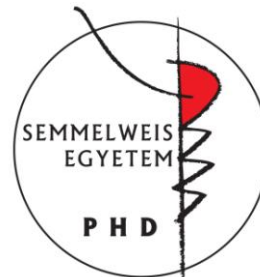


**A tuberoinfundibuláris peptid 39 és a kettős
típusú parathormon receptor neuromodulátor
rendszer szerepe az anyai adaptációk központi
idegrendszeri szabályozásában**

Doktori értekezés

Cservenák Melinda

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dobolyi Árpád tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Szabó Gábor osztályvezető, az MTA doktora
Dr. Földes Anna tudományos munkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Halász Béla prof. emeritus, az MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kiss József tud. tanácsadó, az MTA doktora
Dr. Rácz Bence egyetemi docens, Ph.D.

Budapest

2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	10
1.1. A tuberoinfundibuláris peptid 39 (TIP39).....	10
1.2. TIP39-et expresszáló sejtcsoportok a központi idegrendszerben.....	11
1.2.1. TIP39 sejtek a posterior thalamus area subparafascicularisában (SPA).....	11
<i>A periventricularis szürkeállomány (PVG)</i>	12
<i>A posterior intralaminaris thalamicus komplex (PIL)</i>	13
1.2.2. TIP39 sejtek a nucleus paralemniscalis medialis-ban (MPL)	16
1.3. A TIP39 expresszió változása az egyedfejlődés alatt.....	17
1.4. Nemi különbségek a TIP39 expresszióban.....	18
1.5. A TIP39 receptora, a kettes típusú parathormon receptor (PTH2 receptor).....	19
1.5.1. Parathormon receptorok	19
1.5.2. A PTH2 receptort expresszáló sejtcsoportok a központi idegrendszerben ..	20
1.5.3. PTH2 receptor antagonisták	20
1.6. A TIP39 és a PTH2 receptor neuromodulátor rendszer	21
1.7. Anyai adaptációk	22
1.7.1. A laktogenezis/galaktopoezis szabályozása	25
<i>A prolaktin (PRL) felszabadulás szabályozása</i>	25
<i>A PRL elválasztást reguláló faktorok</i>	27
Gátló faktorok (PIF-ek)	27
Serkentő faktorok (PRF-ek)	28
<i>A szopási inger közvetítésében részt vevő agyi struktúrák</i>	29
<i>PRL elválasztás anyákban</i>	30
<i>A prolaktin receptora (PRL-R)</i>	31
<i>A PRL szerepe a laktációban</i>	31
1.7.2. Az anyai motiváció	32
<i>Az anyai motiváció szabályozásában részt vevő agyi központok</i>	33
<i>Az anyai motiváció mérésére szolgáló viselkedési teszt</i>	36
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	37

1. A PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek topográfiai elhelyezkedésének, valamint neuronális kapcsolatrendszerének a leírása anya patkányokban az alábbi szempontok szerint:	37
2. A TIP39 indukcióját és a TIP39 neuronok aktiválódását vizsgáltuk anya patkányokban. Kérdéseink a következők voltak:	37
3. Az endogén TIP39 antagonizálás hatását az alábbi két kísérleti modellben kívántuk vizsgálni a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra:	37
4. Az endogén TIP39 antagonizálás hatását vizsgáltuk az anyai motivációra. Az alábbi kérdésre kerestük a választ:	38
3. MÓDSZEREK.....	39
3.1. Kísérleti állatok	39
3.2. Hisztológiai módszerek	39
3.3. Hisztológiai analízis	43
3.4. A PIL elektromos léziója.....	44
3.5. A decussatio supraopticus pálya átvágása	44
3.6. Anterográd pályajelölés biotinilált dextrans aminnal	44
3.7. Retrográd pályajelölés kolera toxin β -alegységgel.....	45
3.8. RT-PCR	45
3.9. In situ hibridizációs hisztokémia	46
3.10. PTH2 receptor antagonist (HYWH-TIP39) agykamrába való injektálása	47
3.11. Vírus előállítás.....	47
3.12. Sztereotaxikus vírusbeadás az agyba.....	48
3.13. Vérvétel a szopási inger által kiváltott prolaktin szekréció vizsgálatára.....	48
3.14. A prolaktin koncentrációjának meghatározása a vérplazmában.....	49
3.15. Kondicionált helypreferencia teszt	49
3.16. Statisztikai analízis	50
4. EREDMÉNYEK.....	52
4.1. A PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek topográfiai elhelyezkedése, valamint neuronális kapcsolatrendszerük vizsgálata anya patkányokban.....	52
4.1.1. A PIL topográfiájának és neuronális markereinek vizsgálata	52
<i>A PIL topográfiája</i>	52

<i>A PIL-ben lévő neuronális markerek azonosítása és a TIP39 sejtekkel való topográfiai kapcsolataik</i>	55
4.1.2. A PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek neuronális kapcsolatrendszeré..	57
<i>A TIP39 rostok eliminációja a hypothalamicus magvakból a PIL elektromos léziójának hatására</i>	57
<i>A TIP39 rostok lefutásának vizsgálata és a rostok eliminációja a decussatio supraopticus pálya féloldali átvágásának hatására</i>	58
<i>Az efferens neuronális kapcsolatok feltérképezése</i>	59
Anterográd jelölt rostok eloszlása biotinilált dextrans amin PIL-be történő injektálását követően	59
A TIP39 sejtek jelölődése a célterületre adott kolera toxin β -alegységgel	62
<i>Az afferens neuronális kapcsolatok feltérképezése</i>	62
4.2. A TIP39 neuronok aktiválódásának vizsgálata anya patkányokban	66
4.2.1. A TIP39 immunreaktivitás intenzitásának változása.....	66
4.2.2. A TIP39 mRNS eloszlásának és mennyiségének meghatározása	66
4.2.3. A TIP39 sejtek neuronális aktivitásának vizsgálata Fos immunhisztokémiával.....	71
4.3. Az endogén TIP39 antagonizálás hatásának vizsgálata a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra anya patkányokban	75
4.3.1. A PTH2 receptor antagonist (HYWH-TIP39) agykamrába való injektálásának hatása a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra.....	75
4.3.2. A HYWH-TIP39-GFP lentivírus vektor mediobasalis hypothalamicus injektálásának hatása a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra.....	76
4.4. Az endogén TIP39 antagonizálás hatásának vizsgálata az anyai motivációra	79
4.4.1. Az anyákban Fos-expressziót mutató preopticus neuronok innervációja a posterior thalamicus TIP39 neuronok által.....	79
4.4.2. A HYWH-TIP39-GFP lentivírus vektor medialis preopticus területre való injektálásának hatása a kondicionált helypreferencia tesztben mutatott viselkedésre anya patkányokban	80
5. MEGBESZÉLÉS	82
5.1. A PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek topográfiai elhelyezkedése, valamint neuronális kapcsolatrendszerük anya patkányokban.....	82

5.2. A TIP39 neuronok aktiválódása anya patkányokban	85
5.3. Az endogén TIP39 antagonizálás hatásának vizsgálata a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra anya patkányokban	87
5.4. Az endogén TIP39 antagonizálás hatása az anyai motivációra	90
5.5. A paralemniscalis TIP39 neuronok feltételezett funkciója a postpartum időszakban	93
5.6. A posterior intralaminaris thalamicus TIP39 neuronok szerepe a szopási inger továbbításában	94
5.7. Összegzés	97
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	98
7. ÖSSZEFOGLALÁS	99
8. SUMMARY	100
9. IRODALOMJEGYZÉK	101
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	132
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	133

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A rövidítések jegyzékében az anatómiai elnevezéseknél a szokásos magyar és latin kifejezést, valamint az angol formát is megadtam.

ac	- commissura anterior (anterior commissure)	(central amygdaloid nucleus)
AHN	- nucleus hypothalamicus anterior (anterior hypothalamic nucleus)	CGRP - calcitonin génnel rokon peptid
α -MSH	- α -melanocita-stimuláló hormon	cp - pedunculus cerebri (cerebral peduncle)
AP	- antero-posterior koordináta	CPP - kondicionált helypreferencia teszt (conditioned place preference test)
APT	- nucleus praetectalis anterior (anterior pretectal nucleus)	CRH - korikotropin- releasing hormon
AOB	- járulékos bulbus olfactorius	CTb - kolera toxin β -alegység
Arc	- nucleus arcuatus (arcuate nucleus)	DA - dopamin
BDA	- biotinilált dextransz amin	DAB - 3,3-diaminobenzidin
BNST	- nucleus interstitialis striae terminalis (bed nucleus of the stria terminalis)	DM - nucleus dorsomedialis (dorsomedial hypothalamic nucleus)
cAMP	- ciklikus adenzin- monofoszfát	DpMe - deep mesencephalic nucleus
cc	- corpus callosum	DV - dorso-ventralis koordináta
cDNS	- komplementáris deoxiribonukleinsav	ECIC - a colliculus inferior külső kérgé (external cortex of the inferior colliculus)
CeA	- nucleus amygdaloideus centralis	f - fornix
		FITC - fluoreszcein-izotiocianát

fr	- fasciculus retroflexus	ml	- lemniscus medialis (medial lemniscus)
GABA	- γ -amino- <i>vajsav</i>	MPA	- area praeoptica medialis (medial preoptic area)
GAD	- glutaminsav-dekarboxiláz	MPO,MPN-	nucleus praeopticus medialis (medial praeoptic nucleus)
GAPDH	- gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz	MPL	- nucleus paralemniscalis medialis (medial paralemniscal nucleus)
GFP	- zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)	mRNS	- messenger (hírvivő) ribonukleinsav
GLUT1	- 1-es típusú glükóz transzporter	mt	- tractus mamillothalamicus (mamillothalamic tract)
GnRH	- gonadotropin-releasing hormon	NA	- nucleus accumbens
IC	- colliculus inferior (inferior collicle)	OB	- bulbus olfactorius
ILL	- nucleus lemnisci medialis (intermediate nucleus of the lateral lemniscus)	oc, och	- chiasma opticum (optic chiasm)
L	- medio-lateralis koordináta	ot	- tractus opticus (optic tract)
LS	- nucleus septi lateralis (lateral septal nucleus)	PACAP	- hypophysealis adenilát ciklázt aktiváló polipeptid
LSv	- ventral subdivision of the LS	PAG	- substantia grisea centralis (periaqueductal gray)
LV	- ventriculus lateralis lateral ventricle	PB	- foszfát puffer
me	- eminentia mediana (median eminence)	Pe	- nucleus periventricularis (hypothalamic periventricular nucleus)
MeA	- nucleus amygdaloideus medialis (medial amygdaloid nucleus)	PHDA	- periventriculo- hypophysealis dopaminerg rendszer
MGB	- corpus geniculatum mediale (medial geniculate body)		

PIF	- prolaktin elválasztást gátló faktorok (prolactin inhibiting factor)	PVG	- a thalamus periventricularis szürkeállománya (periventricular gray of the thalamus)
PIL	- a thalamus posterior intralaminaris komplexe (posterior intralaminar complex of the thalamus)	PVN	- nucleus paraventricularis (hypothalamic paraventricular nucleus)
PIN	- nucleus intralaminaris posterior thalami (posterior intralaminar thalamic nucleus)	PTH	- parathormon
Po	- nucleus posterior thalami (posterior thalamic nucleus)	PTHrP	- parathormon-szerű peptid
PoT	- nucleus triangularis posterior thalami (posterior thalamic nucleus, triangular part)	PTH1R	- egyes típusú parathormon receptor
PnO	- nucleus reticularis pontis oralis (pontine reticular nucleus, oral part)	PTH2R	- kettes típusú parathormon receptor
PPN	- nucleus peripeduncularis (peripeduncular nucleus)	REth	- nucleus retroethmoideus (retroethmoid nucleus)
PRF	- prolaktin elválasztást serkentő faktor (prolactin releasing factor)	RIA	- radioimmunoassay
PRL	- prolaktin	rs	- tractus rubrospinalis (rubrospinal tract)
PRL-R	- prolaktin receptor	scp	- pedunculus cerebellaris superior (superior cerebellar peduncle)
		SN	- substantia nigra
		SPA	- area subparafascicularis (subparafascicular area)
		SPFp	- nucleus subparafascicularis parvicellularis (subparafascicular nucleus, parvicellular part)
		STh	- nucleus subthalamicus (subthalamic nucleus)

TIP39	- tuberoinfundibuláris peptid 39	VMH	- nucleus ventromedialis (hypothalamic ventromedial nucleus)
TH	- tirozin-hidroxiláz		
THDA	- tuberohypophysealis dopaminerg rendszer	VP	- ventral pallidum
TIDA	- tuberoinfundibuláris dopaminerg rendszer	VPM	- nucleus posteromedialis ventralis (ventral posteromedial thalamic nucleus)
TRH	- thyreotropin releasing hormon	VPPC	- nucleus posteromedialis ventralis parvicellularis (ventral parvicellular posteromedial thalamic nucleus)
TRIS	- 2-amino-2-hidroximetil- propán-1,3-diol		
UTP	- uridin-5'-trifoszfát		
VGLUT-2	- vezikuláris glutamát transzporter	VTA	- area tegmentalis ventralis (ventral tegmental area)
VIP	- vazooactiv intestinalis peptid	ZI	- zona incerta
VLL	- nucleus ventralis lemniscii lateralis (ventral nucleus of the lateral lemniscus)	3V	- ventriculus tertius (third ventricle)

1. BEVEZETÉS

1.1. A tuberoinfundibuláris peptid 39 (TIP39)

A tuberoinfundibuláris peptid 39 (TIP39) egy 39 aminosavból álló neuropeptid, amit a kettes típusú parathormon receptor (PTH2 receptor)-hoz való affinitása alapján 1999-ben izoláltak borjú hypothalamusának tuberoinfundibuláris régiójából (Usdin és mtsai 1999a). A TIP39 egy peptidcsaládba tartozik a parathormonnal (PTH) és a parathormonszerű peptiddel (PTHrP) aminosavszekvenciájuk és harmadlagos szerkezetük hasonlósága alapján (Usdin és mtsai 1999a). Jelentős különbség van azonban közöttük a receptor aktiválás tekintetében. A TIP39 szelektíven aktiválja a kettes típusú parathormon receptort (Usdin és mtsai 2000), míg a parathormon és a parathormonszerű peptid az egyes típusú parathormon receptoron (PTH1 receptor) keresztül fejtik ki hatásukat (Gensure és mtsai 2005, Muff és mtsai 1994). A humán és az egér TIP39-et kódoló cDNS 80%-os azonosságot mutat, míg ha az érett peptideket kódoló szakaszt hasonlítjuk össze ugyanezekből a fajokból, 90%-os azonosságot kapunk. Ezzel szemben az egér és a patkány peptid szekvenciája teljes mértékben megegyezik (Dobolyi és mtsai 2002, Hansen és mtsai 2002).

A TIP39 100 aminosavas prepropeptidként szintetizálódik, ami tartalmaz egy szekréciós fehérjékre jellemző szignálpeptidet. A szignálpeptidet egy endoproteáz hasítja le és így keletkezik a 70 aminosavból álló TIP39 propeptid, ami az „intercalated” peptidből és a „core” régióból áll (Hansen és mtsai 2002, John és mtsai 2002). Egy második hasítás eredményeként jön létre az érett forma, amely a prepropeptid 62-100 pozícióban lévő aminosavait tartalmazza. A funkcionálisan érett TIP39 peptid N-terminálisa (23 aminosav) felelős a PTH2 receptor aktivációért. Ez a filogenetikailag konzerváltabb szakasz azonos az embernél és az egérnél. A C-terminális (16 aminosav) a receptorhoz való kötődéshez szükséges, törzsfajlódástani értelemben sokkal diverzebb.

A TIP39 kis mennyiségben megtalálható a szemben, a hátsó gyökérdúcban (Dobolyi és mtsai 2002), a vesében (Eichinger és mtsai 2002), valamint a szívben (Ross és mtsai 2005). Ezenkívül a TIP39 mRNS expresszálódik még a herében (John és mtsai

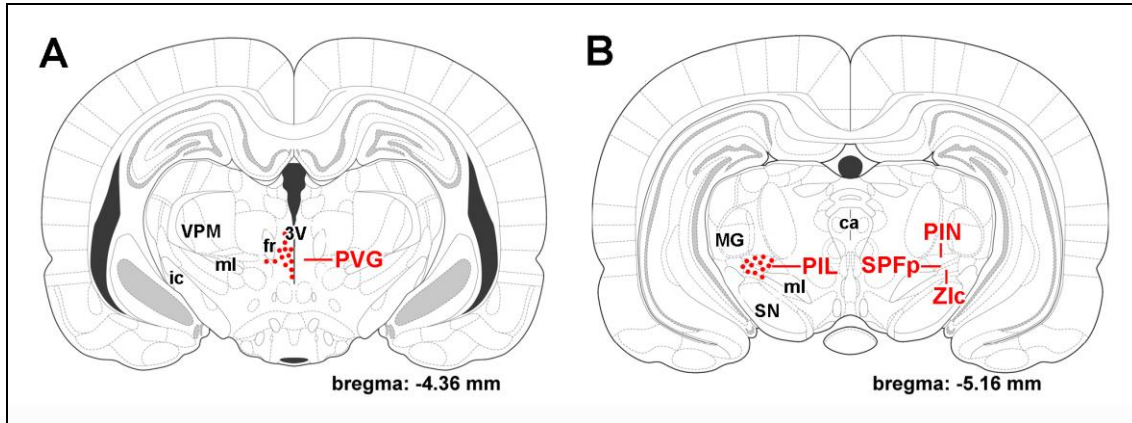
2002, Usdin és mtsai 2008), de legnagyobb mennyiségben a patkány (Dobolyi és mtsai 2003b, Dobolyi és mtsai 2002), az egér (Faber és mtsai 2007, John és mtsai 2002) és a makákó majom (Bago és mtsai 2009) központi idegrendszerében mutatták ki.

1.2. TIP39-et expresszáló sejtcsoportok a központi idegrendszerben

A TIP39-et tartalmazó sejtek csupán két helyen fordulnak elő a patkány központi idegrendszerében: az area subparafascicularis (SPA) területén a posterior thalamusban és a nucleus paralemniscalis medialis (MPL)-ban, a híd lateralis részén (Dobolyi és mtsai 2003b, Dobolyi és mtsai 2002).

1.2.1. TIP39 sejtek a posterior thalamus area subparafascicularisában (SPA)

A TIP39-et expresszáló neuronok megtalálhatóak a magnocellularis (medialis) subparafascicularis magban és az azt körülvevő subparafascicularis areában a thalamus periventricularis szürkeállományán belül (periventricularis szürkeállomány, PVG) (Dobolyi és mtsai 2002, John és mtsai 2002) (1A. ábra). Innen hosszan elnyúlva oldalra és hátrafelé húzódnak a parvicellularis (lateralis) subparafascicularis magban és környékén a lemniscus medialis felett elhaladva egészen a peripeduncularis területig (posterior intralaminaris thalamicus komplex, PIL) (1B. ábra). A TIP39 neuronok fejlődését leíró újabb fejlődéstani (Brenner és mtsai 2008) és funkcionális (Wang és mtsai 2006a) tanulmányok szerint a PVG-ben és PIL-ben lévő TIP39 sejtek két külön sejtcsoportot alkotnak, mivel a PVG-ben csak a születést követően jelennek meg TIP39 sejtek, míg a PIL területén már az embrionális fejlődés 14. napján (Brenner és mtsai 2008). Funkcionális adatok is utalnak a PIL-ben levő TIP39 sejtek különálló szerepére, mivel csak ez a sejtcsoport mutatott c-fos aktivációt hím patkányok ejakulációját követően (Wang és mtsai 2006a).



1. ábra. A TIP39 peptidet expresszáló sejtek lokalizációja a posterior thalamusban

A: A periventricularis szürkeállományban (PVG) a legtöbb TIP39 neuron a harmadik agykamra (3V) és a fasciculus retroflexus (fr) között helyezkedik el. Ventralisabban a harmadik agykamra mentén és a fasciculus retroflexus alatt is található még néhány TIP39 neuron. B: A posterior intralaminaris thalamicus komplex (PIL) caudalisabban helyezkedik el. A TIP39 sejtek megtalálhatóak a posterior intralaminaris thalamicus magban (PIN), a parvicellularis subparafascicularis magban (SPFp), és a zona incerta legcaudalisabb részén (Zic). Rostrálisabban a fő TIP39 sejtcsoporttól medialisán, a lemniscus medialis (ml) felett is megfigyelhető néhány TIP39 neuron. A TIP39 neuronok pozícióját piros pontok jelzik. (Paxinos és Watson 2005 ábráinak módosításával)

A periventricularis szürkeállomány (PVG)

A TIP39 neuronok legrostrálisabban a -3,8 mm bregma szintnél jelennek meg a harmadik agykamra és a fasciculus retroflexus között a magnocellularis subparafascicularis magtól medialisán (Dobolyi és mtsai 2003b, Faber és mtsai 2007). Ezek a periventricularis thalamicus TIP39 neuronok alkotják a legnagyobb TIP39 sejtcsoportot fiatal felnőtt állatokban (Dobolyi és mtsai 2003b). A TIP39 idegsejtek az A11 dopaminerg sejtcsoportnak megfelelő tirozin-hidroxiláz tartalmú neuronokkal részben átfednek, viszont koexpresszió nem figyelhető meg (Dobolyi és mtsai 2003b, Wang és mtsai 2006c).

A PVG elsősorban a limbikus rendszer (medialis prefrontalis kéreg, entorhinalis kéreg, subiculum, septum), a hypothalamus (ventromedialis, periventricularis, dorsomedialis magok, area praeoptica) és a zona incerta felől kap bemenetet (Wang és mtsai 2006b), és főleg a limbikus rendszer (medialis prefrontalis cortex, nucleus septi

lateralis, nucleus interstitialis striae terminalis, amygdala, thalamus periventricularis magok, fundus striati), kisebb mértékben a hypothalamus felé vetül (Dobolyi és mtsai 2003a, Wang és mtsai 2006c).

A PVG funkciójáról keveset tudunk. A PVG stimulációja fájdalomcsökkenéssel járt egyes fájdalomtesztekben (Peschanski és Mantyh 1983, Rhodes és Liebeskind 1978). Továbbá a PVG-ben lévő neuronok közül néhány aktiválódik fájdalmas inger hatására (Dong és mtsai 1978, Sugiyama és mtsai 1992). A hidegnek való kitettség (10°C) hatására c-fos jelenik meg a PVG-beli neuronokban, míg a meleg hőmérséklet (33°C) nem okoz hasonló aktivációt (Baffi és Palkovits 2000, Kiyohara és mtsai 1995, Miyata és mtsai 1995), így szintén feltételezik a PVG szerepét a homeosztázis fenntartásában a hidegstresszhez való alkalmazkodás során (Baffi és Palkovits 2000).

A posterior intralaminaris thalamicus komplex (PIL)

A posterior thalamus lateralis részén (a bregmához képest -4,2 és -6,1 mm között) is találhatóak TIP39 sejtek. Ezen a területen a TIP39 neuronok száma az embrionális (Brenner és mtsai 2008) és korai posztnatális fejlődés (Dobolyi és mtsai 2006b) során a legmagasabb. Az oldalra húzódó TIP39 sejtek egy horizontális sejsort alkotnak a lemniscus medialis felett a corpus geniculatum mediale (MGB)-tól ventromedialisan elhelyezkedő területig. A lemniscus medialis felett elhelyezkedő terület felel meg a nucleus subparafascicularis parvicellularisnak (SPFp), míg az MGB-től ventromedialisan elhelyezkedő terület tartalmazza a posterior intralaminaris thalamicus magot (Dobolyi és mtsai 2003b, Faber és mtsai 2007). Emellett néhány TIP39 sejt a caudalis zona incerta lateralis területére esik (Dobolyi és mtsai 2003b, Faber és mtsai 2007). Hasonló caudolateralis irányban elongált elrendezést írtak le ezen a területen posterior intralaminaris thalamicus komplex (PIL) néven LeDoux és mtsai 1985-ben (LeDoux és mtsai 1985). Az értekezésben ezt a nevezéktant használom, amikor a fasciculus retroflexustól caudolateralisan elhelyezkedő thalamicus TIP39 sejtek pozíciójára utalok (Brenner és mtsai 2008, Dobolyi és mtsai 2006a, Dobolyi és mtsai 2010, Faber és mtsai 2007). Fontos azonban megjegyezni, hogy néhány tanulmányban mesencephalonként (Shimura és Shimokochi 1991), 'zona incerta/lateral tegmental continuum'-ként (Maillard és Edwards 1991) vagy caudal paralaminar

areaként (Wang és mtsai 2006b) jelölik azt a területet, ahol ezek a TIP39 neuronok megtalálhatóak.

A TIP39 neuronok fent leírt elrendezése hasonlít a calcitonin génnel rokon peptid (CGRP) tartalmú neuronok eloszlására a posterior thalamusban. A CGRP neuronok is jelen vannak a SPFp-ban, a PIN-ban és a MGB környékén (Dobolyi és mtsai 2005, Ishida-Yamamoto és Tohyama 1989, Kresse és mtsai 1995, Skofitsch és Jacobowitz 1985). Horizontális metszeten szépen látszik, ahogyan a CGRP sejtek folyamatos ívben hajlanak hátrafelé (Dobolyi és mtsai 2005, Kruger és mtsai 1988), amit CGRP magnak is neveznek (Kruger és mtsai 1988). Bár az elhelyezkedésük nagyon hasonló, csak néhány sejt jelölődik duplán TIP39-re és CGRP-ra, jellemzően nem koexpresszálódnak egyazon sejtben és ha koronális metszeten szemléljük őket, látható, hogy a TIP39 neuronok medialisán helyezkednek el a CGRP sejtekhez képest (Brenner és mtsai 2008).

A nucleus subparafascicularis parvicellularist már korábban két szubdivízióra osztották az alapján, hogy a medialis szubdivízióban galanin-ir rostok denz populációja, míg a lateralis szubdivízióban a CGRP sejtek jelenléte figyelhető meg (Coolen és mtsai 2003a). Továbbá a medialis szubdivízió c-fos expressziót mutat a hím patkányok ejakulációját követően (Coolen és mtsai 2004, Coolen és mtsai 2003a), miközben a lateralis szubdivízió nem (Coolen és mtsai 2003a, D'Hanis és mtsai 2007), funkcionális érvet is szolgáltatva a kompartmentalizációra (Coolen és mtsai 2003a).

Mivel a TIP39 neuronok túlnyomórészt a CGRP neuronoktól medialisán helyezkednek el (Brenner és mtsai 2008) és ejakulációt követően c-fos aktivációt mutatnak (Wang és mtsai 2006a), az SPFp medialis szubdivíziójába sorolhatóak. A kétféle neuropeptidet expresszáló sejtek caudalisabban is megtartják ezt a mediolaterális szeparációt, tehát valószínűsíthető, hogy nemcsak az SPFp, hanem az egész PIL felosztható egy medialis és egy lateralis részre, ahol a TIP39 sejtek a medialis, míg a 'CGRP nucleus' a lateralis szubdivízióban foglal helyet. Ez a felosztás azért is indokolt, mert a PIL-beli TIP39 neuronok projekciója jelentősen különbözik a CGRP sejtek projekciójától (Dobolyi és mtsai 2005, Inagaki és mtsai 1990, Yasui és mtsai 1991).

Elektromos stimulációs (Shimura és Shimokochi 1991) és léziós kísérletek (Maillard és Edwards 1991), valamint c-fos aktivációs mintázat térképezés (Coolen és mtsai 1997) alapján feltételezik, hogy a PIL medialis részének szerepe lehet szexuális

funkciókban. A párzás, illetve az ejakuláció hatására c-fos expresszálódik ezen a területen (Coolen és mtsai 1997, 1998, Sachs és Meisel 1988, Veening és Coolen 1998). Patkányoknál a c-fos néhány TIP39 neuronban indukálódik a párzási aktust követően hímekben, ezek a sejtek valószínűleg részt vesznek a szexuális funkciók szabályozásában (Wang és mtsai 2006a).

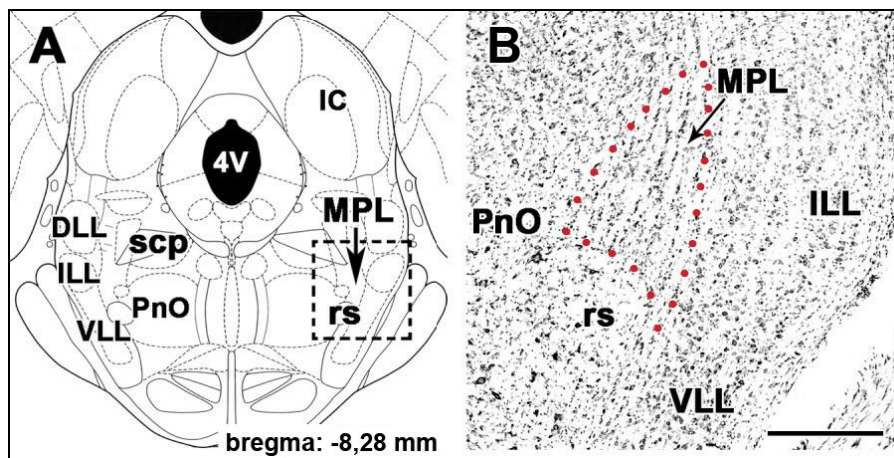
Coolen és mtsai (Coolen és mtsai 2003b) vizsgálták a PIL-nek megfelelő terület afferens kapcsolatait. Megállapították, hogy mindkét szubdivízió kap bemenetet az auditoros kéregből, a lateralis septalis magból, a hypothalamicus anterior és ventromedialis magokból, a zona incertából, a substantia grisea centralisból, a superior colliculus mély rétegéből, az inferior colliculus kortikális rétegéből, a cuneiform magból és a nucleus tegmentalis pedunculopontinusból. Azt a megállapítást tették, hogy a medialis prefrontalis, insularis és somatoszenzoros kéreg, a substantia innominata, a medialis preopticus régió, a hypothalamicus paraventricularis mag, a medialis amygdala, az area tegmentalis ventralis, a parabrachialis magok, a locus coeruleus, a nucleus tractus solitarii és a nucleus tractus spinalis nervi trigemini túlnyomórészt a medialis szubdivízióba projektálnak, míg a lateralis szubdivízió elsősorban auditoros és vizuális agyi központoktól kap bemenetet. Bár a PIL medialis szubdivíziója és a PVG afferens kapcsolatai hasonlóak, a PVG kevesebb bemenetet kap a szomatoszenzoros kéregből, a hypothalamicus paraventricularis magból, az area tegmentalis ventralisból, a locus coeruleusból, a nucleus tractus solitariiból, a nucleus tractus spinalis nervi trigeminiből (Wang és mtsai 2006b). Efferenciációja elsősorban hypothalamicus (hypothalamicus paraventricularis és dorsomedialis magok), kisebb mértékben limbikus (amygdala, medialis prefrontalis cortex, nucleus accumbens, nucleus interstitialis striae terminalis) (Dobolyi és mtsai 2003a).

A PIL kapcsolatai alapján várható, hogy auditoros bemenetet szolgáltat az emóciókkal kapcsolatos agyi központok, mint például az amygdala számára (LeDoux és mtsai 1990, Linke és Schwegler 2000, Namura és mtsai 1997). A corpus geniculatum medialétól ventromedialisan elhelyezkedő terület c-fos aktivitást mutat nagy intenzitású hang hatására (Burow és mtsai 2005, Campeau és Watson 1997). 30 percig tartó 105 Db-es fehér zaj indukálja a c-fos-t a PIL-ben található TIP39 neuronok nagy részében, míg a PVG-ben lévő TIP39 neuronok esetén nem figyelhető meg ilyen aktiváció (Palkovits és mtsai 2004). Mivel a hypothalamicus paraventricularis mag kap bemenetet

a PIL-ből (Campeau és Watson 2000, Palkovits és mtsai 2004), feltételezik, hogy a PIL részt vesz az audiogén stressz szignálok közvetítésében (Palkovits és mtsai 2004).

1.2.2. TIP39 sejtek a nucleus paralemniscalis medialis-ban (MPL)

A harmadik különálló TIP39 sejtszoport patkányban a bregma szinttől -8,0 és -8,5 mm között található a híd rostralis részén. Mediálisan a lemniscus lateralis, dorsalisán a tractus rubrospinalis, rostralisán pedig a Kölliker-Fuse mag határolja ezt a háromszög alakú magot. Kutatócsoportunk elsőként írta le az MPL-t 2003-ban a TIP39 neuronok itt látható expressziós mintázata alapján (Dobolyi és mtsai 2003b), majd környezetétől történő citoarchitektónikus elkülönülése alapján (2. ábra) (Varga és mtsai 2008). Az MPL nemcsak citoarchitektúráilag, hanem afferens kapcsolatait tekintve is különbözik a vele határos agytörzsi magoktól (Varga és mtsai 2008). A morfológiai kép és a chemoarchitektúra alapján 3 sejtszoport különíthető el a magon belül: gliasejtek, TIP39 neuronok (75%) és nem TIP39-ir neuronok (Varga és mtsai 2008).



2. ábra. A nucleus paralemniscalis medialis citoarchitektúrája

A: Az MPL ventralis határát a tractus rubrospinalis alkotja. Medialisan a nucleus reticularis pontis oralis, lateralisan pedig a lemniscus lateralis magjai határolják. B: A koronális metszeten jól elkülöníthetőek az MPL sejtszelei a Nissl festés alapján. A kúp alakú magot egy 20-50 µm-es sejtsegregény zóna veszi körül, amelyet a lemniscus lateralis rostjai alkotnak. A piros pontok az MPL határait jelölik. A lépték a B ábrán 500 µm-t jelöl (Varga és mtsai 2008 nyomán).

Az MPL afferenciát kap a hallórendszer (auditoros kéreg, corpus geniculatum mediale, colliculus superior, colliculus inferior, periolivaris terület) és a hypothalamus (elsősorban ventromedialis magok) felől (Herbert és mtsai 1991, Varga és mtsai 2008, Winer és mtsai 1998). Az MPL-ben lévő TIP39 sejtek fő célpontjai a colliculus superior mélyebb rétegei, a colliculus inferior külső rétege, a nucleus parabrachialis lateralis, a corpus trapezoideum, a periaquaeductalis szürkeállomány és a gerincvelő (Dobolyi és mtsai 2003a).

Az MPL területének ingerlése csökkenti a fájdalomérzést (Basbaum és mtsai 1977, Haws és mtsai 1989) és gátolja a fájdalmas ingerre adott választ (Girardot és mtsai 1987). A denevérek (Metzner 1996) és a selyemmajmok (Hage és Jurgens 2006, Hannig és Jurgens 2006) vokalizációs központja a paralemniscalis TIP39 sejtek pozíciójának felel meg. Az itt lévő „audio-vokalizációs” neuronok bizonyos hallási ingerre aktiválódnak és stimulációjuk az állat vokalizációját váltja ki (Fenzl és Schuller 2007, Hage és Jurgens 2006, Metzner 1993, Schuller és Radtke-Schuller 1990). Az MPL-beli neuronoknak további funkciója a szoptatásra adott válaszban való részvétel lehet, mivel a terület Fos aktivációt mutat kölykök hatására anyaállatokban (Li és mtsai 1999b).

1.3. A TIP39 expresszió változása az egyedfejlődés alatt

A TIP39 neuronok először a 14. embrionális napon jelennek meg a PIL-ben. A 16. embrionális és az 5. posztnatális napok között a TIP39 szintje hímeknél és nőstényeknél egyaránt jelentősen lecsökken és később is alacsony szinten marad (Brenner és mtsai 2008). Ezzel szemben a PVG-ben csak az első posztnatális napon jelennek meg a TIP39 neuronok. Ezen a területen a TIP39 szintje a 14. posztnatális napig növekedik, a 33. napig stagnál, majd innentől kezdve csökken, a 125. posztnatális napon pedig TIP39 már éppen csak kimutatható mennyiségben van jelen (Dobolyi és mtsai 2006b). Az MPL-ben szintén a 14. embrionális napon tűnnek fel a TIP39 neuronok, viszont a TIP39 szintjében bekövetkező posztnatális változások már a PVG-hez hasonlóak (Brenner és mtsai 2008, Dobolyi és mtsai 2006b).

A 16. embrionális napon megjelenik egy TIP39 sejtcsoport az amygdalában (Brenner és mtsai 2008). Kb. 100-200 neuron tűnik fel az amygdalo-hippocampális

tranzíciós zóna anterolateralis részén. A TIP39 immunjelölés intenzitása csökken a 16. embrionális nap után. Az 1. posztnatális nap körül már csak gyenge TIP39 immunjelölődés látható mindkét nemnél az amygdalo-hippocampális tranzíciós zónában, a későbbi posztnatális fejlődés során pedig már nem is észlelhetőek ezek a neuronok, annak ellenére, hogy felnőttkorban TIP39-ir rostokkal közepesen ellátott ez a terület (Dobolyi és mtsai 2003b). A szteroidreceptor expressziója és neuronális összeköttetései alapján (Canteras és mtsai 1992) feltételezik, hogy az amygdalo-hippocampális tranzíciós zóna hormonális információkat továbbít a reproduktív agyi központok felé (Simerly 2002).

1.4. Nemi különbségek a TIP39 expresszióban

Fiatal állatokban nincs nemi különbség a TIP39 expresszióban (Dobolyi és mtsai 2006b, Faber és mtsai 2007). Idősebb állatokban viszont a TIP39 expresszió szignifikánsan magasabb nőstény, mint hím patkányokban, azaz a TIP39 szintek jelentősebben csökkennek hímeiben a fiatal állatokhoz viszonyítva (Dobolyi és mtsai 2006b). Ez a hím és nőstény állatok között megfigyelhető különbség nem függ a szteroid hormonszintektől, mivel felnőtt állatokban végrehajtott gonadectomia nem befolyásolja a TIP39 szinteket (Dobolyi és mtsai 2006b). Ezzel ellentétben a 24. posztnatális nap előtt végrehajtott gonadectomia következtében nem figyelhető meg a kontrollhoz hasonló mértékű csökkenés a TIP39 szintekben, vagyis a csökkenés feltehetően a pubertális éréshez kapcsolódó szexuálszteroid hormonhatásokkal magyarázható (Lamming 1994).

1.5. A TIP39 receptora, a kettes típusú parathormon receptor (PTH2 receptor)

1.5.1. Parathormon receptorok

Az egyes típusú parathormon receptor (PTH1 receptor)-t 1991-ben azonosították (Juppner és mtsai 1991), és kimutatták, hogy a parathormon és a parathormonszerű peptid egyaránt aktiválhatja.

A PTH2 receptort Usdin és munkatársai írták le (Usdin és mtsai 1995). Csak később izolálták a receptor endogén ligandjának tekintett (a PTH2 receptorhoz szelektíven kötődő, azt potensen aktiváló) TIP39-et (Usdin és mtsai 1999b).

A PTH receptorok hét transzmembrán hélix-szel rendelkező receptorok, amelyek a G fehérje kapcsolt receptorok II-es osztályába (vagy B család) tartoznak (Usdin és mtsai 2002), illetve azon belül a B1 alcsaládba, amely tartalmazza többek között a calcitonin, a kortikotropin releasing hormon (CRH), a növekedési hormon releasing hormon (GHRH), a gyomorműködést gátló polipeptid (GIP), a glukagon, a hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP), a szekretin és a vazoaktív intesztinális peptid (VIP) receptorát. Az aminosavszekvencia azonosság a PTH1 receptor és a PTH2 receptor között 70%, a B1 receptor alcsalád többi tagjával pedig 30%-ban azonos az aminosavszekvenciájuk (Usdin és mtsai 1995).

A PTH1 receptor a G-fehérjék α -alegységén (Gs) keresztül (Schwindinger és mtsai 1998) cAMP szintézist és protein kináz A aktivációt indít el (Segre és mtsai 1992). Emellett a PTH1 receptor a Gq-fehérje közreműködésével is aktiválhatja a foszfolipáz C-t (Friedman és mtsai 1999) emelve ezzel az intracelluláris inozitol triszfoszfát (IP3) és Ca^{2+} szintet (Tanaka és mtsai 1995).

