DOI:10.14753/SE.2016.1942

A központi idegrendszeri *amylin* leírása és potenciális szerepe rágcsálók utódgondozó magatartásában

Doktori értekezés

Borsicsné Szabó Éva Rebeka

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Dobolyi Árpád, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Köves Katalin, az MTA doktora, ny.egyetemi tanár
Dr. Hrabovszky Erik, az MTA doktora, tud. tanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Halász Béla, az MTA doktora, egy.tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lukáts Ákos, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Dénes Ádám, Ph.D., tud. főmunkatárs

Budapest
2016

DOI:10.14753/SE.2016.1942

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS 10
1.1. Amylin 10
1.1.1. Az amylin gén, RNS és peptid szerkezete 10
1.1.2. Az amylin receptorai 11
1.1.3. Az amylin előfordulása és funkciói 15
1.1.4. Az amylin megjelenése a központi idegrendszerben 18
1.2. A preopticus terület 19
1.2.1. A preopticus terület elhelyezkedése 20
1.2.2. A mediális preopticus terület neurokémiai jellemzése 22
1.2.3. A preopticus terület funkciói 23
1.2.4. A preopticus area humorális és neuronális bemenetei 25
1.2.5. A preopticus area kimenetei 27
1.2.6. Nucleus interstitialis striae terminalis 28
1.3. Az anyai viselkedés 30
1.3.1. Anyai viselkedés rágcsálókban 31
Szülést követően, a kölykökhöz közvetlenül kapcsolódó anyai magatartásformák 33
Szülést követően, a kölykökhöz közvetetten kapcsolódó anyai magatartásformák 34
1.3.2. Az anyai viselkedés kialakulása és szabályozása 35
Neuronális hatások 36
Hormonális hatások 39
Neurokémiai modulátorok 41
1.3.3. Az anyai viselkedés indukciója nem anya állatokban 44
1.3.4. Az anyai viselkedés vizsgáló módszerei 45
Spontán anyai viselkedés mérése 46
Indukált anyai viselkedést mérő tesztek 46
Kölyök visszaviteli teszt (Pup-retrieval Test) 46
Az anyai agresszió tesztje (Maternal Defense Test) 47

DOI:10.14753/SE.2016.1942

Kondícionált helypreferencia teszt (Conditioned Place Preference Test, CPP) 47
Pedálnyomó viselkedési teszt (Bar-pressing test) 48
A postpartum periódusban bekövetkező emocionális változásokat mérő tesztek 48
Emelt keresztpalló teszt (Elevated plus-maze test, EPM) 48
Kényszeres úszás teszt (Forced Swimming Test, FST) 49
Cukorpreferencia teszt (Sucrose preference test, SPT) 49
2. CÉLKITŰZÉSEK 50
2.1. A szülést követően milyen időbeli lefolyással és eloszlásban jelenik meg az amylin patkányokban és egerekben? 50
2.2. A szülésen kívül milyen más hatások idézhetik elő az amylin központi idegrendszeri indukcióját? 50
2.3. Mutatnak-e anyai aktivációt a preopticus területen található amylint expresszáló idegsejtek? 50
2.4. Kapcsolatban állnak-e az amylint expresszáló idegsejtek a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszerrel? 50
2.5. Hogyan befolyásolja a szülés és az anyai viselkedésre való szenzitizálás az egerek anyai motivációját és depresszió-szerű viselkedését? 51
2.6. Milyen hatással van az amylin hiánya az anyák, illetve a szenzitizált szűz nőstények viselkedésére? 51
3. MÓDSZEREK 52
3.1. Állatok 52
1. Patkányok 52
2. Egerek 52
Az egerek tenyésztése 53
Az egerek genotipizálása 53
3.2. Petefészekirtás (Ovariectomia) 54
3.3. Anyai viselkedés indukciója nem anya patkányokban és egerekben (anyai viselkedésre való szenzitizálás) 55
3.4. A c-fos aktiváció vizsgálata kölykök visszaadásának hatására anya patkányokban 55

3.5. Patkány agyszövet mikrodisszekciója 56
3.6. Amylin mRNS-szint mérése valós idejű polimeráz láncreakcióval 57
3.7. Amylin *in situ* hibridizációs hisztokémia 57
3.8. X-Gal hisztokémia 59
3.9. Immunhisztokémia 59
1. Amylin immunhisztokémia 60
2. c-fos immunhisztokémia 61
3. c-fos immunreaktivitás és amylin mRNS kettős jelölése 62
4. Amylin és c-fos kettős fluoreszcens festés elemzése 62
3.10. Hisztológiai analízis 62
3.11. A szülést és szenzitizálást követő viselkedésbeli változások mérésére, egereken használt magatartási tesztek 63
1. Kondícionált helypreferencia teszt (Conditioned Place Preference, CPP) 64
2. Kényszeres úszás teszt (Forced Swim Test, FST) 65
3.12. Statisztika 66
4. EREDMÉNYEK 67
4.1. Az amylin-indukció időbeli lefolyásának és eloszlásának meghatározása patkányokban és egerekben 67
4.1.1. Amylin mRNS expresszió a szülés körüli (peripartum) és a szülés utáni (postpartum) időszakban patkányok központi idegrendszerében 67
4.1.2. Amylin indukciója egér anyákban 69
4.1.3. Amylin-immunreaktivitás anya patkányok preopticus területén 71
4.1.4. Amylin-immunreaktivitás anya patkányok hasnyálmirigyében 71
4.2. Amylin-indukció vizsgálata ovariectomia, anyai viselkedésre való szenzitzálás, illetve éheztetés hatására szűz nőstény patkányok preopticus területén 73
4.2.1. Amylin mRNS expresszió ovariectomiat, illetve anyai viselkedésre való szenzitizálást követően nőstény patkányok preopticus területén 73
4.2.2. Az anyai viselkedésre való szenzitizálás, illetve az éheztetés hatása az amylin mRNS szintjére nőstény patkányok preopticus területén 74
4.2.3. Az anyai viselkedésre való szenzitizálás amylin-immunreaktivitásra gyakorolt hatása nőstény patkányok preopticus területén 77

4.3. A preopticus területen lévő amylin-tartalmú idegsejtek anyai aktivációjának vizsgálata 78
4.3.1. Az amylin-*immunreaktív* idegsejtek Fos-aktivációja kölykök visszaadásának hatására anya patkányokban 78
4.3.2. Az amylin *mRNS*-t expresszáló neuronok Fos-aktivációja kölykök visszaadásának hatására anya patkányokban 80
4.4. Az amylin-neuronok és a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer topográfiai és funkcionális kapcsolatának feltérképezése 81
4.4.1. Az amylin-immunreaktív idegsejtek és a TIP39-tartalmú idegrostok elhelyezkedése anya patkányok preopticus területén 81
4.4.2. Amylin-pozitív neuronok és PTH2 receptort expresszáló idegsejtek topográfiai eloszlása egér anyák preopticus területén 82
4.4.3. Az amylin-mRNS szintjének meghatározása PTH2R hiányában 83
4.5. A szülés és a szenzitizálás viselkedésre kifejtett hatásának vizsgálata egerekben 86
4.5.1. Az anyaság és a szenzitizálás hatása a kondícionált helypreferencia tesztben mutatott viselkedésre 86
4.5.2. Az anyaság hatása kényszeres úszás tesztben mutatott viselkedésre 88
4.6. Amylin-gént nem tartalmazó egér anyák és szenzitizált nőstény egerek viselkedésének vizsgálata 91
4.6.1. Amylin-gén hiányának hatása a kölyök-asszociált preferencia teszt eredményére 91
4.6.2. Az amylin-hiányos egér anyák depresszió-szerű viselkedése 92
5. MEGBESZÉLÉS 95
5.1. Az amylin-indukció időbeli lefolyása és eloszlása patkányokban és egerekben 95
5.2. Amylin-indukció ovariectomia, anyai viselkedésre való szenzitizálás, illetve éheztetés hatására szűz nőstény patkányok preopticus területén 97
5.3. A preopticus területen lévő amylin-tartalmú idegsejtek anyai aktivációja 99
5.4. Az amylin-neuronok és a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer topográfiai és funkcionális kapcsolata 102
5.5. A szülés és a szenzitizálás viselkedésre kifejtett hatása egerekben 103

DOI:10.14753/SE.2016.1942

5.6. Az egér anyák és a szenzitizált nőstény egerek amylin gén hiányában bekövetkező megváltozott viselkedése 110
6. KÖVETKEZTETÉSEK 113
7. ÖSSZEFOGLALÁS 115
8. SUMMARY 117
9. IRODALOMJEGYZÉK 118
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 153
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 154

DOI:10.14753/SE.2016.1942

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A rövidítések jegyzékében az anatómiai elnevezéseknél a latin kifejezés mellett zárójelben annak angol megfelelője is szerepel.

ac	- commissura anterior (anterior commissure)
AHN	- nucleus hypothalamicus anterior (anterior hypothalamic nucleus)
AMY1 receptor	- 1-es típusú amylin receptor
AMY2 receptor	- 2-es típusú amylin receptor
AMY3 receptor	- 3-as típusú amylin receptor
ANG II	- angiotenzin II (angiotensin II)
AP	- area postrema
Arc	- nucleus arcuatus (arcuate nucleus)
AVP	- arginin-vazopresszin
AVPe	- nucleus periventricularis anteroventralis (anteroventral periventricular nucleus)
BNST	- nucleus interstitialis striae terminalis (bed nucleus of the stria terminalis)
BNSTv	- nucleus interstitialis striae terminalis pars ventralis (bed nucleus of the stria terminalis, ventral part)
CeA	- nucleus amygdaloideus centralis (central amygdaloid nucleus)
CGRP	- kalcitonin gén-rokon peptid (calcitonin gene-related peptide)
CCK	- kolecisztokinin (cholecystokinin)
CL	- kalcitoninszerű receptor (calcitonin like receptor)
CPP	- kondícionált helypreferencia teszt (conditioned place preference test)
CRF	- kortikotropin-felszabadító faktor (corticotropin-releasing factor)
CTR	- kalcitonin receptor (calcitonin receptor)
DA	- dopamin
DMH	- nucleus dorsomedialis (dorsomedial hypothalamic nucleus)
EPM	- emelt keresztpalló teszt (elevated plus maze test)
ER-α	- α-típusú ösztrogén receptorok (estrogen receptor β)

ER-β	- β-típusú ösztrogén receptorok (estrogen receptor β)
E2	- ösztradiol- 17β
f	- fornix
FST	- kényszeres úszás teszt (forced swimming test)
GABA	- γ-amino-vajsav
GLP-1	- glukagon-szerű peptid-1 (glucagon-like peptide 1)
GnRH	- gonadotropin-releasing hormon
Hth	- hypothalamus
IAPP	- amylin, szigetsejt-amyloid polipeptid (islet amyloid polypeptide)
KO	- génhiányos (knockout)
LH	- luteinizáló hormon (luteinizing hormone)
LPB	- nucleus parabrachialis lateralis (lateral parabrachial nucleus)
LPO	- area preotica lateralis/nucleus preopticus lateralis (lateral preotic area/lateral preoptic nucleus)
MG	- corpus geniculatum mediale (medial geniculate body)
ML	- lemniscus medialis (medial lemniscus)
MnPO	- nucleus preopticus medianus (median preoptic nucleus)
MPA	- MPOA dorsolaterális területe
MPN	- nucleus preopticus medialis (medial preoptic nucleus)
MPOA	- area preoptica medialis (medial preoptic area)
NA	- noradrenalin
NAcc	- nucleus accumbens
NTS	- nucleus tractus solitarii (nucleus of the solitary tract)
och	- chiasma opticum (optic chiasm)
OT	- oxytocin
OTR	- oxytocin receptor
OVLT	- organum vasculosum laminae terminalis (vascular organ of lamina terminalis)
PAG	- substantia grisea centralis (periaqueductal gray)
Pe	- nucleus periventricularis (hypothalamic periventricular nucleus)
PIL	- a thalamus intarlaminaris komplexe (posterior intralaminar complex of the thalamus)

POA	- area/regio preoptica (preoptic area)
PPD	- postpartum nap (postpartum day)
PTH2R	- kettes típusú parathormon receptor (parathyroid hormone 2 receptor)
PVN	- nucleus paraventricularis (hypothalamic paraventricular nucleus)
PVPO	- nucleus preopticus periventricularis (periventricular preoptic nucleus)
RAMP	- receptor aktivitást módosító fehérje (receptor activity-modifying protein)
RT-PCR	- valós idejű polimeráz láncreakció (real-time polymerase chain reaction)
SDN-POA	- a preopticus area szexuálisan dimorf magja (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area)
SFO	- szubfornikális szerv (subfornical organ)
SN	- substantia nigra
SP	- P-anyag (substance P)
SPF	- area subparafascicularis (subparafascicular area)
SPT	- cukorpreferencia teszt (sucrose preference test)
TIP39	- tuberoinfundibuláris peptid 39 (tuberoinfundibular peptide of 39 residues)
VLPO	- nucleus preopticus ventrolateralis (ventrolateral preoptic nucleus)
VMH	- nucleus ventromedialis (hypothalamic ventromedial nucleus)
VP	- ventral pallidum
VTA	- area tegmentalis ventralis (ventral tegmental area)
3V	- ventriculus tertius (third ventricle)
5-HT	-szerotonin

DOI:10.14753/SE.2016.1942

1. BEVEZETÉS

1.1. Amylin

Az amylin, vagy szigetsejt-amyloid polipeptid (IAPP) egy 37 aminosavból álló peptid, a kalcitonin peptid család tagja. Az amylint, és annak pancreasból az inzulinnal együtt történő felszabadulását 1986-ban fedezték fel (Westermark és mtsai 1986). Az eddig legtöbbet vizsgált funkciója az étkezés leállítása a vércukorszint emelkedésének hatására (Lutz 2006). Pramlintide elnevezésű analógját kiterjedten alkalmazzák 1-es és 2-es típusú cukorbetegség inzulinnal történő kezelésének kiegészítőjeként (Hay és mtsai 2015). A glükózanyagcserében játszott szerepe mellett az energia metabolizmusra és az obezitásra gyakorolt hatását vizsgáló klinikai tanulmányok kimutatták, hogy az amylin agonistával való kezelés segíti a súlycsökkentést is (Aronne és mtsai 2007). Az amylin további hormonális funkcióit bizonyították a kardiovaszkuláris rendszer és a csontanyagcserével kapcsolatos szabályozásokban (Hay és mtsai 2015). A perifériás amylin anorexigén hatásait elsődlegesen a circumventrikuláris szerveken át az agyba jutva fejti ki (Morley és mtsai 1995). Mindazonáltal az amylin receptorát a központi idegrendszer több olyan területén is leírták (Becskei és mtsai 2004), amelyek a circumventrikuláris szerveken át a perifériáról érkező amylin számára valószínűleg nem hozzáférhetők. Az amylin központi idegrendszeri expresszióját csupán néhány évvel ezelőtt mutatták ki laktáló patkány anyák preopticus területén (Dobolyi 2009). Az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek preopticus területen belüli elhelyezkedését, valamint az expresszió körülményeit tekintve a periférián megjelenő amylintől eltérően a központi idegrendszeri amylin funkciója az anyai adaptációk szabályozásában lehet.

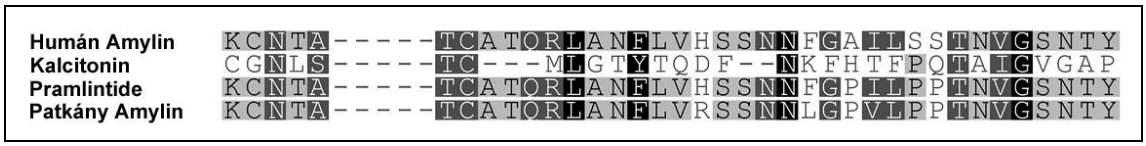
1.1.1. Az amylin gén, RNS és peptid szerkezete

Az amylint kódoló gén a 12. kromoszómán, annak 12p12.1 lókuszán helyezkedik el. Az amylin egy kópiában kódolt (unigén kódja patkányok esetén: Rn.11394) peptid. Kódoló génje egyetlen más, eddig ismert peptidet sem kódol (Leffert és mtsai 1989).

Az amylint kódoló génről először egy 89 aminosavból álló, prekurzorral ellátott prohormon keletkezik, melyből karboxipeptidáz E és prohormon konvertáz révén alakul

ki a peptid végleges szerkezete (Westermark és mtsai 2011), ugyanakkor az amylin teljes bioaktivitásának eléréséhez két poszttranszlációs módosítás szükséges: C-terminálisan egy amid (Tyr37) és két, a 2. és 7. pozícióban lévő cisztein között egy diszulfid kötés alakul ki (Young és mtsai 1996). Aminosav-sorrendje a kalcitonin gén-rokon peptidhez (CGRP) nagyon hasonló, homológiája a CGRP-vel csaknem 50 %-os, míg a peptidcsalád többi tagjával, úgymint a kalcitoninnal, az adrenomedullinnal vagy az intermedinnel/adrenomedullin 2-vel 20-30%-os (Wimalawansa 1997).

Az amylin 37 aminosavból álló, viszonylag stabil, bioaktív szintetikus agonistája a pramlintide, melynek hatáserőssége az amylinéval egyezik meg. Az amylinhez hasonlóan szintén 37 aminosav építi fel, ugyanakkor a 25., 28. és 29. aminosav helyén, az amylintől eltérő módon, prolin található (Gingell és mtsai 2014) (1. ábra).



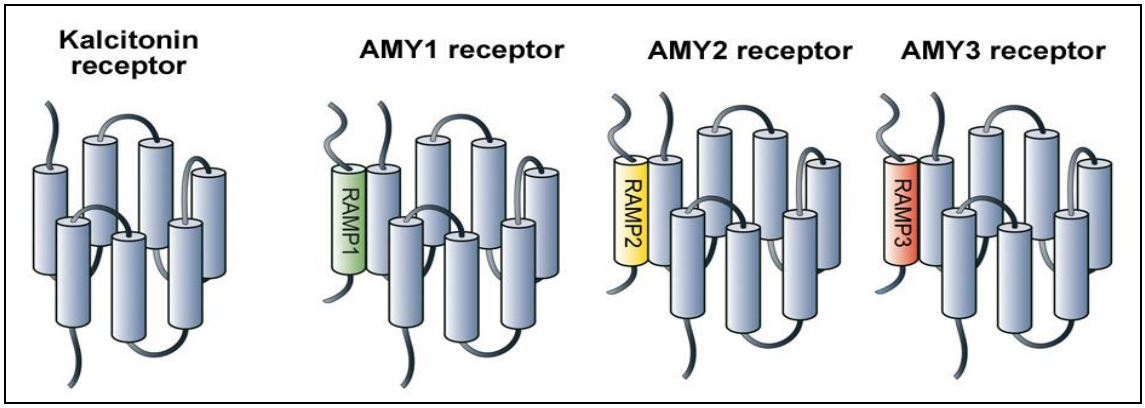
1. ábra. A humán, a patkány amylin, továbbá a kalcitonin és az amylin agonista (pramlintide) aminosavsorrendje

A CGRP peptidcsaládot alkotó peptidek azonos aminosavai az ábrán fekete háttérrel jelöltek, míg a sötét szürkével árnyékolt aminosavak egyezései adják a peptidek 80-100%-os hasonlóságát, a világos szürke árnyalatú aminosavak pedig a felsorolt peptidek esetén a 60-80%-os hasonlóságért felelnek (Gingell és mtsai 2014).

1.1.2. Az amylin receptorai

Az amylin G-proteinhez kapcsolt receptorok „B” családjába tartozó receptorai két kalcitonin receptorból (CTR) és az ahhoz transzmembrán doménként kapcsolódó, egy-egy receptor aktivitást módosító fehérjéből (RAMP) épülnek fel (Poyner és mtsai 2002). A heterodimer formában jelenlévő CTR az amylin receptor központi, ún. „core” régióját alkotja, amelyhez az amylin-kötés magas affinitásáért felelős RAMP-ok kötődnek (Christopoulos és mtsai 1999). Mivel háromféle RAMP kapcsolódhat a CTR-hez, így háromféle amylin receptort különböztethetünk meg (2. ábra), ami az amylin által közvetített hatások, azok farmakológiai, szignalizációs és szabályozási jellemzőinek további variációs lehetőségeit jelenthetik. A receptor aktivitást módosító

fehérjék képesek a velük kölcsönhatásban álló receptorok sejtfelszíni megjelenését befolyásolni (Hay és mtsai 2005).



2. ábra. Az amylin-receptorok szerkezete

Az amylin-receptorok „core" régióját a kalcitonin receptor adja, melyhez receptor aktivitást módosító fehérjék (RAMP) kapcsolódnak. A RAMP-ok szerkezetüket tekintve háromfélék lehetnek (RAMP1, RAMP2 és RAMP3). Aszerint, hogy a CTR-hoz melyik RAMP kötődik, megkülönböztethetünk 1-es, 2-es és 3-as típusú amylin-receptort (AMY1-, AMY2, AMY3 receptor) (Hay és mtsai 2015).

Az amylin-receptorok elnevezése, osztályozása a hozzájuk kötődő RAMP-ok szerint történik. A kalcitonin gén-rokon peptidcsalád receptorai szerkezetüket tekintve nagyon hasonlók: CGRP, adrenomedullin$_1$ és adrenomedullin$_2$ esetén a receptor alapvázát a kalcitoninszerű (CL) receptor adja, míg az amylin esetén a kalcitonin receptor (Poyner és mtsai 2002) (1. táblázat). Amennyiben a heterodimer CTR-hoz az ún. RAMP1 kötődik, egyes típusú amylin receptorról beszélünk (AMY1), amely nagy affinitással köti az amylint, a lazac kalcitonint, valamint a CGRP-t (Poyner és mtsai 2002). Az AMY2 receptor (CLR+RAMP2) kötési képessége nagyban függ a szövet típusától és a kalcitonin receptor splice variánsaitól (Hay és mtsai 2015). A 3-as típusú amylin receptor (AMY3; CTR+RAMP3) az amylin és a lazac kalcitonin iránt magas affinitással rendelkezik, míg a CGRP-t kisebb affinitással köti. Számos peptidet azonosítottak az amylin receptor antagonistájaként, többek között a lazac kalcitonin 8-32-t, valamint az ún. AC187-et, melyeket farmakológia vizsgálatok során széles körben alkalmaznak (Hay és mtsai 2005).

RECEPTOR NEVE	RECEPTOR RÖVIDÍTÉSE	A RECEPTOR SZERKEZETI ELEMEI
Kalcitonin gén-rokon peptid receptor	CGRP1	CL receptor + RAMP1
Adrenomedullin$_1$ receptor	AM1	CL receptor + RAMP2
Adrenomedullin$_2$ receptor	AM2	CL receptor + RAMP3
Kalcitonin receptor	CT	CT receptor
1-es típusú amylin receptor	AMY1	CT receptor + RAMP1
2-es típusú amylin receptor	AMY2	CT receptor + RAMP1
3-as típusú amylin receptor	AMY3	CT receptor + RAMP1

1. táblázat. A kalcitonin gén-rokon peptidcsalád receptorainak elnevezése és az azokat felépítő szerkezeti elemek

Ha a receptor „core” régióját a kalcitoninszerű (CL) receptor alkotja, akkor a hozzá kapcsolódó RAMP-ok típusa szerint jön létre a kalcitonin gén-rokon peptid, az adrenomedullin$_1$, illetve az adrenomedullin$_2$ megkötésére alkalmas receptorszerkezet. A kalcitonin receptorok (CT) a hozzájuk kötődő receptor aktivitást módosító fehérjék (RAMP1, RAMP2, RAMP3) révén válnak képessé az amylin kötésére (AMY1, AMY2, AMY3) (Poyner és mtsai 2002).

Az amylin kötődését követő intracelluláris folyamatok a G-protein kapcsolt, B receptorcsaládba tartozó peptidekéhez hasonlóak: a peptid a receptor C-terminális végén lévő, extracelluláris doménjét jelentő peptidkötő helyhez kapcsolódik, míg az N-terminálison lévő diszulfid híd a receptor transzmembrán doménjének kapcsolódása révén aktiválja a receptort (Archbold és mtsai 2011). Az amylin receptorok közvetítette szignalizáció molekuláris mechanizmusát tekintve, a RAMP C terminális végének típusa a G-fehérjével való kötődés meghatározója (Udawela és mtsai 2006). A CTR splice variánsai szintén különböző kapacitással képesek kötődni az intracelluláris szignalizációs molekulákhoz (Poyner és mtsai 2002). Az amylin akut hatásaként a Gs-kapcsolt („s”: adenilát-ciklázt stimuláló) szignáltranszdukciós útvonal aktiválódik, amely során az intracelluláris cAMP (5’, 3’-ciklikus adenozin-monofoszfát) szintje emelkedik (Hay és mtsai 2015).

Az amylin receptorok radioaktívan jelölt ligandumainak vizsgálatával sikerült meghatározni receptorainak **különböző szöveteken belüli előfordulásá**t (Beaumont és

mtsai 1993, Bhogal és mtsai 1992). Nagyfokú amylin-kötődést tapasztaltak a tüdő, a gyomorfundus, a lép és az agy vizsgálata során.

Rágcsálókon végzett tanulmányok szerint a perifériás amylin központi idegrendszerre kifejtett hatását a circumventrikuláris szerveken, főként a szubfornikális szerv (SFO) és az area postrema (AP) területén expresszálódó receptorai révén fejti ki. A hasnyálmirigy eredetű amylin hatásainak további célterülete lehet még a nucleus tractus solitarii (NTS), az area tegmentalis ventralis (VTA), a nucleus accumbens (NAcc), valamint a hypothalamus (Hth) több területe, hiszen a felsorolt területek mindegyikén sikerült a CTR-t, vagy annak mRNS-ét kimutatni (Becskei és mtsai 2004, Sexton és mtsai 1994). Noha *in situ* hibridizációs hisztokémia segítségével az AP területén mindhárom RAMP jelen van, az egyelőre nem ismert, hogy pontosan melyik amylin receptor felelős az AP-ra, illetve a központi idegrendszerre gyakorolt hatásért (Ueda és mtsai 2001). Bár a SFO területén mindhárom RAMP megtalálható, a NTS régiójában csupán a RAMP2 alacsony expressziója volt megfigyelhető. A hypothalamus számos magjában RAMP1 és RAMP2 is megtalálható. A hypothalamuson belül RAMP2 mRNS-t mutattak ki az area preoptica (POA), a nucleus suprachiasmaticus, a nucleus paraventricularis (PVN), a nucleus periventricularis (Pe), a nucleus supraopticus, a nucleus arcuatus (Arc), a nucleus ventromedialis (VMH), valamint a nucleus dorsomedialis (DMH) területén. A RAMP1 a RAMP2-höz képest kevesebb hypothalamicus magban volt megtalálható, csupán az Arc, a VMH és a DMH területén írták le előfordulását (Stachniak és Krukoff 2003). A VMH területét vizsgálva mindhárom RAMP jelenlétét kimutatták (Le Foll és mtsai 2015), míg NAcc esetén csupán RAMP1 jelentéte volt megfigyelhető. VTA területén az amylin receptor minden összetevőjét (CTR, RAMP1-3) azonosították, így ez a terület feltehetően az amylin táplálékfelvételt befolyásoló fiziológiás hatásainak másik fontos célterülete lehet (Mietlicki-Baase és mtsai 2013).

Humán adatok ezidáig nem állnak rendelkezésre a RAMP2 és RAMP3 központi idegrendszeren belüli előfordulását illetően, továbbá a RAMP1 eloszlásáról és annak potencionális szerepéről is csupán néhány, migrénről szóló tanulmány számol be (Bigal és mtsai 2013). A CTR megjelenését az agytörzsben a tractus spinalis nervi trigemini, valamint a nucleus tractus spinalis nervi trigemini caudalis területén sikerült kimutatni (Walker és mtsai 2015). Bár a CTR agytörzsi eloszlása a RAMP1 megjelenési

területével nagyrészt átfed, kettőjük kolokalizációja csak az erek és a tractus spinalis nervi trigeminalis esetén volt teljes (Walker és mtsai 2015).

1.1.3. Az amylin előfordulása és funkciói

Az amylint eredetileg a 2-es típusú cukorbetegségben szenvedők hasnyálmirigyének ún. amyloid depozitumaiban írták le (Westermark és mtsai 1986). Ebben a kórképben az amylin szekréciója károsodik, polimerizált formájának felhalmozódása a hasnyálmirigy β-sejtjeinek apoptózisával jár (Westermark és mtsai 2011). Az amylin legnagyobb mértékben itt, a pancreas β-sejtjei által termelődik, és az inzulinnal együtt szekretálódik (Young 2005b). A szérumban előforduló, jóllakottsági érzetet keltő hormonként az amylin leginkább ismert és kutatott szerepe a táplálékfelvétel gátlása (Lutz 2006). Ezenkívül az amylin a dorsális gyökér ganglionokban is expresszálódik, ahol valószínűleg a nociceptív információ továbbításában játszik szerepet (Gebre-Medhin és mtsai 1998). További hatását bizonyították a kardiovaszkuláris rendszer (Young és mtsai 1999), valamint a vese fejlődésének szabályozásában (Harris és mtsai 1997), illetve egyes pszichiátriai és neurológiai kórképek kialakulásában (Roth és mtsai 2009, Zhu és mtsai 2015).

Az amylin hasnyálmirigyen belüli szekrécióját számos tényező, többek között a glükóz, az arginin és a zsírsavak fokozzák. Az amylin szekréciója minden esetben az inzulin elválasztását követi, tehát a pancreas β-sejteinek étkezést követő szekréciós változásai felelősek az amylin anorexigén hatásáért (Lutz 2010).

Az amylint elsősorban mint jóllakottsági faktort vizsgálják. Feltételezések szerint az amylin a táplálkozás során az elfogyasztott étel mennyiségének fiziológiás regulátora (Lutz 2010). Az evés gyors amylin-emelkedéshez vezet, míg az exogén amylin dózisfüggő módon perceken belül csökkenti az evés mértékét (Mollet és mtsai 2004).

Egyre több tanulmány szól amellett, hogy az amylin az inzulinhoz hasonlóan az anyagcsere hosszú távú szabályozásában adipozitási szignálként is részt vesz. Az amylin bazális szintje elhízott állatokban magasabb, mint a normál testsúllyal rendelkező társaikban (Pieber és mtsai 1994), továbbá a magas zsírtartalmú diétán tartott állatokban szintén emelkedés következett be az amylin alapszintjében (Boyle és mtsai 2011). A zsíranyagcsere szabályozásában betöltött szerepét bizonyítja az is, hogy

mind perifériás (Mack és mtsai 2007), mind centrális (Rushing és mtsai 2001) amylin krónikus beadását követően az állatok testsúlya és testzsír aránya csökkent, míg antagonista-kezeléssel ezzel ellentétes hatást értek el (Rushing és mtsai 2001).

Az amylin anorexigén hatásának közvetítéséért felelős AP-neuronok amylin általi aktivációja nagy valószínűséggel közvetlen humorális úton valósul meg (Lutz és mtsai 2001). Ezenfelül az AP épsége az amylin gyomorürülés lassítását előidéző hatásának kifejtéséhez is szükséges (Mack és mtsai 2010). Az amylin az AP-NTS-nucleus parabrachialis lateralis (LPB) neuronális tengelyt aktiválja. Nagy valószínűséggel az AP-neuronok aktivációja a neuronális tengely aktivációját vonja maga után, mely az AP-től rostralisan az előagyhoz projíciál, és a pálya mind az NTS-t, mind a LPB-t és a nucleus amygdaloideus centralist (CeA) is tartalmazza (Becskei és mtsai 2007). A neuronális tengely alkotói közötti feltételezett kapcsolatot anterográd és retrográd pályajelölési technikákkal bizonyították, mely során az is megállapítást nyert, hogy az LPB az utóagy és a hypothalamus - beleértve a lateralis hypothalamust, ahol az amylin csökkentette az éhezés hatására bekövetkező Fos aktivációt (Riediger és mtsai 2004), valamint a VMH területét (Mollet és mtsai 2003) - közötti átkapcsoló állomás. A VMH feltételezhetően a leptin és az amylin közötti interakció szabályozásában részt vevő terület (Hay és mtsai 2015). A VTA területén az amylin receptorok jelentős számban expresszálódnak, valamint a területre történt amylin beadást követően a normál táp-, valamint a cukorfelvétel csökkent mértékű volt (Mietlicki-Baase és mtsai 2013).

Az amylin kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatása feltételezhetően az érrrendszerben jelentős mértékben expresszálódó CGRP receptorok aktivációjától függ (Young 2005a). Rágcsálókon végzett kísérletek során az amylin intravénás injektálását erős vasodilatatio kísérte, amely vérnyomáseséshez vezetett, ez pedig a vérnyomás rövid távú szabályozásáért felelős baroreflex révén emelte a szívfrekvenciát (Young és mtsai 1999). Direkt kardiális inotróp hatását mind izolált rágcsáló cardiomyocytákon (Bell és Mcdermott 1995), mind izolált patkányszíven (Kaygisiz és mtsai 2010), mind pedig sertésből származó izolált szívszöveten (Saetrum Opgaard és mtsai 1999) végzett kísérletek is alátámasztják.

Az amylin renális szabályozásban betöltött szerepére hívja fel a figyelmet, hogy az ún. spontán hipertenzív patkány modellben, mely a krónikus szívkárosodás

modelljeként alkalmas a magas vérnyomás és a következményes balkamra hypertrophia tanulmányozására, az amylinkötő helyek száma a vesekéregben hypertensio kialakulását megelőzően magasabb volt, mint azoknál a fajtársaknál, ahol a hypertensio nem következett be. Az amylin génexpresszió további területei közé tartozik a fejlődő vese (Neumann és mtsai 2001), így az amylin a vese fejlődésében növekedési faktorként is szerepelhet.

Preklinikai vizsgálatok szerint **az amylin agonista** sikeresen alkalmazható bizonyos **neuropszichiátriai kórképek kezelésében**. A depresszióra és szorongásra kifejtett hatását vizsgálva megállapították, hogy kényszeres úszás tesztben (forced swimming test, FST) csökkenti az immobilitást, valamint immobilzációs teszt során a cukorfogyasztást és a hypertermiát, ugyanakkor jelenlétében egerek esetén nő a hippocampalis neurogenezis (Roth és mtsai 2009, Turek és mtsai 2010). A centrálisan beadott peptiddel szemben feltehetően a perifériás amylin felel a diabetes során bekövetkező memóriahanyatlásért (Flood és Morley 1992). Az Alzheimer-kór kísérletes viszgálata során a tanulási folyamatot elősegítette, továbbá pramlintide nevű analógjával együtt csökkentette az Alzheimer-kórra jellemző és a kognitív funkciók romlásáért felelős amyloid-béta peptidek mennyiségét (Zhu és mtsai 2015). A skizofrénia kapcsán vizsgált antipszichotikus hatását valószínűleg AMY1 receptorán keresztül fejti ki (Baisley és mtsai 2014). Neurológiai szerepének vizsgálata során a visceralis fájdalmat követően a perifériás amylin antinociceptív hatását a gerincvelői neuronok csökkent c-fos aktivitása bizonyította, amit az amylin KO egerekben megfigyelt csökkent nocicepció is megerősített (Gebre-Medhin és mtsai 1998).

Az amylin génexpresszió további területei a gyomor neuroendokrin sejtjei (Zaki és mtsai 2002). A gyomorfundus szomatosztatin-sejtjeiből felszabaduló amylin auto/parakrin módon hatva csökkentette a gyomor hisztamin- és sósavszekrécióját.

Az amylin SFO-en kifejtett hatása közvetítheti a peptid folyadékfelvételt fokozó hatását, de hogy ez a terület az amylin étkezésre kifejtett hatásának közvetítésében is szerepet játszik-e, még nem bizonyított (Fry és mtsai 2007).

Az osteoporosisban betöltött szerepét vizsgálva megállapították, hogy az amylin a csontállomány szerkezetét mind a reszorpció gátlása, mind a csontépülés serkentése révén erősítette. Ezzel szemben az amylin KO egerek esetén normális osteoblastszám és csontszerkezet mellett, az osteoclastok magas száma miatt a csontfelszívódás mértéke

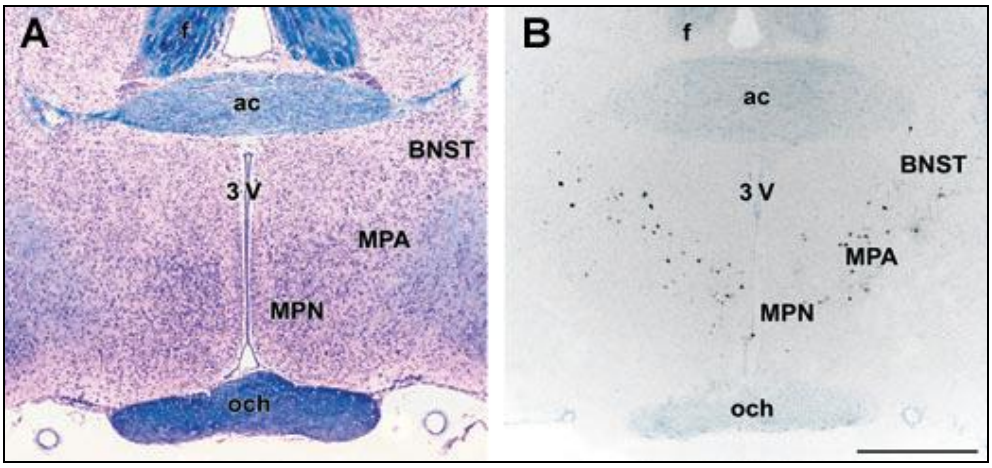
nőtt, ezáltal a csontsűrűség csökkent (Hay és mtsai 2015). A csontátépülést a diabetikus állapot erősen befolyásolta (Horcajada-Molteni és mtsai 2001).

1.1.4. Az amylin megjelenése a központi idegrendszerben

Az amylin patkányokon végzett szövetspecifikus vizsgálata során megjelenését a központi idegrendszerben az első vizsgálatok során nem sikerült kimutatni, igaz, a vizsgálatot csak agykéregből, nyúltvelőből, valamint kisagyból származó mintákon végezték el hím állatokban (Leffert és mtsai 1989). Később majom hypothalamusának vizsgálatakor az amylin központi idegrendszeren belüli jelenlétére utaló adatokat is bemutattak: amylin-immunreaktív (ir) neuronok a hypothalamus több területén (nucleus supraopticus, PVN, Pe, VMH, Arc, n. tuberomamillaris) detektálhatók voltak (D'este és mtsai 2001). Mivel a használt antitest specificitását azóta sem igazolták, az amylin központi idegrendszeri expressziója nem nyert bizonyítást.

Egy korábbi microarray vizsgálat során kutatócsoportunkban kimutatták, hogy az amylin mRNS-szintje jelentősen megemelkedett patkány anyák preopticus területén (Dobolyi 2009). A génexpressziós vizsgálat során az amylin expressziója mintegy 25-szörös emelkedést mutatott a szülést követő 9. napon (PPD 9). Ezt a rendkívül nagymértékű növekedést kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) is igazolták, ugyanakkor az is kimutatható volt, hogy amennyiben az anya állatoktól a szülés után azonnal elveszik a kölykeiket, az amylin preopticus területen belüli expressziója nem következik be. *In situ* hibridizációs hisztokémia segítségével is megerősítették a kapott eredményt, továbbá azonosították az amylin mRNS-t expresszáló neuronok preopticus területen belüli elhelyezkedését. A preopticus területen belül amylin mRNS csak az area preoptica medialison (MPOA) belül elhelyezkedő nucleus preopticus medialis (MPN), a MPOA magokba nem tömörült, dorsolaterálisan fekvő részein (MPA), valamint a nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) ventrális részén (BNSTv) volt megfigyelhető (3. ábra), ugyanakkor a központi idegrendszer más területein amylin mRNS még laktáló anya állatokban sem volt detektálható. Az amylin mRNS-t expresszáló neuronok patkány anyákban amylin immunhisztokémiai festéssel is azonosíthatók voltak. Az amylin anyai viselkedésben betöltött szerepét támasztják alá annak megjelenési körülményei és az expresszió helye: szűz nőstény, valamint a szülést követően kölykeiktől megfosztott patkányokban nincs jelen, ugyanakkor a szülést

követő 9. napon nagymértékű expressziója kimutatható laktáló anya állatokban; továbbá a köponti idegrendszeren belül csak a mediális preopticus területen expresszálódik, amely területről ismert, hogy az anyai viselkedés szabályozó központja (Numan 2012). Ezenfelül az amylin központi idegrendszeri megjelenése magyarázatot szolgáltathat a perifériás amylin hatásainak közvetítésében részt nem vevő amylin receptorok központi idegrendszeri jelenlétére (Becskei és mtsai 2004).



3. ábra. Az amylin mRNS-t expresszáló neuronok preopticus arean belüli elhelyezkedése
A: A preopticus terület szerkezeti képét Luxol Fat Blue festés mutatja, melynek eredményeként kék színnel a myelinizált rostok, míg krezilibolyával a sejtek válnak láthatóvá. A területen belül magas sejtszám jellemzi a mediális preopticus magot (MPN), az ettől dorsolaterálisan elhelyezkedő medális preopticus area (MPOA) egyes, magokba nem tömörült területeit (MPA), valamint a nucleus interstitialis striea terminalis ventrális részét (BNSTv). B: A világos látóteres felvételen az *in situ* hibridizációs hisztokémia alkalmazásával laktáló anya patkányok preopticus területén az amylin mRNS-t expresszáló sejtek (fekete pontok) láthatók, melyek egyforma eloszlást mutatnak a MPN, MPA és a BNSTv területei között. A felvételek a bregma szintjétől 0,36 mm-re caudálisan elhelyezkedő metszetekről készültek. Lépték = 1 mm; ac: commissura anterior, f: fornix, och: chiasma opticum, 3V: ventriculus tertius (Dobolyi 2009).

1.2. A preopticus terület

A preopticus terület (POA) reprodukciós magatartásokban játszott potenciális szerepére elsőként patkányok esetén egyik magjának nemek közti sejtméretbeli különbsége hívta fel a figyelmet (Raisman és Field 1971). A leírt különbséget később humán mintákon is igazolták: fiatal férfiak preopticus területének egy bizonyos része kétszer akkora kiterjedésű, és ott mintegy kétszer annyi sejt található, mint nők esetén

(Swaab és mtsai 1995). Ezt a magot a preopticus area szexuálisan dimorf magjának (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, SDN-POA) nevezték el (Swaab 2003). További kísérletek szerint a preopticus terület részt vesz a szexuális magatartás szabályozásában, a szülői viselkedés kialakulásának és fenntartásának regulációjában (González-Mariscal és Melo 2013), emlősökben (ember és főemlősök kivételével) a területén található gonadotropin felszabadító hormon (GnRH) révén a gonadális tengely szabályozásában (Merchenthaler és mtsai 1984), a termoregulációban (Mckinley és mtsai 2015), az alvás-ébrenlét szabályozásában (Schmidt és mtsai 2000), a só- és vízháztartás (Antunes-Rodrigues és mtsai 2004), valamint a vizeletürítés szabályozásában (Ding és mtsai 1999).

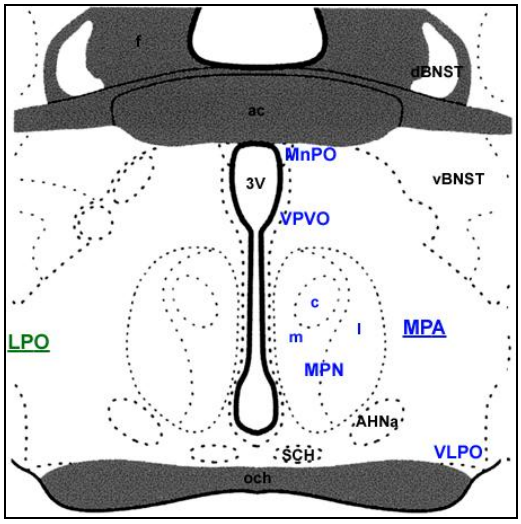
A nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) magot nem sorolják a preopticus régió magjai közé, de mivel azokkal mind topográfiai, mind funkcionális kapcsolatban van, továbbá mivel értekezésem szempontjából is releváns terület, ezért erre a fejezet végén külön is kitérek. A BNST szerepet játszik a szexuális magatartás (Leite és mtsai 2014), az azonos nemű fajtárssal szembeni agresszió (Masugi-Tokita és mtsai 2015), a stresszre adott válaszreakciók (Crestani és mtsai 2013), valamint az anyai magatartás szabályozásában (Klampfl és mtsai 2014).

1.2.1. A preopticus terület elhelyezkedése

Bár a preopticus area-t (*regio/area preoptica*) egyes felosztások topográfiai kapcsolatát tekintve a hypothalamus elülső magcsoportjához sorolják, ezért nucleus anteriorként is szokták nevezni, ugyanakkor funkcióját és strukturális felépítését tekintve a limbicus rendszerhez tartozik (Palkovits 2001). Nevét a látópálya kereszteződéséhez való viszonya alapján kapta, a chiasma opticum-tól (och) craniálisan található. Elülső határát a Broca-féle diagonális köteg ventrális magja alkotja, dorsálisan a commissura anterior határolja, míg caudalis kiterjedését tekintve a középső hypothalamusig, ventrálisan pedig a chiasma opticum-ig tart. A regio preoptica (4. ábra) mediolaterális kiterjedését tekintve további két nagy területre osztható: a III. agykámrához közelebb eső területe az *area preoptica medialis* (MPOA), míg az attól távolabbi az *area preoptica lateralis* (Komoly és Palkovits 2010). Utóbbi az elülső hypothalamus oldalsó részét alkotó terület, részben a commissura anterior kereszteződő

rostjai alatt. Vegyes sejtpopuláció, további szubdivíziókra nem osztható, ezért *nucleus preopticus lateralis*ként (lateral preoptic nucleus, LPO) is nevezik.

Az area preoptica medialison belül további három mag különíthető el. A *nucleus preopticus periventricularis* (PVPO) a III. agykamra két oldalán található keskeny, sejtes réteg. Sejtjei a bregma síkjának közelében, a commissura anterior felett a septum területére is felterjednek, hátrafelé a nucleus periventricularis hypothalami–ban folytatódik (Palkovits 2001). Kis sejtcsoportként közvetlenül a chiasma opticum felett jelenik meg a *nucleus preopticus suprachiasmaticus*, amely azonban nem önálló mag, hanem a PVPO ventrális része. A PVPO antero-ventrális területén belül helyezkedik el a *nucleus periventricularis anteroventralis* (AVPe). A PVPO közvetlenül az ac és a 3V között elhelyezkedő szubdivíziója a *nucleus preopticus medianus* (MnPO) (Palkovits 2000). A *nucleus preopticus medialis* (MPN) összetett, több szubdivízióból (laterális, mediális, középső/centrális) álló mag. A magot laterálisan a LPO, mediálisan pedig a III. agykamra közvetlen szomszédságában elhelyezkedő PVPO határolja. A MPN-en belül található a preopticus area szexuálisan dimorf magja (SDN-POA). A *nucleus preopticus ventrolateralis* (VLPO) a MPN közvetlen szomszédságában, attól ventrálisan és laterálisan elhelyezkedő preopticus mag. Mivel az anyai magatartás szabályozásában az MPOA és az MPA érintett, ezen magokat együtt a szakirodalom mediális preopticus területként említi. Bár ennek anatómiai alapjai vitathatóak, hiszen mediálisan más magok is elhelyezkednek, az értekezés további részében én is ezt az irodalomban elfogadott nevezéktant használom.



