

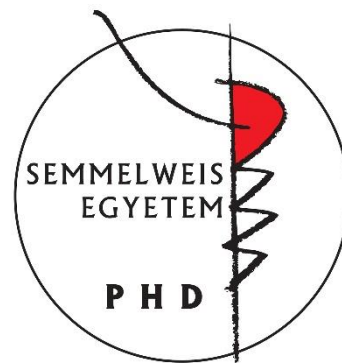
Az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) szerepe a központi idegrendszer anyai adaptációjában

Doktori tézis

Dr. Lékó András Hugó

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dobolyi Árpád, DSc, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Csáki Ágnes, Ph.D, egyetemi docens

Dr. Gereben Balázs, DSc, tudományos tanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Oláh Imre, DSc, nyugalmazott egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vereczki Viktória, PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Hrabovszky Erik, DSc, tudományos tanácsadó

Budapest

2017

I. BEVEZETÉS

Az utódgondozás fontos része a reprodukciónak, a zavartalan anyai viselkedés elsősorban az egészséges utódok felnevelése miatt fontos. A patkány kölykök éretlenül születnek, mozogni önállóan nem tudnak és a testhőmérsékletüket sem képesek szabályozni. Ezért az anya fészket épít, amelyben a kölykök tartózkodhatnak, és ott gondozza őket. Föléjük hajolva egy jellegzetes óvó-védő testtartást vesz fel, nyalogatja-tisztogatja az anogenitális régiójukat, amennyiben pedig a kölykök a fészektől távolabb kerülnek, visszahordja oda őket egyenként. Ezenkívül az anyák félelemérzete csökken, megnő folyadék- és táplálékfelvételük, valamint agresszívvá válnak a betolakodókkal szemben. Ezzel ellentétben a szűz nőtények a kölykökkel szemben elkerülő, sokszor agresszív, támadó viselkedést mutatnak. Az idegrendszer alkalmazkodását eme megváltozott helyzethez nevezzük anyai adaptációnak. A hormonoknak, hormonális változásoknak – laktogének, ösztadiol, oxytocin – a terhesség végén / szüléskor van szerepük az anyai adaptáció megindításában, később annak fenntartásában a kölykök felől jövő szenzoros ingerek, elsősorban szomatoszenzoros bemenetek játszanak főszerepet. Azaz a hormonális hatások aktiválnak egy olyan agyi hálózatot, amely a kölykök felől jövő ingerekre immáron nem averzív reakcióval, hanem gondoskodással válaszol. Ennek a hálózatnak a központi eleme a hipotalamusz medialis preoptikus areája (MPOA), ahol a neuronok jelentős része aktiválódik anyákban. Az itt található galanin sejtek genetikus ablációja megszüntette az anyai viselkedést, a kölykök visszahordását a fészekbe és agresszív reakciót váltott ki anyákból kölykök jelenlétében, valamint optogenetikus aktivációja hímegekben megszüntette az agressziót és kölykökkel szembeni gondoskodó viselkedést vont maga után.

A szülés után nem csak az anyai viselkedés jelenik meg, hanem a szoptatás is megkezdődik. A laktáció és az ehhez szükséges nagyobb mértékű prolaktin (PRL) szekréció az egyik legfontosabb posztpartum élettani változás, amihez szükség van a központi idegrendszer anyai adaptációjára. A PRL hat az anya központi idegrendszerére és egész szervezetére, elősegítve a megváltozott állapothoz való alkalmazkodást. A PRL egy polipeptid hormon, amelyet elsősorban az elülső hipofízis lebeny laktotróf sejtjei szekretálnak. Ezek a sejtek folyamatos gátlás alatt állnak az arcuatus mag tuberoinfundibularis dopaminerg (TIDA) neuronjai által a portális keringésbe szekretált dopamin révén. Magasabb PRL szekréció a gátlás alóli felszabadulás által érhető el. A TIDA neuronok a 3. agykamra két oldalán a nucleus arcuatus dorsomedialis részén találhatók. A