A PTH2 receptor TIP39 általi aktiválása cAMP akkumulációt eredményez (Goold és mtsai 2001). Emellett bizonyos sejttípusokban egy gyors intracelluláris Ca^{2+} koncentrációnövekedést is leírtak (Della Penna és mtsai 2003, Goold és mtsai 2001).

A PTH1 receptor elsősorban a vesében és a csontokban fordul elő, ahol a parathormon ezen a receptoron keresztül fejt ki Ca^{2+} szint szabályozó hatását (Hurwitz 1996, Rizzoli és mtsai 1992). Ezzel ellentétben a PTH2 receptor perifériás szervekben

kis mennyiségben (Usdin és mtsai 1996, Usdin és mtsai 1999a), míg a központi idegrendszerben nagy koncentrációban van jelen (Usdin és mtsai 1995).

1.5.2. A PTH2 receptort expresszáló sejtcsoportok a központi idegrendszerben

In situ hibridizációs hisztokémiával, immunhisztokémiával és PTH2 receptor promóter által hajtott β -galaktozidázt expresszáló transzgén állatokon végzett X-Gal hisztokémia felhasználásával vizsgálták a PTH2 receptor eloszlását (Dobolyi és mtsai 2006a, Dobolyi és mtsai 2002, Faber és mtsai 2007, Wang és mtsai 2000). Ezekben a vizsgálatokban PTH2 receptort expresszáló neuronokat írtak le a limbikus rendszerben (tuberculum olfactorium, lateralis septum, nucleus interstitialis striae terminalis, amygdala, hippocampus, limbikus kéreg, gyrus dentatus, subiculum, claustrum, endopiriform mag, nucleus accumbens, nucleus caudatus, putamen, substantia innominata), a thalamusban (corpus geniculatum mediale, középvonali és intralaminaris magok, nucleus habenulae), a hypothalamusban (medialis preopticus terület, para- és periventricularis hypothalamicus magok, arcuatus mag, tuberomamillaris mag) és a középgyban (substantia grisea centralis, lateralis interpeduncularis magok, paranigralis magok, raphe magok, nucleus colliculi superioris és inferioris). Leírták továbbá a hídban (nucleus sphenoidalis, nucleus corporis trapezoidei, cochlearis magok), a nyúltvelőben (nucleus tractus solitarii, nucleus és tractus spinalis nervi trigemini), a kisagy kéregben, és a gerincvelőben (dorsalis szarv) rágcsálók hímnemű és nőnemű egyedeiben egyaránt (Dobolyi és mtsai 2006a, Dobolyi és mtsai 2002, Faber és mtsai 2007, Wang és mtsai 2000). Néhány kisebb eltéréstől eltekintve, a PTH2 receptort expresszáló neuronok patkányokban megfigyelhető eloszlása megegyezik az egérben (Wang és mtsai 2000), az emberben és a makákó majmokban (Bago és mtsai 2009).

1.5.3. PTH2 receptor antagonisták

A TIP39 számos mutagenezissel előállított módosítását tesztelték farmakológiai kísérletekben. A receptort gátló potenciáljában és szelektivitásában leginkább hatékony PTH2 receptor antagonistát a TIP39 4., 5., 6. és 7. pozíciókban történő aminosavcserével állították elő (Kuo és Usdin 2007). A peptid antagonista

aminosavszekvenciája alapján a His⁴, Tyr⁵, Trp⁶ és His⁷ TIP39 (HYWH-TIP39) nevet kapta.

Az utóbbi években egy kismolekulájú nem-peptid természetű PTH2 receptor antagonistát is kifejlesztettek. Ez sejt kultúrában képes volt gátolni a PTH2 receptor szignalizációs útvonalát, de szelektivitásának hiánya és toxicitása nem teszi lehetővé *in vivo* felhasználását (Visegrady és mtsai 2007).

1.6. A TIP39 és a PTH2 receptor neuromodulátor rendszer

A TIP39-et és a PTH2 receptort expresszáló sejttestek elhelyezkedése gyökeresen különbözik. Míg a TIP39 neuronok csupán a PVG-ben, a PIL-ben és az MPL-ben találhatóak meg, addig a PTH2 receptor számos agyterületen expresszálódik. Általánosságban elmondható, hogy a TIP39-ir neuronok axonjai a sejttesttől távolra nyúlnak, míg a PTH2 receptor-ir rostok a PTH2 receptort expresszáló neuronok közelében lokalizálódnak. A TIP39-immunreaktív rostok és a PTH2 receptor-immunreaktív rostok elhelyezkedése azonban figyelemreméltóan megegyezik. Mindkettő jelen van például a lateralis septumban, a preoptikus területen, a hypothalamicus para- és periventricularis magokban és arcuatus magban, az amygdalában és a substantia grisea centralisban (Faber és mtsai 2007, Wang és mtsai 2000), sőt ezek elhelyezkedése szubregionális szinten is kiválóan egyezik, ami a ligandum specificitás farmakológiai bizonyítékai mellett szintén alátámasztja, hogy a TIP39 és a PTH2 receptor egy neuromodulátor rendszert alkot (Dobolyi és mtsai 2010).

A PTH2 receptor-tartalmú axonvégzódések vezikuláris glutamát transzportert (VGLUT-2) tartalmaznak, tehát glutamátergek a patkány hypothalamusában (Dobolyi és mtsai 2006a) és a makákó majmok septumában és hypothalamusában (Bago és mtsai 2009). A glutaminsav dekarboxiláz (GAD) enzimmel nem volt kimutatható koexpresszió a hypothalamusban (Dobolyi és mtsai 2006a). A TIP39 terminálisokban nem látható sem VGLUT-2, sem GAD immunreaktivitás. Dobolyi és munkatársai (Dobolyi és mtsai 2010) modellje szerint a hypothalamus neuroszekretoros neuronjainak PTH2 receptor-tartalmú serkentő szinapszisait preszinaptikusan, egy axo-axonikus interakcióban modulálja a TIP39.

A TIP39-PTH2 receptor rendszer humán és majom központi idegrendszerében talált anatómiai eloszlása nagyfokú hasonlóságot mutat a korábban rágsálókban végzett vizsgálatokéval (Bago és mtsai 2009), ezért a kísérleti állatokként használt patkányokon kivitelezett funkcionális vizsgálatok eredményeit nagy biztonsággal vonatkoztathatjuk emberre is.

1.7. Anyai adaptációk

Az emlősállatok nőtény egyedei hatalmas megterhelésnek vannak kitéve a reprodukció során, hiszen – fajtól függő mértékben – mindenképpen elsősorban rájuk hárul az utódok táplálása és gondozása. Egy laboratóriumi patkány 22 nap terhesség után átlagosan 12 utódot nevel, 28 napon keresztül szoptatva és gondozva a kezdetben vak és magatehetetlen kölyköket. A kölykökről való megfelelő gondoskodást szolgálják a terhesség időszakában és a szoptatás alatt a nőtényekben lezajló adaptációs folyamatok. A terhesség alatt bekövetkező adaptációs változásokat elsősorban a hormonok (placentális laktogének, korion gonadotropin, progeszteron, ösztrogén) határozzák meg, míg a postpartum időszakban a kölyök és az anya közötti interakció az adaptációs folyamatok fő hajtóereje. Ebben a tekintetben a fejlődő újszülött – különösen a szopási stimuluson keresztül – határozza meg, hogy milyen változások zajlanak le az anya agyában.

Az adaptációs folyamatok több csoportba sorolhatók (3. ábra). A bekövetkező fiziológias változások a fertilitás laktáció alatti szüneteltetését és a tejtermelés (lactogenesis/galaktopoezis) megindulását teszik lehetővé. Egy anya patkány naponta akár fél liter tejet is termelhet, ami jelentősen felemészti energiatartalékait, így azt csak megnövekedett folyadék- és táplálékfelvétellel tudja pótolni (metabolikus változások). Emellett az anyák viselkedése is megváltozik, gondozzák és szoptatják kölykeiket, valamint emocionális változásokat is mutatnak, bátran lépnek fel máskor szorongást okozó szituációkban, például betolakodó idegen hímekkel szemben megvédik kölykeiket.

A laktáció időszakában a szopás és az általa felszabaduló prolaktin gátolja a gonadotropin-releasing hormon (GnRH) termelő neuronok aktivitását (McNeilly 2001, Tsukamura és Maeda 2001). A hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg (HPA)

tengely stresszre adott válaszaik csökkentek a laktáció alatt (Lightman és mtsai 2001). Valószínűleg a szoptatás következtében centrálisan felszabaduló oxytocinnak szerepe van a HPA tengely aktivitásának csökkentésében (Neumann 2001). A postpartum periódusban a szorongás is kisebb mértékű lesz (Walker és mtsai 2001). Ennek hátterében is a szoptatás állhat, mert annak hatására szabadul fel az oxytocin az agyban (Lambert és mtsai 1993).

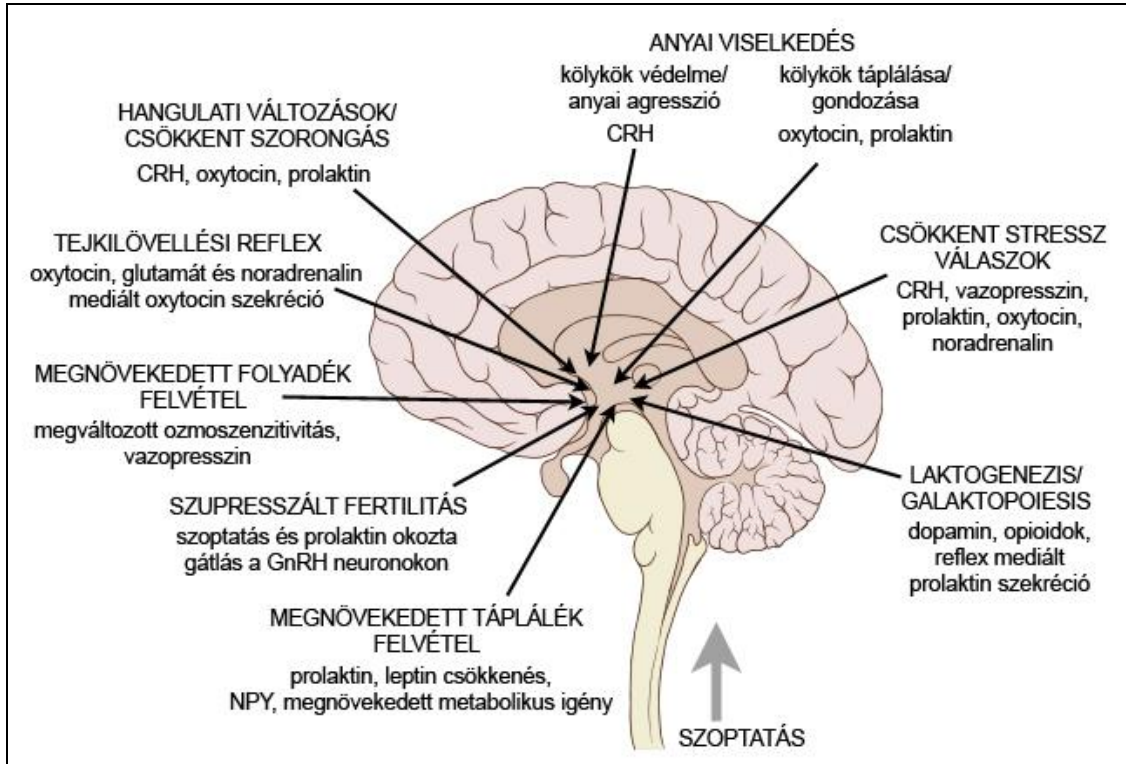
Strukturális és funkcionális adaptációs változások is bekövetkeznek a laktáció idején. Jól ismert példái ennek az oxytocin neuronok. Az oxytocin a hypothalamus nucleus supraopticusában és a nucleus paraventricularis magnocelluláris részében szintetizálódik és a magnocelluláris neuronok axonjaiban gyors axonális transzporttal jut el a neurohypophysisbe, ahol az idegvégződésekben tárolódik. Szoptatás alatt az oxytocin neuronok szinkronizált burst aktivitással tüzelnek, így az oxytocin nagy amplitúdójú pulzusokban ürül az axonvégződésekbe (Poulain és Wakerley 1982). A burst aktivitás alapja, hogy az oxytocin neuronok kapcsolatai és szinaptikus összeköttetései megváltoznak a terhesség alatt (Theodosis és Poulain 2001). A reflexesen aktivált oxytocin a véráram útján végül eljut az emlő oxytocin receptoraihoz és az alveolusokat körülvevő myoepithelsejtek kontrakcióját váltja ki, így a tej a tejvezetékbe tud ürülni (tejkiövellési reflex). Az oxytocin génhányos egerek – a tejürülés deficitje miatt – nem tudják táplálni kölykeiket, így azok elpusztulnak (Young és mtsai 1996). Az oxytocin „in passage” is felszabadulhat az axonok ún. Herring testjeiből, így a portális keringésen keresztül az adenohipophysisbe kerül és a laktotrop sejtek oxytocin receptoraira hatva stimulálja a prolactin szekréciót a szoptatás ideje alatt (Samson és mtsai 1986).

A postpartum időszak legszembetűnőbb endokrin eseménye a laktogenezis/galaktopoezis. Napjainkban nagy figyelem övezi a szoptatás fontosságát a gyermek egészségének érdekében. Számos vita folyik a szoptatás ideális időtartamáról és gyakoriságáról, amely biztosítja a megfelelő tejellátást a gyermek számára. Több, mint egymillió csecsemő halálát tulajdonítják a szoptatás hiányának (McVea és mtsai 2000), ezért egyre nagyobb erőfeszítéseket tesznek a szoptatás népszerűsítésére. Alapvető fontosságú e fiziológiás folyamat alapját képező neuronális hálózat feltérképezése, amelyről napjainkban is csak kevés adat áll rendelkezésre (Dubois-Dauphin és mtsai 1985a, 1985b). Ez későbbiekben segíthet például a primer tejtermelési

képtelenség kezelésében, illetve annak magyarázatában hogyan károsíthatják a laktációt olyan központi idegrendszeri betegségek, mint a tumorok, a fejsérülések, különböző fertőzések (tuberkolózis, hisztoplazmosis) és infiltrációs betegségek (szarkoidózis, hemokromatózis, autoimmun hypophysitis) (Pena és Rosenfeld 2001).

Az anyai viselkedés evolúciósan erősen konzervált motivációs elemekből áll, amely a reprodukciós siker egyik alapköve. Az állatfajoknál – az utód születés kori fejlettségi állapotától függő mértékben – az utódozokról való gondoskodás sikere a faj hosszú távú fennmaradását is biztosítja. Különösen fontos ez az embernél, ahol a csecsemő megszületésekor fejletlensége folytán rendkívüli módon szüleire van utalva. A laboratóriumi patkányok szintén nagyon éretlenül jönnek a világra, ezért életük kezdeti szakaszán teljes mértékben anyjuktól függenek. A még nem szült nőstény patkányokra taszítóan hatnak az újszülött kölykök (Caldji és mtsai 1998), viszont az ellés után rögtön mutatják a sztereotipikus kölyök-vezérelt viselkedési elemeket: összegyűjtik a fészekbe kölykeiket, nyalogatják, tisztogatják őket és különböző szoptatási pózokat vesznek fel, hogy a kölykök zavartalanul szopassanak (Numan 1994, Stern és Lonstein 2001). Az anyai viselkedés azonban nem mindig expresszáldódik optimálisan, néhány újdonsült rágesáló anya elhanyagolja vagy akár kannibalizálja is kölykeit.

Az utóbbi évtizedekben a postpartum depresszió felismerése és az anyai gondoskodás zavarai (gyermekbántalmazás, elhanyagolás) világszerte nagy figyelmet kaptak. Az anyák kb. 15%-a, évente több, mint 500 000 nő tapasztal szorongást, reménytelenséget, érdektelenséget és kimerültséget gyermeke születésének első 12 hónapjában (Pearlstein és mtsai 2009). Ez a csecsemő életének közvetlen veszélyeztetésén túl hosszútávú káros hatásai miatt is aggasztó (Beck 1998, Field 1998). A depressziós édesanyák gyermekeinél gyakoribb a kognitív vagy viselkedési zavar (Cogill és mtsai 1986, Hay és mtsai 2001). A neurotikus zavarokkal küzdő felnőttek gyakran számolnak be a szülői szeretet hiányáról, súlyosabb esetekben bántalmazásról. Extrém esetekben az időben fel nem ismert és így kezeletlenül maradt betegség gyermekgyilkossághoz vagy az anya önkéntelenül okozott halálához is vezethet (Field 1998, Lindahl és mtsai 2005). Fontos tehát, hogy ismereteinket bővítsük ezen a téren, megismerjük a normális és kóros állapot hátterében álló okokat.



3. ábra. Az anyai adaptációk a laktáció idején

Az ábra a laktációs időszakban zajló főbb fiziológiai adaptációkat és folyamatokat ismerteti, feltüntetve az ezekben szereplő neuronális stimulusokat, hormonokat és neurotranszmittereket (Russell és mtsai 2001 nyomán).

Mivel a TIP39 és a PTH2 receptor neuromodulátor rendszer laktogenezis és anyai motiváció szabályozásában betöltött szerepét vizsgáltuk, ezért a továbbiakban ezekről írok részletesebben.

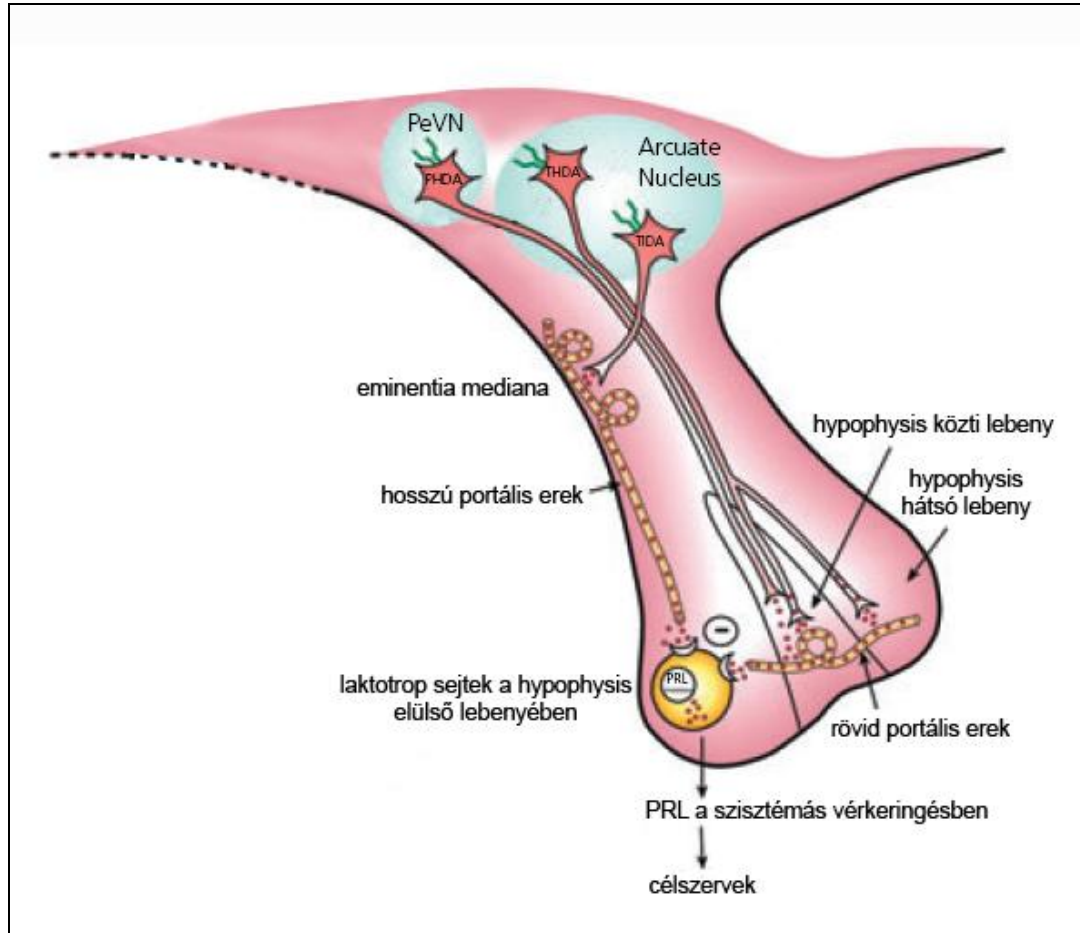
1.7.1. A laktogenezis/galaktopoezis szabályozása

A prolaktin (PRL) felszabadulás szabályozása

A prolaktin (PRL) egy olyan (emberben 199, patkányban 197 aminosav hosszúságú) polipeptid hormon, amit az agyalapi mirigy elülső lebenyének laktotróp sejtjei szintetizálnak és megfelelő stimulusokra (szopási inger, ösztrogénhatás, stressz) szekretálnak a vérkeringésbe. A patkány prolaktin molekulatömege 23 kDa, a humán

szérumban ezen kívül található még egy macroprolactin ($> 100\text{kDa}$) és egy 40-60 kDa-os izoforma is (Fahie-Wilson és mtsai 2005).

A PRL felszabadulást számos inger (szexuális aktivitás, ösztrogénhatás, stressz) előidézheti. Leghatásosabb fiziológias stimulusa anyákban a kölykök által kifejtett szopási inger, amelynek hatására az anyaállat szérum PRL szintje már néhány perc múlva az alapérték többszörösére emelkedik (Freeman és mtsai 2000). Az agyalapi mirigy működését befolyásoló dopaminerg neuronok a hypothalamicus nucleus periventricularis (A14 katekolaminerg sejtsoport) és a nucleus arcuatus (A12 katekolaminerg sejtsoport) területén helyezkednek el. Nagyban különböznek az agy más területein található dopaminerg neuronoktól, mivel hiányzik róluk a D2 típusú autoreceptor és PRL-R-t tartalmaznak, amin keresztül a prolaktin kifejtheti pozitív visszacsatoló (feedback) hatását (Goudreau és mtsai 1995, Goudreau és mtsai 1992, Kawano és Daikoku 1987). A tuberoinfundibuláris dopaminerg (TIDA) rendszert alkotó neuronok a nucleus arcuatus középső és hátsó részében helyezkednek el, és az eminentia mediana külső zónájába projiciálnak. Innen a dopamin, bekerülve a hosszú portális erekbe, eléri az agyalapi mirigy laktotrop sejtjeit és az ezeken található D2 receptorokhoz kötődve gátolja a prolaktin elválasztást (Ben-Jonathan 1985). A tuberohypophysealis dopaminerg rendszer (THDA) neuronjai a nucleus arcuatus rostralis részében találhatóak, és mind a közti, mind a hátsó lebenybe vetülnek (Bjorklund és mtsai 1973, Holzbauer és Racke 1985), patkányokban ezek is részt vesznek a PRL elválasztás szabályozásában (DeMaria és mtsai 1999, DeMaria és mtsai 1998). A periventriculo-hypophysealis dopaminerg (PHDA) neuronok a hypothalamus elülső periventricularis részében helyezkednek el és az agyalapi mirigy közti lebenyében végződnek. Ezek a neuronok a közti lebenyben termelődő α -melanocitastimuláló hormon (α -MSH) elválasztásának szabályozásában vesznek részt (Goudreau és mtsai 1995, Goudreau és mtsai 1992) (4. ábra).



4. ábra. A prolaktin elválasztás szabályozása

A legtöbb esetben a prolaktin felszabadulás hypothalamicus gátlás alatt áll. A gátlásért felelős fő hypothalamicus hormon a dopamin, amit az arcuatus magban lévő tuberoinfundibuláris dopaminerg (TIDA) neuronok szabadítanak fel. A dopamin a hosszú portális ereken keresztül jut az agyalapi mirigy elülső lebenyébe. A szintén az arcuatus magban található tuberohypophysealis dopaminerg rendszer (THDA) is részt vesz a prolaktin szekréció szabályozásában. Ezekből a neuronokból a dopamin a hypophysis közti és hátsó lebenyébe kerül és a rövid portális ereken keresztül éri el a hypophysis elülső lebenyét (Andrews 2005 nyomán).

A PRL elválasztást reguláló faktorok

Gátló faktorok (PIF-ek)

A dopamin mellett további gátló faktorok is szerepelnek a prolaktin elválasztás szabályozásában. Egy járulékos PIF jelölt a gamma-amino-vajsav (GABA), amely az adenohypophysisben $GABA_A$ receptoron keresztül hatva gátolja a laktotropok PRL elválasztását (Grandison és Guidotti 1979, Racagni és mtsai 1979). További PIF-ek

lehetnek még a szomatosztatin (Drouin és mtsai 1976), a calcitonin (Freeman és mtsai 2000) és a neuropeptid Y (Wang és mtsai 1996).

A laktotropok fogékonyságát befolyásoló faktorok képesek megváltoztatni a laktotrop sejtek válaszkészségét a hypothalamicus serkentő és gátló faktorok iránt. Ezek közé tartozik például az aszkorbinsav [a dopamin hatását fokozza (Shin és Stirling 1988)], a glukokortikoidok, a szexuáliszteroidok, a trijód-tironin [a laktotropok érzékenységét befolyásolják egyes serkentő faktorok iránt (Fekete és mtsai 1984, Steele és mtsai 1982)] és a közti lebenyből a rövid portális ereken keresztül a laktotropokhoz eljutó α -MSH [csökkenti a laktotrop sejtek válaszképességét a dopamin gátló hatása iránt (Hill és mtsai 1991), illetve növeli a választ bizonyos serkentő faktorokra (Nagy és Frawley 1990)].

Serkentő faktorok (PRF-ek)

A thyrotropin-releasing hormon (TRH) képes a PRL elválasztás dóziszfüggő serkentésére (Tashjian és mtsai 1971). A szopás hatására megnő a TRH előalakok (preproTRH, proTRH) transzlációs szintje a nucleus paraventricularisban és az eminentia medianában. A TRH-hoz hasonlóan ezek is dóziszfüggően serkentik a PRL szekréciót (Nillni és mtsai 2001).

PRF aktivitással rendelkezik a vasoaktiv intestinalis peptid (VIP) is (Mezey és Kiss 1985), amely direkt módon a laktotrop sejteken található VIP receptorokon keresztül hat. De a VIP esetén stimuláló autokrin hatásmechanizmus is bizonyított, mivel a laktotrop sejtek maguk is termelnek VIP-et (Nagy és mtsai 1988).

Ezzel ellentétben a hypophysealis adenilát ciklázt aktiváló polipeptid 38 aminosavból álló formája (PACAP-38) nem közvetlenül a laktotrop sejteken hatva fejti ki a PRL elválasztást serkentő hatását (Arbogast és Voogt 1994, Nagy és mtsai 1993), hanem, mivel egyidejűleg a növekedési hormon szintet is befolyásolja, feltételezhetően közvetetten az elülső lebeny PACAP receptorokat expresszáló szekretáló sejtjein keresztül, parakrin módon.

Az endogén opioidok (dynorphin, enkephalin) közvetlenül a μ és κ opiát receptorokat is expresszáló TIDA neuronokon hatnak, gátolják azok aktivitását, így serkentik a PRL elválasztást (Van Loon és mtsai 1980).

A tuberomammilláris magból származó hisztamin szintén közvetlenül gátolja a H2 receptorokat expresszáló dopaminerg neuronokat, ezzel stressz hatására megnő a PRL elválasztás (Knigge és mtsai 1988), míg a raphe magokból származó szerotonin a hypothalamicus paraventricularis magban lévő PRF neuronokra hatva indirekt módon befolyásolja a PRL szekréciót (Bagdy 1996, Rittenhouse és mtsai 1993).

A szopási inger közvetítésében részt vevő agyi struktúrák

A szopási stimulust közvetítő felszálló pálya elemei az emlőmirigy mechanoreceptorai és a medialis hypothalamus között egyelőre még nem teljesen felderítettek.

Az idegpálya feltérképezésére neuronális aktivitást jelző markert, c-fos-t használva a felszálló pálya állomásaként merült fel a ventrolateralis medulla (VLM), locus coeruleus, a nucleus parabrachial lateralis, a nucleus paralemniscalis és a substantia grisea centralis caudalis része (Li és mtsai 1999b). Ugyanez a kutatócsoport fluorogold (FG) retrográd neuronális nyomjelző anyag arcuatus magba való injektálásakor megfigyelte, hogy az FG megjelent azokban a sejtekben, amelyekben a szopás aktiválta c-fos is jelen van a peripeduncularis magban (PPN) és a VLM-ban (Li és mtsai 1999a).

Elektromos stimulációs és léziós kísérletek alapján megállapították, hogy az emlő mechanoreceptoraiból a stimulus a gerincvelőbe fut és a nucleus spinalis cervicalis-ban átkapcsolódik (Dubois-Dauphin és mtsai 1985a, 1985b). Innen kilépve a mesencephalikus tegmentumba jut (Dubois-Dauphin és mtsai 1985a, 1985b, Hansen és Kohler 1984, Tasker és mtsai 1986, Tindal és Knaggs 1969, 1971) és továbbítódik a hypothalamus felé. A corpus geniculatum mediale, a posterior intralaminaris thalamicus mag és a pedunculus cerebri között elhelyezkedő nucleus peripeduncularis fontos mediátora a szopási szignálok továbbításának, mivel léziójával (Factor és mtsai 1993, Hansen és Kohler 1984) a laktáció károsodik. Stimulációs paradigmát használó kísérletekben (Tindal és Knaggs 1969, 1975) a középagy tegmentumának leglateralisabb részének, a Paxinos atlasz (Paxinos és Watson 2005) által definiált PPN stimulációjával effektíven szabadítottak fel PRL-t.

Neuronális tracer technikát használva direkt neuronális kapcsolatot mutattak ki a thalamus és a középgagy határán elhelyezkedő SPFP neuronjai és a ventrolateralis Arc dinorfin tartalmú neuronjai között nem-laktáló nőstényekben (Szabo és mtsai 2010). Emellett azt is megmutatták, hogy a dinorfin neuronok beidegzik a TIDA neuronokat (Szabo és mtsai 2010).

PRL elválasztás anyákban

A legtöbb rágcsálóban a PRL luteotrop hormonnaként hat, aminek következtében a párzás után 6-10 napig fenntartja a sárgatest szerkezeti és funkcionális integritását (Morishige és Rothchild 1974), később a terhesség során a PRL szerepét a humán placentáris laktogén (HPL) veszi át (Lawrence és Lawrence 2011), ami a PRL receptorokhoz kötődve negatív visszacsatolással csökkenti a PRL szintet. A magas keringő PRL/HPL koncentráció ellenére a várandósság alatt nem indul be a bőséges tejtermelés. Ennek oka a szteroid hormonok magas szintje. A magas ösztrogénszint gátolja a PRL bejutását a tejtermelő sejtekbe. A magas progeszteron-szint pedig gátolja a PRL serkentő hatását a kazein mRNS átírásra. Szüléskor a gátló hormonok koncentrációja leesik és a PRL – felszabadulva a gátlás alól – magas koncentrációban ki tudja fejteni tejtermelést serkentő hatását az alveoláris sejteken.

A szülést követően a prolaktinkoncentráció továbbra is magas marad és minden egyes szoptatási aktusnál még kb. 5-10-szeresére fokozódik. A prolaktinszekréció fokozódását az emlőbimbó mechanoreceptorainak ingerlése váltja ki, az ingerület a gerincvelőbe, majd onnan az agytörzsön keresztül a hypothalamusba jut (Findlay 1966). Ha a laktáló anyákat elválasztjuk kölykeiktől, a PRL szekréció azonnali és csaknem teljes mértékű gátlását figyelhetjük meg. A plazma PRL szint az egész elválasztási (szeparációs) periódus alatt igen alacsony szinten marad (Nagy és Halasz 1983). Amikor az elválasztás végén a kölyköket visszatesszük az anyákhoz, azonnali PRL elválasztás indul meg, melynek hatására az anyaállatban a vér PRL szintje már néhány perc múlva emelkedni kezd, majd 10 percen belül elérve egy maximális értéket, az intenzív szopási inger ideje alatt emelkedett szinten marad. A szoptatás befejezése után szintje újra a laktáció időszakára jellemző alap értékre csökken (Neill és Nagy 1994).

A prolaktin receptora (PRL-R)

A PRL-R a citokin receptor családba tartozik (Cosman és mtsai 1990). Három izoformája (rövid: 291aa, intermedier: 393aa és hosszú: 591 aminosav hosszú) ismert patkányban (Kelly és mtsai 1993). Az izoformák hosszúsága és jellegzetességei közel azonosak emberben és rágcsálókban (Ben-Jonathan és mtsai 2008), viszont a humán szérumban, illetve tejben megfigyelték szolubilis izoformák jelenlétét is (Kline és Clevenger 2001).

Az izoformák különböző mértékben expresszálódnak a szövetekben az ösztroz ciklus egyes fázisaiban, terhesség és laktáció alatt (Bole-Feysot és mtsai 1998). Az emlőben a hosszú PRL-R expressziós szintje emelkedik terhesség során, szüléskor kiemelkedően magas és elválasztás után lecsökken (Jahn és mtsai 1991). A hypothalamusban és az agyalapi mirigyben túlnyomóan szintén a hosszú izoforma van jelen és ennek mennyisége a diösztroz fázisban nagyobb, mint a ciklus proösztroz fázisában. A petefészekben és a méhben viszont a proösztroz során magasabb a hosszú izoforma expressziója.

A PRL szerepe a laktációban

A PRL fontos szerepet játszik az emlőmirigy növekedésében és fejlődésében, valamint a tejtermelés megindításában és fenntartásában. A várandósság alatt a tejmirigyekben egy olyan alveoláris hám alakul ki, amely képes a tejspecifikus összetevők szintézisére (szekretoros differenciálódás). A PRL elősegíti a kazein mRNS átírását és serkenti az α -laktalbumin szintézisét, ami a laktóz-szintetáz enzim esszenciális kofaktora. A PRL fokozza a lipoprotein lipáz aktivitását is. A PRL ezen kívül szabályozza a GLUT1, a fő glukóz transzporter fehérje génexpresszióját is (Anderson és mtsai 2007). PRL, illetve PRL receptor génhiányos egerekben az emlőmirigy fejlődése abnormális, az állatok tejtermelésre nem képesek (Ormandy és mtsai 1997).

A fenti funkciók mellett a PRL a szülés után meggyorsítja az anyai viselkedésformák megjelenését (Grattan 2002). Egy speciális PRL receptor antagonistá injektálása a medialis preopticus területre meggátolja az anyai viselkedés kialakulását

(Bridges és mtsai 2001). Emellett a PRL a reprodukzív funkciók gátlásában is jelentős szerepet játszik (Freeman és mtsai 2000). A pulzatilis gonadotropin szekréció gátlását okozza a medialis preopticus területen lévő GnRH neuronokra hatva (Cohen-Becker és mtsai 1986a, b, Freeman és mtsai 2000), illetve ebben a folyamatban az arcuatus magban történő szopás-indukálta kisspeptin génexpresszió gátlás is szerepet játszik (Yamada és mtsai 2007). A PRL továbbá hatékony anxiolitikus ágens (Torner és Neumann 2002), valamint táplálkozást serkentő hatású (Sauve és Woodside 1996, 2000). Ezek a prolaktin-mediált effektusok konzisztensek azokkal a neuroendokrinológiai adaptációkkal, amelyek a terhesség és a laktáció alatt történnek az agyban (Russell és mtsai 2001), ezért a prolaktin kulcsszereplőnek tekinthető a terhesség alatti és szülés utáni időszakban történő neuroendokrinológiai és viselkedési adaptációk organizációjában, integrációjában és koordinációjában (Grattan 2002).

A laktációban kifejtett szerepén túl a PRL részt vesz számos egyéb reprodukciós folyamatban, például befolyásolja a szaporodási magatartásformákat (Dutt és mtsai 1994), illetve a szervezet belső egyensúlyának, homeosztázisának fenntartásában is nagy szerepet kap. Napjainkban több, mint 300 féle biológiai hatását írták le, részt vesz például a csontnövekedés, az immunrendszer, a só-vízháztartás és az angiogenezis szabályozásában is (Freeman és mtsai 2000).

1.7.2. Az anyai motiváció

Jay Rosenblatt motivációs modellje szerint az anyai magatartás akkor tud megnyilvánulni, amikor a kölykök felől érkező ingerekre való válaszképességi hajlandóság nagyobb lesz, mint a kölyköktől való elzárkózásra, illetve a kölykök elkerülésére való törekvés (Rosenblatt és Mayer 1995). Ez olyan belső folyamatok lezajlását feltételezi a peripartum időszakban, amelyek elősegítik a nőstény vonzódását a kölykök iránt, illetve felkeltik a nőstény érdeklődését a kölykök felől érkező ingerek iránt, miközben ezzel egyidőben elnyomják az antagonisztikusan ható rendszereket, amelyek aktiválnák az elkerülő és visszahúzó válaszokat. Az utóbbi folyamat háttérében a hormonok és a kölykök felől jövő ingerek által aktivált anyai motivációs rendszer interakciója áll egyéb motivációs rendszerekkel, amely egyrészt magába foglalja a konkuráló motivációs rendszerek (például táplálékkeresést proponáló

rendszer) elnyomását, másrészt a nonspecifikus vagy általános motivációs rendszer aktiválását, amely aktív állapotában növeli az egyed fogékonyságát a biológiailag releváns külső stimulusok iránt, mint például a figyelmi vagy ébresztő rendszerek (Numan 2006).

A még nem szült nőtények kitérnek a kölykök elől (Fleming és Luebke 1981), viszont az újszülöttekkel történő néhány napos állandó együttlét után a szűz patkányok, sőt a hímek is az anyai viselkedés összes jellemzőjét mutathatják (Fleming 1986, Rosenblatt 1967) – melegen tartják, tisztogatják, cipelik az újszülöttestet. Ezt a folyamatot nevezik anyai szenzitizációnak. A motivációs modell alapján úgy értelmezhetjük a szenzitizáció folyamatát, hogy az új, kölykök felől érkező ingerek félelmet keltenek a szűz nőtényekben, de folyamatos jelenlétüket a nőtények néhány nap alatt megszokják, így közvetlen kapcsolatba kerülhetnek velük. Ekkor már további (elsősorban tapintási) ingerek is elősegítik a gondoskodó viselkedés megjelenését.

Az először szülő nőtényeknek nincs szükségük kohabitációs időszakra, rögtön gondoskodnak kicsinyeikről, mivel a terhesség alatti és a terhesség végén lezajló endokrin események felkészítik a központi idegrendszert a megfelelő válaszcselelésre (Numan és Insel 2003).