4. ábra. A regio preoptica elhelyezkedése patkány agy koronális metszetén

1.2.2. A mediális preopticus terület neurokémiai jellemzése

A régió sokrétű, különféle szabályozási mechanizmusokban betöltött szerepét tükrözi az itt expresszálódó neuropeptidek, receptorok és neuromodulátor anyagok sokfélesége.

Az MPA területe androgén- és ösztrogén receptorokban rendkívül gazdag (Kruijver és mtsai 2002). A területen az anyai viselkedés során nagy számban aktiválódott idegsejtek jelentős része γ-amino-vajsav (GABA) általi beidegzéssel rendelkezik. Ezek közül számos idegsejt galanin-, neurotenzin- és/vagy tachykinin 2 mRNS-expressziót mutatott. A GABAerg neuronokon kívül glutamáterg neuronok jelenléte is kimutatható volt a területen (Tsuneoka és mtsai 2013). Az itt termelődő atriális natriuretikus hormon a vazopresszin szintézisében és neurohypophysisbe juttatásában vesz részt. A GnRH-neuronokat innerváló rostok β-endorfint, neuropeptid Y-t, GABA-t, glutamátot, tirozin-hidroxilázt, agouti gén-rokon peptidet, kortikotropin-felszabadító faktort (CRF), szerotonint és kisspeptint tartalmaznak (Hrabovszky és mtsai 1995, Turi és mtsai 2008).

A MPN területén jelen lévő oxytocin és vazopresszin V1a típusú receptorkötés erősségében erőteljes növekedés következik be laktáló patkány anyákban (Bosch és mtsai 2010). A területen nagy számban expresszálódó ösztrogén-receptorok aktivációjának következményeként hímek is anyákhoz hasonló, kölyökgondozó magatartást mutatnak (Rosenblatt és Ceus 1998). A MPN területén galanin- (Bloch és mtsai 1993), tireotropint felszabadító hormon- (Garcia és mtsai 1995), és GABA- (Gao és Moore 1996) tartalmú idegsejtek mellett mérsékelt számban SP előfordulását is leírták.

Az MPN területén a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer is jelen van (Dobolyi és mtsai 2003, Dobolyi és mtsai 2010). A kettes típusú parathormon receptor (PTH2R) a központi idegrendszer számos területén előfordul. Jelen van a limbikus rendszerben, a thalamusban és a hypothalamusban, valamint hypothalamuson belüli expresszióját leírták többek között a MPN területén is (Dobolyi és mtsai 2006). A PTH2R endogén ligandja a tuberoinfundibuláris peptid 39 (TIP39), mely központi idegrendszeri megjelenését tekintve csupán két magban, az area subparafascicularis (SPF) területén, valamint a híd laterális részén azonosítható (Dobolyi és mtsai 2002). A TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer szerepet játszhat a stresszválasz, valamint a

szorongáskeltő helyzetekben adott félelmi reakciók kialakulásában (Dimitrov és Usdin 2010), hathat az agyalapi mirigy vazopresszin- (Antunes-Rodrigues és mtsai 2004) és növekedési hormon elválasztására (Usdin és mtsai 1999), részt vehet a nociceptív információk feldolgozásában (Dimitrov és mtsai 2010), a termoregulációban (Dimitrov és mtsai 2011), továbbá a laktáció során a prolaktin-elválasztásban (Cservenák és mtsai 2010), mindemelett pedig az anyai motiváció kialakulásában (Cservenak és mtsai 2013). A preopticus arean belül a PTH2R, valamint PTH2R- és TIP39-ir rostok topográfiai eloszlását írták le (Faber és mtsai 2007).

1.2.3. A preopticus terület funkciói

A preopticus terület funkciói az evolúció során szinte alig változtak, azok filogenetikai szempontból rendkívül konzerváltak. A hypothalamus sokrétű funkciói közül a preopticus area részt vesz a szexuális magatartás (Rodriguez-Sierra és Terasawa 1979) és szülői viselkedés (Kuroda és mtsai 2007), a gonadális tengely (Merchenthaler és mtsai 1984), a termoreguláció (Osaka 2004), az alvás-ébrenlét (Srividya és mtsai 2006), a só- és vízháztartás, valamint a vizeletürítés szabályozásában (Mittelman-Smith és mtsai 2015).

A MPN szexuális magatartást szabályozó funkciója nőstényekben és hímekben eltérő. Ennek anatómiai bizonyítéka a magon belül található SDN-POA. A preopticus area szexuálisan dimorf magjának létrejötte a nemek közti perinatális szteroid-szintekben bekövetkező különbség következménye: hím patkányokban ez 3-8-szoros a nőstényekben mérhetőhöz képest (Jacobson és mtsai 1980a). Nőstények esetén a MPN a mediális amygdala maggal együtt a kopulációt megelező és azt elősegítő viselkedésformák megjelenéséért felel, továbbá a szexuális szagpreferencia kialakulása is ezen a területen megy végbe (Martinez és Petrulis 2013). Hím patkányokban a MPN nem csupán a szexuális magatartás egyes komponenseiért felel, hanem lézióját a kopulációs magatartás teljes hiánya követi (Paredes 2003). Az MPN a szexuális viselkedések szabályozásán túl, a MPA további területeivel együtt elsődleges szerepet játszik az utódgondozó viselkedések intergrációjában (Numan és Insel 2003), továbbá a GnRH termelő sejtek jelentéte révén részt vesz a gonadális tengely szabályozásában (Turi és mtsai 2008), valamint a termoregulációban.

A terület szülői viselkedésben betöltött szerepét erősíti az is, hogy a terület Fos-aktivációt mutat patkány anyákban és apákban (Stack és Numan 2000, Zhong és mtsai 2014), valamint ösztrogén, oxytocin, prolaktin, illetve dopamin mediális preopticus területre való beadását követően szűz nőstény patkányok anyákra jellemző magatartásformákat mutatnak. A MPN teljes területére kiterjedő lézió az anyai viselkedés bekövetkeztének, a fészeképítés, valamint a kölykök cipelésének elmaradásával jár, amely legfőképp laterális projekciójának, a MPN - LPO - VTA pálya megszűnésével magyarázható (Numan 1988). A MPOA dorsolaterális része (MPA) különösen fontos a kölykök fészekbe való visszahordásának, cipelésének szempontjából (Numan 1990).

Az alacsonyabb rendű emlősökben (pl. patkány) a területen található GnRH-neuronok α-típusú ösztrogén receptort (ER-α) tartalmaznak, amely receptorok révén az ösztrogének gátló hatást fejtenek ki a GnRH pulzaitilis szekréciójára a prepubertás alatt (Clarke és mtsai 2015). A pubertás során a nucleus periventricularis anteroventralis és a nucleus arcuatus területén bekövetkező kisspeptin-expresszió azonban lehetővé teszi a GnRH-neuronok pulzatilis szekrécióját (Roa és mtsai 2008). A GnRH-neuronok pulzativitásának további korlátozó tényezője a szopás által indukált gátolt kisspeptin-expresszió is (Yamada és mtsai 2007).

A MPN területén található centrális termoreceptorok részben neurális, részben keringési szignálokra, az átáramló vér hőmérsékletének változásaira érzékenyek, aktivációjuk hőleadást eredményez. Patkányok esetén a területre történt inzulin, valamint egyes típusú inzulinszerű növekedési faktor injektálását követően a barna zsírszövet aktiválása révén hipertermia következett be, míg neuropeptid Y beadását hipotermia követte. A változások a specializált GABAerg termoszenzitív neuronok receptorain keresztül következtek be (Dubins és mtsai 2012).

Az agykéregből leszálló viszceromotoros rostok egy része a MPA-ban kapcsolódik át, majd a Barrington mag neuronjain végződve, a sacralis gerincvelőn futó pályán keresztül vesz részt a musculus sphincter externus nyitásában (Komoly és Palkovits 2010) – egyes tanulmányok szerint a vizeletürítés a mediális preopticus neuronok aktiválásával indul el (Ding és mtsai 1999).

A VLPO léziója specifikusan a REM-alvás kimaradását okozza (Schmidt és mtsai 2000), míg a VLPO-neuronok az alvás szabályozása során az alvás idejében

aktívak. Ezek a GABAerg neuronok az ún. alvásgenerátor idegsejtek, melyek gátolják a nucleus tuberomamillaris hisztaminerg neuronjait, ezáltal a felszálló aktiváló rendszer gátlása révén bekövetkezhet az alvás (Szymusiak és mtsai 1998).

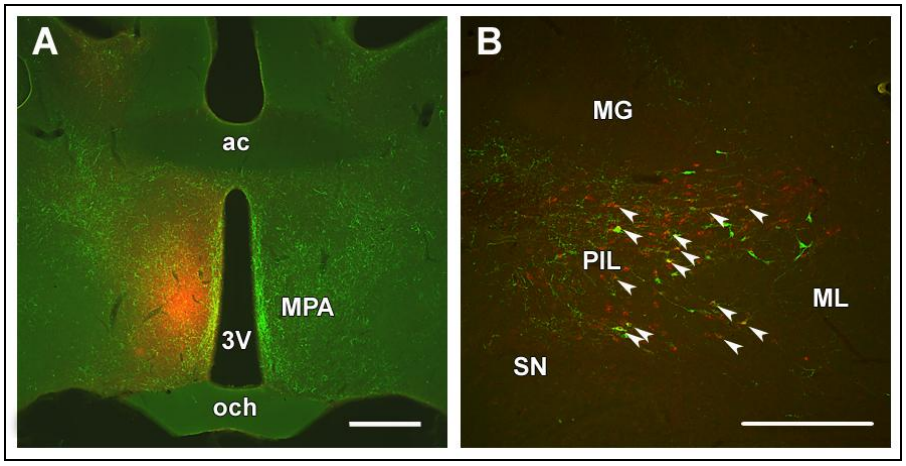
Patkányokon végzett vizsgálatok szerint az LPO-neuronok a folyadékfelvételt csökkentik, míg ezen idegsejtek gátlása fokozza a vízfelvételt (Osaka és mtsai 1993). Az LPO mellett az MnPO is a folyadékfelvétel szabályozója: szerepe jelentős a szomjúságérzet kialakulásában (Miyakubo és mtsai 2003).

1.2.4. A preopticus area humorális és neuronális bemenetei

A vér-agy gát-mentes circumventrikuláris szervek közül a preopticus areat a **humorális ingerek** a szubfornikális szerven, valamint az állatokban fejlett, emberben alig található, 3. agykamra elülső csúcsában levő organum vasculosum laminae terminalison (OVLT) keresztül érik el (Komoly és Palkovits 2010). Az OVLT-hez kapcsolódóan a kamra elülső falában található az ún. organum vasculosum, ez a lamina terminalis részeként a nucleus preopticus medialisban és a szubfornicalis szervben folytatódik. A SFO az agy angiotenzin-rececptorokban leggazdagabb területe, innen nagy mennyiségű afferentációt kap az MnPO, így ez a mag a perifériáról érkező kemoszenzoros és humorális információk - ozmolaritás, angiotenzin II (ANG II) szérumszintje - relay állomása (Johnson és mtsai 1996).

Az MPN területét többféle **neuronális információ** éri el: 1) kemoszenzoros információk az olfactoros és az accessoros olfactoros rendszerből érkeznek, amely magában foglalja a BNST posteromediális területét, valamint az amygdala anteromediális, anterocorticalis és posterocorticalis magjait; 2) szteroid-érzékeny területekről, úgymint az amygdala posteromediális magja, BNST, laterális septum, AVPe része, MPN, nucleus ventromedialis hypothalami, n. arcuatus; 3) az agytörzsből származók és a genitáliák területéről szenzoros információkat szállítók: nucleus subparafascicularis thalami, nucleus peripeduncularis, nucleus premamillaris (Wang és Swann 2006). Az MPN termoregulációban betöltött szerepét mutatja a nyúltvelői nucleus peritrigeminalis termoszenzitív sejtcsoportjaitól érkező közvetlen neuronális afferentációja (Bratincsak és mtsai 2008). További, thalamus eredetű bemenetet kap a thalamus posterior intralaminaris komplexében (PIL) expresszálódó TIP39-neuronoktól (Cservenak és mtsai 2013) (5. ábra). A PIL-ben található TIP39 a nucleus arcuatus

beidegzése révén a szopás által indukált prolaktin-felszabadulásban, míg a preopticus területtel való kapcsolata révén az anyai motiváció szabályozásában vesz részt.



5. ábra. A posterior intralaminaris komplex projekciója a mediális preopticus területre. A retrográd nyomjelző anyag (kolera toxin B-alegység) piros, a TIP39-sejtek zöld színnel jelöltek. A: A MPA területére történt retrográd nyomjelző anyag beadási helye a fotón piros színnel, míg a beadás helyen és annak közvetlen közelében elhelyezkedő TIP39-rostok zöld színnel láthatók. B: A PIL területén a beadást követően a TIP39-sejtek jelentős része CTb-vel duplán jelölődött (a sárga színű dupla jelölődést fehér nyilak mutatják). A jelentős számú, nem jelölődött TIP39-rostok zöld színnel láthatók. Lépték = 1 mm (A); 500 µm (B). További rövidítések: MG: corpus geniculatum mediale, ML: lemniscus medialis, SN: substantia nigra (Cservenak és mtsai 2013).

Noha a GnRH-neuronok pulzatilis szekréciója a GnRH-neuronok intrinzik aktivitásának eredménye (Nunemaker és mtsai 2001), az epizodikus szekréció frekvenciáját és amplitudóját a GnRH-neuronok speciális afferentációját jelentő klasszikus neurotranszmitterek és neuromodulátorok módosíthatják (Herbison 1998). Az ismertetett kisspeptinen kívül a GnRH-neuronokat β-endorfin (Leranth és mtsai 1988b), NPY (Tsuruo és mtsai 1990), GABA (Leranth és mtsai 1985), glutamát (Kiss és mtsai 2003), tirozin-hidroxiláz (Leranth és mtsai 1988a), agouti gén-rokon peptid (Turi és mtsai 2003), CRF (Maclusky és mtsai 1988), kolinerg (Turi és mtsai 2008) és szerotonin (Kiss és Halasz 1985) tartalmú rostok, valamint maguk a GnRH-neuronok (Witkin és mtsai 1995) is innerválják.

1.2.5. A preopticus area kimenetei

Az MnPO-t elhagyó rostok egy része a hypothalamus nucleus supraopticus és nucleus paraventricularis magjainak neuroendokrin sejtjein végződnek, és a vazopresszin felszabadulás szabályozásában vesznek részt. Az MnPO területéről induló poliszinaptikus, kéregben végződő pályák a szomjúság és a folyadékfelvétel szabályozásában vesznek részt. A nucleus preopticus medianus további kimenetét a nucleus dorsomedialishoz és a nyútvelői raphe magvakhoz futó termoregulációs pálya alkotja, mely a hőtermelést biztosító didergés, a barna zsírszövet, valamint a bőr vasokonstrikciójának szabályozója. A PVN parvocellularis neuronjaihoz tartó projíció autonóm szabályozó pálya, mely a kardiovaszkuláris rendszerre hat (Llewellyn és mtsai 2012). A szabályozás kimenő szárát a preopticus areából, a szimpatikus rendszerhez és a szomatomotoros rendszerhez futó pályák biztosítják, melyek révén a kapillárisok tágassága, a sima- és harántcsíkolt izmok aktivitása, a verejtékmirigyek, a pajzsmirigy és mellékvese működésének befolyásolása révén a szervezet hőt termel vagy hőt ad le. Az MnPO azonban nem csak a preopticus területen kívüli projekciókkal rendelkezik, hanem a ventrolateralis preopticus maggal, valamint a lateralis hypothalamicus területtel való kapcsolata révén részt vesz az alvás mechanizmusában is (Mckinley és mtsai 2015, Uschakov és mtsai 2007).

Az MPN területéről kimenő információk célterületei a következők: 1) hímek párzási magatartásában részt vevő agytörzsi magok, úgymint substantia grisea centralis, deep mesencephalic nucleus, katekolaminerg retrorubralis mező, VTA, nucleus paragigantocellularis lateralis; 2) septalis, preopticus és hypothalamicus szteroid-tartalmú magok (Wang és Swann 2014). Míg a MPN kemoszenzoros afferenseivel való kapcsolata egyirányú (BNST posteromediális területe, az amygdala anteromediális, anterocorticalis és posterocorticalis magjai), addig a szteroid-tartalmú magokkal kétirányú kapcsolatban áll, ami lehetővé teszi a szexuális és szülői viselkedést meghatározó szteroidhatás MPN általi befolyásolását. Az MPN afferens és efferens kapcsolatának ismeretében megállapítható, hogy az MPN a kemoszenzoros és hormonális ingerek integrációja révén az MPN-nel kapcsolatban álló agytörzsi struktúrák a központi idegrendszerbe beérkező ingereknek megfelelő motoros válaszait teszi lehetővé.

Az MPA területén található GnRH-neuronok az eminentia medianaba projíciálnak, ahol a GnRH-t a hypophysis portális keringésébe juttatják (Merchenthaler és mtsai 1984), ezáltal a gonadális tengely szabályozásában vesznek részt.

Amennyiben a folyamatos gátlás alatt álló VLPO GABAerg sejtek aktiválódnak, gátolják az ébresztő hatású locus coeruleus (LC) területen található noradrenalin-, valamint a nucleus raphe dorsalis magban jelen lévő szerotonin-tartalmú sejtek és a laterális hypothalamus orexin sejtjeinek aktivitását, és bekövetkezik a nem-REM alvás („mélyalvás”) (Saito és mtsai 2013, Sherin és mtsai 1996).

A POA-t elérő visceromotoros rostok átkapcsolódás után a Barrington mag neuronjain végződnek, majd a sacralis gerincvelőben az oldalsó köteg paraszimpatikus preganglionáris neuronjait idegezik be, a rostok egy része az elülső szarv oldalsó részében lévő nucleus Onuf beidegzését követően szabályozza a musculus sphincter urethrae externus zárását, és ezáltal a vizeletürítést (Komoly és Palkovits 2010).

1.2.6. Nucleus interstitialis striae terminalis

Az area preoptica lateralis felett, a commissura anterior kereszteződésénél, a striatumtól mediálisan elhelyezkedő, viszonylag nagy mag, sűrűn elhelyezkedő sejtekkel. A stria terminalis magjaként mindvégig magában foglalja a stria terminalis rostjait (Komoly és Palkovits 2010, Palkovits 2001). A nucleus accumbens mögött jelenik meg, majd caudalisan benyúlik a Hth állományába. A commissura anteriorhoz való viszonya alapján két részre oszthatjuk: *pars dorsalis*, amely az ac felett, a fornix mellett és az oldalkamra alatt helyezkedik el, míg a *pars ventralis* az ac alatt található (4. ábra). Ez utóbbi része beterjed a regio preopticába, valamint hátrafelé a Hth állományába.

A BNST szerepet játszik a szexuális magatartás kialakulásában (Leite és mtsai 2014), posteromediális magcsoportja szexuálisan dimorf (Swaab 2003). További funkciói közé tartozik a hímek egymással szembeni agressziójának (Masugi-Tokita és mtsai 2015), valamint a szorongás és a stresszre adott válaszreakciók (Daniel és Rainnie 2015), illetve a preopticus területtel való összeköttetése révén az anyai magatartás szabályozása (Klampfl és mtsai 2014).

A BNST területén nagy számban neurokinin B neuropeptid, neuropeptid Y- és diazepin kötőhelyek, valamint kisebb számban SP-ir idegsejtek találhatók (Chawla és mtsai 1997, Najimi és mtsai 2001). Humán vizsgálatok szerint laterális magja neuropeptid Y– sejteket (Walter és mtsai 1991), valamint SP-rostokat (Walter és mtsai 1991), centrális magja szomatosztatint (Kruijver és mtsai 2000) tartalmaz. Mediális magja kapcsán enkephalin- és neurotenzin-tartalmú sejteket írtak le (Walter és mtsai 1991), míg ventrolaterális magjában szomatosztatint, enkephalint és neurophysineket azonosították (Lesur és mtsai 1989, Walter és mtsai 1991, Zhou és mtsai 1995). Az ösztrogén szexuális magatartásra kifejtett hatását a területén előforduló β-típusú ösztrogén receptoron (ERβ) keresztül fejti ki (Leite és mtsai 2014). A területen a hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid fokozott expressziója mind nőstény, mind hím patkányok esetén anorexiához és következményes súlyvesztéshez vezetett (Kocho-Schellenberg és mtsai 2014). A hímek hímekkel szembeni agressziójában betöltött szerepe a BNST metabotróp glutamát receptorain keresztül érvényesül (Masugi-Tokita és mtsai 2015). Az anyai viselkedést fenntartó hormonok (oxytocin, vazopresszin) a preopticus terület mellet a BNST területén is jelen vannak, valamint a postpartum időszak során a BNST magban jelen lévő oxytocin és vazopresszin V1a típusú receptorkötés erősségének növekedése a terület anyai viselkedésben betöltött szabályozó szerepére enged következtetni (Bosch és mtsai 2010).

Az anyai magatartás szabályozásában a terület mediál-posterior szubdivíziójában expresszálódó CRF receptorok hipoaktivációja szükséges (Klampfl és mtsai 2014). A BNST-re a galanin rostok innervációja, valamint a galanin receptorok nagy száma jellemző (Mufson és mtsai 1998). Centrális magját humánban amygdala eredetű, patkányok esetén PAG és nucleus raphe dorsalis eredetű VIP-rostok innerválják (Zhou és mtsai 1995), míg mediális magját nagyrészt VIP-, kisebb mértékben aminerg-, peptiderg, enkephalin-. és neuropeptid Y-rostok (Zhou és mtsai 1995). A BNST területén előforduló androgén- és ERα típusú receptorok esetén - a preopticus areától eltérő módon - nemek közti különbségek nem voltak megfigyelhetők (Fernandez-Guasti és mtsai 2000, Kruijver és mtsai 2002). A TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer a preopticus területhez hasonlóan itt is jelen van (Faber és mtsai 2007).

A BNST rostokat küld a preopticus területre, továbbá a stria terminalis révén a Hth-BNST-amygdala reciprok összeköttetései is jól ismertek (Coolen és Wood 1998,

Weller és Smith 1982), valamint a VTA innerválása révén az averzív és jutalmazó válaszok szabályozásában vesz részt (Matsushita és mtsai 2015). GABAerg projekciója révén gátolja a PVN-neuronok aktivációját a stresszválasz során (Bienkowski és Rinaman 2011). Az amygdala efferens rostjainak egy része itt kapcsolódik át. Az innen eredő rostok részben a hypothalamusban, részben az alsó agytörzsben végződnek, egyike a limbicus rendszer extracorticalis efferenseinek (Cadiz-Moretti és mtsai 2014). További efferentációját a PVN (Champagne és mtsai 1998), nucleus periventricularis (Krajewski és mtsai 2010), nucleus parabrachialis (Gungor és Pare 2014), medullaris (Aston-Jones és mtsai 1999), valamint mesencephalicus struktúrákból kapja (Kozicz és mtsai 1998).

1.3. Az anyai viselkedés

Anyai viselkedés alatt az anyák azon, jellegzetes viselkedési elemeinek összességét értjük, mely az utódok felnevelését szolgálja, így alapvető szereppel bír a faj fenntartásában. Kialakulását veleszületett és tanult elemek határozzák meg. Az anyai magatartás a szülő-gyermek interakciók sorozatában nyilvánul meg; ez tehát minden esetben kölcsönös, kétirányú kapcsolatot feltételez.

Intenzív kutatásának létjogosultságát támasztják alá humán vonatkozásai: a szülést követő hangulati zavarok, súlyos esetben a postpartum depresszió megjelenése (Yim és mtsai 2015), mely nem csak az anyák, hanem általuk az utódok fizikai és lelki jóllétét is veszélybe sodorja. A postpartum időszakban megjelenő, anyákat érintő mentális problémák - leggyakrabban a postpartum depresszió és szorongás - gyakoriak és a szülő-gyermek kapcsolat alakulása szempontjából elsődleges rizikófaktorként számon tartott jelenségek (Swain 2011). A postpartum depresszió a szülő anyák mintegy 10-15 %-ánál előforduló, súlyos mentális zavar (Caplan és mtsai 1989), továbbá az anyák több, mint 60 %-ánál a szülést követő első 6 hétben felfedezhető a szülést követő depresszió tünetegyüttesének valamely tünete (Stowe és Nemeroff 1995). A postpartum depresszióra jellemző az általános depressziós tünetek (értéktelenség érzése, bűntudat, lassú döntéshozatal, önállótlanság, alvászavarok, túlzott érzékenység és fáradékonyság, negatív jövőkép) mellett a babával kapcsolatos negatív gondolatok, túlzott aggodalom vagy érdektelenség megjelenése (Lee és mtsai 2015). Friss kutatási eredmények szerint a depressziós és szorongásos tüneteket mutató anyák gyermekei

esetén a mentális zavarok előfordulása jelentősen megemelkedik (Brown és mtsai 1987, Heim és mtsai 1997, Kendler és mtsai 1993, Sroufe és mtsai 1999). Tehát az anyák, vagy a nevelők megfelelő pszichés állapota szükséges a gyermekek hosszú távú, felnőttkorukra is jellemző mentális stabilitásához, és így a gyermekekből felnövő szülők megfelelő szülői viselkedésmintázatának kialakulásához (Akman és mtsai 2007, Verreault és mtsai 2014). Továbbá számos esetben az is bizonyítást nyert, hogy a szülők gyermekük szellemi és pszichés fejlődésére tett hatása már az utódok perinatális korában elkezdődik (Werner 2004).

1.3.1. Anyai viselkedés rágcsálókban

Az anyai viselkedés kialakulásának körülményeiben (hormonális, szenzoros hatások) és jellemzőiben számos hasonlóságot lehet felfedezni humán és nem humán fajok között (Lonstein és mtsai 2015). Humán vonatkozásokat tekintve az anyai viselkedés megvalósulásában főként subcorticalis eredetű reflexív válaszok, kérgi funkciókhoz köthető kognitív reakciók és az anyasághoz kapcsolódó memória, valamint érzelmi reakciók játszanak szerepet (Swain 2011). Az anyai viselkedéshez kapcsolódó reflexív válaszok állatmodellek segítségével jól és megbízható módon vizsgálhatók. Az így kapott eredmények nagyfokú interpretálhatósága révén az anyai viselkedés emberekben megvalósuló szabályozásáról állatkísérletek segítségével is egyre több adat áll rendelkezésünkre (Lonstein és mtsai 2015).

Úgy tűnik, hogy habár az anyaként való viselkedés képessége rágcsálókban már a pubertás időszakában megjelenik és folyamatosan jelen van a felnőttkor végéig, ugyanakkor kifejeződésének intenzitása a szülés körüli időszakban jelentősen megnövekszik (Bridges 2015). Az anyai viselkedés első, erőteljes, szüléskor bekövetkező megnyilvánulása a magzatvízzel és a kölykökkel szembeni fokozott pozitív válaszkészség. A kölykökkel szembeni fokozott válaszkészség specifikus anyai motivációs állapotot jelent, mely különböző utódgondozó magatartási formákban nyilvánul meg, úgymint fészeképítés, kölykök nyalogatása, tisztogatása, illetve azok fészekbe való visszahordása (Olazabal és mtsai 2013), továbbá ezzel párhuzamosan növekszik az anya állatok betolakodókkal szembeni agressziója (Mayer és Rosenblatt 1984).

DOI:10.14753/SE.2016.1942

Az anyákra jellemző viselkedések egy része már a szüléskor, más része pedig azt követően jelenik meg (2. táblázat). Az anya állatok *szüléskor* bekövetkező jellegzetes viselkedése a magzatvíz és a placenta elfogyasztása, mely egyrészt az anyák nagy fizikai megterhelést jelentő szülést követő táplálását, másrészt pedig a ragadozók számára vonzó olfactoros ingerek eliminálását szolgálhatja, emellett a placenta olyan hormonokban bővelkedik, melyek a laktogenezis elősegítésében és a negatív energia-egyensúly helyreállításában játszhatnak szerepet. A *szülést követően* megjelenő anyai válaszokat, illetve azok anyai viselkedésként való megnyilvánulásait alapvetően két csoportba oszthatjuk: a kölykökhöz közvetlenül, illetve azokhoz közvetetten kapcsolódó magatartási formák (Bridges 2015).

AZ ANYAI VISELKEDÉS FORMÁI		
Szüléskor megjelenő	***Szülést követően megjelenő***	
	Közvetlen	*Közvetett*
kölykök ingerlése	kölyökcipelés	anyai agresszió
magzatvíz elfogyasztása	nyalogatás, tisztogatás	megnövekedett táplálékfelvétel
	szoptatás, görnyedés	csökkent szorongás és megnövekedett explorációs aktivitás
placentofágia	védelem és melegítés (fészeképítés)	

2. táblázat. A postpartum rágcsálókra jellemző magatartásformák

A legkorábban megjelenő anyai viselkedések már szüléskor megfigyelhetők. Ezek közé tartozik az újszülött kölykök későbbi idegrendszeri fejlődésük szempontjából is fontos stimulálása, továbbá a magzatvíz és a laktogenezist elősegítő hormonokat tartalmazó és tápanyagként is szolgáló placenta elfogyasztása. A szülés után kialakuló viselkedések egy része a kölykökkel való közvetlen interakcióban nyilvánul meg, míg másik részük a kölykök közvetlen hatásának tudható be. A kölykökkel való közvetlen kapcsolat kiterjed az utódok fészekbe való visszahordására, a kölykök nyalogatására, tisztogatására, különböző szoptató pózok felvételévelére, azok szoptatására, illetve a fészeképítés réven a kölykök ragadozókkal és a hővesztéssel szembeni védelmére. Bár nem jelenti a kölykökkel való közvetlen interakciót, mégis az anyai viselkedés fontos aspektusát képezi a betolakodókkal szembeni agresszió,

továbbá a laktogenezis, a megnövekedett táplálékfelvétel, illetve az anyák bátrabb fellépése új helyzetekben (a szorongás csökkent mértéke és az explorációs aktivitás fokozódása), melyek mind-mind a kölykök védelmét és megfelelő ellátását biztosítják (Bridges 2015).

Szülést követően, a kölykökhöz közvetlenül kapcsolódó anyai magatartásformák

A kölykök cipelése, illetve fészekbe való visszavitele révén a még fejletlen utódok testhőmérsékletének fenntartása és ragadozókkal szembeni fizikai védelme valósul meg. Ez a magatartási forma rágcsálókban teljesen általános, sérülése a BNSTv és az anyai viselkedés központjának tekintett mediális preopticus area léziójával idézhető elő (Gammie 2005, Jacobson és mtsai 1980b, Numan 1986, Numan és Numan 1996), ugyanakkor a nucleus accumbens shell régiójának roncsolásával szelektíven is kiváltható (Li és Fleming 2003).

A kölykök nyalogatásának, tisztogatásának szerepe nem csupán a kölykök tisztán tartása, mely történhet a kölyök testének nyalogatásával („body licking”), hanem az ún. anogenitális nyalogatás az anogenitális tájék ingerlése révén segíti a kölykök vizelet- és széklet ürítését (Gubernick és Alberts 1983). A kölyköktől származó vizelet ugyanakkor fontos stimulust jelent az anya állat számára: képes fokozni az anyai gondoskodás mértékét, úgymint a kölykök cipelését, nyalogatását, tisztogatását (Londei és mtsai 1989). Emellett további hatását írták le kölykök szociális és emocionális fejlődésére (Bosch 2011). A nyalogatás/tisztogatás központi idegrendszeri szabályozásában az MPA területén elhelyezkedő ERα, valamint a VTA dopamin neuronjai kiemelt jelenőséggel bírhatnak, ugyanis ezen magatartásforma csökkenése együtt jár az ERα és dopamin neuronok számának redukciójával (Pena és Champagne 2014).

A kölykök fölé görnyedéssel, borulással azok fizikai és lehűlés elleni védelme valósul meg. Az alloparental (örökbefogadó) viselkedés kapcsán kimutatták, hogy az anyai viselkedés egyik komponensének tartott kölykök fölé görnyedéssel töltött idő, ami gyakran egybeesik azok nyalogatásával, tisztogatásával, a kétszülősen gondozó préri földipockok esetén erősen függ az MPOA és a laterális septum területén expresszálódó oxytocin receptorok (OTR) számával és eloszlásával (Olazabal és Young 2006). A kölykök fölé borulás gyakran a szoptatási pózok egyik komponense is lehet.

A szoptatást általában megelőzik az azt bevezető, szomatoszenzoros ingerekre bekövetkező viselkedésformák, úgymint a kölykök összegyűjtése, nyalogatása,

tisztogatása. A szoptatás során felvett testtartás történhet nyugalmi vagy teljesen mozdulatlan testhelyzetben, ami magasabb alomszám esetén is lehetőséget nyújt a kölykök egyidejű szoptatására (Stern 1989). A nyugalmi testhelyzet azon kívül, hogy lehetővé teszi a kölykök emlőbimbóhoz való hozzáférését, a szopási stimulus hatására bekövetkező tejejekcióhoz is nélkülözhetetlen testtartás (Lincoln és mtsai 1980). Rágcsáló anyák, főleg a postpartum időszak első felében, idejük jelentős részét, mintegy 85%-át szoptatással töltik, míg ez az arány a szülést követő 17. napra jelentősen, 30% körüli értékre csökken (Grota és Ader 1974).

A legtöbb rágcsáló a még fejletlen utódai számára fészket épít. Egerek esetén kimutatták, hogy a fészeképítés magas progeszteron és alacsony ösztrogén szint mellett megy végbe (Lisk 1971). Progeszteron és ösztrogén együttes kezelésével a fészeképítés indukálható, míg izolált adásukkal nem (Swanson és Campbell 1979), ugyanakkor a prolaktin valószínűleg antagonizálja a sztreoidok fészeképítésre gyakorolt pozitív hatását (Numan és mtsai 2006). Az MPA/BNSTv sérülését követően a kölykök fészekbe való visszavitele mellett a fészeképítés is zavart szenved (Numan és mtsai 2006).

Szülést követően, a kölykökhöz közvetetten kapcsolódó anyai magatartásformák

Az anyai gondoskodás (kölyökcipelés, nyalogatás/tisztogatás, szoptatás, fészeképítés) mellett a kölykök védelmének egyik fontos, a szülést követően minden anya állatban általánosan megjelenő anyai viselkedésformája az anyai agresszió (Numan és Insel 2003). A kölykök jelenléte és kora mellett a támadó (betolakodó) neme és kora külső tényezőkként módosítják az anyai agresszió mértékét, míg a belső paraméterek közé sorolható az anyák természetes szorongása, illetve az anyai agresszió kialakulásáért felelős neuropeptidek, az oxytocin és a vazopresszin (Bosch 2013). Az anyai agresszió a szülést követő első héten a legkifejezettebb (Erskine és mtsai 1978), sőt a szülést követő második héten szintje, kifejeződése még tovább emelkedik (Nephew és mtsai 2010). Szabályozásában az oxytocinnak kiemelt jelentőséget tulajdonítanak (Bosch és Neumann 2012).

Az anyai adaptációk egyik fontos tényezője a vemhesség és a laktáció során megjelenő fokozott táplálékfelvétel és következményes leptin-rezisztencia (Ladyman és Grattan 2005). A tejtermelés következtében fellépő negatív energia-egyensúly az anyák hyperphagiájának fő oka (Xu és mtsai 2009). A táplálékfelvétel fokozódásában szerepet

játszhat még a prolaktin szintjének emelkedése, valamint a kölykök felől érkező szopási stimulus (Chen és Smith 2003, Woodside 2007), továbbá a táplálékfelvétel szabályozásában részt vevő, nucleus arcuatus-ban és más hypothalamicus területeken előforduló egyéb peptidek, különösen a neuropeptid Y (Chen és Smith 2003).

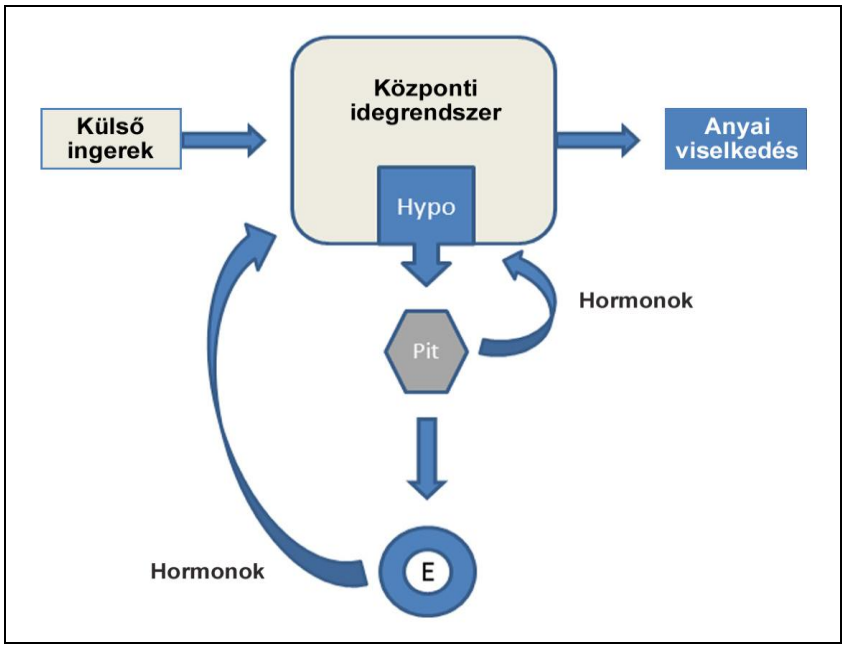
A különböző stresszorokkal szembeni válaszkészség csökkenését mind a vemhesség végén (Neumann és mtsai 1998), mind pedig a laktáció során kimutatták (Neumann és mtsai 1995). A hypothalamo-hipofízis-mellékvese tengely csökkent válaszkészsége a limbikus, hypothalamicus és agytörzsi agyterületek adaptációs képességének köszönhető (Johnstone és mtsai 2000). A postpartum időszakban bekövetkező csökkent mértékű stresszválasz egyik következményének tudható be a laktáló állatokban leírt megnövekedett mértékű explorációs aktivitás (Leppanen és mtsai 2008).

Azok a neuonális folyamatok, amelyek a kölykökről való gondoskodás különböző formáiban nyilvánulnak meg, eredményezik ún. az anyai motivációs állapotot (Numan és Woodside 2010, Pereira és Morrell 2011). Motivációnak tekinthetünk minden olyan állapotot, mely során az egyedben végbemenő belső folyamatok megváltoztatják egy külső ingerre adott általános válaszát (Pfaff 1982). Az anyai motivációs állapot szelektíven növeli az anyai viselkedés bekövetkeztének mértékét, továbbá olyan magatartásformákban (pl. kölyökcipelés, szoptatás, nyalogatás, fészeképítés) nyilvánul meg, melyek lehetővé teszik az anya állatok szülés után bekövetkező megváltozott, speciális körülményeihez való alkalmazkodását (Olazabal és mtsai 2013).

1.3.2. Az anyai viselkedés kialakulása és szabályozása

Az anyai viselkedés kialakulásában és szabályozásában mind endokrin, mind neuronális tényezők szerepet játszanak. Bár az anyai viselkedés alapját a neuroendokrin rendszer képezi (Bridges és mtsai 1999), szabályozását, megjelenését és fenntartását külső ingerek (kölykök felől érkező szaglási, szenzoros, tapintási információk), különböző hormonok, neurokémiai mediátorok és specifikus agyterületek összehangolt munkája egészíti ki. Az anyai viselkedés szabályozásában szerepet játszó hormonok, akár hipofizeális, akár perifériás eredetűek, a központi idegrendszerre, főként a

hypothalamusra ható visszacsatolásos folyamatok mediátorai, melyek az anyák kölykökre és a kölykök által jelentett stimulusokra adott válaszkészséget befolyásolják (Bridges 2015) (6. ábra).



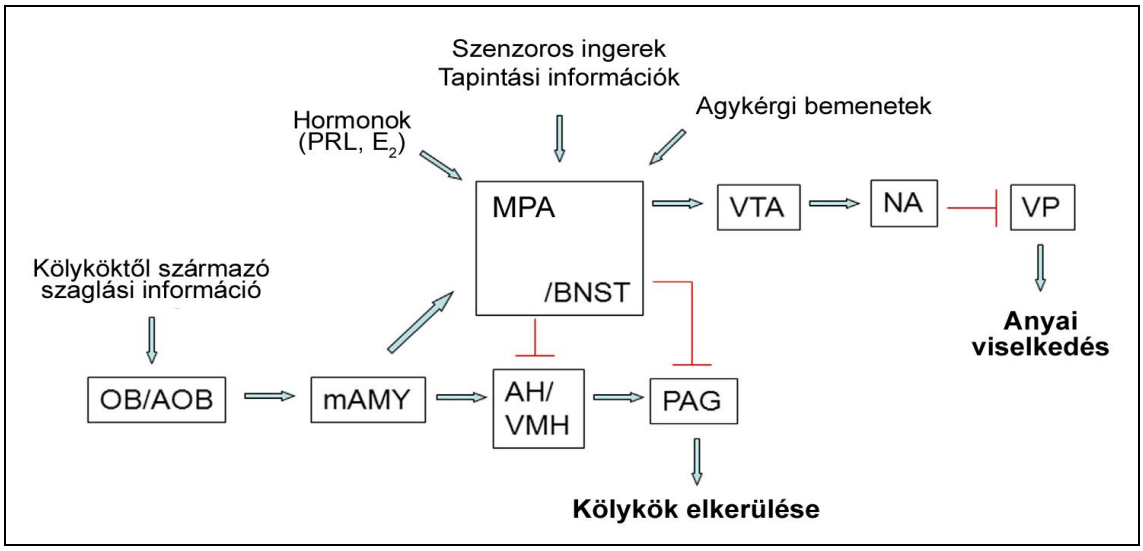
6. ábra. Sematikus rajz az anyai viselkedés központi idegrendszeri és hormonok által megvalósuló visszacsatolásos szabályozásáról

Az anyai viselkedés kialakulásában és fenntartásában fontos tényezőkként szerepelnek a külvilág felől érkező ingerek. Ezek közé tartoznak a kölykök felől érkező szaglási, szenzoros és tapintási információk. A szabályozásban részt vevő hormonokat az agyalapi mirigy (pituitary gland, Pit), illetve perifériás endokrin szövetek (E), például az ovárium, mellékvese, placenta, termelik. Ezek a hormonok a központi idegrendszer bizonyos területein, főként a hypothalamuson (Hypo) hatva stimulálják, modulálják az anyai viselkedést. Ezen felül, egy hypothalamuson belüli, ún. intrinsic neurokémiai szabályozó kör is érvényesül, mely hormonális és szenzoros szabályozás alatt áll. A visszacsatoló szabályozás részeként a hypothalamus és az agyalapi mirigy között fennálló közvetlen neuroendokrin kapcsolat befolyásolja a neuroaktív hormonok elválasztását és hatását (Bridges 2015).

Neuronális hatások

A kölykök iránti gondoskodó magatartásformákat neurális folyamatok biztosítják és szabályozzák (Olazabal és mtsai 2013). Emlősökben sokrétű szenzoros modalitások felelnek az anyai válaszok kialakulásáért (Dulac és mtsai 2014).

Az anyai viselkedés kialakulásában elsőként Fleming munkája során vált ismertté a szaglás és a hozzá kapcsolódó neuronális útvonalak, valamint az anyai válaszhoz és az anyai memóriához köthető jutalmazó rendszer és ennek központja, a nucleus accumbens (Fleming 1994), továbbá az ezeket befolyásolni képes agykérgi bemenetek (Lee és mtsai 1999). Noha az olfactoros rendszer a még nem szült (nullipara) nőstény patkányok esetén a kölykökkel való első interakciók során, azokkal szemben elkerülő magatartást fejt ki (Levy és mtsai 2004), a vemhesség során a kölykökhöz kapcsolódó szenzoros ingerek egyre inkább vonzóvá válnak a nőstény számára (Corona és Levy 2015), és ez, a kölyköktől származó ingerek hatásának értékelésében bekövetkezett változás teszi lehetővé szülést követően a kölykökről való anyai gondoskodás kialakulását. A kölyköktől származó olfactoros információ az amygdalán keresztül számos hypothalamicus területet, többek között az MPOA-t, a nucleus hypothalamicus anteriort (AHN), a BNST-t éri el. Az amygdalából származó inhibitoros hatás valószínűleg a szülés körül gátlódik, tehát bekövetkezik a gátlás gátlása, vagyis a diszinhibíció, ennek hatására szűnik meg a kölyköktől való averzió és alakulhat ki az anyai magatartás, amely az amygdalával kapcsolatban álló hypothalamicus területek aktivitásának gátlásához köthető. Az MPOA a VTA-val való közvetlen kapcsolata révén feltehetően fokozza a jutalmazó rendszert, a NAcc-t elérő mesolimbicus dopaminerg projekciókat, amely a ventralis pallidum (VP) gátlása révén lehetővé teszi az anyai viselkedés manifesztációját (Numan és mtsai 2005b). Az AHN/VMH, valamint az MPA/BNST substantia grisea centralist (PAG) elérő projekcióik révén csökkentik a kölykök elkerülésére irányuló magatartásformákat és növelik annak valószínűségét, hogy az újszülött utódok az anya számára vonzóak legyenek (Bridges 2015). A hypothalamicus MPOA tehát az anyai viselkedés központja, ahol az imént ismertetett neuronális rendszer mellett, egyrészt az anyai viselkedés szabályozásában szerepet játszó hormonok az itt található receptoraik révén az anyai gondoskodás kifejeződésében vesznek részt, másrészt pedig ezen a területen történik meg az agykérgi bemenetek moduláló hatása mellett a viselkedési elemek integrációja által az anyai magatartás szabályozása (Numan 2012) (7. ábra).



7. ábra. Az anyai neuronális hálózat idegrendszeri elemeinek és az azokat befolyásoló tényezők áttekintő ábrája

Az anyai viselkedés központjának tekintett mediális preopticus area, valamint a bed nucleus of the stria terminalis területén több, az anyai viselkedés kialakulásában és szabályozásában szerepet játszó inger és információ konvergál. A kölykök szaga nullipara nőstények esetén, a kölykökkel való első találkozásukkor az olfactoros rendszer (OB/OAB) – amygdala (mAMY) – elülső hypthalamus (AH) – VMH kapcsolatrendszer révén hat a PAG-ra, és ez a kölykök elkerüléséhez vezet. A szülés során bekövetkező, amygdalából származó gátlás gátlása révén, az MPA gátolja a kölykök elkerüléséhez vezető neuronális kapcsolatokat (AH/VMH és PAG), továbbá a VTA – NA (itt: nucleus accumbens) rendszer fokozása, ezáltal a VP gátlása révén megvalósulhat az anyai viselkedés. A szülés során megváltozott hormonális státusz (PRL: prolaktin, E2: ösztradiol), továbbá a kölyköktől származó szenzoros és taktilis információk, valamint agykérgi bemenetek hatásai az MPA terület további bemeneteit képezve fokozzák a megfelelő anyai viselkedés kialakulását (Bridges 2015).