hipotalamusz-prolaktin hormonális tengely egyetlen feedback mechanizmusa a PRL által a TIDA sejtekre kifejtett negatív visszacsatolás. PRL-receptor található ezen sejteken és PRL hatására fokozódik a tirozin-hidroxiláz enzim (TH) expressziója, az eminentia medianában a dopamin metabolizmus, illetve a dopamin szekréciója a portális keringésbe. A TH-re kifejtett hatás azért fontos, mert ez az enzim a katekolamin szintézis első és egyben sebesség meghatározó lépése. A TH mennyiségét expressziója határozza meg leginkább, aktivitását pedig foszforilációja szabályozza. A patkányok TH enzime 4 különböző helyen foszforilálható: a Ser8, 19, 31 és 40 pozíciókban. Jelentős hatása az enzim működésére a Ser31 és 40 foszforilációjának van, amely növeli az enzim aktivitását és stabilitását. A Ser31-et az ERK1/2 és a Cdk5 (ciklin dependens kináz-5), a Ser40-t a PKA, illetve a MAPK (mitogén aktiválta protein kináz) foszforilálja.

Az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) egy evolúciós szempontból ősi peptid, amelynek sejtek túlélését, osztódását, szövetek gyógyulását elősegítő hatása régóta ismert. A vérben keringő IGF-1 elsődleges forrása a máj, melyben a növekedési hormon (GH) hatására képződik és szabadul fel, így vállalva főszerepet a növekedési hormon tengelyben, mint a GH hatásainak közvetítője a perifériás szövetek felé. Mindazonáltal IGF-1 egyéb perifériás szövetekben és a központi idegrendszerben is termelődik, autokrin és parakrin funkciókat ellátva. Fontos szerepe van abban is, hogy kapcsolatot teremt a növekedési hormon tengely és más neuroendokrin rendszerek, mint például a hipotalamo-hipofizeális-gonád tengely, illetve a prolaktin felszabadulás – laktáció között. Prolaktin hiányában a tejhozam felére csökken, teljes lepadást GH és prolaktin együttes megvonásával lehet elérni. A GH szükséges a normál tejtermeléshez és emberben is fokozza a tejelválasztást. Az IGF-1 a hipofízisben serkenti a prolaktin felszabadulást és az emlőmirigyben fokozza a tejelválasztást.

Sejtszinten hatását az IGF-1 az IGF1-receptoron (IGF-1R) keresztül fejt ki, ez egy tirozin-kináz típusú, sejtfelszínen található receptor. Az IGF-1 az extracelluláris térben, illetve a keringésben a 6 IGF kötőfehérje (IGF binding protein – IGFBP) valamelyikéhez kötött állapotban van jelen. A májban termelődött IGF-1 több, mint 99%-a IGFBP-hez kötődik, ezen belül is 75-90%-ban az IGFBP-3-hoz. Az IGFBP-k nagyobb affinitással kötik meg az IGF-1-et, mint az IGF-1R, befolyásolva ezzel az utóbbi kettő interakcióját, amely az IGFBP-3 esetében az IGF-1 hatásainak gyengítését jelenti.

Az anyai adaptáció kulcsszerepet játszó szabályozó központja a korábbiakban már említett MPOA, ahol a szülés után jelentős génexpressziós változások történnek. Kutatócsoportunk hipotézise egy korábbi vizsgálat során az volt, hogy az anyákban megváltozott expressziót mutató gének szerepet játszanak a központi idegrendszer anyai adaptációjában. A hipotézis bizonyításának első lépéseként egy microarray vizsgálatot végzett kutatócsoportunk, hogy megtudják mely gének expressziója változik meg jelentősen az MPOA-ban laktáló anyákban ún. deprivált anyákhoz képest, melyeknek kölykeit a szülés után azonnal elvették és emiatt nem történt meg az anyai adaptáció. Ezen állatok a vizsgálat időpontjában már nem laktáltak, és nem mutattak utódgondozó viselkedést sem. Ennek a vizsgálatnak az eredményeit újraértékeltek és összehasonlítottuk egy hasonló microarray kísérlettel. Összesen 21 olyan gén volt laborunk microarray eredményei közt, amely magasan szignifikáns változást mutatott ($p < 0,007$), a legnagyobb, 25-szörös változást az islet amyloid polipeptid, azaz amylin mutatta, expressziója laktáló anyákban jóval magasabb volt. Az amylin, mint új, anyai adaptációban fontos szerepet játszó neuropeptidet sikerült leírni. További 5 gén expressziója 2-4-szeresére emelkedett laktáló anyákban és ezek közül az IGFBP-3 volt az, amelyet a másik kutatócsoport microarray vizsgálata során is kimutattak, mint fontos, megnövekedett expressziójú gént. Ezért az IGFBP-3-at és a tőle működésben nem elválasztható IGF-1-et, tehát az IGF-1 – IGFBP-3 rendszert választottuk kutatásaink tárgyául. ***Hipotézisünk így az volt, hogy az IGF-rendszer szerepet játszik a központi idegrendszer anyai adaptációjában.***