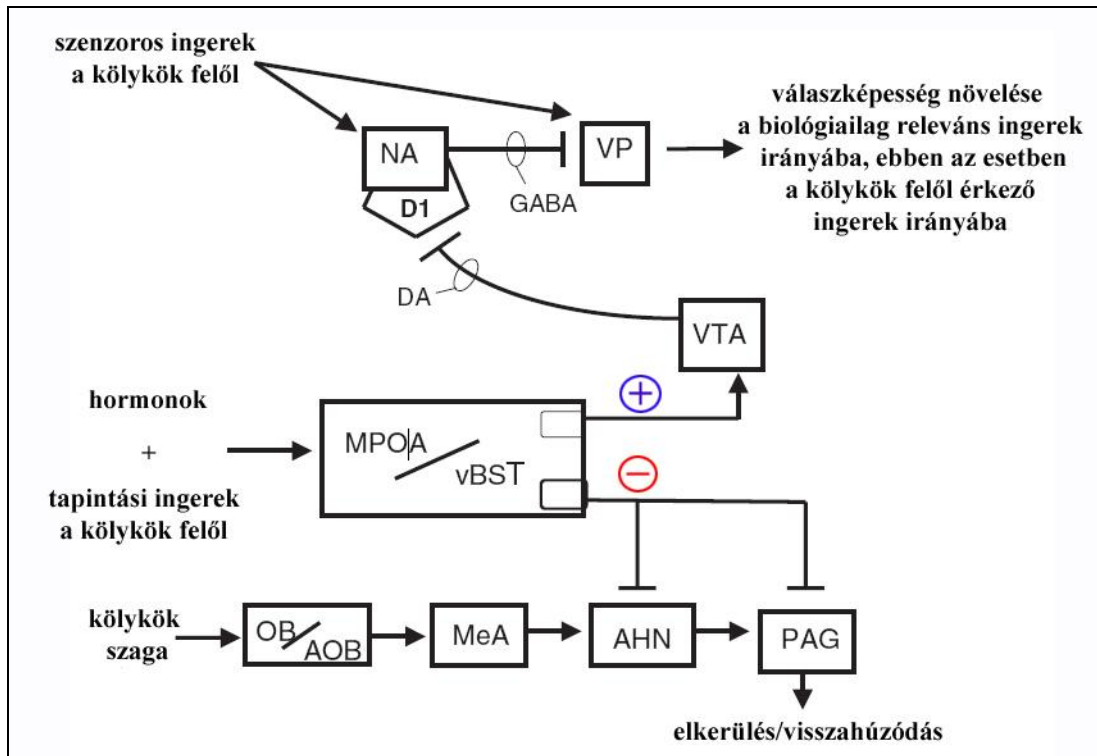
Az anyai motiváció szabályozásában részt vevő agyi központok

Numan és munkatársai kutatásai alapján körvonalazódott ennek a motivációs modellnek az alapjait képező neuronális hálózat (Numan 2006) (5. ábra). Az olfaktoros rendszernek kritikus szerepe van az anyai viselkedés megjelenésében. Az újszülött szaga gátolja a szűz patkány anyai érdeklődését, de ugyanez facilitáló hatású a laktáló állatoknál (Fleming 1986, Fleming és mtsai 1989, Fleming és Corter 1988). Eszerint a még nem szült nőtényekben a medialis amygdala (MeA), amely szaglási információt kap a bulbus olfactorius-ból (OB) és a járulékos bulbus olfactorius-ból (AOB), a központi averziós rendszert aktiválja (AHN, PAG), ezért az újszülött illata a szűz nőtények defenzív (menekülés, elkerülés) magatartását váltja ki. Anosmia vagy a MeA léziója facilitálja az anyai viselkedés megjelenését még nem szült nőtényekben (Fleming és Rosenblatt 1974, Numan és mtsai 1993).

A hypothalamus medialis preopticus területe (MPO|A) és a szomszédos nucleus interstitialis striae terminalis ventrális része (vBNST) alapvető fontosságú az anyai motiváció szabályozásában (Numan 2006). Az MPO|A/vBNST roncsolása elektromos vagy excitotoxikus lézióval jelentősen gátolja az anyai magatartás kifejeződését (Jacobson és mtsai 1980, Numan 1974, Numan és mtsai 1988, Numan és mtsai 1977). A MPO|A léziója nemcsak a gondozó és fészeképítő magatartást szünteti meg, de az MPO|A-lézionált állatok az operáns billentyűnyomó tesztben (operant bar press test) szignifikánsan kevesebbszer nyomják le azt a billentyűt, amely a kölykökhöz való hozzáférésüket engedné meg, mert nem találják elég jutalmazónak a kölyköket (Lee és mtsai 2000). Ösztradiol és prolaktin direkt injektálása az MPO|A/vBNST-be elősegítette a viselkedés megjelenését még nem szült nőstényeknél (Bridges és mtsai 1990, Numan és mtsai 1977), tehát az MPO|A egy olyan agyterület, ahol (az ott jelenlévő receptoraikon keresztül) az ösztradiol és prolaktin hatni képes az anyai magatartás megjelenésére (Numan és Insel 2003).

C-fos és FosB immunhisztokémiával kimutatták, hogy az MPO|A/vBNST neuronjai aktívak anyákban (Fleming és mtsai 1994b, Lin és mtsai 1998, Sheehan és mtsai 2000), és az anyákban aktív Fos-ir neuronok ösztrogén receptort tartalmaznak (Lonstein és De Vries 2000).

Anyákban a peripartum időszak hormonális eseményei és a kölykök felől érkező tapintási ingerek tehát aktiválják az MPO|A-t, amely legátolja az averziós rendszert (AHN, PAG) és aktiválja a célvezérelt magatartások kivitelezésének háttérében álló motivációs kört, így az anyák „figyelmét” a kölykök irányába tereli, az anyák motiváltak lesznek a kölykökről való gondoskodásban (Numan 2006).



5. ábra. Az anyai magatartás regulációjának hipotetikus neuronális modellje

A hormonális hatások alatt álló MPOA/vBST-nek két fő hatása van. Az első a kölyköktől való visszahúzódot preferáló válasz. A második hatás a mezolimbikus DA rendszer aktiválása. Ha az MPOA nem aktív, mint a nem szült nőstényeknél, ez a két erő szemben áll egymással, ami végülis alacsony VP aktivitást eredményez. Az MPOA/vBST aktivációja anyákban, megengedi a VP számára, hogy reagáljon a kölykök felől érkező stimulusokra, ami az akarlatlagos anyai válaszok kifejeződését okozza (Numan 2006 nyomán).

Az MPOA/vBNST mellett, hogy elsősorban gátló neuronális kapcsolatot tart fenn az AHN-nel és a PAG-gal, kapcsolatban áll az area tegmentalis ventralissal (VTA) is, mely kapcsolat jellegét tekintve elsősorban serkentő. A VTA dopaminerg neuronjai a nucleus accumbensbe (NA) vetítenek, amely viszont a ventral pallidumba (VP) küld gátló rostokat. Amikor a VTA aktív, dopamin szabadul fel a NA-ban, amely gátolja a NA VP-be vetítő neuronjait, így a VP felszabadul a gátlás alól és így a biológiailag releváns ingerek felé megnő a válaszkészség (Numan 2006).

Az MPOA/vBNST-VTA kapcsolat roncsolásakor az anya csökkent hajlandóságot mutat arra, hogy szájában hordozza kölykeit (retrieving), ami az anya motiválatlanságának egyik fő jelzője (Numan és Smith 1984). Hasonló hatása van a neurotoxin 6-hidroxi-dopaminnak is, amely elpusztítja a dopaminerg neuronokat a

VTA-ban. Kimutatták, hogy az anya patkány a csökkent motiváció és nem a motoros deficit miatt nem gyűjti össze a kölyköket a fészekben (Numan és Insel 2003).

Az anyai motiváció mérésére szolgáló viselkedési teszt

A kondicionált helypreferencia teszt (conditioned place preference test, CPP) általánosan használt teszt valamilyen megerősítő stimulus (élelem, élvezeti értékkel bíró italok, kábítószer) preferenciára vagy motivációra gyakorolt hatásának kimutatására. A CPP módszer a megerősítő stimulus hiányában is működik, ha az állatokat előzőleg kondicionálták egyedi környezeti elemekre a megerősítő stimulus jelenlétében (Fleming és mtsai 1994a).

Az anyáknál használatos teszt azon alapul, hogy az anyaállatok a kölyök által kiváltott pozitív élményt a kölyöktől való elválasztás után is igénylik és keresik. Ez az ún. kölyökkereső magatartás abban nyilvánul meg, hogy az anyaállatok a tesztapparátus azon részén töltenek több időt, amely a kölyökre emlékeztető tárgyakat tartalmazza (Fleming és mtsai 1994a, Magnusson és Fleming 1995), míg a szűz nőtények nem mutatnak ilyen preferenciát (Fleming és mtsai 1994a).

Tipikusan a CPP tesztekben egy megerősítő stimulus iránti preferenciát vizsgálnak, viszont előfordulnak olyan tanulmányok, amelyekben kettő vagy több megerősítő inger hatását tesztelik egyszerre. Mattson és munkatársai olyan kondicionált helypreferencia tesztet alkalmaztak, amelyben az anyáknak egy kölyök-asszociált és egy kokain-asszociált ketrec között lehetett választania. Ebben a kísérleti felállásban, az anyák többsége a korai postpartum időszakban a kölyök-asszociált kompartmentet választotta a kokain-asszociálttal szemben, míg a késői postpartum időszakban éppen fordítva (Mattson és mtsai 2001).

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek topográfiai elhelyezkedésének, valamint neuronális kapcsolatrendszerének leírása anya patkányokban az alábbi szempontok szerint:

1. Milyen neuronális markereket expresszáló neuronok vannak a PIL-ben és ezeknek milyen topográfiai kapcsolata van a TIP39 sejtekkel?
2. Milyen a PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek neuronális kapcsolatrendszere?
 - 2.1. A PIL elektromos léziójának hatására eltűnnek-e a TIP39 rostok a hypothalamus magjaiból?
 - 2.2. Hol és hogyan futnak le a TIP39 rostok?
 - 2.3. Milyenek a PIL efferens neuronális kapcsolatai?
 - 2.4. Milyenek a PIL afferens neuronális kapcsolatai?

2. A TIP39 indukcióját és a TIP39 neuronok aktiválódását vizsgáltuk anya patkányokban. Kérdéseink a következők voltak:

1. Változik-e a TIP39 mRNS mennyisége vemhesség és laktáció alatt?
2. Változik-e a TIP39 immunreaktivitás laktáció alatt?
3. A TIP39 sejtek milyen hatásra aktiválódnak?

3. Az endogén TIP39 antagonizálás hatását az alábbi két kísérleti modellben kívántuk vizsgálni a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra:

1. Van-e hatása a PTH2 receptor antagonistá (HYWH-TIP39) agykamrába való injektálásának a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra?
2. Van-e hatása a HYWH-TIP39-GFP lentivírus vektor mediobasalis hypothalamicus injektálásának a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra?

4. Az endogén TIP39 antagonizálás hatását vizsgáltuk az anyai motivációra. Az alábbi kérdésre kerestük a választ:

1. Van-e hatása a HYWH-TIP39-GFP lentivírus vektor medialis preopticus területre való injektálásának az anyai motivációra?

3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez elsősül, Wistar-Kyoto törzsből származó vemhes és laktáló patkányokat, illetve még nem szült nőstény állatokat használtunk, melyeket automatikusan szabályozott hőmérsékleti (21-23°C) és fényviszonyok (12 h fény, 12 óra sötétség ciklus; a világítás reggel 6 órakor kapcsolt be) között tartottunk. A táplálékhoz és a vízhez az állatok szabadon hozzáférhettek. Az anyákat egyedi ketrecekben tartottuk a kölykeikkel, a kölykök számát a szülést követő második napon nyolcra csökkentettük. Az állatkísérletek tervezése és kivitelezése a European Communities Council 2010. szeptember 22-i direktívája (2010/63/EU), a Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérleti Bizottságának Állatvédelmi Szabályzata és az ÁNTSZ 3453/003/2009. számú engedélye szerint történt. A műtéti beavatkozások során, illetve a transcárdialis perfúzió előtt az állatok kellő mélységű narkózisát intramuscularisan adott 0,2 ml/300 g testtömeg ketamin (100 mg/ml) és 0,3 ml/300 g testtömeg xylazin (20 mg/ml) elegyével biztosítottuk.

3.2. Hisztológiai módszerek

1. Perfúzió

A szív bal kamráján át kanült vezettünk az aortába, majd a jobb pitvar megnyitása után állatonként 150 ml fiziológiás sóval kimostuk a vért az érrendszerből. Ezután fixálószerként 300 ml jéghideg 4%-os paraformaldehid-oldatot (pH 7,4) használtunk.

2. Fixálás és metszés

A perfúzió után a kivett agyakat 24 órán át a perfúziós oldatban 4°C-on utófixáltuk, majd 0,1% Na-azidot tartalmazó foszfát pufferbe (PB) tettük át. Metszés előtt 20%-os, 0,1 M-os foszfát pufferben oldott cukoroldatba helyeztük egy éjszakára. Az agyakból fagyasztó mikrotóm (Leica SM 2000 R, Nussloch, Germany) segítségével

4 sorozat, 50 µm vastag coronális, horizontális, illetve sagittális metszetet készítettünk a kísérletnek megfelelően. Felhasználásig a metszeteket 0,05% Na-azidot tartalmazó foszfát pufferben 4°C-on tároltuk.

3. Luxol Fast Blue festés

A Luxol Fast Blue (LFB) festés az idegi elemek vizsgálatára alkalmas festési módszer. Az idegsejtek axonját borító myelin hüvelyek foszfolipid tartalmuk alapján megkötik a festéket, amelynek eredményeképpen a myelin elemek zöldeskék színűre, az idegsejtek liláskék színűre festődnek.

A LFB festéshez a 4%-os foszfát puffert tartalmazó paraformaldehid (pH7,4) elegyben rögzített agyszövet mintákat felszálló alkoholsorral víztelenítettük, majd paraffinba ágyaztuk. A paraffinba ágyazott blokkból 15-20 µm vastagságú metszeteket készítettünk és Klüver-Barrera szerint festettük meg, vagyis a deparaffinálást követően, a metszeteket LFB festék 0,1%-os oldatával festettük, ezután lítium-karbonát 0,05%-os oldatába merítettük, majd 70%-os alkoholban differenciáltuk és xilollal derítettük.

4. Immunhisztokémia

TIP39 immunhisztokémia

Az úszó metszeteket először szobahőmérsékleten 15 percig 0,3%-os 0,1 M-os foszfát pufferben oldott hidrogén-peroxidban inkubáltuk, meggátolva ezzel az endogén-peroxidázok működését. Ezt a lépést követte a 3%-os tritonos szarvasmarha szérum albumin (BSA) kezelés, hogy lecsökkentsük az antitestek aspecifikus kötődését. A normál szérum eltávolítása után 48 órás inkubálás következett nyúl anti-patkány TIP39 antiszérumban. Az anti-TIP39 szérumot 1:3000-es hígításban alkalmaztuk. PB-s mosás után a metszeteket 1 órára 1:1000-es hígítású biotinilált kecske anti-nyúl IgG-be (Vector Laboratories, Burlingame, CA) tettük, majd PB-vel mostuk. Ezután szintén 1 órára avidin-biotin peroxidáz komplexbe (1:500 hígítás, Vectastain, ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) tettük a metszeteket, majd 0,05 M-os TRIS pufferben (pH 7,8) mostuk őket. Végül a peroxidáz reakció kimutatásához a metszeteket szobahőmérsékleten 4 percre hívóoldatba helyeztük, amely 0,3 mg/ml 3,3'-diaminobenzidint, 1 mg/ml nikkell-ammónium-szulfátot és 15 µl 30%-os H₂O₂-t

tartalmazott 0,05 M-os TRIS-ben oldva. Végül a megfestett metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk és DPX médiummal (Sigma, St. Louis, MO) lefedtük.

A metszetek egy részén fluorescein-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.

Fos immunhisztokémia

A patkányanyákat (n=6) a 8-9. postpartum napon 13 órakor különválasztottuk kölykeiktől. A következő nap 9 órakor 3 anyaállat visszakapta kölykeit, de 3 anya továbbra is szeparáltan maradt. Azoknál az anyáknál, amelyek visszakapták kölykeiket a szoptatás 10 percen belül elkezdődött. Minden állatot 22 órával az elválasztás után – a 3 anya esetén 2 óra szoptatást követően – perfundáltunk, majd az agyakat fagyasztó mikrotómmal lemetszettük.

A szabadon úszó metszeteket hidrogén-peroxidos oldattal kezeltük 15 percen keresztül, majd 1:30000 arányban hígított poliklonális nyúl anti-patkány c-fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) antitesttel 24 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Másodlagos antitestként biotinnal konjugált anti-nyúl IgG (Sigma Laboratories) 1:1000 hígítását alkalmaztuk, majd 1:500-as hígítású avidin-biotin-komplex-szel (Vectastain, ABC Kit, Vector Laboratories) kezeltük. A DAB-os előhívást nikkel-szulfátot és hidrogén-peroxidot tartalmazó oldattal végeztük el. A metszeteket zselatinnal bevont tárgylemezre húztuk, dehidráltuk és DPX médiummal fedtük.

TIP39 és Fos kettős fluoreszcens immunhisztokémia

Első lépésként, az előbbieken leírt módon TIP39 immunfestést végeztünk. Ezt követően a metszeteket nyúl anti-Fos antitesttel (1:10000 hígítás, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) inkubáltuk. A primer antitesttel való inkubálást követően a metszeteket számból származó Alexa Fluor 594 anti-nyúl másodlagos

antitesttel kezeltük (1:500 hígítás, Molecular Probes) 2 óráig. A metszeteket tárgylemezre vittük, megszáritottuk, majd a fluoreszcencia halványodását gátló médiummal (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes) fedtük le és sötét helyen tároltuk.

BDA immunhisztokémia

A szabadon úszó metszetek közül minden negyediket előkezeltük 0,5% Triton X-100-at tartalmazó foszfát pufferrel 1 óráig, ezután 1:300-as hígítású avidin-biotin-peroxidáz komplex-ben (Vectastain, ABC Kit, Vector Laboratories) inkubáltuk 2 órán keresztül. A metszeteket 0,003% hidrogén-peroxidot tartalmazó biotin-tiramid oldatba (1:1000 hígítás) helyeztük 20 percre. Ezután újabb 1 órás ABC-ben (1:1000 hígítás) történő inkubáció következett. Végül a metszeteket 1:3000-szeres hígítású FITC-tiramidot és 0,003% hidrogén-peroxidot tartalmazó TRIS pufferbe (0,05 M, pH 8,0) helyeztük 6 percre és fluoreszcencia halványodását gátló médiummal (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes) fedtük le.

TIP39 és BDA kettős fluoreszcens immunhisztokémia

Dupla immunfestés esetén a BDA vizualizációját a fent leírt FITC-tiramidos amplifikációval végeztük. Ezután a metszeteket Alexa Fluor 594 anti-nyúl szekunder antiszérumban (1:500 hígítás, Life Technologies) inkubáltuk 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Végül a metszeteket szárítottuk, majd lefedtük és sötét helyen tároltuk.

Fos és BDA kettős fluoreszcens immunhisztokémia

Dupla immunfestés esetén a BDA FITC-tiramidos amplifikációja után a metszeteket nyúl anti-Fos primer antiszérumban (1:10000 hígítás, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) inkubáltuk 48 órán keresztül szobahőmérsékleten. Majd a metszeteket 2 órán át szárárból származó Alexa Fluor 594 anti-nyúl másodlagos antitesttel kezeltük (Life Technologies, 1:500 hígítás). Végül a metszeteket tárgylemezre vittük, megszáritottuk, lefedtük és sötét helyen tároltuk.

CTb, calbindin és parvalbumin immunhisztokémia

A metszeteket 0,5% Triton X-100 és 3% BSA oldatba helyeztük 1 órára. Ezután 3%-os BSA-t és kecskéből származó primer anti-CTb antitestet (List Biological Laboratories) 1:10000-szeres hígításban, egérben termeltetett primer anti-calbindin D-28k antitestet (Sigma, St. Louis, MO) 1:5000-es hígításban és szintén egérben termeltetett primer anti-parvalbumin antitestet (Sigma, St. Louis, MO) 1:3000-es hígításban tartalmazó foszfát pufferben inkubáltuk, 24 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Ezután vittük fel 1 órára a szekunder antitestet, ami biotinilált, számból származó anti-kecske vagy anti-egér IgG volt, 1:500-as hígításban (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Ezután 1 órán keresztül inkubáltuk a metszeteket 1:500-as hígítású avidin-biotin komplexben (ABC, Vectastatin ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). A hívást 0,02% 3,3-diaminobenzidint (DAB, Sigma), 0,08% nikkel(II)-szulfátot és 0,003% hidrogén-peroxidot tartalmazó TRIS pufferben (0,1 M, pH 8,0), 10 perces inkubációval végeztük. Végül a metszeteket felhúztuk, szárítottuk és Cytoseal 60 médiummal (Stephens Scientific, Riverdale, NJ) fedtük le.

TIP39 és CTb, calbindin és parvalbumin kettős fluoreszcens immunhisztokémia

Az előbb részletezett módon fluorescein-izotiocianát (FITC)-tiramid amplifikációs immunfluoreszcens festést alkalmaztunk a TIP39-re a CTb injektált állatok agymintáin, valamint további 3-3 kezeletlen állaton a calbindin és a parvalbumin esetén, majd a metszeteket kecskéből származó primer patkány CTb ellenes, egérben termeltetett anti-calbindin D-28k és egérből származó anti-parvalbumin antitestekkel inkubáltuk külön-külön 2 napig szobahőmérsékleten, majd Alexa Fluor 594-el jelzett, számból származó szekunder anti-kecske vagy anti-egér antitestekkel 2 órán át. Mosást követően a metszeteket a fluoreszcencia halványodását gátló médiummal (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes) fedtük le és sötét helyen tároltuk.

3.3. Hisztológiai analízis

A metszetek kiértékeléséhez epifluoreszcens és sötétlátóteres kondenzorral ellátott Olympus BX60 fénymikroszkópot használtunk. A felvételek 2048x2048 pixeles felbontásban SPOT Xplorer digitális CCD kamerával (Diagnostic Instruments, Sterling

Heights, MI) készültek. A konfokális felvételeket Bio Radianc 2100 Laser Scanning System-mel rendelkező Nikon Eclipse E800 konfokális mikroszkóppal készítettük.

3.4. A PIL elektromos léziója

A 16 napos vemhes állatok fejét az altatást követően rögzítettük a sztereotaxikus készülékben (Stoelting, Wood Dale, IL). A fejbőrt szétnyitottuk és a megfelelő koordináták felett átfürtük a koponyát. Mivel a PIL egy anteroposterior irányban elnyúlt struktúra, két különböző koordinátánál is elvégeztük a léziót. A léziós készülék (UGO Basile, 3500 Lesion Producing Device, Varese, Italy) mikroelektrodáit az AP: -5,0 mm, L: -2,6 mm, DV: -6,9 mm és AP: -5,6 mm, L: -2,6 mm, DV: -6,9 mm koordinátákhoz állítottuk be és 10 másodpercig 3mA-es áramot vezettünk át rajtuk. Az állatokat a szülés utáni 5. napon, 11 nappal a léziót követően transzkardiálisan perfundáltuk.

3.5. A decussatio supraopticus pálya átvágása

A 16 napos vemhes állatok elaltatását követően fejüket sztereotaxikus készülék segítségével rögzítettük. A koponyán jobb oldalon az AP: -2,64 mm, L: -3,0 mm koordinátáknál egy 3 mm-es vonal alakú lyukat fürtünk. A dura mater megnyitását követően a decussatio supraopticus pályát egy fedőlemezről készített, 2 mm széles üveggész segítségével a DV: -8,6 mm koordinátánál vágtuk át az anteroposterior tengelyhez képest 75°-ban. 11 nappal a transzekciót követően az állatokat túlaltattuk, perfundáltuk, majd az agyukat eltávolítottuk.

3.6. Anterográdn pályajelölés biotinilált dexrán aminnal

Anterográdn terjedő biotinilált dexrán amint (25 mg BDA/250 µl PB, 10000 MW, Molecular Probes, Eugene, OR) juttatunk iontoforézis segítségével (6 µA pozitív áramimpulzusok: 7 s be – 7 s ki, 20 percen keresztül) a 3-4. postpartum napon az anya patkányok ($n_{\text{össz.}}=22$) PIL-jébe (AP: -5,18 mm, L: -2,52 mm, DV: -6,4 mm). A kapillárisokat (hegyük átmérője 15-20 µm volt) 10%-os BDA-oldattal töltöttük fel és a beadást követően a beadási helyen tartottuk 15 percig, és csak ezt követően húztuk ki.

Egy héttel később az állatokat perfundáltuk, az agyakat eltávolítottuk, és a BDA-t tartalmazó rostokat biotin-tiramin amplifikálást követően avidin-biotin peroxidázzal mutattuk ki.

3.7. Retrográd pályajelölés kolera toxin β -alegységgel

A műtétekhez összesen 26 db, 3-4 postpartum napos Wistar anya patkányt használtunk fel. A műtét során 0,25%-os retrográdan terjedő kolera toxin β -alegységet (CTb, List Biological Laboratories, Campbell, CA) mikroinjektáltunk elektroforetikusan 6-6 állat esetén a medialis preopticus területre (koordináták: AP: -0,48 mm, L: -0,41 mm, DV: -8,4 mm) és a nucleus arcuatusba (koordináták: AP: -2,56 mm, L: -0,41 mm, DV: -9,34 mm), valamint 14 állat esetén a posterior intralaminaris thalamicus komplexbe (koordináták: AP: -5,18 mm, L: -2,52 mm, DV: -6,4 mm). A beadást a BDA beadással megegyező módon végeztük. A műtét után 7 nappal az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk.

3.8. RT-PCR

8 laktáló anya, 8 kölykeitől megfosztott anya és 8 azonos korú szűz kontroll nőtény agyát távolítottuk el mikrodisszekció céljából a 8-9 postpartum napon. 3 mm széles koronális szeleteket vágunk a subparafascicularis areát tartalmazó friss agyból. 2 mm belméretű mikropunch tűvel végeztük el a PVG és a PIL disszekcióját. A disszekált szövetet lefagyasztottuk és felhasználásig -80°C -on tároltuk.

A teljes RNS-t izoláltuk a mikrodisszekált PVG-ből és PIL-ből TRIzol reagenst (Invitrogen, Carlsbad, CA) használva, a gyártó utasításai szerint. Miután az RNS-t egységesen $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ -re hígítottuk, deoxyribonukleáz I-gyel (Invitrogen) kezeltük és a gyártó előírásait követve cDNS-t szintetizáltattunk belőle Superscript II reverz transzkriptáz kittel (Invitrogen). 10x-es hígítást követően, $2,5\ \mu\text{l}$ -t használtunk templátként az előkészült cDNS-ből a multitemplát PCR-hoz illetve szekvencia specifikus fluoreszcensen jelölt TaqMan próbákat a TIP39-re (6-FAM-CGCTAGCTGACGACGCGCCT-TAMRA) és a gliceraldehid-3 foszfát-dehidrogenázra (GAPDH; JOE-ATGGCCTTCCGTGTTCCCTACCCCC-TAMRA).

A TIP39 primereket (CTGCCTCAGGTGTTGCCCT és TGTAAGAGTCCAGCCAGCGG) 300 nm-os, a GAPDH primereket (CTGAACGGGAAGCTCACTGG és CGGCATGTCAGATCCACAAC) pedig 150 nm-os koncentrációban használtuk. A PCR reakció enzime az iTaq DNS polimeráz (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) volt. Az áttörési ciklusszámokat a koncentrációk logaritmusának függvényében ábrázolva jutottunk egy kalibrációs görbéhez, mely standard sor alapján kiszámoltuk a TIP39 és GAPDH cDNS mennyiségét a két agyterületet (PVG, PIL) reprezentáló mintáinkban.

3.9. In situ hibridizációs hisztokémia

3 darab 21 napos vemhes, 1, 9 és 23 postpartum napos elsőszülő anya patkány, 3 kölykeitől megfosztott anya és 3 azonos korú szűz kontroll nőtény agyát dekapitálást követően szárazjégen lefagyasztottuk és -80°C-on tároltuk. A PIL és a PVG területéről kriosztáttal 12 µm vastag metszeteket készítettünk, melyeket polilizines tárgylemezekre rögzítettünk (Thermo Scientific, Wien, Austria). A metszeteket tartalmazó tárgylemezek felhasználásig -80°C-ra kerültek. A kontroll nőtények ösztroz ciklus stádiumát nem határoztuk meg, mivel az ösztrogén szintváltozásoknak nincs detektálható hatása a TIP39 mRNS expresszióra (Dobolyi és mtsai 2006b). A [³⁵S] UTP-jelölt ribopróbákat MAXIscript transzkripció kittel (Ambion, Austin, TX) készítettük a TOPO TA vektorba (Invitrogen) szubklónozott TIP39 cDNS-éről, és olyan hígításban vittük fel a metszetekre, hogy tárgylemezenként a beütésszám percenként 1 millió legyen. A próbák gyártásakor a patkány TIP39 cDNS szekvenciájának -55-től 37-ig terjedő szakaszát használtuk mintaként. Az autoradiográfiás jel előhívásához a tárgylemezeket Kodak folyékony emulzióba mártottuk (Eastman Kodak, Rochester, NY), majd az emulziót három hét várakozási idő után előhívtuk. A metszeteket ezután Giemsa-val háttérfestettük, lefedtük, majd digitális kamerával felszerelt Olympus BX60 mikroszkóppal analizáltuk, sötét- és világos látótér funkciókban.

3.10. PTH2 receptor antagonista (HYWH-TIP39) agykamrába való injektálása

A szülés utáni 2. napon a patkányokat elaltattuk, fejüket sztereotaxikus készülék segítségével rögzítettük, majd egy állandó kanült (Plastics One, Roanoke, VA) implantáltunk a jobb oldalkamrába (koordináták: AP: -0,5 mm, L: -1,4 mm (Paxinos és Watson 1986), mely a koponyához fogászati cementtel (Plastics One) lett rögzítve. Az állandó kanül egy beleilleszkedő „kupakkal” lett lezárva. A kísérlet napján a 0,375 és 0,075 mg/ml koncentrációjú PTH2 receptor antagonistából 6 perc alatt 6 µl-t injektáltunk állatonként Hamilton fecskendő (Hamilton Company, Bonaduz, Switzerland) és a beépített kanülhöz rögzíthető hosszabbító cső (Plastics One) segítségével.

3.11. Vírus előállítás

A HYWH-GFP lentivírus vektort úgy tervezték, hogy a PTH2 receptor antagonista, hisztidin⁴, tirozin⁵, triptofán⁶, és hisztidin⁷-TIP39-et (HYWH-TIP39) (Kuo és Usdin 2007) szekretálja, a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) pedig a megfertőzött sejtben maradjon, hogy láthatóvá váljon a beadás helye. A kontroll vírus csak a GFP-t expresszálta. A HYWH-GFP lentivírus vektort az alábbiak szerint állították elő: oligonukleotid szintézis, PCR és konvencionális szubklónozás kombinációjával készítették egy konstrukciót, amelyben a fibronektin szignálszekvenciát fuzionáltatták a PTH2 receptor antagonista HYWH-TIP39 szekvenciájával, amelyet az IRES szekvencia és a GFP szekvenciája követ. Röviden: két oligonukleotidot (ATGCTCAGGGGTCCGGGACCCGGGCGGCTGCTGCTGCTGGCAGTCCTGTGCCTGGGGACC és AGGACACGGACCCCTGGAGCCACGCGACGTGGCTTCGGCCCTTCTCGTTCTCCTCGGACCGCGTAATGACCGTAC) hőkezelték és meghosszabították, hogy létrehozzák a fibronektin szignál szekvenciát és a HYWH-TIP39 5' végét. A fibronektin szignálszekvencia/HYWH-TIP39 fúziós szekvenciát PCR reakcióval állították elő, amely ezt a terméket, két további oligonukleotidot (GCATGAGCTCGCCGCCACCATGCTCAGGGGTCCGGGA és GCATGGATCCTCAGGGCGCGTCCAGCA) és a HYWH-TIP39-et kódoló plazmidot

tartalmazta. Az így elkészített fibronektin szignálszekvencia/HYWH-TIP39 fúziós szekvenciát a pWPI lentivírus vektor (Addgene plazmid 12254; D. Trono ajándéka, École Polytechnique Fédérale De Lausanne) PmeI hasítási helyére klónozták be. A korrekt szekvenciát és orientációt szekvenálással határozták meg. A HEK293T sejteket kotranszfektálták a fent leírt módon előállított plazmiddal, psPax2 plazmiddal (Addgene plazmid 12260; D. Trono) és pMD2.G plazmiddal (Addgene plazmid 12259; D. Trono). A koncentrált törzsvonalat a sejt kultúra ultracentrifugálását követő polietilén-glikolos precipitációjával állították elő (Kutner és mtsai 2009). 72 órával a HEK293T sejt infekcióját követően a fluoreszcens sejteket megszámlálták és a titert 10^8 transzdukáló egység/ml-re állították be. A GFP-t kódoló kontroll vírust pFUGW-GFP plazmid (Addgene plazmid 14883, D. Baltimore ajándéka, California Inst Technology) és segítő plazmidok felhasználásával állították elő a HYWH-TIP39-et kódoló vírus vektornál leírt módszerrel (Lois és mtsai 2002).

3.12. Sztereotaxikus vírusbeadás az agyba

A nőstény állatokat elaltattuk és fejüket sztereotaxikus készülék segítségével rögzítettük. A koponyán egy kisméretű lyukat fúrtunk, majd a dura matert egy metszéssel megnyitottuk. A vírusokat 15-20 μm átmérőjű üvegapilláris segítségével nyomással juttattuk mindkét oldali mediobasalis hypothalamusba az alábbi sztereotaxikus koordináták szerint: AP: -2,33 mm; L: $\pm 0,41$ mm; DV: -9,11 mm, illetve mindkét oldali area preoptica medialis-ba az alábbi sztereotaxikus koordináták szerint: AP: -0,48 mm; L: $\pm 0,41$ mm; DV: -8,17 mm. 300 nl vírust tartalmazó steril fiziológiás sóoldatot injektáltunk a már korábban leközölt módszerrel (Kovacs és Palkovits 2010). Más agyterületek befertőzésének elkerülésére olajjal zártuk le a kapillárist. 2 héttel a műtét után kezdtük meg az állatok pároztatását.

3.13. Vérvétel a szopási inger által kiváltott prolaktin szekréció vizsgálatára

A szopási stimulus hatására bekövetkező prolaktin szekréciót a szülés utáni 10-11. napon vizsgáltuk. Egy nappal a kísérlet előtt, éteres altatás alatt, egy krónikus

szilikon kanült (belső átmérő 0,5 mm, külső átmérő 0,9 mm; Dow Corning Corp., Midland, MI, and Becton Dickinson Parsippany, NY) ültettünk be az állatok jugularis vénájába, mely lehetővé teszi a többszörös vérvételt a szabadon mozgó állatokból. A kísérlet napján reggel 8 órakor vért vettünk, majd a kölyköket 4 órára elválasztottuk az anyáktól. Az elválasztás végén vért vettünk az állatoktól, majd az intracerebroventricularis kanülon keresztül beinjektáltuk a steril fiziológiás só-t a kontroll csoportnak, illetve a PTH2 receptor antagonistát a másik csoportnak. A kölyök visszatétele utáni 5., 15., 30. és 60. percben szintén vettünk vért az anyáktól, miközben azok szoptattak. Minden vérvételi időpontban 200 µl vért vettünk le, majd a vérmintákat centrifugáltuk, a plazmát elválasztottuk és a PRL szint meghatározásig – 20°C-on tároltuk.

3.14. A prolaktin koncentrációjának meghatározása a vérplazmában

A plazma PRL szinteket radioimmunoassay (RIA) módszerrel határoztuk meg, amelyhez a szükséges reagenseket a National Hormone and Pituitary Program-tól (NIH, USA) Dr. A. F. Parlow közvetítésével kaptuk meg. A RIA módszer menete kisebb változtatások mellett megegyezett a kihez adott leírással. A jóddal való jelöléshez a Chloramin-T módszert követtük, a szabad és a kötött hormonok szétválasztásához protein A-t (BactASorb, Human Rt, Gödöllő) használtunk. A mérési adatok összegyűjtése és kiértékelése LKB Clinigamma szoftver használatával történt. Az egyes méréseken belüli és a mérések közötti variancia 10%, illetve 14% volt. A PRL mérés érzékenysége 0,5 ng/ml patkány plazma volt a PRL RP-3 standard használatakor. Minden vérmintából dupla sorozatot mértünk (50-50 µl plazmát használva a méréshez), majd az így kapott két érték számtani átlagát vettük eredménynek.

3.15. Kondicionált helypreferencia teszt

Tesztapparatunk három részből állt: egy centrális, neutrális zónából (15 cm átmérőjű és 20 cm hosszú barna cső), egy fehér dobozból (idegen doboz, 41x22x19 cm) és egy kék dobozból (kölyök-asszociált, 35x28x22 cm). Az anyaállatokat kölykeikkel a saját fehér dobozuktól a szülés utáni 3. napon helyeztük át a kék

dobozba. A 6-7. postpartum napon egy ovális, narancssárga műanyag etetőt (15x20 cm) tettünk a kék dobozba, hogy a kölykökre való kondicionálást elősegítse. Kísérleteinket a szülés utáni 9. napon végeztük. A kísérlet előtt az anyákat 2 órára elválasztottuk kölykeiktől, a teszthez használt dobozokat pedig alkohollal kimostuk és szárazra töröltük. A fehér dobozba egy téglalap alakú, fekete műanyag etetőt (13x15 cm) tettünk. A két doboz megvilágítása azonos volt, az összekötő cső viszont jelentősen sötétebb volt. A ketrecek tetejét rács fedte, melyen keresztül az anyák viselkedését 60 perces időintervallumban figyeltük meg. Az állatok a kompartmentek között szabadon mozoghattak. Az általunk vizsgált paraméterek: a preferált és a nem-preferált kompartmentekbe történő belépések száma, melyek a mozgásaktivitásra utalnak; illetve a preferált és a nem-preferált kompartmentekben eltöltött idő, melyek közül ez utóbbi utal a kölyökkereső magatartásra.

3.16. Statisztikai analízis

A statisztikai analízist a Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) programmal végeztük. A PIL neuronális aktivitás analíziséhez a Fos-ir neuronok számát, a TIP39 neuronok számát és a duplán jelölt neuronok számát 3 csoportban (1. csoport: szoptató anyák; 2. csoport: azok az anyák, amelyeknek nem volt megengedve a fizikai kontaktus kölykeikkel; és a 3. csoport: azok az anyák, amelyek egyáltalán nem voltak kapcsolatban kölykeikkel) hasonlítottuk össze egyutas varianciaanalízissel (one-way ANOVA), amit Bonferroni posthoc eljárás követett.

A kölykök elvétele előtti alap prolaktin szinteket a két csoport közötti (PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák, kontroll vírus-injektált anyák) összehasonlítást a Student-féle t-próbával végeztük. A „szoptatási” kísérleteknél a 2-2 csoportot (a PTH2 receptor antagonistát intracerebroventricularisan (ICV) kapott anyák és a fiziológiás söt ICV kapott anyák csoportja, valamint a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák és a kontroll vírus-injektált anyák csoportja) kétutas ismételt méréses variancia analízissel (two-way repeated measures ANOVA) vizsgáltuk, hogy eldöntsük a kétféle módszerrel bejuttatott antagonistának van-e hatása a prolaktin szintekre. Annak meghatározására, hogy melyik időpontban volt hatásos az antagonistista, Bonferroni posthoc eljárást használtunk.