Az utódoktól az anyák nemcsak olfactoros, hanem auditoros információkat is kapnak. Ez a hallási inger a kölykök sírása, azok ultrahangos vokalizációja, melyet a kölykök stresszhelyzetekben, például hideg hatására vagy a fészek elhagyása esetén hallatnak (Kromkhun és mtsai 2013). A kölykök sírása szintén képes aktiválni a mesolimbicus dopaminerg rendszert. A kölykök vokalizációja két másik agyterületen is fokozott aktivációt vált ki: az elülső insula és a prefrontális kéreg területén. Az elülső insula a szociális érzelmekkel kapcsolatos információk feldolgozásában játszik szerepet (Rilling és Young 2014), míg a prefrontális kéreg feltételezhetően a kölykök sírása által, anyákban kiváltott negatív érzelmi válaszok kialakulásáért felel (Barr 2012).

Az emlő felől érkező szomatoszonzenzoros ingerek tejejekcióban és anyai motivációban való szerepét Cservenák és mstai írták le (Cservenák és mtsai 2010, Cservenak és mtsai 2013). A PIL felszálló bemenetet kap a nucleus gracilistől és nucleus cuneatustól, amelyek a gerincvelőből szenzoros információt szállító fasciculus dorsalis és a lemniscus medialis átkapcsoló magjai. Direkt gerincvelői bemenet szintén eléri a PIL-t, valószínűleg a tractus spinothalamicus kollaterálisain keresztül. Mindkét afferens kapcsolat továbbíthatja a szopási ingerületet a PIL felé. A PIL-ben lévő TIP39 idegsejtek ugyanakkor kapcsolatban állnak a prolaktin receptort tartalmazó nucleus arcuatus (Goudreau és mtsai 1995, Goudreau és mtsai 1992, Kawano és Daikoku 1987) és az MPOA területeivel, így a Arc-szal való kapcsolatuk révén átkapcsoló állomásként szerepelnek az emlő mechanoreceptoraiból érkező szopás által kiváltott szopási reflex felszálló útvonalán, valamint az MPOA-val való kapcsolatuk által az anyai adaptációk szabályozásában részt vevő agyi központok felé továbbítják a kölyköktől származó szenzoros információkat.

Hormonális hatások

Az endokrin rendszer hormonszekréciójának, már a vemhesség során bekövetkező változása számos emlős csoportnál fontos szerepet játszik a szülés során megvalósuló anyai magatartás kialakulásában. Vemhesség során megemelkedik a keringő ösztrogének, valamint a progeszteron és a laktogén hormonok (prolaktin, placentáris laktogének) szintje. Az ösztrogén és a progeszteron emelkedett szintje lehetővé teszi a méh állapotát az embrió beágyazódására, illetve a placenta fejlődésére, a prolaktin a tejtermelést fokozza, míg az oxytocin a szoptatás során a tej tejutakból való kiürülését segíti. Ezek a hormonok a dopaminnal való kapcsolatuk révén specifikus neuronális hálózatok aktiválásában vesznek részt, melyek a szülőket a kölykök gondozására, a kölykökhöz való kötődésére és azok védelmezésére késztetik (Rilling és Young 2014). Tehát ez a hormonális változás az anyai magatartásformák indukciója szempontjából különösen fontos (Rosenblatt 1994). Az anyai viselkedés endokrin változásoktól való dependenciája a szülések számának növekedésével csökken: többször szült (multipara) nőstények esetén a hormonális indukció szerepe redukált (Bridges 2015).

Ösztradiol- 17β (E2) az **ösztrogén** legaktívabb formája, szintje a terhesség alatt megemelkedik, a laktáció időszakában azonban lecsökken (Howard Kinsley 1994). Az E2 rágcsálók mellet számos faj esetén az ún. anyai terhességi hormonok csoportjának tagjaként, a progeszteron és a prolaktin mellett nullipara nőstényeknél is részt vesz az anyai viselkedés indukciójában (Moltz és mtsai 1970) . Az ösztrogén-hatás feltehetően ösztrogén alpha receptorokon keresztül valósul meg (Ribeiro és mtsai 2012). A továbbiakban ismertetett, az anyai viselkedés indukciójából alapvető szereppel bíró hormonok és neurokémiai modulátorok, úgymint a progeszteron, a prolaktin és az oxytocin hatékonysága az ösztradiol mennyiségétől nagymértékben függ.

A **progeszteron** neve egyben funkciójára is utal: szerepe a vemhesség, azaz a gesztáció elősegítésében van. A progeszteron szintje, az ösztradiolhoz hasonló módon, a terhesség alatt megemelkedik, és csak közvetlenül a szülést megelőzően csökken (Morishige és mtsai 1973). A progeszteronnak két viselkedésbeli szerepét írták le: egyrészt a vemhesség során érzékenyíti a szülés alatt álló patkányt a szülést követően megjelenő, kölyköktől származó ingerekre, másrészt szabályozza a megemelkedett válaszkészség megjelenésének időpontját (Bridges 2015). Az utódgondozás szempontjából túl korán megjelenő anyai magatartásra kifejtett inhibitoros hatását egyrészt az MPOA, VMH, valamint középagyi tegmentális területeken (Bridges 2015), másrészt valószínűleg prolaktin receptorokon (Bridges és Hays 2005) keresztül éri el.

Prolaktin és placentáris laktogének az anyai viselkedés indukciójában betöltött szerepükre elsőként az hívta fel a figyelmet, hogy ovariectomizált, nullipara nőstény patkányok ösztrogén-, progeszteron és terhességi hormonok adását követően, akár hypophysectomia után, akár ép agyalapi mirigy jelenlétében, az anyákra jellemző magatartásformákat mutattak (Bridges 1984). Ugyanakkor hypophysectomián átesett és szteroidkezelésben részesült szűz nőstények anyai válaszadása a szteroidkezelést nem kapott állatokéhoz volt hasonló (4-5 nap), míg a szteroidkezelés mellett ép agyalapi miriggyel rendelkező állatok esetén a megfelelő anyai válasz kialakulása csupán 1-2 napot vett igénybe (Bridges és mtsai 1985).

A prolaktin-hatás kifejeződésének egyik célterülete az MPOA (Bridges és Ronsheim 1990) és a VMH lehet (Bridges és mtsai 1999). A PRL szekréció szabályozásában ugyanakkor egy másik neuropeptid, a TIP39 játszik szerepet

(Cservenak és mtsai 2013). A TIP39 a PTH2R endogén ligandja, a PTH2R antagonista pedig bizonyítottan blokkolja a szopási inger által kiváltott prolaktin felszabadulást.

A placentáris laktogének vemhes patkányok esetén a gesztáció második felében igen nagy mennyiségben szekretálódnak (Robertson és Friesen 1981). Az anyai viselkedés indukciójában betöltött szerepüket támasztja alá, hogy infúziójukat követően felnőtt, petefészekirtott, nullipara nőstény patkányban ösztrogén- és progeszteron-kezelést, illetve az endogén PRL-szekréciót gátló bromokriptin-adást követően az anyai válasz, szűz nőstényekben bekövetkező 6 napos kialakulásának ideje 2 napra redukálódott (Bridges és mtsai 1996).

Neurokémiai modulátorok

Számos neurokémiai rendszert és az ezekhez kapcsolódó neuromodulátor funkcióval rendelkező molekulát azonosítottak, melyek az anyai viselkedés kialakulásában, megindulásában játszanak szerepet. Ezek közé a neuromodulátor anyagok közé éppúgy tartoznak neuropeptidek (oxytocin, opioidok, vazopresszin, opioidok, tachykininek, kolecisztokinin), mint klasszikus neurotranszmitterek (dopamin, noradrenalin, szerotonin), valamint további szabályozó anyagok (PTH2R, galanin).

Az **oxytocin** (OT) anyai viselkedésre kifejtett stimuláló hatását ösztrogén-hiányos felnőtt, szűz nőstény patkányok esetén írták le, mely során az OT intracerebroventricularis (ICV) injektálását követően az anyai válaszok gyors megjelenése következett be (Pedersen és mtsai 1982), míg OT-antagonista adása esetén bizonyos anyai magatartásformák (kölykök nyalogatása, tisztogatása, kyphoticus szoptatási póz gyakorisága) redukciója volt megfigyelhető (Pedersen és Boccia 2003). A PVN magnocelluláris szubdivíziójában szintetizálódó oxytocin az anyai viselkedés indukciójában betöltött szerepét az MPOA-n és a VTA-n hatva fejti ki (Pedersen és mtsai 1994). Az anyai viselkedés megindítása mellet feltételezett szerepe van az anyai motiváció növelésében, és ezzel együtt a szorongás mértékének csökkentésében (Bridges 2015). Az anyai viselkedés egyik aspektusának, az anyai agresszió kialakulásának szabályozásában is jelentőséget tulajdonítanak neki (Bosch és Neumann 2012).

A **vazopresszin** (AVP) anyai gondoskodó magatartás indukciójában betölött szerepe kevéssé ismert, bár szűz nőstény patkányok esetén AVP-injáktálását követően leírták az anyai válaszok valamelyest gyorsabb kialakulását (Pedersen és mtsai 1982), valamint AVP-hiányos ún. Brattleboro patkány esetén a kölykök nyalogatásával, tisztogatásával töltött idő csökkenését (Fodor és mtsai 2012). Az AVP anyai viselkedéshez kapcsolódó, legintenzívebben vizsgált szerepét tekintve elsődlegesen az anyai agresszió kialakulásában játssza (Lonstein és Gammie 2002).

Az **opioidok** anyai viselkedésben betöltött szerepének ellentétes hatásait írták le, melyek egyrészt azokat, az anyai motivációt és a kölykökkel való interakciókat stimuláló (Panksepp és mtsai 1994), másrészt azokat gátló hatások, melyek a kölykök iránti válaszkészséget csökkentik (Bridges és Grimm 1982). Az opioidok gátló hatásának vizsgálata során az MPOA területére morfin-adást végeztek, ennek hatására az anyai viselkedések megjelenése nőstény patkányokban sérült, míg az opiát antagonista adása ezzel ellentétes hatást váltott ki (Rubin és Bridges 1984). A morfin anyai viselkedésre kifejtett gátló hatását feltételezhetően μ opiát receptorokon fejti ki (Mann és mtsai 1991).

A **kolecisztokinin** legfontosabb, az anyai viselkedésben betöltött szerepe a β-endorfin gátló hatásának antagonizálása (Lavi-Avnon és mtsai 2004, Mann és mtsai 1995, Miranda-Paiva és mtsai 2002). CCK és β-endorfin MPA területére történt együttes adása meggátolta az opioid anyai viselkedésre kifejtett negatív hatását postpartum patkányok esetén. Mindemellett az opioid-kolecisztokinin interakciónak a szexuális magatartásformák kialakulásának szabályozásában is szerepet tulajdonítanak (Micevych és Sinchak 2001).

A **tachynininek**, melyek közé a substance P, a neuropeptid K (új nevezéktan szerint neurokinin B) és a neurokinin A is tartozik, feltehetően azon neuronális rendszer elemeit alkotják, amelyek az anyai viselkedés gátlásában játszanak szerepet. A neuropeptid K VMN területére való beadását követően hormonkezelt nőstény patkányok esetén sem következett be az anyai viselkedés (Sheehan és Numan 1997), míg ettől a területtől dorsolaterális beadott neuropeptid K semmilyen hatással sem volt az anyai viselkedésre. Mivel a tachykinin neurális pályája a MeA-t és a VMN-t köti össze, ezért feltételezhető, hogy a VMN területre adott neuropeptid K aktiválta a

„központi elkerülő rendszert (central aversion system)", amely alapesetben hormonkezelt nőstényben down-regulált, így ezeknél az állatoknál hormonális hatásra a kölyköktől való averzió, azok elkerülése nem következik be (Numan és Sheehan 1997).

A **dopamin** (DA) az anyai viselkedés szempontjából leginkább vizsgált neurotranszmitter, mely mind az anyai magatartás indukciójában, mind pedig annak fenntartásában szerepet játszik (Bridges 2015). Emelkedett DA felszabadulás a NAcc területén az anya-kölyök interakciók számának növekedésével járt (Champagne és mtsai 2004), továbbá erősítette az anyai viselkedés fennmaradását (Numan és mtsai 2005a). A DA anyai viselkedésre kifejtett stimuláló hatása egyes típusú (D1) receptorán keresztül érvényesül (Stolzenberg és mtsai 2007). A DA mesolimbicus jutalmazó rendszerben betöltött szerepét tekintve, erősen valószínűsíthető, hogy a DA az anyák számára a kölykök jutalmazó ingerekként való megerősítésében vesz részt (Bridges 2015).

A **noradrenalin** (NA) anyai viselkedésben betöltött szerepét eddig leginkább juhokban vizsgálták, az eredmények alapján valószínűsítik, hogy a noradrenerg rendszer az anyai gondoskodó magatartás bizonyos komponenseire hathat (Bridges 2015).

A **szerotonin** (5-HT) patkányok anyai viselkedésében betöltött szerepét vizsgálva azt találták, hogy a nucleus raphe medialis neurotoxikus lézióját követően a kölykök iránti anyai válaszok és a gondoskodás mértéke csökkent (Barofsky és mtsai 1983). KO egérmodellek segítségével azt is sikerült bizonyítani, hogy 5-HT teljes hiányában az anyai viselkedés csökkent mértéke legfőképp a kölykök visszavitelét érintette (Alenina és mtsai 2009).

A **kettes típusú parathormon receptor** (PTH2R) anyai magatartásban betöltött szerepét támasztja alá, hogy endogén ligandja, a TIP39 az Arc területén a szopás-indukált prolaktin-felszabadulásban (Cservenák és mtsai 2010), az MPOA területén az anyai motiváció kialakulásában vesz részt (Cservenak és mtsai 2013). A thalamus intralamináris komplexében expresszálódó TIP39 neuropeptidet tartalmazó sejtek gerinvelői bemenetet kapnak és rostokat küldenek a Arc-hoz, valamint az MPA-hoz, így a PIL TIP39 sejtjei egyrészt az emlő mechanoreceptoraitól az arcuatus maghoz futó felszálló pálya átkapcsoló neuronjai, továbbá az MPA-val való kapcsolatuk révén részt vesznek az anyai motiváció kialakításában.

A **galanin** a központi idegrendszeren belül elsősorban az olfactoros rendszerben és az MPOA területén található meg mind nőstény, mind hím egyedekben. A szülői gondoskodó magatartásban betöltött szerepét Wu és munkacsoportja írta le elsőként (Wu és mtsai 2014). Az MPOA területén található galanin sejtjek mintegy 60%-nak eliminációját követően szűz nőstény egerek esetén a kölykök fészekbe való visszavitele csökkent mértékű volt, sőt fokozódott a kölykökkel szembeni agresszió is, továbbá a galanin sejtek optogenetikai aktivációjával hím egerekben csökkent a kölykökkel szembeni agresszió mértéke, és megemelkedett a kölykök nyalogatásának, tisztogatásának frekvenciája.

1.3.3. Az anyai viselkedés indukciója nem anya állatokban

A peripartum időszakban az anyai viselkedés a hormonális indukció (Moltz és mtsai 1970) mellett, az állatok kölyköknek való expozíciójával is elérhető (Rosenblatt 1967). Ezt a folyamatot szenzitizációnak nevezik, melynek eredményeként a szenzitizálódott állatok esetén az anyákra jellemző viselkedési mintázathoz nagyon hasonló magatartásformák jelennek meg (Numan és mtsai 2006). A folyamatos kölyökjelenlétnek köszönhetően a szenzitizálás alatt álló állatokban a kölyköktől való kezdeti averzió elmúlik, és ezt követően lehetővé válik a megfelelő kölyökgondozó magatartási formák kifejeződése (Fleming és mtsai 1989). Kontroll (szűz, nullipara) nőstény patkányok esetén a szenzitizáció 3-8 napon keresztül tart (Numan és Insel 2003). Egerekben, a patkányokhoz hasonló módon, kölyköknek való expozíciót követően kontroll nőstényekben is megjelennek az anyákra jellemző magatartási formák (Stolzenberg és Rissman 2011), ugyanakkor mivel nőstények egerek szenzitizáció nélkül, a kölykökkel való első találkozásukkor is mutatnak anyákra jellemző viselkedési elemeket, amiket spontán anyai viselkedésnek nevezünk, ezért esetükben a szenzitizáció időtartama a patkányokéhoz képest rövidebb: 4 napon keresztüli, napi pár óra kölykökkel való együttlét elegendő a hosszú időn keresztül fennmaradó szenzitizációs állapot eléréséhez (Stolzenberg és mtsai 2012). A szenzitizáció jelensége nem csupán nőstény, hanem hím állatok esetén is bekövetkezik (Rosenblatt és mtsai 1996).

1.3.4. Az anyai viselkedés vizsgáló módszerei

Az anyai viselkedés tanulmányozásának története patkányok esetén több évtizedre nyúlik vissza, jelenleg ez a faj az anyai viselkedés vizsgálata szempontjából leggyakrabban alkalmazott modellszervezet (González-Mariscal és Melo 2013, Numan és mtsai 2006, Olazabal és mtsai 2013), ugyanakkor a genetikailag módosított egértörzsek megjelenésével egyre több, az egerek anyai viselkedését vizsgáló tanulmány születik (Brooks és mtsai 2012, Heiming és mtsai 2013, Rich és mtsai 2014). Általánosságban elmondható, hogy a kölykök jelenlétéhez kötött anyai viselkedés kvantitatív leírására a kölykökkel való interakciók számának meghatározása szolgál (Bridges 2015).

Az anyai viselkedés leírása során több tényezőt is figyelembe kell vennünk. Mivel az anyai magatartásformák egy kölcsönös anya-kölyök interakcióban nyilvánulnak meg, ezért a kölykök anyai viselkedésre való hatásával minden esetben számolni kell. Egyészt fontos tényezőként szerepelhet az alomszám. A kölykök száma hat azok tápláltságára, az emlőbimbókhoz való hozzáférésük lehetőségére. Magasabb alomszám a kölykök alultápláltságához (Williams és mtsai 2003), míg az alacsonyabb azok túltápláltságához vezethet (Plagemann és mtsai 1998), ezek pedig összességében a kölykök fokozott, illetve csökkent jelzéseiben nyilvánulnak meg. Másik fontos tényező lehet a megfigyelés, teszt elvégzésének időpontja: az állatok aktivitásának napszaki ritmusa van, ez pedig nemcsak anyai viselkedésük mértékére, hanem annak megjelenési formájára is kihat (Shoji és Kato 2006). Egerek vizsgálatánal további, az anyai viselkedést meghatározó tényezővel kell számolnunk: az egerek kölyökgondozó magatartását nagymértékben befolyásolják azok genetikai tulajdonságai (Shoji és Kato 2006).

Az anyai viselkedés alapvetően kétféle módon vizsgálható. Egyrészt az anya állat megzavarása nélkül saját ketrecében, ebben az esetben a spontán, azaz természetes magatartásformák megfigyelésére nyílik lehetőség, másrészt az anyák természetes viselkedésének (nyalogatás, szoptatás, kölykök fölé görnyedés) befolyásolásával (pl. kölykök elvétele, az anya új környezetbe helyezése, idegen fajtárs megjelenése) az ún. indukált anyai magatartásformák válthatók ki (Fodor és mtsai 2012). Ezeket egészítik ki a postpartum periódusban megváltozott egyéb viselkedésekre irányuló, szorongás és

depresszió-szerű magatartását mérő tesztek segítségével elvégzett vizsgálatok (Fodor és mtsai 2012).

Spontán anyai viselkedés mérése

Mivel az anya-kölykök közti interakciók száma a szülést követő első napokban a legmagasabb, ezért a spontán anyai viselkedések kvantitatív analízisének elvégzése ebben az időszakban ajánlatos (Bridges 2015), továbbá több, anyai magatartást mérő teszt sorozatos elvégzése esetén a spontán anyai viselkedés zavartalanságának biztosítása érdekében szintén ajánlott ezzel a megfigyeléssel kezdeni.

A spontán anyai viselkedés mérésének egyik legalaposabb módját Dimitsantos és mtsai írták le (Dimitsantos és mtsai 2007), azóta mind patkányok, mind egerek anyai magatartásának vizsgálatára elterjedten alkalmazzák (Benatti és mtsai 2011, Fodor és Zelena 2013). Az anyai viselkedéseket az első 7 postnatális napokon (PPD1-7) keresztül a nappali ciklus alatt háromszor (8:30, 12:30 és 14:30 h), míg éjszaka egyszer (20:30 h) figyelték meg. Egy megfigyelési időtartam alatt minden anya viselkedését 25 alkalommal értékelték, melyek között 3 perc szünetet tartottak. Ezekkel a megfigyelési paraméterekkel állatonként a kísérlet időtartama alatt összesen 700 megfigyelést végeztek (25 megfigyelés x 4 periódus/nap x 7 nap). A következő magatartási fomák jelenlétét, illetve azok hiányát pontozták: (1) bármely kölyök nyalogatása, tisztogatása (test + anogenitál nyalogatás); (2) kyphosis; (3) “prone nursing”, vagy “low/partial kyphosis”; (4) “supine nursing”; (5) anya fészken kívül, nincs interakció a kölykökkel. Ha a nyalogatások-tisztogatások számát az egyes kölykök esetén külön-külön is megvizsgáljuk, akkor az egyes kölykökkel folytatott interakciók számának meghatározásával a nyalogatás-tisztogatás mértékének pontosabb leírása válik lehetővé.

Indukált anyai viselkedést mérő tesztek

Kölyök visszaviteli teszt (Pup-retrieval Test)

Ennek egy lehetséges és gyakran alkalmazott formája patkányok és egerek esetén annak mérése, hogy mennyi idő telik el addig, ameddig a saját ketrecben szétszórtan elhelyezett kölyköket az anya a fészekbe visszaviszi, összegyűjti (Bridges 2015). A teszt kezdetét megelőzi egy 5-10 perces kölyköktől való szeparáció, majd azt követi a kölykök ketrecbe való visszahelyezése, mely történhet az összes kölyök (Fodor

és mtsai 2012), vagy csupán 3-4 kölyök (Stolzenberg és Rissman 2011, Stolzenberg és mtsai 2012) visszaadásával. A kölykök visszahelyezését követő 10 percben a következők szerint értékelhető az anyai magatartás: az első kölyök 'megfogásáig' eltelt idő, az első kölyök fészekbe való visszahelyezéséig eltelt idő, illetve az összes kölyök fészekben való összegyűjtéséhez szükséges idő (Slamberova és mtsai 2001).

További lehetséges formájaként mindez megvalósítható T-labirintus tesztben (T-maze maternal behavior test) is (Stolzenberg és mtsai 2012). Ebben az esetben a kölykök összegyűjtése egy, a nőstény számára teljesen ismeretlen környezetben történt, az összegyűjtés helyét némi saját alomanyaggal jelölték. Ez a teszt az anyai viselkedésre való szenzitizálás hosszú távú hatásainak leírására adott lehetőséget.

Az anyai agresszió tesztje (Maternal Defense Test)

Az anyai agresszió a betolakodóval szembeni védekezésből fakadó támadó magatartásban nyilvánul meg (Neumann és mtsai 2001). A betolakodó (nőstény, hím) az anya saját ketrecébe való behelyezését követően az anya részéről a következő viselkedésformákat válthatja ki: támadások, ágaskodások, harapások, rúgások és ágaskodás közben végrehajtott ütések (Lonstein és Gammie 2002). A kölykök jelenlétében végzett teszt időtartama 10 perc, mely során mind az anya, mind a betolakodó által mutatott támadó (támadások, fenyegetések, támadást követően az ellenfél genitális megszaglászása, támadó jellegű szaglászás), védekező (megdermedés, támadást követő immobilitás), explorációs (ágaskodás, ellenfél felé szagolgatás, ketrec felfedezése) és anyai magatartásformák (szoptatás, kölykök nyalogatása/tisztogatása, kölyökcipelés) kerülnek megfigyelésre (Neumann és mtsai 2001).

Kondícionált helypreferencia teszt (Conditioned Place Preference Test, CPP)

A kondícionált helypreferencia teszt az anyai motiváció mérésére alkalmas, arra rendkívül érzékeny módszer (Mattson és mtsai 2003), mely egy megerősítő stimulus (pl. kábítószerek) motivációra gyakorolt hatását képes kimutatni. Megerősítő inger hiányában is elvégezhető a teszt, ekkor a kondícionálás valamely környezeti elemre irányul (Fleming 1994). A kölykök az anyák számára egy olyan pozitív hajtóerőt, ingert jelentenek, hogy hiányukban a rájuk emlékeztető környezeti elemek ép anyai motiváció esetén alkalmasak az anyák, kölykeikhez kötődő helypreferenciájának fenntartására (Fleming 1994).

A 60 min időtartam hosszúságú teszt bizonyos típusaiban az anyák a kölyök-asszociált és a másik stimulushoz kötött kompartment között választhatnak (Mattson és mtsai 2001), míg más kísérleti elrendezés során a kölyök-assszociált és egy ún. semleges kontroll doboz közötti preferencia mérhető (Cservenak és mtsai 2013). Ép anyai motiváció esetén az anyák a korai postpartum időszakban a kölyök-asszociált kompartmentben tartózkodnak többet, ezt preferálják, míg a késői postpartum időszakban a kölykök már nem képviselnek az anya számára mindennél erősebb ingert, így megjelenik a másik stimulus (nem kölyök) iránti preferencia (Mattson és mtsai 2001, Wansaw és mtsai 2008).

Pedálnyomó viselkedési teszt (Bar-pressing test)

A teszt szintén az anyai motiváció mérésére alkalmas módszer, mely során az operáns tanulás olyan típusa következik be, amelyben a megfigyelt kísérleti állat valamilyen módon a környezetet aktívan befolyásolja, azaz a viselkedés szabályozza a következményeket, konkrétan az anya állatok pedálnyomó viselkedésének aktivitása felerősödik, ha a pedál megnyomását az operáns kondícionáló kamrában jutalomként a kölykök jelenléte követi. A teszt első lépéseként megtörténik az állat inaktív operáns kamrára (Skinner-doboz) való habituációja. Ekkor napi egy órán keresztül csak az inaktív kísérleti kamrával ismerkedik. A tanulási folyamat, vagyis kondícionálás alatt a pedálnyomásra az állat megkapja a megerősítő stimulust, a jutalmat (étel, kölykök), majd a teszt mérési fázisában megtörténik a jutalom megszerzéséért folytatott pedálnyomások mérése (Lee és mtsai 2000). Elsőként ezzel a módszerrel sikerült kimutatni, hogy a kölykök kora hat az anyai motiváció mértékére (Noirot 1964). A teszt érzékenységének további jó fokmérője, hogy anyák esetén a pedálnyomás fokozódása csak akkor következett be, ha ezt nem csupán a kölykök jelenléte, hanem az azokkal való közvetlen interakció is követte, míg szűz, nem szenzitizált állatok esetén nem a kölykök, hanem az étel idézte elő a fokozott pedálnyomogatást (Lee és mtsai 2000).

A postpartum periódusban bekövetkező emocionális változásokat mérő tesztek

Emelt keresztpalló teszt (Elevated plus-maze test, EPM)

A szorongás mértékének vizsgálatára alkalmas módszer (Pellow és mtsai 1985). A kísérlet során egy magas, keresztalakú kísérleti berendezésre helyezzük az állatot, amely két zárt és két nyitott karból, valamint az azokat összekötő központi

kompartmentből áll. A teszt 15 perces időtartama alatt a szorongás fokmérőjeként meghatározhatjuk a nyitott karokban töltött idő mennyiségét, valamint a nyílt karokba történt belépések számát (Fodor és mtsai 2012). A zárt karokba történt belépések száma az állat általános lokomotoros aktivitásáról ad információt (File 2001). Az anya állatokban a postpartum időszakban végbemenő egyik legfontosabb változás szorongásuk csökkenése (Neumann és mtsai 2000), mely megkönnyíti számukra a kölykök elfogadását és az utódokkal való szociális kötődés kialakulását (Rich és mtsai 2014).

Kényszeres úszás teszt (Forced Swimming Test, FST)

Első leírása óta a farmakológiai kutatásokban az antidepresszáns hatás vizsgálatára széles körben alkalmazott módszer (Marti és Armario 1993). A teszt ideje alatt az állatokat egy henger alakú vízzel töltött, átlátszó falú edénybe helyezik, és mérik az aktív (küdés, úszás) és passzív (lebegés) viselkedési formák időtartamát. Minél több időt töltenek az állatok passzív viselkedéssel, annák inkább depresszív viselkedést folytatnak (Fodor és mtsai 2012). Az anyaság emocionalitásra kifejtett hatásaként leírták, hogy a postpartum időszakban a teszt során fokozott aktivitás volt mérhető, tehát az anyaság antidepresszív hatással rendelkezik (Maguire és Mody 2008).

Cukorpreferencia teszt (Sucrose preference test, SPT)

A FST-hez hasonlóan szintén az emocionalitásban bekövetkezett változásokat mérő teszt. Az anhedónia (örömtelenség), a jutalom által vezérelt csökkent motiváció fokmérője. A teszt három fázisra osztható: az első fázisban megtörténik a cukoroldathoz való habituáció, amikor az állatok csak cukoroldatot kapnak, ezt követi második fázisként a preferencia kialakulásának ideje, amikor az állatok a víz és a cukoroldat között szabadon választhatnak, majd a harmadik fázisban az elfogyasztott víz és cukoroldat visszamérése alapján megtörténik a cukorpreferencia meghatározása (Kurhe és mtsai 2014). A depresszió-szerű tüneteket mutató állatmodellekben a depresszív tünetek együtt járnak a cukorpreferencia csökkenésével, azaz az anhedónia mértékének fokozódásával (Fernandez és mtsai 2014).

DOI:10.14753/SE.2016.1942

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A szülést követően milyen időbeli lefolyással és eloszlásban jelenik meg az amylin patkányokban és egerekben?

1. Változik-e az amylin mRNS szintje a szülés körüli (peripartum) és a szülés utáni (postpartum) időszakban patkányok központi idegrendszerében?
2. Kimutatható-e az amylin indukciója egér anyák hypothalamusában?
3. Megjelenik-e az amylin mint funkcionális peptid anya patkányok preopticus területén?
4. Változik-e a perifériás amylin immunreaktivitása a szülést követően?

2.2. A szülésen kívül milyen más hatások idézhetik elő az amylin központi idegrendszeri indukcióját?

1. Befolyásolja-e az ovariectomia, illetve az azt követő szenzitizálás az amylin megjelenését a preopticus területen?
2. Hogyan változik a központi idegrendszeri amylin mRNS-mennyisége az anyai viselkedésre való szenzitizálás és az éheztetés hatására?
3. Kimutatható-e a funkcionális amylin peptid a szenzitizálást követően a preopticus területen?

2.3. Mutatnak-e anyai aktivációt a preopticus területen található amylint expresszáló idegsejtek?

1. Mutatnak-e Fos-aktivációt az amylin-immunreaktív idegsejtek kölykök hatására?
2. Aktiválódnak-e az amylin mRNS-t kifejező neuronok kölykök visszaadásának hatására?

2.4. Kapcsolatban állnak-e az amylint expresszáló idegsejtek a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszerrel?

1. Milyen elhelyezkedés jellemzi az amylin-ir neuronokat és a TIP39-rostokat a preopticus területen?
2. Milyen az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek és a PTH2R-ir neuronok elhelyezkedése a preopticus területen?
3. Befolyásolja-e PTH2R hiánya az amylin mRNS-szintjét?

2.5. Hogyan befolyásolja a szülés és az anyai viselkedésre való szenzitizálás az egerek anyai motivációját és depresszió-szerű viselkedését?

1. Megváltozik-e az anyai motiváció szülést, illetve szenzitizálást követően ?
2. Befolyásolja-e a szülés és az anyai viselkedésre való szenzitizálás az egerek kényszeres úszás tesztben mért aktivációját, azaz depresszió-szerű viselkedését?

2.6. Milyen hatással van az amylin hiánya az anyák, illetve a szenzitizált szűz nőstények viselkedésére?

1. Van-e szignifikáns eltérés a vad típusú és az amylin-hiányos egér anyák kondícionált helypreferenciájában?
2. Megváltozik-e amylin hiányában az egér anyák kényszeres úszás tesztben mért viselkedése?

3. MÓDSZEREK

3.1. Állatok

Az állatkísérletek megtervezése és kivitelezése a European Communities Council 2010. szeptember 22-i direktívája, valamint a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Bizottságának Állatvédelmi Szabályzata és az ÁNTSZ 3453/003/2009. számú engedélye szerint történt.

Az állatokat - patkányokat és egereket külön állatházi helyiségben – egyesével, standard állatházi körülmények között, temperált hőmérsékleten (patkányok: 20-21 ºC; egerek: 23 ºC), 65%-os páratartalom mellett tartottuk 12 órás fény-sötét ciklusban. Az éheztetésben részt vevő patkányok kivételével az állatok a vízhez és táphoz szabadon hozzáfértek (*ad libitum*). Az állatokat a műtéteket, perfúziókat és a disszekciót megelőzően testsúlyukra vonatkoztatott mennyiségű, intramuszkulárisan injektált ketamin és xylazin (66mg/kg ketamin, 13 mg/kg xylazin) elegyével altattuk.

A felnőtt nőstény állatok 3 kísérleti csoportba (kontroll nőstény, laktáló anya, szenzitizált nőstény) való kiválasztása véletlenszerűen történt. A kontroll nőstény csoport tagjai szűz, még nem szült, ún. nullipara állatok voltak, melyek a kísérlet során kölykökkel egyáltalán nem érintkeztek. A laktáló anyák csoportjának tagjai a pároztatás első napját követő 14. napon külön ketrecbe kerültek, vemhességüket és szülésüket naponta ellenőriztük. A szülés napját nulladik postpartum (PP0) napnak tekintettük. A kölykök számát a szülést követő 2 napon belül patkány anyák esetén 10-re, míg egér anyák esetén 5-7-re redukáltuk. Azok a laktáló anya állatok (egér, patkány), melyek kölykeit az anyai viselkedésre való szenzitizálás során használtuk (patkányok esetén 3, egerek esetén 4 darab), a kísérletek más részeiben nem vettek részt.

1. <u>Patkányok</u>

Patkányokkal végzett kísérleteinket összesen 79 felnőtt nőstény *Wistar* patkánnyal végeztük (260-340 gr; Charles Rivers Laboratories, Budapest, Hungary). Az állatok leölésükkor minden esetben 90-120 naposak voltak. Három anya patkányt a kísérletből kizártunk, mivel 6-nál kevesebb kölyköt szült, illetve kölykeik elpusztultak.

2. <u>Egerek</u>

Kísérleteinkben C57/Bl6 törzsből származó, felnőtt, 90-110 napos, 25-30 grammos egereket használtunk. A vad típusú egerek (kontroll nőstény, laktáló anya,

szenzitizált nőstény) viselkedésbeli változásait leíró viselkedési tesztekben – melyek megelőzték az amylin viselkedésben betöltött szerepének vizsgálatát - összesen 52, míg az amylin gén hiányában bekövetkező változások vizsgálatánál 39 db vad típusú (IAPP +/+) és 44 db amylin gén-hiányos (amylin-knockout, amylin-KO, IAPP -/-) állatot használtunk. Az amylin-KO állatokat Thomas A. Lutz (Institute of Veterinary Physiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland) bocsátotta rendelkezésünkre.

Az egerek tenyésztése

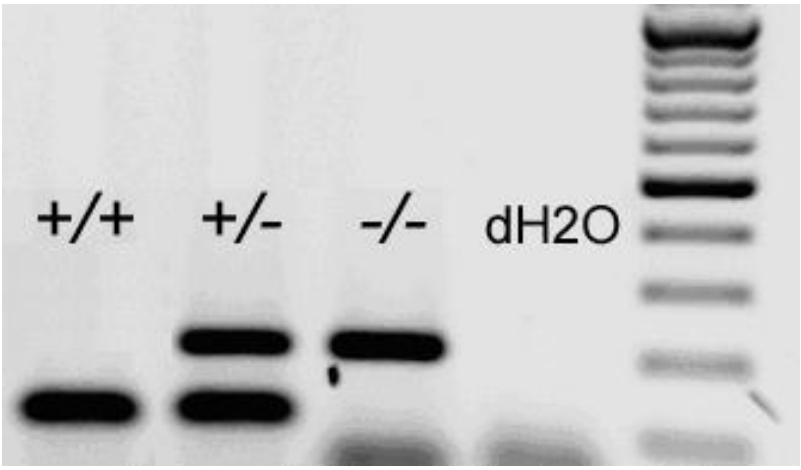
Az egerek tenyésztését a beltenyésztés szabályai szerint 8-10 hetes állatok sorozatos testvér-testvér, gyermek-szülő pároztatással végeztük. Az állatok egyedi azonosítószámai a ketrecszámokból és a lábujjvágás mintázatából származtak. A 8-10 napos kölykökből 0,5 cm nagyságú farokmintákat vettünk, ezekből határoztuk meg az adott állat genotípusát. A farokmintákat azonnal, száraz jégen hűtött Eppendorf-csövekbe tettük, a mintákból végzett DNS-izolálásig azokat -20 ºC-on tároltuk.

Az egerek genotipizálása

A vágott farokmintákból a DNS-t fenol-kloroformos extrakció révén izoláltuk. A mintákat 500 µl lízispufferbe [összetétele: 0,5M etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 10% sodium-dodecil-szulfát (SDS), 1M Tris-HCl, 5M NaCl, 0,5 mg/ml proteináz-K] egy éjszakára 350 rpm sebességgel rázatva, 55 ºC hőmérsékletet tartó termosztáttal ellátott rázógépbe tettük. A minták fenol-kloroform-izoamil-alkoholos, majd sorozatos alkoholos kicsapása után a DNS fehér színű csapadékként jelent meg az Eppendorf-cső alján. Ezt a csapadékot végül 100 µl Tris-EDTA pufferben oldottuk fel, és egy éjszakán keresztül 55 ºC-on inkubáltuk. A minták DNS-tartalmát minden esetben spektrofotométerrel (NanoDrop ND-2000, Thermo Scientific, Wien, Austria) ellenőriztük.

A kapott DNS-oldatokból, melyek a RT-PCR során templátként szolgáltak, 2 primer pár felhasználásával állapítottuk meg az egerek genotípusát. Az iTaq DNS polimeráz enzimmel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) végzett PCR reakció lépései a következők voltak: 95 ºC-on 3 min, 95 ºC-on 30 sec, 60 ºC 30 sec, és 72 ºC-on 1 min, az utóbbi két lépés ismétlése 32-szer, 72 ºC 10 min. Az amylin gént meghatározó két, ellentétes orientációjú [forward, F (5'GTA GCA ACC CTC AGA TGG AC3'; reverse, R (5'GAG GAC TGC ACC AAG GTT GT3'); Microsynth, Switzerland] primer párja – amennyiben a minta tartalmazta az amylin gént – 300 bárzispárnál (bp),

míg az amylin gén helyére beültett ún. kazetta [primer párjai: forward, F (5'CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC3'; reverse, R (5'CAC AGC TGC GCA AGG AAC3');); Microsynth, Switzerland] 200 bp nagyságnál adott jelet a PCR-termék 1,2%-os agaróz gélen való megfuttatását követően. A minták méretének meghatározásához a futtatás során HyperLadder™ II létrát (Bioline, London, UK) használtunk. Amennyiben az adott állatból származó minta esetén csak 300 bp-nál, úgy vad típusú homozigóta (IAPP+/+), ha csak 200 bp-nál, abban az esetben amylinre nézve KO (IAPP-/-), míg ha 200 és 300 bp-nál is kaptunk PCR-terméket, úgy az állat heterozigóta (IAPP+/-) genotípusú volt (8. ábra).



8. ábra. Vad típusú, heterozigóta és amylin gén -hiányos állatok gélfotója

A farokmintából történő DNS-izolálást követő PCR során kapott termékeket agaróz gélen megfuttattuk. A kapott termékek alapján az állat genotípusa a következők szerint volt meghatározható: PCR-termék csak 300 bp hosszúságnál jelent meg, az állat tartalmazta az amylin gént, de az amylin gén helyére beültetett ún. kazettát nem, így vad típusú (IAPP+/+, az ábrán: +/+) volt; a 300 bp nagyságú termék mellett 200 bp méretben is megjelent egy termék, az állat mind az amylint, mind pedig génjének helyére inszertált kazettát is tartalmazta, így heterozigóta (IAPP+/-, az ábrán: +/-) volt; csak 200 bp nagyságú terméket kaptunk, az állat amylin génnel nem, csak a helyére illesztett kazettával rendelkezett, tehát amylinre nézve KO (IAPP-/-, az ábrán: -/-) volt. A kép jobb oldalán látható DNS-létra segítségével tudtuk meghatározni a keletkező termékek bázispár méretét.

3.2. Petefészekirtás (Ovariectomia)

Altatást követően 16 db szűz (még nem szült, nullipara) nőstény patkányon és 8 db szűz, nullipara nőstény egéren kétoldali metszést ejtve a műtött állatok mindkét

oldali petefészkét eltávolítottuk (Waynforth és Flecknell 1992), ezután a hasfalat műtéti fonállal összeöltöttük, majd a bőrt sebkapoccsal zártuk. A műtött állatok az anyai viselkedésre való szenzitizálás megkezdése előtt két hétig lábadoztak, szenzitizálásukkor koruk a laktáló anyák korával volt megegyező.

3.3. Anyai viselkedés indukciója nem anya patkányokban és egerekben (anyai viselkedésre való szenzitizálás)

Patkányok esetén felnőtt szűz nőstények (nullipara) szenzitizálását kísérleti állatonként 3-3 darab, 3-14 napos kölyök folyamatos (24 órás) jelenlétével végeztük. A frissen szoptatott kölyköket naponta cseréltük, azokat a nőstény patkányok saját ketrecébe, azon belül is az általuk leginkább preferált hellyel szemben elszórtan helyeztük el (Fleming és Rosenblatt 1974). Egy, szenzitizálás alatt álló patkányt a kölykök kannibalizálása miatt a kísérletből kizártunk. Anyai viselkedésre szenzitizáltnak tekintettünk minden olyan nőstényt, amely a dobozban szétszórt kölyköket két egymást követő napon, 5 percen belül összegyűjtötte, majd azok fölé hajolt (crouching) és nyalogatta azokat. Az összesen 16 állatból 14 állat 4-8 napon belül teljesítette ezt a kitételt.

Felnőtt szűz nőstény (nullipara) egerek szenzitizálását a patkányokétól eltérően, az irodalomban leírt módon a következők szerint végeztük: a nőstény egerek ketrecébe 4 napon keresztül, napi 2-2 óra időtartamra 4 darab, 3-6 napos egérkölyköt helyeztünk (Stolzenberg és Rissman 2011). A szenzitizálás alatt álló egereket a szenzitizáció időtartamára (4 napon keresztüli, napi 2-2 óra) kék színű, oldalán fehér csíkkal jelölt, ún. kölyök-asszociált dobozba tettük, majd a napi szenzitizáció befejeztével az állatokat visszahelyeztük saját ketrecükbe, így ezen kísérleti csoport állatai csak az ún. kölyök-asszociált dobozban érintkezhettek a kölykökkel.

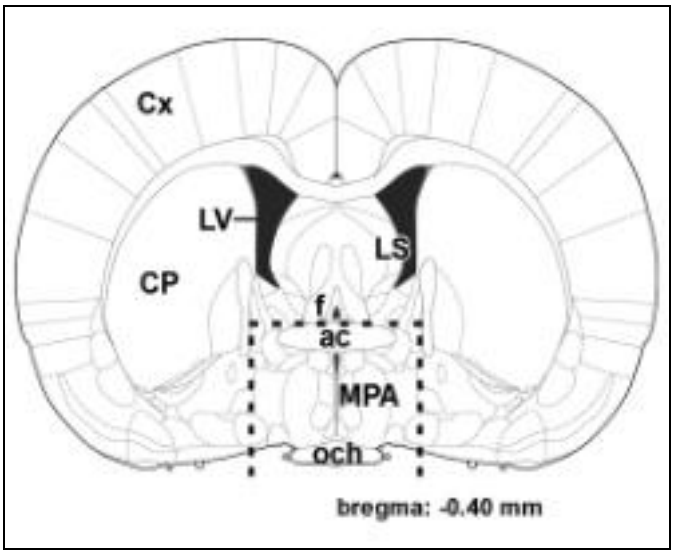
3.4. A c-fos aktiváció vizsgálata kölykök visszaadásának hatására anya patkányokban

A 8. és 9. postpartum napon anya patkányoktól (n=16) 20 órára elvettük a kölykeiket. A következő nap, 20 óra elteltével a 16 anyából csak 8 visszakapta kölykeit. Mind a 8 patkány, mely visszakapta a kölykeit, 10 percen belül megkezdte a kölykök szoptatását. Minden állat a kölykök elvételét követően 22 órával – 8 állat esetén a

kölykök visszaadásától számított 2 órával - leölésre került. Az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk, majd kivett agyukon c-fos és amylin kettős immunhisztokémiát, illetve c-fos immunhisztokémiával kombinált amylin *in situ* hibridizációs hisztokémiát végeztünk.

3.5. Patkány agyszövet mikrodisszekciója

Nyolc, anyai viselkedésre szenzitizált és nyolc, azonos korú nem-szenzitizált nullipara, továbbá nyolc, 48 órán keresztül éheztetett és nyolc, az éheztetett állatokkal azonos korú szűz nőstény agyát kivettük. Közvetlenül a látópálya kereszteződésétől rostrálisan és attól 2 mm-re caudálisan, valamint közvetlenül a commisura anterior fölött horizontálisan, illetve a középvonaltól mindkét irányban 2-2 mm-rel laterálisan ejtett metszésekkel olyan metszeteket kaptunk, amelyek a preopticus area mellett csupán néhány, a preopticus area közvetlen szomszédságában lévő területet (Broca-féle diagonális köteg, commisura anterior, chiasma opticum, ventral pallidum) tartalmaztak (9. ábra). A disszektált mintákat azonnal száraz jégre tettük, majd az RT-PCR elvégzéséig -80 ºC-on tároltuk.



9. ábra. Sematikus rajz a mikrodisszektált terület elhelyezkedéséről

A commisura anteriortól horizontálisan, a chiasma opticumtól rostrálisan és a középvonaltól 2-2 mm-re bilaterálisan fekvő preopticus areát a szaggatott vonal által határolt terület mutatja. A preopticus területet 8 szenzitizált és 8 nem-szenzitizált (kontroll), valamint 8 éheztetett és 8 (nem éheztetett kontroll) nőstényből disszektáltuk, majd az amylin mRNS mennyiségét RT-PCR-ral meghatároztuk.

3.6. Amylin mRNS-szint mérése valós idejű polimeráz láncreakcióval

A nyolc, anyai viselkedésre szenzitizált és nyolc, azonos korú nem-szenzitizált nullipara éheztetett nőstény preopticus területének mikrodisszektálása során kapott mintákból a teljes RNS-t TRIzol Reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével a forgalmazó által biztosított protokoll szerint izoláltuk. Az egyes mintákat, azok RNS mennyiségének 2 µg/µl koncentrációra való egységesítése után, DNase I (Invitrogen) termékkel amplifikáltuk, ebből Superscript II reverz transzkriptáz kit (Invitrogen) alkalmazásával cDNS-t készítettünk. Az így kapott cDNS tízszeres higítását követően mintegy 2,5 µl-nek megfelelő mennyiségű mintát templátként használtunk a valós idejű, SYBR Green festékkel jelölt (Sigma, St. Louis, MO, USA) PCR során. A PCR reakciót iTaq DNS polimeráz enzimmel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) végeztük mintánkénti 12,5 µl össztérfogatban a következő körülmények között: 95 ºC-on 3 percig, 35-ös ciklusszám mellett 95 ºC-on fél percig, 60 ºC-on fél percig és 72 ºC-on 1 percig. A reakció során belső kontrollként egy háztartási gént, a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, GAPDH) alkalmaztuk. A PCR során a primereket, az amylint [ACATGTGCCACACAACGTC (222-241 bp) és ACAAACACAGCAAGCACAGG (493-512 bp), GenBank NM_012586] és a GAPDH-t [TGCCACTCAGAAGACTGTGG (540-559 bp) és GTCCTGAGTGTAGCCCAGGA (812-831 bp) GenBank M17707] 300 nM koncentrációban használtuk. Az áttörési ciklusszámokat a koncentrációk logaritmusának függvényében ábrázolva egy kalibrációs görbét kaptunk, mely standard sor alapján a preopticus terület amylin és GAPDH cDNS mennyiségét számoltuk ki.

