Úrnak. A munkahelyi jó, baráti hangulatért és hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért, köszönetet mondok Dr. Borsicsné Szabó Éva Rebekának, Dr. Dobolyiné Renner Évának, Toronyay-Kasztner Magdolnának és Dr. Pál Gabriellának a labor dolgozóinak, kutatóinak. Külön köszönöm Dr. Vitéz-Cservenák Melindának a kutatásban nyújtott segítséget és a tőle tanult módszereket, Deák Szilviának az asszisztenciáját és munkáját állatokon történt minden beavatkozásban. Nagyon hálás vagyok Hanák Nikolettnek, aki több, mint 6 éven keresztül segített minden laboratóriumi munkában, mellettem állt az első pillanattól kezdve óriási segítséget jelentve nekem, az ő precizitása mindig példaértékű lesz számomra. Köszönettel tartozom az Anatómiai-, Szövet- és Fejlődéstani Intézetnek, hogy második otthonom volt az itt diákkörösként és doktoranduszként töltött évek során, valamint a Kísérletes Neuroanatómiai és Fejlődésbiológiai Csoport tagjainak, Dr. Alpár Alánnak, Dr. Hanics Jánosnak és Németh Andreának az élvezetes közös munkáért, az *in vitro* kutatásokban nyújtott segítségükért.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni Édesanyám, Édesapám és Feleségem szeretetét, támogatását és hogy mind sikereimben, mind nehézségeimben mellettem álltak és állnak mindenkor.