A kondicionált helypreferencia tesz esetén először a kísérlet validálására a kontroll vírus-injektált anyák által a két különböző kompartmentben eltöltött időt analizáltuk egyutas ismételt méréses varianciaanalízissel (one-way repeated measures ANOVA), amit Bonferroni posthoc eljárás követett. Azután a két csoport (a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák és a kontroll vírus-injektált anyák) által a két kompartmentben eltöltött időt vizsgáltuk kétutas variancia analízissel. A vírusbeadás hatását a kölyök-asszociált kompartmentben eltöltött időre Bonferroni posthoc eljárással állapítottuk meg. Egy állat preferenciáját egy adott ketrec iránt, úgy határoztuk meg, hogy az illető állatnak 20%-kal több időt kellett töltenie az adott ketrecben, mint a másokban. A ketrecek és csoportok közötti kompartment preferenciát chi-négyzet próbával (chi-square test) és Fisher-féle egzakt próbával (Fisher's exact test) vizsgáltuk. Tovább vizsgálva azt az időt, amit az állatok a kölyök-asszociált vs. kontroll ketrecben töltöttek, kaptuk meg az ún. preferencia indexet, amelynek számítási módja a következő: $100 * (\text{kölyök-asszociált ketrecben töltött idő} - \text{kontroll ketrecben töltött idő}) / (\text{kölyök-asszociált ketrecben töltött idő} + \text{kontroll ketrecben töltött idő})$. A preferencia index nulla, ha az állat ugyanannyi időt tölt mindkét ketrecben. A két csoport preferencia indexét Student-féle t-teszttel hasonlítottuk össze.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek topográfiai elhelyezkedése, valamint neuronális kapcsolatrendszerük vizsgálata anya patkányokban

4.1.1. A PIL topográfiájának és neuronális markereinek vizsgálata

A PIL topográfiája

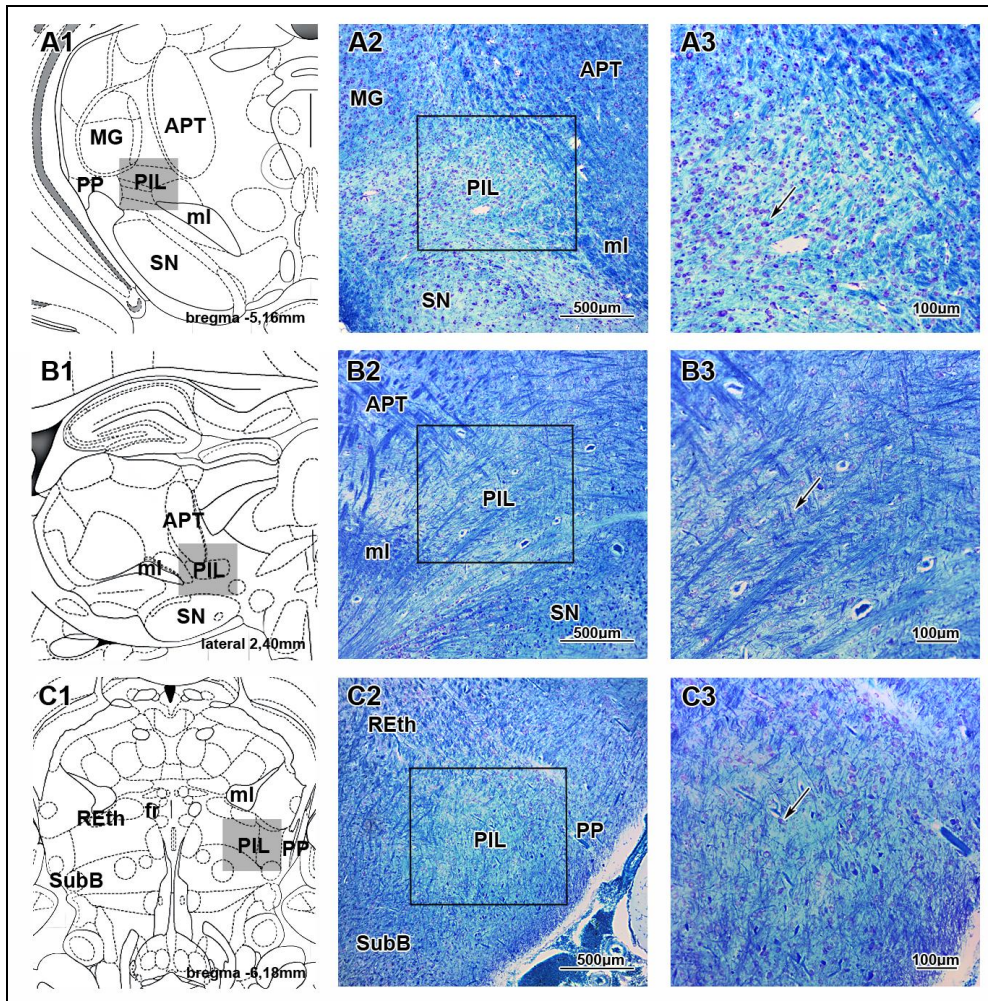
A LFB festés alapján megállapítható, milyen neuroanatómiai képletek veszik körül a PIL-t. A festésnek köszönhetően kirajzolódik a PIL-t határoló substantia nigra és a corpus geniculatum mediale, valamint a rostokban gazdag lemniscus medialis (6. ábra).

A PIL-beli TIP39 sejtek a bregma ponttól számított -4,8 mm és -5,6 mm között láthatóak és a PVG-től hosszan elnyúlva oldalra és hátrafelé húzódnak a lemniscus medialis felett elhaladva, egészen a peripeduncularis területig.

A PIL ventralis és dorsomedialis határai jól azonosíthatóak a PV-immunreaktív neuronok jelenléte alapján a substantia nigrában és a nucleus praetectalis anteriorban (7A. ábra). A PIL dorsolateralis és medialis határát a corpus geniculatum medialeban és a lemniscus medialisban található PV-ir rostok körvonalazzák (7A. ábra). Ezzel ellentétben, a PIL lateralis és dorsalis határát képező area peripeduncularis és nucleus triangularis posterior thalami nem különíthető el a parvalbumin immunhisztokémia alapján, mivel csak kevés PV-ir rostot tartalmaz (7A. ábra). Pedig miközben az area peripeduncularis és nucleus triangularis posterior thalami nem tartalmaz TIP39-ir sejtesteket, a TIP39-ir neuronok egyenletesen kitöltik a PIL-t (7B. ábra).

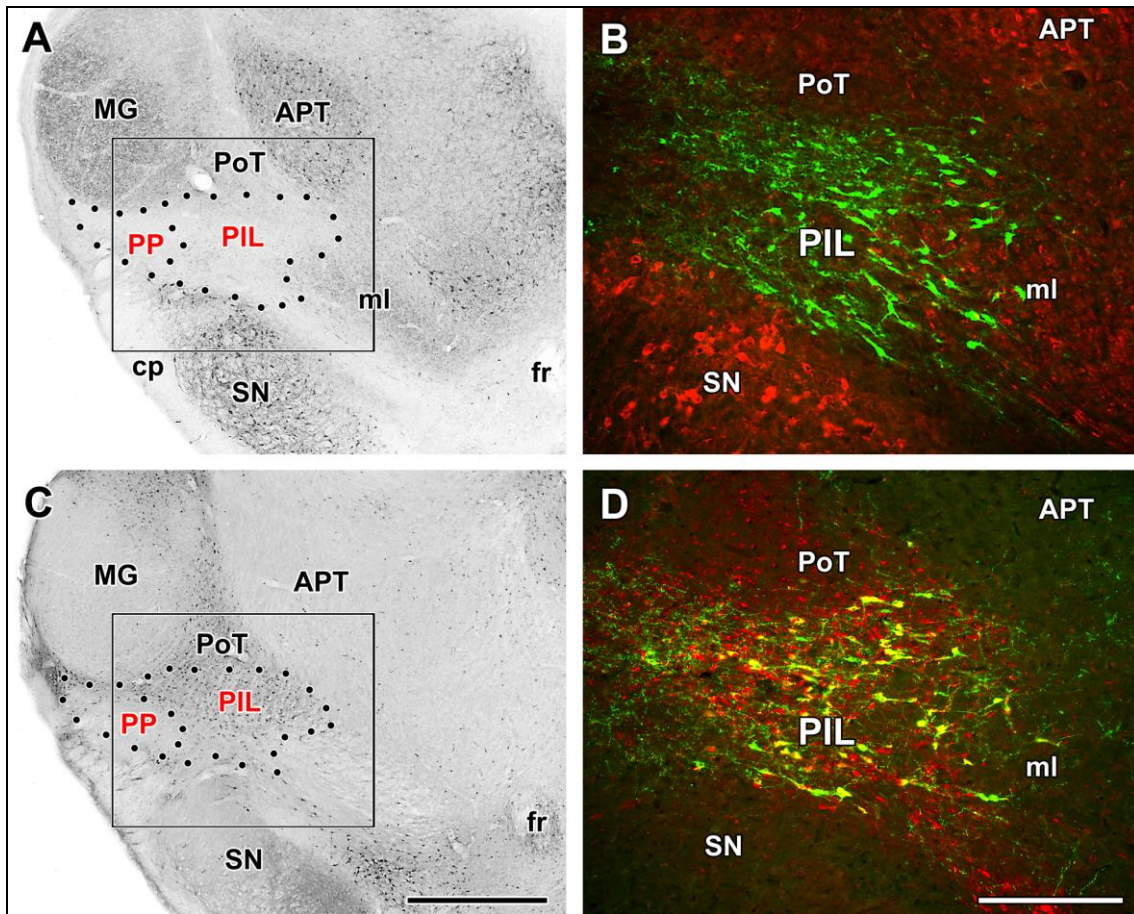
A calbindin immunreaktivitás éles ellentétben áll a parvalbumin immunreaktivitással a PIL-ben és környékén. A PIL sok CB-ir sejtestet tartalmaz, ahogyan a nucleus triangularis posterior thalami is. A többi PIL-lel szomszédos terület elhanyagolható számú CB-ir sejtestet tartalmaz (7C. ábra). A PIL-en belül mind a TIP39-, mind a CB-ir sejtestek egyenletesen elosztva találhatóak (7D. ábra). Továbbá szinte az összes TIP39-ir neuron jelölődik calbindinre is, miközben további CB-pozitív,

de TIP39-negatív neuronok is jelen vannak a PIL-ben (7D. ábra). Sem a TIP39, sem a kalcium-kötő fehérjék eloszlásában nem találtunk különbséget a PIL egyes részei (nucleus intralaminaris posterior thalami, nucleus subparafascicularis parvicellularis, zona incerta lateralis része) között, ezért a PIL-t, mint topográfiai entitást tekinthetjük.



6. ábra. A posterior intralaminaris thalamicus komplex citoarchitektúrája

A1-A3: Koronális metszetek. B1-B3: Sagittális metszetek. C1-C3: Horizontális metszetek. A bal oldali ábrák (A1, B1, C1) a patkány agy sztereotaxikus atlasz (Paxinos és Watson 2005) alapján készített sematikus ábrázolások. A középső ábrák (A2, B2, C2) a bal oldali sematikus ábrák szürke keretében lévő posterior intralaminaris thalamicus komplexet reprezentálják. A jobb oldali ábrák (A3, B3, C3) a középső ábrák keretezett részéről készített nagy nagyítású felvételek. A nyilak a jobb oldali ábrákon a PIL-ben található sejteket jelölik.

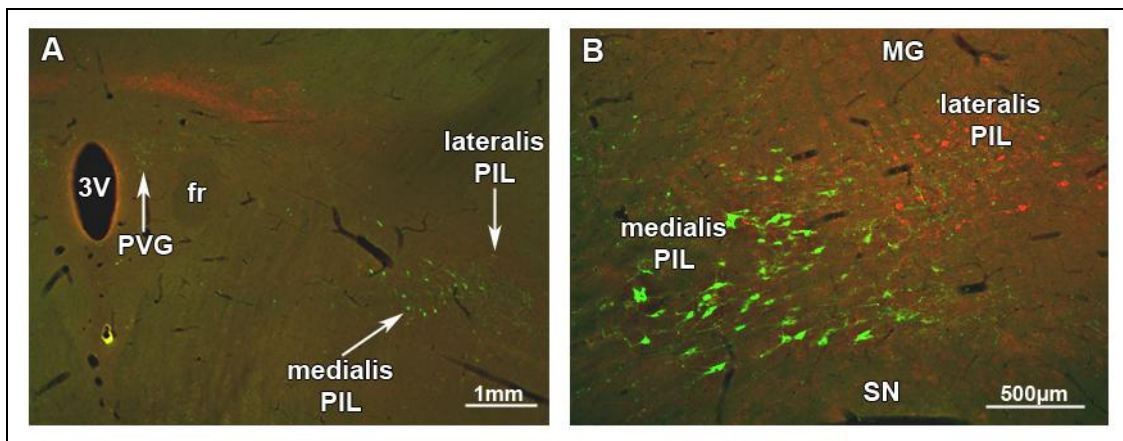


7. ábra. A TIP39 sejtek és a kalcium-kötő fehérjéket tartalmazó sejtek közötti topográfiai kapcsolat a posterior thalamusban

A: A parvalbumin-expresszáló sejttestek lokalizációja a posterior intralaminaris thalamicus komplexben. Parvalbumin-ir neuronok láthatóak még ezen kívül a nucleus praetectalis anterior-ban és a substantia nigra-ban. Továbbá parvalbumin-ir rostok találhatóak a corpus geniculatum mediale-ban, miközben csak néhány figyelhető meg ezekből a nucleus peripeduncularis-ban és a nucleus triangularis posterior thalamicus-ban. B: A parvalbumin és TIP39 dupla fluoreszcens immunhisztokémiai festés alapján megállapítottuk, hogy a parvalbumin (piros) és a TIP39 (zöld) nem kolokalizál a PIL-ben. C: A calbindin-expresszáló sejttestek lokalizációja a posterior intralaminaris thalamicus komplexben. Calbindin-ir neuronok vannak még a nucleus triangularis posterior thalamicus-ban, viszont hiányoznak a corpus geniculatum mediale-ből, a nucleus praetectalis anterior-ból, a substantia nigra-ból és a nucleus peripeduncularis-ból. D: A C ábra keretezett részének megfelelő nagyobb nagyítású TIP39 (zöld) – calbindin (piros) dupla fluoreszcens felvétel demonstrálja, hogy a TIP39 neuronok eloszlása átfed a calbindin-ir neuronokkal a posterior intralaminaris thalamicus komplexben, viszont a nucleus triangularis posterior thalamicus-ban nem esik egybe. A lépték a C ábrán 1 mm-t, a D ábrán a 400 μm -t jelöl.

A PIL-ben lévő neuronális markerek azonosítása és a TIP39 sejtekkel való topográfiai kapcsolataik

A CGRP neuronok és rostok elhelyezkedése nagyban hasonlít a TIP39 sejtek rostromedialis-caudolateralis irányú elrendeződéséhez a posterior thalamusban. Horizontális metszeteken látszik, hogy a CGRP neuronok egy folytonos ívet alkotnak a PIL-ben (Dobolyi és mtsai 2005, Kruger és mtsai 1988), viszont nem fednek át a TIP39 neuronokkal. Koronális metszeteken is megfigyelhető, hogy a TIP39 sejtek a CGRP sejtektől medialisán helyezkednek el (8. ábra).



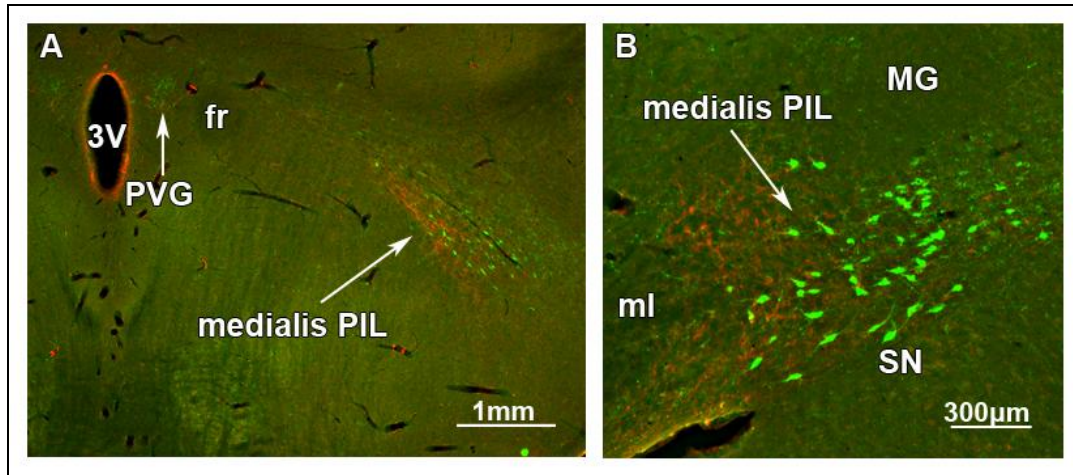
8. ábra. A TIP39 és a CGRP sejtek közötti topográfiai kapcsolat a posterior thalamusban

A: A horizontális síkú metszeten kettős fluoreszcens immunfestéssel vált láthatóvá, hogy a TIP39-immunreaktív neuronok (zöld) medialisán helyezkednek el a CGRP-ir neuronokhoz (piros) képest a PIL-ben. B: A koronális metszeten a TIP39-ir (zöld) és a CGRP-ir neuronok (piros) két külön szubdivízióban foglalnak helyet.

Megállapítottuk, hogy a Coolen és munkatársai (Coolen és mtsai 2003a) által ezen a területen leírt galanin-rostok lefutása szinte teljesen egybeesik a TIP39 neuronokkal. A galanin-ir rostok a TIP39 sejtcsoport medialis részén helyezkednek el és medialis irányba nyúlnak túl a sejtcsoporton (9A. ábra). Galanin-pozitív sejttesteket nem találtunk a PIL területén, csupán immunreaktív rostokat, amelyek a TIP39 neuronok között futnak le, de nem veszik körül azokat (9B. ábra).

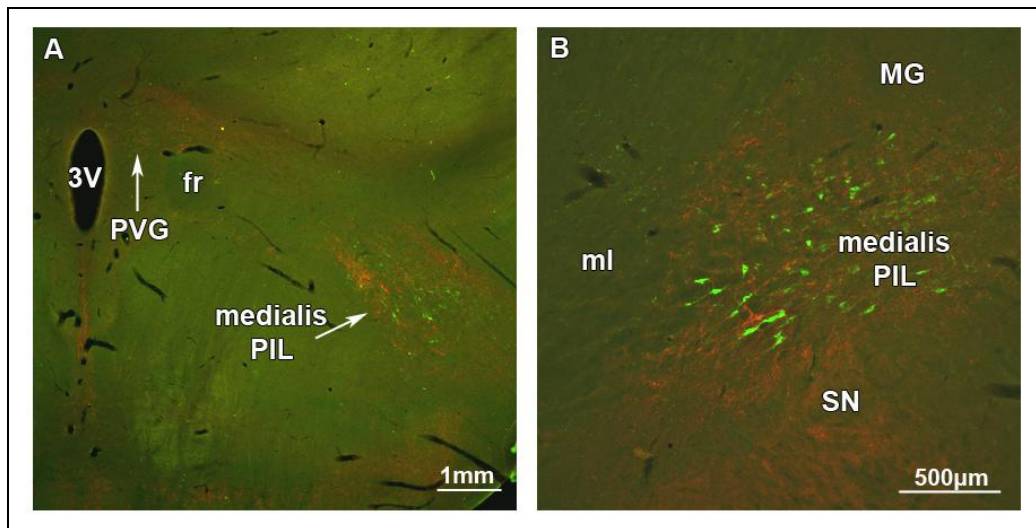
Bombesin rostok jelenlétét is kimutatták a posterior thalamusban (Coolen és mtsai 2003a), ezért megvizsgáltuk a TIP39 neuronok kapcsolatát a bombesin rostokkal.

A bombesin-ir rostok hálózata a TIP39 neuronok között és azoktól lateralisán is megfigyelhető, mindkét szubdivízióban jelen vannak (10. ábra).



9. ábra. A TIP39 sejtek és a galanin rostok közötti topográfiai kapcsolat a posterior thalamusban

A: A horizontális síkban a TIP39-ir neuronok (zöld) és a galanin-pozitív rostok (piros) a PIL ugyanazon részén figyelhetők meg. B: A koronális síkban megfigyelhető, hogy a galanin-ir rostok (piros) a TIP39 neuronok (zöld) között futnak le, de nem veszik körül azokat.



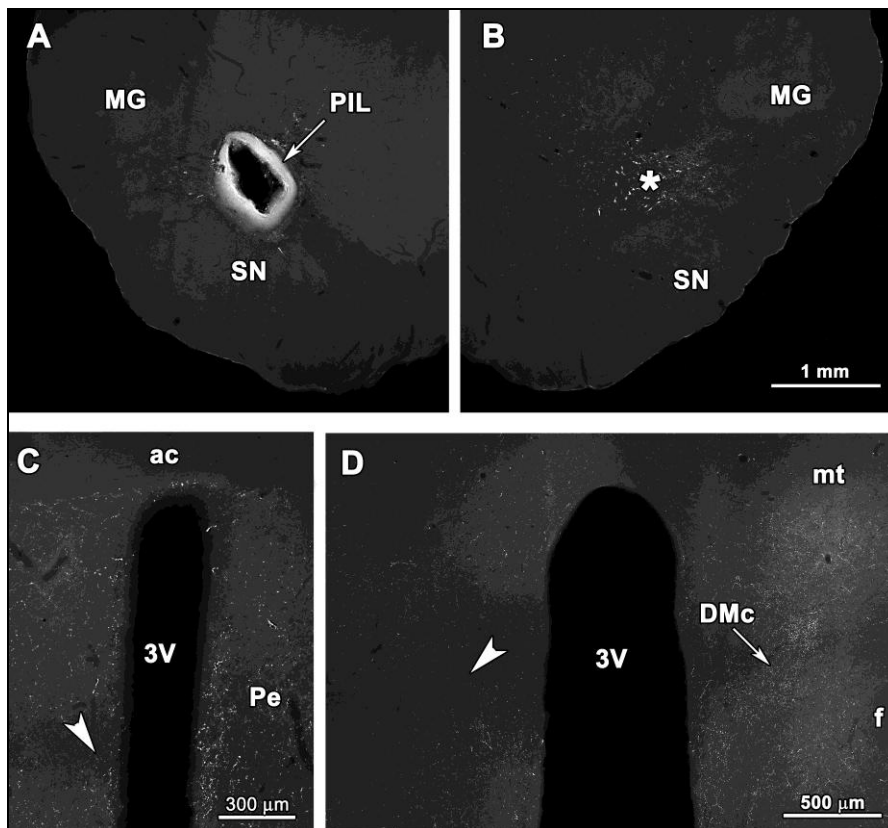
10. ábra. TIP39 sejtek és a bombesin rostok közötti topográfiai kapcsolat a posterior thalamusban

A: A horizontális metszeten látszik, hogy a bombesin-ir rostok (piros) mindkét szubdivízióban, míg a TIP39-ir neuronok (zöld) csak a medialis szubdivízióban találhatóak meg. B: A koronális metszetről készített ábra szemlélteti, hogy a TIP39 neuronok (zöld) között futnak a bombesin rostok (piros) a medialis PIL-ben.

4.1.2. A PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek neuronális kapcsolatrendszer

A TIP39 rostok eliminációja a hypothalamicus magvakból a PIL elektromos léziójának hatására

A PIL léziójának hatására egy jelentős redukció volt megfigyelhető a TIP39 rostok denzitásában az ipsilateralis hypothalamusban, különösen a nucleus peri- és paraventricularis-ban, valamint a nucleus dorsomedialis compact részében. Ezenkívül a TIP39 rostok eltűntek a nucleus arcuatus-ból és a retrochiasmaticus area-ból, valamint az amygdaloid komplexből. Kisebb mértékű, de látható csökkenés következett be a rostok számában a medialis prefrontalis cortexben, a nucleus accumbensben és a nucleus interstitialis striae terminalisban (11. ábra).

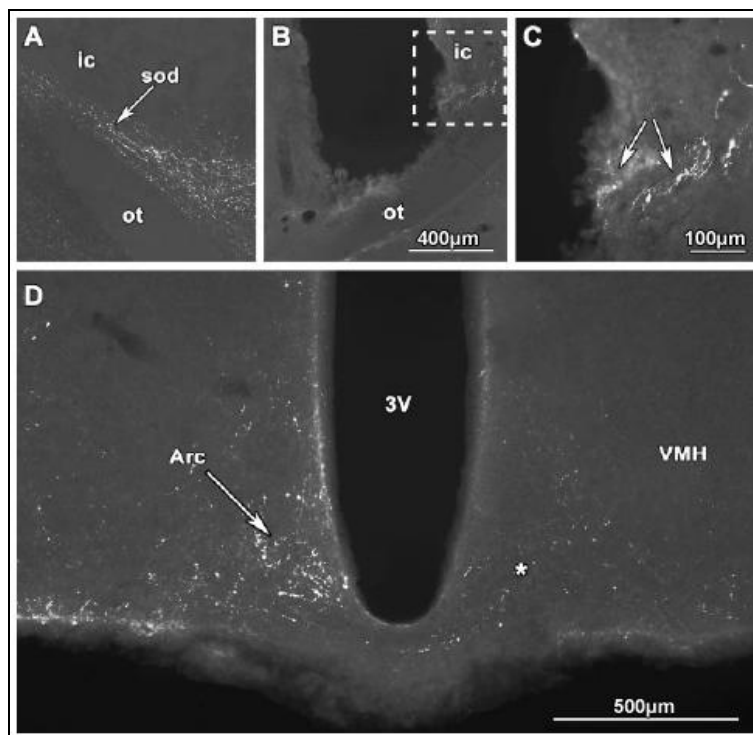


11. ábra. A PIL elektrolitikus léziója

A: A heges szélű agyszövet jelzi a lézió helyét a PIL-ben, ahonnan eltűntek a TIP39 neuronok. B: A lézióval ellentétes oldalon láthatóak az ép TIP39 idegsejtek. C-D: A PIL elektrolitikus léziójának hatására eltűnnek a TIP39-ir rostok a nucleus periventricularis-ból és a nucleus dorsomedialis-ból.

A TIP39 rostok lefutásának vizsgálata és a rostok eliminációja a decussatio supraopticus pálya féloldali átvágásának hatására

A hypothalamus peri-, paraventricularis és arcuatus magja nagy denzitásban tartalmaz TIP39-ir rostokat laktáló anyákban. A rostok lefutása és a terminálisok eloszlása megegyezik az anyákban és a kontroll nőstényekben, habár az immunjelölődés intenzitása anyákban nagyobb. A TIP39 rostok lefutása követhető a decussatio supraopticus felé, melyben a rostok ventromedialis irányba fordulnak (12A. ábra). A bregma szintjétől számított AP -2,64 mm és L 3.00 mm koordinátáknál végrehajtott transzekció eredményeként a TIP39 felhalmozódása figyelhető meg a transzekciótól caudalisan a decussatio supraopticusban haladó rostokban (12B-C. ábra). A műtött állatokban jelentős csökkenés történt a TIP39-tartalmú rostok és rostvégzódések sűrűségében a hypothalamicus peri- és paraventricularis, valamint az arcuatus magokban az ipsilateralis oldalon (a 12D. ábrán az arcuatus mag látható).



12. ábra. A TIP39 neuronok projekciója a nucleus arcuatus-ba anya patkányban

A: A TIP39 rostok a supraoptic decussations-ban haladnak a hypothalamus felé. B: A transzekciót a supraoptic decussations-ra merőlegesen hajtottuk végre. A rostok eltűntek a transzekciótól medialisan. C: A B ábra bekeretezett részéről készült nagy nagyítású kép szemlélteti, hogy a TIP39 akkumulálódik az átvágott rostokban a transzekciótól lateralisán. D: A TIP39 rostok megmaradnak az arcuatus magban a contralateralis oldalon, míg eltűnnek az átvágás oldalán.

*Az efferens neuronális kapcsolatok feltérképezése***Anterográd jelölt rostok eloszlása biotinilált dextrán amin PIL-be történő injektálását követően**

Anterográd nyomkövető anyaggal, biotinilált dextrán aminnal (BDA) iontoforetikus mikrobeadásokat végeztünk az anyapatkányok PIL-jébe. A beadás helyén elhelyezkedő idegsejtek dendritjei/sejttesteik veszik fel a BDA-t és a mikrotubuláris rendszer segítségével a nyomjelző anyag a sejt szinaptikus terminálisai felé transzportálódik, így megjelölhetőek azok a területek, ahová nyúlványokat küldenek a TIP39 neuronok.

A BDA PIL-be való beadását követően a BDA-jelölt rostok megjelenése viszonylag korlátozott. Csak néhány felsőbb agytörzsi és előagyi régió tartalmaz BDA-ir rostokat (13. ábra). A jelölt rostok nagy többsége a beadási helyhez képest azonos oldali (ipsilateralis) és csak kisszámú jelölt rost volt látható contralateralisan. A PIL injektálások utáni BDA-pozitív rostok eloszlási mintázata jelentősen különbözött azokban az esetekben, amikor a beadás egy a TIP39 sejtekkel szomszédos területet ért. A beadási hely azonosítására TIP39-BDA dupla immunhisztokémiát alkalmaztunk, így bizonyítani tudtuk, hogy a PIL-re korlátozódott az anterográd neuronális jelzőanyag lerakódása a 4-es, 35-ös, 37-es és 40-es számú beadások esetén (13A-C. ábra). A BDA-jelölt rostok eloszlása nem különbözött ezekben az esetekben, és még a jelölt rostok sűrűsége is igen hasonló volt az egyes agyterületeken. Ezért a PIL efferens kapcsolatainak leírása e 4 állat alapján történt. Továbbá a többi, TIP39 neuronok pozíciójával részben átfedő, illetve szomszédos beadás szintén bevonásra került a PIL projekcióinak analízisébe, mint kontroll beadási hely.

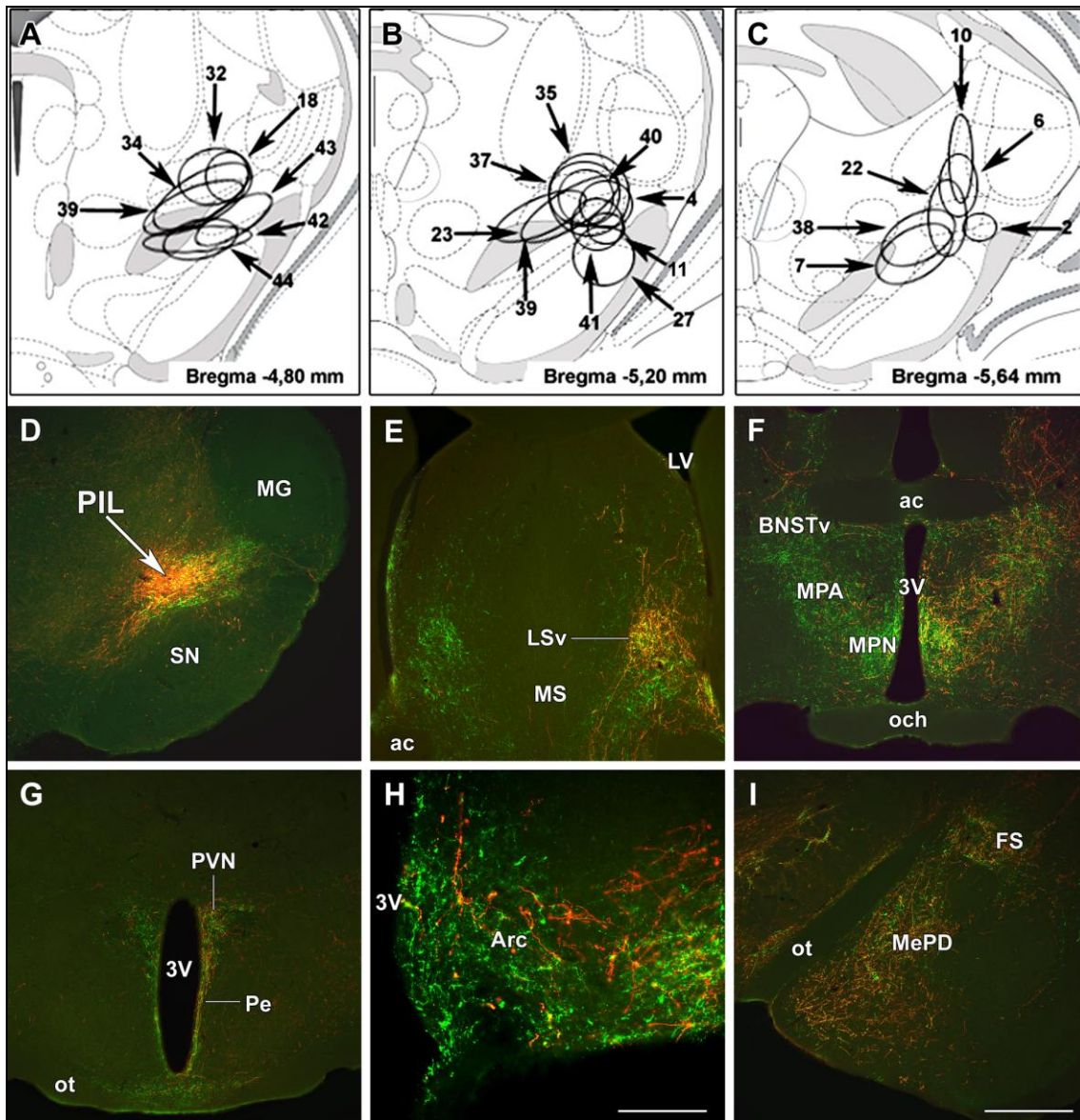
A beadás következtében BDA-jelölt rostok jelentek meg a medialis prefrontalis kéregben, különösen az infralimbikus cortex-ben, viszont a kéreg más részein nem fordultak elő. A septum a PIL egyik fő célpontja (13E. ábra). BDA-rostok denz populációját figyeltük meg a nucleus septi lateralis-ban, különösen annak ventralis részén, ahol a TIP39 rostok denzitása is nagyon magas (13E. ábra). A nucleus septi lateralis középső szubdivíziójában is megfigyelhető néhány BDA rost, a dorsalisban azonban nem, ezen kívül a nucleus septalis medialis is tartalmaz néhány BDA-ir rostot. A másik agyterület, amely magas BDA-rost denzitást mutat, az area praeoptican belül található: a

nucleus praeopticus medialis, az area praeoptica medialis néhány területe és a nucleus interstitialis striae terminalis ventralis része (13F. ábra). Az area praeoptica és a nucleus interstitialis striae terminalis többi része csak kevés BDA rostot tartalmaz.

Az amygdalában jelentős mennyiségű BDA rost jelent meg meghatározott topografikus felosztásban. A nucleus amygdaloideus medialis posterodorsalis szubdivízióját és az amygdalo-striatalis tranzíciós zónát (fundus striati) sűrűn behálózzák a BDA-, valamint a TIP39-tartalmú rostok is (13I. ábra). Néhány más amygdala mag, mint például a nucleus amygdaloideus medialis posteroventralis és a nucleus amygdaloideus basomedialis túlnyomórészt BDA rostokat tartalmaz.

A hypothalamus sok régiójában, mint a nucleus paraventricularis és periventricularis (13G. ábra), a nucleus arcuatus (13H. ábra) és a nucleus ventromedialis ventrolateralis szubdivíziója, a jelölt rostok sűrűsége kifejezetten magas. További hypothalamicus magok és területek (nucleus hypothalamicus anterior, area hypothalamica lateralis és dorsalis, nucleus dorsomedialis) is tartalmaznak figyelemreméltó mennyiségű BDA rostot, jóllehet, valamivel kisebb sűrűségben, mint az előbbieket. Az összes vizsgált régióban megegyezett a BDA-jelölt rostok és a TIP39 rostok eloszlása, kolokalizációt is számos esetben kimutattunk. A thalamusban szinte soha nem voltak megfigyelhetőek BDA-rostok, a kevés kivétel egyikét képezi az area subparafascicularis.

A középagyban és a híd területén szintén kevés BDA rostot találtunk. Jelentős mennyiségű BDA rost jelent meg azonban a substantia grisea centralisban és a nucleus tegmentalis pedunculopontinusban. A nucleus cuneatus, a colliculus superior mély rétegei, a nucleus mesencephalicus mély rétegei, az area paralemniscalis, a formatio reticularis pontis szintén tartalmaztak néhány BDA-pozitív rostot. Ezzel ellentétben, a medulla oblongataból teljes mértékben hiányoznak a BDA rostok.



13. ábra. A biotinizált dextrán amin beadási helyek és az anterográd jelölőanyaggal töltött rostok eloszlása

A-C: A bregma ponttól számított -4,80 mm-nél (A), -5,20 mm-nél (B) és -5,64 mm-nél (C) készült sematikus ábrák (Paxinos és Watson 2005) az állatszámoknak megfelelő beadásokat ábrázolják a PIL-be és a szomszédos agyterületekre. D: A 40-es beadás esetén a BDA éppen eltalálta a TIP39 neuronokat a PIL-ben. E-I: A BDA PIL-be való injektálásának hatására BDA-pozitív rostok jelentek meg a nucleus septalis ventralis-ban (E), az area praeoptica medialis-ban és a nucleus interstitialis striae terminalis részén (F), a nucleus paraventricularis-ban (G), a nucleus arcuatus-ban (H) és a nucleus amygdaloideus-ban (I).

A TIP39 sejtek jelölődése a célterületre adott kolera toxin β -alegységgel

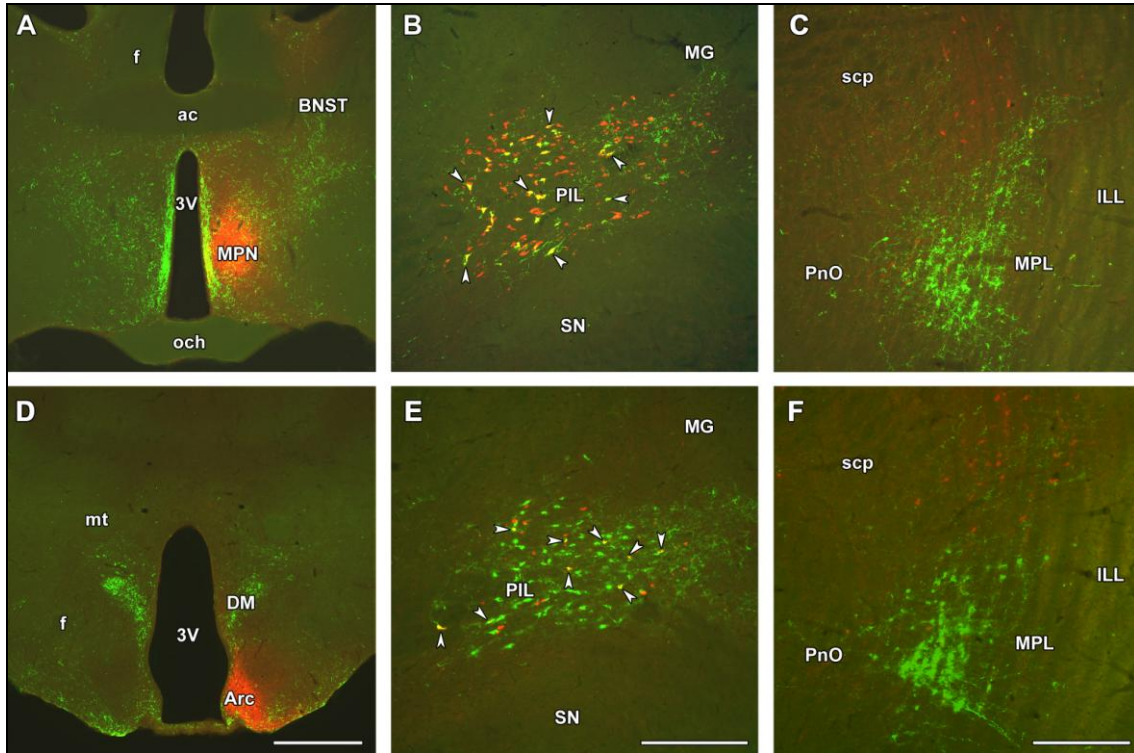
A kolera toxin β -alegységet (CTb) az adott területre vetülő idegrostok terminálisai felveszik, majd a sejttestbe szállítják, így a beadás helyére projiciáló idegsejtek lokalizálhatók.

CTb-t injektáltunk a PIL TIP39 neuronjainak két fő célterületére: a nucleus preopticus medialis-ba és a nucleus arcuatus-ba. A beadási helyeket a TIP39 rostokhoz képest vizsgáltuk, hogy demonstráljuk: a TIP39 terminálisok helyzete egybeesik a retrográd nyomjelző anyag beadási helyével (14A, C. ábra). Mindkét beadás esetén túlnyomó részben az ipsilaterális oldalon jelentek meg CTb-jelölt sejtek a PIL-ben, de a szomszédos agyterületeken nem (14B, D. ábra). A CTb-jelölt sejtek száma magasabb volt, mint a TIP39 neuronok száma a nucleus preopticus medialis-ba történt CTb injektálás esetén (14B. ábra) és kevesebb a nucleus arcuatus-ba történt CTb beadás esetén (14D. ábra). Dupla TIP39-CTb fluoreszcens immunhisztokémiával kimutattuk, hogy hozzávetőlegesen a célterületre projektáló neuronok fele tartalmazza a TIP39 peptidet, de TIP39-negatív projekciós neuronok is jelen vannak a PIL-ben.