3.7. Amylin *in situ* hibridizációs hisztokémia

Az *in situ* hibridizációra használt próba készítését az irodalomban korábban már leírt módon végeztük (Dobolyi és Palkovits 2008). Az így kapott próba az amylint kódoló gén nagyfokú szekvencia homológiája (Nishi és mtsai 1989) miatt mind patkányok, mind egerek ISH hisztokémiájára alkalmas volt. Az amylin PCR termékét gélből tisztítottuk, majd TOPO TA klónozó vektorba (Invitrogen) inszertáltuk, és az erre kompetenssé tett baktériumba transzformáltuk. A transzformáláson átesett és így kiválasztásra került plazmidokat egy újabb PCR során templátként használtuk. A reakcióban olyan, amylin génre specifikus primer párokat alkalmaztunk, amelyek egy, a

T7 RNS polimeráz számára alkalmas felismerő hellyel rendelkeztek. Végül a kapott cDNS mintákat szekvencia-analízis révén ellenőriztük.

Minden kísérleti csoportból – 1. csoport: vemhes patkány nőstények a vemhesség 21. napján; 2. csoport: anya patkányok a szülést követő 1. (PP1), 9. (PP9), 23. (PP23) napon; 3. csoport: ovariectomian átesett nőstény patkányok; 4. csoport: ovariectomizált és szenzitizált nőstény patkányok; 4. csoport: az előbbi csoportokkal azonos korú, nullipara ún. kontroll nőstény patkányok; 5. csoport: PP9 egér anyák; 6. csoport: PTH2R KO anyák - 3-3 állat agyát eltávolítottuk, azokat azonnal száraz jégre tettünk. Az irodalomban leírt módon (Dobolyi és mtsai 2002) kriosztát (Leica CM3050 S, Leica, Wetzlar, Germany) segítségével olyan coronális, 12 µm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk, melyek közül a legcraniálisabbak és legcaudálisabbak a bregma szintjétől 3,0-3,0 mm-re voltak, tehát a preopticus areat teljes egészben tartalmazták. A metszeteket pozitívan töltött tárgylemezekre (Superfrost Plus, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA) vettük fel, száradás után további felhasználásukig -80 ºC-on tároltuk. Az antiszensz [^{35}S] izotóppal jelölt uridin-trifoszfátot (UTP) T7 RNS-polimerázt tartalmazó MAXIscript trasnzkripciós kit (Ambio, Austin, TX, USA) felhasználásával állítottuk elő. Az így elkészült próbákat a hibridizáció során olyan hígításban vittük fel a metszetekre, hogy a beütésszám percenként 1 millió legyen. Az amylin mRNS-indukciójának vizsgálatára patkányok esetén minden 18., egerek esetén minden 9. egymástól 216, illetve 108 µm távolságban lévő metszetet hibridizáltunk a jelölt amylin próbákkal. A hibridizációt és mosásokat követően a lemezeket Kodak folyékony emulzióba mártottuk (Eastman Kodak, Rochester, NY), majd az emulziót a három hetes inkubációs idő letelte után Kodak Dektol termékkel előhívtuk és Kodak fixálószerrel fixáltuk, ezután Giemsa festékkel háttérfestettük, végül Cytoseal 60 (Stephens Scientific, Riverdale, NJ, USA) termékkel lefedtük. A metszeteket digitális kamerával felszerelt Olympus BX60 (Olympus, Tokyo, Japan) mikroszkóppal értékeltük ki, sötét- és világos látótér funkciókban.

Az *in situ* hibridizációval nyert adatok kvantitatív analízisét a következők szerint végeztük: az amylin mRNS-t expresszáló neuronok – detektálhatósági határuk > 9 autoradiográfiás szemcse, ami a háttérként jelentkező szemcseszám háromszorosa – a három, egymást követő, egymástól patkányok esetén 216 µm, egerek esetén 108 µm távolságra lévő coronális metszeteken jól felismerhetőek voltak. Az amylin mRNS-t

expresszáló idegsejtek számát mind a vemhesség 21. napjában lévő nőstények, mind a szülést követő 1., 9. és 23. napon lévő patkány anyák, illetve PTH2R KO egér anyák esetében meghatároztuk. Ezen felül az autoradiográfiás szemcseszámot, ami megegyezik az egy sejtre vetített mRNS számával, a patkány kísérleti csoportok 3-3 egyedénél random módon kiválasztott 20-20 amylin mRNS-t expresszáló neuronnál, valamint a PTH2R KO egér anyák esetén az összes amylin mRNS-t expresszáló sejtnél külön is megszámoltuk. Mind az amylin mRNS-t kifejező sejtek számát, mind pedig az egy sejten belül található mRNS-mennyiségét - ami az egy sejten belül található autoradiográfiás szemcseszámnak felelt meg - meghatároztuk.

3.8. X-Gal hisztokémia

A PTH2R promóterrel hajtott β-galaktozidáz lehetővé tette a PTH2R megjelenítését X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) szubsztrát (kat.szám: 12757072, Fermentas, Fisher Scientific UK Ltd , Loughborough , UK) tartalmú festőoldattal való kezelést követően (Dobolyi és mtsai 2006, Dobolyi és mtsai 2002, Faber és mtsai 2007). X-Gal festőoldat készítése során a következő anyagokat PB-ben mértük össze 1 mg/ml végkoncentrációra vonatkozóan: 5 mM kálium-ferricianid, 5 mM kálium-ferrocianid, 20%-os X-Gal, 2 mM magnézium-klorid. A szöveteket az így összeállított festőoldatban egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A metszeteket DPX médiummal (Sigma, St. Louis, MO, USA) történő fedésük után Olympus BX 60 (Olympus, Tokyo, Japan) fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

3.9. Immunhisztokémia

A patkányokat (n=31) mélyaltatást követően 150 ml fiziológiás sóoldattal, majd 300 ml 4%-os, foszfát-pufferben oldott (phosphate buffer, PB; pH 7.4) paraformaldehid oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyakat és néhány esetben [két laktáló anya és két, kölykeitől 22 órára megfosztott (kölykeit vissza nem kapó) anya] a hasnyálmirigyeket egy napon keresztül 4%-os paraformaldehidben utófixáltuk, majd PB-ben oldott 20%-os cukoroldatban 2 napon keresztül krioprotekciót végeztünk. Az agyakból fagyasztó mikrotóm (Leica SM 2000 R, Wetzlar, Germany) segítségével a bregma szintjétől 3 mm-re craniális és caudális irányban meghatározott távolságok

között, 50 µm vastagságú, szabadon úszó, coronális sorozatmetszeteket, míg pancreas esetén kriosztáttal (Leica) 20 µm vastagságú, tárgylemezre (Superfrost Plus, Fischer Scientific) felvett metszeteket készítettünk. A szabadon úszó metszeteket felhasználásig 0,05%-os, Na-azidot tartalmazó foszfát pufferben 4°C-on, míg a tárgylemezre felvett mintákat -80 ºC-on tároltuk.

1. Amylin immunhisztokémia

Három elsőszülő (primipara) laktáló anya, három a vemhesség 21. napjában lévő; 3 szenzitizált; 2, kölykökkel érintkezett, de nem szenzitizálódott és 3 kontroll, nullipara nőstény szabadon úszó, 50 µm vastagságú agymetszetein, valamint 2 laktáló anya és 2, kölykeitől megfosztott anya tárgylemezre vitt pancreas szöveteit anti-amylin antiszérummal [rabbit anti-amylin (rat), katalógusszám: T-4146.0050; Bachem, Bubendorf, Svájc] immunhisztokémiai festést végeztünk. A metszeteket első lépésben antigénfeltárás céljából 1 h-ra 0,5 %-os Triton X-100-ba, majd a nem specifikus antigének lekötésére 3%-os szarvasmarha szérum albuminba (bovine serum albumin, BSA) tettük. Az így előkészített szöveteket amylin ellen termelt antiszérumban 1:5000 higításban 2 napon keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A két napos, antiszérummal való inkubációt követően a metszeteket biotinnal konjugált, kecskében termeltetett, nyúl ellenes másodlagos antitesttel (1:1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) egy órán, majd avidin-biotin peroxidáz komplex reagenssel (avodin-biotin peroxidase complex, ABC, 1:500, Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories) további egy órán keresztül kezeltük, eztután 0,05 M-os TRIS pufferben (pH 7,8) mostuk. A peroxidáz reakció kimutatásához a metszeteket szobahőmérsékleten 3 percre hívóoldatba helyeztük, amely 0,3 mg/ml 3,3'- diaminobenzidint (DAB), 1 mg/ml nikkel-ammónium-szulfátot és 15 µl 30%-os H_2O_2-t tartalmazott 0,05 M-os TRIS-ben oldva. A megfestett metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk, egy napos szobahőn való szárítást követően DPX médiummal (Sigma) lefedtük. A metszetek egy részén fluoreszcein-izotiocianát (FITC)-tiramid amplifikációs immunfluoreszcens festést használtunk DAB helyett. Ezekben az esetekben az ABC oldatban történt inkubációt követően a metszeteket 1:8000-szeres hígítású FITC-tiramidot és 0,003% hidrogén-peroxidot tartalmazó TRIS pufferbe (0,1 M, pH 8,0) helyeztük 8 percre. Mosást követően a metszeteket a fluoreszcencia halványodását gátló médiummal (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) fedtük le és sötét helyen

tároltuk. A pancreasból készített metszeteket ezen felül a sejtmagok háttérfestését adó DAPI-val (4',6-diamidino-2-phenylindol) is megfestettük.

Az amylin antiszérum specificitását az *in situ* hibridizáció során nyert eredményekkel ellenőriztük: laktáló anyák ISH hisztokémiája során kimutatott amylin mRNS-t expresszáló neuronok preopticus területen belüli eloszlása megegyezett az anyák immunfestése során nyert adatokkal, továbbá kontroll nőstényekben az ISH hisztokémia eredményeivel megegyező módon jelölődés nem következett be a preopticus területen. Az amylin antitest specificitását tovább erősítette az a tény, hogy az immunfestést megelőzően nyúlellenes CGRP antiszérumot (szintetikus Tyr-CGRP ellen termelt, 23-37, katalóguszám: 1720-9007; Biogenesis, Kingston, NH, USA) használva, ezzel az amylint maszkírozva, festődést a laktáló anya állatok esetén sem tapasztaltunk az általunk vizsgált területen.

2. c-fos immunhisztokémia

Minden negyedik szabadon úszó metszeten kísérleti csoportonként (a 8. és 9. postpartum napon kölykeiktől 20 órára megfosztott, majd 2 órára kölykeiket visszakapó anya patkányok; illetve PP8 és PP9 napon kölykeiktől 22 h-ra megfosztott, de kölykeiket vissza nem kapó anya állatok) 5-5 állatból az amylin immunfestés metodikáját követve, a preopticus területen bekövetkező neuronális aktivációt vizsgálva c-fos immunhisztokémiát végeztünk, mely esetben nyúlban termelt Fos-ellenes elsődleges antiszérummal (1:20 000 higítás, kat.szám: sc-52; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA) egy nap szobahőn inkubáltuk a metszeteket.

Amylin és c-fos kettős immunfestése során minden negyedik szabadon úszó metszetet, a fent említett kísérleti csoportok (kölykeiktől megfosztott, majd azokat visszakapó anyák és kölykeitől 22 h-ra megvont anyák) 5-5 állatából, először anti-amylin elsődleges antiszérummal kezeltünk, majd a jelet FITC-tiramid amplifikációt követően tettük láthatóvá. Ezt követően a metszeteket anti-Fos elsődleges antiszérumban (1:10000) egy napig szobahőn inkubáltuk. A metszeteket a második elsődleges antiszérummal (c-fos) történt inkubációt követően 2 órán keresztül Alexa 594 szamárban termeltetett, nyúl ellenes másodlagos fluoreszcens antitesttel (1:500, Molecular Probes) kezeltük, majd PB-ben többször alaposan átmostuk, tárgylemezre húztuk és a fluoreszcencia halványodását gátló médiummal (Molecular Probes) fedtük.

3. c-fos immunreaktivitás és amylin mRNS kettős jelölése

A perfundált és 20%-os cukoroldatban krioprotekción átesett, kölykeiket 20 óra megvonás után visszakapó anya patkányok fagyasztott agyaiból kriosztát (Leica) segítségével 20 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A tárgylemezre felvett metszeteken a fent leírt módon (ld: „Amylin *in situ* hibridizációs (ISH) hisztokémia”) amylin *in situ* hibridizációt végeztünk. Ezt követően, de még a tárgylemezek autoradiográfiás emulzióba való bemártását megelőzően c-fos immunfestés következett. Az immunfestést az előző pontban („c-fos immunhisztokémia”) leírt módon végeztük azzal az egyetlen különbséggel, hogy ebben az esetben a c-fos antiszérum (Santa Cruz Biotechnology) higítása 1:7000 volt. Az immunfestést DAB reakció révén tettünk láthatóvá, majd a lemezek kezelését a „Amylin *in situ* hibridizációs hisztokémia” pontban leírtak szerint (emulzióba mártás, előhívás, fixálás) fejeztük be.

4. Amylin és c-fos kettős fluoreszcens festés elemzése

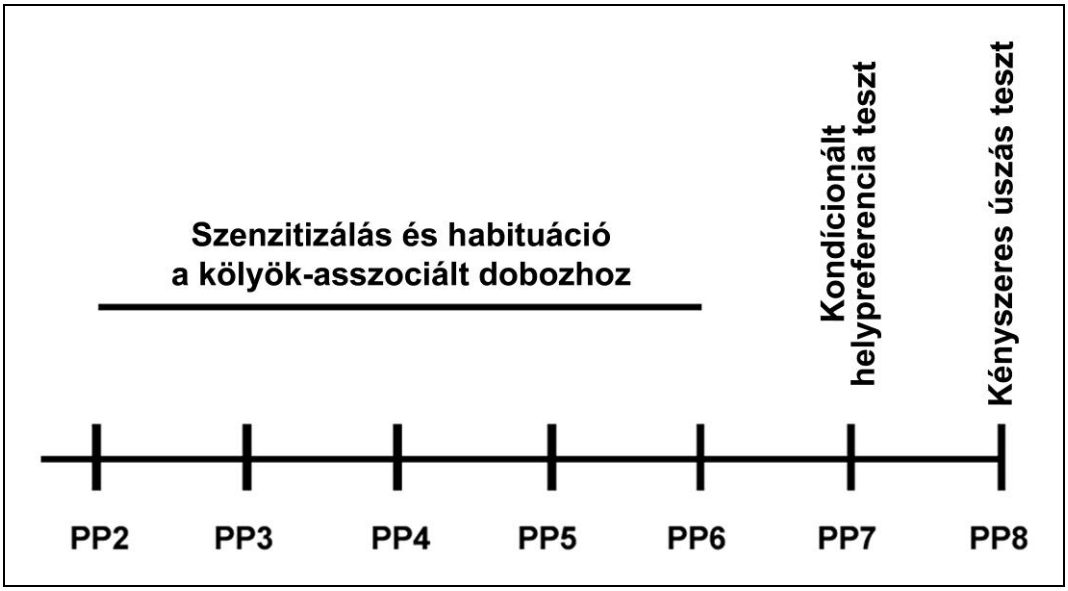
Agyanként tipikusan 3 metszeten az amylin-immunreaktív neuronok mellett az amylinnel és c-fos-szal kettősen jelölődött sejteket az MPN, az MPA és a BNSTv területén a zöld és vörös fluoreszcencia detektálására alkalmas epifluoreszcens kondenzorral (Olympus, Tokyo, Japan) ellátott Olympus BX60 fénymikroszkóp (Olympus) segítségével megszámoltuk.

3.10. Hisztológiai analízis

A metszetek kiértékeléséhez epifluoreszcens és sötétlátóteres kondenzorral ellátott Olympus BX60 (Olmypus) fénymikroszkópot használtunk. A felvételek 2048x2048 pixeles felbontásban SPOT Xplorer digitális CCD kamerával (Diagnostic Instruments, Sterling 44 Heights, MI) készültek. A konfokális felvételeket Bio Radiance 2100 Laser Scanning System-mel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) rendelkező Nikon Eclipse E800 (Nikon, Tokyo, Japan) konfokális mikroszkóppal készítettük. A felvételek kontrasztját és élességét Adobe Photoshop CS 8.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) program segítségével javítottuk. A képeket végül 300 dpi felbontásban készítettük el.

3.11. A szülést és szenzitizálást követő viselkedésbeli változások mérésére, egereken használt magatartási tesztek

Minden viselkedési tesztet nappal, a 12 órás fény-sötét ciklus fény szakaszában végeztünk. Az egyes tesztekre, mindhárom kísérleti csoport esetén [kontroll nőstény (vad típusú egér: n=13; IAPP+/+: n=14; IAPP-/-: n=18); laktáló anya (vad típusú egér: n=16; IAPP+/+: n=17; IAPP-/-: n=18); szenzitizált nőstény (vad típusú egér: n=7; IAPP+/+: n=8; IAPP-/-: n=8)] ugyanazon a napon, de az állatok sorrendjét tekintve random módon került sor (10. ábra). Az állatokat a kísérleti szobához való habituáció céljából a kísérletek megkezdése előtt legalább 24 órával a kísérleti szobában helyeztük el.



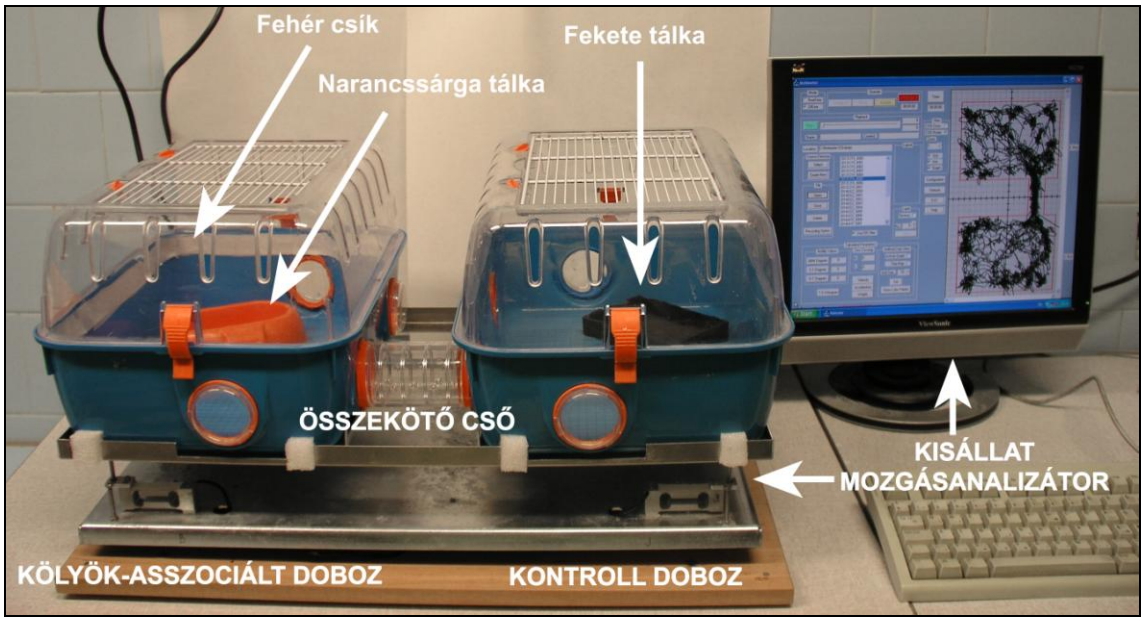
10. ábra. A szenzitizálás, a habituáció és a viselkedési tesztek időbeli sorrendje

Az anyai magatartásra való szenzitizálás idejére (4 napon keresztül, napi 2-2 órára) 4 darab 2-6 napos kölyökkel együtt a nullipara nőstényeket (narancssárga tálkával és belül fehér csíkkal jelölt) kék dobozba tettük (szenzitizálás és habituáció a kölyök-asszociált dobozhoz). A napi 2-2 órás szenzitizálási idő leteltével a nőstényeket saját ketrecükbe, míg a kölyköket saját anyukhoz tettük vissza. A laktáló egér anyákat a szülést követő 2-6 napokon, tehát szintén négy napra kölykeikkel együtt a jelölt kék dobozba tettük (habituáció a kölyök-asszociált dobozhoz). A szenzitizálás és habituáció befejeztét követő napon, amely megfelelt a 7. postpartum napnak, kondícionált helypreferencia tesztet végeztünk, melyet a 8. postpartum napon kényszeres úszás teszt követett. PP: postpartum nap.

1. Kondícionált helypreferencia teszt (Conditioned Place Preference, CPP)

Az irodalomban korábban már leírt kondícionált helypreferencia teszt patkányok anyai motivációjának vizsgálatára alkalmas módosítását végeztük el (Cservenak és mtsai 2013). A szülést követő 2. napon (PP2) az egér anyákat kölykeikkel együtt standard állatházi ketreceikből egy narancssárga, lekerekített szélű tálkával és fehér csíkkal jelölt, kék színű dobozba tettük a 4 napon keresztül tartó habituáció idejére (10. ábra). Az anyai viselkedésre szenzitizált nőstény egereket csak a 4 napon keresztül tartó, napi 2-2 óra időtartamú, 4 kölyök jelenlétében folytatott szenzitizálás idejére helyeztük a fent említett, jelölt kék dobozba. A teszt megkezdése előtt az anya állatoktól a kölykeiket 10 percre elvettük. A kondícionált helypreferencia teszt elvégzésére alkalmas készülék két kék dobozból (lekerekített szélű, narancssárga tálkával és fehér csíkkal jelölt, kék doboz; fekete szögletes tálkával, de fehér csíkkal nem jelölt kék doboz), illetve egy azokat összekötő átlátszó csőből állt (11. ábra). Az összekötő cső mérete – 20 cm hossz, 12 cm átmérő - megengedte az állatok szabad mozgását, így azok dobozok közötti választását a teszt időtartama alatt. A berendezés mindhárom térfele azonos megvilágítású volt. A berendezést, az összekötött dobozokat az összekötő csővel együtt, minden állat vizsgálata után 96%-os alkohollal megtisztítottuk. A szenzitizálás és habituáció alatt alkalmazott, narancssárga tálkával és fehér csíkkel jelölt kék doboz teljes mértékben megfelelt a tesztben használt, ugyanilyen módon jelölt kék doboznak. Mivel a laktáló anya és szenzitizált állatok ebben a dobozban kölykökkel együtt tartózkodtak a tesztet megelőző szenzitizáció és habituáció alkalmával, ezért ezt a dobozt ún. kölyök-asszociált doboznak tekintettük. A másik, más formájú (szögletes) fekete tálkát tartalmazó, de fehér csíkkal nem jelölt kék doboz ismeretlen volt az állatok számára, ez ún. kontroll dobozként szerepelt a kísérletben. A laktáló anya állatok és szenzitizált nullipara nőstények mellett a tesztet nem-szenzitizált (kölykökkel nem érintkezett), ún. kontroll nőstényekkel is elvégeztük. A kontroll nőstények tesztet megelőző, jelölt, kék dobozhoz való habituációja az anya állatokéhoz hasonló módon zajlott: a kontroll állatokat kölykök nélkül (!), a tesztet megelőzően 4 napra a jelölt, kék dobozba helyeztük, így a kölyök-asszociáltként definiált doboz számukra sem volt ismeretlen. Az összes kísérleti csoport (kontroll nőstény, laktáló anya, szenzitizált nőstény) minden állatát a teszt megkezdésekor a számukra ismeretlen, kontroll dobozba helyeztük, így elkerülvén azt, hogy az állatok az ismert környezetből (kölyök-asszociált

dobozból) nem, vagy nehezebben mozdulnak el. A teszt időtartama 60 perc volt, ezalatt az egyes kompartmentekben (2 kék doboz, összekötő cső) töltött időt mind manuálisan, mind az ún. Kisállat Mozgáskoordinátor (Small Laboratory Animals Tracking Equipment, SLATE, Med-Eval Ltd., Budapest, Hungary) segítségével rögzítettük. A tesztet végző állat helyzetét egy, a kísérleti berendezés alatt található tálca négy sarkába épített mechanikai szenzor érzékelte. A program a szenzor által érzékelt adatok alapján számolta ki az egyes térfeleken töltött idő százalékát. A kísérletet manuálisan is kiértékeltük. A szenzor és program (SLATE) által felvett és számolt adatok a manuálisan feljegyzett és kalkulált eredményektől nem különböztek.



11. ábra. Kondícionált helypreferencia vizsgálatára használt készülék

Két, különböző módon jelölt (narancssárga, lekerekített szélű tálka és fehér csík; fekete, szögletes tálka) kék dobozt kötöttünk össze egy átlátszó csővel, melyen keresztül az állatok a kísérlet időtartama alatt szabadon mozoghattak. Az állatok helyzetét mechanikai szenzor érzékelte, és az automatikusan rögzített adatokból a program kiszámolta, hogy melyik térfélen mennyi időt töltöttek az egerek.

2. <u>Kényszeres úszás teszt (Forced Swim Test, FST)</u>

A kísérlet 8. napján (10. ábra), ami megegyezett a kísérletben részt vevő laktáló anyák 8. postpartum napjával (PP8), a kontroll, szenzitizált és anya egereket egy kerek, 13 cm magas, 24 ºC hőmérsékletű vizet tartalmazó, 14 cm átmérőjű, 19 cm magas, kör

alakú üvegedénybe helyeztük. A kísérleti állatokat 6 percre a vízbe tettük, mozgásukat videofelvételen rögzítettük. A teszt befejeztével az állatokat törölközővel megtöröltük. további 20 percre melegítő lámpa alá helyeztük, majd saját dobozukba visszatettük. A vizet minden állat után cseréltük.

Az úszást és a függőleges irányú, mellső mancsokkal a vízfelszínt áttörő kapálózást („küzdés") aktív viselkedésnek tekintettünk, míg a lebegés passzív magatartásforma volt. Az állatok lebegése csak az egyensúlyozás és a vízen való lebegés fenntartására végzett legszükségesebb mozgásokat jelentette (Fodor és mtsai 2012). Az aktív és passzív viselkedéssel töltött idő teljes időhöz (6 perc) viszonyított százalékát számoltuk.

3.12. Statisztika

Az RT-PCR statisztikai kiértékelése során Prism 5 program (GrahPad Software, Inc., La Jolla, Ca, USA) segítségével Student's t tesztet végeztünk.

Az *in situ* hibridizációval nyert adatok kvantitatív analízise során a négy kísérleti csoport (vemhesség 21. napja, PP1, PP9, PP23) eredményeit, azaz mind az amylin mRNS-t expresszáló neuronok számát, mind pedig az egy sejten belül található autoradiográfiás szemcseszámot egyutas variancia-analízissel hasonlítottuk össze, majd az így nyert adatokon Tukey-féle post hoc tesztet végeztük.

A viselkedési tesztek (CPP, FST) kiértékelése során minden adatot középértek szórással [±, standard error of the mean] ábrázoltunk és Prism 5 program segítségével értékeltünk ki. Kondícionált helypreferencia teszt esetén az állatcsoportok (kontroll nőstény, laktáló anya, szenzitizált nőstény) különböző térfeleken (kölyök-associált és kontroll doboz, összekötő cső) töltött idő százalékát kétutas variancia-analízissel állapítottuk meg, ahol az egyik faktor az egyes állatcsoportok, míg a másik az egyes térfeleken töltött idő volt. A különböző állatcsoportok kényszeres úszás tesztben aktív, illetve passzív viselkedéssel töltött idejét egyutas variancia-analízissel határoztuk meg. Az ANOVA elvégzése után Bonferroni-féle post hoc teszttel vizsgáltuk a kísérleti csoportok közötti különbségeket.

A statisztikai kiértékelések során kapott $P < 0,05$ értéket minden esetben szignifikánsnak tekintettük.

DOI:10.14753/SE.2016.1942

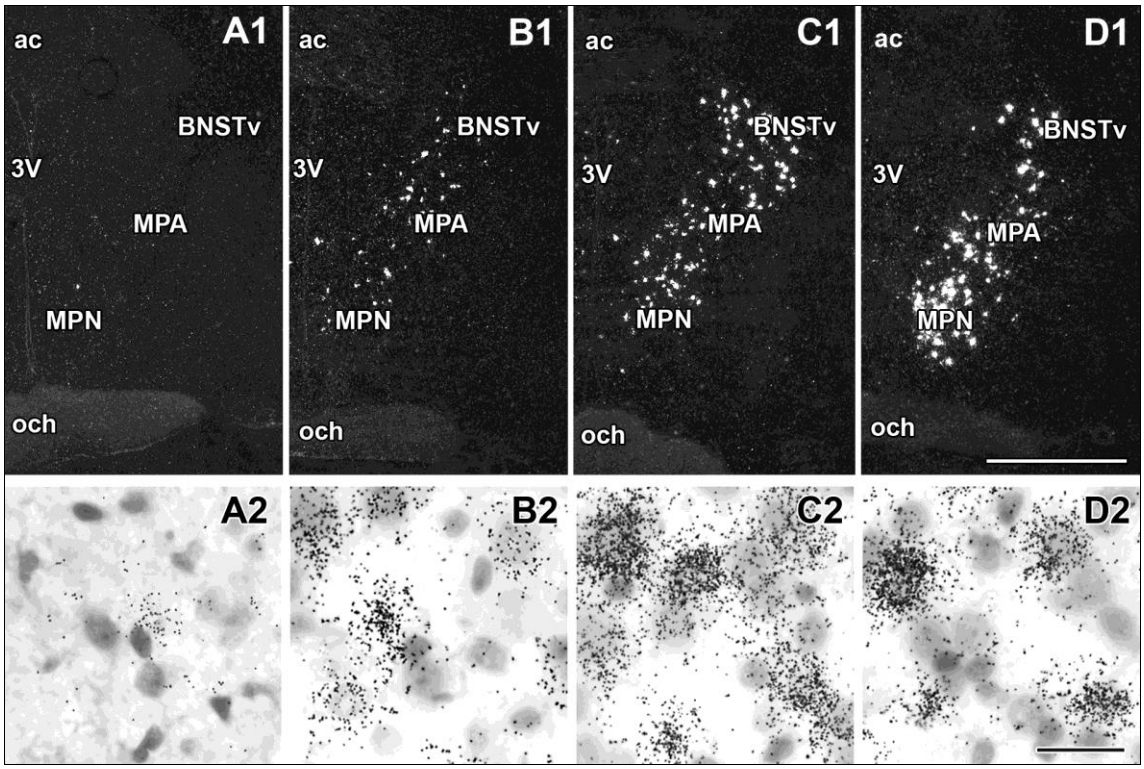
4. EREDMÉNYEK

4.1. Az amylin-indukció időbeli lefolyásának és eloszlásának meghatározása patkányokban és egerekben

4.1.1. Amylin mRNS expresszió a szülés körüli (peripartum) és a szülés utáni (postpartum) időszakban patkányok központi idegrendszerében

Az amylin mRNS nagyon alacsony szintje volt kimutatható közvetlenül a szülést megelőzően, a vemhesség 21. napján (12A. ábra). A preopticus terület amylin mRNS-t expresszáló sejteinek oldalankénti száma átlagosan 5,3 ± 1,0, míg az egyes sejtek átlagos autoradiográfiás szemcseszáma 30,8 ± 5,2 volt (13A. ábra). Ebben az esetben az amylin mRNS jel intenzitása a szűz nőstényekben korábban leírt adatokkal (Dobolyi 2009) megegyező volt. A szülést követően, mind az amylin mRNS-t expresszáló neuronok számában (F=60,86), mind pedig az egy sejtre jutó átlagos szemcseszámban (F=44,82) szignifikáns emelkedés mutatkozott. Már a szülés utáni 1. napon (1. postpartum nap, PP1) amylin mRNS-t expresszáló sejtek jelentős száma [(81,3 ± 8.7)/oldal] volt kimutatható (12B. és 13A. ábra). A jelölt sejtek autoradiográfiás jel intenzitása is megemelkedett (66,5 ± 5,3 szemcse/sejt). A szülést követő 9. és 23. napon az amylin expressziója további emelkedést mutatott (12. és 13. ábra). Az amylint expresszáló neuronok száma PP9 és PP23 esetén 120 ± 9,5, illetve 108 ± 3,3 három, egymás után következő sorozatmetszeten a középvonaltól laterálisan 1-1 oldalon. Az átlagos, azaz egy, amylint expresszáló idegsejtre vonatkoztatott szemcseszám 105,6 ± 5,3 (PP9) és 102,1 ± 7,3 (PP23) (13B. ábra). A megnövekedett amylin expresszió csak a már korábban (PP1 anyák esetén) is leírt területeken volt megfigyelhető, azaz a commissura anterior magasságában az MPN, MPA, valamint a BNSTv területén. Az amylin-neuronok ezeken a területeken nem képeztek önálló magokat, hanem elszórtan helyezkedtek el. A vizsgált preopticus területen (bregma +3 - -3; MPN, MPA egyes részei, BNSTv) kívül amylin expresszió nem volt megfigyelhető.

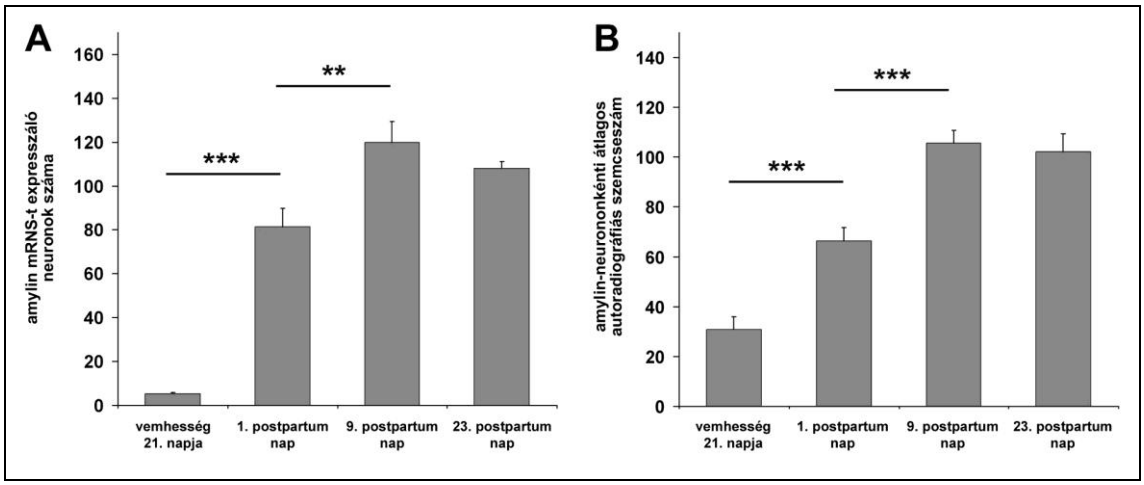
DOI:10.14753/SE.2016.1942



12. ábra. A radioaktív *in situ* hibridizációs hisztokémia amylin mRNS-t expresszáló idegsejtjeinek megjelenését mutatja a preopticus területen

A1-D1: Az amylin mRNS eloszlását láthatjuk a sötét látóterrel készített felvételeken, a fehér jel az amylin mRNS-t mutatja. Az amylin mRNS diffúz eloszlását láthatjuk a mediális preopticus mag (MPN), a mediális preopticus area MPN-tól dorsolaterálisan elhelyezkedő területein (MPA), és az ettől további dorsolaterális irányban található bed nucleus of the stria terminalis ventrális részében (BNSTv). A2-D2: Nagy nagyítású, világos látóteres felvételek az amylin mRNS-t expresszáló neuronok egyedi, autoradiográfiás szemcséit mutatják. Az amylin mRNS expressziója a szülés előtt közvetlenül, a vemhesség 21. napján (A) nagyon alacsony, majd PP1 napon megemelkedik (B), és a szülést követő időszakban (PP9, PP23) további emelkedést mutat. A felvételek (A-D) a bregma szinttől 0,24 mm-re caudálisan készültek. Lépték = 1 mm (A1-D1); 30 µm (A2-D2).

DOI:10.14753/SE.2016.1942



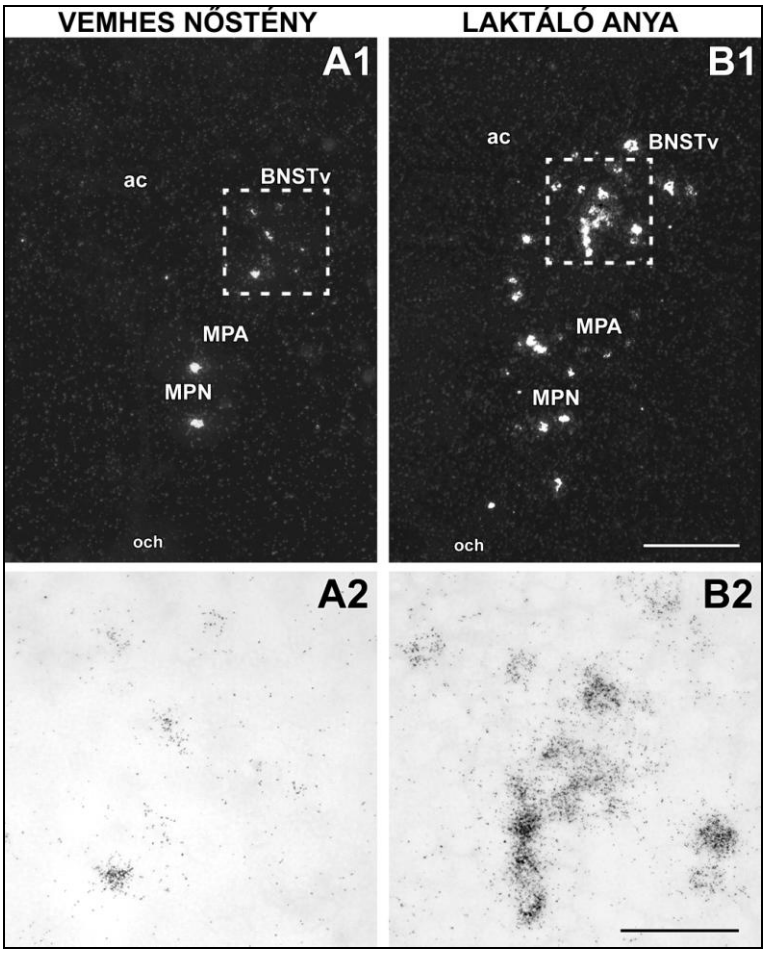
13. ábra. A radioaktív amylin *in situ* hibridizációs hisztokémia eredményeinek kvantitatív elemzése

A: Az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek száma 3, egymást követő, egymástól 216 µm távolságra lévő sorozatmetszeten unilaterálisan [n=6/kísérleti csoport (vemhesség 21. napja, PP1, PP9, PP23)]. A vemhesség 21. napja és az első postpartum nap között az amylin mRNS-t expresszáló neuronok számának emelkedésében szignifikáns különbség volt kimutatható a preopticus területen. További szignifikáns változás volt tapasztalható a 1. és a 9. postpartum nap között. B: Véletlenszerűen kiválasztott amylin mRNS-t expresszáló neuronok átlagos szemcseszáma (10 neuron/oldal). Az autoradiográfiás szemcseszámban szignifikáns növekedés volt tapasztalható mind a vemhesség 21. napja és az 1. postpartum nap, valamint az 1. postpartum nap és a 9. postpartum nap között (n=6/kísérleti csoport). **P < 0,01; *** P < 0,001.

4.1.2. Amylin indukciója egér anyákban

Az amylin mRNS expresszió nagyon alacsony szintje volt jellemző a szülést megelőzően egerek preopticus területén. Az expresszió mértéke, mind az amylin mRNS-t expreszáló neuronok, mind pedig azok átlagos szemcseszámát tekintve jelentősen megemelkedett a szülést követően. Az amylin mRNS expressziót mutató neuronok csak a mediális preopticus magban (MPN), a mediális preopticus mag MPN-tól dorsolaterálisan elhelyezkedő részeiben (MPA), valamint a bed nucleus of the stria terminalis ventrális részén (BNSTv) volt megfigyelhető (14. ábra). Az amylin mRNS-t expresszáló neuronok az MPN, MPA és BNSTv területén belül diffúzan helyezkedtek el, önálló magokba nem tömörültek.

DOI:10.14753/SE.2016.1942

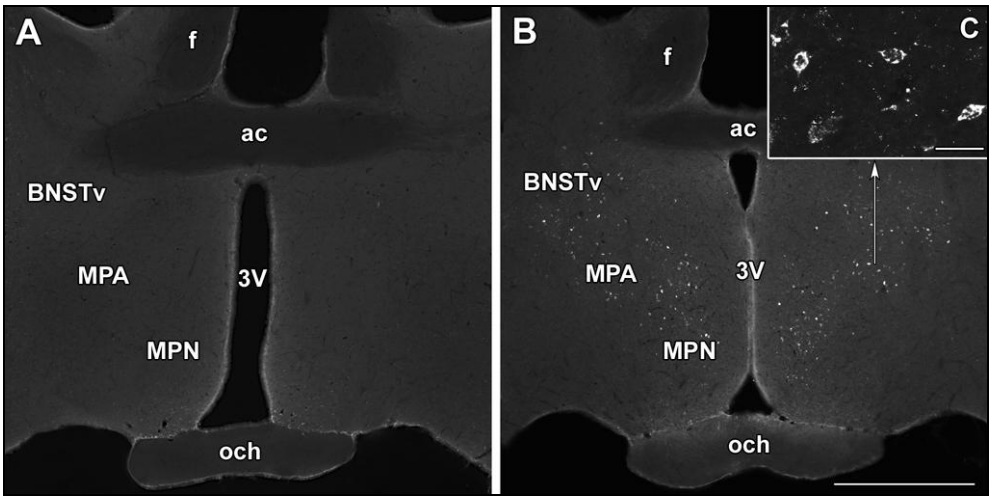


14. ábra. Radioaktív *in situ* hibridizációs hisztokémiával kimutatott amylin mRNS expresszió egerek preopticus területén

A1-B1: A sötét látótérrel készült felvételeken az amylin mRNS expresszió preopticus területen belüli eloszlása látható, a fehér jel az amylin mRNS-t mutatja. Amylin mRNS-t expresszáló neuronok csak a mediális preopticus magban (MPN), a mediális preopticus area egyes területein (MPA), valamint a bed nucleus of the stria terminals ventrális részén (BNSTv) diffúzan jelentek meg. A1: A vemhesség utolsó napján a preopticus területen belül amylin mRNS-t expresszáló sejtek nagyon kis mennyiségben vannak jelen. B1: A szülést követően, laktáló egér anyákban az amylin mRNS expresszió jelentősen megnő. A2-B2: Nagy nagyítású, világos látótérrel készített felvételeken az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek egyedi autoradiográfiás szemcseszámai láthatók. A2: Vemhesség idején a kevés számú amylin mRNS expressziót mutató idegsejt autoradiográfiás szemcseszáma is alacsony. B2: Laktáló anya állatokban az amylin mRNS autoradiográfiás szemcseszáma is jelentős emelkedést mutat. A felvételek (A-B) a bregma szintjétől 0,10 mm-re caudálisan elhelyezkedő metszetekről készültek. Lépték = 300 µm (A1-B1); 100 µm (A2-B2).

4.1.3. Amylin-immunreaktivitás anya patkányok preopticus területén

Amylin-immunreaktivitás a vemhesség utolsó, 21. napján a preopticus területen még nem jelent meg (15A. ábra). Ezzel ellentétben a szülést követő 9. napon az amylin-pozitív neuronok nagy számban (96,0 ± 33,2 /metszet; 3, egymást követő sorozatmetszet; n=5 agy) voltak detektálhatók patkány anyák preopticus területén (15B. ábra). Ezek immunfestés által jelölődött sejtek perikarionjai a MPN-, MPA-, illetve a BNST ventrális területére lokalizálódtak (15B. ábra). Tehát az amylin-ir neuronok eloszlása az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek (12C. ábra) eloszlásával egyezett meg.



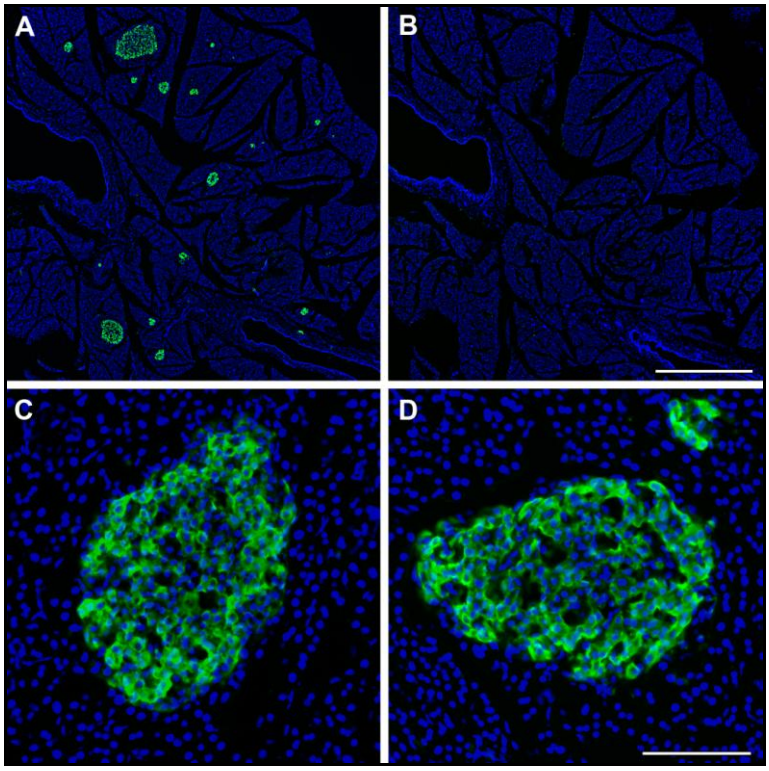
15. ábra. Amylin-immunreaktivitás anya patkányok preopticus területén

A: Amylin-ir neuronok a vemhesség 21. napján nincsenek jelen a preopticus területen. B: Anya patkányok preopticus területén intenzív jelölődés látható a szülést követő 9. napon. Az amylint tartalmazó perikarionok az MPN-ban, az MPA területén, illetve a BNST ventrális részén helyezkednek el. C: A B ábra nyíllal jelölt részének megfelelő, konfokális mikroszkóppal készített felvételen az amylin peptidet tartalmazó perikarion látható nagy nagyításban. A felvételek a bregma szintjétől 0,44 mm-re caudálisan elhelyezkedő metszetekről készültek. Lépték = 1 mm (A-B); 50 µm (C).

4.1.4. Amylin-immunreaktivitás anya patkányok hasnyálmirigyében

A preopticus területen bekövetkezett amylin-indukcióhoz hasonló IAPP-indukció a pancreas esetén a szülést követően nem volt megfigyelhető. A hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben az amylin immunreaktivitás intenzitása nem különbözött a

kölykeikkel együtt tartott, szoptató anyák és a kölykeiktől közvetlenül szülés után elválasztott – így leölésükkor már nem laktáló – állatok között (16. ábra).