II. CÉLKITŰZÉSEK

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

- a.) Az IGFBP-3 esetében a microarray során a preoptikus területen jelentkező mRNS szint emelkedés igazolható-e kvantitatív RT-PCR-rel?
- b.) Az IGFBP-3 laktáló anyákban emelkedett preoptikus expressziója hol lokalizálódik a microarray-hez és RT-PCR-hez használt disszekált területen belül?

2. IGF-1 anyai motivációra való hatása

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

3. Az IGF-1 laktációra kifejtett hatása

- a.) Hatással van-e a krónikus IGF-1 kezelés a szoptatás által kiváltott szérums prolaktin szint emelkedésre?
- b.) Az IGF-rendszer fontos eleme, az IGFBP-3 expresszálódik-e a prolaktin szekréciót szabályozó TIDA sejtekben?

Változik-e az IGFBP-3 expressziója a laktációval összefüggésben a TIDA sejtekben?

Hogyan hat az IGF-1 a tirozin-hidroxiláz enzim expressziójára *in vivo* és *in vitro*?

Hogyan hat az IGF-1 a tirozin-hidroxiláz enzim aktivitását meghatározó foszforilációjára *in vitro*?

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

- a.) Hogyan változik a szérums IGF-1 szint szoptatás hatására anyaállatokban?
Van-e összefüggés a prolaktin és az IGF-1 szintek között a szoptatás során?
- b.) Milyen hatása van az akut és a krónikus intracerebroventrikuláris (icv.) IGF-1 beadásnak a szoptatás során bekövetkező IGF-1 szérums szint változásokra?

III. MÓDSZEREK

Állatkísérleteinket a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóságának 44009/2013-as engedélyével a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében végeztük.

Laktáló és deprivált anyákból disszekáltuk a preoptikus területet RT-PCR-hez, hogy igazoljuk az IGFBP-3 esetében a microarray kísérlet során tapasztalt több, mint kétszeres expressziófokozódást. Az IGFBP-3 laktáló anyákban megemelkedett expresszióját *in situ* hibridizációs hisztokémiával (ISHH) lokalizáltuk a preoptikus területen belül.

A szülést követően patkány anyáknak, ozmotikus minipumpához kapcsolt icv. kanül segítségével, IGF-1-et és egy IGBP-3 inhibitor (NBI-31772), valamint kontrollként ACSF-et adagoltunk 14 napon keresztül. Ezalatt vizsgáltuk a kezelés magatartásra gyakorolt hatásait kölyök visszahordási teszt (szülés utáni 6. napon) és emelt keresztpalló teszt (szülés utáni 7. napon) elvégzésével, valamint az 5 napon keresztül (szülés utáni 4-9. nap között) napi három alkalommal megfigyelt spontán anyai viselkedés leírásával.