A medialis preopticus beadás és a nucleus arcuatus-ba történő beadás után a TIP39 neuronok nem jelölődnek CTb-re az MPL-ben. Azoktól dorsalisán jelenik meg néhány CTb-pozitív neuron a beadások hatására (14C, F. ábra).

Az afferens neuronális kapcsolatok feltérképezése

CTb PIL-be való injektálása után csak korlátozott számban jelentek meg CTb-jelölt sejtek néhány agyterületen és a gerincvelőben (15. ábra). A CTb-pozitív sejtek megjelenése a PIL beadás esetén jelentősen különbözött attól, mint amikor egy PIL-lel szomszédos területet sikerült eltalálni. Így feltételezhetjük, hogy a PIL a szomszédos agyterületektől különböző, speciális afferens neuronális kapcsolatokkal rendelkezik. A jelölt sejtek szignifikáns oldaldominanciát mutatnak. A CTb-ir sejtek döntő többsége az injektálás helyével azonos oldalon található, kivéve a nucleus gracilis-t, a nucleus cuneatus-t, a nucleus spinalis nervi trigemini-t és a gerincvelőt, ahol contralaterális dominanciát figyeltünk meg.



14. ábra. CTb beadás a nucleus preopticus medialis-ba (A) és a nucleus arcuatus-ba (C)

A: Az ábra a CTb beadási helyet jelöli az MPN-ben az itt található TIP39 rostokhoz viszonyítva. B: A beadás következtében számos CTb-re és TIP39-re duplán jelölődő (nyílfejek) és csak egyszeres TIP39-negatív CTb-jelölt neuronok is láthatóak a PIL-ben. C: Az MPL-ben található TIP39 neuronok nem jelölődnek CTb-re a medialis preopticus beadás következtében. D: CTb beadási hely a nucleus arcuatus-ba az itt található TIP39 rostokhoz képest. E: A beadás hatására a TIP39 neuronok egy része jelölődik CTb-re is (nyílfejek), de CTb-negatív TIP39 neuronok és TIP39-negatív CTb-jelölt neuronok is jelen vannak a PIL-ben. F: Az MPL-beli TIP39 neuronokban nem jelenik meg a CTb a nucleus arcuatus-ba történő beadás után. A lépték 1 mm a D ábrán, 500 μ m az E ábrán és 400 μ m az F ábrán.

Az összes mikroinjektálás (15A-C. ábra) közül jónéhány eltalálta a PIL-t, a 15D. ábrán egy olyan beadást mutatunk be, ahol a neuronális tracert a PIL neuronjai veszik fel. Azokat a beadásokat, amelyek határosak a PIL-lel, kontrollként analizáltuk. Néhány beadás nem esik egybe a PIL-lel (15A-C. ábra), ezek érintik a substantia nigra-t, a nucleus triangularis posterior thalami-t, a lemniscus medialis-t, és a nucleus peripeduncularis-t. A nem átfedő kontroll beadások esetén a megjelenő CTb-jelölt sejtek mintázata határozottan különbözött a PIL beadásokétól és általában azokon a területeken, ahol a pontos PIL találat esetén megjelentek a CTb-ir sejtek, az előbbi esetben nem voltak megfigyelhetőek.

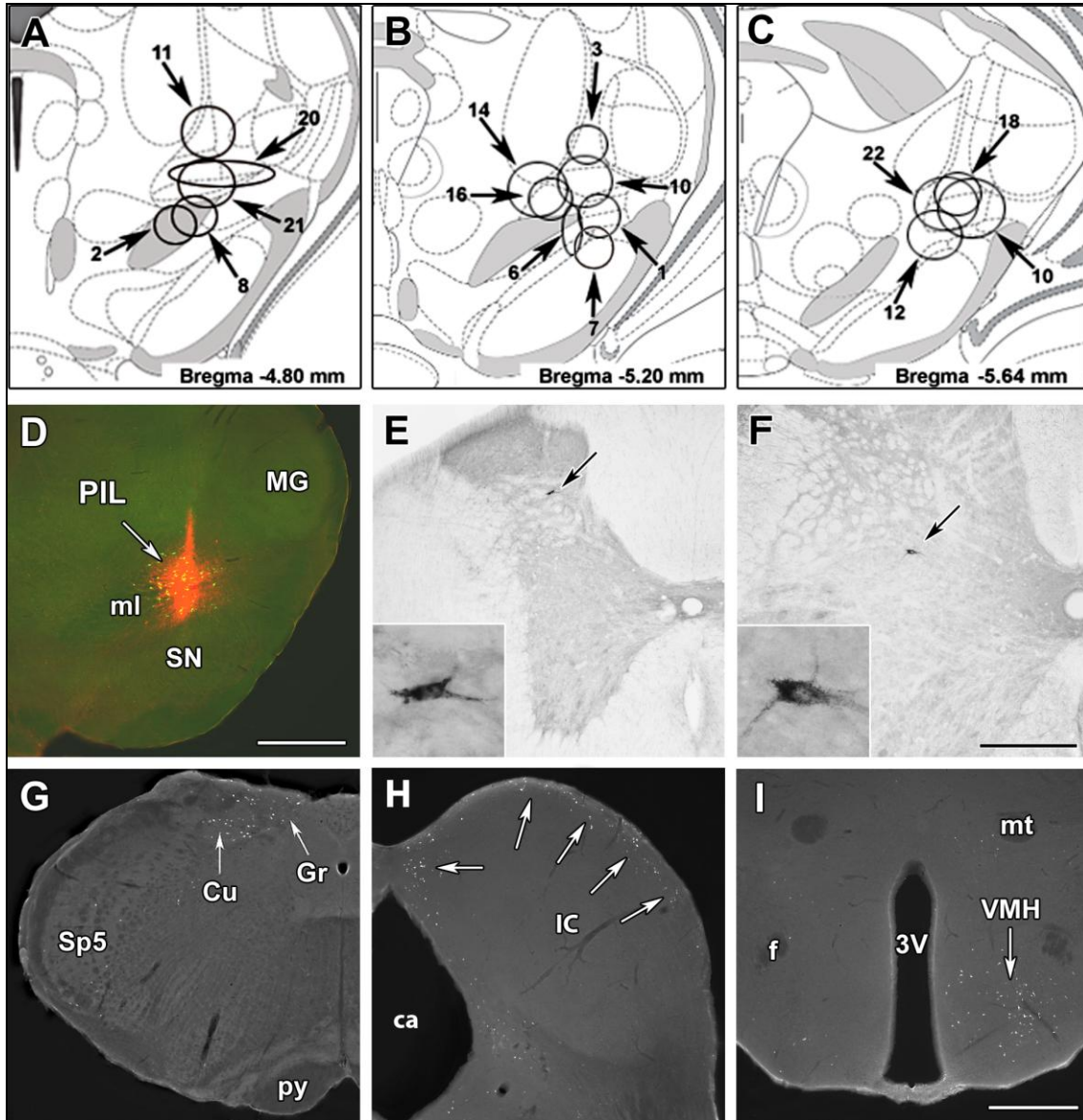
A gerincvelő szintén tartalmazott CTb-pozitív neuronokat a beadási hellyel ellentétes oldalon. Ezek a neuronok a thoracalis és lumbalis szegmentumok IV.-VII. Rexed-féle lamináiban helyezkedtek el. A CTb-ir sejtek a thoracalis szakaszon tipikusan a IV-V. laminákban (15E. ábra), míg a lumbalis szakaszon inkább a VI-VII. laminákban fordultak elő (15F. ábra). Ritkán találtunk egynél több jelölt sejtet egy adott 50 µm vastag koronális metszeten és átlagban minden negyedik koronális metszet tartalmazott egy jelölt sejtet. A jelölt sejtek perikarionja ovális alakú, több dendrittel (15E, F. ábra).

A nyúlvelőben a legtöbb CTb-tartalmú sejtet a nucleus gracilisban és cuneatusban találtuk (15G. ábra). Kiemelkedő mennyiségű jelölt sejt volt még jelen a nucleus tractus spinalis nervi trigemini-ben, különösen annak ventralis részének mélyrétegeiben (15G. ábra). Ezekben a magokban a beadási hellyel contralateralisan lokalizálódtak a jelölt sejtek.

A felsőbb agytörzsben szintén csak néhány helyen voltak megfigyelhetőek a CTb-jelölt neuronok. A legmagasabb számban az inferior colliculus külső rétegeiben (15H. ábra), de a nucleus parabrachialis lateralis-ban, a substantia grisea centralis-ban és a superior colliculus mély rétegeiben is megfigyeltünk néhány CTb-pozitív neuront.

Az agykérgen belül, az auditoros areák számottevő CTb-jelölt neuront tartalmaztak. Néhány CTb-tartalmú neuron volt az insularis és a medialis prefrontalis kéregben, legnagyobb számban az infralimbicus kéregben. Más agykérgi területek mentesek voltak a CTb jelölődéstől.

Kiemelkedő mennyiségű jelölt neuront detektáltunk a nucleus amygdaloideus centralis-ban, a substantia innominata-ban, a nucleus septi lateralis anterior részén. A köztiagyban, CTb-ir neuronok legnagyobb számban a nucleus ventromedialis-ban voltak jelen, főleg annak ventrolateralis szubdivíziójában (15I. ábra). Tekintélyes mennyiségű CTb-tartalmú neuront láttunk az area preoptica lateralis-ban és a zona incerta-ban.



15. ábra. Kolera toxin β -alegység beadási helyek és a retrográd jelölőanyaggal töltött sejtek eloszlása.

A-C: A bregma ponttól számított -4,80 mm-nél (A), -5,20 mm-nél és -5,64 mm-nél (C) készült sematikus ábrák (Paxinos és Watson 2005) az állatszámoknak megfelelő beadásokat ábrázolják a PIL-be és a szomszédos agyterületekre. D: A 10-es beadás esetén a CTb éppen eltalálta a TIP39 neuronokat a PIL-ben. E-I: A CTb PIL-be való injektálásának hatására CTb-pozitív neuronok jelennek meg a thoracalis és lumbalis gerincvelő hátsó szarvában (E, F), a nucleus gracilisben és cuneatusban (G), a colliculus inferior külső rétegében (H) és a nucleus ventromedialis ventrolateralis részén (I). A lépték az F ábrán 400 μ m-t, a D és I ábrán pedig 1 mm-t jelöl.

4.2. A TIP39 neuronok aktiválódásának vizsgálata anya patkányokban

4.2.1. A TIP39 immunreaktivitás intenzitásának változása

A PVG-ben gyenge immunjelölődés volt megfigyelhető a kontroll nőtényeknél, az anyaállatoknál és a kölykeiktől megfosztott anyáknál egyaránt (16A-C. ábra). Ezzel ellentétben a PIL-ben az immunjelölődés intenzitása erősebb volt a laktáló anyákban a 9. postpartum napon (16E. ábra). Nagyszámú (metszetenként több, mint 40 sejt) TIP39-ir sejttest volt látható a laktáló anyák PIL-jében (16E. ábra), miközben csak néhány (metszetenként kevesebb, mint 10 sejt) detektálható a kontroll nőtények (16D. ábra) és a kölykeiktől megfosztott anyák PIL-jében (16F. ábra).

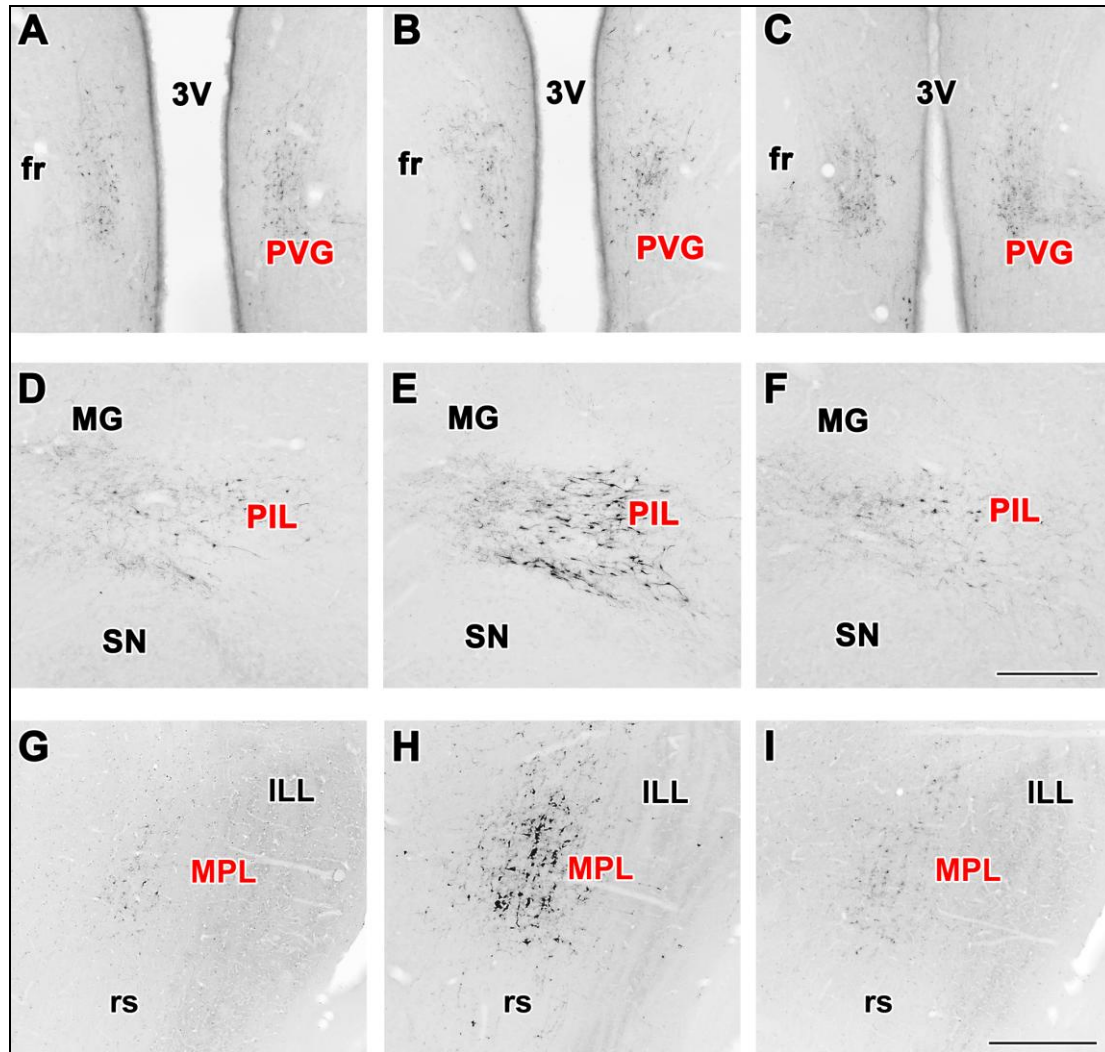
Az MPL-ben szintén megnőtt az immunjelölődés intenzitása a laktáló anyákban (16H. ábra). Nagy számban (metszetenként több, mint 30 sejt) vannak jelen a TIP39-ir sejtek az anyaállatok MPL-jében (16H. ábra), míg a kontroll nőtényeknél (16G. ábra) és a kölykeiktől megfosztott anyáknál (16I. ábra) csak kevés (metszetenként kevesebb, mint 10 sejt) figyelhető meg. Mindhárom területen megegyezik a TIP39 immunjelölt perikarionok eloszlása a TIP39 mRNS-t expresszáló neuronokkal.

4.2.2. A TIP39 mRNS eloszlásának és mennyiségének meghatározása

In situ hibridizációs hisztokémiával kimutattuk, hogy TIP39 mRNS-tartalmú neuronok vannak a fasciculus retroflexustól medialisán a posterior thalamus ventrális részén lévő PVG (17A-C. ábra) és a corpus geniculatum mediale-től ventromedialisán elhelyezkedő PIL területén (17D-F. ábra) anyaállatokban. A PIL-beli TIP39 mRNS-tartalmú neuronok a posterior intralaminar thalamicus magban, a parvicellularis (lateralis) subparafascicularis magban és a zona incerta caudalis részén helyezkednek el. Az idegsejtek lokalizációja azonos a fiatal hím és nőtény egyedekben megfigyeltekkel (Dobolyi és mtsai 2003b). A PIL-ben megfigyelhető autoradiográfiás jel intenzitása jelentősen magasabb volt a PVG-hez képest anya patkányokban (17E. ábra), míg a PVG-ben lévő TIP39 neuronok csak alacsony intenzitású szignált mutattak (17B. ábra).

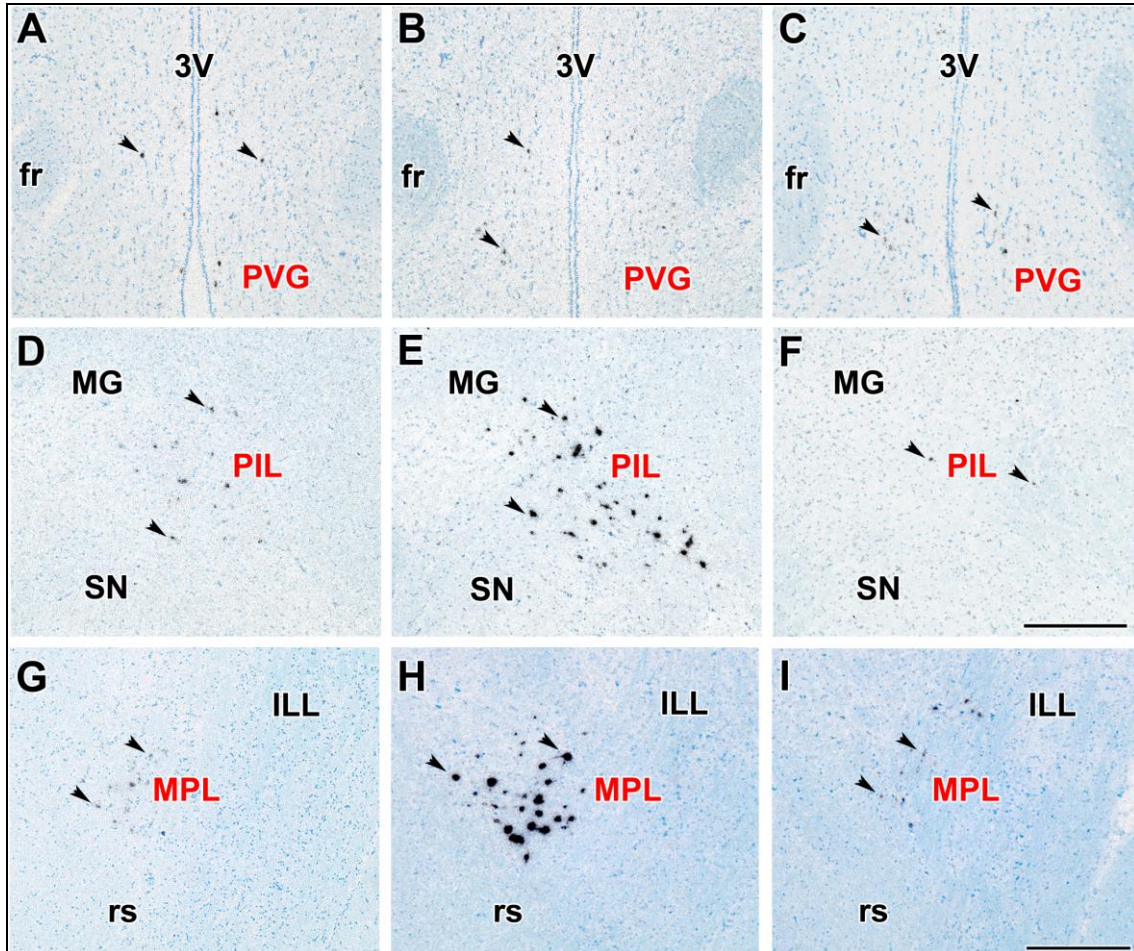
A TIP39 mRNS-tartalmú neuronok egyenletesen oszlanak el az MPL-ben (17G-I. ábra). Az MPL-en és a posterior thalamus-on kívül nem találtunk a TIP39

mRNS-nek megfelelő szignált a laktáló anyák vizsgált agyterületein (1-10 mm caudalisan a bregma szinttől). Az autoradiográfias jel intenzitása határozottan magasabb volt az anyaállatok MPL-jében (17H. ábra), mint a még nem szült nőtények (17G. ábra) és a kölykeiktől megfosztott anyák MPL-jében (17I. ábra).



16. ábra. TIP39-ir neuronok a PVG-ben, a PIL-ben és az MPL-ben

A-C: A PVG-ben az immuncitokémia TIP39-pozitív sejtek jelenlétét mutatta ki a kontroll nőtényeknél (A), a laktáló anyáknál (B) és a kölykeiktől megfosztott anyáknál (C). A relatíve gyengén festődő sejttestek elhelyezkedése egyforma mindhárom csoportban, hasonlóan a TIP39 mRNS tartalmú neuronokhoz. D-I: Ezzel ellentétben a kontroll nőtényekben a PIL és az MPL területén csak kevés gyengén immunjelölt neuron található (D, G), azonban a laktáló anyákban jelentős számú intenzíven festődő TIP39 sejttest figyelhető meg (E, H). A kölykök eltávolítása után a TIP39 immunjelölődés intenzitása a kontroll állatokban megfigyelt szintre csökken a PIL-ben és az MPL-ben (F, I). A lépték az A-F ábrákon 500 μm -t, a G-I ábrákon 400 μm -t jelöl.

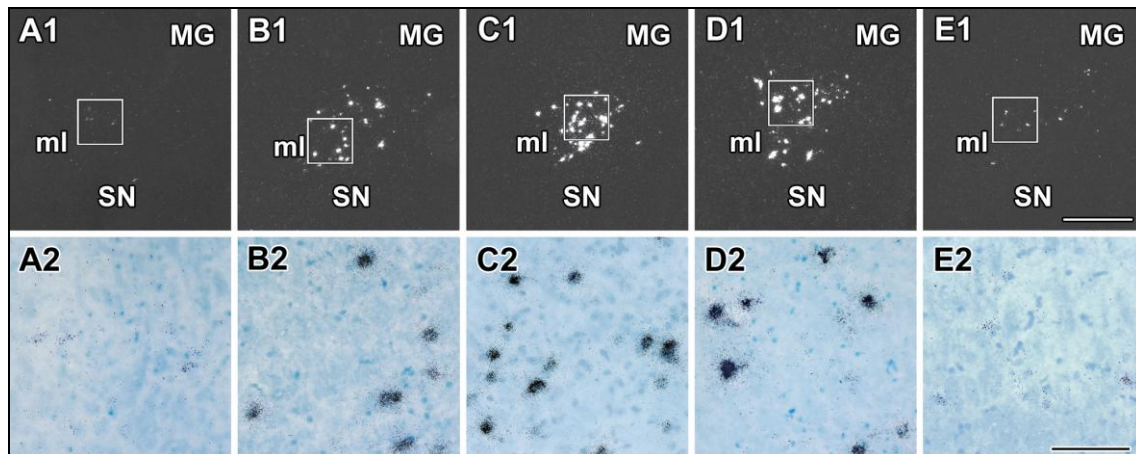


17. ábra. A TIP39 mRNS expressziója a PVG-ben (A-C), a PIL-ben (D-F) és az MPL-ben (G-H)

Az *in situ* hibridizációs metszetről készült világos látóteres fotókon a nyílhegyek jelölik az autoradiográfias jelet a TIP39-et expresszáló neuronok felett. A-C: A PVG-ben csak gyenge jel figyelhető meg a kontroll nőtények (A), a laktáló anyák (B), és a kölykeiktől megfosztott anyák (C) esetén is. D-I: A PIL-ben és az MPL-ben alacsony expressziós szinten van a TIP39 mRNS a kontroll nőtényeknél (D, G), ezzel ellentétben az anyák PIL-jében és MPL-jében (E, H) jelentősen megnő az autoradiográfias szignál intenzitása (a TIP39 mRNS szintje), miközben a kölyök eltávolítása lecsökkenti a TIP39 mRNS mennyiségét a PIL-ben és az MPL-ben, ahogy azt a kevés sötét szemcse jelenléte is jelzi (F, I). A lépték az A-F ábrákon 500 μm -t, a G-I ábrákon 400 μm -t jelöl.

Vizsgáltuk a TIP39 mRNS expressziójának időbeli változásait vemhes és anyaállatokban különböző szülés utáni napokon. *In situ* hibridizációs kísérleteinkből kiderült, hogy a TIP39 mRNS mennyisége a PIL-ben nagyon alacsony a 21. terhességi napon. Csak néhány TIP39 mRNS-t expresszáló neuront detektáltunk ebben az időben a PIL-ben (18A1. ábra) és ezek a sejtek is kevés autoradiográfias szemcsét tartalmaztak

(18A2. ábra). Ez az intenzitás megfelelt annak, amit korábban még nem szült nőtények PIL-jében kimutattunk. Szülés után szignifikáns emelkedést detektáltunk mind a TIP39 mRNS-t expresszáló neuronok számában, mind az egy neuron felett megjelenő autoradiográfiás szemcseszámban. A szülés utáni 1. napon nagyszámú TIP39 neuron jelent meg a PIL-ben (18B1. ábra) és az autoradiográfiás szignál is intenzív lett (18B2. ábra). A 9. és 23. postpartum napok között a TIP39 expresszió még magasabb szintet ér el, mint az első postpartum napon (18C, D. ábra). Így a TIP39 mRNS szintek emelkedettek maradnak végig a laktációs periódusban. A PIL-en belül a TIP39 mRNS-t expresszáló neuronok nem alkotnak kompakt sejtcsoportot, hanem relatíve egyenletesen szétszóródva találhatóak meg a PIL-ben. A TIP39 expressziós szint az alapszintre csökken az elválasztás utáni 7. napon (18E. ábra).



18. ábra. A TIP39 mRNS expresszió változásai a PIL-ben vemhesség alatt, valamint a korai és késői postpartum időszakban

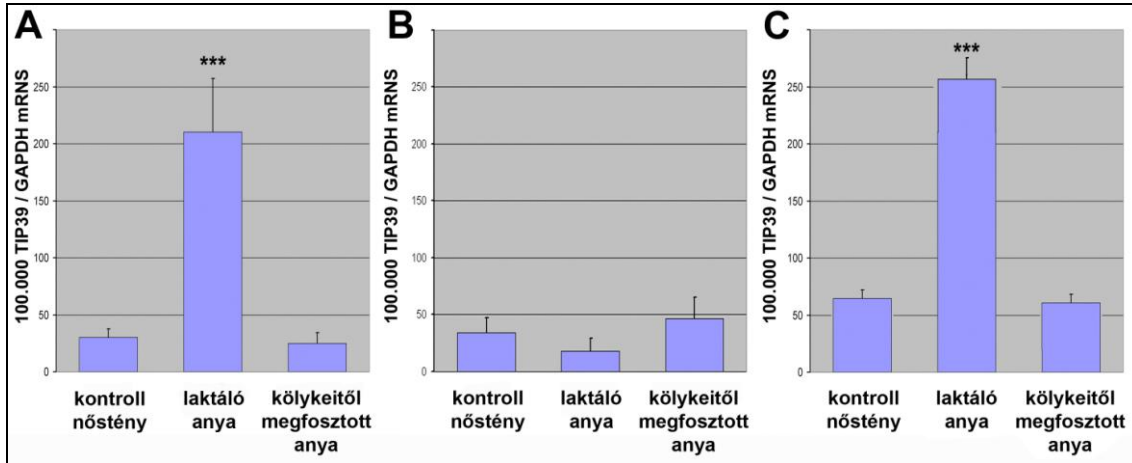
A1-E1: Koronális metszetekről készített sötét látóteres felvételek az *in situ* hibridizációs hisztokémiával a PIL-ben kimutatott TIP39 mRNS-nek megfelelő autoradiográfiás jelek a reprodukív ciklus különböző időpontjaiban. A2-E2: Az A1-E1 ábrák kerettel jelzett területei nagy nagyítású, világos látóteres felvételeken, ahol a fekete szemcseklaszterek a sejteket reprezentálják. A1,2: a vemhesség 21. napján; B1,2: 1. postpartum napon; C1,2: 9. postpartum napon; D1,2: 23. postpartum napon; E1,2: 7 nappal elválasztás után. A lépték az E1 ábrán 500 μm -t, az E2 ábrán 100 μm -t jelöl.

A laktáló anyák PIL-jében a 9. postpartum napon a TIP39 mRNS szintje 6,9-szer magasabb volt, mint az azonos korú szűz kontroll állatoknál, miközben a TIP39 mRNS szint a kontroll állatoknál mért szintre csökkent a kölykök eltávolításakor (19A. ábra).

A TIP39 mRNS szintje ($100.000 * \text{TIP39 mRNS szint/GAPDH mRNS szint}$) 30 ± 7 volt kontroll nőtényeknél, 210 ± 47 az anyaállatoknál és 25 ± 9 a kölykeiktől megfosztott anyákban. Ezek az értékek statisztikailag szignifikáns különbséget jelentenek a csoportok között. A különbség csak a TIP39 mRNS szintben mutatható ki, mivel a PIL GAPDH mRNS szintjében nem volt különbség a 3 csoport között ($4944 \pm 1871 \text{ fg}/\mu\text{l}$ kontroll nőtényeknél, $6018 \pm 1726 \text{ fg}/\mu\text{l}$ anyaállatoknál, $7894 \pm 2064 \text{ fg}/\mu\text{l}$ kölykeiktől megfosztott anyákban).

A PIL-lel ellentétben a PVG-ben nem volt szignifikáns különbség a TIP39 mRNS szintben a 3 csoport között (19B. ábra). Az itt mért értékek a következők voltak ($100.000 * \text{TIP39 mRNS szint/GAPDH mRNS szint}$): 34 ± 13 kontroll nőtényekben, 18 ± 11 anyaállatokban és 46 ± 19 a kölykeiktől megfosztott anyákban. A GAPDH szintben szintén nem volt különbség a PVG-ben a csoportok között ($6277 \pm 2323 \text{ fg}/\mu\text{l}$ kontroll nőtényeknél, $3310 \pm 919 \text{ fg}/\mu\text{l}$ anyaállatoknál, $4712 \pm 1099 \text{ fg}/\mu\text{l}$ kölykeiktől megfosztott anyáknál).

Az MPL-ben a laktáló anyáknál a TIP39 mRNS szintje 4-szer magasabb volt, mint az azonos korú még nem szült nőtényeknél. A PIL-hez hasonlóan, a TIP39 mRNS szint lecsökkent a kölyök eltávolításakor (19C. ábra). A TIP39 mRNS szintje ($100.000 * \text{TIP39 mRNS szint/GAPDH mRNS szint}$) 65 ± 7 volt kontroll nőtényeknél, 259 ± 23 az anyaállatoknál és 62 ± 11 a kölykeiktől megfosztott anyákban. A különbség itt is csak a TIP39 mRNS szintben volt kimutatható, mivel a PIL GAPDH mRNS szintjében nem volt különbség a 3 csoport között.



19. ábra. A TIP39 kvantitatív valós idejű RT-PCR –ral kimutatott szelektív indukciója a PIL-ben és az MPL-ben

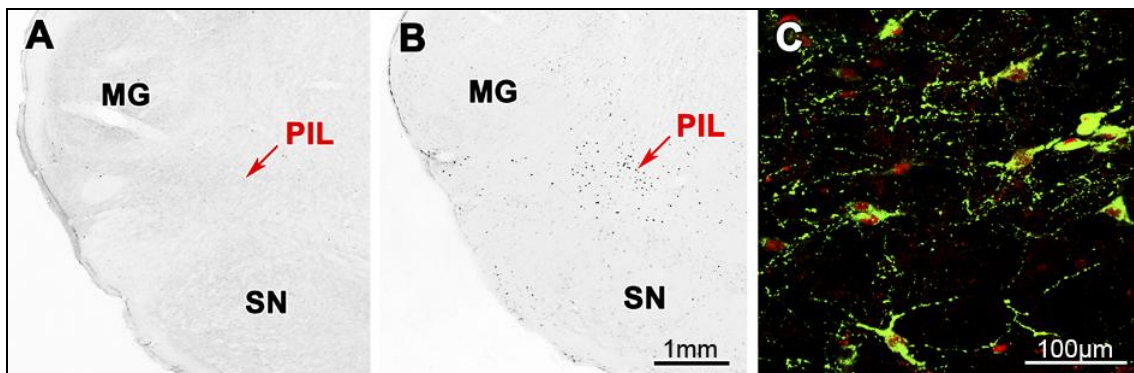
A: A PIL-ben a TIP39 mRNS szintje szignifikánsan (***) $P < 0.001$) magasabb az anyáknál ($n=8$), mint az azonos korú kontroll nőstényeknél ($n=8$) és a kölykeiktől megfosztott anyáknál ($n=8$) (ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt). Az utóbbi két csoport között nincs különbség. B: A PVG-ben nincs szignifikáns különbség a csoportok között (ANOVA). C: Az MPL-ben a TIP39 mRNS szintje ugyancsak szignifikánsan (***) $P < 0.001$) magasabb az anyáknál, mint az azonos korú kontroll nőstényeknél és a kölykeiktől megfosztott anyáknál ($n=8$ mindhárom csoportban) (ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt). Az adatokat a GAPDH mRNS mennyiségéhez viszonyítva ábrázoltuk.

4.2.3. A TIP39 sejtek neuronális aktivitásának vizsgálata Fos immunhisztokémiával

Az idegsejtek aktivitását jelző c-fos gén expressziójának immunhisztokémiai vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy Fos-ir neuronok jelennek meg számos más agyterület (nucleus septi lateralis, nucleus periventricularis anteroventralis rész, nucleus preopticus medialis, area preoptica medialis, nucleus interstitialis striae terminalis ventralis szubdivízió, substantia grisea centralis, nucleus paralemniscalis medialis) mellett a laktáló anyák PIL-jében. Amikor 20 óra szeparációt követően 2 órára az anyák visszakapják kölykeiket, a PIL-ben a szoptatás által aktivált neuronok száma szignifikánsan megemelkedik (metszetenként több, mint 50 Fos-ir sejtmag). A PIL-en belül a Fos-ir neuronok egyenletesen oszlanak el, miközben a nucleus peripeduncularis kivételével a szomszédos agyterületeken egyáltalán nem fordultak elő c-fos-t expresszáló neuronok (20B. ábra). Viszont csak kevés Fos-pozitív neuron

(metszetenként kevesebb, mint 10 Fos-ir sejtmag) detektálható azoknak az anyáknak a PIL-jében, amelyekről 22 órára eltávolítottuk kölykeiket (20A. ábra).

Laktáló anyákban a TIP39-ir neuronok száma a PIL-ben 40 ± 5 volt a véletlenszerűen kiválasztott metszeteken. A TIP39 és Fos dupla fluoreszcens immunhisztokémia megmutatta, hogy a TIP39-ir neuronok 93%-a Fos pozitív a PIL-ben (20C. ábra), mivel a Fos-pozitív TIP39 neuronok száma metszetenként 37 ± 5 volt. A fennmaradó Fos negatív TIP39-ir neuronok nem alkottak különálló sejtcsoportot, hanem inkább elszórva voltak megfigyelhetőek a PIL területén. Érdekes módon, metszetenként 27 ± 4 Fos-pozitív, de TIP39-negatív neuron szintén megfigyelhető volt a PIL-ben. A PVG területén csupán metszetenként 10 ± 4 Fos-ir sejtmag jelent meg a szoptatás hatására és egyáltalán nem találtunk Fos-pozitív TIP39 neuronokat ezen az agyterületen.

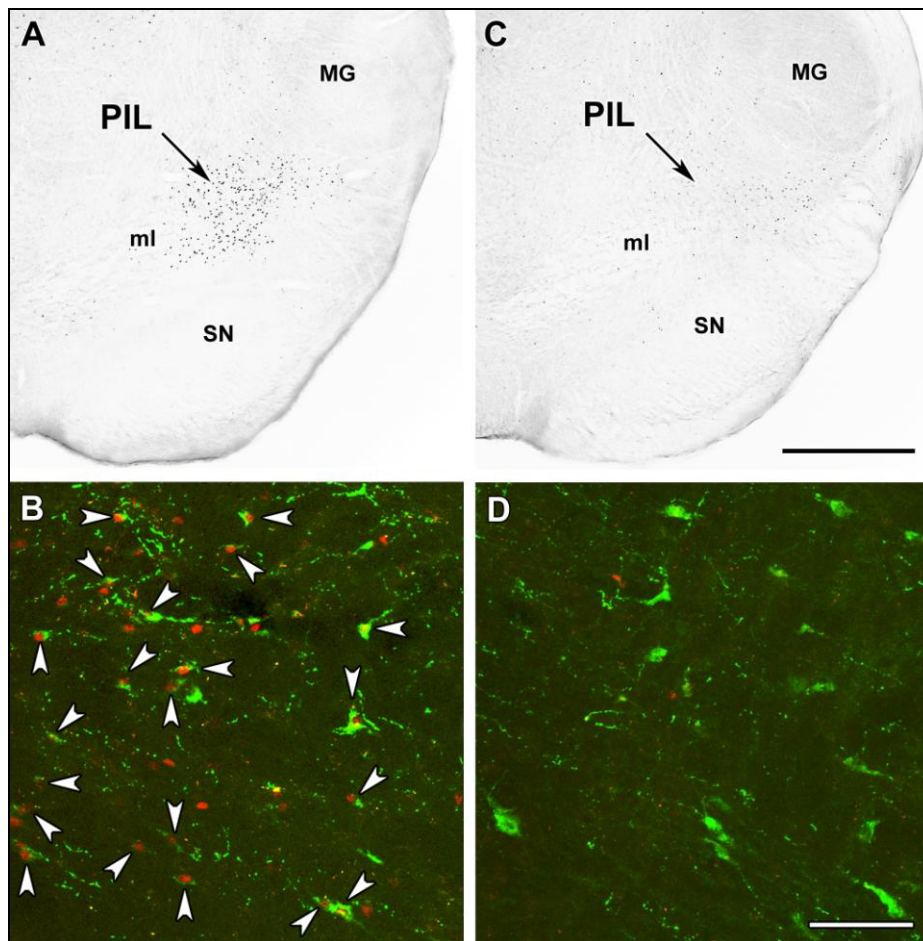


20. ábra. Fos aktiváció anyákban a PIL területén

A: A kölykök elválasztása után 22 órával csak kevés Fos-immunopozitív neuron van jelen a PIL-ben. B: 2 órával a kölykök visszaadása után a Fos-ir neuronok száma szemmel láthatóan megemelkedik a PIL-ben. C: A dupla fluoreszcens immunhisztokémia tanúsága szerint csaknem valamennyi TIP39 sejt (zölden festődő sejtestek) tartalmaz Fos-t (pirosan festődő sejtmagok) a kölykök jelenlétében.