16. ábra. Amylin immunreaktivitás anya patkányok hasnyálmirigyében

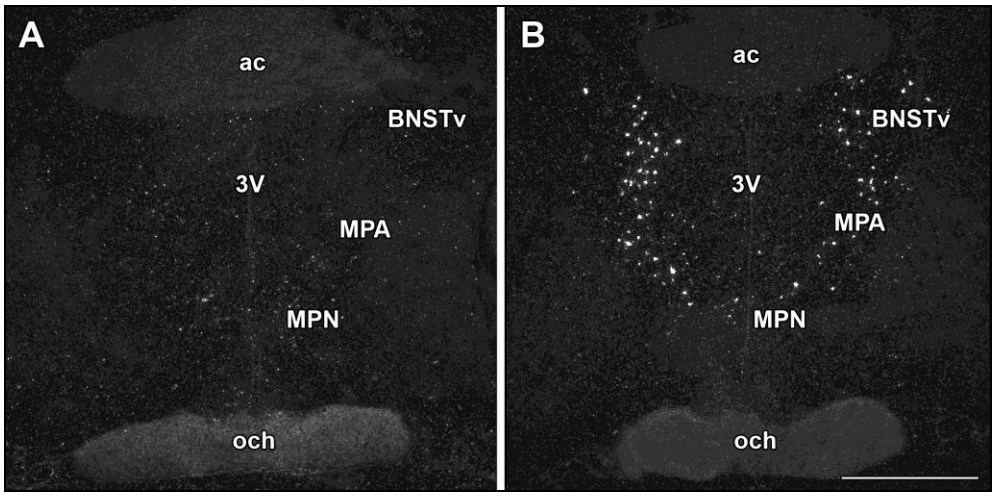
A: Az amylin-immunreaktivitás (zöld szín) a pancreas szigeteire korlátozódik. B: Anti-amylin antiszérum hiányában végzett immunhisztokémiai festés esetén jelölődést a pancreas területén nem tapasztaltunk. C: PP9 anya patkány pancreas metszetéről készített nagy nagyítású képen zölddel jelölt amylin-ir sejtek láthatók a hasnyálmirigy szigeteiben. D: Kölykeitől a szülés után azonnal megfosztott PP9 anyák pancreas szigeteiben látható amylin-immunreaktivitás intenzitása megegyezik a C ábrán bemutatottal, vagyis olyan anyák amylin-immunreaktivitásával, akik kölykeikkel együtt voltak. Lépték = 1 mm (A-B); 300 µm (C-D).

DOI:10.14753/SE.2016.1942

4.2. Amylin-indukció vizsgálata ovariectomia, anyai viselkedésre való szenzitzálás, illetve éheztetés hatására szűz nőstény patkányok preopticus területén

4.2.1. Amylin mRNS expresszió ovariectomiat, illetve anyai viselkedésre való szenzitizálást követően nőstény patkányok preopticus területén

Az amylin mRNS-szintje 2 héttel az ovariectomiat követően nagyon alacsony volt (17A. ábra). Tehát amylin-indukció, akárcsak szülés előtt álló nőstény patkányok (12A. ábra) esetén, petefészekirtást követően nem következett be. Ugyanakkor az anyai viselkedésre való szenzitizálás, akár az ovariectomiát követően, nagymértékű amylin expressziót indukált (17B. ábra). Azonban preopticus területen kívüli amylin-indukció szenzitizálást követően sem volt megfigyelhető.



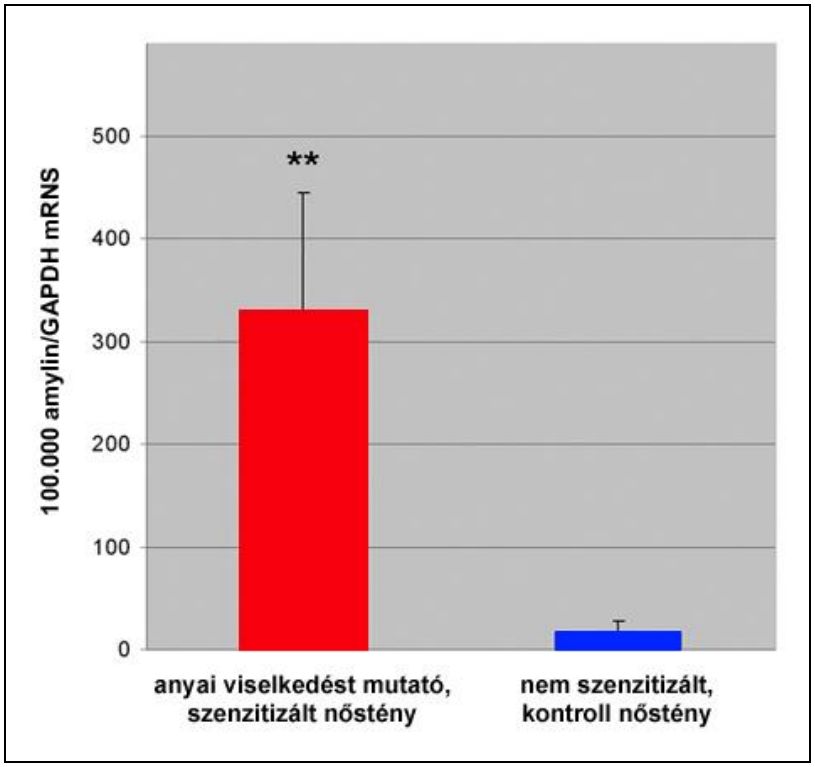
17. ábra. *In situ* hibridizációs hisztokémiával jelölt amylin mRNS expresszió ovariectomizált és szenzitizált nőstény patkány preopticus területén

A sötét látótérrel készített felvételek (A-B) a bregma szintjétől 0,36 mm-re caudálisan elhelyezkedő metszetekről készültek. A: Az ovariectomia egyetlen területen (MPN, MPA egyes területei, BNSTv) sem váltott ki amylin mRNS indukciót. B: Az ovarectomiát követő szenzitizálás jelentős mértékű amylin mRNS expresszió emelkedést okozott az MPN-ban, az MPA területén, valamint a BNST ventrális részén. A felvételek (A-B) a bregma szintjétől 0,40 mm-re caudálisan elhelyezkedő metszetekről készültek. Lépték = 1 mm.

DOI:10.14753/SE.2016.1942

4.2.2. Az anyai viselkedésre való szenzitizálás, illetve az éheztetés hatása az amylin mRNS szintjére nőstény patkányok preopticus területén

Az ISH hisztokémiával történt vizsgálatokat követő kvantitatív RT-PCR vizsgálat szerint a szenzitizált nőstény patkányok kontroll (nem szenzitizált) nőstényekhez képesti amylin mRNS szintje 17,9-szeres (P <0,03) emelkedést mutatott (18. ábra). A szenzitizált nőstények amylin mRNS szintje („10^5 amylin mRNS szint/GAPDH mRNS szint" mértékben kifejezve) 332 ± 115 volt, míg kontroll nőstények esetében ez az érték 18 ± 9, ugyanakkor a GAPDH-szintben (szenzitizált nőstények: 638 ± 84 fg/µl; kontroll nőstény: 777 ± 272 fg/µl) a két csoport között nem volt eltérés.



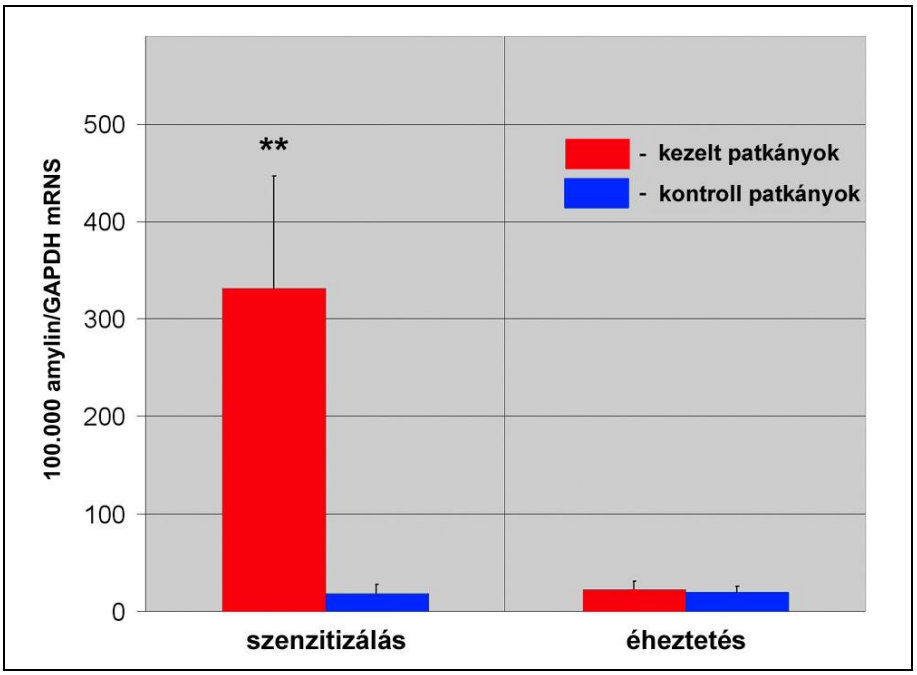
18. ábra. Az anyai viselkedésre való szenzitizálás amylin mRNS-re kifejtett hatásának vizsgálata a preopticus területen kvantitatív RT-PCR segítségével

A grafikon a szenzitizálás hatására bekövetkező amylin mRNS szint szignifikáns emelkedését mutatja. Az adatokat a GAPDH mRNS szint függvényében adtuk meg. **P < 0,03, n=8/csoport (szenzitizált, kontroll).

Kvantitatív RT-PCR technikával a szenzitizálás (18. és 19. ábra) és az éheztetés amylin (18. ábra) mRNS szintre való hatásának összehasonlítását is elvégeztük. A 18. ábrán bemutatott szenzitizálás hatása számszerűen megegyezik az előző bekezdésben leírtakkal, azaz a szenzitizált nőstény patkányok kontroll (nem szenzitizált) nőstényekhez képesti amylin mRNS szintje 17,9-szeres (P <0,03) emelkedést mutatott (18. ábra). A szenzitizált nőstények amylin mRNS szintje („10^5 amylin mRNS szint/GAPDH mRNS szint" mértékben kifejezve) 332 ± 115 volt, míg kontroll nőstények esetében ez az érték 18 ± 9, a két csoport között amylin mRNS szintje között az eltérés szignifikáns volt, ugyanakkor a GAPDH-szintben (szenzitizált nőstények: 638 ± 84 fg/µl; kontroll nőstény: 777 ± 272 fg/µl) a két csoport között nem volt eltérés.

48 órán át tartó éheztetés az amylin mRNS szintjére hatástalan volt. Az amylin mRNS szintje („10^5 amylin mRNS szint/GAPDH mRNS szint" mértékben kifejezve) éheztetett nőstény patkányok esetén 14 ± 6, míg azokkal azonos korú, ún. kontroll nőstény patkányok esetén 17 ± 6 volt. A két csoport (éheztetett, kontroll) között a GAPDH mRNS szintjében sem találtunk szignifikáns változást (éheztetett nőstény patkányok: 443±64 fg/µl; kontroll nőstény patkányok: 412±62 fg/µl) (19. ábra).

DOI:10.14753/SE.2016.1942



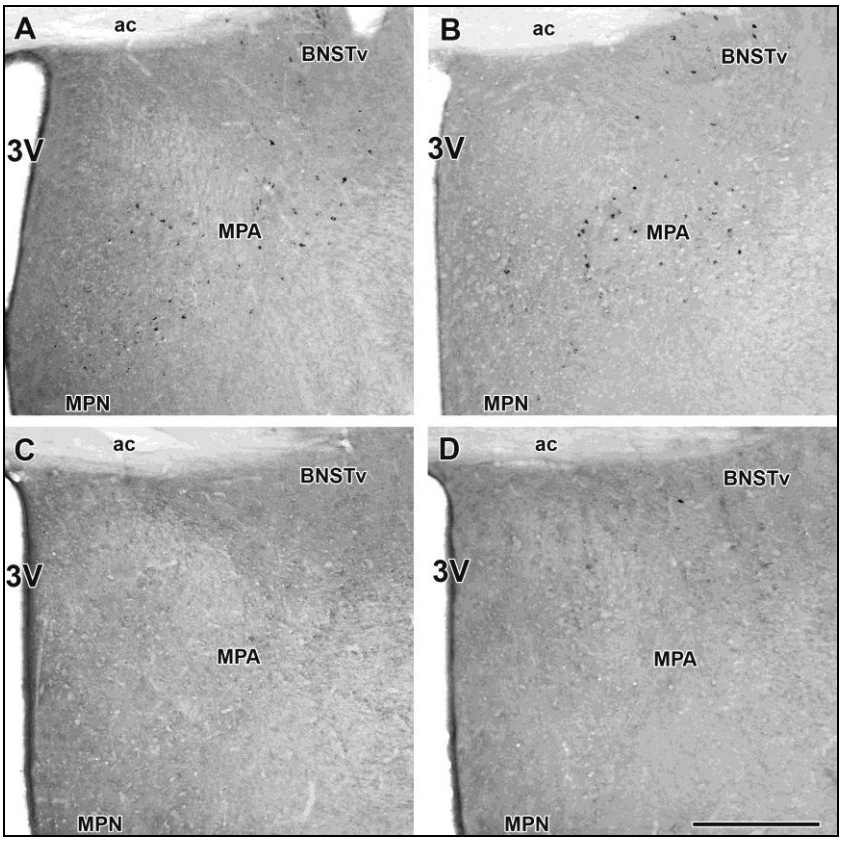
19. ábra. Az anyai viselkedésre való szenzitizálás és az éheztetés hatása a preoticus terület amylin mRNS szintjére nőstény patkányokban

Kontroll nőstényekhez képest az amylin mRNS szint szignifikáns emelkedését találtuk szenzitizált szűz nőstény patkányok preopticus területén kvantitatív RT-PCR technikával végzett vizsgálatunk során (**: $P < 0.03$, n=8 csoportonként). Ezzel ellentétben a 48 órán át tartó éheztetés - a táplálékhoz szabadon hozzájutó nőstényekhez hasonlóan - az amylin mRNS szintjére hatástalannak bizonyult. Adatainkat a GAPDH mRNS szintjének arányában fejeztük ki.

DOI:10.14753/SE.2016.1942

4.2.3. Az anyai viselkedésre való szenzitizálás amylin-immunreaktivitásra gyakorolt hatása nőstény patkányok preopticus területén

Az ovariectomiát követő szenzitizálás hatására jelentős mennyiségű amylin-ir neuron mutatható ki a preopticus területen (20A. ábra). A szenzitizált állatokban és laktáló anyákban (20B. ábra) megjelenő amylin-ir idegsejtek elhelyezkedése azonos, ugyanakkor a szenzitizálási folyamat ellenére sem szenzitizálódott nőstényeknél (20C. ábra), illetve a kontroll nőstényeknél (nullipara, 20D. ábra) amylin-ir neuronok nem jelentek meg a preopticus területen.



20. ábra. Amylin immunreaktivitás szenzitizált nőstény patkányok preopticus területén

A: Szenzitizált szűz nőstények MPN-jában, MPA egyes részein, illetve BNSTv területén megjelenő amylin immunjelölt idegsejtjei. B: Amylin-ir neuronok jelen vannak PP9 laktáló anya patkányok preopticus területén. Az amylin-pozitív neuronok eloszlása a két csoport (A: szenzitizált nőstény, B: PP9 laktáló anya) esetén azonos. C: Amylin-immunreaktív idegsejtek nincsenek jelen olyan nőstényekben, amelyek a szenzitizálási folymat ellenére sem mutattak anyai viselkedést. D: Amylin-ir neuronok nem jelennek meg nullipara (kontroll) nőstények preopticus területén. A felvételek (A-D) a bregma szintjétől 0,40 mm-re caudálisan fekvő metszetekről készültek. Lépték = 500 μm.

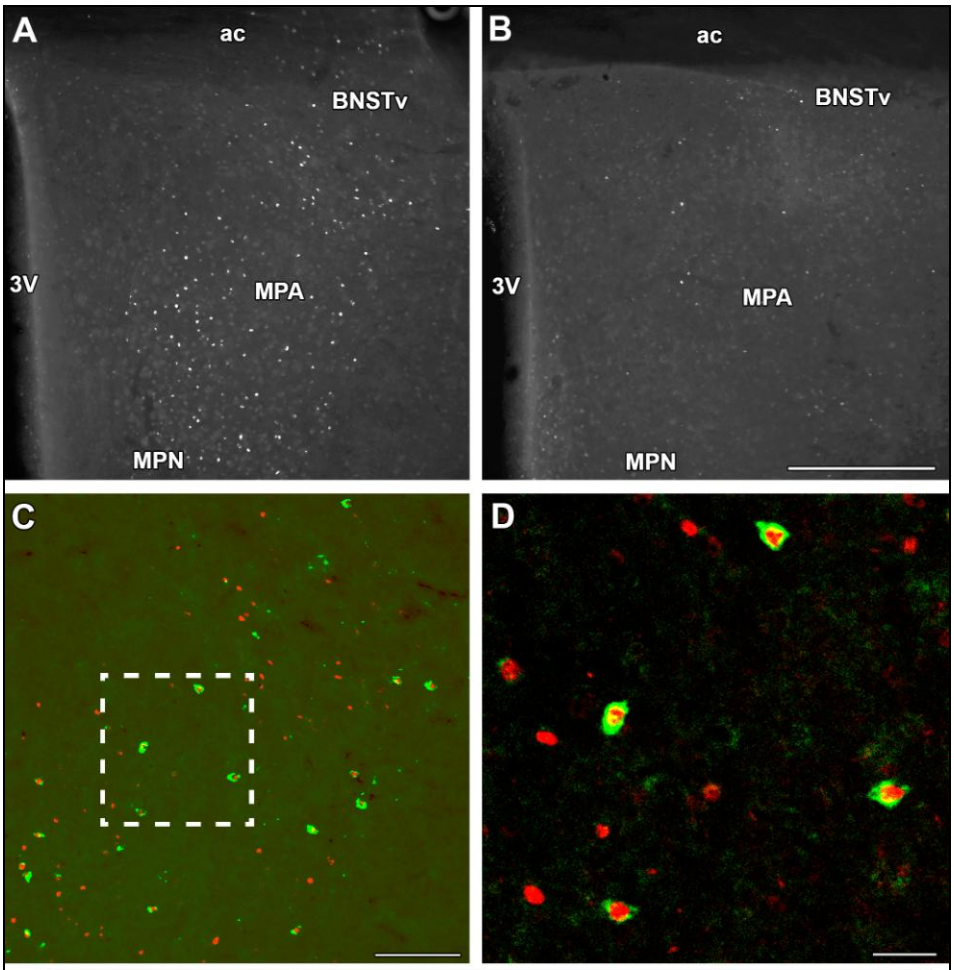
4.3. A preopticus területen lévő amylin-tartalmú idegsejtek anyai aktivációjának vizsgálata

4.3.1. Az amylin-*immunreaktív* idegsejtek Fos-aktivációja kölykök visszaadásának hatására anya patkányokban

Az anyák kölyköktől való 22 órás szeparációja az anyai c-fos pozitív neuronok számának jelentős mértékű csökkenésével jár. A kölykök visszaadását követően az anyák azonnal megkezdik a kölykök gondozását és 10 percen belül azok szoptatását. Kölykök visszaadásának hatására számos agyterületen jelennek meg c-fos-ir neuronok. Ilyen Fos-immunpozitivitást mutató agyterületek közé tartozik a laterális septalis mag és a periaqueductalis szürkeállomány mellett a preopticus area. A preopticus területen belül Fos-ir neuronok (584 ± 72 3 egymást követő sorozatmetszeten) az MPN-ban, az MPA területén, továbbá a BNST ventrális részén jelentek meg 20 órás szeparációt követő 2 órás kölyökvisszaadás hatására (21A. ábra). Tehát a kölyökvisszaadás hatására aktiválódó neuronok és az amylint expresszáló idegsejtek elhelyezkedése rendkívül hasonló. Ugyanakkor csupán néhány Fos-ir idegsejt (71 ± 21 3 egymást követő sorozatmetszeten) detektálható a preopticus területen, amennyiben a 20 órás kölyköktől való szeparációt nem követi kölyökvisszaadás – ez esetben a kölyköktől való elválasztás 22 órán át tart (21B. ábra). A környező agyterületeken, azaz a preopticus area, illetve a BNST más területein elhelyezkedő idegsejtek Fos-pozitivitást kölykök vissszaadásának hatására sem mutatnak.

Az egyértelműen beazonosítható sejtmaggal rendelkező amylin-ir neuronok száma 174,2 ± 61,0 (3, egymást követő sorozatmetszeten). Az amylin-pozitív neuronok preopticus területen belüli elhelyezkedéséről megállapítható volt, hogy az MPN és az MPA területén közel azonos számban, míg a BNSTv területén – az MPN és az MPA területeihez képest - alacsonyabb számban vannak jelen (21E. ábra). Amylin és c-fos kettős immunhisztokémia eredménye szerint az amylin-ir neuronok 85,6 %-a c-fos pozitivitást mutatott (21C-E. ábra). A Fos-pozitivitást mutató amylin-ir neuronok aránya az MPN, az MPA és a BNST ventrális része között jelentős mértékben nem különbözött. Az a néhány amylin ir-neuron, amely sejttestje Fos immunreaktivitást nem mutatott, illetve a c-fos pozitív, de amylin-negatív sejtek preopticus területen belüli elhelyezkedése a duplán jelölt (amylin- és Fos-ir) sejtek eloszlásától nem különbözött.

DOI:10.14753/SE.2016.1942



E

	MPN	MPA	vBNST
Amylin-ir neuronok száma	65.0 ± 30.7	70.0 ± 29.2	39.2 ± 23.7
Amylin-neuronok Fos-pozitivitása (%)	85.9 ± 2.1	82.9 ± 3.7	90.4 ± 5.2

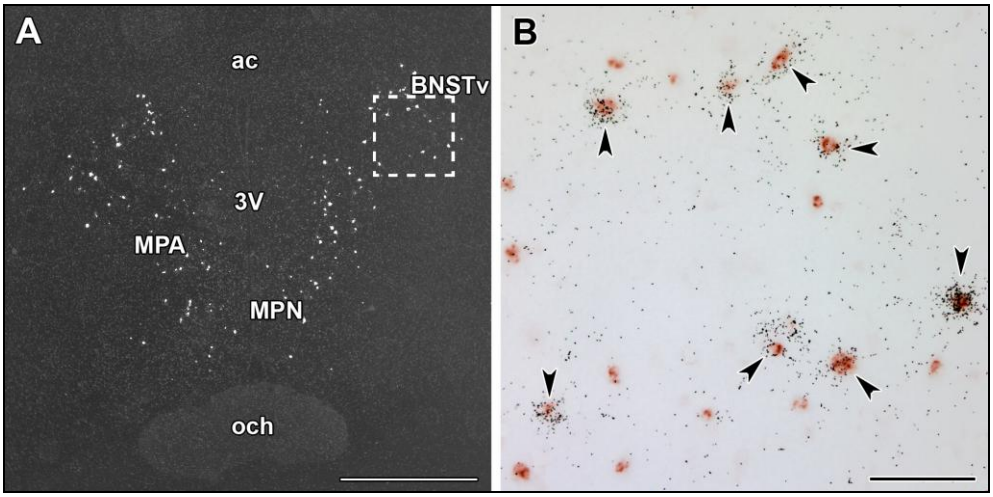
21. ábra. Amylin-ir neuronok c-fos aktivációja kölykök visszaadásának hatására

A: Fos-ir neuronok (fehér pontszerű sejtmagok) nagy mennyiségben jelentek meg anya patkányok preopticus területén kölyköktől való 20 órán át tartó szeparációt követő 2 órás kölyökvisszaadás hatására. Fos-jelölt idegsejtek láthatók az MPN-ban, az MPA területén, valamint a BNST ventrális részén. B: A Fos-ir neuronok rendkívül alacsony számban voltak jelen a preopticus területen azoknál az anyáknál, akiknél a kölykök elvételét nem követte azok visszaadása. C: Kettős (amylin – c-fos) immunhisztokémia során az amylin ir-idegsejtek (zöld sejttest) jelentős része c-fos pozitivitást (piros színnel jelölt sejtmag) mutatott kölykök visszaadását követően. A felvételen a duplán jelölt sejtek mellett kis mennyiségben c-fos-ir, de amylin-negatív neuronok is láthatók. D: A C ábrán bekeretezett területről, konfokális mikroszkóppal készített felvételen amylin és c-fos duplán jelölt sejtek láthatók. E: Öt állat három, egymást követő coronális sorozatmetszetén található amylin-neuronok száma, illetve az

amylin-ir idegsejtek Fos-pozitivitásának mértékét mutatja a táblázat. Az amylin-pozitív neuronok az MPN és az MPA területein azonos mennyiségben találhatók, míg a BNST ventrális részén az amylin-ir neuronok száma kevesebb. Ugyanakkor az adott területen jelen lévő Fos-immunpozitivitást mutató amylin-sejtek százalékos megoszlása a területek között azonos volt. Az epifluoreszcens kondenzátorral ellátott mikroszkóppal készített felvételek (A-D) a bregma szintjétől 0,40 mm-re caudálisan elhelyezkedő metszetekről készültek. Lépték = 500 µm (A-B); 200 µm (C); 50 µm (D).

4.3.2. Az amylin *mRNS*-t expresszáló neuronok Fos-aktivációja kölykök visszaadásának hatására anya patkányokban

Az amylin és a c-fos gén koexpressziójának vizsgálatára kölykök visszaadását követően anya állatok preopticus területén amylin ISH hisztokémia és c-fos immunhisztokémiai festést kombináltunk (22B. ábra). Az amylin mRNS-t expresszáló sejtek száma 113 ± 15 volt az összes, amylin mRNS-t tartalmazó metszeten oldalanként. A kölykök visszaadásának hatására a preopticus területen megjelenő intenzív c-fos immunreaktivitást az amylint expresszáló neuronok 93,2 %-nál detektáltunk.



22. ábra. Az amylin mRNS-t expresszáló, preopticus területen található neuronok Fos aktivációja a kölykök visszaadásának hatására

A: A sötét látóteres felvételen jól látható, hogy az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek (fehér pontok) nagy mennyiségben vannak jelen anya patkányok preopticus területén. B: Az A ábrán bekeretezett terület nagy nagyítású, világos látótérben készített felvétele mutatja, hogy az amylin mRNS-t expresszáló neuronokban (fekete autoradiográfiás szemcsék) a c-fos immunreaktivitás (barna sejtmagok) kölykök visszaadását követően 2 órával megjelenik. A

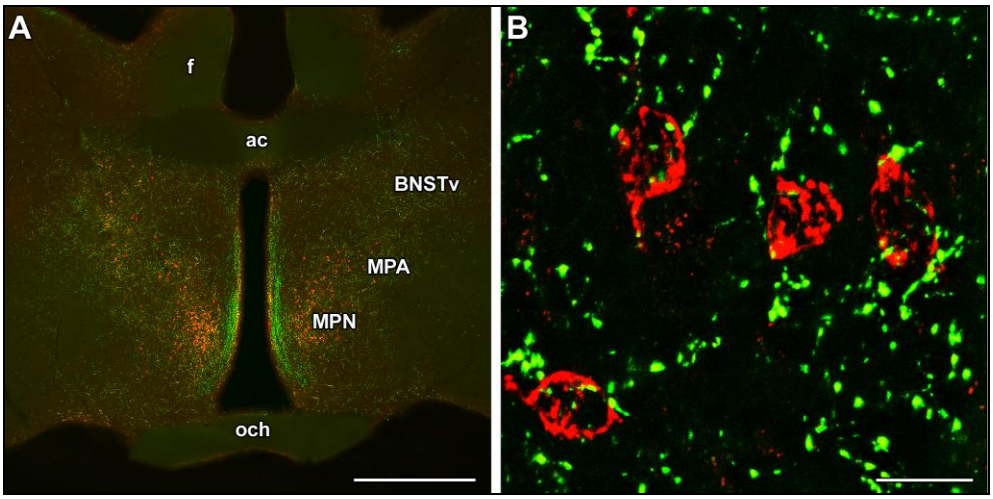
kettősen jelölt sejtek mellett kis számban Fos-ir, de amylin-negatív idegsejtek is láthatók. Fos-ir neuronok az MPN-ban, az MPA területén, illetve a BNST ventrális részén jelentek meg. Ezek preopticus területen belüli eloszlása az amylint expresszáló neuronok helyzetéhez hasonló. A felvételek (A-B) a bregma szinttől 0,4 mm-re caudálisan készültek. Lépték = 1 mm (A); 100 µm (B).

4.4. Az amylin-neuronok és a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer topográfiai és funkcionális kapcsolatának feltérképezése

4.4.1. Az amylin-immunreaktív idegsejtek és a TIP39-tartalmú idegrostok elhelyezkedése anya patkányok preopticus területén

Az amylin-ir neuronok és a preopticus terület egyik jelentős bemenetét adó, PIL-eredetű TIP39-rostok anatómiai kapcsolatának vizsgálatára amylin-TIP39 kettős immunhisztokémiai festést végeztünk. Az amylin-ir neuronok és a TIP39-rostok preopticus területen belüli elhelyezkedése nagyon hasonló: TIP39-rostok legnagyobb számban a mediális preopticus magban, a mediális preopticus area egyes részein, illetve a bed nucleus of the stria terminális ventrális részén helyezkednek el, akárcsak az amylint kifejező idegsejtek (23A. ábra). A TIP39-rostok terminálisai az amylin-ir neuronokhoz rendkívüli közelségben végződnek (23B. ábra).

DOI:10.14753/SE.2016.1942



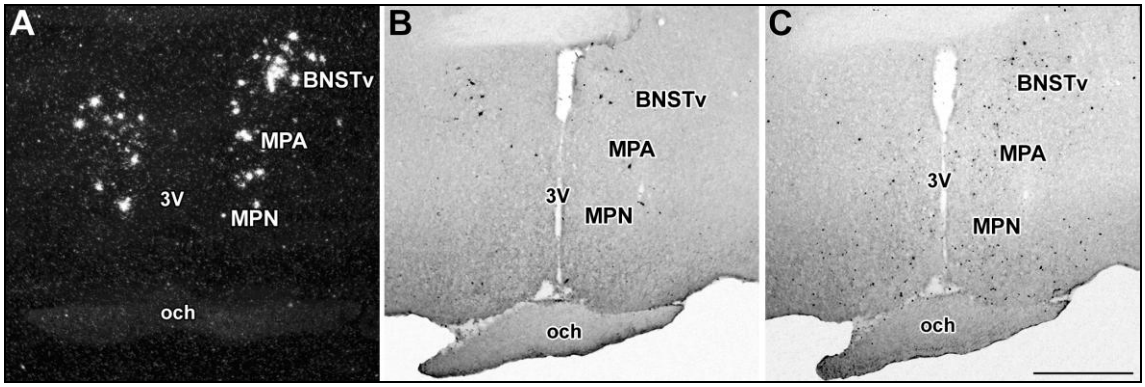
23. ábra. Az amylin-ir neuronok és a TIP39 rostok eloszlása anya patkányok preopticus területén

A: A fluoreszcens kettős immunhisztokémiai festéssel készített metszeten az amylin-pozitív neuronok (piros pont) és a TIP39-tartalmú rostok (zöld szín) hasonló, preopticus területen belüli elhelyezkedése látható. A preopticus területen belül a TIP39-rostok legnagyobb számban az amylin-ir idegsejtek elhelyezkedésével megegyező területeken találhatók (MPN, MPA, BNSTv). B: Nagy nagyítású konfokális felvételen jól látható az amylin-ir neuronok és a TIP39-rostok appozíciója. A felvételek (A-B) a bregma szinttől 0,4 mm-re caudálisan készültek. Lépték = 1 mm (A); 20 µm (B).

4.4.2. Amylin-pozitív neuronok és PTH2 receptort expresszáló idegsejtek topográfiai eloszlása egér anyák preopticus területén

In situ hibridizációs hisztokémia segítségével kimutatható volt, hogy az amylin nem csak patkány anyák, hanem laktáló egerek preopticus területén is erőteljes indukciót mutat a szülést követően az MPN, az MPA, valamint a BNST ventrális részén (14B1. és 24A. ábra), tehát a patkányok esetén leírtakkal (12. ábra) azonos eloszlásban. Ebben az esetben is megállapítható volt, hogy az amylin preopticus területen belüli megjelenése diffúz. A szülést követően nem csak az amylin emelkedett mRNS-szintje, hanem immunhisztokémiai festés révén az amylin peptid is kimutatható volt a preopticus területen, az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtekkel megegyező eloszlásban (24B. ábra). A TIP39 endogén ligandja, a PTH2 receptor preopticus területen belüli eloszlása az amylin neuronok megjelenési mintázatával jelentősen

átfedő volt, így X-Gal hisztokémia segítségével PTH2R-t expresszáló sejtek voltak megfigyelhetőek az MPN, az MPA egyes területein, valamint a BNST ventrális részén.



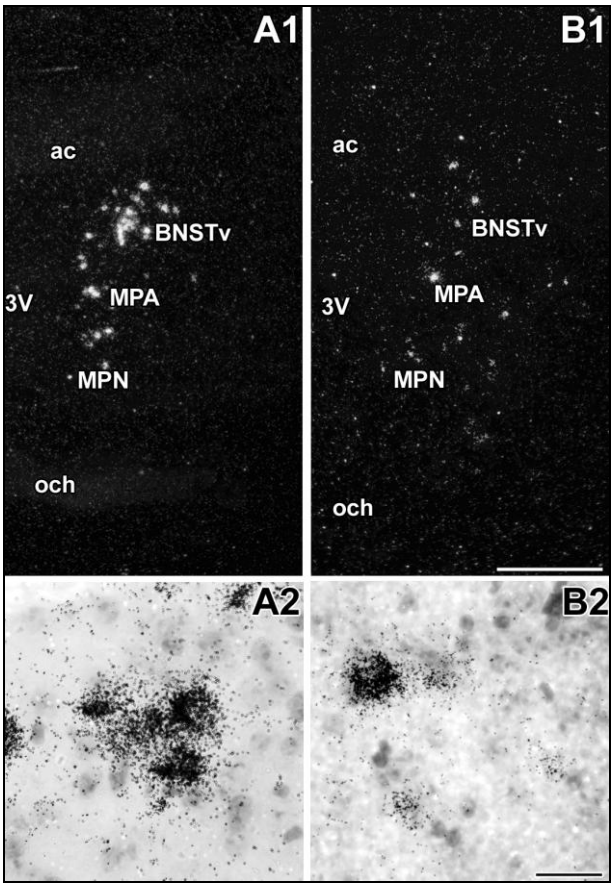
24. ábra. Az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek, az amylin-ir neuronok, valamint a PTH2R-t kifejező sejtek hasonló preopticus területen belüli elhelyezkedése egér anyákban
A: Radioaktív *in situ* hibridizációs hisztokémia alkalmazásával jól látható, hogy az amylin erőteljes expressziója (a fehér pontok az amylin mRNS-t expresszáló sejteket mutatják) következett be egér anyák (PP8) preopticus területén. A preopticus területen belül csak az MPN-ban, az MPA egyes területein, valamint a BNST ventrális részén helyezkednek el az amylin mRNS-t expresszáló neuronok. B: Immunhisztokémiai festés révén az amylin-ir neuronok is kimutathatók voltak egér anyák (PP9) MPN-jában, az MPA területén és a BNST ventrális részén. C: PTH2 receptort expresszáló neuronok X-Gal festéssel jelentős számban voltak kimutathatók egerek preopticus területén. A PTH2R expresszió az amylin-ir neuronok megjelenési területével nagymértékben átfed (MPN, MPA, BNSTv). A felvételek a bregma szinttől 0,10 mm-re caudálisan készültek. Lépték = 1 mm.

4.4.3. Az amylin-mRNS szintjének meghatározása PTH2R hiányában

A szülést követő amylin-indukciót, mely mind az amylin mRNS-t expresszáló neuronok számának (25A1. ábra), mind pedig azok átlagos szemcseszámának (25A2. ábra) emelkedését jelentette, *in situ* hibridizációs hisztokémia segítségével mutattuk ki egér anyák preopticus területének meghatározott részein (MPN, MPA, BNSTv), ahol az amylin neuronok diffúz elhelyezkedése volt megfigyelhető. A PTH2R preopticus területen belüli eloszlása (24C. ábra) az amylin neuronok eloszlásához hasonló volt. PTH2 receptort nem tartalmazó egerek szülést követő vizsgálatával amylin ISH hisztokémia alkalmazása révén pedig a PTH2R hiányában bekövetkező amylin mRNS-szint változás is megállapítható volt (25. ábra). PTH2R-ral nem rendelkező (PTH2R

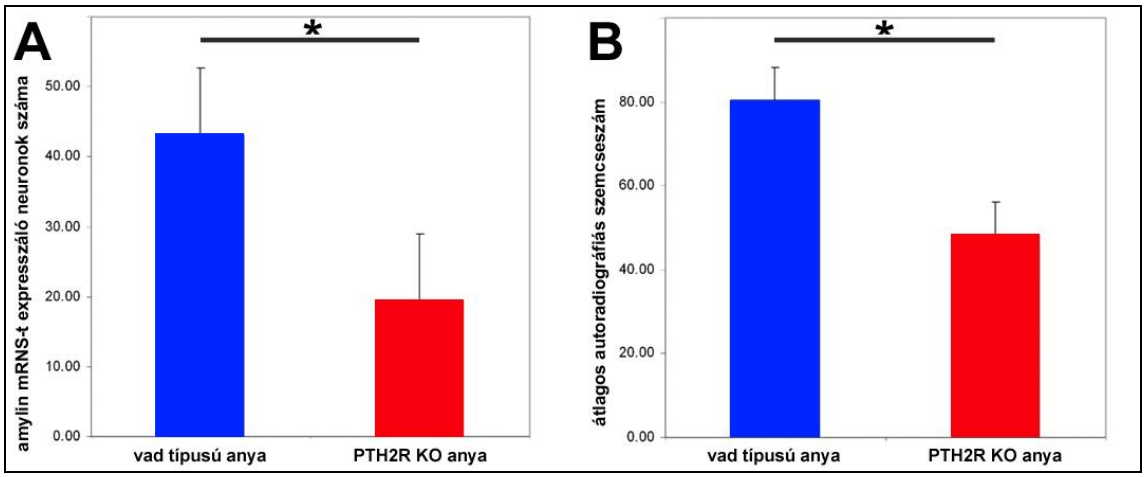
KO) egér anyák preopticus területén az amylin mRNS-t expresszáló neuronok számának (25B1. ábra), illetve azok átlagos szemcseszámának (25B2. ábra) csökkenése volt megfigyelhető. A PTH2R hiányában bekövetkező amylin-indukció csökkenés vad típusú, azaz PTH2 receptorral rendelkező egér anyákkal való összehasonlításának kvantitatív elemzése révén az is megállapítható volt, hogy a PTH2R KO anyáknál leírt amylin-szint csökkenés szignifikáns volt mind az amylin mRNS-t expresszáló sejtek (26A. ábra), mind az átlagos autoradiográfiás szemcseszám (26B. ábra), tehát az egy sejten belül kifejeződő mRNS mennyisége tekintetében. Az amylin mRNS-t expresszáló sejtek mennyisége PTH2R hiányában a vad típusú anyák esetén megállapított 43,20 ± 4,33 értékről 19,50 ± 9,50 értékre csökkent, míg az átlagos szemcseszám tekintetében a 80,38 ± 7,75 érték 48,28 ± 4,07 értékre csökkent.

DOI:10.14753/SE.2016.1942



25. ábra. A PTH2R hiány amylin mRNS szintre kifejtett hatásának vizsgálata *in situ* hibridizációs hisztokémia felhasználásával

A1: A szülést követően (PP9) az anyák preopticus területén az MPN-ban, az MPA, valamint a BNSTv területén az amylin mRNS-t expresszáló sejtek (fehér pontok) megemelkedett száma látható a sötét látóteres felvételen. A2: Az amylin mRNS szintben bekövetkezett változás nem csak az amylin mRNS-t expresszáló sejtek számában, hanem azok autoradiográfiás szemcseszámában is megnyilvánul, amit a világos látótérrel készített nagy nagyítású kép mutat be. B1: A sötét látóteres felvételen jól látható, hogy PTH2R hiányának következtében az amylin mRNS-t expresszáló sejtek száma vad típusú (PTH2 receptorral rendelkező) anyákéhoz (A1) képest a preopticus területen lecsökken. B2: Nagy nagyítású, világos látótérrel készített felvétel mutatja az egy, amylin mRNS-t expresszáló sejt autoradiográfiás szemcseszámát, ami a vad típusú anyákéhoz (A2) képest szintén csökkenést mutat. A felvételek (A-B) a bregma szinttől 0,10 mm-re caudálisan készültek. Lépték = 300 µm (A1-B1); 100 µm (A2-B2).



26. ábra. A radioaktív amylin *in situ* hibridizációs hisztokémia eredményeinek kvantitatív elemzése PTH2R hiányában

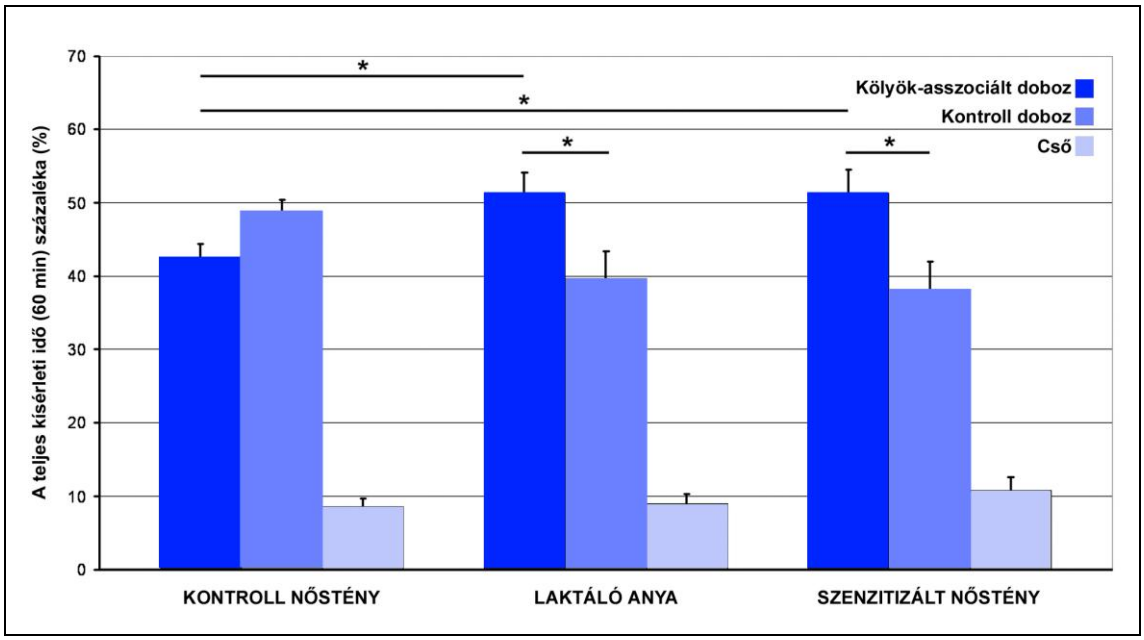
A: Az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek száma 3, egymást követő, egymástól 108 µm távolságra lévő sorozatmetszeten vad típusú (PTH2R-ral rendelkező) és PTH2R-ral nem rendelkező (PTH2R KO) egér anyák (PP9) esetén. A vad típusú és a PTH2R KO anyák amylin mRNS-t expresszáló neuronjainak száma között szignifikáns eltérés volt megfigyelhető: PTH2R hiányában az amylin mRNS-t expresszáló sejtek száma csökkent. B: Az amylin mRNS-t expresszáló neuronok (autoradiográfiás) szemcseszáma szintén szignifikáns csökkenést mutatott PTH2R hiányában. *P < 0,05; *** P < 0,001.

4.5. A szülés és a szenzitizálás viselkedésre kifejtett hatásának vizsgálata egerekben

4.5.1. Az anyaság és a szenzitizálás hatása a kondícionált helypreferencia tesztben mutatott viselkedésre

Mind az anya állatok, mind a szenzitizált, illetve nem szenzitizált (kontroll) nőstény egerek mindhárom térfélre (kölyök-asszociált doboz, kontroll doboz, cső) beléptek, és ott hosszabb-rövidebb időn keresztül tartózkodtak. A teszt 60 perce alatta a kontroll nőstények 25,59 ± 1,02 percet (a teljes kísérleti idő 42,66 ± 1,71 %-a) tartózkodtak a kölyök-asszociált dobozban, 29,22 ± 0,99 percet (48,70 ± 1,65 %) a kontroll dobozban és 5,19 ± 0,63 percet (8,65 ± 1,05 %) a két dobozt összekötő csőben. Ezzel szemben az egér anyák a kísérlet teljes ideje (60 perc) alatt 30,77 ± 1,71 percet (51,29 ± 2,85 %) a kölyök-asszociált dobozban, 23,81 ± 2,18 percet (39,68 ± 3,63 %) a

kontroll dobozban és 5,42 ± 0,76 percet (9,03 ± 1,27 %) a csőben (27. ábra). Kétutas ANOVA [egyik faktor: kompartmentek (kölyök-asszociált doboz, kontroll doboz, cső); másik faktor: állatcsoportok (kontroll nőstény, laktáló anya, szenzitizált nőstény)] segítségével kerestük a kísérleti csoportok és azok különböző kompartmentekben töltött ideje közötti szignifikáns eltérést. A kompartment ($P < 0,0001$, $F(2)=176,4$) és az interakció ($P = 0,0023$, $F(4)=4,47$) szignifikáns változást mutatott. A kétutas ANOVA-t követő Bonferroni-féle post hoc teszt kimutatta, hogy az egér anyák szignifikánsan több időt töltöttek a kölyök-asszociált dobozban, mint a kontroll nőstények ($p < 0,05$), továbbá az is megállapítható volt, hogy az egér anyák a kölyök-asszociált dobozban szignifikánsan több időt töltöttek, mint a kontroll dobozban ($p < 0,05$). Mindemellett a kontroll nőstények esetén egy tendencia volt megfigyelhető: több időt töltöttek a kontroll dobozban, mint a kölyök-asszociált dobozban (29,22 ± 0,99 perc *vs.* 25,59 ± 1,02 perc). Az ösztrusz ciklus helypreferenciára való hatásának kizárására a tesztet ovariectomizált nőstényekkel is elvégeztük. Az ovariectomizált nőstények kondícionált helypreferencia tesztben mutatott viselkedése a kontroll nőstényekéhez volt hasonló: a kontroll *vs.* kölyök-asszociált dobozban töltött idő aránya kontroll nőstények esetén 1,14 ± 0,08, míg ovariectomizált nőstények esetén 1,20 ± 0,26 volt (az ovariectomizált állatok adatait a 27. ábrán nem tüntettük fel). A szenzitizált nőstények a kölyök-asszociált dobozban szignifikánsan több időt töltöttek, mint a kontroll dobozban (kétutas ANOVA-t követő Bonferroni-féle post hoc teszt eredménye: $t=2,58$, $p < 0,05$), továbbá a szenzitizált nőstények kölyök-asszociált dobozban töltött ideje a laktáló anya állatokétól nem különbözött ($t=0,43$). A teszt teljes ideje (60 perc) alatt a szenzitizált nőstények a kölyök-asszociált dobozban 30,76 ± 1,94 percet (51,27 ± 3,23 %) töltöttek, ezzel szemben a kontroll dobozban csak 22,78 ± 2,43 percet (37,96 ± 4,05 %), míg az összekötő csőben 6,46 ± 1,09 percet (10,77 ± 1,82 %) (27. ábra). Ez azt jelenti, hogy a szenzitizált nőstény egerek 1,35 ± 0,19 –szer több időt töltöttek a kölyök-asszociált dobozban, mint a kontroll nőstények. Amennyiben a két dobozt megcseréltük – narancssárga, lekerekített szélű tálkával és fehér csíkkal jelöltük a kontroll dobozt, míg a kölyök-asszociált doboz a jelölés nélküli, de fekete, négyszögletes tálkát tartalmazó lett – ez az arány nem változott: a szenzitizált nőstények 1,38 ± 0,15 –ször több időt töltöttek a kölyök-asszociált dobozban, mint a kontroll egerek.