Ozmotikus minipumpához kapcsolt icv. kanül használatával vizsgáltuk az IGF-1 prolaktin szekrécióna kifejtett hatását. 12 napig tartó egyenletes IGF-1 kezelés után a szülés utáni 14. napon vettünk vért jugularis kanülon keresztül szoptatás közben patkány anyákból, hogy a szoptatás indukálta prolaktin szekrécióna vizsgálhassuk. Az IGF-1 hatásának hátterében álló lehetséges mechanizmusok feltérképezéséhez IGFBP-3 ISHH-t végeztünk, illetve kombináltunk TH immunhisztokémiával a nucleus arcuatus területén különös tekintettel a prolaktin szekrécióna szabályozó korábban említett TIDA sejtekre. Emellett a TH expresszióna is vizsgáltuk ezen az agyterületen az IGF-1 kezelt és kontroll állatokban ISHH segítségével. Az IGF-1 TH enzim expresszióna és foszforilációna kifejtett hatását *in vitro* vizsgáltuk meg, primer hipotalamikus sejt kultúrákban RT-PCR és Western Blot módszerekkel, utóbbi esetében foszforilációs helyekre specifikus antitesteket alkalmazva.

Az IGF-1 szérumbeli koncentrációna laktációval összefüggő változásait jugularis kanülon keresztül patkány anyákból szoptatás közben vett vérminták ELISA vizsgálatával írtuk le. Az ennek hátterében álló lehetséges szabályozó mechanizmusok feltérképezéséhez ozmotikus minipumpával történő hosszú idejű folyamatos IGF-1 kezelést, valamint icv. kanülon történő gyors beadást használtunk. Ezek hatását vizsgáltuk a szoptatás során mért IGF-1 szérumbeli szintekre.

IV. EREDMÉNYEK

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

Mivel a microarray vizsgálatok során nagy a fals pozitív eredmények aránya, RT-PCR-el megmértük az IGFBP-3 mRNS szinteket laktáló és deprivált anyákban a preoptikus területen. A microarray eredményt sikerült validálni, ugyanis az IGFBP-3 expressziója háromszoros volt laktáló anyákban a depriváltakhoz képest. Emellett ISHH-val is sikerült igazolnunk az IGFBP-3 expresszió fokozódását a MPOA-ban, pontosabban azon belül a nucleus preopticus medialisban (MPN). Az IGFBP-3 mRNS-t kifejező neuronok legnagyobb denzitásban az MPN centralis és medialis, 3. agykamrához közelebbi részén található. Ezen a területen jelentősen megnő az aktív neuronok száma szülés után, illetve szűz nőstényekben is kölykök jelenlétében. Ezért jogosan feltételezhetjük, hogy az IGFBP-3 megemelkedett expressziója szerepet játszik a központi idegrendszer anyai adaptációjában.

2. Az IGF-rendszer szerepe az anyai motiváció szabályozásában

Az IGF-1, illetve az IGFBP ligand inhibitor NBI-31772 folyamatos icv. adagolásával a szabad, effektív IGF-1 mennyiségét növeltük meg direkt módon, illetve indirekt úton, kötőfehérjéjének gátlásával. Az NBI-31772 nagyobb affinitással tud kötödni az IGFBP-hez, felszabadítva az IGF-1-et a funkcionálisan inaktív komplexből. Ez a módszer a preoptikus területen laktáló anyákban nagyobb mértékben termelődő IGFBP-3-at tudta semlegesíteni, rávilágítva a megnövekedett expresszió lehetséges szerepére. A kezelések a kölyök visszahordási tesztben növelték mind az első kölyök felvételéig, mind az összes kölyök fészekbe való visszahordásáig eltelt időt. Ezek az eredmények azt jelentik, hogy az IGF-1 csökkentette az anyai motivációt, mivel a kölyök visszahordása, mint célorientált viselkedés az anyai motiváció indikátora és az anyai adaptáció fontos eleme. Ugyanakkor a spontán anyai viselkedés vizsgálatokor kiderült, hogy az anyai viselkedés egyéb elemeit nem befolyásolta a kezelés, illetve az emelt keresztpalló teszt eredményei azt mutatták, hogy az állatok motoros aktivitása és szorongás-szerű viselkedése sem változott meg. Az, hogy a kölyök-visszahordás károsodása nem járt együtt a spontán anyai viselkedés és gondozás csökkenésével, az anyai magatartás ezen két elemének egymástól elkülönült szabályozásával magyarázható. Az IGF-1 irodalomban ismert szorongáscsökkentő hatását vélhetőleg semlegesítette kísérleteink során az anyai motivációt csökkentő hatás, amely az anyai adaptációval járó szorongáscsökkenést gyengítette. Amíg a szülés körüli hormonális