Egy további kísérletben vizsgáltuk szenzoros (vizuális, auditoros és olfaktoros) bemenetek hatásait a PIL-beli TIP39 sejtek aktiválására és azt tapasztaltuk, hogy a metszetenkénti Fos-ir neuronok száma a PIL-ben a kölyköknek való kitettség módjától függött ($F=82,95$). A Fos-ir sejtek száma 16%-ra csökkent, amikor a kölyköket úgy adtuk vissza az anyáknak a 20 órás szeparáció után, hogy látták a kölyköket, hallották a kölykök ultrahangos sírását és érezhették a kölykök szagát, de a szoptatáshoz szükséges

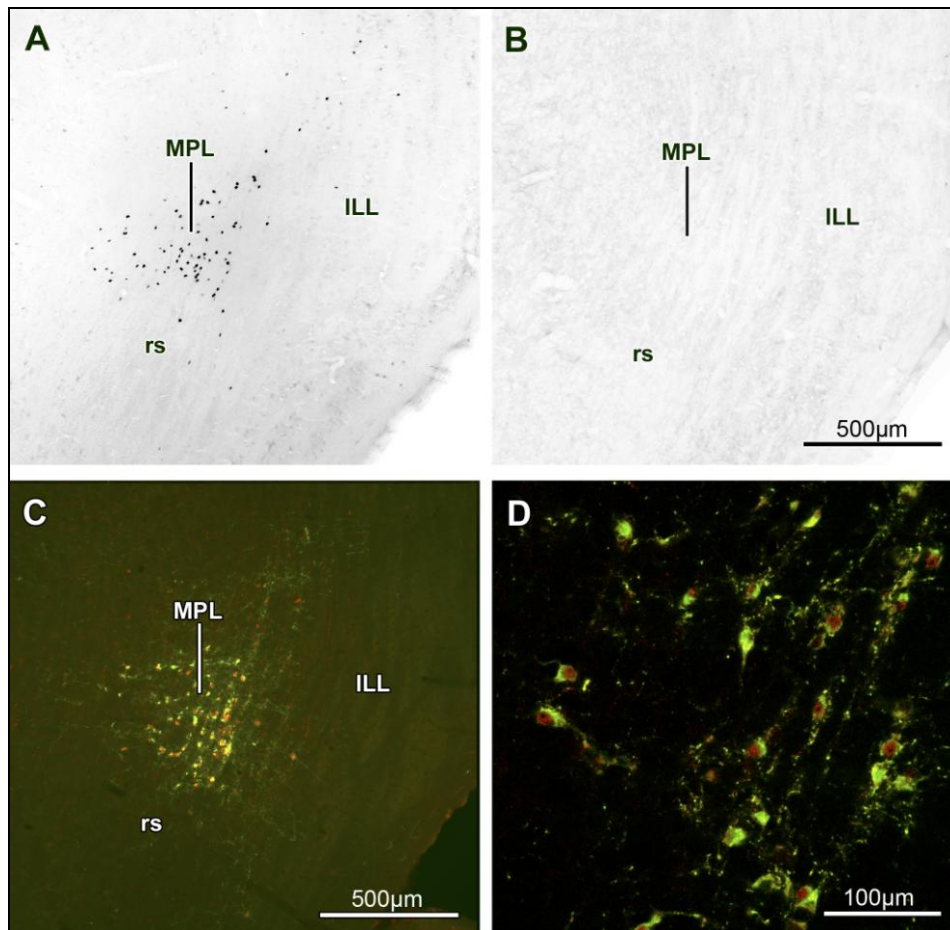
fizikai kontaktusba nem kerülhettek velük ($p < 0,001$) (21C. ábra). Miközben a TIP39 neuronok számában nincs különbség a 3 csoport között – ez átlagosan 42 ± 5 -nek adódott metszetenként –, a c-fos expresszáló TIP39 neuronok száma szignifikánsan változott a kölykök jelenlététől függően ($F=34,17$). A szoptató anyákban a duplán jelölt neuronok száma magasabb volt (35 ± 6), mint azon anyák csoportjában, amelyek hallották a kölykök ultrahangos sírását, láthatták és szagolhatták a kölykeiket, de nem kerülhettek közeli kontaktusba velük (6 ± 2 ; $p < 0,001$) (21D. ábra), miközben a duplán jelölt sejtek száma nem különbözött az utóbbi csoport és a kontroll anyák között.



21. ábra. Fos aktiváció a PIL-ben kizárólag a kölykök és az anya közvetlen kontaktusa során figyelhető meg

A: 22 óra szeparációt követő 2 órás szoptatás során a szopási inger aktiválja a TIP39 neuronokat a PIL-ben. B: A TIP39 neuronok 93%-a válik Fos pozitívvá a szoptatás alatt. B: A kölykök felől érkező egyéb szenzoros (szaglási, látási, hallási) ingerek nincsenek hatással a PIL-beli TIP39 neuronokra. D: Amikor az anyák szagolhatják, láthatják kölykeiket és hallják a kölykök ultrahangos sírását, de nem érinthetik meg őket, a c-fos nem expresszálódik a TIP39 neuronok sejtmagjában. A lépték a C ábrán 1 mm-t, a D ábrán 100 μ m-t jelöl.

A PIL-beli TIP39 neuronok anyákban megfigyelt Fos aktivációja után kíváncsiak voltunk, hogy a Fos az MPL TIP39 neuronjaiban is megjelenik-e a kölykök jelenlétében. Ezen a területen jelentős számú (metszetenként 31 ± 3) TIP39-ir sejttest volt látható az anya patkányok MPL-jében. Továbbá eredményeink szerint az MPL-beli TIP39 neuronok 91%-a mutat c-fos aktivációt a kölykökkel való kontaktus hatására. A 20 óra szeparációt követő 2 óra szoptatás hatására jelentős mennyiségű (metszetenként több, mint 30), míg 22 órás elválasztást követően csupán elenyésző mennyiségű (metszetenként kevesebb, mint 3) Fos-pozitív neuron jelenik meg az MPL-ben. Az MPL-től dorsalisán elhelyezkedő néhány sejttől eltekintve, az area paralemniscalis más részeiben nem voltak megfigyelhetőek Fos-ir sejtmagok (22. ábra).



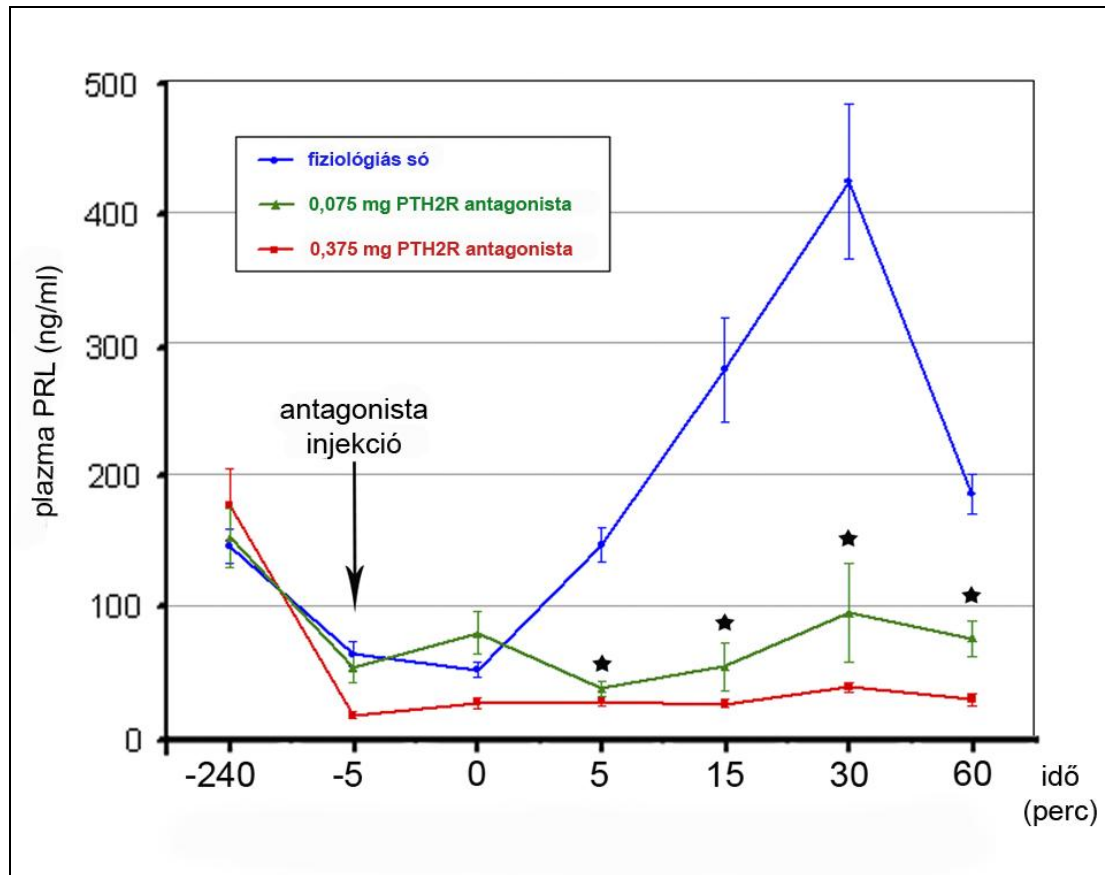
22. ábra. Fos aktiváció az MPL-ben a kölykök jelenlétében

A 20 órás szeparációt követő 2 óras szoptatás aktiválja a medialis paralemniscalis magban lévő TIP39 neuronokat (A). A 22 órára kölykeiktől megfosztott anyák MPL-jében nincsenek jelen Fos-pozitív neuronok (B). A dupla immunhisztokémiai festés láthatóvá tette, hogy a zöld TIP39-ir sejttestek és a piros Fos-ir sejtmagok átfednek (C). A konfokális felvételen látszik, hogy a TIP39 immunjelölt neuronok döntő többsége tartalmazza a Fos fehérjét a sejtmagjában (D).

4.3. Az endogén TIP39 antagonizálás hatásának vizsgálata a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra anya patkányokban

4.3.1. A PTH2 receptor antagonist (HYWH-TIP39) agykamrába való injektálásának hatása a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra

Az első három vérvételezési időpontban (-240, -5, és 0 perc) a plazma prolaktin szintek a három csoportban nem különböztek szignifikánsan egymástól. A plazma prolaktin koncentrációt a fiziológiás só (kék görbe) és a fiziológiás sóban oldott 0,075 mg HYWH-TIP39 (zöld görbe) vagy a 0,375 mg HYWH-TIP39 (piros görbe) ICV injektálása előtt (-5 perc) levett vérből is megmértük. A kontroll csoportnál a görbe meredeken emelkedik a szoptatás megkezdésével és a 30. perc körül egy csúcsot (423 ± 118 ng/ml) ér el. A kölykök anyjukhoz való visszahelyezése után 5, 15, 30 és 60 perccel a prolaktin koncentrációk a plazmában a következők voltak: 145 ± 26 ng/ml, 280 ± 79 ng/ml, 423 ± 118 ng/ml, és 185 ± 31 ng/ml a kontroll csoportban, 37 ± 13 ng/ml, 53 ± 36 ng/ml, 94 ± 76 ng/ml és 75 ± 28 ng/ml 0,075 mg HYWH-TIP39 ICV injektálása; 27 ± 8 ng/ml, 25 ± 7 ng/ml, 38 ± 8 ng/ml, és 28 ± 10 ng/ml pedig 0,375 mg HYWH-TIP39 ICV injektálása után. A 0,075 mg PTH2 receptor antagonist beinjektálása 5, 15, 30 és 60 perccel a kölykök visszaadása után mérve szignifikánsan ($P < 0,01$) lecsökkentette a szopási inger által kiváltott plazma prolaktin szintemelkedést (ANOVA, Bonferroni post hoc teszt). 0,375 mg beinjektálása pedig blokkolta a prolaktin felszabadulást (23. ábra).



23. ábra. HYWH-TIP39 hatása a szopási inger által kiváltott prolaktin felszabadulásra intracerebroventricularis beadáskor

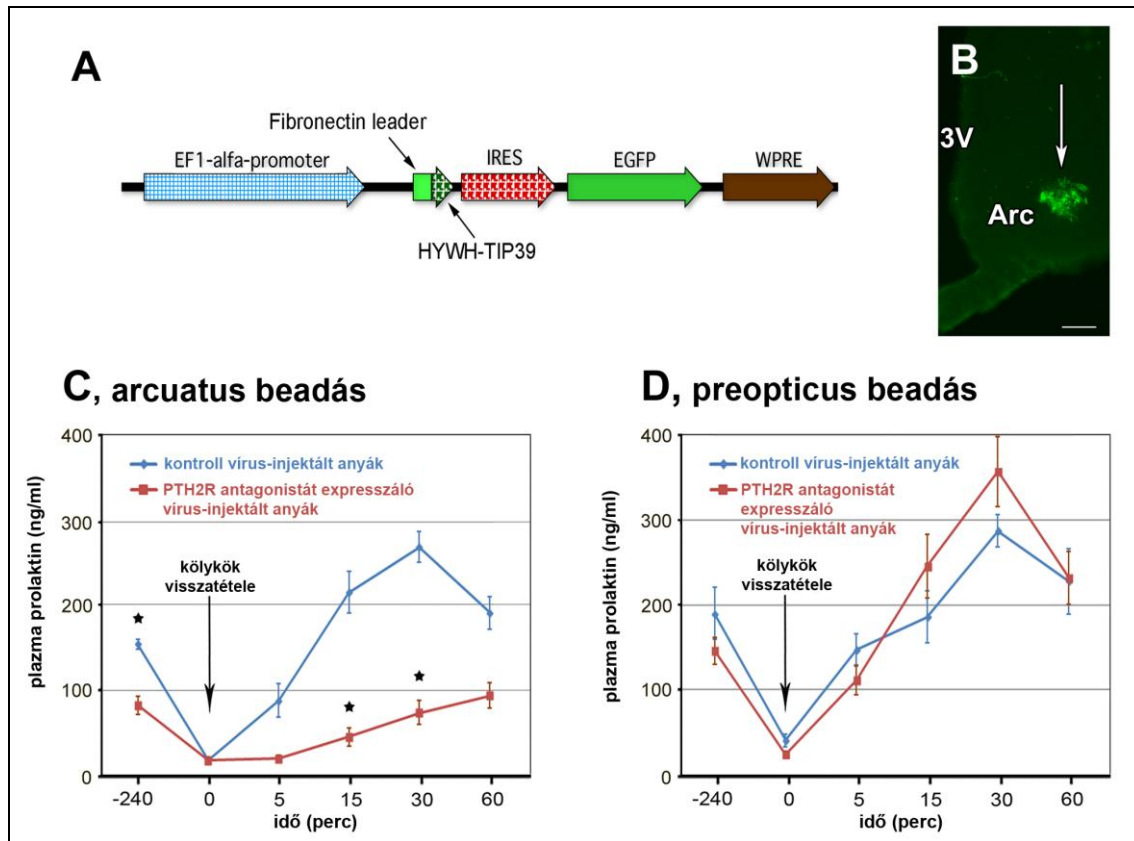
A plazma prolaktin koncentrációja a szeparációs időszak végére (0 perc) lecsökkent. Az ezt megelőző fiziológiás só, illetve a PTH2 receptor antagonist (HYWH-TIP39) két koncentrációban való (0,075 mg és 0,375 mg) beinjektálása ezt nem befolyásolta. Nulla percnél a kölykök visszakerültek anyjukhoz és elkezdtek szopni, ami a plazma prolaktin szintjének robbanásszerű emelkedését eredményezte a kontroll csoportban. Az antagonist agykamrába való injektálása azonban koncentrációfüggő módon megátolta a prolaktin koncentráció kontroll csoportban megfigyelt emelkedését. A prolaktin koncentráció emelkedés az alacsonyabb koncentrációjú PTH2 receptor antagonist injektálása után szignifikánsan lecsökkent, a magasabb koncentrációjú után pedig gyakorlatilag megszűnt.

4.3.2. A HYWH-TIP39-GFP lentivírus vektor mediobasalis hypothalamicus injektálásának hatása a szopási inger által kiváltott PRL szekréción

Már az elválasztás előtti alap prolaktin szint is szignifikánsan ($p < 0,05$) alacsonyabb a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyákban ($82,8 \pm 20,8$ ng/ml), mint a kontroll vírus-injektált anyákban ($153 \pm 11,1$ ng/ml) (24C).

ábra). Az anyák 4 órás szeparációja kölykeiktől nagyfokú esést idézett elő a plazma prolaktin szintekben ($18,1 \pm 7,9$; $18,5 \pm 7,3$ ng/ml). A szeparációs időszak végén a kölykök szopása megindítja a prolaktin szekréciót a kontroll vírus-injektált anyáknál, ami a szoptatás megkezdése utáni 15. percben 215 ± 48 ng/ml értéket, majd a 30. perc elteltével egy csúcsot ér el (267 ± 36 ng/ml). A PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák csoportjában a szopási inger által kiváltott plazmaszint emelkedés ($F=9,962$) szignifikánsan kisebb (24C. ábra). A PTH2 receptor antagonista jelenlétében a prolaktin szintek szignifikánsan alacsonyabbak, mint a kontroll csoportban (46 ± 21 ng/ml 15 perc elteltével, 74 ± 28 ng/ml 30 perccel a szoptatás megkezdése után; $p < 0,001$ mindkét vérvételezési időpontban).

Ezzel ellentétben a kétféle vírus beinjektálása a preopticus területre nem befolyásolta az alap prolaktin szintet (190 ± 61 ng/ml a kontroll vírus-injektált anyák csoportjában, 146 ± 31 ng/ml a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák csoportjában). A szopás indukált prolaktin felszabadulás szintén nem különbözött a két csoportban (24D. ábra). A prolaktin koncentráció értékek a következők voltak 15 és 30 perccel a kölykök anyjukhoz való visszatétele után: 186 ± 62 és 287 ± 77 ng/ml a kontroll vírus-injektált anyák csoportjában, és 245 ± 75 és 357 ± 83 ng/ml a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák csoportjában.



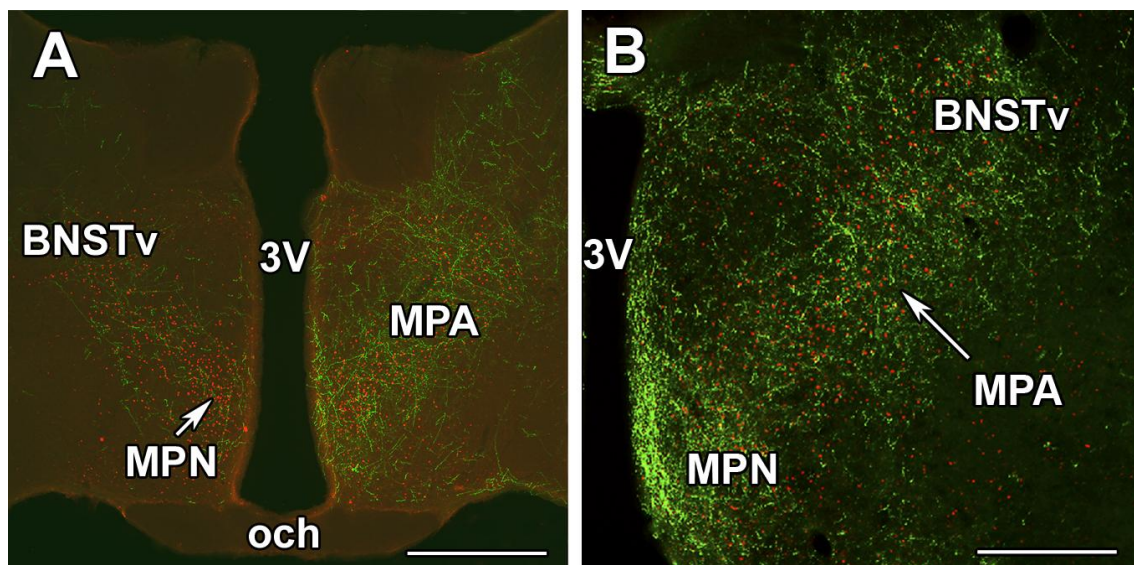
24. ábra. HYWH-TIP39 hatása a szopási inger által kiváltott prolaktin felszabadulásra az antagonistá gójét hordozó lentivírus arcuatus magba és medialis preopticus területre való injektálásakor

A: A PTH2 receptor antagonistá, HYWH-TIP39-et expresszáló virális konstrukció szerkezete. Egy erős promoter (EF1-alfa) gondoskodik a fúziós fehérje megfelelő szintű expressziójáról. A fibronectin vezető szekvencia révén szekretálódik extracellulárisan az antagonistá. Ezt követi egy belső riboszóma visszatérő hely (IRES), ami elősegíti a felerősített zöld fluoreszkáló fehérje (EGFP) átírását. B: A nyíl a vírus által megfertőzött sejteket jelöli. A sejteket a vírus által kódolt zöld fluoreszkáló fehérje alapján tettük láthatóvá. A beadás helye a nucleus arcuatus közvetlen közelében látható. C: A kontroll vírus-injektált és a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált laktáló anyákat 4 órára elválasztottuk a kölykeiktől, majd mindkét csoporthoz visszatettük a kölyköket, megengedve a szoptatást. A PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyáknál már az elválasztás előtt is szignifikánsan alacsonyabb alapértékeket mértünk, mint a kontroll vírus-injektált anyáknál. A kontroll vírus-injektált anyáknál a prolaktin szint jelentősen megemelkedik a szoptatás hatására, míg a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyáknál ilyen mértékű szintemelkedés nem figyelhető meg (*: $p < 0,01$). D: a kétféle vírus-injektált anyák szopási inger által kiváltott plazma PRL értékei egyetlen vérvételzési időpontban sem térnek el szignifikánsan egymástól a preopticus injektálás esetén. A lépték a B ábrán 100 μm -t jelöl.

4.4. Az endogén TIP39 antagonizálás hatásának vizsgálata az anyai motivációra

4.4.1. Az anyákban Fos-expressziót mutató preopticus neuronok innervációja a posterior thalamicus TIP39 neuronok által

A preopticus területhez tartozó nucleus periventricularis anteroventralis részében, a nucleus preopticus medialis-ban, az area preoptica medialis-ban, a nucleus interstitialis striae terminalis ventralis részében szoptatás hatására nagy sűrűségben jelennek meg Fos- expresszáló idegsejtek. A Fos-ir neuronok megjelenési mintázata nagyfokú hasonlóságot mutat a BDA PIL-be való beadásának következtében a preopticus területen megjelenő anterográd nyomjelző anyaggal töltött rostok (25A. ábra) és a TIP39-ir rostok és idegvégződések (25B. ábra) eloszlásával.



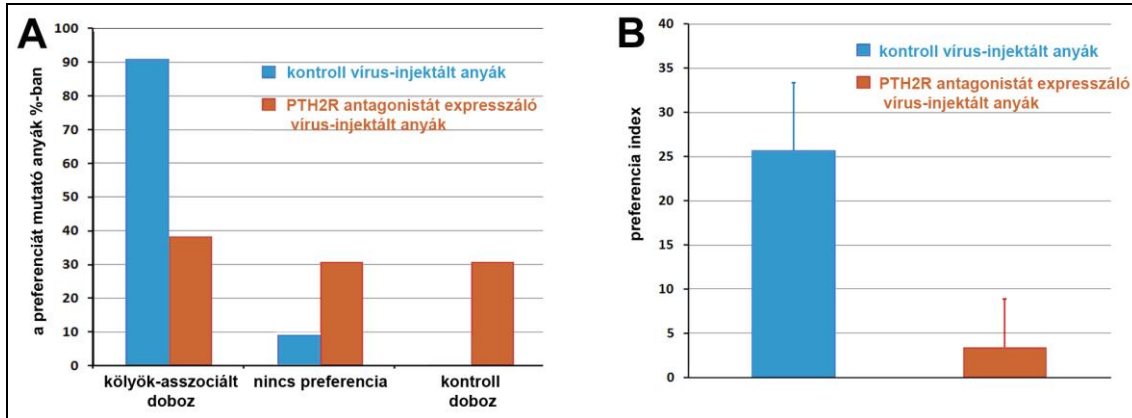
25. ábra. Az anyákban Fos-expressziót mutató neuronok és a BDA, illetve a TIP39 rostok elhelyezkedése a preopticus területen

A: Az anterográd nyomkövető anyag beadása a PIL-be BDA-tartalmú rostok (zöld) megjelenését eredményezte a nucleus preopticus medialis-ban (MPN), az area preoptica medialis-ban (MPO) és a nucleus interstitialis striae terminalis ventralis részén (BNSTv), melyek eloszlása nagyban hasonlít az anyákban ezeken a területeken megjelenő Fos-ir neuronok (piros) eloszlásához. B: A TIP39 rostok (zöld) lefutásával egyező pozícióban helyezkednek el az anyákban aktív Fos-ir idegsejtek (piros). A lépték az A ábrán 1 mm-t, a B ábrán 500 μ m-t jelöl.

4.4.2. A HYWH-TIP39-GFP lentivírus vektor medialis preopticus területre való injektálásának hatása a kondicionált helypreferencia tesztben mutatott viselkedésre anya patkányokban

A kontroll vírus-injektált anyák csoportjában az állatok 91%-a (11 állatból 10) preferálta a kölykökre emlékeztető dobozt, vagyis 20%-kal több időt töltött ebben a dobozban, mint a kontroll dobozban. Míg a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák ettől teljesen eltérő tesztkompartment preferenciát mutattak ($X^2 = 8,023$, $p < 0,05$), ebben a csoportban csupán az állatok 46%-a tartozott a kölyök-asszociált dobozt preferálók közé (13 állatból 5), miközben 4 állat a kontroll doboz iránt mutatott preferenciát (26A. ábra).

A kondicionált helypreferencia tesztben a kontroll vírus-injektált anyák nem egyenlő időt töltöttek a különböző ketrecekben ($F = 3,84$). A megfigyelési idő (60 min) 43%-át ($25,9 \pm 1,9$ min) töltötték a kölykökre emlékeztető dobozban és 26%-át ($15,7 \pm 2,1$ min) az idegen dobozban. Ezzel ellentétben, a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyáknál a ketrecekben eltöltött idő nem különbözött ($F = 0,783$). A kísérlet időtartamának 32%-át ($19,1 \pm 1,7$ min) töltötték a kölykökre emlékeztető dobozban és 30%-át ($18,1 \pm 1,3$ min) az idegen dobozban. A két csoport közötti, a preferált kompartmentben eltöltött idő tekintetében mutatkozó különbség szignifikánsnak adódott ($F = 9,83$). A PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák szignifikánsan ($p < 0,05$) kevesebb időt töltöttek kölykökre emlékeztető dobozban, mint a kontroll vírus-injektált anyák ($19,1 \pm 1,7$ min vs. $25,9 \pm 1,9$ min). A preferencia index is szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb volt a kontroll vírus-injektált anyáknál, mint a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyáknál ($25,7 \pm 7,6$ vs. $3,4 \pm 5,5$) (26B. ábra).



26. ábra. Az endogén TIP39 antagonizálás hatása az anyai motivációra

A: A kontroll vírus-injektált anyák nagy többsége a kölyök-asszociált kompartment iránt mutat preferenciát. Ezzel szemben a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák nem mutattak preferenciát a kölyökre emlékeztető doboz iránt. B: Emellett a kontroll vírus-injektált anyák szignifikánsan több időt töltöttek a kölyök-asszociált kompartmentben, mint a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák, ahogyan azt a kontroll csoport szignifikánsan magasabb preferencia indexe is mutatja.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A PIL-ben elhelyezkedő TIP39 idegsejtek topográfiai elhelyezkedése, valamint neuronális kapcsolatrendszerük anya patkányokban

A PIL, mint neuroanatómiai egység, a TIP39 neuronok jelenléte alapján definiálható. Magába foglalja a nucleus intralaminaris posterior thalami-t, a nucleus subparafascicularis parvicellularis-t és a zona incerta caudalis részét.

A kalcium-kötő fehérjéket már sikerrel használták a thalamicus magok felosztásában patkányban és egérben is (Arai és mtsai 1994, Motomura és Kosaka 2011). Winsky és munkatársai kimutatták, hogy a PIL-nek megfelelő terület tartalmaz calbindin és calretinin sejteket (Winsky és mtsai 1992), viszont parvalbumin sejteket nem. Azt is leírták, hogy az ejakuláció indukálta Fos-pozitív neuronok tartalmazzak calbindint (Coolen és mtsai 2003a). A calbindin-ir neuronok megjelenése a TIP39-ir neuronokhoz hasonlóan szintén csak a PIL területére korlátozódik, kivételt csupán a PIL-lel dorsalisán szomszédos nucleus triangularis posterior thalami képez, ahol néhány calbindin-immunreaktív neuron megtalálható, de a TIP39 neuronok hiányoznak. A calbindin immunreaktivitás eloszlása megegyezett egy korábbi tanulmányban leírttal (Rogers és Resibois 1992), de ott ugyanezt a területet mint nucleus subparafascicularis parvocellularis nevezték meg. Az általunk definiált PIL megfelel annak a posterior intralaminaris thalamicus komplexnek, amely más szerzők szerint is tartalmaz calbindin-ir idegsejteket, viszont parvalbumin-pozitív neuronokat egyáltalán nem (Cruikshank és mtsai 2001), valamint a posterior thalamus medioventralis részének, amelyet hasonló kalcium-kötő fehérje profillal jellemeztek egérben (Motomura és Kosaka 2011).

Coolen és munkatársai (Coolen és mtsai 2003a) két elkülönülő szubdivízióra osztották fel a PIL-t a neurokémiai markerek eltérő jelenléte alapján. A medialis szubdivízió galanin-immunreaktív axonokat tartalmaz, melyek a lumbosacrális gerincvelő galanin neuronjaiból erednek, míg a lateralis szubdivízió calcitonin-gén rokon peptid (CGRP)-ir neuronokat és rostokat tartalmaz. A calbindin-ir neuronok és a substance P-ir rostok mindkét szubrégióban megtalálhatóak.

A citoarchitektonikailag felosztott két szubdivízió funkcionálisan is különböző. Kimutatták, hogy a medialis szubdivízió hímekben és nőstényekben is szelektíven aktiválódik a szexuális tevékenységgel asszociációban, miközben a lateralis szubdivízió nem mutatott párzás-indukálta neuronális aktivációt. A PIL CGRP-ir része az akusztikus és nociceptív információk továbbításában vesz részt (Ledoux és mtsai 1987). A nociceptív ingerek továbbításában szerepet játszó substance P-tartalmú rostok a felső cervicalis gerincvelőből erednek és a PIL területén végződnek (Battaglia és mtsai 1992).

Mivel a TIP39 neuronok a CGRP neuronoktól medialisán, a galanin-rostokkal viszont átfedésben helyezkednek el és c-fos aktivációt mutatnak a hímek ejakulációjával asszociációban (Wang és mtsai 2006a), a korábbi felosztást alkalmazva a medialis szubdivízióba sorolhatóak be.

A PIL-ben található TIP39 neuronok kapcsolatrendszere eddig jobbra felderítetlen maradt. A PIL neuronjainak projekcióit korábbi munkákban retrográd nyomkövető anyagok használatával tipikusan egy projekcióra koncentrálnak le. Így kimutatták, hogy az area preoptica medialis (Coolen és mtsai 1998, Simerly és Swanson 1986), a nucleus paraventricularis (Campeau és Watson 2000), a nucleus arcuatus (Li és mtsai 1999, Szabo és mtsai 2010), a fundus striati (Shammah-Lagnado és mtsai 1999) és egyes amygdala magok (LeDoux és mtsai 1990, Ottersen és Ben-Ari 1979) kapnak afferens rostokat a PIL-nek megfelelő agyterületről. A dolgozatban szereplő anterográd technikát használó kísérlet anyáállatokban történt a beadási hely TIP39 sejtekhez képest történő azonosítása érdekében, mivel a TIP39 sejtek a TIP39 indukciója miatt anyákban válnak jól láthatóvá. Eredménye konzisztens azzal a korábbi léziós tanulmánnyal, melyben feltételezik a PIL TIP39 neuronjaiból eredő hypothalamicus projekciók létét (Dobolyi és mtsai 2003a). Habár az ezelőtt leközölt megfigyelések nem laktáló anyákban történtek, az előző adatok megerősítése azt sugallja, hogy a PIL idegsejtjeinek topográfiája és kapcsolatai nem változnak a reproduktív ciklus stádiumaitól függően. Ráadásul, a retrográd nyomkövető anyag felhasználásával történt beadásaink nemcsak alátámasztották a PIL projekciós kapcsolatát az area preoptica medialis-sal és a nucleus arcuatus-sal, hanem azt is demonstrálták, hogy a posterior thalamuson belül a retrográdan jelölt neuronok megjelenése kizárólag a PIL területére korlátozódik, illetve ezek egyenletesen oszlanak el a PIL-en belül. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a PIL egy topográfiai egység, még akkor is, ha nem felel meg

egyértelműen egy citoarchitektonikailag definiált magnak, valamint azt is, hogy a TIP39 neuronok csak egy részét képezik a PIL-ben lévő projekciós neuronoknak, emellett a PIL-ben elhelyezkedő TIP39-negatív neuronok szintén vetülnek az area preoptica medialis-ba és a nucleus arcuatus-ba.

Retrográd neuronális tracer PIL-be való juttatásával bizonyítottuk, hogy a PIL direkt és indirekt felszálló projekciót is kap a nucleus gracilis-en és a nucleus cuneatus-on keresztül az ellenkező oldali gerincvelőből. A direkt projekció a gerincvelő számos thoracalis és lumbalis szegmentumából ered, többnyire azokból a neuronokból, amelyek a gerincvelő hátsó szarvának mélyebb rétegeiben foglalnak helyet. További bejövő információ érkezik ide az auditoros kéregből és a nem tonotopikusan organizált auditoros magnak számító colliculus inferior külső rétegéből, ahogyan azt korábban is feltételezték (Herbert és mtsai 1991, Zhou és Shore 2006). Emellett a PIL a hypothalamicus és a limbikus rendszerhez tartozó magok felől is kap bemenetet.

A PIL afferens kapcsolatainak fent leírt mintázata megegyezik azzal, amit a hím patkányok nucleus subparafascicularis parvicellularis neuronális bemeneteiről korábban ismertettek (Coolen és mtsai 2003b). Leírták, hogy ezen a területen Fos expresszálódik ejakuláció hatására és az aktiválódott neuronok kapnak genitoszenzoros információt szállító spinothalamicus projekciót (Coolen és mtsai 2004, Coolen és mtsai 2003b). Ezenkívül több kutatócsoport is igazolta, hogy a PIL-nek megfelelő terület kap direkt és indirekt bemenetet a lumbosacralis gerincvelőből (Ju és mtsai 1987, Ledoux és mtsai 1987, Nahin 1988). LeDoux és munkatársai (Ledoux és mtsai 1987) megmutatták, hogy az ejakuláció hatására aktiválódott Fos- és calbindin-pozitív neuronokat a PIL-ben kosárszerűen körülveszik a lumbosacralis gerincvelőből jövő galanin-ir axonok, amelyek olyan gerincvelői galanin neuronokból erednek, amelyek maguk is aktiválódnak az ejakuláció következtében. Kimutatták továbbá, hogy a Fos ejakuláció hatására a PIL-en belül a TIP39 neuronokban is megjelenik (Wang és mtsai 2006a), ez valószínűsíti, hogy ezek az idegsejtek kaphatnak gerincvelői bemenetet.

Elektromos mikrostimulációkat és léziós technikákat használva megállapították, hogy a szopási reflex felszálló ága a mesencephalic lateral tegmentum corpus geniculatum mediale ventromedialisán eső részén halad keresztül a hypothalamus felé (Tasker és mtsai 1986, Tindal és Knaggs 1971, 1977), éppen ott, ahol a TIP39 neuronok is megtalálhatóak. Az itt lévő relé neuronok iboténsav lokális injekciójával való

elpusztítása meggátolta a hímek ejakulációját, valamint a tejkilövellési reflexet (Hansen és Kohler 1984).

A PIL léziója a TIP39 rostok denzitásának csökkenését eredményezte a hypothalamus több magjában, míg a septalis és limbikus kérgi TIP39 rostok csak a PVG irtásával tűntek el (Dobolyi és mtsai 2003a). A fejlődő agyban a TIP39 rostok a decussatio supraopticusban már megtalálhatóak (Dobolyi és mtsai 2006b) és PIL-beli eredési helyükig visszavezethetőek (Brenner és mtsai 2008). A decussatio supraopticus egyoldali átvágása anyákban a TIP39 rostok eltűnésével jár a hypothalamicus para-, periventricularis és arcuatus magokból, ami arra utal, hogy ezek a rostok és rostvégződés a PIL-ből származnak. Különböző hypothalamicus transzekciók, amelyek minden valószínűség szerint érintik a felszálló TIP39 axonokat is, megakadályozzák a szopási inger által kiváltott prolaktin felszabadulást (Bodnar és mtsai 2002).

5.2. A TIP39 neuronok aktiválódása anya patkányokban

A TIP39 neuronok aktiválódását a PIL-ben és az MPL-ben *in situ* hibridizációs hisztokémiával vizsgáltuk anya patkányokban és egy másik független módszerrel, RT-PCR-rel is megerősítettük eredményeinket. Az anyákban megfigyelt TIP39-immunjelölt idegsejtek megemelkedett száma a PIL-ben és az MPL-ben, arra utal, hogy a nagyobb TIP39 mRNS expresszió emelkedett szintű peptidszintézist is eredményez. A laktáló anyákban vizsgált TIP39 neuronok eloszlása megegyezik a fiatal állatokban korábban leírt eloszlással (Dobolyi és mtsai 2003a, Dobolyi és mtsai 2006b), ami arra utal, hogy a laktáció időszakában a neuropeptid ugyanazokban a neuronokban jelenik meg újra, amelyekben az egyedfejlődés korábbi szakaszában is jelen volt.

In situ hibridizációs kísérleteinkből nyert eredményeink alapján tudjuk, hogy a TIP39 aktiválódása a PIL-ben a terhesség alatt még nem következik be. A szülés utáni első napon kezd a TIP39 mRNS szint növekedni és az expresszió a laktáció végéig magas szinten marad.

A két posterior thalamicus TIP39 sejtcsoportot összehasonlítva elmondhatjuk, hogy a PIL-ben indukálódik a TIP39 expresszió anyákban, a PVG-ben viszont nem figyelhető meg ez a változás. Bár a PIL-ből előbb eltűnik a TIP39 az egyedfejlődés

során, mint a PVG-ből (Brenner és mtsai 2008), felnőtt állatokban mindkét régióban jelentősen redukálódik a peptidszint. Mivel vannak olyan agyterületek (nucleus septi lateralis, medialis prefrontalis cortex), amelyek kizárólag a PVG-ből kapnak TIP39 rostokat (Dobolyi és mtsai 2003b, Wang és mtsai 2006b) és PTH2 receptort is magas koncentrációban tartalmaznak (Dobolyi és mtsai 2006a), feltételezhető, hogy a PVG-beli TIP39 idegsejtek is aktiválódhatnak valamilyen eddig azonosítatlan fiziológiás hatásra.

A paralemniscalis TIP39 neuronok aktivációjának időbeli mintázata a laktáció során megegyezik a posterior intralaminaris thalamicus TIP39 sejtcsoportéval. Bár indukciós mintázatuk azonos, a két TIP39 sejtcsoport két független sejtmaghoz tartozik, amelyek 3 mm-re vannak egymástól és citoarchitektonikailag (Dobolyi és mtsai 2010), valamint afferens neuronális kapcsolataik tekintetében is különböznek egymástól (Coolen és mtsai 2003b, Varga és mtsai 2008).

A Fos, mint korai transzkripciós faktor gén, az adott körülmények között aktiválódott sejtekben mutatható ki (Morgan és Curran 1991). Szoptatás hatására megjelenik a PIL-ben és az MPL-ben lévő TIP39 sejtekben, ami arra utal, hogy ezek a sejtek megemelkedett aktivitással válaszolnak erre az ingerre. Ez az eredményünk megerősíti azt a korábbi tanulmányt, amelyben leírják, hogy a Fos jelen van a PIL-nek és az MPL-nek megfelelő területen szoptató anyaállatokban (Li és mtsai 1999b, Lin és mtsai 1998). Továbbá ez a felfedezés is alátámasztja, hogy anyáknál a TIP39 a szoptási ingerre indukálódik a PIL-ben és az MPL-ben. Az igen kevés Fos-pozitív, de TIP39 immunnegatív neuron jelenléte arra utal, hogy más sejtípusok valószínűleg nem aktiválódnak a szoptatás hatására a PIL-ben és az MPL-ben.

A kölyköknek való kitettség valójában egy komplex stimulust jelent az anyáknak. Teoretikusan, a kölykök felől érkező olfaktoros, szomatoszenzoros, vizuális és auditoros bemenetek egyaránt aktiválhatják a TIP39 neuronokat a PIL-ben és az MPL-ben, megemelve neuronális aktivációs szintjüket. A legdominánsabb stimulus az anyák számára mégiscsak a kölykök szopása, amely számos anyai adaptáció kiváltásában közreműködik (Russell és mtsai 2001). Korábbi kutatások beszámoltak arról, hogy a kölykök által közvetített exteroceptív szenzoros ingerek szoptatás nélkül nem váltják ki a Fos expressziót az MPL-ben (Li és mtsai 1999b). A hallási ingerek azonban részt vehetnek az MPL-beli TIP39 neuronok aktiválásában, hiszen az MPL

masszív bemenetet kap az auditoros kéregből, a colliculus inferior-ból és a periolivaris területről (Varga és mtsai 2008).