27. ábra. A három kísérleti csoport (kontroll nőstény, laktáló anya, szenzitizált nőstény) különböző kompartmentekben töltött ideje kondícionált helypreferencia tesztben

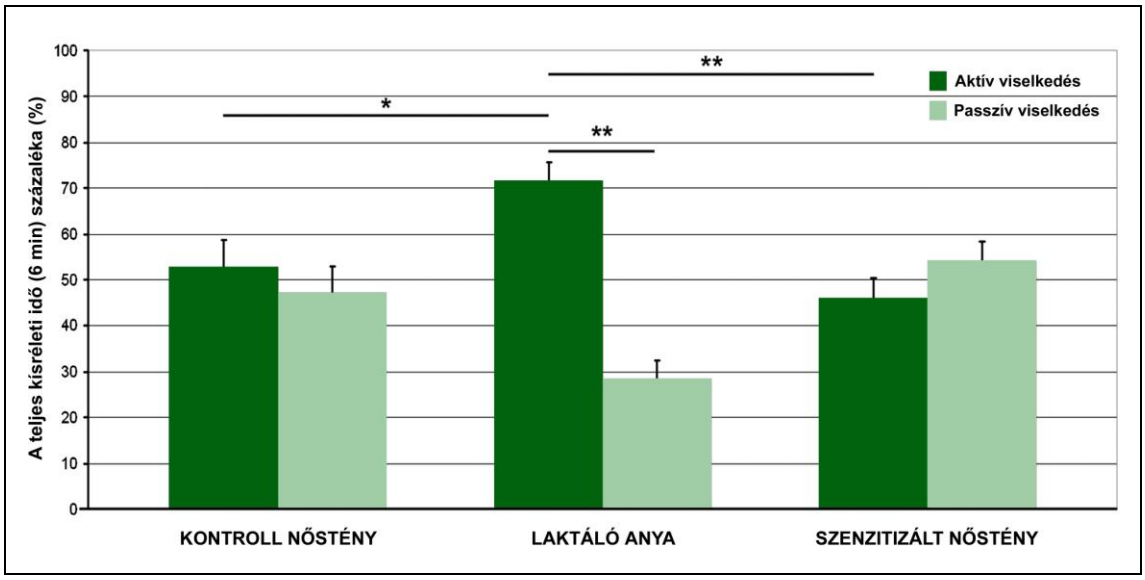
A kölyök-asszociált dobozban (sötétkék oszlop), a kontroll dobozban (középkék oszlop) és a két dobozt összekötő csőben (világoskék oszlop) töltött időt a kísérleti idő (60 min) százalékában ábrázoltuk. Laktáló anyák és szenzitizált szűz nőstények kölyök-asszociált dobozban töltött ideje megegyező, és ez szignifikánsan több, mint a kontroll dobozban töltött idő. Laktáló anyák és szenzitizált nőstények esetén további szignifikáns különbség mutatható ki a kontroll nőstényekhez képest: az előbbi két csoport (laktáló anya, szenzitizált nőstény) tagjai szignifikánsan több időt töltenek a kölyök-asszociált dobozban, mint a kontroll nőstények. A kontroll nőstények ezzel szemben tendenciaszerűen több időt töltenek a kontroll dobozban. Az oszlopokat összekötő, csillaggal (*) jelölt vonalak az egyes állatcsoportok közötti, illetve az állatcsoportokon belül a kompartmentek közötti szignifikanciát jelölik. *P < 0,05.

4.5.2. Az anyaság hatása kényszeres úszás tesztben mutatott viselkedésre

Kényszeres úszás teszt során a vizsgált egerek nagy része – a laktáló anya állatok kivételével – azonos mértékben mutatattak aktív (úszás és „küzdés”) és passzív (lebegés) viselkedést. A hat perces teszt ideje alatt a kontroll nőstények 3,17 ± 0,35 percet (a teljes kísérleti idő 52,82 ± 5,83 %-a) aktív viselkedéssel, míg 2,83 ± 0,35 percet (47,18 ± 5,83 %) passzív viselkedéssel töltöttek. Laktáló anya állatok aktív viselkedéssel töltött ideje 4,30 ± 0,25 perc (71,64 ± 4,14 %), míg ezen állatcsoport esetén a passzív viselkedéssel töltött idő 1,70 ± 0,25 perc (28,36 ± 4,14 %) volt (28.

ábra). A passzív viselkedéssel töltött idő, valamint az aktív viselkedéssel töltött idő, mindhárom kísérleti csoport esetén szignifikánsan eltérő volt (egyutas ANOVA, F(2,22)=8,604, P=0,0017). Bonferroni-féle post hoc teszttel történt további statisztikai elemzés kimutatta, hogy az anyák szignifikánsan több időt töltenek aktív viselkedéssel, mint a kontroll nőstények, továbbá, hogy a laktáló anyák aktív viselkedéssel töltött ideje szignifikánsan több volt, mint amennyit lebegéssel, azaz passzív viselkedésformával töltöttek ($p < 0,01$). A szenzitizált nőstények a teszt során 2,76 ± 0,26 percet (45,96 ± 4,36 %) töltöttek aktív viselkedéssel, tehát összesen 3,24 ± 0,26 percet (54,04 ± 4,36 %) passzív viselkedéssel, ami szignifikánsan nem különbözött az aktivitással töltött időtől (28. ábra). Továbbá a szenzitizált nőstények és laktáló anya állatok között bármely (aktív, passzív) viselkedési formát tekintve szignifikáns különbség volt kimutatható ($p < 0,05$). Ezzel ellentétben a szenzitizált nőstények viselkedési mintázata a kontroll nőstényekéhez volt hasonló. Az ösztrusz ciklus viselkedést befolyásoló hatását vizsgálva petefészekirtáson átesett nőstény egereken is elvégeztük a kényszeres úszás tesztet. Az ovariectomizált állatok a passzív viselkedéshez (3,71 ± 0,18 min, 61,84 ± 3,01%) képest csökkent aktív viselkedést (2,29 ± 0,18 perc, 38,20 ± 3,03 %) mutattak ($p < 0,05$; adataik a 28. ábrán nem szerepelnek). Ugyanakkor az ovariectomizált állatok esetén tapasztalt szignifikáns változás nem jelentett szignifikáns eltérést a kontroll, illetve a szenzitizált nőstényekkel összehasonlítva (F(2,19)=0,8378, P=0,4480).

DOI:10.14753/SE.2016.1942



28. ábra. A három kísérleti csoport (kontroll nőstény, laktáló anya, szenzitizált nőstény) aktív és passzív viselkedéssel töltött ideje kényszeres úszás tesztben

Az aktív (sötétzöld oszlop) és passzív (világoszöld oszlop) viselkedéssel töltött időt a teszt teljes időtartamára (6 perc) vonatkoztatva százalékban adtuk meg. Mivel a kísérleti idő két magatartásforma között oszlott meg, ezért amennyiben valamelyik kísérleti csoport egyik viselkedésformája szignifikanciát mutatott egy másik csoport ugyanazon viselkedésformájával, úgy a másik viselkedésforma esetén is fennáll a szignifikancia a másik csoport ugyanazon viselkedésformájával, így az ábrán csak az aktív viselkedéssel töltött idő szignifikancia-értékeit tüntettük fel. A csoportokon (kontroll nőstény, laktáló anya, szenzitizált nőstény) belüli viselkedéseket vizsgálva megállapítható volt, hogy kontroll és szenzitizált nőstények közel azonos időt töltöttek aktív és passzív viselkedéssel, míg laktáló anyák esetén az aktív viselkedéssel töltött idő szignifikánsan nagyobb volt. Csoportok közötti aktív viselkedéssel töltött időt összehasonlítva elmondható, hogy a laktáló anyák szignifikánsan több időt töltöttek aktív viselkedéssel, mint a másik két csoport (kontroll nőstény, szenzitizált nőstény) tagjai. Az oszlopokat összekötő, csillaggal (*) jelölt vonalak az egyes állatcsoportok közötti, illetve az állatcsoportokon belüli szignifikanciát jelölik. $*p < 0{,}05$, $**p < 0{,}01$.

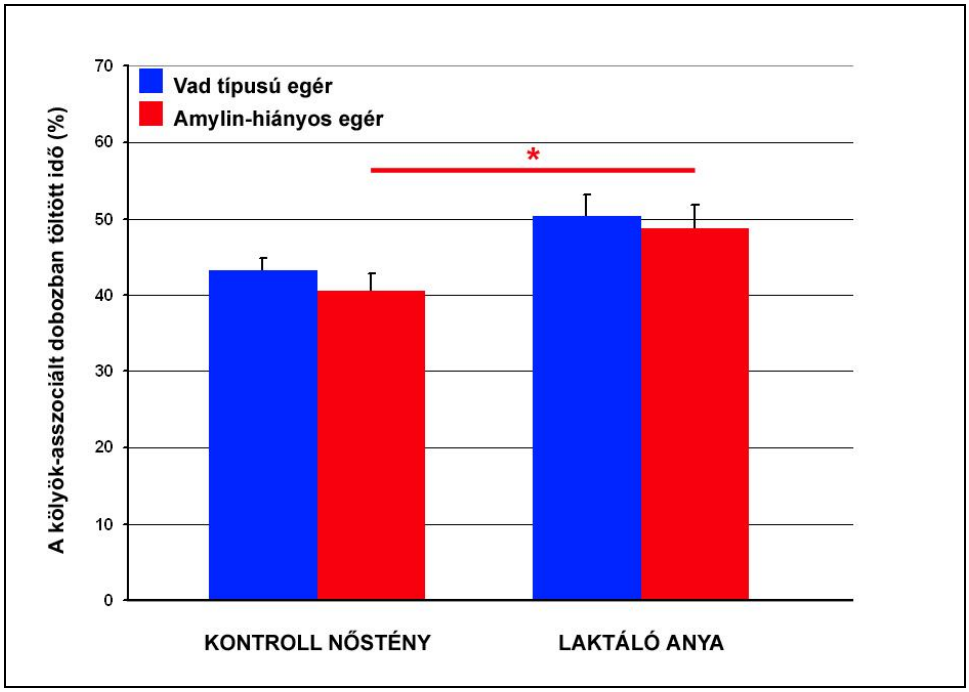
4.6. Amylin-gént nem tartalmazó egér anyák és szenzitizált nőstény egerek viselkedésének vizsgálata

4.6.1. Amylin-gén hiányának hatása a kölyök-asszociált preferencia teszt eredményére

Mind az anya, mind a szenzitizált, mind pedig a kontroll egerek genotípusuktól függetlenül mindhárom térfélen (kölyök-asszociált doboz, kontroll doboz, cső) hosszabb-rövidebb időn keresztül tartózkodtak. A vad típusú (WT, IAPP+/+) kontroll nőstények a kölyök-asszociált dobozban a teljes kísérleti idő 43,23 ± 1,68 %-át, míg az amylin-hiányos (KO, IAPP-/-) kontroll nőstények 40,51 ± 2,24 %-át, ugyanakkor WT laktáló anyák esetén ez 50,35 ± 2,84 %, IAPP-/-anyáknál 48,74 ± 3,07 % volt (29. ábra). Kétutas ANOVA [egyik faktor: reproduktív státusz (kontroll nőstény, laktáló anya állat); másik faktor: genotípus (vad típus, amylin-hiányos)] segítségével kerestük a reproduktív státusz és a genetikai állapot kölyök-asszociált dobozban töltött időre kifejtett hatását. A genotípus szignifikáns hatása ($P<0,05$, $(F)=2,44$) volt kimutatható amylin KO kontroll nőstények és amylin KO laktáló anyák között (40,51 ± 2,24 % vs. 48,74 ± 3,07 %). A kétutas ANOVA-t követő Bonferroni-féle post hoc teszt kimutatta, hogy laktáló anya állatok szignifikánsan több időt töltöttek a kölyök-asszociált dobozban ($p < 0,05$). A WT kontroll nőstények és WT anyák között a kölyök-asszociált dobozban töltött idő jelentős különbsége (43,23 ± 1,68 % vs. 50,35 ± 2,84 %) ellenére sem lehetett szignifikáns eltérést kimutatni ($P>0,05$, $(F)=1,951$). A két kontroll nőstény csoport (WT, KO) kölyök-asszociált dobozban töltött ideje hasonló volt (43,23 ± 1,68 % vs. 40,51 ± 2,24 %), szignifikáns különbség nem volt közöttük. A WT-, valamint az IAPP-/- laktáló egér anyák között szintén nem volt eltérés a kölyök-asszociált dobozban töltött idő tekintetében ($P>0,05$, $(F)=3,196$).

Az állatcsoportokra vonatkozó további (nem ábrázolt) adatok: 1) kontroll dobozban töltött idő: WT kontroll nőstények: 48,32 ± 1,58 %, KO kontroll nőstények: 47,43 ± 2,26 %; WT anya állatok: 40,34 ± 3,47 %, IAPP-/- laktáló anyák: 42,21 ± 3,55%; 2) összekötő csőben töltött idő: WT kontroll nőstények: 8,45 ± 0,99 %, KO kontroll nőstények: 12,06 ± 1,93 %, WT anya állatok: 9,31 ± 1,23 %, IAPP-/- laktáló anyák: 8,91 ± 1,16%. A szenzitizált állatok egyes kompartmentekben töltött tartózkodási ideje a következő volt: 1) kölyök-asszociált doboz: WT: 50,51 ± 2,90 %,

KO: 42,17 ± 2,20 %; 2) kontroll doboz: WT: 39,38 ± 3,78 %, KO: 46,82 ± 1,67 %; 3) összekötő cső: WT: 10,04 ± 1,74 %, KO: 11,02 ± 0,78 %. A nem ábrázolt adatok esetén sem a reproduktív státusz, sem pedig a genotípus nem befolyásolta a kompartmentekben töltött idő mennyiségét.



29. ábra. A reproduktív státusz és a genoptípus hatása a kölyök-asszociált kompartmentben töltött idő mennyiségére.

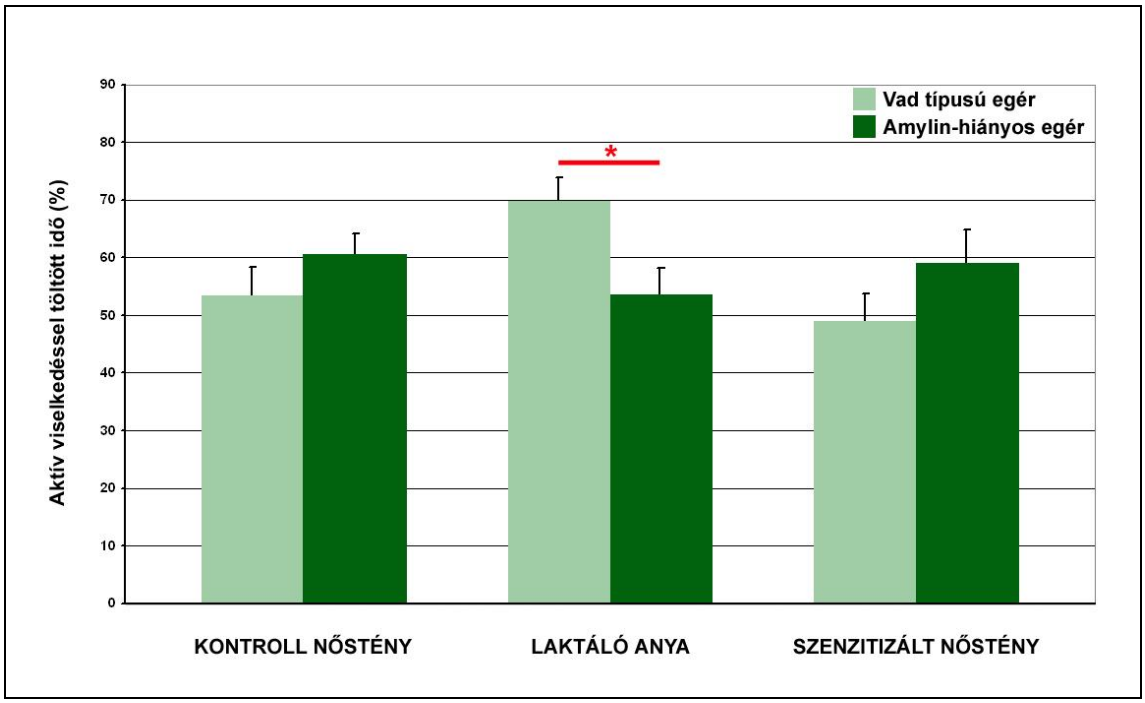
A kölyök-asszociált dobozban töltött időt a kísérleti idő (60 min) százalékában ábrázoltuk mind vad típusú (sötétkék oszlop), mind amylin-hiányos (piros oszlop) állatok esetén. A kontroll nőstények genetikai állapotuktól függetlenül közel azonos időt töltöttek a kölyök-asszpciált kompartmentben, ez mindkét állatcsoport esetén a teljes kísérleti idő kevesebb, mint 50%-át jelentette, ezzel szemben mind a vad típusú, mind az amylin-hiányos laktáló anya állatok a kísérleti idő majdnem felét a kölyök-asszociált dobozban töltötték. Szignifikánsan több időt töltöttek az amylin KO egér anyák a kölykökre emlékeztető dobozban, mint az amylin KO kontroll nőstények. Az oszlopokat összekötő, csillaggal (*) jelölt vonalak az egyes állatcsoportok közötti szignifikáns eltérést jelölik. *P < 0,05.

4.6.2. Az amylin-hiányos egér anyák depresszió-szerű viselkedése

Az amylin-gén hiányának kényszeres úszás tesztben mért aktivitásra kifejtett hatását is megvizsgáltuk. A teljes kísérleti időnek (6 min) a WT kontroll nőstények

53,40 ± 5,08 %-át, KO kontroll nőstények 60,45 ± 3,71 %-át; WT laktáló anyák 69,82 ± 4,20 %-át, KO egér anyák 53,66 ± 4,47 %-át; WT szenzitizált nőstények 48,97 ± 4,82 %,-át KO szenzitizált nőstények 59,17 ± 5,59 %-át töltötték aktív viselkedéssel (30. ábra). A kétutas ANOVA-val történt statisztikai elemzés során a reproduktív státusz és a genotípus aktív viselkedésre kifejtett hatását vizsgáltuk. Vad típusú laktáló anyák szignifikánsan több időt töltöttek aktív viselkedéssel, mint a vad típusú kontroll nőstények ($P< 0,05$, $F=2,55$), ezt a szignifikanciát a Bonferroni-féle post hoc teszt is megerősítette ($p< 0,05$). További szignifikáns eltérést tapasztaltunk vad típusú laktáló anyák és szenzitizált nőstények között: a WT laktáló egerek szingifikánsan több időt töltöttek aktívan, mint az azonos genotípusú szenzitizált nőstények ($P< 0,01$, $F=3,239$), mely szignikáns eltérést a Bonferroni-féle post hoc teszt is megerősítette ($p< 0,01$). A genotípus hatásának vizsgálata során megállapítható volt, hogy amylin-hiányában a laktáló egér anyák aktív viselkedéssel töltött ideje szignifikánsan kisebb volt a vad típusú anya állatokéhoz képest ($P< 0,05$, $F=2,807$). Bonferrroni-féle post hoc analízist követően ez a szignifikancia megerősítésre került ($p< 0,05$). A 30. ábrán csak ez utóbbi, a WT laktáló anya *vs.* KO laktáló anya közti szignifikancia került feltüntetésre.

DOI:10.14753/SE.2016.1942



30. ábra. Vad típusú és amylin-hiányos kontroll nőstény, laktáló anya és szenzitizált nőstény egerek aktív viselkedéssel töltött ideje kényszeres úszás tesztben

Vad típusú (világoszöld oszlop) és amylin-hiányos (sötétzöld oszlop), különböző reproduktív státuszban lévő egerek kényszeres úszás tesztben mért aktív viselkedéssel töltött idejét tekintve szignifikáns eltérés volt tapasztalható egyrészt a WT kontroll nőstények és WT laktáló anyák között: az egér anyák szignifikánsan több itőt töltöttek aktív viselkedéssel, mint a kontroll nőstények, másrészt a WT laktáló állatok a WT szenzitizált nőstényeknél is szignifikánsan több időt töltöttek aktív magatartással. Amylin gén hiányában ugyanakkor csökkent a laktáló anyák aktív viselkedéssel töltött ideje, és ez az eltérés szignifikáns volt a WT anya állatokéhoz képest. Az oszlopokat összekötő, csillaggal (*) jelölt vonalak az állatcsoportok közötti szignifikanciát jelölik. *$p < 0,05$.

DOI:10.14753/SE.2016.1942

5. MEGBESZÉLÉS

Az amylin anyai viselkedés szabályozásában betöltött szerepét több megközelítésben is megvizsgáltuk. A megbeszélés során elsőként az amylin indukciójának, központi idegrendszeren belüli lokalizációjának, majd ovariectomiát, szenzitizálást és éheztetést követő kifejeződésének, illetve az amylin-ir neuronok anyai aktivációjának megbeszélésére kerül sor. Munkám részét képezte az amylin és a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer anatómiai és funkcionális kapcsolatának vizsgálata, mellyel kapcsolatos eredményeink megbeszélésére szintén a következőkben kerül sor. Az amylin egerekben, patkányokhoz hasonló módon, bekövetkezett megjelenése miatt először olyan viselkedési teszteket kerestünk, amelyek alkalmasak az anyai motiváció és az anyákban bekövetkező emocionális változások leírására, így a munkám során vad típusú kontroll nőstények, laktáló anyák és anyai viselkedésre szenzitizált nőstény egereken elvégzett viselkedési tesztek (kondícionált helypreferencia teszt, kényszeres úszás teszt) során kapott eredményeink kerülnek megbeszélésre. Ezt követően a vad típusú egereken validált teszteket amylin-hiányos kontroll nőstényekkel, laktáló anyákkal és szenzitizált állatokkal is elvégeztük, ezen eredmények tükrében pedig az amylin az anyai motiváció kialakulásában, illetve a szülést követő emocionális változásokban betöltött szerepére következtetünk.

5.1. Az amylin-indukció időbeli lefolyása és eloszlása patkányokban és egerekben

Az *in situ* hibridizációs hisztokémia során patkány és egér anyák esetén kimutatott, a szülést megelőző állapothoz képest bekövetkező, emelkedett amylin jel az amylin-szint jelentős mértékű emelkedésére enged következtetni. Eredményeink nem csupán az amylin indukciójára, hanem annak időbeli lefolyására vonatkozóan is szolgáltattak adatokat. Az amylin mRNS indukciója a szülés előtt 1 nappal (a vemhesség 21. napján) még nem, de az azt követő napon már bekövetkezett, és a postpartum időszak előrehaladtával további emelkedést mutatott. Az amylin immunreaktivitás szintén a szülést követően, és nem azt megelőzően (vemhesség idején) jelent meg. Ez megerősíti az ISH hisztokémiával kimutatott amylin jel

specificitását, továbbá ezáltal feltételezhető, hogy az amylin mRNS-szintjének emelkedését a funkcionális peptid megjelenése követi. Az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek és az amylin-immunreaktív neuronok számának összehasonlítása metodikai nehézségekbe ütközik, ugyanis az immunhisztokémiára előkészített metszetek vastagabbak (50 µm; ISH hisztokémia esetén ez 12 µm), ugyanakkor az antiszérum penetrációja ennél kisebb. Mindazonáltal az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek és az amylin immunreaktivitást mutató neuronok patkány anyák preopticus területén belüli eloszlása megegyezett. Ennek ismeretében ezeket a sejteket amylin neuronokként definiáltuk. Az amylin neuronok a preopticus area jelentős, de nem minden részén, elszórtan helyezkednek el. Az amylin idegsejtek az MPN, az MPA, valamint a BNST ventrális részére korlátozódnak, amely területeken az amylint nem tartalmazó idegsejtekkel hasonló arányban fordulnak elő, és azokkal egyenletes eloszlást mutatnak.

Az amylin mRNS-indukciója nem csupán patkány anyák, hanem laktáló egerek esetén is bekövetkezett. Egerek esetén az indukció helye és körülményei a patkányokénál leírtakéval megegyezett: csak a szülést követően, és a központi idegrendszeren belül csak a mediális preopticus terület bizonyos részein (MPN, MPA), valamint a BNST ventrális területén következett be. Patkányok és egerek anyai viselkedését tekintve sok hasonlóság fedezhető fel: az anyai viselkedést befolyásoló területek azonosak, továbbá az anyai viselkedés megjelenési formái, a kölyökgondozó magatartás elemei szintén nagyon hasonlók. A két modellszervezet homológ területein hasonló körülmények között indukálódó amylin szerepe a két állatcsoport esetén azonos lehet.

A perifférián előforduló amylinről ismert, hogy a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben vezikulumokban tárolódik és onnan szabadul fel (Young 2005b); ennek ismeretében valószínűsíthető, hogy a központi idegrendszeri amylin a preopticus terület neuronjaiból szabályozott vesicularis transzport során ürül. A perifériás amylin az inzulinnal együtt szekretálódik, legjobban ismert funkciója az étkezés leállítása a vércukorszint emelkedésének hatására (Lutz 2006). Ugyanakkor a hasnyálmirigyben expresszálódó amylin szintjét a kölykök jelenléte nem befolyásolja, tehát a táplálékfelvétel szabályozásán kívül az anyai viselkedés szabályozásában nem vesz részt, szemben a patkány anyák központi idegrendszerében megjelenő amylinnel, mely

szintje mindaddig magas marad, ameddig az anya állatok kölykeik jelenlétében vannak (Dobolyi 2009).

Az anyai magatartásban bizonyított szerepük ellenére a prolaktin, az oxytocin és a vazopresszin a preopticus területen belül nem mutatható ki, még patkány anyákban sem. Mindazonáltal ezek a peptidek a preopticus területen végződő terminálisokból felszabadulva fejthetik ki hatásukat az anyai viselkedésre úgy, ahogy a vazopresszin esetében ez nemrég bizonyítást nyert (Bosch és mtsai 2010). Más neuropeptidek, úgymint az opioidok, a tachykininek és a kortikotropint felszabadító hormon nem csak a preopticus területen (Tohyama és Takatsuji 1998), hanem az agy számos más részén is expresszálódnak. Ezzel szemben az amylin csak a preopticus területre korlátozódó expressziója révén a neuropeptidek között egyedülálló előfordulással rendelkezik.

5.2. Amylin-indukció ovariectomia, anyai viselkedésre való szenzitizálás, illetve éheztetés hatására szűz nőstény patkányok preopticus területén

Mivel az amylin patkányok és egerek esetén az anyai viselkedés szabályozásában központi szerepet játszó területen egy erőteljes hormonális változásokat jelentő időszakban, a postpartum periódusban jelenik meg, ezért felmerült annak lehetősége, hogy indukciója szteroid hormonok által mediált folyamat. Míg ovarieoctomian átesett nullipara nőstények esetén amylin mRNS nem volt kimutatható a preopticus területen, az ovariectomiat követő szenzitizálás hatására mégis bekövetkezett az amylin központi idegrendszeri indukciója. Az ISH hisztokémia által nyert adatokat kvantitatív RT-PCR segítségével validáltuk, amely az anyai viselkedést mutató (szenzitizált) nőstény patkányok esetén az amylin indukcióját megerősítette. Szenzitizált nőstények amylin neuronjainak preopticus területen belüli eloszlása az anya patkányoknál leírtakkal egyezett meg.

Az amylint elsőként a pancreas Langerhans-szigeteiben szekretálódó perifériás hormonként ismerték fel, mely az area postreman keresztül hatva szabályozza a táplálékfelvételt. Legtöbbet vizsgált rövid távú anorexigén hatása mellett további funkcióját mutatták ki adipozitási szignálként a táplálékfelvétel hosszú távú szabályozásában, emellett a nociceptív információ feldolgozásában, valamint legújabb tanulmányok szerint a kardiovaszkuláris szabályozások, renális hatások és bizonyos

neurológiai és pszichiátraia kórképek kialakulásában. Ezért az irodalmi adatok ismeretében RT-PCR technika alkalmazásával összehasonlítottuk az amylin mRNS mennyiségét éheztetés, valamint kölykök folyamatos jelenléte által szenzitizálódott és anyai viselkedést mutató szűz nőstény patkányok esetén. Az éheztetés az amylin mRNS szintjére hatástalan volt, amihez képest a szenzitizálás eredményeként jelentős mértékű amylin indukció volt megfigyelhető a preopticus területen. Patkány anyák perifériás amylin szintjének vizsgálata során nem találtunk különbséget a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben expresszálódó amylin mennyiségében kölykök jelenlétének vagy azok hiányának függvényében sem. Tehát a központi és perifériás amylin indukciójának hatásmechanizmusa két, teljesen eltérő módon valósul meg: a periférián szecernálódó amylin esetén a kölykök jelenléte, illetve azok hiánya nem, csak maga a táplálékfelvétel, illetve az azt követő, hasnyálmirigyben bekövetkező szekréciós változások, míg a preopticus területen megjelenő amylin esetén a kölykök jelenléte a hormon expressziójának kiváltója.

A szenzitizált állatok RT-PCR vizsgálattal kimutatott, központi idegrendszerben bekövetkezett indukcióját amylin immunhisztokémiai festés révén is megvizsgáltuk. Ennek során nem csak igazoltuk, hogy a szenzitizálás hatására maga a funkcionális peptid is megjelenik a preopticus területen, hanem bizonyítottuk, hogy nem csak a kölykök jelenléte, hanem az irányukba mutatott kölyökgondozó magatartás az, ami az amylin indukciójához szükséges, ugyanis az anyai magatartást mutató, tehát a szenzitizálási folyamat eredményeként valóban szenzitizálódott szűz nőstény patkányok esetén megjelenik az amylin peptid, és ennek eloszlási mintázata az anya patkányokéval egyezett meg, míg a szenzitizálási folyamat ellenére anyai viselkedést nem, hanem a kölykökkel szemben averzív magatartást mutató nullipara nőstényeknél amylin-indukció nem következett be a preopticus területen. A nem szenzitizálódott állatok negatív amylin festése azokkal a kontroll nőstényekével egyezett meg, akik kölykökkel még sosem kerültek kapcsolatba.

Az anyai viselkedésre szenzitizált nullipara nőstények vizsgálatának külön jelentőségét az adja, hogy mivel ezek az állatok nem szoptatnak, így a szoptatás által fennálló metabolikus terhelésnek nincsenek kitéve, ezért alkalmasak az anyai viselkedés szabályozásának metabolikustól független vizsgálatára (Fleming és Rosenblatt 1974, Rosenblatt 1967). Az MPOA felelős a vemhesség során bekövetkező hormonális

változások érzékeléséért, és feltehetően az amygdala-anterior hypothalamus szuppresszálása, valamint a mesolimbicus dopaminerg pálya aktiválása révén ez a területe felelős a szülés körül kialakuló kölykökkel szembeni averzió megszűnéséért, amely averzió hormonális változások nélkül, folyamatos kölyökexpozíció hatására is bekövetkezhet rágcsálókban.

Az amylin neuropeptidként való definiálását tovább erősíti az a tény, hogy az amylin a szűz, még nem szült, de a szenzitizálást követően anyai viselkedést mutató nőstény patkányok preopticus területén is az anya patkányokban leírt eloszlással megegyező módon megjelenik. Az ovariectomia az amylin megjelenésére hatástalan volt, ez tehát az amylin kölykök általi, ugyanakkor szexuálhormonoktól független indukcióját feltételezi. A preopticus area bilaterális lézióját követően az anyai viselkedés teljesen megszűnik (Numan 1986); így az ezen a területen megjelenő amylin az anyai magatartás szabályozásában játszhat szerepet. Az amylin utódgondozó magatartásban feltételezett szerepét tovább erősíti az a tény, hogy az amylin nem laktáló, de fészket építő, kölyköket fészekbe visszahordó, kölykök anogenitális nyalogatását végző, tehát szenzitizálódott, azaz anyai viselkedést mutató, szűz nőstényekben is megjelenik.

5.3. A preopticus területen lévő amylin-tartalmú idegsejtek anyai aktivációja

Az amylin neuronok aktivációs vizsgálata során az aktivált sejtekben kifejeződő, korai aktivációs gén termékeként ismert c-fos fehérjét (Herdegen és Leah 1998) a sejtszintű aktiváció markereként alkalmaztuk. Anya patkányok preopticus területén kölykök hatására megnő a c-fos pozitív sejtek száma. A c-fos-t expresszáló sejtek jelentős mennyisége volt megfigyelhető az MPN, az MPA, valamint a BNST ventrális részén. Vizsgálatunk során patkány anyákban kölykök hatására c-fos-t expresszáló idegsejtek megjelenése és preopticus területen belüli eloszlása a korábbi irodalmi adatokkal egyezett meg (Lonstein és mtsai 1997, Numan és Numan 1997, Stack és Numan 2000). Ezenfelül c-fos és amylin kettős immunhisztokémia, valamint c-fos immunhisztokémia és amylin ISH hisztokémia kombinálásával az is megállapítható volt, hogy csaknem valamennyi amylin neuron aktiválódott kölykök visszaadásának hatására, ami a patkány anyákban kifejeződő amylin neuronok kölykök jelenlétében

bekövetkező magas szintű aktivitására utal. Továbbá ez azt is jelentheti, hogy nem csak az amylin indukciója, hanem annak aktivációja is kölykök jelenlététől függő folyamat. Így az amylin a patkány anyák preopticus területén, kölykök jelenlétének hatására aktiválódó idegsejtek markere is lehet. Az amylin pozitivitással azonosított sejtek elektrofiziológiai vizsgálata, illetve géntechnikai eszközökkel való módosítása pedig ezen, kölykök hatására aktiválódó sejtek szelektív funkcionális vizsgálatát teszik lehetővé.

Az, hogy a kölyköktől származó ingerek közül mely, vagy melyek felelősek az amylin neuronok aktivációjáért, egyelőre nem ismert. A kölyköktől származó, az amylin neuronok aktivációjában elsődlegesen szerepet játszó stimulus az anyai adaptációk fő hajtóerejeként ismert szoptatás, illetve a szoptatás jelentette visceroszenzoros inger lehet. A szopási inger jelentette aktiváció érkezhet a thalamus posterior intralaminaris komplexében található TIP39 neuronok felől, melyek a szopási információ átkapcsoló állomásaként, a mediális hypothalamicus területekre való projekciójuk révén részt vesznek a szopás hatására bekövetkező prolaktin felszabadulásban (Cservenák és mtsai 2010). Mivel a thalamus ezen területe a preopticus terület egyik neuronális bemenetét jelenti (Coolen és mtsai 1998); így az amylin neuronok aktivációja a szopási információt közvetítő posterior thalamicus TIP39 idegsejtek révén is megvalósulhat (Dobolyi 2011). A neuronális kapcsolatokat feltérképező pályajelölési technikák alkalmazásával a preopticus terület számos egyéb bemenetét is sikerült azonosítani (Simerly és Swanson 1986). A preopticus areával anatómai és funkcionális kapcsolatban álló, a preopticus terület bemeneteit jelentő idegsejtek kölykök visszaadásának hatására aktiválódnak (Li és mtsai 1999, Lin és mtsai 1998a), és így, a kölyköktől származó vizuális, auditoros, olfactoros és exteroceptív ingereket közvetítve vehetnek részt az amylin neuronok kölykök hatására bekövetkező aktivációjában.

A szülés, illetve a szenzitizálás hatására az amylin szintjében bekövetkező jelentős mértékű emelkedés, valamint az amylin neuronok kölykök hatására megvalósuló aktivációja alapján az amylin az anyai funkciók szabályozásában vehet részt. A laktáció az anya állatok számára erőteljes metabolikus megterhelést jelent, a laktáció időtartama alatt az anya állatok jelentős súlycsökkenése figyelhető meg (Augustine és mtsai 2008, Smith és Grove 2002). A testsúly csökkenése mellett ugyanakkor a testzsír aránya a laktáció során növekszik, ami feltételezhetően inkább a

specifikus anyai adaptáció következménye, mintsem az egész élethossz alatt tartó homeosztatikus szabályozás eredménye (Woodside 2007). Mivel az agyban található amylin receptorok aktivációja feltételezhetően csökkenti kontroll (nem anya) patkányok esetén a testzsír százalékát (Rushing és mtsai 2001), így elképzelhető, hogy az anyai viselkedés szabályozása mellett a preopticus területen expresszálódó amylin szerepet játszik a laktáló anyák testsúly változásában. Azonban valószínűbb, hogy a központi idegrendszeri amylin anyai viselkedésre kifejtett hatása és a perifériás amylin anorexigén hatása egymástól független. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a perifériás amylin által közvetített anorexigén hatás a dorzális vagus komplex léziójával teljesen eliminálható (Lutz és mtsai 2001), továbbá az az eredményünk, mely szerint az éheztetés a központi idegrendszeri amylin indukciójára hatástalan volt.

Egy napos, kölyköktől való szeparációt követő 2 órán át tartó kölykökkel való együttlét a patkány anyák preopticus területén nagymértékű c-fos expresszióval jár (Lonstein és mtsai 1997, Numan és Numan 1997), ugyanakkor a c-fos-t expressszáló idegsejtek aránya a terület különböző szubdivíziói között nem egyforma, ez feltételezi azok eltérő mértékű szerepét bizonyos anyai magatartásfomák szabályozásában (Kuroda és mtsai 2007, Li és mtsai 1999, Stack és Numan 2000, Tsuneoka és mtsai 2013). Az amylint expresszáló neuronok kölykök visszaadásának hatására c-fos aktivációt mutatnak. Az aktivált preopticus neuronok számos, az anyai magatartás kialakulásában és szabályozásában szerepet játszó agyterületre vetülnek (Numan és Sheehan 1997). Az aktivált preopticus idegsejtekkel kapcsolatban álló területek közül számos, többek között a BNST, különböző hypothalamicus és amygdala magok és a periaqueductalis szürkeállomány, tartalmazza az amylin receptorát (Becskei és mtsai 2004, Sexton és mtsai 1994, Sheward és mtsai 1994).

A kölykök visszaadásának hatására aktiválódó mediális preopticus mag és az azt körülvevő területek az agy számos területére projíciálnak, többek között a laterális septum, a BNST, a substantia innominata, az amygdala, illetve a hypothalamus számos (periparaventricularis zóna, ventromediális mag, nucleus arcuatus, laterális hypothalamicus mag, periaqueductalis szürkeállomány) területére (Numan és Numan 1997, Simerly és Swanson 1988). Feltételezhető, hogy a projekciók egy része révén a preopticus területen előforduló amylin a projekciók célterületein található amylin receptorokon keresztül fejti ki hatását (Becskei és mtsai 2004, Sexton és mtsai 1994,

Sheward és mtsai 1994). Így az amylin és saját receptora egy peptid neuromodulátor rendszert alkotva befolyásolhatja az anyai viselkedést. Tehát az amylin számos, az anyai viselkedés valamely aspektusának szabályozásában részt vevő peptidhez – pl. prolaktin, oxytocin, vazopresszin, opioidok, tachykininek és kortikotropint felszabadító hormon - hasonlóan neuromodulátor funkciót tölthet be (Bosch és Neumann 2008, Leng és mtsai 2008, Numan és Insel 2003).

5.4. Az amylin-neuronok és a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer topográfiai és funkcionális kapcsolata

Az anyai viselkedés kialakulásában és szabályozásában részt vevő területek azonosítását a léziós kísérletek (Dobolyi és mtsai 2014, Izquierdo és mtsai 1992, Lee és mtsai 2000, Numan és mtsai 1988) és a Fos-aktivációt vizsgáló tanulányok (Chen és Smith 2003, Cservenak és mtsai 2013, Lin és mtsai 1998a, Lin és mtsai 1998b, Marina és mtsai 2002, Matsushita és mtsai 2015, Salmaso és mtsai 2010) mellett pályajelölési technikák tették lehetővé. Az MPOA és a BNSTv területére beadott retrográd pályajelölés és Fos-immunhisztokémia kombinálása révén azokat a területeket is sikerült azonosítani, amelyek az anyai válaszkészség kialakulásában vesznek részt (Numan és Numan 1997). Az MPN és az MPA neuronális bemenetei – nucleus septalis lateralis, medialis hypothalamus a nucleus ventromedialis magasságában, nucleus habenularis lateralis, VTA, retrorubralis mező, PAG – közül az anyai viselkedés során erős Fos-aktivációt mutató MPA sejtek a medialis hypothalamus, a nucleus ventromedialis magasságában, és a nucleus septalis lateralis területéről kapnak bemenetet, míg az erősen aktiválódott BNSTv neuronok a retrorubralis mező, PAG és a medialis hypothalamus területéről. Mind az MPA, mind a BNSTv területén jelen lévő és viszonylag gyenge anyai aktivációt mutató sejtek a PAG neuronjainak legnagyobb részével kapcsolatban álltak.

A medális preopticus area egyik, pályajelölési technikával kimutatott, jelentős bemenetét a thalamus intralaminaris komplexében található TIP39 neuronok adják (Cservenak és mtsai 2013). A TIP39 neuronok a preopticus területtel való kapcsolatuk révén az anyai motiváció szabályozásában vesznek részt, míg a nucleus arcuatust elérő projekcióikkal a szopás-által indukált prolaktin felszabadulásban vesznek részt. A TIP39 indukcióját, központi idegrendszeri megjelenésének körülményeit tekintve az

amylinhez nagyon hasonló: csak a postpartum időszakban a központi idegrendszer bizonyos területein jelenik meg, továbbá kölykök visszaadásának hatására Fos-, azaz anyai aktivációt mutat. A TIP39 a kettes típusú parathormon receptor endogén ligandja. Nemcsak a TIP39-sejtek preopticus areaval való közvetlen kapcsolatát, hanem a PTH2R ezen a területen belüli megjelenését is leírták (Dobolyi és mtsai 2006). A TIP39-rostok, továbbá a PTH2R-ir sejtek preopticus területen belüli mintázata, eloszlása az amylin neuronokéval megegyező volt. A TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer és az amylin anatómiai és funkcionális vizsgálata során a TIP39- és amylin kettős immunhisztokémiai festés segítségével jól látható módon a TIP39 rostok terminálisai az amylin sejtek közvetlen közelében végződnek. Az amylin TIP39-PTH2R rendszerrel való kapcsolatát tovább erősíti az a tény, hogy az amylin mRNS-t expresszáló, valamint amylin-immunreaktivitást mutató sejtek preopticus területen belüli eloszlása rendkívül hasonló a PTH2R területen belüli megjelenésével. A TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer és amylin funkcionális kapcsolatát sejteti, hogy kettes típusú parathormon receptor hiányában laktáló egér anyákban az amylin mRNS szintje a vad típusú állatokéhoz képest szignifikáns csökkenést mutatott. Mivel a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer szerepet játszik a szopás-által indukált anyai motiváció szabályozásában, így az amylinnel való kapcsolata révén ez az anyai magatartásra kifejtett TIP39-hatás az amylin neuronok beidegzése révén valósulhat meg.

5.5. A szülés és a szenzitizálás viselkedésre kifejtett hatása egerekben

Az anyákban endokrin és emocionális adaptációs folyamatok játszódnak le, melyek rövid idő alatt megteremtik az utódokról való gondoskodás feltételeit (Krasnow és Steiner 2006). Ezek közé az adaptációs folyamatok közé tartozik a szoptatás hatására bekövetkező prolaktin- és oxytocin-felszabadulás (Burbach és mtsai 2006, Freeman és mtsai 2000), a szuppresszált GnRH szekréció miatt bekövetkező laktációs anösztrusz (Mcneilly 2006), a betolakodókkal szembeni anyai agresszió, a csökkent szorongás, valamint a hypothalamo-hypophysis-mellékvese tengely csökkent érzékenysége (Carter és mtsai 2001). A szülést követő változások viselkedésbeli változásokkal járnak együtt.

Egerek anyai vizsgálatát különösen megnehezíti az a tény, hogy nullipara nőstények az anyai magatartáshoz hasonló, ún. spontán anyai viselkedést mutatnak, ennek következtében csak nemrégiben sikerült kimutatni, hogy T-labirintus tesztben a

C57BL/6J törzsbe tartozó egér anyák a kölykök fészekbe való visszahordását, mely aktív anyai viselkedésnek tekinthető, gyorsabban teljesítették, mint a nullipara nőstény egerek (Stolzenberg és mtsai 2012). Azt, hogy vajon a kölykök képesek-e az anya egerekben, a patkányokhoz hasonló módon helypreferenciát kialakítani, eddig még nem vizsgálták. Patkányok esetén a kondícionált helypreferencia tesztet az anyai motiváció mérésére csak az utóbbi időben kezdték alkalmazni (Pereira és Morrell 2011). A teszt során a patkány anyák két kompartment közül választhatnak, az egyik térfél az, ahol a tesztet megelőző kondícionálás során kölykeikkel együtt tartózkodnak, a másik egy számukra ismeretlen, neutrális doboz (Cservenak és mtsai 2013, Wansaw és mtsai 2008).

A postpartum periódusban az anya patkányok másik jellemző tulajdonsága a csökkent mértékű szorongás, amely feltehetően a kölykök felnevelése által jelentett teherrel segít megbirkózni (Hillerer és mtsai 2011, Silva és mtsai 1997). Humán adatokat tekintve az anyák egy részénél a szorongás mértéke a szülést követően megemelkedett, míg 10-15%-uknál a postpartum depresszióra jellemző tünetek mutatkoztak (Hirst és Moutier 2010, Patel és mtsai 2012). Ezen tények ismeretében megvizsgáltuk az egér anyák esetén jelentkező depresszió-szerű tünetek fennállását, mértékét. A szülést követő, depresszió-szerű viselkedés megváltozását több transzgén egértörzs esetén leírták (Chourbaji és mtsai 2011, Maguire és Mody 2008, Rich és mtsai 2014). A nagyszámú vizsgálatok ellenére csupán egy kutatás hasonlította össze szűz nőstények és anya állatok depresszió-szerű viselkedését, melyben az anyaságot antidepresszáns hatásként jellemezték (Maguire és Mody 2008). Az anyaság depresszió-szerű viselkedésre kifejtett hatását eddig még nem vizsgálták (Perani és Slattery 2014, Tarantino és mtsai 2011), ugyanakkor ez a humán vonatkozásokat tekintve is rendkívüli jelentőséggel bír, ezért a szülést követő hangulati változás mérésére a széles körben elterjedt kényszeres úszás tesztet alkalmaztuk (Bogdanova és mtsai 2013, Cryan és mtsai 2005). Mivel az állatok szteroid szintje a szülést követően lecsökken, ezért a kísérleteket (kondícionált helypreferencia teszt, kényszeres úszás teszt) az állapot modellezésére petefészekirtott nőstényekkel is elvégeztük.