változások elsősorban az anyai viselkedést irányító neuronhálózatok működését indítják be az MPOA-n keresztül, más kevésbé feltérképezett faktorok felelősek az anyai viselkedés fenntartásáért a posztpartum időszakban. Az általunk vizsgált IGF-rendszer valószínűleg ez utóbbiak közé tartozik és egy új elemet jelent az anyai adaptáció központi idegrendszeri szabályozásában.

3. Az IGF-rendszer laktációt befolyásoló hatásának mechanizmusa

Az anyai adaptáció során létrejövő élettani változások egyik legfontosabb eleme a laktáció, ezért különösen fontosnak tartottuk annak vizsgálatát, hogy az IGF-1 milyen hatással van rá. Rágcsálókban a laktációt a kölykök felől jövő ingerek irányítják, a szoptatás jelentős emelkedést vált ki a szérum prolaktin koncentrációjában. Ozmotikus minipumpákhoz csatlakoztatott icv. kanülök segítségével IGF-1-et, illetve kontrollként ACSF-et adagoltunk laktáló patkány anyák agykamrájába 12 napon keresztül és a szülés utáni 14. napon vizsgáltuk a szoptatás által kiváltott szérum prolaktin emelkedést. Az ACSF-el kezelt kontroll anyákban sikerült megfigyelnünk ezt a szoptatás indukálta kiugró mértékű prolaktin szekréción. Ezzel szemben az IGF-1-kezelt állatoknál ez a prolaktinszint emelkedés szignifikánsan kisebb volt, az IGF-1 jelentősen csökkentette a szoptatás indukálta prolaktin szekréción. A kölykök egy óra szoptatás alatti súlynövekedése is kisebb volt, ami az alacsonyabb prolaktinszint okozta csökkent tejtermelés következménye. Az, hogy az IGF-1 hipotalamikus szinten befolyásolni tudja a prolaktin szekréción, új eredménynek tekinthető.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a prolaktin szekréción hipotalamikus szinten szabályozó TIDA neuronok kifejezik-e az IGFBP-3-at, valamint függ-e az expresszió a laktációtól, az anyai motivációt szabályozó MPOA-hoz hasonlóan. In situ hibridizációs hisztokémiát TH immunhisztokémiával kombinálva sikerült kimutatnunk, hogy a TH pozitív TIDA neuronok expresszálnak IGFBP-3-at. A ko-lokalizációs arányokból az látszott, hogy nem minden TIDA sejt expresszál IGFBP-3-at (67,3%), azonban a nucleus arcuatus dorsomedialis szubdivíziójában megjelenő IGFBP-3 expresszió szinte kizárólag a TIDA sejtekhez köthető (85,9%). Sikerült leírunk IGFBP-3 expressziót a nucleus arcuatus mellett a paraventricularis magban (PVN), ráadásul előbbiben szignifikánsan nagyobb mértékben expresszálódott az IGFBP-3 laktáló anyákban deprivált anyákhoz képest, míg a PVN-ben az expresszió mértéke nem függött a laktációtól. A TIDA sejtekben tehát laktáció során nagyobb mértékben expresszálódik IGFBP-3, feltételezésünk szerint azért, hogy az IGF-1 prolaktin szekréción csökkentő hatásait semlegesítse.