A szakirodalomban leírták, hogy a szopási reflexen kívül olfaktoros, auditoros és vizuális ingerek, illetve a kölykök jelenlétéhez kapcsolható hormonális változások is indukálhatnak prolaktin felszabadulást (Hashimoto és mtsai 2001, Terkel és mtsai 1979). Munkánkban megvizsgáltuk, hogy a PIL-beli TIP39 sejtek aktivitása milyen tényezőktől függhet. Az aktiváló stimulusra vonatkozóan azt a megállapítást tettük, hogy a szaglási, hallási és látási ingerek nem váltanak ki Fos expressziót a PIL-beli TIP39 neuronokban, kizárólag a szopási inger aktiválja a TIP39 neuronokat a PIL-ben. Lehetséges viszont, hogy a peripartum időszak hormonális eseményei váltják ki az aktivációt, a kölyköknek való kitettség pedig csak fenntartja az emelkedett aktivációs szintet.

5.3. Az endogén TIP39 antagonizálás hatásának vizsgálata a szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra anya patkányokban

A szoptatás időszakában fontos szerepet játszó hypophysis hormonok (mint a PRL és az oxitocin) ürítésének szabályozásában a hypothalamicus és az agytörzsi struktúrák jelentőségére már számos vizsgálat rávilágított (Neville 2006). Feltételezik, hogy az emlőbimbó mechanoreceptoraitól az ingerület a gerincvelő, majd az agytörzs pályáin át jut el a hypothalamusig, viszont az üzenet továbbításában részt vevő idegi struktúrák pontos lefutását és természetét korábban nem térképezték fel (Neill és Nagy 1994).

Az általánosan elfogadott metódus alapján terveztük meg kísérletünket, mely szerint a kölykök 4 órás elválasztása az anyjuktól az anya plazmájában mérhető prolaktin drasztikus esését eredményezi, amely a szoptatás beindulásakor percekben belül megemelkedik és körülbelül 30 perc elteltével egy csúcsot ér el (Bodnar és mtsai 2004). Fiziológiás sóoldat lateralis agykamrába való injektálásakor a várt görbét kapjuk, mely megfelel a fent leírt prolaktin szintváltozásoknak. A PTH2 receptor antagonistá injektálása viszont blokkolta a kontroll állatokban megfigyelt prolaktinszint drámai megemelkedését a vérplazmában. Az általunk alkalmazott speciális PTH2 receptor antagonistá (HYWH-TIP39) szelektíven köt a TIP39 receptorához, amely bőségesen

megtalálható a kamrát határoló periventricularis, paraventricularis és arcuatus magokban (Faber és mtsai 2007, Wang és mtsai 2006b). Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy a HYWH-TIP39 a PTH2 receptoron keresztül hatva fejt ki gátló hatását a szopási inger által kiváltott prolaktin felszabadulásra. A TIP39 közvetlen hatása nem valószínű a dopaminerg neuronokon, mivel nem találtak PTH2 receptorokat a tirozin-hidroxiláz (TH) sejteken a periventricularis és arcuatus magokban (Dobolyi és mtsai 2006a, Faber és mtsai 2007). Biotinilált dextrans amin PIL-be való injektálása következtében a mediobasalis hypothalamusban megjelenő BDA rostok és az itt lévő TH neuronok között nem figyeltek meg közeli kontaktust (Szabo és mtsai 2010). A HYWH-TIP39 olyan interneuronokon hathat, amelyek expresszálják a PTH2 receptort és beidegzik a dopaminerg neuronokat. A TIP39 a PTH2 receptorra hatva emeli a cAMP és Ca^{2+} szinteket (Goold és mtsai 2001), ez a mechanizmus serkentő hatást feltételez a neuropeptidnek, így a TIP39 a dopaminerg neuronokat gátló neuronokon keresztül befolyásolhatja. Ilyen jelöltek a dinorfin-tartalmú neuronok az arcuatus magban, mivel ezek beidegzik a TIDA neuronokat (Fitzsimmons és mtsai 1992) és innerválják őket a PIL-ből jövő BDA-rostok (Szabo és mtsai 2010). Korábban leírták, hogy az endogén opioid peptidok a tirozin-hidroxiláz aktivitás gátlásával vesznek részt a szopási inger által kiváltott prolaktin felszabadulás szabályozásában (Arbogast és Voogt 1998, Callahan és mtsai 2000, Tavakoli-Nezhad és Arbogast 2010). Elképzelhető azonban az is, hogy a TIP39 közvetlenül vagy közvetve a prolaktin elválasztást serkentő faktorokat tartalmazó neuronok stimulálásával vált ki prolaktin felszabadulást (Andrews 2005, Freeman és mtsai 2000). Ilyen jelöltek a PVN parvicelluláris részében elhelyezkedő thyrotropin-releasing hormont termelő sejtek (Lyons és mtsai 2010, Yamada és mtsai 2006).

Az általunk használt lentivírus vektor képes termelni, az általa megfertőzött sejtek pedig konstitutívan szekretálni a PTH2 receptor antagonistá hatású HYWH-TIP39-et (Kuo és Usdin 2007). A vírus mediobasalis hypothalamusba való injektálása lecsökkentette az alap prolaktin szintet és gátolta a szopás-indukálta plazma prolaktin szintemelkedést. Az extracelluláris térbe szekretált antagonistá képes bizonyos távolságra diffundálva elérni a PTH2 receptorokat és hozzájuk kötődve blokkolja az intracelluláris szignalizációs útvonalát.

A vírus hetekkel a kísérlet előtti bejuttatása az agyba azzal az előnnyel jár, hogy így a vérvétel előtt nem manipuláljuk az állatot, viszont a gátló hatás még így is érvényesül. Az alacsony alap prolaktin szint magyarázható az antagonistá virális expressziót követő állandó jelenlétével. Az is fontos tényező, hogy a beinjektált vírus mennyiségét úgy választottuk meg, hogy csak részleges gátlást idézzon elő, máskülönben a kölykök biztosan nem tudtak volna túlélni. A PTH2 receptor antagonistá jelenlétében megfigyelt csökkent prolaktin elválasztás a prolaktin felszabadulás regulációjában fiziológias szerepet tulajdonít az endogén TIP39-nek. TIP39 rostok és idegvégződésesek bőségesen beidegzik a mediobasalis hypothalamust, különösen nagy mennyiségben találhatóak meg a nucleus arcuatus-ban, a nucleus periventricularis-ban és a nucleus paraventricularis-ban (Dobolyi és mtsai 2003b). Ezek a TIP39-tartalmú axonterminálisok a forrásai annak az endogén TIP39-nek, amely befolyásolja a prolaktin felszabadulást. Megalapozott okunk van azt hinni, hogy ezek a rostok a PIL-ből erednek, ahogyan a PIL-be injektált anterográdn neuronális tracer megjelent a nucleus arcuatus-ban és *vica versa* a nucleus arcuatus-ba beadott retrográdn nyomjelző anyag megjelölte a PIL TIP39 neuronjait. A laktáció alatti a TIP39 iránt jelentkező megemelkedett igényt a TIP39 mRNS expressziójának emelkedése fedezi a PIL-ben. A TIP39 laktáció időszakában betöltött specifikus hatásai összhangban vannak azzal, hogy a TIP39 mRNA szint a terhesség végéig nem emelkedik meg és a bazális értékre tér vissza a kölykök eltávolításakor. A TIP39-PTH2 receptor neuromodulátor rendszer fiziológias jelentősége a laktáció idején megerősítést nyert transzgen egerekben is: a PTH2 receptor KO egerek kölykei kisebb testtömegűek, mint a vad típusú anyák kölykei (Coutellier és mtsai 2011).

A TIP39 receptorán ható, a későbbiekben kifejlesztendő gyógyszerek hozzájárulhatnak a normális tejtermelés beindulásához, vagy megakadályozhatják az anyák 10-15%-ánál jelentkező szülés utáni depresszió kialakulását. A jelenleg elérhető farmakológiai tejtermelést fokozó szerek (Domperidone, Metoclopramide) mind dopamin antagonisták (Lawrence és Lawrence 2005), ezért mellékhatásaik a teljes dopamin rendszer érintettsége miatt széleskörűek (depresszió, szorongás, motoros nyugtalanság, dystoniás mozgászavarok, extrapyramidális szimptomák) (Bunik és mtsai 2011). Ezért a PTH2 receptoron ható molekulák fejlesztése potenciálisan kisebb mellékhatású laktációt elősegítő szereket eredményezhet.

5.4. Az endogén TIP39 antagonizálás hatása az anyai motivációra

A célvezérelt magatartások kivitelezésének háttérben álló motivációs folyamatokat egy összetett neuronális hálózat vezérli, amelynek fő elemei: az orbitofrontalis és medialis prefrontalis kéreg, a nucleus amygdaloideus basolateralis magcsoportja, a hippocampus, a nucleus accumbens és ennek bemenetei az area tegmentalis ventralisból. A nucleus accumbens konvergens serkentő kapcsolatot tart fenn az összes fent említett kortikális és szubkortikális struktúrával (Brog és mtsai 1993, Groenewegen és mtsai 1999, Wright és mtsai 1996, Zahm és Brog 1992). A postpartum időszakban további agyrégiók csatlakoznak a hálózatba, amelyek közül a legfontosabb a medialis preopticus terület (Arrati és mtsai 2006, Numan 2006, Pereira és Morrell 2011). Az MPO|A kapcsolatban áll az area tegmentalis ventralis-sal, a nucleus accumbens-sel és a medialis prefrontalis kéreggel (Kocsis és mtsai 2003, Numan és mtsai 2005, Saper 2000), ami lehetővé teszi, hogy az MPO|A a kölykök felől érkező szenzoros modalitások függvényében hatást gyakoroljon a motivációs neuronális körre, hogy az anya figyelmét a kölykök irányába terelje.

Az MPO|A az egyetlen olyan agyterület, ahol kimagaslóan megemelkedik a c-Fos immunreaktivitás, amikor CPP tesztben az anyák a kölyök-asszociált kompartmentet választják a kokain-asszociálttal szemben (Mattson és Morrell 2005). Ezenkívül emelkedett c-fos expressziót találtak az infralimbikus és anterior cingularis kéregben és a nucleus amygdaloideus basolateralisban, illetve emelkedett CART (kokain- és amfetamin-regulált transzkript; a c-fos-hoz hasonlóan a neuronális aktivitást jelzi) expressziót a nucleus accumbens-ben azoknál az anyáknál, amelyek a kölyök-asszociált környezetet preferálták (Mattson és Morrell 2005). Ez a CPP teszt során megfigyelt c-fos aktivitás-mintázat az MPO|A-ban topografikusan megfelel annak, amit megfigyeltek az anyák medialis preopticus területén a kölykökkel való interakció során (Fleming és mtsai 1994a, Lonstein és De Vries 2000, Lonstein és mtsai 1998). Ezek az eredmények konzisztensek azokkal a funkcionális mágneses rezonancia vizsgálatokkal, amelyek erőteljes aktivációt mutatnak mezokortikolimbikus struktúrákban anya patkányokban a kölyköktől érkező szenzoros stimulációra adott válaszul (Febo 2011, Ferris és mtsai 2005).

Pereira és Morell bupivacaine hydrochloride-ot (lokális anesztetikum, amely a feszültségfüggő nátriumcsatornákat blokkolja) injektáltak az anyák medialis preopticus területére. Az MPO|A funkcionális inaktiválása alapvetően befolyásolta az anyák választását a kölyök-asszociált és kokain-asszociált tesztkompartmentek között a korai postpartum időszakban. Az anyák ekkor a kokain-asszociált tesztkompartmentet preferálták a kölyök-asszociálttal szemben (Pereira és Morrell 2011). Úgy tűnik, hogy az MPO|A funkcionális integritása feltétlenül szükséges a kontextus-indukált kölyökkereső magatartáshoz. Az MPO|A a korai postpartum időszakban segíti az anyai magatartást ösztönző motivációs folyamatok előtérbe kerülését. Lee és munkatársai kimutatták, hogy az MPO|A lézióját követően a korai postpartum anyák szignifikánsan kevesebbszer nyomták le azt a kart, amely lenyomásakor a kölyökhöz való hozzáférésüket tette lehetővé (Lee és mtsai 2000).

Kísérleteinkkel nemcsak megerősítettük az area preoptica medialis létfontosságú szerepét az anyai motiváció organizációjában, de bizonyítást nyert a TIP39/PTH2 receptor neuromodulátor rendszer részvétele is a folyamatban. Kimutattuk, hogy a PIL-beli TIP39 neuronok axonjainak és axonvégződéseinek lefutása a preopticus területen feltűnően hasonló elrendezésű, mint a kölyköknek való kitettség hatására az anyákban a Fos-t expresszáló neuronok megjelenése a nucleus preoptica medialis és az area praeoptica medialis területén, valamint a nucleus interstitialis striae terminalis ventralis részén. Ennél is fontosabb, hogy a PTH2 receptor antagonistá hatására lecsökkent azoknak az anyáknak a száma, amelyek a CPP tesztben a kölyök-asszociált kompartmentet preferálták és az az idő is, amelyet az anyák a kölyök-asszociált kompartmentben töltöttek.

A kondicionált helypreferencia teszt különösen szenzitív módon méri az anyák motivációját, így az egyébként közel egyformán viselkedő anyák között is képes különbséget kimutatni (Mattson és mtsai 2003). Kísérletünkben az anyák két csoportjának (PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák, kontroll vírus-injektált anyák) egy kölyök-asszociált és egy semleges, specifikus kondicionált stimulushoz nem köthető környezet között kellett választania. A PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák esetében a megfertőzött MPO|A sejtek által termelt HYWH-TIP39-nek (amely az MPO|A neuronjain jelenlévő PTH2 receptoron hatni képes) hasonló hatása volt a bupivacaine hydrochloride-hoz (Pereira és

Morrell 2011). Ezek az anyák szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a kölyök-asszociált ketrecben, mint a kontroll vírus-injektált anyák, nem mutattak preferenciát a kölykökre emlékeztető környezet iránt. A HYWH-TIP39 tehát érintette az MPO|A azon funkcióját, hogy a célvezérelt magatartásokat a kölykök felé fordítsa. A PIL-beli TIP39 neuronoknak (melyek bőségesen innerválják a MPO|A neuronjait) egyik szerepe lehet, hogy a kölykök felől érkező szenzoros szignálokat továbbítsák az MPO|A felé, amely más motivációs központokra hatva, a bejövő információk alapján a motivációs irányultságot a kölykök irányába tereli. Fontos azt is megjegyezni, hogy a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus preopticus injektálása nem volt hatással a plazma prolaktin szintjére, így kizárható a prolaktin ismert anyai magatartást befolyásoló indirekt hatása (Larsen és Grattan 2012).

A PTH2 receptor antagonista expresszióját követő csökkent kölyök-asszociált kompartment preferencia arra utal, hogy az endogén TIP39-nek is lehet szerepe az anyai motiváció kontrolljában. A medialis preopticus területen elhelyezkedő Fos-expresszáló neuronokat körülvevő TIP39-tartalmú terminálisok a potenciális endogén forrásai az anyai motivációt befolyásoló TIP39-nek. Előzetesen azt is kimutattuk, hogy a PTH2 receptorok jelen vannak a preopticus területen és eloszlásuk nagyon hasonló a TIP39 rostok ezen a területen megfigyelt lefutásához (Dobolyi 2011, Faber és mtsai 2007). Retrográd és anterográd neuronális nyomkövető anyagok felhasználásával erős bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy ezek a TIP39-tartalmú axonok a PIL-ből származnak. A TIP39 mRNS expresszió növekedés időzítetttsége az első postpartum napon felveti, hogy a TIP39-nek sokkal inkább a kölykök felé irányuló magas motivációs szint fenntartásában, mintsem indukciójában van szerepe. Valójában a szexuáliszteroidokról ismert, hogy a szagló bemenet gátlásának csökkentésével befolyásolják a motivációs irányultságot (Numan és Insel 2003). A szoptatási aktus és a közvetlen kontaktus a kölykökkel felelős lehet az anyai magatartás és motiváció fennmaradásában a postpartum időszakban (Numan és Woodside 2010). Az anyák perioralis régiójának és ventralis testfelének deszenzitizációja helyi érzéstelenítővel a kondicionálás időszaka alatt megakadályozta a kondicionált helypreferencia kifejlődését, a CPP tesztben az analgetikus hatású krémmel kezelt állatok nem mutattak preferenciát a kölyök-asszociált doboz iránt (Magnusson és Fleming 1995).

Feltételezhető, hogy a TIP39 kölcsönhat a preopticus területen előforduló egyéb hormonokkal és neurotranszmitterekkel, mint például az oxytocin, vazopresszin, endogén opioidok és melanin-koncentráló hormon, hogy együttesen fenntartsák az anyai motivációt (Bosch és mtsai 2010, Numan és Insel 2003, Rondini és mtsai 2010).

5.5. A paralemniscalis TIP39 neuronok feltételezett funkciója a postpartum időszakban

Kevés információ érhető el a szakirodalomban az MPL és ezen belül az itt lévő TIP39 neuronok funkciójáról. Mivel az MPL a lemniscus lateralis magjainak közvetlen közelében helyezkedik el és bilaterális anatómiai kapcsolata van a hallási információk feldolgozásában részt vevő agyrégiókkal (Dobolyi és mtsai 2003a, Varga és mtsai 2008), elsősorban ilyen funkciót tételeznek fel neki.

A denevéreknél a nucleus lemnisci medialis-tól medialisan elhelyezkedő paralemniscalis area ultrahangos kommunikáció során válik aktívvá és a vokalizációban játszik szerepet (Fenzl és Schuller 2002, Metzner 1993, 1996). Patkányoknál viszont a nagy intenzitású zaj aktiválja a paralemniscalis TIP39 neuronokat (Palkovits és mtsai 2009). Mivel az MPL-beli TIP39 neuronok nem aktiválódnak fájdalmas ingerre (Varga és mtsai 2012), valószínűleg nem a nagy intenzitású zaj fájdalmat keltő jellege az, ami aktiválásukban közreműködik. Viszont az anyákban specifikus auditoros ingerek szerepet játszhatnak az MPL-ben található TIP39 neuronok aktiválásában. A kölyök patkányok anyjuktól történő izolációjukkor ultrahangos vokalizációval hívják fel magukra a figyelmet (Hofer 1996). A kölykök ultrahangos vokalizációja prolaktin szekréciót indukál és az anyai viselkedés megjelenését idézi elő (Hashimoto és mtsai 2001, Terkel és mtsai 1979). Jelenleg azonban még nem világos milyen anatómiai útvonalon továbbítódik az ultrahang által kódolt információ az anyákban lejátszódó viselkedési és neuroendokrinológiai változásokért felelős limbikus és hypothalamicus központok felé. Feltételezésünk szerint a paralemniscalis TIP39 neuronokat a kölykök által kiadott ultrahangok aktiválhatják és a TIP39 neuronok az MPL-ben közvetíthetik a kölykök ultrahangos sírását magasabb agyi központok felé, ezáltal hozzájárulva az anyai adaptációs folyamatok lejátszódásához a postpartum időszakban.

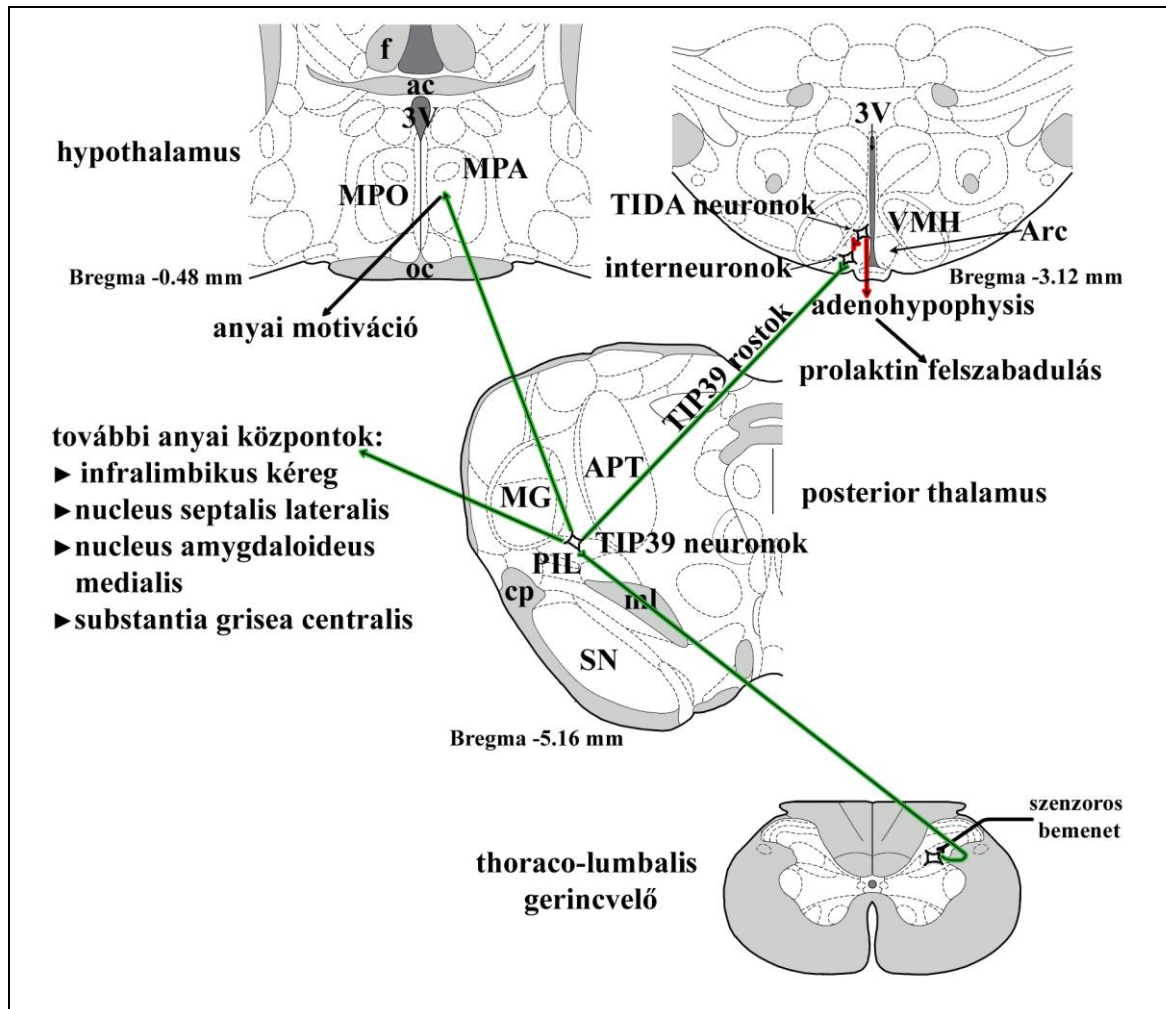
Az MPL-ben elhelyezkedő TIP39 neuronok efferens kapcsolatai egyelőre nem kellően felderítettek. Léziós kísérletek során derült fény a nem-tonotopikus szerveződésű auditoros agytörzsi régiók felé futó projekciókra (Dobolyi és mtsai 2003a), miközben retrográd neuronális nyomkövető anyagok felhasználásával feltárták, hogy a paralemniscalis TIP39 rostok eléri a nucleus arcuatus-t (Li és mtsai 1999a) és a nucleus paraventricularis-t (Palkovits és mtsai 2004). A nem-tonotopikus elrendezésű agytörzsi hallási központok felé futó projekciók lehetnek az alapjai annak, ahogyan az anyai auditoros rendszer a kölykök vokalizációjára érzékennyé válik a szülés utáni időszakban. Az anyákban a nucleus paraventricularis-sal fennálló kapcsolat szerepet kaphat a megváltozott stressz válaszok létrejöttében, miközben a paralemniscalis TIP39 neuronok projekciója a nucleus arcuatus felé hozzájárulhat a prolaktin felszabadulás szabályozásához.

5.6. A posterior intralaminaris thalamicus TIP39 neuronok szerepe a szopási inger továbbításában

A PIL kap felszálló bemenetet a nucleus gracilistól és 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 kaphat auditoros információt is az inferior colliculus külső rétegéből és az auditoros kéregből. A PIL-ben lévő TIP39 neuronok részt vehetnek a kölykök ultrahangos sírásának feldolgozásában, mivel aktiválódnak nagy intenzitású hallási stimulusokra (Palkovits és mtsai 2009). A kísérleteink során használt protokoll szerint azonban a szopási aktus aktiválta a PIL neuronjait, mivel a Fos expresszió a szopatás hatására szignifikánsan magasabb volt, mint a közvetlen kontaktus nélküli anya-kölyök együttlét esetén. Egy hasonló kísérleti elrendezésben Fos-expresszáló neuronokat írtak le a gerincvelő különböző rétegeiben, a thoracalis és lumbalis szakaszon, a szopatás hatására, azt sugallva, hogy ezek a neuronok továbbítják a szopási információt az agyi központokhoz (Marina és mtsai 2002). Ebben a tanulmányban a legtöbb Fos-t kifejező neuront a gerincvelő mély

rétegeiben találták, éppen ott, ahol a retrográdan jelölt neuronokat megfigyeltük a CTb PIL-be való injektálása után.

Különböző kísérletekből származó bizonyítékok támasztják alá, hogy a PIL egy átkapcsoló mag, ami szopási információt továbbít az anyai magatartást organizáló agyi központok felé (27. ábra).



27. ábra. Sematikus ábra a posterior intralaminaris thalamicus TIP39 neuronok feltételezett szerepéről

Neuroanatómiai és funkcionális bizonyítékok is szolgáltatnak alapot arra a feltételezésünkre, miszerint a posterior intralaminaris thalamicus komplexben elhelyezkedő TIP39 neuronok közvetítik a szoptatás hatását az anyai központok felé. A felszálló útvonal által szállított információ befolyásolja a prolaktin felszabadulást, az anyai motivációt és feltételezhetően az adaptációs folyamatok egyéb komponenseit is a laktációs időszakban (Paxinos és Watson 2005 ábráinak felhasználásával).

Lényegében a PIL-ben található összes TIP39-pozitív neuron expresszál Fos-t a szoptatás hatására. Továbbá a TIP39 expresszió fokozott a postpartum periódus során további bizonyítékként arra, hogy ezek a neuronok emelkedett aktivitást mutatnak a laktáció alatt. A PIL neuronok széleskörűen ellátják rostokkal azokat a limbicus és hypothalamicus központokat, amelyek potenciálisan közreműködnek a szopási információ feldolgozásában. Jelen dolgozatban funkcionális bizonyítékot mutattunk be arra, hogy a TIP39 hatással van a prolaktin felszabadulásra a thalamo-arcuatus projekción keresztül és az anyai motivációra a thalamo-preopticus projekción keresztül, habár a szoptatásról ismeretes, hogy érint egy sor anyai adaptációs folyamatot. A szoptatás kiváltja a nucleus paraventricularisban szintetizáló oxytocin szekrécióját és a neurohypophysisből való felszabadulását, ami a tej kiürülését idézi elő (Burbach és mtsai 2006, Wakerley és mtsai 1978). A tejtermelés magas energiaigénye negatív energia egyensúlyt teremt, amely – bár nem egyedülként – felelős a laktáció alatti hyperphagiáért (Smith és Grove 2002, Xu és mtsai 2009). A megemelkedett prolaktin szintek és a szopási stimulus is szerepet játszhat a megnövekedett táplálékfelvételben (Chen és Smith 2003, Woodside 2007). A proopiomelanokortin hasítási termékei és a táplálékfelvétel szabályozásában részt vevő egyéb peptidek a nucleus arcuatus-ban és más hypothalamicus helyeken szintén közreműködhetnek abban a mechanizmusban, amely végeredményben a terhesség és laktáció alatti megemelkedett táplálékfelvételhez vezet (Crowley és mtsai 2007, Ladyman és mtsai 2010). A neuropeptid Y-nak (NPY), amely indukálódik a nucleus dorsomedialis-ban, különösen annak kompakt szubdivíziójában (Chen és Smith 2003), specifikus szerepe lehet a laktáció alatti krónikus hyperphagia fenntartásában (Xu és mtsai 2009) és részt vehet a GnRH szekréció laktáció alatti szupressziójában (Pralong 2010, Wojcik-Gladysz és Polkowska 2006). Figyelemfelkeltő módon a TIP39 rostok különösen nagy denzitásban találhatóak meg a nucleus dorsomedialis kompakt szubdivíziójában (Dobolyi és mtsai 2003b). Azonkívül, a GnRH elválasztás elnyomása laktációs anoestrous-hoz vezet (McNeill 2006), amelyet a laktáció első felében elsődlegesen a szopási inger, míg a második felében a negatív energia egyensúly okoz (Tsukamura és Maeda 2001). A nucleus periventricularis anteroventralis-ban (AVPV) és a nucleus arcuatus-ban – ahol szintén rendkívül nagy sűrűségű TIP39 rosthálózat található – elhelyezkedő kisszeptin neuronok képviselhetik a végső közös utat a GnRH neuronok szabályozásában (Oakley

és mtsai 2009, Pineda és mtsai 2010). A stresszt leküzdő stratégiák is megváltoznak a késői terhességben és postpartum: az anya patkányok csökkent szorongást mutatnak és a HPA tengely válaszképessége is redukált, ami alacsonyabb CRH szintézissel és felszabadulással jár (Carter és mtsai 2001, Neumann 2001, 2003). Feltételezik, hogy a postpartum időszakban a szoptatás áll a HPA tengely csökkent válaszképességének hátterében (Brunton és mtsai 2008) és a nucleus paraventricularis-ban fellelhető TIP39 rostok és idegvégződések éppen ideális pozícióban vannak, hogy befolyásolhassák ezt a folyamatot. Az anyai magatartás más aspektusaira is hatása lehet a TIP39-nek. Például a TIP39 axonokkal és terminálisokkal igen gazdagon ellátott substantia grisea centralis szabályozza a kyphosis-t – amely a leghatásosabb teszhelyzet a kölykök szoptatásához – és az anyai agressziót (Lonstein és Stern 1998).

Következtetésképpen elmondható, hogy bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy a PIL-ben lévő TIP39 idegsejtek átkapcsoló állomásként szerepelnek a szopási reflex felszálló útvonalán, valamint az anyai adaptációk szabályozásában részt vevő agyi központok felé továbbítják a kölyköktől származó szenzoros információkat. A TIP39 részt vesz a prolaktin szekréció szabályozásában a szoptatás ideje alatt és az anyai motiváció fenntartásában a PTH2 receptoron keresztül. A TIP39-PTH2 receptor rendszer emberben és patkányban megfigyelt hasonlósága okán (Bago és mtsai 2009), ezen eredmények alapján következtetéseket vonhatunk le a nőkben lezajló, szoptatást befolyásoló folyamatokra vonatkozólag.

5.7. Összegzés

Vállalt célkitűzéseinknek megfelelően 1.) Anya patkányokban végzett vizsgálatainkban elsőként írtuk le a PIL-ben elhelyezkedő TIP39 neuronok topográfiai elhelyezkedését és neuronális kapcsolatrendszerét. 2.) Elsőként mutattuk ki a TIP39 neuronok aktiválódását a PIL és az MPL területén anya patkányokban. 3.) Igazoltuk az endogén TIP39 antagonizálás szopási inger által kiváltott PRL szekrécióra kifejtett gátló hatását. 4.) Elsőként bizonyítottuk a TIP39 antagonizálás anyai motivációt befolyásoló hatását.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Megállapítottuk, hogy a posterior intralaminaris thalamicus komplex neurokémiai markerek alapján két szubdivízióra osztható. A TIP39 neuronok a galanin rostokkal együtt a PIL medialis szubdivíziójában helyezkednek el, míg a CGRP neuronok a lateralis szubdivízióban találhatóak meg. A TIP39 neuronok koexpresszióját mutattuk ki calbindinnal a PIL területén, amely az intralaminaris magvak egyik fő sejtmarkere.

2. Anterográd és retrográd nyomkövető pályajelölési technika segítségével demonstráltuk, hogy a TIP39 neuronok a PIL-ből a hypothalamus több területére is vetülnek. Ezek között szerepelnek azok a hypothalamicus magok, melyek az anyai adaptációk szabályozásában központi helyet foglalnak el.

3. Leírtuk, hogy a pubertás utáni időszak alacsony szintjével szemben anyákban a TIP39 neuronok aktiválódnak a PIL-ben és az MPL-ben, míg a PVG területén a TIP39 expresszió a postnatalis élet folyamán perzisztál. A TIP39-cel ellentétben a PTH2 receptor expressziója a postnatalis egyedfejlődés során változatlan marad, így a neuropeptid képes hatni a jelenlévő receptorokon.

4. Elsőként igazoltuk, hogy a TIP39 szerepet játszik a prolaktin szekréció szabályozásában. Két, egymástól független módszerrel is kimutattuk, hogy a PTH2 receptor antagonistá blokkolja a szopási inger által kiváltott prolaktin felszabadulást.

5. Leírtuk, hogy a PIL TIP39 neuronjai gerincvelői bemenetet kapnak és rostokat küldenek a hypothalamicus arcuatus maghoz, így a PIL TIP39 sejtjei az emlő mechanoreceptoraitól az arcuatus maghoz futó felszálló pálya átkapcsoló neuronjai lehetnek.

6. Elsőként mutattuk ki, hogy a TIP39-PTH2 receptor neuromodulátor rendszer befolyásolja az anyai motivációt.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A tuberoinfundibuláris peptid 39-et (TIP39-et) termelő idegsejtek csupán három agyterületen találhatóak meg a patkány központi idegrendszerében. A TIP39 szintje jelentősen csökken a pubertális érés után, míg a TIP39 receptora, a PTH2 receptor expressziója nem mutat ilyen változást. Az értekezés keretében leírtuk, hogy az anyaállatokban laktáció alatt aktiválódnak a TIP39-tartalmú neuronok a posterior intralaminaris thalamicus komplex (PIL) és a nucleus paralemniscalis medialis (MPL) területén, és a TIP39 mRNS és peptid tartalom ezekben a sejtekben jelentősen megnő. A retrográd neuronális nyomjelző kolera toxin β -alegység (CTb) beadásával vizsgáltuk a PIL afferens kapcsolatait. CTb jelölt sejteket találtunk a gerinvelői thoracalis, lumbalis és sacralis szegmentumok hátsó szarvában, ami arra utal, hogy a PIL-beli TIP39 sejtek kapnak felszálló gerincvelői bemenetet. Anterográd neuronális nyomjelző PIL-be való injektálásával biotinilált dextransz amin (BDA) jelölt rostokat mutattunk ki többek között a medialis preopticus területen és az arcuatus magban. Vizsgáltuk az aktiválódott TIP39 neuronok funkcióját egy PTH2 receptor antagonistágykamrába való injektálásával, valamint egy genetikailag módosított, PTH2 receptor antagonistát expresszáló, és GFP-t is kifejező vírus medialis hypothalamusba történő beadásával. A két koncentrációban ICV adott HYWH-TIP39 dóziszfüggő módon csökkentette a prolaktin szekréciót. A HYWH-GFP lentivirussal injektált anyáknál szignifikánsan csökkent alap prolaktin szintet találtunk és a szopási inger által kiváltott prolaktin felszabadulás ebben az esetben is gátolt volt. Teszteltük a HYWH-TIP39 hatását az anyai motivációra a PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus medialis preopticus területre történő beadásával. A PTH2 receptor antagonistát expresszáló vírus-injektált anyák kevésbé preferálták a kölyök-asszociált tesztkompartmentet, mint a kontroll vírus-injektált anyák. Mindezek alapján valószínűsítjük, hogy a PIL-ben lévő TIP39 neuronok átkapcsoló állomásként szerepelnek a szopási reflex felszálló útvonalán és részt vesznek a prolaktin szekréció szabályozásában a szoptatás ideje alatt. Az MPOA-val való kapcsolatuk révén pedig befolyásolják annak motivációs neuronális hálózatra gyakorolt hatását, amely biztosítja az anyák magas motiváltságát a kölykökről való gondoskodásban a postpartum időszak alatt.

8. SUMMARY

Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39)-containing neurons are restricted to 2 thalamic and a pontine brain region. TIP39 levels dramatically decrease by adulthood while its receptor, the parathyroid hormone 2 receptor (PTH2 receptor) does not show a similar decrease in its expression level. We found that TIP39 mRNA and peptide levels are markedly elevated in the posterior intralaminar complex of the thalamus (PIL) and the medial paralemniscal nucleus (MPL) of lactating dams compared to the PIL and MPL of virgin control and postpartum female rats separated from their pups. Furthermore, we investigated the efferent and afferent neuronal connections of the activated TIP39 neurons by injecting anterograde and retrograde tracer into the PIL. Neurons in the PIL receive ascending information from the spinal cord and in turn project to maternal brain centers including the preoptic area and the arcuate nucleus. To investigate a potential function of TIP39 in lactation a PTH2 receptor antagonist (HYWY-TIP39) was injected into the lateral ventricle of mother rats. The PTH2 receptor antagonist almost completely blocked suckling-induced elevation of plasma prolactin levels. Subsequently, a genetically modified lentivirus expressing HYWY-TIP39 (or only GFP-tagged virus as control) was injected into the mediobasal hypothalamus of female rats, which infected a few cells around the injection site and made them release the PTH2 receptor antagonist HYWY-TIP39. We observed a lower basal prolactin level and a significant reduction in suckling-induced prolactin levels in the PTH2 receptor antagonist expressing dams. The same virus was injected into the preoptic area and conditioned place preference test was performed on virus injected mothers. The results indicated that PTH2 receptor antagonist expressing mothers showed no preference for pup-associated chamber as did control virus injected dams suggesting reduced maternal motivation following blockade of endogenous TIP39 action. This effect may be mediated by neurons expressing c-fos by pup exposure in the preoptic area, as they were demonstrated to be closely apposed by TIP39 terminals. In conclusion, TIP39 neurons are ideally positioned in the PIL to convey suckling information towards maternal brain centers to regulate different maternal responses in the postpartum period.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Anderson SM, Rudolph MC, McManaman JL, Neville MC. (2007) Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Res*, 9: 204.

Andrews ZB. (2005) Neuroendocrine regulation of prolactin secretion during late pregnancy: easing the transition into lactation. *J Neuroendocrinol*, 17: 466-473.

Arai R, Jacobowitz DM, Deura S. (1994) Distribution of calretinin, calbindin-D28k, and parvalbumin in the rat thalamus. *Brain Res Bull*, 33: 595-614.

Arbogast LA, Voogt JL. (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) increases prolactin release and tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity. *Brain Res*, 655: 17-24.

Arbogast LA, Voogt JL. (1998) Endogenous opioid peptides contribute to suckling-induced prolactin release by suppressing tyrosine hydroxylase activity and messenger ribonucleic acid levels in tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Endocrinology*, 139: 2857-2862.

Arrati PG, Carmona C, Dominguez G, Beyer C, Rosenblatt JS. (2006) GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats. *Physiol Behav*, 87: 51-65.

Baffi JS, Palkovits M. (2000) Fine topography of brain areas activated by cold stress. A fos immunohistochemical study in rats. *Neuroendocrinology*, 72: 102-113.

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

Bago AG, Dimitrov E, Saunders R, Seress L, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A. (2009) Parathyroid hormone 2 receptor and its endogenous ligand tuberoinfundibular peptide of 39 residues are concentrated in endocrine, viscerosensory and auditory brain regions in macaque and human. *Neuroscience*, 162: 128-147.

Basbaum AI, Marley NJ, O'Keefe J, Clanton CH. (1977) Reversal of morphine and stimulus-produced analgesia by subtotal spinal cord lesions. *Pain*, 3: 43-56.