Anya egerekben elsőként mutattunk ki kondícionált helypreferencia teszt során kölyök-asszociált dobozhoz való preferenciát. A helypreferencia feltehetően a kölykök jelenlétének következménye. Erre utal, hogy egér anyák esetén kölykök jelenlétében a

két doboz hasonlósága ellenére is megtörtént a két doboz közötti preferencia, továbbá az a tény, hogy amennyiben a két dobozt felcseréltük, és az eredeti kísérletben kontroll dobozként használt kompartmentet tettük meg a szenzitizáció és habituáció során kölyök-asszociált doboznak, megmaradt a preferencia az iránt a doboz iránt, ahol az anya állatok a kölykökkel együtt tartózkodtak, tehát nem maga a doboz mintázata, vagy az abban található tálka mérete, formája, azaz a dobozban található környezet váltotta ki a preferenciát. A kontroll nőstények, akik kölykökkel nem kerültek kapcsolatba, tendenciaszerűen a számukra ismeretlen kontroll dobozban tartózkodtak többet; ez explorációs aktivitásukkal magyarázható. Ugyanakkor eredményeink értelmében, anya állatok kevesebb időt töltenek a számukra ismeretlen kontroll dobozban, ami a kutató-kereső magatartást mérő tesztben mért csökkent szorongásuknak látszólag ellent mond (Leppanen és mtsai 2008, Maestripieri és D'amato 1991). A különböző csoportok (kontroll nőstények, laktáló egér anyák, szenzitizált nőstények) különböző kompartmentekben töltött eltérő ideje egybevág a patkányok esetén már korábban leírt eredményekkel (Cservenak és mtsai 2013, Mattson és mtsai 2003). A kölykök által indukált helypreferencia az anyai motiváció mérésére alkalmas módszer (Pereira és Morrell 2010, Wansaw és mtsai 2008). Patkány anyákat vizsgálva azt is kimutatták, hogy a laktáció első felében a kölyök-asszociált doboz iránti preferencia még a kokain-asszociált dobozzal szemben is megmarad (Ferris és mtsai 2005, Mattson és mtsai 2003). Operáns kondícionálás során, ahol a kölykök a pozitív megerősítő stimulust jelentették, patkány anyák a pedált kölykök hatására gyakrabban megnyomták (Lee és mtsai 2000). Ezenfelül a kölyök-asszociált helypreferencia és az anyai motiváció közötti korrelációt több esetben is leírták (Numan és Woodside 2010, Pereira és Morrell 2011, Seip és Morrell 2009). Az anya állatokban bekövetkező megnövekedett anyai motiváció, amely jól korrelál az aktív anyai viselkedés megjelenésével és fokozódásával, jól mérhető jelenség (Gandelman 1973, Stolzenberg és Rissman 2011), szemben a kontroll egerekben megjelenő spontán anyai viselkedéssel (Lonstein és De Vries 2000, Noirot 1969).

Az, hogy egér anyák esetén a kondícionált helypreferencia teszt alkalmas módszernek bizonyult a megnövekedett anyai motiváció mérésére, a további kutatások szempontjából is fontos megállapítás, hiszen egyre több olyan transzgén egértörzs áll rendelkezésünkre, melyek aktív anyai viselkedésüket tekintve a normálistól eltérő

módon viselkednek (Chourbaji és mtsai 2011, Lucas és mtsai 1998, Maguire és Mody 2008, Rich és mtsai 2014, Thomas és Palmiter 1997), így érdemes lehet megvizsgálni, hogy ezen állatok megváltozott aktív anyai viselkedése kihat-e anyai motivációjukra. Továbbá a viszonylag könnyen megvalósítható és általunk is alkalmazott, kölykök által indukált kondícionált helypreferencia teszt az ilyen transzgén egértörzsekben jelentkező változások vizsgálatának hasznos módja, amely így az anyai motiváció neurobiológiájának jobb megértéséhez járulhat hozzá (Olazabal és mtsai 2013). Fontos megjegyezni, hogy bár az aktív anyai viselkedésben bekövetkező változásokat az egereknél megjelenő jelentős mértékű spontán anyai viselkedések miatt nehezebb vizsgálni egerekben, mint patkányokban, ugyanakkor a kondícionált helypreferencia tesztek hasonló nagyságrendű eredményeket mutatnak mindkét fajnál (Lonstein és Fleming 2002), így ez a teszt mind egerek, mind patkányok esetén alkalmas az anyai motiváció vizsgálatára.

A kontroll nőstények által mutatott spontán anyai viselkedések magas arányának köszönhetően a nullipara nőstények négy napon keresztül tartó, napi 2-2 órás kölykökkel való együttléte (expozíciója) elegendőnek bizonyult T-labirintus tesztben egy aktív anyai viselkedésforma megjelenésére, a kölykök összegyűjtésére (Stolzenberg és mtsai 2012). Mivel a szenzitizációnak ez a módja (4 nap, napi 2-2 óra) a T-labirintus tesztben is ilyen jelentős és mérhető hatást váltott ki nőstény egereknél, ezért ugyanezt a szenzitizációs eljárást választottuk jelen tanulmányunkban. Elmondhatjuk, hogy a szenzitizáció időtartama elegendőnek bizonyult a kölyök-asszociált doboz iránti preferencia kialakulásához és annak megtartásához az azt követő kondícionált helypreferencia tesztben. A szenzitzált nőstényekben kialakult preferencia mértéke hasonló volt az anya egerekben tapasztalt preferenciához, ami azt feltételezi, hogy az anyai motiváció szenzitizált nullipara egerekben a laktáló anya egerekhez hasonló módon emelkedett meg. Ezt az eredményt több korábbi tanulmány is alátámasztja, amelyek a kölykök összegyűjtésének, az azokkal való interakciónak és a kölykök fölé görnyedések megnövekedett gyakoriságát írtak le szenzitizált egerek esetén (Stolzenberg és Rissman 2011).

Az anyai szenzitizáció mechanizmusai egerekben máig nagyrészt felderítetlenek. Patkányokban a szenzitizáció jelensége részletesebben tanulmányozott, így erről a fajról több adat áll rendelkezésre (Fleming 1994, Numan és mtsai 2006). Mivel a kontroll

nőstény patkányok elkerülik a kölyköket, ezért esetükben az anyai szenzitizáció kialakuláshoz az egereknél hosszabb, mintegy 3-8 nap folyamatos kölykökkel való együttlét, expozíció szükséges (Orpen és Fleming 1987, Rosenblatt 1967). A szenzitizált és anya patkányok anyai viselkedését tekintve a szakirodalom álláspontja nem egységes, hiszen számos tanulmány szerint a szenzitizált és a laktáló anya patkányok anyai viselkedése egymástól nem különböztethető meg (Bridges és mtsai 1972, Fleming és Rosenblatt 1974, Reisbick és mtsai 1975), ugyanakkor néhány tanulmány ez ellen érvel (Gandelman 1973). Kontroll nőstény patkányoknál a kölykök elkerülését szaglási ingerek vezérlik, és ennek a kölykökkel szembeni averziónak kell megszűnnie a szenzitizációs folyamat során. A hypothalamus preopticus areáját elérő, kölykök által kiváltott szomatoszenzoros ingerek fontosak az anyai viselkedések kiváltásában (Cservenak és mtsai 2013, Numan és Sheehan 1997, Terkel és mtsai 1979), továbbá hozzájárulhatnak a kölykök szaga jelentette inhibitoros hatás eltűnéséhez (Brunton és Russell 2008, Gammie 2005). Léziós kísérletek alapján feltételezhető, hogy a preopticus area szintén szükséges a kölykök által kiváltott kondícionált helypreferencia kialakulásához (Pereira és Morrell 2011). Egereknél a kölykök szaga feltehetően nincs gátló hatással az anyai viselkedés és válasz kialakulására, ahogy ez a kontroll nőstények által mutatott spontán anyai viselkedések és a rövidebb szenzitizációs folyamat alapján feltételezhető. Továbbá ovariectomizált egerek és hormonpótlás alatt álló egerek vizsgálata azt sugallja, hogy az anyai motiváció inkább a kölykök érzékelésétől, mintsem a petefészekhormonok jelenlététől függ (Ehret 1989, Stolzenberg és Rissman 2011). Kondícionált helypreferencia teszt során valóban nem találtunk különbséget a normál hormonális ciklussal rendelkező kontroll és a petefészekirtott nőstények között, míg a kontroll és ovareictomizált nőstények magatartásával szemben szenzitizált állatok esetén megjelent a kölyök-asszociált dobozhoz való preferencia.

Anya egerekben csökkent mértékű szorongás mutatható ki a postpartum időszakban (Leppanen és mtsai 2008, Maestripieri és D'amato 1991). A postpartum egerek ezen tulajdonsága hasonló az anya patkányokéhoz, melyekre szintén, a kontroll nőstényekhez képest alacsonyabb szintű szorongás jellemző (Hillerer és mtsai 2011, Neumann 2003). Patkány anyákhoz hasonlóan az anyai viselkedésre szenzitizált nőstény egerek szorongása az azt mérő tesztekben a nem anya egerekhez képest jelentős

mértékben alacsonyabb volt, ugyanakkor ennek mértéke laktáló nőstényekben még ennél is jobban lecsökkent (Pereira és mtsai 2005). A depresszió-szerű viselkedés vizsgálatára a leggyakrabban alkalmazott módszer a terhességi modell, mely a terhesség alatt bekövetkező hormonszint változásokat modellezi: a krónikus ösztrogén vagy progeszteron kezelés alatt álló nullipara nőstények szteroid megvonását követően a depresszió-szerű viselkedések száma megnőtt (Beckley és Finn 2007, Brummelte és Galea 2010, Galea és mtsai 2001). Ezt követően azonban, ez a modell, úgy tűnik, nem ismétli meg teljesen a kezeletlen anya patkányok postpartum periódusát, a depresszió-szerű tünetek nem lettek gyakoribbak (Craft és mtsai 2010, Fernandez és mtsai 2014). További, a depressziós állapot mérésére alkalmas és széles körben elterjedt eljárás a cukorpreferencia vizsgálata (Fodor és mtsai 2012). Az anhedónia, amely a jutalom iránti magatartás csökkent motivációjában nyilvánul meg, a klinikai depresszió jellemző tünete. Depresszió-szerű tüneteket mutató állatmodellekben az anhedónia az édes folyadák iránti csökkent preferenciában nyilvánul meg. A teszt validitását az adja, hogy antidepresszív kezelés hatására a tesztben mérhető módon csökken az anhedónia mértéke. Valójában az egyetlen postpartum egér anyák és nullipara nőstény egerek depresszió-szerű viselkedését összehasonlító tanulmány egy GABA A receptor alegység hiányát vizsgáló kísérlet része volt, melyben szülést követően a passzív viselkedések csökkenése, tehát az antidepresszív tünetek megjelenése volt tapasztalható kényszeres úszás tesztben (Maguire és Mody 2008). Tanulmányunk ezt az eredményt alátámasztja, mivel a szülést követő 8. napon vizsgált egér anyák esetén kimutattuk azok csökkent passzivitását, illetve ennek reciprok eredményeként az antidepresszív viselkedés jelének tekinthető aktív viselkedések megnövekedett mértékét. Továbbá azt is megállapítottuk, hogy szenzitizált nőstények esetén a kényszeres úszás tesztben mért depresszió-szerű viselkedés nem változik. Így az anyai motivációban és anyai viselkedésben bekövetkező növekedés elkülönül a folyamatos depresszió-szerű viselkedésektől szenzitizált egerek esetén, amely azt feltételezi, hogy a szenzitizációs folyamat a nőstény egerek emocionalitását az egér anyákétól eltérő módon változtatja meg. Lehetséges, hogy a peripartum hormonális változások vagy a tényleges szopási inger szükséges a depresszió-szerű viselkedések csökkenéséhez. Az utóbbi, tehát a valódi szoptatás, valószínűbbnek tűnik, mivel bár a postpartum periódusra a szexuálszteroid hormonok alacsony szintje jellemző (Howard Kinsley 1994), ugyanakkor az ovariectomia hatására

kialakuló magatartás az anya állatokban leírtakkal ellentétes: kísérletünkben a korábbi irodalmi adatokhoz hasonlóan (Okada és mtsai 1997, Rocha és mtsai 2005) a petefészekirtás, tehát a szexuálszteroidok hiánya, megemelkedett depresszió-szerű viselkedést okozott. Másodsorban korábbi tanulmányok szerint az utódokkal való szoros kapcsolat, azaz kölyök-expozíció szükséges a depresszió-szerű viselkedések csökkenéséhez (Pawluski és mtsai 2009). Ugyanakkor a kölykök hatásán kívül más mechanizmusok is feltételezhetők a postpartum periódus során jelentkező hangulati állapotok szabályozásában (Perani és Slattery 2014), beleértve a hormonokat és az olyan neuropeptideket, mint a prolaktin, az oxytocin, a vasopresszin, a CRH és az amylin (Bosch 2011, Carter és mtsai 2001, Neumann 2003, Szabo és mtsai 2012). Emellett a kölyköktől érkező ingerek hatására direkt aktiválódó idegi mechanizmusok szintén szerepet játszhatnak az emocionális válaszkészségben (Cservenak és mtsai 2013, Dulac és mtsai 2014, Moses-Kolko és mtsai 2014, Numan és Woodside 2010, Olza-Fernandez és mtsai 2014, Pawluski és mtsai 2009). Jelen tanulmányunkban a postpartum egerekben megfigyelt antidepresszív viselkedés általunk megadott leírása képezi az egerekben bekövetkező érzelmi változások vizsgálatának alapját. A kényszeres úszás teszt azonban a depressziónak csak az érzelmi változáshoz kapcsolódó egyik aspektusát vizsgálja (Binder és mtsai 2011). Más, gyakorta alkalmazott állatkísérletek a farkon lógatás és a cukorpreferencia mértékét mérő teszteket alkalmazzák a depresszió-szerű tüneteket vizsgálatára (Brenes Saenz és mtsai 2006, Kreiner és mtsai 2013). A cukorpreferencia teszt különösen érdekes lehet patkány anyák esetén, mivel az a depresszió egy más aspektusát, az anhedóniát vizsgálja (Papp és mtsai 1991). Patkányokban az anyák többsége alacsony cukorpreferenciát mutat (Fernandez és mtsai 2014). A postpartum érzelmi változások vizsgálata különösen fontos, mivel humán vonatkozásban óriási hatással bír az anya, gyermeke és a családja jóllétére (Breese Mccoy 2011, Goodman és Santangelo 2011, Meltzer-Brody 2011). Transzgén egérvonalak tanulmányozásával az anyai kötődés, az anyai viselkedés és az anyákra jellemző megnövekedett alkalmazkodó képesség génszintű vizsgálatára nyílhat lehetőség.

5.6. Az egér anyák és a szenzitizált nőstény egerek amylin gén hiányában bekövetkező megváltozott viselkedése

Az anyai viselkedés szabályozásának megértéséhez a korszerű metodikai fejlődés, a molekuláris biológiai és genetikai eszközök széleskörű elterjedése teszi indokolttá és lehetővé az egér mint modellszervezet felhasználását. Így prolaktin, oxytocin, norepinefrin, ösztrogén, glukokortokiod és GABA receptor alegység génhiányos egerek révén vált vizsgálhatóvá az anyai viselkedés számos aspektusa (Chourbaji és mtsai 2011, Lucas és mtsai 1998, Maguire és Mody 2008, Ogawa és mtsai 1998, Rich és mtsai 2014, Thomas és Palmiter 1997), az utóbbi időben ezt egészíti ki számos, virális és optogenetikai technika alkalmazásával született eredmény (Wu és mtsai 2014). Ezek mellett még számtalan más tanulmány vizsgálta az anyai viselkedés egerekre jellemző formáit (Dulac és mtsai 2014, Lonstein és Fleming 2002). Ezen felül a legújabb molekuláris biológiai-genetikai kutatások képesek a preopticus területen belül elhelyezkedő specikfikus neuronpopulációk izolálására és az anyai viselkedésben betöltött egyéni szerepük vizsgálatára (Dulac és mtsai 2014).

Mivel az amylin anyai viselkedésben betöltött szerepét vizsgálataink során több aspektusból is bizonyítottuk, ezért dolgozatom előző pontjában validált két, az anyai viselkedést mérő tesztet amylin-gén hiányában is elvégeztük. Az anyai motivációt mérő kondícionált helypreferencia elvégzése során a reproduktív státusz (nullipara nőstény *vs.* laktáló anya), valamint a genotípus között nem találtunk különbséget: a még nem szült és kölykökkel kapcsolatba nem került nőstények a számukra ismerős, de számukra kölykök jelenlétéhez nem kötött ún. kölyök-asszociált dobozban ugyanannyit tartózkodtak, mint az amylin KO kontroll nőstények, ami egyik állatcsoport esetén sem érte el a teljes kísérleti idő felét, tehát ezek az állatok ezt a térfelet nem preferálták. Ugyanakkor laktáló egér anyák a kísérleti idő jelentős részét abban a kölyök-asszociált dobozban töltötték, ahol a tesztet megelőző habituáció során a kölykökkel együtt voltak. Az egér anyáknál megfigyelt kölyök-asszociált doboz iránti helypreferencia amylin gén hiányában sem sérült, ugyanakkor az amylin KO anyák – vad típusú laktáló anya egerekhez hasonlóan – az ugyanazon genotípussal, de más reprodukciós fázisban lévő amylin KO kontroll nőstényekhez képest szignifikánsan többet tartózkodtak a kölykökhöz köthető kompartmentben.

Az amylin hiányában esetlegesen bekövetkező, postpartum időszakra jellemző emocionális változás vizsgálatára kényszeres úszás tesztet végeztünk. Előző kísérletsorozatunkban megállapítottuk, hogy az anyákban speciálisan végbemenő változások szükségesek az antidepresszív tünetek megjelenéséhez, mely emocionális változás a tesztben mért fokozott aktivitásban nyilvánul meg. A szenzitizálás révén anyai viselkedést mutató nullipara egerek a kontroll, azaz nem szenzitizált nőstényekhez hasonló módon viselkedtek: idejük jelentős részét passzív viselkedéssel töltötték, tehát depresszív tüneteket mutattak. A kontroll, illetve szenzitizált és laktáló anya patkányok közötti különbség szignifikáns volt. Amylin gén hiányában a kontroll nőstények vad típusú, tehát amylint expresszáló társaikhoz hasonló módon viselkedtek, depresszió-szerű tüneteket mutattak. Az amylin gén hiánya a szenzitizált állatok FST-ben mért passzivitására sem hatott. Ugyanakkor laktáló egér anyák amylin gén hiányában, vad típusú társaiktól eltérően, az FST tesztben csökkent aktivitást, azaz depresszió-szerű tüneteket mutatnak.

A vemhességet, a szülést, valamint a szülést követő postpartum időszakot a hormonális szintekben bekövetkező nagymértékű változások jellemzik. A harmadik trimeszter végére a plazma ösztrogén- és progeszteron szintje a normális menstruációs ciklusban mérhető szintek 50-, illetve 10-szeresére emelkedik. A szülést követően az emelkedett hormonszintek rendkívül gyorsan a korai folliculáris fázis 3. és 7 napja közötti szintre csökkennnek (Bloch és mtsai 2003). Ezen nagymértékű endokrin változásokat a postpartum depresszió kiváltásának legjelentősebb okaként tartják számon (Suda és mtsai 2008). Farmakológiai modellek ezt a hipotézist támasztják alá: a postpartum időszakra jellemző hormonális változások (a terhességre jellemző magas ösztrogén és progeszteron-szintek, majd a szülés után bekövetkező nagymértékű csökkenésük) művi úton történő előidézését követően a PPD előfordulási gyakorisága jelentősen megemelkedett. Igaz, statisztikailag ez az eltérés nem volt szignifikáns, mégis ezeket az endokrin történéseket a kedélyállapot negatív irányú megváltozásának egyik rizikófaktoraként tartják számon (Bloch és mtsai 2000), noha a postpartum depresszióhoz vezető neurobiológiai folyamatokat eleddig nem sikerült azonosítani. Számtalan, ezzel kapcsolatos tanulmányt patkányokon végeztek (Galea és mtsai 2001, Molina-Hernandez és Tellez-Alcantara 2001, Stoffel és Craft 2004). Bizonyos tanulmányok a korai laktációs fázis antidepresszív hatását mutatták ki (Molina-

Hernandez és Tellez-Alcantara 2001), míg más tanulmányok a hormonok által előidézett vemhesség ilyen jellegű hatását bizonyították (Galea és mtsai 2001, Stoffel és Craft 2004). Az a tény, hogy a progeszteron hatását tekintve képes a neurotranszmisszió befolyásolására, a PPD kialakulásának patofiziológiájában játszott feltételezett szerepét erősíti (Bloch és mtsai 2003). Az FST-ben a hormonális kezelés által előidézett vemhes állatok immobilitása szignifikáns csökkenést mutatott, mely az antidepresszív viselkedés jellemzőjének tekinthető magatartásbeli változás (Porsolt és mtsai 1979, Porsolt és mtsai 1977). Ugyanakkor a szorongást növelő szerek, pentylenetetrazol, kortikotropin-felszabadító faktor 1-es típusú receptor agonista, vagy a diazepam inverz agonistája, akutan mind csökkentik a FST-ben az immobilitással töltött idő mennyiségét (Cannizzaro és mtsai 1993, Nishimura és mtsai 1989, Tezval és mtsai 2004).

A kölykök sírása szintén képes aktiválni a mesolimbicus dopaminerg rendszert. Depressziós anyák esetén a kölykök sírásának hatására a nucleus accumbens csökkent aktivációt mutatott, ez az aktivitásbeli csökkenés egybecsengett ezen anyák csökkent anyai motivációjával (Laurent és Ablow 2012). Érdekes módon, depressziós és szerhasználó anyák prefrontális kérge kevésbé mutat aktivációt, ami összefüggésbe hozható azzal, hogy ezek az anyák kevésbé képesek szabályozni a kölykök sírásának hatására bekövetkező negatív érzelmeiket (Landi és mtsai 2011).

A postpartum időszakban megjelenő amylin részt vehet az anyákban zajló emocionális és endokrin változások szabályozásában. Az amylin és az anyai viselkedés általa szabályozott aspektusainak ismerete újfajta terápiás irányt is jelenthet az anyasághoz társuló diszfunkciók, főként a posztnatális depresszió kezelésében.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az amylin expresszió jelentős mértékű emelkedését mutattuk ki a szülést követően patkány és egér anyák preopticus területén. Míg a szülést megelőzően amylin mRNS-t expresszáló sejtek nem voltak jelen, az expresszió mértéke a szülést követő 9. napra jelentősen megemelkedett. A preopticus területen belül csak az MPN, az MPA, valamint a BNSTv területén következett be az amylin indukciója. A szülést követően ugyanezen a területen a funkcionális peptid is kimutatható volt.

2. Az amylin megnövekedett indukciója szintén megfigyelhető volt anyai viselkedésre szenzitizált, nem laktáló, nullipara nőstény patkányok esetén, ugyanakkor éheztetés, valamint ovariectomiát követően nem következett be, így az amylin megjelenése feltételezhetően a táplálékfelvételtől és a petefészekhormonok jelenlététől független, ugyanakkor kölykök jelenlétéhez kötött folyamat.

3. Kölyköktől való szeparáció hatására a preopticus terület Fos-aktivitása lecsökken, majd ismételt kölyökexpozíció hatására a területen nagymértékű neuronális aktiváció következik be. Az itt jelen lévő amylin neuronok jelentős része kölykök visszaadásának hatására c-fos, azaz anyai aktivációt mutattak.

4. Az amylin TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszerrel való kapcsolatát egyrészt az amylin neuronok és a TIP39-rostok terminálisainak területen belüli közelsége, másrészt az amylin mRNS-t expresszáló, valamint amylin immunreaktivitást mutató neuronok és a PTH2R-ir idegsejtek hasonló eloszlása, továbbá PTH2R hiányában az amylin csökkent mRNS szintje feltételezi.

5. Kondícionált helypreferencia teszt alkalmazásával kimutattuk a postpartum időszakban anya egerek és anyai viselkedésre szenzitizált nullipara nőstények esetén az anyai motiváció fokozódását. A rágcsálók depresszió-szerű viselkedésének leírására leggyakrabban használt kényszeres úszás teszt során az egér anyák antidepresszív tüneteket mutattak, ugyanakkor a depresszió-szerű viselkedés csökkenése nem volt kimutatható a szenzitizált és a kontroll szűz nőstényeknél.

6. Az amylin preopticus területhez kötődő megjelenése a kondícionált helypreferencia tesztben mérhető anyai motiváció mértékére nincs hatással, ugyanakkor amylin gén hiányában az anyák a kontroll és szenzitizált állatokhoz hasonlóan a kényszeres úszás tesztben depresszió-szerű tüneteket mutatnak.

DOI:10.14753/SE.2016.1942

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az amylin, egy 37 aminosavból álló, elsőként a hasnyálmirigyben azonosított peptid, központi idegrendszeri expresszióját elsőként kutatócsoportunk mutatta ki patkány anyák preopticus területén. Az amylin expressziója a szülés körül megemelkedett, és az amylin mRNS-szintje mindaddig emelkedett maradt, ameddig a patkány és egér anyák kölykeik jelenlétében voltak. Az amylin expressziója anyai viselkedésre szenzitizált, nem laktáló nullipara nőstényekben is bekövetkezett, ugyanakkor a nem szenzitizált, illetve a szenzitizálási folyamat ellenére anyai viselkedést nem mutató (nem szenzitizálódott) nőstényekben az indukció elmaradt. Immunhisztokémiai vizsgálattal igazoltuk az amylin peptid megjelenését anyai viselkedést mutató patkányokban és kimutattuk, hogy az amylin peptid eloszlása az *in situ* hibridizáció során kimutatott amylin mRNS eloszlásával megegyezett. Az ovariectomia az amylin indukciójára hatástalan volt, ez az amylin szexuálhormonoktól független indukcióját feltételezi. Funkcionális vizsgálatunk során bizonyítottuk, hogy 22 órás kölyköktől való szeparációt követő 2 órás kölyökvisszaadás hatására az amylin neuronok jelentős része, mintegy 86-93%-a c-fos aktivációt mutatott.

Az amylin és TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer kapcsolatát vizsgálva megállapítottuk, hogy a TIP39- és PTH2R tartalmú rostok a preopticus területen belüli elhelyezkedése az amylin neuronokéval megegyező. Továbbá, az amylin neuronok közvetlenül a TIP39-terminálisok mentén helyezkednek el, valamint PTTH2R hiányában az amylin mRNS szintje erőteljes csökkenést mutatott.

Az anyai motivációt mérő kondícionált helypreferencia teszt során az anya állatok és a szenzitizált nőstények szignifikánsan több időt tartózkodtak a kölyök-asszociált dobozban, míg kontroll nőstények és ovariectomián átesett egerek esetén hasonló preferencia nem alakult ki. A depresszió-szerű viselkedés vizsgálatára alkalmazott kényszeres úszás teszt során az anyák a szenzitizált és nőstény egerekkel szemben, szignifikánsan több időt töltöttek aktív magatartással. Amylin hiányában az anya állatokra jellemző anyai motiváció megtartott maradt, ugyanakkor az amylin KO anyák depresszió-szerű tüneteket mutattak a kényszeres úszás tesztben.

A patkány és egerek vizsgálata során kimutatott amylin indukció, időbeli megjelenés és eloszlási mintázat speciális jellege, valamint a TIP39-PTH2R

neuromodulátor rendszerrel való kapcsolata alapján, és a hiányában bekövetkező anyákban megjelenő depresszió-szerű viselkedés arra utal, hogy az amylin az anyai viselkedés bizonyos aspektusainak szabályozásában vesz részt.

DOI:10.14753/SE.2016.1942

8. SUMMARY

Amylin, a 37-AA peptide previously known to be released from the pancreas, was found to be expressed in the preoptic area of mother rats in our microarray study. A significant increase in amylin expression was found immediately after parturition, and remain elevated as long as the pups were not removed from the dams. Amylin expression was also induced in virgin but maternally behaving non-lactating but not in females who did not become maternal despite the sensitization procedure. Immunohistochemistry verified the increased amlyin peptide expression in maternally behaving rats and demonstrated the same expression pattern in dams as *in situ* hybridization. Ovariectomy had no effect on the activation of amylin neurons suggesting sexual steroid independent mechanisms. In subsequent functional experiments, mothers were separated from their pups for 22 h. On return of the pups, 86-93% of amylin neurons were activated in response to pup exposure suggesting their activation in dams.

Examing the relationship of amylin and the TIP39-PTH2R neuromodulator system we found that fibers containing TIP39 and parathyroid hormone 2 receptor have the similar distribution as amylin neurons in the preoptic area. Furthermore, amylin neurons were closely apposed by TIP39 terminals and in the lack of PTH2R a decreased amylin mRNA level was showed.

In the place preference test, to measure the maternal motivation state, mother and maternally sensitized female mice in pup-associated cage, while the virgin and ovariectomized mice did not show such preference. In the forced swimming test used to examine depression-like behavior, mother spent more time with active behavior than sensitized and virgin femal mice did. However in the lack of amylin mother mice showed elevated maternal motivational state, but the amlyin KO mice showed depression-like behavior in the forced swimming test.

The unique induction, time course and distribution pattern of amylin mRNA in mother rats and mice, its relationship with the TIP39-PTH2R neuromodulator system, and the elevated depression-like behavior in amylin KO mice implicate that amylin is a neuropeptide with specific maternal function.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Akman C, Uguz F, Kaya N. (2007) Postpartum-onset major depression is associated with personality disorders. Compr Psychiatry, 48: 343-347.

Alenina N, Kikic D, Todiras M, Mosienko V, Qadri F, Plehm R, Boye P, Vilianovitch L, Sohr R, Tenner K, Hortnagl H, Bader M. (2009) Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 10332-10337.

Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. (2004) Neuroendocrine control of body fluid metabolism. Physiol Rev, 84: 169-208.

Archbold JK, Flanagan JU, Watkins HA, Gingell JJ, Hay DL. (2011) Structural insights into ramp modification of secretin family g protein-coupled receptors: Implications for drug development. Trends Pharmacol Sci, 32: 591-600.

Aronne L, Fujioka K, Aroda V, Chen K, Halseth A, Kesty NC, Burns C, Lush CW, Weyer C. (2007) Progressive reduction in body weight after treatment with the amylin analog pramlintide in obese subjects: A phase 2, randomized, placebo-controlled, dose-escalation study. J Clin Endocrinol Metab, 92: 2977-2983.

Aston-Jones G, Delfs JM, Druhan J, Zhu Y. (1999) The bed nucleus of the stria terminalis. A target site for noradrenergic actions in opiate withdrawal. Ann N Y Acad Sci, 877: 486-498.

Augustine RA, Ladyman SR, Grattan DR. (2008) From feeding one to feeding many: Hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. Journal of Physiology, 586: 387-397.

Baisley SK, Bremer QZ, Bakshi VP, Baldo BA. (2014) Antipsychotic-like actions of the satiety peptide, amylin, in ventral striatal regions marked by overlapping calcitonin receptor and ramp-1 gene expression. J Neurosci, 34: 4318-4325.

Barofsky AL, Taylor J, Tizabi Y, Kumar R, Jones-Quartey K. (1983) Specific neurotoxin lesions of median raphe serotonergic neurons disrupt maternal behavior in the lactating rat. Endocrinology, 113: 1884-1893.

Barr RG. (2012) Preventing abusive head trauma resulting from a failure of normal interaction between infants and their caregivers. Proc Natl Acad Sci U S A, 109 Suppl 2: 17294-17301.

Beaumont K, Kenney MA, Young AA, Rink TJ. (1993) High affinity amylin binding sites in rat brain. Mol Pharmacol, 44: 493-497.

Beckley EH, Finn DA. (2007) Inhibition of progesterone metabolism mimics the effect of progesterone withdrawal on forced swim test immobility. Pharmacol Biochem Behav, 87: 412-419.

Becskei C, Grabler V, Edwards GL, Riediger T, Lutz TA. (2007) Lesion of the lateral parabrachial nucleus attenuates the anorectic effect of peripheral amylin and cck. Brain Res, 1162: 76-84.

Becskei C, Riediger T, Zünd D, Wookey P, Lutz TA. (2004) Immunohistochemical mapping of calcitonin receptors in the adult rat brain. Brain Research, 1030: 221-223.

Bell D, McDermott BJ. (1995) Activity of amylin at cgrp1-preferring receptors coupled to positive contractile response in rat ventricular cardiomyocytes. Regul Pept, 60: 125-133.

Benatti C, Alboni S, Montanari C, Caggia F, Tascedda F, Brunello N, Blom JMC. (2011) Central effects of a local inflammation in three commonly used mouse strains with a different anxious phenotype. Behavioural Brain Research, 224: 23-34.

Bhogal R, Smith DM, Bloom SR. (1992) Investigation and characterization of binding sites for islet amyloid polypeptide in rat membranes. Endocrinology, 130: 906-913.

Bienkowski MS, Rinaman L. (2011) Immune challenge activates neural inputs to the ventrolateral bed nucleus of the stria terminalis. Physiol Behav, 104: 257-265.

Bigal ME, Walter S, Rapoport AM. (2013) Calcitonin gene-related peptide (cgrp) and migraine current understanding and state of development. Headache, 53: 1230-1244.

Binder E, Malki K, Paya-Cano JL, Fernandes C, Aitchison KJ, Mathe AA, Sluyter F, Schalkwyk LC. (2011) Antidepressants and the resilience to early-life stress in inbred mouse strains. Pharmacogenet Genomics, 21: 779-789.

Bloch GJ, Eckersell C, Mills R. (1993) Distribution of galanin-immunoreactive cells within sexually dimorphic components of the medial preoptic area of the male and female rat. Brain Res, 620: 259-268.

Bloch M, Daly RC, Rubinow DR. (2003) Endocrine factors in the etiology of postpartum depression. Compr Psychiatry, 44: 234-246.

Bloch M, Schmidt PJ, Danaceau M, Murphy J, Nieman L, Rubinow DR. (2000) Effects of gonadal steroids in women with a history of postpartum depression. Am J Psychiatry, 157: 924-930.

Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. (2013) Factors influencing behavior in the forced swim test. Physiol Behav, 118: 227-239.

Bosch OJ. (2011) Maternal nurturing is dependent on her innate anxiety: The behavioral roles of brain oxytocin and vasopressin. Hormones and Behavior, 59: 202-212.

Bosch OJ. (2013) Maternal aggression in rodents: Brain oxytocin and vasopressin mediate pup defence. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 368: 20130085.

Bosch OJ, Neumann ID. (2008) Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105: 17139-17144.

Bosch OJ, Neumann ID. (2012) Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: From central release to sites of action. Horm Behav, 61: 293-303.

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. Journal of Neuroendocrinology, 22: 420-429.

Boyle CN, Rossier MM, Lutz TA. (2011) Influence of high-fat feeding, diet-induced obesity, and hyperamylinemia on the sensitivity to acute amylin. Physiol Behav, 104: 20-28.

Bratincsak A, Kovacs ZI, Palkovits M. (2008) Direct neuronal projection from a brainstem thermosensitive cell group to the preoptic thermoregulatory center. Neuroscience, 156: 966-972.

Breese McCoy SJ. (2011) Postpartum depression: An essential overview for the practitioner. South Med J, 104: 128-132.

Brenes Saenz JC, Villagra OR, Fornaguera Trias J. (2006) Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats. Behav Brain Res, 169: 57-65.

Bridges R, Zarrow MX, Gandelman R, Denenberg VH. (1972) Differences in maternal responsiveness between lactating and sensitized rats. Dev Psychobiol, 5: 123-127.

Bridges RS. (1984) A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. Endocrinology, 114: 930-940.

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: 782-784.

Bridges RS, Grimm CT. (1982) Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. Science, 218: 166-168.

Bridges RS, Hays LE. (2005) Steroid-induced alterations in mrna expression of the long form of the prolactin receptor in the medial preoptic area of female rats: Effects of exposure to a pregnancy-like regimen of progesterone and estradiol. Brain Res Mol Brain Res, 140: 10-16.

Bridges RS, Mann PE, Coppeta JS. (1999) Hypothalamic involvement in the regulation of maternal behaviour in the rat: Inhibitory roles for the ventromedial hypothalamus and the dorsal/anterior hypothalamic areas. J Neuroendocrinol, 11: 259-266.

Bridges RS, Robertson MC, Shiu RP, Friesen HG, Stuer AM, Mann PE. (1996) Endocrine communication between conceptus and mother: Placental lactogen stimulation of maternal behavior. Neuroendocrinology, 64: 57-64.

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: 837-848.

Brooks LR, Le CD, Chung WC, Tsai PS. (2012) Maternal behavior in transgenic mice with reduced fibroblast growth factor receptor function in gonadotropin-releasing hormone neurons. Behav Brain Funct, 8: 47.

Brown GW, Bifulco A, Harris TO. (1987) Life events, vulnerability and onset of depression: Some refinements. Br J Psychiatry, 150: 30-42.

Brummelte S, Galea LA. (2010) Depression during pregnancy and postpartum: Contribution of stress and ovarian hormones. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 34: 766-776.

Brunton PJ, Russell JA. (2008) The expectant brain: Adapting for motherhood. Nat Rev Neurosci, 9: 11-25.

Burbach JPH, Young LJ, Russell JA. Oxytocin: Synthesis, secretion, and reproductive functions. In: (szerk.), Knobil and neill's physiology of reproduction. 2006: 3055-3128.

Cadiz-Moretti B, Otero-Garcia M, Martinez-Garcia F, Lanuza E. (2014) Afferent projections to the different medial amygdala subdivisions: A retrograde tracing study in the mouse. Brain Struct Funct.

Cannizzaro G, Flugy A, Cannizzaro C, Gagliano M, Sabatino M. (1993) Effects of desipramine and alprazolam in the forced swim test in rats after long-lasting termination of chronic exposure to picrotoxin and pentylenetetrazol. Eur Neuropsychopharmacol, 3: 477-484.

Caplan HL, Cogill SR, Alexandra H, Robson KM, Katz R, Kumar R. (1989) Maternal depression and the emotional development of the child. British Journal of Psychiatry, 154: 818-822.

Carter CS, Altemus M, Chrousos GP. (2001) Neuroendocrine and emotional changes in the post-partum period. Prog Brain Res, 133: 241-249.

Champagne D, Beaulieu J, Drolet G. (1998) Crfergic innervation of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus: A tract-tracing study. J Neuroendocrinol, 10: 119-131.

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: 4113-4123.

Chawla MK, Gutierrez GM, Young WS, 3rd, McMullen NT, Rance NE. (1997) Localization of neurons expressing substance p and neurokinin b gene transcripts in the human hypothalamus and basal forebrain. J Comp Neurol, 384: 429-442.

Chen P, Smith MS. (2003) Suckling-induced activation of neuronal input to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: Possible candidates for mediating the activation of dmh neuropeptide y neurons during lactation. Brain Res, 984: 11-20.

Chourbaji S, Hoyer C, Richter SH, Brandwein C, Pfeiffer N, Vogt MA, Vollmayr B, Gass P. (2011) Differences in mouse maternal care behavior - is there a genetic impact of the glucocorticoid receptor? PLoS One, 6: e19218.

Christopoulos G, Perry KJ, Morfis M, Tilakaratne N, Gao Y, Fraser NJ, Main MJ, Foord SM, Sexton PM. (1999) Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. Mol Pharmacol, 56: 235-242.

Clarke H, Dhillo WS, Jayasena CN. (2015) Comprehensive review on kisspeptin and its role in reproductive disorders. Endocrinol Metab (Seoul), 30: 124-141.

Coolen LM, Peters HJ, Veening JG. (1998) Anatomical interrelationships of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: A combined fos and tract-tracing study. J Comp Neurol, 397: 421-435.

Coolen LM, Wood RI. (1998) Bidirectional connections of the medial amygdaloid nucleus in the syrian hamster brain: Simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. J Comp Neurol, 399: 189-209.

Corona R, Levy F. (2015) Chemical olfactory signals and parenthood in mammals. Horm Behav, 68: 77-90.

Craft RM, Kostick ML, Rogers JA, White CL, Tsutsui KT. (2010) Forced swim test behavior in postpartum rats. Pharmacol Biochem Behav, 96: 402-412.

Crestani CC, Alves FH, Gomes FV, Resstel LB, Correa FM, Herman JP. (2013) Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: A review. Curr Neuropharmacol, 11: 141-159.

Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. (2005) Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. Neurosci Biobehav Rev, 29: 547-569.

Cservenák M, Bodnár 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: 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: 3070-3084.

D'Este L, Wimalawansa SJ, Renda TG. (2001) Distribution of amylin-immunoreactive neurons in the monkey hypothalamus and their relationships with the histaminergic system. Arch Histol Cytol, 64: 295-303.

Daniel SE, Rainnie DG. (2015) Stress modulation of opposing circuits in the bed nucleus of the stria terminalis. Neuropsychopharmacology.

Dimitrov E, Usdin TB. (2010) Tuberoinfundibular peptide of 39 residues modulates the mouse hypothalamic-pituitary-adrenal axis via paraventricular glutamatergic neurons. J Comp Neurol, 518: 4375-4394.

Dimitrov EL, Kim YY, Usdin TB. (2011) Regulation of hypothalamic signaling by tuberoinfundibular peptide of 39 residues is critical for the response to cold: A novel peptidergic mechanism of thermoregulation. J Neurosci, 31: 18166-18179.

Dimitrov EL, Petrus E, Usdin TB. (2010) Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (tip39) signaling modulates acute and tonic nociception. Exp Neurol, 226: 68-83.

Dimitsantos E, Escorihuela RM, Fuentes S, Armario A, Nadal R. (2007) Litter size affects emotionality in adult male rats. Physiol Behav, 92: 708-716.

Ding YQ, Wang D, Xu JQ, Ju G. (1999) Direct projections from the medial preoptic area to spinally-projecting neurons in barrington's nucleus: An electron microscope study in the rat. Neurosci Lett, 271: 175-178.

Dobolyi A. (2009) Central amylin expression and its induction in rat dams. Journal of Neurochemistry, 111: 1490-1500.

Dobolyi A. (2011) Novel potential regulators of maternal adaptations during lactation: Tuberoinfundibular peptide 39 and amylin. Journal of Neuroendocrinology, 23: 1002-1008.

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

Dobolyi A, Irwin S, Wang J, Usdin TB. (2006) The distribution and neurochemistry of the parathyroid hormone 2 receptor in the rat hypothalamus. Neurochem Res, 31: 227-236.

Dobolyi A, Palkovits M. (2008) Expression of latent transforming growth factor beta binding proteins in the rat brain. Journal of Comparative Neurology, 507: 1393-1408.

Dobolyi A, Palkovits M, Usdin TB. (2003) Expression and distribution of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in the rat central nervous system. J Comp Neurol, 455: 547-566.

Dobolyi A, Palkovits M, Usdin TB. (2010) The tip39-pth2 receptor system: Unique peptidergic cell groups in the brainstem and their interactions with central regulatory mechanisms. Prog Neurobiol, 90: 29-59.

Dobolyi A, Ueda H, Uchida H, Palkovits M, Usdin TB. (2002) Anatomical and physiological evidence for involvement of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in nociception. Proc Natl Acad Sci U S A, 99: 1651-1656.

Dubins JS, Sanchez-Alavez M, Zhukov V, Sanchez-Gonzalez A, Moroncini G, Carvajal-Gonzalez S, Hadcock JR, Bartfai T, Conti B. (2012) Downregulation of gpr83 in the hypothalamic preoptic area reduces core body temperature and elevates circulating levels of adiponectin. Metabolism, 61: 1486-1493.

Dulac C, O'Connell LA, Wu Z. (2014) Neural control of maternal and paternal behaviors. Science, 345: 765-770.

Ehret GK, M., Haack, B., Markl, H. (1989) Sex and parental experience determine the onset of an instinctive behavior in mice. Naturwissenschaften, 74: 47.

Erskine MS, Barfield RJ, Goldman BD. (1978) Intraspecific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal. Behav Biol, 23: 206-218.

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: 563-583.

Fernandez-Guasti A, Kruijver FP, Fodor M, Swaab DF. (2000) Sex differences in the distribution of androgen receptors in the human hypothalamus. J Comp Neurol, 425: 422-435.

Fernandez JW, Grizzell JA, Philpot RM, Wecker L. (2014) Postpartum depression in rats: Differences in swim test immobility, sucrose preference and nurturing behaviors. Behav Brain Res, 272: 75-82.

Ferris CF, Kulkarni P, Sullivan JM, Jr., Harder JA, Messenger TL, Febo M. (2005) Pup suckling is more rewarding than cocaine: Evidence from functional magnetic resonance imaging and three-dimensional computational analysis. J Neurosci, 25: 149-156.

File SE. (2001) Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. Behav Brain Res, 125: 151-157.

Fleming AS, Cheung U, Myhal N, Kessler Z. (1989) Effects of maternal hormones on 'timidity' and attraction to pup-related odors in female rats. Physiol Behav, 46: 449-453.

Fleming AS, Korsmit, M., Deller, M. (1994) Rat pups are potent reinforcers to the maternal animal: Effects of experience, parity, hormones, and dopamine function. Psychobiology, 22: 44-53.

Fleming AS, Rosenblatt JS. (1974) Maternal behavior in the virgin and lactating rat. J Comp Physiol Psychol, 86: 957-972.

Flood JF, Morley JE. (1992) Differential effects of amylin on memory processing using peripheral and central routes of administration. Peptides, 13: 577-580.

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: 539-551.

Fodor A, Zelena D. The behavior of the mother and vasopressin. In: (szerk.), Hormones and behavior. 2013: 29-66.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. (2000) Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. Physiological Reviews, 80: 1523-1631.

Fry M, Hoyda TD, Ferguson AV. (2007) Making sense of it: Roles of the sensory circumventricular organs in feeding and regulation of energy homeostasis. Exp Biol Med (Maywood), 232: 14-26.

Galea LA, Wide JK, Barr AM. (2001) Estradiol alleviates depressive-like symptoms in a novel animal model of post-partum depression. Behav Brain Res, 122: 1-9.

Gammie SC. (2005) Current models and future directions for understanding the neural circuitries of maternal behaviors in rodents. Behav Cogn Neurosci Rev, 4: 119-135.

Gandelman R, Zarrow, M.X., Denenberg, V.H. (1973) Maternal behavior: Differences between mother and virgin mice as a function of testing procedure. Developmental Psychobiology, 3: 207-214.

Gao B, Moore RY. (1996) The sexually dimorphic nucleus of the hypothalamus contains gaba neurons in rat and man. Brain Res, 742: 163-171.

Garcia SI, Dabsys SM, Martinez VN, Delorenzi A, Santajuliana D, Nahmod VE, Finkielman S, Pirola CJ. (1995) Thyrotropin-releasing hormone hyperactivity in the preoptic area of spontaneously hypertensive rats. Hypertension, 26: 1105-1110.

Gebre-Medhin S, Mulder H, Zhang Y, Sundler F, Betsholtz C. (1998) Reduced nociceptive behavior in islet amyloid polypeptide (amylin) knockout mice. Brain Res Mol Brain Res, 63: 180-183.

Gingell JJ, Burns ER, Hay DL. (2014) Activity of pramlintide, rat and human amylin but not aβ1-42 at human amylin receptors. Endocrinology, 155: 21-26.