Az IGF-1 TIDA sejtekre kifejtett hatásának vizsgálata során arra az eredményre jutottunk, hogy az IGF-1 fokozta a TH expressziót a TIDA sejtekben laktáló anyákba ozmotikus minipumpa segítségével icv. adagolva, illetve *in vitro* is hasonló hatást tapasztaltunk primer mediobasalis hipotalamikus sejt kultúrákban. Az IGF-1-ről már kimutatták, hogy chromaffin sejtekben növeli a TH mennyiségét, azonban ez a hatás a hipotalamusz dopaminerg sejtjeinél eddig nem volt ismert. Az IGF-1 kötődése receptorához aktiválja a Ras-ERK1/2 intracelluláris jelátviteli útvonalat és az ERK a Nurr1 (nuclear-receptor related 1), illetve az AP-1 (activator-protein-1) segítségével tudja erősíteni a TH gén transzkripcióját. Emellett az IGF-1 a TH foszforilációját is fokozta a Ser31-es foszforilációs helyen *in vitro*, növelve ezzel az enzim aktivitását. Ebből arra következtethetünk, hogy az IGF-1 az ERK1/2 útvonal aktiválásával fokozta a TH enzim működését. Ezáltal a TIDA sejtekben nagyobb mennyiségű dopamin termelődhet IGF-1 hatására. Ez egy gyors, dopaminerg sejteket aktiváló hatása az IGF-1-nek, amit eddig még nem mutattak ki. Az IGF-1 tehát a TH expresszió fokozásával és foszforiláció általi aktivációjával tudja a TIDA sejtek dopamintermelését fokozni és így közvetetten a szoptatás indukálta prolaktin szekréciót csökkenteni.

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

További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogyan változik a szérumbeli IGF-1 koncentrációja a szoptatás alatt. Az IGF-1 képes átmenni a vér-agy gáton és hatni a hipotalamuszban. Ezt a hatást képes az ott termelődött IGFBP-3 lokális szinten befolyásolni. Kimutattuk, hogy az IGF-1 serkenti a TIDA sejtek működését és ezáltal csökkenti a szoptatás indukálta prolaktin szekréciót, ezt a hatását az IGF-1-nek pedig ki kell védeni. Így az volt a hipotézisünk, hogy azért van szükség az emelkedett IGFBP-3 expresszióra, mert az IGF-1 szintje is változik laktáció során. Feltételezésünknek megfelelően kísérleteink során elsőként sikerült leírni a szoptatás indukálta IGF-1 szekréciót, amely 30 perc után éri el csúcspontját és 60 perc után lecseng. Ez az időbeli lefolyás nagyon hasonlít a szoptatás indukálta prolaktin szekrécióra és találtunk is szignifikáns pozitív korrelációt a két hormon szérumbeli koncentrációi között a szoptatás során. A szoptatás kétféle módon is képes indirekt úton indukálni az IGF-1 szekréciót. Egyrészt a szoptatás a GHRH serkentésével GH szekrécióhoz vezet, ami fokozza az IGF-1 felszabadulást és termelődést, másrészt a prolaktin is képes ugyanerre a májban. A szoptatás indukálta IGF-1 szekréciónak élettani jelentősége is lehet tekintettel a bevezetőben említett hipofizeális laktotróf sejteket, illetve az emlőmirigyet érintő pozitív hatásaira.

A szoptatás indukálta IGF-1 szekréció háttérében álló lehetséges szabályozó mechanizmusokat is megvizsgáltuk. Hosszabb időn keresztül folyamatosan adagoltunk IGF-1-et icv., ozmotikus minipumpa segítségével, ahogy tettük azt korábbi kísérleteink során. Ez a krónikus IGF-1 beadás gyakorlatilag megszüntette a szoptatás indukálta IGF-1 szérumszint-emelkedést. Bár 60 perc után szignifikánsan magasabb volt az IGF-1 koncentráció, mint a szoptatás kezdetekor, kérdéses hogy ez az emelkedés biológiailag is szignifikáns-e, azaz a szoptatás indukálta csúcs csak megkésett, vagy pedig ez csak egy fiziológias ingadozás következménye. A 60 percnél későbbi hatások feltérképezéséhez további kísérletek szükségesek. A krónikus IGF-1 adagolás kifejthette ezt a hatást a GH vagy a prolaktin szekréció csökkentésén keresztül is. A növekedési hormon tengelyen belül az IGF-1 negatív visszacsatolással hat a GH-ra, azt pedig saját kísérleteinkből tudjuk, hogy az IGF-1 csökkenti a szoptatás-indukálta prolaktin szekréciót is.