Battaglia G, Spreafico R, Rustioni A. (1992) Substance P innervation of the rat and cat thalamus. I. Distribution and relation to ascending spinal pathways. *J Comp Neurol*, 315: 457-472.

Beck CT. (1998) The effects of postpartum depression on child development: a meta-analysis. *Arch Psychiatr Nurs*, 12: 12-20.

Ben-Jonathan N. (1985) Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev*, 6: 564-589.

Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. (2008) What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*, 29: 1-41.

Bjorklund A, Moore RY, Nobin A, Stenevi U. (1973) The organization of tuberohypophyseal and reticulo-infundibular catecholamine neuron systems in the rat brain. *Brain Res*, 51: 171-191.

Bodnar I, Banky ZS, Toth BE, Nagy GM, Halasz B. (2002) Brain structures mediating the suckling stimulus-induced release of prolactin. *J Neuroendocrinol*, 14: 384-396.

Bodnar I, Mravec B, Kubovcakova L, Toth EB, Fulop F, Fekete MI, Kvetnansky R, Nagy GM. (2004) Stress- as well as suckling-induced prolactin release is blocked by a structural analogue of the putative hypophysiotrophic prolactin-releasing factor, salsolinol. *J Neuroendocrinol*, 16: 208-213.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, 19: 225-268.

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

Brenner D, Bago AG, Gallatz K, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A. (2008) Tuberoinfundibular peptide of 39 residues in the embryonic and early postnatal rat brain. *J Chem Neuroanat*, 36: 59-68.

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

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

Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS. (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol*, 338: 255-278.

Brunton PJ, Russell JA, Douglas AJ. (2008) Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *J Neuroendocrinol*, 20: 764-776.

Bunik M, Chantry CJ, Howard CR, Lawrence RA, Marinelli KA, Noble L, Powers NG, Taylor JS. (2011) ABM Clinical Protocol #9: Use of galactogogues in initiating or

augmenting the rate of maternal milk secretion (First Revision January 2011). *Breastfeed Med*, 6: 41-49.

Burbach JPH, Young LJ, Russell JA. Oxytocin: Synthesis, Secretion and Reproductive Functions. In: Neill J (szerk.), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Academic Press, Oxford, 2006: 3055-3128.

Burow A, Day HE, Campeau S. (2005) A detailed characterization of loud noise stress: Intensity analysis of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain activation. *Brain Res*, 1062: 63-73.

Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. (1998) Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 5335-5340.

Callahan P, Klosterman S, Prunty D, Tompkins J, Janik J. (2000) Immunoneutralization of endogenous opioid peptides prevents the suckling-induced prolactin increase and the inhibition of tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology*, 71: 268-276.

Campeau S, Watson SJ. (1997) Neuroendocrine and behavioral responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress. *J Neuroendocrinol*, 9: 577-588.

Campeau S, Watson SJ, Jr. (2000) Connections of some auditory-responsive posterior thalamic nuclei putatively involved in activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in response to audiogenic stress in rats: an anterograde and retrograde tract tracing study combined with Fos expression. *J Comp Neurol*, 423: 474-491.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. (1992) Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol*, 324: 143-179.

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

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.

Cogill SR, Caplan HL, Alexandra H, Robson KM, Kumar R. (1986) Impact of maternal postnatal depression on cognitive development of young children. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 292: 1165-1167.

Cohen-Becker IR, Selmanoff M, Wise PM. (1986a) Hyperprolactinemia alters the frequency and amplitude of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology*, 42: 328-333.

Cohen-Becker IR, Selmanoff M, Wise PM. (1986b) Inhibitory effects of exogenously induced hyperprolactinemia on the endogenous cyclic release of luteinizing hormone and prolactin in the estrogen-primed ovariectomized rat. *Endocrinology*, 119: 1718-1725.

Coolen LM, Allard J, Truitt WA, McKenna KE. (2004) Central regulation of ejaculation. *Physiol Behav*, 83: 203-215.

Coolen LM, Peters HJ, Veening JG. (1997) Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. *Neuroscience*, 77: 1151-1161.

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, Veening JG, Petersen DW, Shipley MT. (2003a) Parvocellular subparafascicular thalamic nucleus in the rat: anatomical and functional compartmentalization. *J Comp Neurol*, 463: 117-131.

Coolen LM, Veening JG, Wells AB, Shipley MT. (2003b) Afferent connections of the parvocellular subparafascicular thalamic nucleus in the rat: evidence for functional subdivisions. *J Comp Neurol*, 463: 132-156.

Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March CJ. (1990) A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci*, 15: 265-270.

Coutellier L, Logemann A, Rusnak M, Usdin TB. (2011) Maternal absence of the parathyroid hormone 2 receptor affects postnatal pup development. *J Neuroendocrinol*, 23: 612-619.

Crowley WR, Ramoz G, Torto R, Keefe KA, Wang JJ, Kalra SP. (2007) Neuroendocrine actions and regulation of hypothalamic neuropeptide Y during lactation. *Peptides*, 28: 447-452.

Cruikshank SJ, Killackey HP, Metherate R. (2001) Parvalbumin and calbindin are differentially distributed within primary and secondary subregions of the mouse auditory forebrain. *Neuroscience*, 105: 553-569.

D'Hanis W, Linke R, Yilmazer-Hanke DM. (2007) Topography of thalamic and parabrachial calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive neurons projecting to subnuclei of the amygdala and extended amygdala. *J Comp Neurol*, 505: 268-291.

Della Penna K, Kinose F, Sun H, Koblan KS, Wang H. (2003) Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39): molecular structure and activity for parathyroid hormone 2 receptor. *Neuropharmacology*, 44: 141-153.

DeMaria JE, Lerant AA, Freeman ME. (1999) Prolactin activates all three populations of hypothalamic neuroendocrine dopaminergic neurons in ovariectomized rats. *Brain Res*, 837: 236-241.

DeMaria JE, Zelena D, Vecsernyes M, Nagy GM, Freeman ME. (1998) The effect of neurointermediate lobe denervation on hypothalamic neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res*, 806: 89-94.

Dobolyi A. (2011) Novel potential regulators of maternal adaptations during lactation: tuberoinfundibular peptide 39 and amylin. *J Neuroendocrinol*, 23: 1002-1008.

Dobolyi A, Irwin S, Makara G, Usdin TB, Palkovits M. (2005) Calcitonin gene-related peptide-containing pathways in the rat forebrain. *J Comp Neurol*, 489: 92-119.

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

Dobolyi A, Palkovits M, Bodnar I, Usdin TB. (2003a) Neurons containing tuberoinfundibular peptide of 39 residues project to limbic, endocrine, auditory and spinal areas in rat. *Neuroscience*, 122: 1093-1105.

Dobolyi A, Palkovits M, Usdin TB. (2003b) 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.

Dobolyi A, Wang J, Irwin S, Usdin TB. (2006b) Postnatal development and gender-dependent expression of TIP39 in the rat brain. *J Comp Neurol*, 498: 375-389.

Dong WK, Ryu H, Wagman IH. (1978) Nociceptive responses of neurons in medial thalamus and their relationship to spinothalamic pathways. *J Neurophysiol*, 41: 1592-1613.

Drouin J, De Lean A, Rainville D, Lachance R, Labrie F. (1976) Characteristics of the interaction between thyrotropin-releasing hormone and somatostatin for thyrotropin and prolactin release. *Endocrinology*, 98: 514-521.

Dubois-Dauphin M, Armstrong WE, Tribollet E, Dreifuss JJ. (1985a) Somatosensory systems and the milk-ejection reflex in the rat. I. Lesions of the mesencephalic lateral tegmentum disrupt the reflex and damage mesencephalic somatosensory connections. *Neuroscience*, 15: 1111-1129.

Dubois-Dauphin M, Armstrong WE, Tribollet E, Dreifuss JJ. (1985b) Somatosensory systems and the milk-ejection reflex in the rat. II. The effects of lesions in the ventroposterior thalamic complex, dorsal columns and lateral cervical nucleus-dorsolateral funiculus. *Neuroscience*, 15: 1131-1140.

Dutt A, Kaplitt MG, Kow LM, Pfaff DW. (1994) Prolactin, central nervous system and behavior: a critical review. *Neuroendocrinology*, 59: 413-419.

Eichinger A, Fiaschi-Taesch N, Massfelder T, Fritsch S, Barthelmebs M, Helwig JJ. (2002) Transcript expression of the tuberoinfundibular peptide (TIP)39/PTH2 receptor system and non-PTH1 receptor-mediated tonic effects of TIP39 and other PTH2 receptor ligands in renal vessels. *Endocrinology*, 143: 3036-3043.

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.

Factor EM, Mayer AD, Rosenblatt JS. (1993) Peripeduncular nucleus lesions in the rat: I. Effects on maternal aggression, lactation, and maternal behavior during pre- and postpartum periods. *Behav Neurosci*, 107: 166-185.

Fahie-Wilson MN, John R, Ellis AR. (2005) Macroprolactin; high molecular mass forms of circulating prolactin. *Ann Clin Biochem*, 42: 175-192.

Febo M. (2011) A bold view of the lactating brain: functional magnetic resonance imaging studies of suckling in awake dams. *J Neuroendocrinol*, 23: 1009-1019.

Fekete MI, Kanyicska B, Szentendrei T, Simonyi A, Stark E. (1984) Decrease of morphine-induced prolactin release by a procedure causing prolonged stress. *J Endocrinol*, 101: 169-172.

Fenzl T, Schuller G. (2002) Periaqueductal gray and the region of the paralemniscal area have different functions in the control of vocalization in the neotropical bat, *Phyllostomus discolor*. *Eur J Neurosci*, 16: 1974-1986.

Fenzl T, Schuller G. (2007) Dissimilarities in the vocal control over communication and echolocation calls in bats. *Behav Brain Res*, 182: 173-179.

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.

Field T. (1998) Maternal depression effects on infants and early interventions. *Prev Med*, 27: 200-203.

Findlay AL. (1966) Sensory discharges from lactating mammary glands. *Nature*, 211: 1183-1184.

Fitzsimmons MD, Olschowka JA, Wiegand SJ, Hoffman GE. (1992) Interaction of opioid peptide-containing terminals with dopaminergic perikarya in the rat hypothalamus. *Brain Res*, 581: 10-18.

Fleming A. (1986) Psychobiology of rat maternal behavior: how and where hormones act to promote maternal behavior at parturition. *Ann N Y Acad Sci*, 474: 234-251.

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, Corter C. (1988) Factors influencing maternal responsiveness in humans: usefulness of an animal model. *Psychoneuroendocrinology*, 13: 189-212.

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

Fleming AS, Luebke C. (1981) Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiol Behav*, 27: 863-868.

Fleming AS, Rosenblatt JS. (1974) Olfactory regulation of maternal behavior in rats. II. Effects of peripherally induced anosmia and lesions of the lateral olfactory tract in pup-induced virgins. *J Comp Physiol Psychol*, 86: 233-246.

Fleming AS, Suh EJ, Korsmit M, Rusak B. (1994b) Activation of Fos-like immunoreactivity in the medial preoptic area and limbic structures by maternal and social interactions in rats. *Behav Neurosci*, 108: 724-734.

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

Friedman PA, Gesek FA, Morley P, Whitfield JF, Willick GE. (1999) Cell-specific signaling and structure-activity relations of parathyroid hormone analogs in mouse kidney cells. *Endocrinology*, 140: 301-309.

Gensure RC, Gardella TJ, Juppner H. (2005) Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 328: 666-678.

Girardot MN, Brennan TJ, Martindale ME, Foreman RD. (1987) Effects of stimulating the subcoeruleus-parabrachial region on the non-noxious and noxious responses of T1-T5 spinothalamic tract neurons in the primate. *Brain Res*, 409: 19-30.

Goold CP, Usdin TB, Hoare SR. (2001) Regions in rat and human parathyroid hormone (PTH) 2 receptors controlling receptor interaction with PTH and with antagonist ligands. *J Pharmacol Exp Ther*, 299: 678-690.

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.

Grandison L, Guidotti A. (1979) gamma-Aminobutyric acid receptor function in rat anterior pituitary: evidence for control of prolactin release. *Endocrinology*, 105: 754-759.

Grattan DR. (2002) Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction*, 123: 497-506.

Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV, Voorn P. (1999) Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann N Y Acad Sci*, 877: 49-63.

Hage SR, Jurgens U. (2006) On the role of the pontine brainstem in vocal pattern generation: a telemetric single-unit recording study in the squirrel monkey. *J Neurosci*, 26: 7105-7115.

Hannig S, Jurgens U. (2006) Projections of the ventrolateral pontine vocalization area in the squirrel monkey. *Exp Brain Res*, 169: 92-105.

Hansen IA, Jakob O, Wortmann S, Arzberger T, Allolio B, Blind E. (2002) Characterization of the human and mouse genes encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues, a ligand of the parathyroid hormone receptor family. *J Endocrinol*, 174: 95-102.

Hansen S, Kohler C. (1984) The importance of the peripeduncular nucleus in the neuroendocrine control of sexual behavior and milk ejection in the rat. *Neuroendocrinology*, 39: 563-572.

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

Haws CM, Williamson AM, Fields HL. (1989) Putative nociceptive modulatory neurons in the dorsolateral pontomesencephalic reticular formation. *Brain Res*, 483: 272-282.

Hay DF, Pawlby S, Sharp D, Asten P, Mills A, Kumar R. (2001) Intellectual problems shown by 11-year-old children whose mothers had postnatal depression. *J Child Psychol Psychiatry*, 42: 871-889.

Herbert H, Aschoff A, Ostwald J. (1991) Topography of projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the rat. *J Comp Neurol*, 304: 103-122.

Hill JB, Nagy GM, Frawley LS. (1991) Suckling unmasks the stimulatory effect of dopamine on prolactin release: possible role for alpha-melanocyte-stimulating hormone as a mammatrope responsiveness factor. *Endocrinology*, 129: 843-847.

Hofer MA. (1996) Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology*, 21: 203-217.

Holzbauer M, Racke K. (1985) The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Med Biol*, 63: 97-116.

Hurwitz S. (1996) Homeostatic control of plasma calcium concentration. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 31: 41-100.

Inagaki S, Matsuda Y, Nakai Y, Takagi H. (1990) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the afferents to the caudate-putamen and perirhinal cortex of rats. *Brain Res*, 537: 263-270.

Ishida-Yamamoto A, Tohyama M. (1989) Calcitonin gene-related peptide in the nervous tissue. *Prog Neurobiol*, 33: 335-386.

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

Jahn GA, Edery M, Belair L, Kelly PA, Djiane J. (1991) Prolactin receptor gene expression in rat mammary gland and liver during pregnancy and lactation. *Endocrinology*, 128: 2976-2984.

John MR, Arai M, Rubin DA, Jonsson KB, Juppner H. (2002) Identification and characterization of the murine and human gene encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Endocrinology*, 143: 1047-1057.

Ju G, Melander T, Ceccatelli S, Hokfelt T, Frey P. (1987) Immunohistochemical evidence for a spinothalamic pathway co-containing cholecystokinin- and galanin-like immunoreactivities in the rat. *Neuroscience*, 20: 439-456.

Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF, Jr., Hock J, Potts JT, Jr., Kronenberg HM, et al. (1991) A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science*, 254: 1024-1026.

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.

Kelly PA, Ali S, Rozakis M, Goujon L, Nagano M, Pellegrini I, Gould D, Djiane J, Edery M, Finidori J, et al. (1993) The growth hormone/prolactin receptor family. *Recent Prog Horm Res*, 48: 123-164.

Kiyohara T, Miyata S, Nakamura T, Shido O, Nakashima T, Shibata M. (1995) Differences in Fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures. *Brain Res Bull*, 38: 193-201.

Kline JB, Clevenger CV. (2001) Identification and characterization of the prolactin-binding protein in human serum and milk. *J Biol Chem*, 276: 24760-24766.

Knigge U, Matzen S, Warberg J. (1988) Histaminergic mediation of the stress-induced release of prolactin in male rats. *Neuroendocrinology*, 47: 68-74.

Kocsis K, Kiss J, Csaki A, Halasz B. (2003) Location of putative glutamatergic neurons projecting to the medial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain Res Bull*, 61: 459-468.

Kovacs ZI, Palkovits M. (2010) Microcapillary specifically designed for pressure microinjections of very low volumes. *J Neurosci Methods*, 190: 229-234.

Kresse A, Jacobowitz DM, Skofitsch G. (1995) Detailed mapping of CGRP mRNA expression in the rat central nervous system: comparison with previous immunocytochemical findings. *Brain Res Bull*, 36: 261-274.

Kruger L, Sternini C, Brecha NC, Mantyh PW. (1988) Distribution of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in relation to the rat central somatosensory projection. *J Comp Neurol*, 273: 149-162.

Kuo J, Usdin TB. (2007) Development of a rat parathyroid hormone 2 receptor antagonist. *Peptides*, 28: 887-892.

Kutner RH, Zhang XY, Reiser J. (2009) Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc*, 4: 495-505.

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

Lambert RC, Moos FC, Richard P. (1993) Action of endogenous oxytocin within the paraventricular or supraoptic nuclei: a powerful link in the regulation of the bursting pattern of oxytocin neurons during the milk-ejection reflex in rats. *Neuroscience*, 57: 1027-1038.

Lamming GE. (szerk.) *Marshall's Physiology of Reproduction*. Chapman & Hall, London, 1994.

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

Lawrence RA, Lawrence RM. *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession*. Elsevier Mosby, Philadelphia, 2005.

Lawrence RA, Lawrence RM. Physiology of lactation. In: Lawrence RA, Lawrence RM (szerk.), *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession.*, Elsevier Mosby, Philadelphia, 2011: 62-97.

LeDoux JE, Farb C, Ruggiero DA. (1990) Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J Neurosci*, 10: 1043-1054.

Ledoux JE, Ruggiero DA, Forest R, Stornetta R, Reis DJ. (1987) Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *J Comp Neurol*, 264: 123-146.

LeDoux JE, Ruggiero DA, Reis DJ. (1985) Projections to the subcortical forebrain from anatomically defined regions of the medial geniculate body in the rat. *J Comp Neurol*, 242: 182-213.

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.

Li C, Chen P, Smith MS. (1999) Identification of neuronal input to the arcuate nucleus (ARH) activated during lactation: implications in the activation of neuropeptide Y neurons. *Brain Res*, 824: 267-276.

Li C, Chen P, Smith MS. (1999a) Identification of neuronal input to the arcuate nucleus (ARH) activated during lactation: implications in the activation of neuropeptide Y neurons. *Brain Res*, 824: 267-276.

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

Lightman SL, Windle RJ, Wood SA, Kershaw YM, Shanks N, Ingram CD. (2001) Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog Brain Res*, 133: 111-129.

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

Lindahl V, Pearson JL, Colpe L. (2005) Prevalence of suicidality during pregnancy and the postpartum. *Arch Womens Ment Health*, 8: 77-87.

Linke R, Schwegler H. (2000) Convergent and complementary projections of the caudal paralaminar thalamic nuclei to rat temporal and insular cortex. *Cereb Cortex*, 10: 753-771.

Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 295: 868-872.

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

Lonstein JS, Simmons DA, Swann JM, Stern JM. (1998) Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. *Neuroscience*, 82: 267-281.

Lonstein JS, Stern JM. (1998) Site and behavioral specificity of periaqueductal gray lesions on postpartum sexual, maternal, and aggressive behaviors in rats. *Brain Res*, 804: 21-35.

Lyons DJ, Horjales-Araujo E, Broberger C. (2010) Synchronized network oscillations in rat tuberoinfundibular dopamine neurons: switch to tonic discharge by thyrotropin-releasing hormone. *Neuron*, 65: 217-229.

Magnusson JE, Fleming AS. (1995) Rat pups are reinforcing to the maternal rat: Role of sensory cues. *Psychobiology*, 23: 69–75.

Maillard CA, Edwards DA. (1991) Excitotoxin lesions of the zona incerta/lateral tegmentum continuum: effects on male sexual behavior in rats. *Behav Brain Res*, 46: 143-149.

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.

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

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.

McNeill AS. Suckling and the Control of Gonadotropin Secretion. In: Neill JD (szerk.), *Knobil és Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press Oxford, 2006: 2511-2552.

McNeilly AS. (2001) Neuroendocrine changes and fertility in breast-feeding women. *Prog Brain Res*, 133: 207-214.

McVea KL, Turner PD, Pepler DK. (2000) The role of breastfeeding in sudden infant death syndrome. *J Hum Lact*, 16: 13-20.

Metzner W. (1993) An audio-vocal interface in echolocating horseshoe bats. *J Neurosci*, 13: 1899-1915.

Metzner W. (1996) Anatomical basis for audio-vocal integration in echolocating horseshoe bats. *J Comp Neurol*, 368: 252-269.

Mezey E, Kiss JZ. (1985) Vasoactive intestinal peptide-containing neurons in the paraventricular nucleus may participate in regulating prolactin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 245-247.

Miyata S, Ishiyama M, Shido O, Nakashima T, Shibata M, Kiyohara T. (1995) Central mechanism of neural activation with cold acclimation of rats using Fos immunohistochemistry. *Neurosci Res*, 22: 209-218.

Morgan JJ, Curran T. (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci*, 14: 421-451.

Morishige WK, Rothchild I. (1974) Temporal aspects of the regulation of corpus luteum function by luteinizing hormone, prolactin and placental luteotrophin during the first half of pregnancy in the rat. *Endocrinology*, 95: 260-274.

Motomura K, Kosaka T. (2011) Medioventral part of the posterior thalamus in the mouse. *J Chem Neuroanat*, 42: 192-209.

Muff R, Born W, Kaufmann M, Fischer JA. (1994) Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein receptor update. *Mol Cell Endocrinol*, 100: 35-38.

Nagy GM, Frawley LS. (1990) Suckling increases the proportions of mammatropes responsive to various prolactin-releasing stimuli. *Endocrinology*, 127: 2079-2084.

Nagy GM, Halasz B. (1983) Time course of the litter removal-induced depletion in plasma prolactin levels of lactating rats. An immediate full blockade of the hormone release after separation. *Neuroendocrinology*, 37: 459-462.

Nagy GM, Mulchahey JJ, Neill JD. (1988) Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology*, 122: 364-366.

Nagy GM, Vigh S, Arimura A. (1993) PACAP induces prolactin and growth hormone release in lactating rats separated from their pups. *Endocrine Journal*, 1: 169-173.

Nahin RL. (1988) Immunocytochemical identification of long ascending, peptidergic lumbar spinal neurons terminating in either the medial or lateral thalamus in the rat. *Brain Res*, 443: 345-349.

Namura S, Takada M, Kikuchi H, Mizuno N. (1997) Collateral projections of single neurons in the posterior thalamic region to both the temporal cortex and the amygdala: a fluorescent retrograde double-labeling study in the rat. *J Comp Neurol*, 384: 59-70.

Neill JD, Nagy GM. Prolactin secretion and its control. In: Knobil E, Neill JD (szerk.), *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, 1994: 1833-1860.

Neumann ID. (2001) Alterations in behavioral and neuroendocrine stress coping strategies in pregnant, parturient and lactating rats. *Prog Brain Res*, 133: 143-152.

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

Neville MC. Lactation and its hormonal control. In: Neill JD (szerk.), Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* Academic Press, Amsterdam, 2006: 2993–3054.

Nilni EA, Aird F, Seidah NG, Todd RB, Koenig JI. (2001) PreproTRH(178-199) and two novel peptides (pFQ7 and pSE14) derived from its processing, which are produced

in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus, are regulated during suckling. *Endocrinology*, 142: 896-906.

Numan M. (1974) Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. *J Comp Physiol Psychol*, 87: 746-759.

Numan M. Maternal behavior. In: Knobil EN, J. D. (szerk.), *Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 1994: 221-302.

Numan M. (2006) Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. *Behav Cogn Neurosci Rev*, 5: 163-190.

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, Insel TR. *The neurobiology of parental behavior*. Springer, New York, 2003.

Numan M, Numan MJ, English JB. (1993) Excitotoxic amino acid injections into the medial amygdala facilitate maternal behavior in virgin female rats. *Horm Behav*, 27: 56-81.

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

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

Numan M, Smith HG. (1984) Maternal behavior in rats: evidence for the involvement of preoptic projections to the ventral tegmental area. *Behav Neurosci*, 98: 712-727.

Numan M, Woodside B. (2010) Maternity: neural mechanisms, motivational processes, and physiological adaptations. *Behav Neurosci*, 124: 715-741.

Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. (2009) Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev*, 30: 713-743.

Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA. (1997) Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev*, 11: 167-178.

Ottersen OP, Ben-Ari Y. (1979) Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat. I. Projections from the thalamus. *J Comp Neurol*, 187: 401-424.

Palkovits M, Dobolyi A, Helfferich F, Usdin TB. (2004) Localization and chemical characterization of the audiogenic stress pathway. *Ann N Y Acad Sci*, 1018: 16-24.

Palkovits M, Helfferich F, Dobolyi A, Usdin TB. (2009) Acoustic stress activates tuberoinfundibular peptide of 39 residues neurons in the rat brain. *Brain Struct Funct*, 214: 15-23.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, 2005.

Pearlstein T, Howard M, Salisbury A, Zlotnick C. (2009) Postpartum depression. *Am J Obstet Gynecol*, 200: 357-364.

Pena KS, Rosenfeld JA. (2001) Evaluation and treatment of galactorrhea. *Am Fam Physician*, 63: 1763-1770.

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.

Peschanski M, Mantyh PW. (1983) Efferent connections of the subfascicular area of the mesodiencephalic junction and its possible involvement in stimulation-produced analgesia. *Brain Res*, 263: 181-190.

Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. (2010) Physiological roles of the kisspeptin/GPR54 system in the neuroendocrine control of reproduction. *Prog Brain Res*, 181: 55-77.

Poulain DA, Wakerley JB. (1982) Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience*, 7: 773-808.

Pralong FP. (2010) Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. *Mol Cell Endocrinol*, 324: 82-86.

Racagni G, Apud JA, Locatelli V, Cocchi D, Nistico G, di Giorgio RM, Muller EE. (1979) GABA of CNS origin in the rat anterior pituitary inhibits prolactin secretion. *Nature*, 281: 575-578.

Rhodes DL, Liebeskind JC. (1978) Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat. *Brain Res*, 143: 521-532.

Rittenhouse PA, Levy AD, Li Q, Bethea CL, Van de Kar LD. (1993) Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate the serotonergic stimulation of prolactin secretion via 5-HT_{1c/2} receptors. *Endocrinology*, 133: 661-667.

Rizzoli R, Ferrari SL, Pizurki L, Caverzasio J, Bonjour JP. (1992) Actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein. *J Endocrinol Invest*, 15: 51-56.

Rogers JH, Resibois A. (1992) Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: patterns of partial co-localization. *Neuroscience*, 51: 843-865.

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

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

Rosenblatt JS, Mayer AD. An analysis of approach/withdrawal processes in the initiation of maternal behavior in the laboratory rat. In: Hood KE, Greenberg G, Tobach E (szerk.), *Behavioral development*. Garland Press, New York, 1995:

Ross G, Engel P, Abdallah Y, Kummer W, Schluter KD. (2005) Tuberoinfundibular peptide of 39 residues: a new mediator of cardiac function via nitric oxide production in the rat heart. *Endocrinology*, 146: 2221-2228.

Russell JA, Douglas AJ, Ingram CD. (2001) Brain preparations for maternity--adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. *Prog Brain Res*, 133: 1-38.

Sachs BD, Meisel RL. The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E, Neill JD (szerk.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 1988:

Samson WK, Lumpkin MD, McCann SM. (1986) Evidence for a physiological role for oxytocin in the control of prolactin secretion. *Endocrinology*, 119: 554-560.

Saper CB. (2000) Hypothalamic connections with the cerebral cortex. *Prog Brain Res*, 126: 39-48.

Sauve D, Woodside B. (1996) The effect of central administration of prolactin on food intake in virgin female rats is dose-dependent, occurs in the absence of ovarian hormones and the latency to onset varies with feeding regimen. *Brain Res*, 729: 75-81.

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

Schuller G, Radtke-Schuller S. (1990) Neural control of vocalization in bats: mapping of brainstem areas with electrical microstimulation eliciting species-specific echolocation calls in the rufous horseshoe bat. *Exp Brain Res*, 79: 192-206.

Schwindinger WF, Fredericks J, Watkins L, Robinson H, Bathon JM, Pines M, Suva LJ, Levine MA. (1998) Coupling of the PTH/PTHrP receptor to multiple G-proteins. Direct demonstration of receptor activation of Gs, Gq/11, and Gi(1) by [α -³²P]GTP- γ -azidoanilide photoaffinity labeling. *Endocrine*, 8: 201-209.

Segre GV, Abou-Samra AB, Juppner H, Schipani E, Force T, Urena P, Freeman M, Kong XF, Kolakowski LF, Jr., Hock J, et al. (1992) Characterization of cloned PTH/PTHrP receptors. *J Endocrinol Invest*, 15: 11-17.

Shammah-Lagnado SJ, Alheid GF, Heimer L. (1999) Afferent connections of the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure and adjacent amygdalostriatal transition area in the rat. *Neuroscience*, 94: 1097-1123.

Sheehan TP, Cirrito J, Numan MJ, Numan M. (2000) Using c-Fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behav Neurosci*, 114: 337-352.

Shimura T, Shimokochi M. (1991) Modification of male rat copulatory behavior by lateral midbrain stimulation. *Physiol Behav*, 50: 989-994.

Shin SH, Stirling R. (1988) Ascorbic acid potentiates the inhibitory effect of dopamine on prolactin release in primary cultured rat pituitary cells. *J Endocrinol*, 118: 287-294.

Simerly RB. (2002) Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu Rev Neurosci*, 25: 507-536.

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

Skofitsch G, Jacobowitz DM. (1985) Calcitonin gene-related peptide: detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system. *Peptides*, 6: 721-745.

Smith MS, Grove KL. (2002) Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Front Neuroendocrinol*, 23: 225-256.

Steele MK, McCann SM, Negro-Vilar A. (1982) Modulation by dopamine and estradiol of the central effects of angiotensin II on anterior pituitary hormone release. *Endocrinology*, 111: 722-729.

Stern JM, Lonstein JS. (2001) Neural mediation of nursing and related maternal behaviors. *Prog Brain Res*, 133: 263-278.

Sugiyama K, Ryu H, Uemura K. (1992) Identification of nociceptive neurons in the medial thalamus: morphological studies of nociceptive neurons with intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Res*, 586: 36-43.

Szabo FK, Snyder N, Usdin TB, Hoffman GE. (2010) A direct neuronal connection between the subparafascicular and ventrolateral arcuate nuclei in non-lactating female rats. Could this pathway play a role in the suckling-induced prolactin release? *Endocrine*, 37: 62-70.

Tanaka H, Smogorzewski M, Koss M, Massry SG. (1995) Pathways involved in PTH-induced rise in cytosolic Ca²⁺ concentration of rat renal proximal tubule. *Am J Physiol*, 268: F330-337.

Tashjian AH, Jr., Barowsky NJ, Jensen DK. (1971) Thyrotropin releasing hormone: direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 43: 516-523.

Tasker JG, Theodosis DT, Poulain DA. (1986) Afferent projections from the mammary glands to the spinal cord in the lactating rat--I. A neuroanatomical study using the

transganglionic transport of horseradish peroxidase-wheatgerm agglutinin. *Neuroscience*, 19: 495-509.

Tavakoli-Nezhad M, Arbogast LA. (2010) Mu and kappa opioid receptor expression in the mediobasal hypothalamus and effectiveness of selective antagonists on prolactin release during lactation. *Neuroscience*, 166: 359-367.

Terkel J, Damassa DA, Sawyer CH. (1979) Ultrasonic cries from infant rats stimulate prolactin release in lactating mothers. *Horm Behav*, 12: 95-102.

Theodosis DT, Poulain DA. (2001) Maternity leads to morphological synaptic plasticity in the oxytocin system. *Prog Brain Res*, 133: 49-58.

Tindal JS, Knaggs GS. (1969) An ascending pathway for release of prolactin in the brain of the rabbit. *J Endocrinol*, 45: 111-120.

Tindal JS, Knaggs GS. (1971) Determination of the detailed hypothalamic route of the milk-ejection reflex in the guinea-pig. *J Endocrinol*, 50: 135-152.

Tindal JS, Knaggs GS. (1975) Further studies on the afferent path of the milk-ejection reflex in the brain stem of the rabbit. *J Endocrinol*, 66: 107-113.

Tindal JS, Knaggs GS. (1977) Pathways in the forebrain of the rat concerned with the release of prolactin. *Brain Res*, 119: 211-221.

Torner L, Neumann ID. (2002) The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress*, 5: 249-257.

Tsukamura H, Maeda K. (2001) Non-metabolic and metabolic factors causing lactational anestrus: rat models uncovering the neuroendocrine mechanism underlying the suckling-induced changes in the mother. *Prog Brain Res*, 133: 187-205.

Usdin TB, Bonner TI, Harta G, Mezey E. (1996) Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology*, 137: 4285-4297.

Usdin TB, Bonner TI, Hoare SR. (2002) The parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor. *Receptors Channels*, 8: 211-218.

Usdin TB, Gruber C, Bonner TI. (1995) Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem*, 270: 15455-15458.

Usdin TB, Hilton J, Vertesi T, Harta G, Segre G, Mezey E. (1999b) Distribution of the parathyroid hormone 2 receptor in rat: immunolocalization reveals expression by several endocrine cells. *Endocrinology*, 140: 3363-3371.

Usdin TB, Hoare SR, Wang T, Mezey E, Kowalak JA. (1999a) TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus. *Nat Neurosci*, 2: 941-943.

Usdin TB, Paciga M, Riordan T, Kuo J, Parmelee A, Petukova G, Camerini-Otero RD, Mezey E. (2008) Tuberoinfundibular Peptide of 39 residues is required for germ cell development. *Endocrinology*, 149: 4292-4300.

Usdin TB, Wang T, Hoare SR, Mezey E, Palkovits M. (2000) New members of the parathyroid hormone/parathyroid hormone receptor family: the parathyroid hormone 2 receptor and tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Front Neuroendocrinol*, 21: 349-383.

Van Loon GR, De Souza EB, Ho D, Shin SH. (1980) beta-Endorphin-induced prolactin secretion is mediated by suppression of release of newly synthesized hypothalamic dopamine. *Can J Physiol Pharmacol*, 58: 436-439.

Varga T, Mogyorodi B, Bago AG, Cservenak M, Domokos D, Renner E, Gallatz K, Usdin TB, Palkovits M, Dobolyi A. (2012) Paralemniscal TIP39 is induced in rat dams and may participate in maternal functions. *Brain Struct Funct*, 217: 323-335.

Varga T, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A. (2008) The medial paralemniscal nucleus and its afferent neuronal connections in rat. *J Comp Neurol*, 511: 221-237.

Veening JG, Coolen LM. (1998) Neural activation following sexual behavior in the male and female rat brain. *Behav Brain Res*, 92: 181-193.

Visegrady A, Boros A, Nemethy Z, Kiss B, Keseru GM. (2007) Application of the BD ACTOne technology for the high-throughput screening of Gs-coupled receptor antagonists. *J Biomol Screen*, 12: 1068-1073.

Wakerley JB, O'Neill DS, ter Haar MB. (1978) Relationship between the suckling-induced release of oxytocin and prolactin in the urethane-anaesthetized lactating rat. *J Endocrinol*, 76: 493-500.

Walker CD, Toufexis DJ, Bulet A. (2001) Hypothalamic and limbic expression of CRF and vasopressin during lactation: implications for the control of ACTH secretion and stress hyporesponsiveness. *Prog Brain Res*, 133: 99-110.

Wang J, Ciofi P, Crowley WR. (1996) Neuropeptide Y suppresses prolactin secretion from rat anterior pituitary cells: evidence for interactions with dopamine through inhibitory coupling to calcium entry. *Endocrinology*, 137: 587-594.

Wang J, Coolen LM, Brown JL, Usdin TB. (2006c) Neurons containing tuberoinfundibular peptide of 39 residues are activated following male sexual behavior. *Neuropeptides*, 40: 403-408.

Wang J, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A. (2006a) Forebrain projections of tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39)-containing subparafascicular neurons. *Neuroscience*, 138: 1245-1263.

Wang J, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A. (2006b) Afferent connections of the subparafascicular area in rat. *Neuroscience*, 138: 197-220.

Wang T, Palkovits M, Rusnak M, Mezey E, Usdin TB. (2000) Distribution of parathyroid hormone-2 receptor-like immunoreactivity and messenger RNA in the rat nervous system. *Neuroscience*, 100: 629-649.

Winer JA, Larue DT, Diehl JJ, Hefti BJ. (1998) Auditory cortical projections to the cat inferior colliculus. *J Comp Neurol*, 400: 147-174.

Winsky L, Montpied P, Arai R, Martin BM, Jacobowitz DM. (1992) Calretinin distribution in the thalamus of the rat: immunohistochemical and in situ hybridization histochemical analyses. *Neuroscience*, 50: 181-196.

Wojcik-Gladysz A, Polkowska J. (2006) Neuropeptide Y--a neuromodulatory link between nutrition and reproduction at the central nervous system level. *Reprod Biol*, 6 Suppl 2: 21-28.

Woodside B. (2007) Prolactin and the hyperphagia of lactation. *Physiol Behav*, 91: 375-382.

Wright CI, Beijer AV, Groenewegen HJ. (1996) Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *J Neurosci*, 16: 1877-1893.

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 M, Shibusawa N, Ishii S, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Monden T, Satoh T, Hirato J, Mori M. (2006) Prolactin secretion in mice with thyrotropin-releasing hormone deficiency. *Endocrinology*, 147: 2591-2596.

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.

Yasui Y, Saper CB, Cechetto DF. (1991) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive projections from the thalamus to the striatum and amygdala in the rat. *J Comp Neurol*, 308: 293-310.

Young WS, 3rd, Shepard E, Amico J, Hennighausen L, Wagner KU, LaMarca ME, McKinney C, Ginns EI. (1996) Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. *J Neuroendocrinol*, 8: 847-853.

Zahm DS, Brog JS. (1992) On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*, 50: 751-767.

Zhou J, Shore S. (2006) Convergence of spinal trigeminal and cochlear nucleus projections in the inferior colliculus of the guinea pig. *J Comp Neurol*, 495: 100-112.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Az értekezés témájában megjelent publikációk

1. **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. **IF: 4,993**
2. Varga T, Mogyoródi B, Bagó AG, **Cservenák M**, Domokos D, Renner E, Gallatz K, Usdin TB, Palkovits M, Dobolyi A. (2012) Paralemniscal TIP39 is induced in rat dams and may participate in maternal functions. *Brain Struct Funct*, 217: 323-335. **IF: 7,837**

2. Egyéb, az értekezéshez fel nem használt publikáció

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**

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Dobolyi Árpádnak, aki megtanított az igényes, önálló kutatói munka lépéseinek elsajátítására. Ezúton szeretném megköszönni neki segítségét, támogatását és tanácsait, amelyekkel szakmai fejlődésemhez hozzájárult. Szeretném megköszönni a Neuromorfológiai Laboratórium vezetőjének, Palkovits Miklós professzor úrnak a támogatását, akitől lehetőséget kaptam, hogy a kutatócsoportban dolgozhassak és akinek jóindulatú tanácsai és segítsége végigkísért Ph.D. munkám során.

Külön köszönet illeti Nagy M. György professzor urat és Dr. Bodnár Ibolyát, a prolaktin mérésekben nyújtott szakmai és gyakorlati segítségükért.

Köszönettel tartozom továbbá közvetlen kollégáimnak, Szabó Éva Rebekának, Toronyay-Kasztner Magdolnának, Balázs Tamásnak és Renner Évának szakmai és emberi támogatásukért, Dellaszéga-Lábas Viktóriának, Hanák Nikolettnek és Deák Szilviának a kísérletek gyakorlati kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért, valamint a Neuromorfológiai Laboratórium többi dolgozójának a jó hangulatú, intellektuálisan stimuláló légkör megteremtéséért.

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani Szüleimnek tanulmányaim során nyújtott szerető támogatásukért, valamint Vőlegényemnek a sok-sok biztatásért és türelemért.