González-Mariscal G, Melo AI. Parental behavior. In: (szerk.), Neuroscience in the 21st century: From basic to clinical. 2013: 2069-2100.

Goodman JH, Santangelo G. (2011) Group treatment for postpartum depression: A systematic review. Arch Womens Ment Health, 14: 277-293.

Goudreau JL, Falls WM, Lookingland KJ, Moore KE. (1995) Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. Neuroendocrinology, 62: 147-154.

Goudreau JL, Lindley SE, Lookingland KJ, Moore KE. (1992) Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of the rat pituitary. Neuroendocrinology, 56: 100-105.

Grota LJ, Ader R. (1974) Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage. Horm Behav, 5: 275-282.

Gubernick DJ, Alberts JR. (1983) Maternal licking of young: Resource exchange and proximate controls. Physiol Behav, 31: 593-601.

Gungor NZ, Pare D. (2014) Cgrp inhibits neurons of the bed nucleus of the stria terminalis: Implications for the regulation of fear and anxiety. J Neurosci, 34: 60-65.

Harris PJ, Cooper ME, Hiranyachattada S, Berka JL, Kelly DJ, Nobes M, Wookey PJ. (1997) Amylin stimulates proximal tubular sodium transport and cell proliferation in the rat kidney. Am J Physiol, 272: F13-21.

Hay DL, Chen S, Lutz TA, Parkes DG, Roth JD. (2015) Amylin: Pharmacology, physiology, and clinical potential. Pharmacol Rev, 67: 564-600.

Hay DL, Christopoulos G, Christopoulos A, Poyner DR, Sexton PM. (2005) Pharmacological discrimination of calcitonin receptor: Receptor activity-modifying protein complexes. Mol Pharmacol, 67: 1655-1665.

Heim C, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. (1997) The role of early adverse life events in the etiology of depression and posttraumatic stress disorder. Focus on corticotropin-releasing factor. Ann N Y Acad Sci, 821: 194-207.

Heiming RS, Monning A, Jansen F, Kloke V, Lesch KP, Sachser N. (2013) To attack, or not to attack? The role of serotonin transporter genotype in the display of maternal aggression. Behav Brain Res, 242: 135-141.

Herbison AE. (1998) Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocr Rev, 19: 302-330.

Herdegen T, Leah JD. (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: Control of gene expression by jun, fos and krox, and creb/atf proteins. Brain Research Reviews, 28: 370-490.

Hillerer KM, Reber SO, Neumann ID, Slattery DA. (2011) Exposure to chronic pregnancy stress reverses peripartum-associated adaptations: Implications for postpartum anxiety and mood disorders. Endocrinology, 152: 3930-3940.

Hirst KP, Moutier CY. (2010) Postpartum major depression. Am Fam Physician, 82: 926-933.

Horcajada-Molteni MN, Chanteranne B, Lebecque P, Davicco MJ, Coxam V, Young A, Barlet JP. (2001) Amylin and bone metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. J Bone Miner Res, 16: 958-965.

Howard Kinsley C. (1994) Developmental psychobiological influences on rodent parental behavior. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 18: 269-280.

Hrabovszky E, Vrontakis ME, Petersen SL. (1995) Triple-labeling method combining immunocytochemistry and in situ hybridization histochemistry: Demonstration of overlap between fos-immunoreactive and galanin mrna-expressing subpopulations of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in female rats. J Histochem Cytochem, 43: 363-370.

Izquierdo MA, Collado P, Segovia S, Guillamon A, del Cerro MC. (1992) Maternal behavior induced in male rats by bilateral lesions of the bed nucleus of the accessory olfactory tract. Physiol Behav, 52: 707-712.

Jacobson CD, Shryne JE, Shapiro F, Gorski RA. (1980a) Ontogeny of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. J Comp Neurol, 193: 541-548.

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

Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL. (1996) Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. Clin Exp Pharmacol Physiol, 23: 183-191.

Johnstone HA, Wigger A, Douglas AJ, Neumann ID, Landgraf R, Seckl JR, Russell JA. (2000) Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: Changes in feedforward and feedback mechanisms. J Neuroendocrinol, 12: 811-822.

Kawano H, Daikoku S. (1987) Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: Retrograde tracing and immunohistochemical study. J Comp Neurol, 265: 242-253.

Kaygisiz Z, Ozden H, Erkasap N, Koken T, Gunduz T, Ikizler M, Kural T. (2010) Positive inotropic, positive chronotropic and coronary vasodilatory effects of rat amylin: Mechanisms of amylin-induced positive inotropy. Acta Physiol Hung, 97: 362-374.

Kendler KS, Kessler RC, Neale MC, Heath AC, Eaves LJ. (1993) The prediction of major depression in women: Toward an integrated etiologic model. Am J Psychiatry, 150: 1139-1148.

Kiss J, Halasz B. (1985) Demonstration of serotoninergic axons terminating on luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry and high resolution autoradiography. Neuroscience, 14: 69-78.

Kiss J, Kocsis K, Csaki A, Halasz B. (2003) Evidence for vesicular glutamate transporter synapses onto gonadotropin-releasing hormone and other neurons in the rat medial preoptic area. Eur J Neurosci, 18: 3267-3278.

Klampfl SM, Brunton PJ, Bayerl DS, Bosch OJ. (2014) Hypoactivation of crf receptors, predominantly type 2, in the medial-posterior bnst is vital for adequate maternal behavior in lactating rats. J Neurosci, 34: 9665-9676.

Kocho-Schellenberg M, Lezak KR, Harris OM, Roelke E, Gick N, Choi I, Edwards S, Wasserman E, Toufexis DJ, Braas KM, May V, Hammack SE. (2014) Pacap in the bnst produces anorexia and weight loss in male and female rats. Neuropsychopharmacology, 39: 1614-1623.

Kozicz T, Vigh S, Arimura A. (1998) The source of origin of pacap- and vip-immunoreactive fibers in the laterodorsal division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. Brain Res, 810: 211-219.

Krajewski SJ, Burke MC, Anderson MJ, McMullen NT, Rance NE. (2010) Forebrain projections of arcuate neurokinin b neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat. Neuroscience, 166: 680-697.

Krasnow SM, Steiner RA. Chapter 47 - physiological mechanisms integrating metabolism and reproduction. In: JDNMPWPRGCMdKSRM Wassarman (szerk.), Knobil and neill's physiology of reproduction (third edition). Academic Press, St Louis, 2006: 2553-2625.

Kreiner G, Chmielarz P, Roman A, Nalepa I. (2013) Gender differences in genetic mouse models evaluated for depressive-like and antidepressant behavior. Pharmacol Rep, 65: 1580-1590.

Kromkhun P, Katou M, Hashimoto H, Terada M, Moon C, Saito TR. (2013) Quantitative and qualitative analysis of rat pup ultrasonic vocalization sounds induced by a hypothermic stimulus. Lab Anim Res, 29: 77-83.

Kruijver FP, Balesar R, Espila AM, Unmehopa UA, Swaab DF. (2002) Estrogen receptor-alpha distribution in the human hypothalamus in relation to sex and endocrine status. J Comp Neurol, 454: 115-139.

Kruijver FP, Zhou JN, Pool CW, Hofman MA, Gooren LJ, Swaab DF. (2000) Male-to-female transsexuals have female neuron numbers in a limbic nucleus. J Clin Endocrinol Metab, 85: 2034-2041.

Kurhe Y, Mahesh R, Devadoss T, Gupta D. (2014) Antidepressant-like effect of a novel 5-ht3 receptor antagonist n-(benzo[d] thiazol-2-yl)-3-ethoxyquinoxalin-2-carboxamide 6k using rodents behavioral battery tests. J Pharmacol Pharmacother, 5: 197-202.

Kuroda KO, Meaney MJ, Uetani N, Fortin Y, Ponton A, Kato T. (2007) Erk-fosb signaling in dorsal mpoa neurons plays a major role in the initiation of parental behavior in mice. Mol Cell Neurosci, 36: 121-131.

Ladyman SR, Grattan DR. (2005) Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. Endocrinology, 146: 3868-3874.

Landi N, Montoya J, Kober H, Rutherford HJ, Mencl WE, Worhunsky PD, Potenza MN, Mayes LC. (2011) Maternal neural responses to infant cries and faces: Relationships with substance use. Front Psychiatry, 2: 32.

Laurent HK, Ablow JC. (2012) The missing link: Mothers' neural response to infant cry related to infant attachment behaviors. Infant Behav Dev, 35: 761-772.

Lavi-Avnon Y, Malkesman O, Hurwitz I, Weller A. (2004) Mother-infant interactions in rats lacking cck(a) receptors. Behav Neurosci, 118: 282-289.

Le Foll C, Johnson MD, Dunn-Meynell AA, Boyle CN, Lutz TA, Levin BE. (2015) Amylin-induced central il-6 production enhances ventromedial hypothalamic leptin signaling. Diabetes, 64: 1621-1631.

Lee A, Clancy S, Fleming AS. (2000) Mother rats bar-press for pups: Effects of lesions of the mpoa and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup-reinforcement. Behav Brain Res, 108: 215-231.

Lee A, Li M, Watchus J, Fleming AS. (1999) Neuroanatomical basis of maternal memory in postpartum rats: Selective role for the nucleus accumbens. Behav Neurosci, 113: 523-538.

Lee PJ, Liaw JJ, Chen CM. (2015) [concept analysis of postpartum depression]. Hu Li Za Zhi, 62: 66-71.

Leffert JD, Newgard CB, Okamoto H, Milburn JL, Luskey KL. (1989) Rat amylin: Cloning and tissue-specific expression in pancreatic islets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86: 3127-3130.

Leite C, Madeira MD, Sa SI. (2014) Effects of sex steroids and estrogen receptor agonists on the expression of estrogen receptor alpha in the principal division of the bed nucleus of the stria terminalis of female rats. Brain Res, 1582: 99-106.

Leng G, Meddle SL, Douglas AJ. (2008) Oxytocin and the maternal brain. Current Opinion in Pharmacology, 8: 731-734.

Leppanen PK, Ravaja N, Ewalds-Kvist SB. (2008) Prepartum and postpartum open-field behavior and maternal responsiveness in mice bidirectionally selected for open-field thigmotaxis. J Gen Psychol, 135: 37-53.

Leranth C, MacLusky NJ, Sakamoto H, Shanabrough M, Naftolin F. (1985) Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on lhrh neurons in the rat medial preoptic area. Neuroendocrinology, 40: 536-539.

Leranth C, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. (1988a) Catecholaminergic innervation of luteinizing hormone-releasing hormone and glutamic acid decarboxylase

immunopositive neurons in the rat medial preoptic area. An electron-microscopic double immunostaining and degeneration study. Neuroendocrinology, 48: 591-602.

Leranth C, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. (1988b) Immunohistochemical evidence for synaptic connections between pro-opiomelanocortin-immunoreactive axons and lh-rh neurons in the preoptic area of the rat. Brain Res, 449: 167-176.

Lesur A, Gaspar P, Alvarez C, Berger B. (1989) Chemoanatomic compartments in the human bed nucleus of the stria terminalis. Neuroscience, 32: 181-194.

Levy F, Keller M, Poindron P. (2004) Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. Horm Behav, 46: 284-302.

Li C, Chen P, Smith MS. (1999) Neural populations in the rat forebrain and brainstem activated by the suckling stimulus as demonstrated by cfos expression. Neuroscience, 94: 117-129.

Li M, Fleming AS. (2003) Differential involvement of nucleus accumbens shell and core subregions in maternal memory in postpartum female rats. Behav Neurosci, 117: 426-445.

Lin SH, Miyata S, Matsunaga W, Kawarabayashi T, Nakashima T, Kiyohara T. (1998a) Metabolic mapping of the brain in pregnant, parturient and lactating rats using fos immunohistochemistry. Brain Research, 787: 226-236.

Lin SH, Miyata S, Weng W, Matsunaga W, Ichikawa J, Furuya K, Nakashima T, Kiyohara T. (1998b) Comparison of the expression of two immediate early gene proteins, fosb and fos in the rat preoptic area, hypothalamus and brainstem during pregnancy, parturition and lactation. Neurosci Res, 32: 333-341.

Lincoln DW, Hentzen K, Hin T, van der Schoot P, Clarke G, Summerlee AJ. (1980) Sleep: A prerequisite for reflex milk ejection in the rat. Exp Brain Res, 38: 151-162.

Lisk RD. (1971) Oestrogen and progesterone synergism and elicitation of maternal nest-building in the mouse (mus musculus). Anim Behav, 19: 606-610.

Llewellyn T, Zheng H, Liu X, Xu B, Patel KP. (2012) Median preoptic nucleus and subfornical organ drive renal sympathetic nerve activity via a glutamatergic mechanism

within the paraventricular nucleus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 302: R424-432.

Londei T, Segala P, Leone VG. (1989) Mouse pup urine as an infant signal. Physiol Behav, 45: 579-583.

Lonstein JS, De Vries GJ. (2000) Sex differences in the parental behavior of rodents. Neurosci Biobehav Rev, 24: 669-686.

Lonstein JS, Fleming AS. (2002) Parental behaviors in rats and mice. Curr Protoc Neurosci, Chapter 8: Unit 8 15.

Lonstein JS, Gammie SC. (2002) Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. Neurosci Biobehav Rev, 26: 869-888.

Lonstein JS, Levy F, Fleming AS. (2015) Common and divergent psychobiological mechanisms underlying maternal behaviors in non-human and human mammals. Horm Behav.

Lonstein JS, Simmons DA, Swann JM, Stern JM. (1997) Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. Neuroscience, 82: 267-281.

Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA. (1998) Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. Endocrinology, 139: 4102-4107.

Lutz TA. (2006) Amylinergic control of food intake. Physiol Behav, 89: 465-471.

Lutz TA. (2010) The role of amylin in the control of energy homeostasis. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 298: R1475-1484.

Lutz TA, Mollet A, Rushing PA, Riediger T, Scharrer E. (2001) The anorectic effect of a chronic peripheral infusion of amylin is abolished in area postrema/nucleus of the solitary tract (ap/nts) lesioned rats. International Journal of Obesity, 25: 1005-1011.

Mack C, Wilson J, Athanacio J, Reynolds J, Laugero K, Guss S, Vu C, Roth J, Parkes D. (2007) Pharmacological actions of the peptide hormone amylin in the long-term regulation of food intake, food preference, and body weight. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 293: R1855-1863.

Mack CM, Soares CJ, Wilson JK, Athanacio JR, Turek VF, Trevaskis JL, Roth JD, Smith PA, Gedulin B, Jodka CM, Roland BL, Adams SH, Lwin A, Herich J, Laugero KD, Vu C, Pittner R, Paterniti JR, Jr., Hanley M, Ghosh S, Parkes DG. (2010) Davalintide (ac2307), a novel amylin-mimetic peptide: Enhanced pharmacological properties over native amylin to reduce food intake and body weight. Int J Obes (Lond), 34: 385-395.

MacLusky NJ, Naftolin F, Leranth C. (1988) Immunocytochemical evidence for direct synaptic connections between corticotrophin-releasing factor (crf) and gonadotrophin-releasing hormone (gnrh)-containing neurons in the preoptic area of the rat. Brain Res, 439: 391-395.

Maestripieri D, D'Amato FR. (1991) Anxiety and maternal aggression in house mice (mus musculus): A look at interindividual variability. J Comp Psychol, 105: 295-301.

Maguire J, Mody I. (2008) Gaba(a)r plasticity during pregnancy: Relevance to postpartum depression. Neuron, 59: 207-213.

Mann PE, Felicio LF, Bridges RS. (1995) Investigation into the role of cholecystokinin (cck) in the induction and maintenance of maternal behavior in rats. Horm Behav, 29: 392-406.

Mann PE, Kinsley CH, Bridges RS. (1991) Opioid receptor subtype involvement in maternal behavior in lactating rats. Neuroendocrinology, 53: 487-492.

Marina N, Morales T, Diaz N, Mena F. (2002) Suckling-induced activation of neural c-fos expression at lower thoracic rat spinal cord segments. Brain Res, 954: 100-114.

Marti J, Armario A. (1993) Effects of diazepam and desipramine in the forced swimming test: Influence of previous experience with the situation. Eur J Pharmacol, 236: 295-299.

Martinez LA, Petrulis A. (2013) The medial preoptic area is necessary for sexual odor preference, but not sexual solicitation, in female syrian hamsters. Horm Behav, 63: 606-614.

Masugi-Tokita M, Flor PJ, Kawata M. (2015) Metabotropic glutamate receptor subtype 7 in the bed nucleus of the stria terminalis is essential for intermale aggression. Neuropsychopharmacology.

Matsushita N, Muroi Y, Kinoshita K, Ishii T. (2015) Comparison of c-fos expression in brain regions involved in maternal behavior of virgin and lactating female mice. Neurosci Lett, 590: 166-171.

Mattson BJ, Williams S, Rosenblatt JS, Morrell JI. (2001) Comparison of two positive reinforcing stimuli: Pups and cocaine throughout the postpartum period. Behav Neurosci, 115: 683-694.

Mattson BJ, Williams SE, Rosenblatt JS, Morrell JI. (2003) Preferences for cocaine- or pup-associated chambers differentiates otherwise behaviorally identical postpartum maternal rats. Psychopharmacology (Berl), 167: 1-8.

Mayer AD, Rosenblatt JS. (1984) Prepartum changes in maternal responsiveness and nest defense in rattus norvegicus. J Comp Psychol, 98: 177-188.

McKinley MJ, Yao ST, Uschakov A, McAllen RM, Rundgren M, Martelli D. (2015) The median preoptic nucleus: Front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. Acta Physiologica, 214: 8-32.

McNeilly AS. Suckling and the control of gonadotropin secretion. In: (szerk.), Knobil and neill's physiology of reproduction. 2006: 2511-2551.

Meltzer-Brody S. (2011) New insights into perinatal depression: Pathogenesis and treatment during pregnancy and postpartum. Dialogues Clin Neurosci, 13: 89-100.

Merchenthaler I, Gorcs T, Setalo G, Petrusz P, Flerko B. (1984) Gonadotropin-releasing hormone (gnrh) neurons and pathways in the rat brain. Cell Tissue Res, 237: 15-29.

Micevych P, Sinchak K. (2001) Estrogen and endogenous opioids regulate cck in reproductive circuits. Peptides, 22: 1235-1244.

Mietlicki-Baase EG, Rupprecht LE, Olivos DR, Zimmer DJ, Alter MD, Pierce RC, Schmidt HD, Hayes MR. (2013) Amylin receptor signaling in the ventral tegmental area

is physiologically relevant for the control of food intake. Neuropsychopharmacology, 38: 1685-1697.

Miranda-Paiva CM, Nasello AG, Yim AJ, Felicio LF. (2002) Puerperal blockade of cholecystokinin (cck1) receptors disrupts maternal behavior in lactating rats. J Mol Neurosci, 18: 97-104.

Mittelman-Smith MA, Krajewski-Hall SJ, McMullen NT, Rance NE. (2015) Neurokinin 3 receptor-expressing neurons in the median preoptic nucleus modulate heat-dissipation effectors in the female rat. Endocrinology, 156: 2552-2562.

Miyakubo H, Yamamoto K, Hatakenaka S, Hayashi Y, Tanaka J. (2003) Drinking decreases the noradrenaline release in the median preoptic area caused by hypovolemia in the rat. Behav Brain Res, 145: 1-5.

Molina-Hernandez M, Tellez-Alcantara NP. (2001) Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in wistar rats forced to swim. Psychoneuroendocrinology, 26: 479-491.

Mollet A, Gilg S, Riediger T, Lutz TA. (2004) Infusion of the amylin antagonist ac 187 into the area postrema increases food intake in rats. Physiol Behav, 81: 149-155.

Mollet A, Meier S, Riediger T, Lutz TA. (2003) Histamine h1 receptors in the ventromedial hypothalamus mediate the anorectic action of the pancreatic hormone amylin. Peptides, 24: 155-158.

Moltz H, Lubin M, Leon M, Numan M. (1970) Hormonal induction of maternal behavior in the ovariectomized nulliparous rat. Physiol Behav, 5: 1373-1377.

Morishige WK, Pepe GJ, Rothchild I. (1973) Serum luteinizing hormone, prolactin and progesterone levels during pregnancy in the rat. Endocrinology, 92: 1527-1530.

Morley JE, Flood JF, Farr SA, Perry HJ, 3rd, Kaiser FE, Morley PM. (1995) Effects of amylin on appetite regulation and memory. Can J Physiol Pharmacol, 73: 1042-1046.

Moses-Kolko EL, Horner MS, Phillips ML, Hipwell AE, Swain JE. (2014) In search of neural endophenotypes of postpartum psychopathology and disrupted maternal caregiving. J Neuroendocrinol, 26: 665-684.

Mufson EJ, Kahl U, Bowser R, Mash DC, Kordower JH, Deecher DC. (1998) Galanin expression within the basal forebrain in alzheimer's disease. Comments on therapeutic potential. Ann N Y Acad Sci, 863: 291-304.

Najimi M, Bennis M, Moyse E, Miachon S, Kopp N, Chigr F. (2001) Regional distribution of benzodiazepine binding sites in the human newborn and infant hypothalamus. A quantitative autoradiographic study. Brain Res, 895: 129-138.

Nephew BC, Byrnes EM, Bridges RS. (2010) Vasopressin mediates enhanced offspring protection in multiparous rats. Neuropharmacology, 58: 102-106.

Neumann I, Landgraf R, Bauce L, Pittman QJ. (1995) Osmotic responsiveness and cross talk involving oxytocin, but not vasopressin or amino acids, between the supraoptic nuclei in virgin and lactating rats. J Neurosci, 15: 3408-3417.

Neumann ID. (2003) Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. Depress Anxiety, 17: 111-121.

Neumann ID, Johnstone HA, Hatzinger M, Liebsch G, Shipston M, Russell JA, Landgraf R, Douglas AJ. (1998) Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohypophysial changes. J Physiol, 508 (Pt 1): 289-300.

Neumann ID, Torner L, Wigger A. (2000) Brain oxytocin: Differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. Neuroscience, 95: 567-575.

Neumann ID, Toschi N, Ohl F, Torner L, Kromer SA. (2001) Maternal defence as an emotional stressor in female rats: Correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin. Eur J Neurosci, 13: 1016-1024.

Nishi M, Chan SJ, Nagamatsu S, Bell GI, Steiner DF. (1989) Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. Proc Natl Acad Sci U S A, 86: 5738-5742.

Nishimura H, Ida Y, Tsuda A, Tanaka M. (1989) Opposite effects of diazepam and beta-cce on immobility and straw-climbing behavior of rats in a modified forced-swim test. Pharmacol Biochem Behav, 33: 227-231.

Noirot E. (1964) Changes in responsiveness to young in the adult mouse: The effect of external stimuli. J Comp Physiol Psychol, 57: 97-99.

Noirot E. (1969) Serial order of maternal responses in mice. Anim Behav, 17: 547-550.

Numan M. (1986) The role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior in the rat. Annals of the New York Academy of Sciences, 474: 226-233.

Numan M. (1988) Neural basis of maternal behavior in the rat. Psychoneuroendocrinology, 13: 47-62.

Numan M. (1990) Long-term effects of preoptic area knife cuts on the maternal behavior of postpartum rats. Behav Neural Biol, 53: 284-290.

Numan M. (2012) Maternal behavior: Neural circuits, stimulus valence, and motivational processes. Parenting, 12: 105-114.

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: 381-396.

Numan M, Fleming AS, Levy F. Maternal behavior. In: JD Neill (szerk.), Knobil and neill´s physiology of reproduction. Academic Press, Oxford, 2006: 1729-2058.

Numan M, Numan M. (1996) A lesion and neuroanatomical tract-tracing analysis of the role of the bed nucleus of the stria terminalis in retrieval behavior and other aspects of maternal responsiveness in rats. Dev Psychobiol, 29: 23-51.

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. Journal of Neuroendocrinology, 9: 369-384.

Numan M, Numan MJ, Pliakou N, Stolzenberg DS, Mullins OJ, Murphy JM, Smith CD. (2005a) 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: 1588-1604.

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

Numan M, Woodside B. (2010) Maternity: Neural mechanisms, motivational processes, and physiological adaptations. Behavioral Neuroscience, 124: 715-741.

Nunemaker CS, DeFazio RA, Geusz ME, Herzog ED, Pitts GR, Moenter SM. (2001) Long-term recordings of networks of immortalized gnrh neurons reveal episodic patterns of electrical activity. J Neurophysiol, 86: 86-93.

Ogawa S, Eng V, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. (1998) Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. Endocrinology, 139: 5070-5081.

Okada M, Hayashi N, Kometani M, Nakao K, Inukai T. (1997) Influences of ovariectomy and continuous replacement of 17beta-estradiol on the tail skin temperature and behavior in the forced swimming test in rats. Jpn J Pharmacol, 73: 93-96.

Olazabal DE, Pereira M, Agrati D, Ferreira A, Fleming AS, Gonzalez-Mariscal G, Levy F, Lucion AB, Morrell JI, Numan M, Uriarte N. (2013) New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals. Neurosci Biobehav Rev, 37: 1860-1874.

Olazabal DE, Young LJ. (2006) Species and individual differences in juvenile female alloparental care are associated with oxytocin receptor density in the striatum and the lateral septum. Horm Behav, 49: 681-687.

Olza-Fernandez I, Marin Gabriel MA, Gil-Sanchez A, Garcia-Segura LM, Arevalo MA. (2014) Neuroendocrinology of childbirth and mother-child attachment: The basis of an etiopathogenic model of perinatal neurobiological disorders. Front Neuroendocrinol, 35: 459-472.

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

Osaka T. (2004) Cold-induced thermogenesis mediated by gaba in the preoptic area of anesthetized rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 287: R306-313.

Osaka T, Kawano S, Ueta Y, Inenaga K, Kannan H, Yamashita H. (1993) Lateral preoptic neurons inhibit thirst in the rat. Brain Res Bull, 31: 135-144.

Palkovits M. Micro- and macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. In: PM Conn ,ME Freeman (szerk.), Neuroendocrinology in physiology and medicine. Humana Press, New Jersey, 2000: 23-40.

Panksepp J, Nelson E, Siviy S. (1994) Brain opioids and mother-infant social motivation. Acta Paediatr Suppl, 397: 40-46.

Papp M, Willner P, Muscat R. (1991) An animal model of anhedonia: Attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. Psychopharmacology (Berl), 104: 255-259.

Paredes RG. (2003) Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. Scand J Psychol, 44: 203-212.

Patel M, Bailey RK, Jabeen S, Ali S, Barker NC, Osiezagha K. (2012) Postpartum depression: A review. J Health Care Poor Underserved, 23: 534-542.

Pawluski JL, Lieblich SE, Galea LA. (2009) Offspring-exposure reduces depressive-like behaviour in the parturient female rat. Behav Brain Res, 197: 55-61.

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

Pedersen CA, Boccia ML. (2003) Oxytocin antagonism alters rat dams' oral grooming and upright posturing over pups. Physiol Behav, 80: 233-241.

Pedersen CA, Caldwell JD, Walker C, Ayers G, Mason GA. (1994) Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. Behav Neurosci, 108: 1163-1171.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985) Validation of open:Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods, 14: 149-167.

Pena CJ, Champagne FA. (2014) Neonatal over-expression of estrogen receptor-alpha alters midbrain dopamine neuron development and reverses the effects of low maternal care in female offspring. Dev Neurobiol.

Perani CV, Slattery DA. (2014) Using animal models to study post-partum psychiatric disorders. Br J Pharmacol, 171: 4539-4555.

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: 216-231.

Pereira M, Morrell JI. (2011) Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: Effects of site-specific transient neural inactivation. J Neuroendocrinol, 23: 1020-1035.

Pereira M, Uriarte N, Agrati D, Zuluaga MJ, Ferreira A. (2005) Motivational aspects of maternal anxiolysis in lactating rats. Psychopharmacology (Berl), 180: 241-248.

Pfaff D. Motivational concepts: Definitions and distinctions. In: D Pfaff (szerk.), The physiological mechanisms of motivation. Springer New York, 1982: 3-24.

Pieber TR, Roitelman J, Lee Y, Luskey KL, Stein DT. (1994) Direct plasma radioimmunoassay for rat amylin-(1-37): Concentrations with acquired and genetic obesity. Am J Physiol, 267: E156-164.

Plagemann A, Rake A, Harder T, Melchior K, Rohde W, Dorner G. (1998) Reduction of cholecystokinin-8s-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. Neurosci Lett, 258: 13-16.

Porsolt RD, Bertin A, Blavet N, Deniel M, Jalfre M. (1979) Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. Eur J Pharmacol, 57: 201-210.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. (1977) Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature, 266: 730-732.

Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM. (2002) International union of pharmacology. Xxxii. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. Pharmacological Reviews, 54: 233-246.

Raisman G, Field PM. (1971) Sexual dimorphism in the preoptic area of the rat. Science, 173: 731-733.

Reisbick S, Rosenblatt JS, Mayer AD. (1975) Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat. J Comp Physiol Psychol, 89: 722-732.

Ribeiro AC, Musatov S, Shteyler A, Simanduyev S, Arrieta-Cruz I, Ogawa S, Pfaff DW. (2012) Sirna silencing of estrogen receptor-alpha expression specifically in medial preoptic area neurons abolishes maternal care in female mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 109: 16324-16329.

Rich ME, deCardenas EJ, Lee HJ, Caldwell HK. (2014) Impairments in the initiation of maternal behavior in oxytocin receptor knockout mice. PLoS One, 9: e98839.

Riediger T, Zuend D, Becskei C, Lutz TA. (2004) The anorectic hormone amylin contributes to feeding-related changes of neuronal activity in key structures of the gut-brain axis. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 286: R114-122.

Rilling JK, Young LJ. (2014) The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development. Science, 345: 771-776.

Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. (2008) New frontiers in kisspeptin/gpr54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. Front Neuroendocrinol, 29: 48-69.

Robertson MC, Friesen HG. (1981) Two forms of rat placental lactogen revealed by radioimmunoassay. Endocrinology, 108: 2388-2390.

Rocha BA, Fleischer R, Schaeffer JM, Rohrer SP, Hickey GJ. (2005) 17 beta-estradiol-induced antidepressant-like effect in the forced swim test is absent in estrogen receptor-beta knockout (berko) mice. Psychopharmacology (Berl), 179: 637-643.

Rodriguez-Sierra JF, Terasawa E. (1979) Lesions of the preoptic area facilitate lordosis behavior in male and female guinea pigs. Brain Res Bull, 4: 513-517.

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

Rosenblatt JS. (1994) Psychobiology of maternal behavior: Contribution to the clinical understanding of maternal behavior among humans. Acta Paediatr Suppl, 397: 3-8.

Rosenblatt JS, Ceus K. (1998) Estrogen implants in the medial preoptic area stimulate maternal behavior in male rats. Horm Behav, 33: 23-30.

Rosenblatt JS, Hazelwood S, Poole J. (1996) Maternal behavior in male rats: Effects of medial preoptic area lesions and presence of maternal aggression. Horm Behav, 30: 201-215.

Roth JD, Maier H, Chen S, Roland BL. (2009) Implications of amylin receptor agonism: Integrated neurohormonal mechanisms and therapeutic applications. Arch Neurol, 66: 306-310.

Rubin BS, Bridges RS. (1984) Disruption of ongoing maternal responsiveness in rats by central administration of morphine sulfate. Brain Res, 307: 91-97.

Rushing PA, Hagan MM, Seeley RJ, Lutz TA, D'Alessio DA, Air EL, Woods SC. (2001) Inhibition of central amylin signaling increases food intake and body adiposity in rats. Endocrinology, 142: 5035-5038.

Saetrum Opgaard O, de Vries R, Tom B, Edvinsson L, Saxena PR. (1999) Positive inotropy of calcitonin gene-related peptide and amylin on porcine isolated myocardium. Eur J Pharmacol, 385: 147-154.

Saito YC, Tsujino N, Hasegawa E, Akashi K, Abe M, Mieda M, Sakimura K, Sakurai T. (2013) Gabaergic neurons in the preoptic area send direct inhibitory projections to orexin neurons. Front Neural Circuits, 7: 192.

Salmaso N, Hicks J, Woodside B. (2010) Effects of parturition on immediate early gene protein expression within the brains of female rats. Neuroscience, 169: 637-644.

Schmidt MH, Valatx JL, Sakai K, Fort P, Jouvet M. (2000) Role of the lateral preoptic area in sleep-related erectile mechanisms and sleep generation in the rat. J Neurosci, 20: 6640-6647.

Seip KM, Morrell JI. (2009) Transient inactivation of the ventral tegmental area selectively disrupts the expression of conditioned place preference for pup- but not cocaine-paired contexts. Behav Neurosci, 123: 1325-1338.

Sexton PM, Paxinos G, Kenney MA, Wookey PJ, Beaumont K. (1994) In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain. Neuroscience, 62: 553-567.

Sheehan TP, Numan M. (1997) Microinjection of the tachykinin neuropeptide k into the ventromedial hypothalamus disrupts the hormonal onset of maternal behavior in female rats. J Neuroendocrinol, 9: 677-687.

Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB. (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. Science, 271: 216-219.

Sheward WJ, Lutz EM, Harmar AJ. (1994) The expression of the calcitonin receptor gene in the brain and pituitary gland of the rat. Neuroscience Letters, 181: 31-34.

Shoji H, Kato K. (2006) Maternal behavior of primiparous females in inbred strains of mice: A detailed descriptive analysis. Physiol Behav, 89: 320-328.

Silva MR, Bernardi MM, Nasello AG, Felicio LF. (1997) Influence of lactation on motor activity and elevated plus maze behavior. Braz J Med Biol Res, 30: 241-244.

Simerly RB, Swanson LW. (1986) The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. Journal of Comparative Neurology, 246: 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: 209-242.

Slamberova R, Szilagyi B, Vathy I. (2001) Repeated morphine administration during pregnancy attenuates maternal behavior. Psychoneuroendocrinology, 26: 565-576.

Smith MS, Grove KL. (2002) Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: Lactation as a model. Frontiers in Neuroendocrinology, 23: 225-256.

Srividya R, Mallick HN, Kumar VM. (2006) Differences in the effects of medial and lateral preoptic lesions on thermoregulation and sleep in rats. Neuroscience, 139: 853-864.

Sroufe LA, Carlson EA, Levy AK, Egeland B. (1999) Implications of attachment theory for developmental psychopathology. Dev Psychopathol, 11: 1-13.

Stachniak TJ, Krukoff TL. (2003) Receptor activity modifying protein 2 distribution in the rat central nervous system and regulation by changes in blood pressure. J Neuroendocrinol, 15: 840-850.

Stack EC, Numan M. (2000) The temporal course of expression of c-fos and fos b within the medial preoptic area and other brain regions of postpartum female rats during prolonged mother-young interactions. Behavioral Neuroscience, 114: 609-622.

Stern JM. Maternal behavior: Sensory, hormonal and neural determinants. In: FR Brush ,AS Levine (szerk.), Psychoendocrinology. Academic Press, San Diego, 1989: 103-226.

Stoffel EC, Craft RM. (2004) Ovarian hormone withdrawal-induced "depression" in female rats. Physiol Behav, 83: 505-513.

Stolzenberg DS, McKenna JB, Keough S, Hancock R, Numan MJ, Numan M. (2007) Dopamine d1 receptor stimulation of the nucleus accumbens or the medial preoptic area promotes the onset of maternal behavior in pregnancy-terminated rats. Behav Neurosci, 121: 907-919.

Stolzenberg DS, Rissman EF. (2011) Oestrogen-independent, experience-induced maternal behaviour in female mice. J Neuroendocrinol, 23: 345-354.

Stolzenberg DS, Stevens JS, Rissman EF. (2012) Experience-facilitated improvements in pup retrieval; evidence for an epigenetic effect. Horm Behav, 62: 128-135.

Stowe ZN, Nemeroff CB. (1995) Women at risk for postpartum-onset major depression. Am J Obstet Gynecol, 173: 639-645.

Suda S, Segi-Nishida E, Newton SS, Duman RS. (2008) A postpartum model in rat: Behavioral and gene expression changes induced by ovarian steroid deprivation. Biol Psychiatry, 64: 311-319.

Swaab DF. Sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (sdn-poa) = intermediate nucleus = interstitial nucleus of the anterior hypothalamus (inah-1) = preoptic nucleus. In: (szerk.), The human hypothalamus: Basic and clinical aspects. . Elsevier, Amsterdam, 2003: 127-133.

Swaab DF, Gooren LJ, Hofman MA. (1995) Brain research, gender and sexual orientation. J Homosex, 28: 283-301.

Swain JE. (2011) The human parental brain: In vivo neuroimaging. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 35: 1242-1254.

Swanson LJ, Campbell CS. (1979) Induction of maternal behavior in nulliparous golden hamsters (mesocricetus auratus). Behav Neural Biol, 26: 364-371.

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

Szymusiak R, Alam N, Steininger TL, McGinty D. (1998) Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. Brain Res, 803: 178-188.

Tarantino LM, Sullivan PF, Meltzer-Brody S. (2011) Using animal models to disentangle the role of genetic, epigenetic, and environmental influences on behavioral outcomes associated with maternal anxiety and depression. Front Psychiatry, 2: 44.

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: 369-380.

Tezval H, Jahn O, Todorovic C, Sasse A, Eckart K, Spiess J. (2004) Cortagine, a specific agonist of corticotropin-releasing factor receptor subtype 1, is anxiogenic and antidepressive in the mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A, 101: 9468-9473.

Thomas SA, Palmiter RD. (1997) Impaired maternal behavior in mice lacking norepinephrine and epinephrine. Cell, 91: 583-592.

Tohyama M, Takatsuji K. (1998) Atlas of Neuroactive Substances and Their Receptors in the Rat.

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: 1633-1663.

Tsuruo Y, Kawano H, Kagotani Y, Hisano S, Daikoku S, Chihara K, Zhang T, Yanaihara N. (1990) Morphological evidence for neuronal regulation of luteinizing hormone-releasing hormone-containing neurons by neuropeptide y in the rat septo-preoptic area. Neurosci Lett, 110: 261-266.

Turek VF, Trevaskis JL, Levin BE, Dunn-Meynell AA, Irani B, Gu G, Wittmer C, Griffin PS, Vu C, Parkes DG, Roth JD. (2010) Mechanisms of amylin/leptin synergy in rodent models. Endocrinology, 151: 143-152.

Turi GF, Liposits Z, Hrabovszky E. (2008) Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. Neurochem Int, 52: 723-728.

Turi GF, Liposits Z, Moenter SM, Fekete C, Hrabovszky E. (2003) Origin of neuropeptide y-containing afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in male mice. Endocrinology, 144: 4967-4974.

Udawela M, Christopoulos G, Morfis M, Christopoulos A, Ye S, Tilakaratne N, Sexton PM. (2006) A critical role for the short intracellular c terminus in receptor activity-modifying protein function. Mol Pharmacol, 70: 1750-1760.

Ueda T, Ugawa S, Saishin Y, Shimada S. (2001) Expression of receptor-activity modifying protein (ramp) mrnas in the mouse brain. Brain Res Mol Brain Res, 93: 36-45.

Uschakov A, Gong H, McGinty D, Szymusiak R. (2007) Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. Neuroscience, 150: 104-120.

Usdin TB, Hoare SR, Wang T, Mezey E, Kowalak JA. (1999) Tip39: A new neuropeptide and pth2-receptor agonist from hypothalamus. Nat Neurosci, 2: 941-943.

Verreault N, Da Costa D, Marchand A, Ireland K, Dritsa M, Khalife S. (2014) Rates and risk factors associated with depressive symptoms during pregnancy and with postpartum onset. J Psychosom Obstet Gynaecol, 35: 84-91.

Walker CS, Eftekhari S, Bower RL, Wilderman A, Insel PA, Edvinsson L, Waldvogel HJ, Jamaluddin MA, Russo AF, Hay DL. (2015) A second trigeminal cgrp receptor: Function and expression of the amy1 receptor. Ann Clin Transl Neurol, 2: 595-608.

Walter A, Mai JK, Lanta L, Gorcs T. (1991) Differential distribution of immunohistochemical markers in the bed nucleus of the stria terminalis in the human brain. J Chem Neuroanat, 4: 281-298.

Wang J, Swann JM. (2006) The magnocellular medial preoptic nucleus i. Sources of afferent input. Neuroscience, 141: 1437-1456.

Wang J, Swann JM. (2014) Connections of the magnocellular medial preoptic nucleus (mpn mag) in male syrian hamsters. Ii. The efferents. Neuroscience, 274: 102-118.

Wansaw MP, Pereira M, Morrell JI. (2008) Characterization of maternal motivation in the lactating rat: Contrasts between early and late postpartum responses. Horm Behav, 54: 294-301.

Waynforth HB, Flecknell PA. (1992) Experimental and Surgical Technique in the Rat.

Weller KL, Smith DA. (1982) Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. Brain Res, 232: 255-270.

Werner EE. (2004) Journeys from childhood to midlife: Risk, resilience, and recovery. Pediatrics, 114: 492.

Westermark P, Andersson A, Westermark GT. (2011) Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. Physiol Rev, 91: 795-826.

Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Sletten K. (1986) A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. Biochem Biophys Res Commun, 140: 827-831.

Williams MT, Morford LL, Wood SL, Rock SL, McCrea AE, Fukumura M, Wallace TL, Broening HW, Moran MS, Vorhees CV. (2003) Developmental 3,4-methylenedioxymethamphetamine (mdma) impairs sequential and spatial but not cued learning independent of growth, litter effects or injection stress. Brain Res, 968: 89-101.

Wimalawansa SJ. (1997) Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: A peptide superfamily. Critical Reviews in Neurobiology, 11: 167-239.

Witkin JW, O'Sullivan H, Silverman AJ. (1995) Novel associations among gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology, 136: 4323-4330.

Woodside B. (2007) Prolactin and the hyperphagia of lactation. Physiology and Behavior, 91: 375-382.

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

Xu J, Kirigiti MA, Grove KL, Smith MS. (2009) Regulation of food intake and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone during lactation: Role of insulin and leptin. Endocrinology, 150: 4231-4240.

Yamada S, Uenoyama Y, Kinoshita M, Iwata K, Takase K, Matsui H, Adachi S, Inoue K, Maeda KI, Tsukamura H. (2007) Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-gpr54 signaling in the arcuate nucleus-median eminence region during lactation in rats. Endocrinology, 148: 2226-2232.

Yim IS, Tanner Stapleton LR, Guardino CM, Hahn-Holbrook J, Dunkel Schetter C. (2015) Biological and psychosocial predictors of postpartum depression: Systematic review and call for integration. Annu Rev Clin Psychol, 11: 99-137.

Young A. (2005a) Cardiovascular effects. Adv Pharmacol, 52: 239-250.

Young A, Kolterman O, Hall J. (1999) Amylin innocent in essential hypertension? Diabetologia, 42: 1029.

Young AA, Vine W, Gedulin BR, Pittner R, Janes S, Gaeta LSL, Percy A, Moore CX, Koda JE, Rink TJ, Beaumont K. (1996) Preclinical pharmacology of pramlintide in the rat: Comparisons with human and rat amylin. Drug Development Research, 37: 231-248.

Zaki M, Koduru S, McCuen R, Vuyyuru L, Schubert ML. (2002) Amylin, released from the gastric fundus, stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in mice. Gastroenterology, 123: 247-255.

Zhong J, Liang M, Akther S, Higashida C, Tsuji T, Higashida H. (2014) C-fos expression in the paternal mouse brain induced by communicative interaction with maternal mates. Mol Brain, 7: 66.

Zhou JN, Hofman MA, Gooren LJ, Swaab DF. (1995) A sex difference in the human brain and its relation to transsexuality. Nature, 378: 68-70.

Zhu H, Wang X, Wallack M, Li H, Carreras I, Dedeoglu A, Hur JY, Zheng H, Li H, Fine R, Mwamburi M, Sun X, Kowall N, Stern RA, Qiu WQ. (2015) Intraperitoneal injection of the pancreatic peptide amylin potently reduces behavioral impairment and brain amyloid pathology in murine models of alzheimer's disease. Mol Psychiatry, 20: 252-262.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Az értekezés témájában megjelent publikációk

1. **Szabó ER**, Cservenák M, Dobolyi A. (2012) Amylin is a novel neuropeptide with potential maternal functions in the rat. FASEB J, 26: 272-281. **IF: 5,704**

2. **Szabó ER**, Cservenák M, Lutz TA, Gévai L, Endrényi M, Simon L, Dobolyi A. (2015) Behavioural changes in mothers and maternally sensitised female mice. BEHAVIOUR, 152: 1801-1819. **IF: 1,230**

2. Egyéb, az értekezéshez fel nem használt publikációk

1. Vincze C, Pál G, Wappler EA, **Szabó ER**, Nagy ZG, Lovas G, Dobolyi A. (2010) Distribution of mRNAs encoding transforming growth factors-beta1, -2, and -3 in the intact rat brain and after experimentally induced focal ischemia. J Comp Neurol, 18: 3752-70. **IF: 3,774**

2. 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. Psychoneuroendocrino, 12: 3070-84. **IF: 5,591**

3. Helfferich F, Lourmet G, **Szabó ÉR**, Boldogkői Zs, Palkovits M. (2016) Facial virus inoculations infect vestibular and auditory neurons in rats. Clin Neurosci, 69: E001-E004. **IF: 0,386**

4. Völgyi K, Udvari EB, **Szabó ÉR**, Györffy BA, Hunyadi-Gulyás É, Medzihradszky K, Juhász G, Kékesi KA, Dobolyi Á. (2016) Maternal alterations in the proteome of the medial prefrontalcortex in rat. J Proteomics, 16: pp 30206-8. **IF: 3,867**

5. Cservenák M1, Kis V, Keller D, Dimén D, Menyhárt L, Oláh S, **Szabó ÉR**, Barna J, Renner É, Usdin TB, Dobolyi A. (2016) Maternally involved galanin neurons in the preoptic area of the rat. Brain Struct Funct: pp 1–18. **IF: 5.811**

DOI:10.14753/SE.2016.1942

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Dobolyi Árpádnak, akinek mindenkori támogatása, biztatása és tanácsai nélkül nem jöhetett volna létre ezen dolgozat. Köszönöm türelmét és azt, hogy bármikor fordulhattam hozzá segítségért. Külön köszönet illeti Prof. Palkovits Miklós tanár urat, első főnökömet, akinek kitartása, precizitása, valamint az idegtudomány és a kutatómunka iránti szeretete a mai napig számomra példamutató értékű. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Alpár Alán docens úrnak, hogy disszertációm házi bírálatát elvállalta, melyet rendkívüli precizitással, segítő szándékkal és építő jellegű, jóindulatú kritikával végzett el.

Külön köszönet illeti Dr. Gerber Gábort, a SE Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet általános igazgatóhelyettesét, aki lehetővé tette, hogy egy tanév erejéig a kutatómunkára koncentrálhassak.

Szeretném megköszönni a Neuromorfológiai Laboratórium lelkes csapatának a segítséget, támogatást és a munkával töltött jókedvű hétköznapokat. Dr. Vitéz-Cservenák Melindát, Dr. Dobolyiné Renner Évát és Dr. Pál Gabriellát a szakmai, Hanák Nikolettet, Deák Szilviát és Dellaszéga-Lábas Viktóriát a technikai, Toronyay-Kasztner Magdolnát az ügyintézői segítségéért illeti külön köszönet. Köszönöm mindannyiuknak, hogy nem csak munkatársaim, hanem barátaim is voltak.

Végül, de nem utolsó sorban szeretné megköszönni Férjem, Szüleim és Testvéreim segítségét, akik szerető támogatására mindig számíthattam.