Az IGF-1 beadása közvetlenül a szoptatás kezdete előtt ezzel szemben hatástalannak bizonyult: nem hatott a szoptatás indukálta IGF-1 és prolaktin szekrécióra. Mindemellett a szoptatás indukálta IGF-1 és prolaktin szekréció görbéje más lefutást mutatott még a kontroll állatokban is, mint icv. beadás nélkül, vagy krónikus beadás esetén. Már 15 perccel a szoptatás kezdete után szignifikáns emelkedést tapasztaltunk mindkét hormon esetében és ez a magas szint megmaradt 60 perc után is. Ezt a görbék lefutásában tapasztalt különbséget magyarázhatja az akut icv. beadás okozta stressz: meg kell fogni az állatokat, változik a liquor mennyisége rövid idő alatt. A stressz fokozhatja a prolaktin szekréciót, ami a kortikoszteronnal együtt hozzájárulhat az IGF-1 szint magasán tartásához 60 percnél hosszabb ideig.

Tehát a szoptatás akár a prolaktin, akár a GH szekréció fokozásán keresztül indukálhatja az IGF-1 szérumbeli koncentrációjának emelkedését. Ezt a centrálisan, krónikusan adagolt IGF-1 képes gátolni vagy a TIDA sejtek dopamintermelésére hatva a prolaktin közvetett gátlásával, vagy pedig a GH-ra hatva negatív visszacsatolással. A szoptatás következtében tapasztalható magasabb IGF-1 szérumszint kedvező hatással van a hipofízis laktotróf sejteinek prolaktintermelésére, illetve az emlőmirigy tejelválasztására, vérkeringésére és lobulo-alveolaris epithelsejteinek túlélésére. A hipotalamuszban azonban a TIDA neuronokban serkentené a TH enzim expresszióját és foszforiláció általi aktiválódását, ezáltal a dopamintermelést, ami viszont a hipofízis prolaktin szekrécióját gátolná. Ennek a hatásnak a kivédéséhez van feltehetőleg szükség laktáció során nagyobb mennyiségű IGFBP-3 expresszióra a TIDA sejtekben. Ez a hipotézis egy különleges neuroendokrin szabályozási

formára világít rá: neuronok képesek egy adott hormon rájuk irányuló hatásait gátolni oly módon, hogy megnövelik kötőfehérjéjük kifejeződését.

V. KÖVETKEZTETÉSEK

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

VI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Az értekezés témájában megjelent publikációk

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

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

2. Egyéb, az értekezéshez fel nem használt publikációk

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

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

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek és mentoromnak, Dr. Dobolyi Árpádnak a fáradhatatlan odafigyelésért, iránymutatásért és azért, hogy saját idejét és energiáját nem kímélve, nagy türelemmel segítette tudományos munkámat. Hálával tartozom tanításáért Palkovits Mikós Professzor Úrnak, a munkahelyi jó, baráti hangulatért és hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért Dr. Borsicsné Szabó Éva Rebekának, Dr. Dobolyiné Renner Évának, Toronyay-Kasztner Magdolnának és Dr. Pál Gabriellának a labor dolgozóinak, kutatóinak. Külön köszönöm Dr. Vitéz-Cservenák Melindának a kutatásban nyújtott segítséget és a tőle tanult módszereket, Deák Szilviának segítségét az állatokon történt minden beavatkozásban. Nagyon hálás vagyok Hanák Nikolettnek, aki segített minden laboratóriumi munkában, mellettem állt az első pillanattól kezdve. Köszönettel tartozom Dr. Alpár Alánnak, Dr. Hanics Jánosnak és Németh Andreának az in vitro kutatásokban nyújtott segítségükért. Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni Édesanyám, Édesapám és Feleségem szeretetét, támogatását és hogy mind sikereimben, mind nehézségeimben mellettem álltak és állnak mindenkor.