

**A prolactin szekréció és tejhozam szabályozásában
résztevő agyi struktúrák neuroanatómiája és
funkciója**

Dr. Szabó Flóra

PhD tézisek

**Témavezető: Dr.Köves Katalin egyetemi tanár, MTA
doktora**

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doctori Iskola
Idegtudományok Program

Doktori Iskola elnöke: DR. Bereczki Daniel egyetemi tanár, MTA doktora.
Program vezető: Dr. Liposits Zsolt egyetemi tanár, MTA doktora

Budapest, 2012

BEVEZETÉS

Az emlősök újszülötteiket az emlőben termelt tejjel táplálják. A tejelválasztást laktációnak nevezzük. Ennek a folyamatnak két fő fázisa van: 1. a tejelválasztás kezdete a laktogenezis, 2. fenntartása a galaktopoézis. Ezt a fázist patkányban középlaktációnak nevezzük. A tejürítés legfontosabb ingere a szopás. Ezt a reflexmechanizmust tejkilövellésnek nevezzük. A tejelválasztásért a prolaktin (PRL), a tejkilövellésért az oxitocin (OXY) felelős.

IRODALMI HÁTTER

A PRL biokémiája

A patkány PRL fehérje hormon. 197 aminosavból álló polipeptid lánc. Molekula súlya 23 kD. Először a hipofízisben fedezték fel. Génje a 17. kromoszomán található. Humán szérumban két nagy molekula súlyú formáját is leírták (makro vagy big-big PRL, 100 kD és big PRL, 40-60 kD). Klinikai jelentőségük nem tisztázott, valószínűleg ezek felelősek a hiperprolaktinémiáért.

PRL termelő struktúrák

A hipofízisben acidofil sejtek termelik a PRL-t. Ezeket a sejteket mammo- vagy mammoszomatotropoknak nevezzük. Laktáció alatt a mammotrop sejtek hipertrofizálódnak. Az utóbbi 30 évben a hipofízisen kívül több mint tíz szövetben írtak le PRL-t és PRL-szerű immunreaktivitást vagy PRL mRNA-t. Ezek a placenta, uterus, immunrendszer, emlőmirigy, sárgatest, prostata, testis, urethralis, könny- és verejték mirigyek, pankréasz sziget, és végül az agy.

PRL receptor (PRL-R)

Az emlőmirigy a legfontosabb célszövet. Hipofízisben a legmagasabb PRL-R szintet szomatotropokon találták, csökkenő számban laktotropokon, tirotropokon, kortikotropokon és végül gonadotropokon.

A PRL szekréció szabályozása

Everett (1954, 1956) több mint 50 évvel ezelőtt leírta, hogy más szövetbe transzplantált hipofízis hipotalamikus kapcsolat nélkül fenntartja a sárgatestet és az áterhességet. Ebből arra következtetett, hogy van egy hipotalamikus faktor, ami a portális vérbe ürül, és gátolja a PRL szekréciót. Hamarosan kiderült, hogy ez a faktor a dopamin (DA). A DA egy katekolamin neurotranszmitter. Számos neuron neurohormonként használja. Ezek a neuronok tirozint vesznek fel, és ezt a tirozin hidroxiláz (TH) dihidroxi-fenilalaninná alakítja. Ez a DA közbeeső prekursora. Ebből lesz a DA. Más neuronokban a DA a noradrenalin előanyaga. A DA számos agyi struktúrában termelődik, többek között a nucleus arcuatusban (ARC). Ennek a magnak fontos szerepe van a PRL szekréció szabályozásában. A hipotalamuszban rosztro-kaudális irányban három sejtcsoport található: 1. periventrikulo-hipofizeális dopaminerg (PHDA), 2. tubero-hipofizeális dopaminerg (THDA), és 3. tubero-infundibuláris dopaminerg (TIDA) rendszer. Ez utóbbi pálya eredő sejtjei a periventrikuláris – ARC régióban vannak. A PHDA neuronok legrosztrálisabban vannak, és a hipofízis közti-lebenyében végződnek. A THDA neuronok a középső régiót foglalják el, és a közti- és hátsó lebenyben végződnek. A TIDA neuronok középen és hátul vannak, és az eminentia mediana (EM) külső zónájában lévő kapillárisok körül végződnek. Nem laktáló állatokban ezek a neuronok DA-t termelnek, és folyamatosan a hipofízis portális keringésébe ürítik. A DA a laktotropok D2 receptorain hatva gátolja a PRL kidobást. Amikor a DA kidobás gátolt, a PRL gyorsan ürül a portális keringésbe. A PRL szekréciót a DA sejteken keresztül számos stimulus, stressz, szexuális aktivitás és az emlő ingerlése szabályozza.

Nagy számú bizonyíték áll rendelkezésre, hogy az emlő ingerlése a TIDA neuronális aktivitás és így a PRL szekréció legerélyesebb regulátora. Laktáló emlő 3 perces elektromos stimulusa 63 %-os csökkenést eredményez a hipofízis nyél és az EM DA szintjében megelőzve a plazma PRL szint emelkedést.

A legintenzívebben tanulmányozott neuroendokrin reflex, amely felelős a tejtermelésért a “suckling induced PRL release (SIPR)”. A legfőbb gátló faktor a DA. A szopás kezdetén a szopási stimulus eléri a hipotalamuszt és gátolja a

TIDA neuronokat, így lehetővé teszi a PRL kidobást a hipofízisből az általános keringésbe, és a PRL stimulálja a tejszékreciót az emlőmirigyben.

A pálya lefutása az emlőmirigyből a mediális bazális hipotalamusz neuronjaihoz csak részben ismert. Ez a pálya serkenti a megno celluláris hipotalamo-hipofízis rendszer OXY termelő neuronjait is. Korábbi vizsgálatok igazolják, hogy a PRL és OXY kidobás nem egymástól független folyamat. Az emlőbimbó mechanoreceptorait a szopási stimulus ingerli, az ingerület a gerincvelő hátsó szarván keresztül eléri az azonos oldali nyaki gerincvelő oldalkötegében lévő nucleus cervicalis spinalist. Innen tovább halad a középagy rostrális részének tegmentumába, majd eléri a hipotalamuszt. Korábbi vizsgálatok szerint a corpus geniculatum mediale, a hátsó intralamináris thalamikus magok és a pedunculus cerebri között lévő nucleus peripeduncularis (PPN) az egyik fontos közvetítője a szopási stimulusnak, amely elengedhetetlen a tejkidobáshoz. Ennek a magnak a stimulusa PRL kidobást is eredményez. Medialisabb terület ingerlése is PRL kidobást eredményezett. Nem világos, hogy itt lévő neuronok, vagy csak átfutó rostok ingerlése történt. Fontos tisztázni, hogy a PPN vagy a tőle medialisán lévő subparafascicularis parvocelluláris mag (SPFpc) az átkapcsoló állomás.

A kutatók egy további átkapcsoló neuron létét is feltételezik az OXY és TIDA sejtcsoporthoz. Miután a szopási stimulus ingerli az OXY neuronokat, de gátolja a TIDA neuronokat, a pályának valahol szét kell válnia. Léziós kísérletek arra utalnak, hogy ez a szétválás a középagy és a hipotalamusz között történik.

Korábbi vizsgálatok arra utalnak, hogy a szopási stimulus c-Fos expressziót eredményez néhány agytörzsi struktúrában. Ez felveti lehetőséget annak, hogy ezek a struktúrák résztvesznek a szopási stimulus átkapcsolásában. Li és mtsai (1999) leírták, hogy a fluorogold tracer (FG) az ARC-ba fecskendezve retrográd transzportálódva megjelenik az agytörzs azon struktúráiban, ahol a c-FOS expresszió megjelent, azaz a PPN-ben és a nyúltvelő ventrolateralis sejtcsoportjában (VLM). Ebben a tanulmányban a tracer az ARC szélein túlterjedt.

Egyes sejtcsoportokban, amelyek a SIPR pálya átkapcsoló állomásai lehetnek, néhány neuropeptidet írtak le. Az ARC ventrolateralis részében, más peptidek között, dinorfint (DYN) találtak. Az SPFPc a tuberoinfundibuláris peptid (TIP39) forrása (Dobolyi és mtsai 2003). Ezt a peptidet a tuberoinfundibuláris régióból izolálták, ahol sejttesteket nem, de sűrű TIP39 rosthálózatot írtak le. Calcitonin gén-related peptid (CGRP) pozitív sejtek találhatóak a PPN-ben és az SPFPc-ben. Ebben a régióban sűrű galanin (GAL) rosthálózatot is leírtak.

Számos kutató vizsgálta a szopási stimulus hatását a DA turnoverre és kidobásra. Megfigyelték, hogy a szopás kezdetén a DA turnover és kidobás jelentősen csökken (Wang és mtsai 1993). A TIDA neuronokban a TH mRNA expressziója nagyon dinamikus, tükrözi a szopási stimulus változásait. Berghorn és mtsainak (2001) vizsgálatai szerint a szopás befejezése után másfél órán belül a TIDA neuronokban a TH mRNA expressziója megkezdődik, helyenként megjelenik a heteronukleáris mRNA a TIDA neuronok magjában, a citoplazmatikus TH mRNA növekedése a szopás befejezése után 6 órán belül válik nyilvánvalóvá. Az mRNA szintek 12-24 óra múlva érték el a legmagasabb szintet. A megnövekedett protein szintézist az EM-ben 6 óra múlva figyelték meg (Berghorn és mtsai 1995). Ezekből az adatokból nem világos, hogy az mRNA expresszió korai jele egy trigger mechanizmust képvisel, vagy ezeknek a neuronoknak folyamatos ingerlése kell a TH szint emelkedéshez.

Egy másik faktor, aminek expressziója változik nem-laktáló és laktáló állatokban, az enkefalin (ENK). Ciklusos állatokban alig van ENK, azonban laktáló állatokban dramatikusan megnő az ARC-ben és az EM-ben. Irodalmi adatok szerint az emelkedett ENK szint idézi elő a laktációs hiperprolaktinémiát. Azonban így sem teljesen világos, hogy mi a szerepe laktáció alatt az ENK-nek a TIDA neuronokban. Az irodalmi adatok szerint, bár a TH szint jelentősen csökken, ez nem jelenti azt, hogy más anyagot nem tudnak ezek a sejtek szintetizálni.

Az emlő mirigy autonóm beidegzése

Az emlőbimbó és az emlőmirigy nemcsak érző, hanem autonóm beidegzéssel is rendelkezik. A tejszekréciót a PRL tartja fenn, míg a tejkilövellésért az OXY felelős, azonban a szopás kezdetén a tejhozamot noradrenerg hatás befolyásolja. Findlay és Grosvenor (1969) leírták, hogy katekolaminok csökkentik a tejhozamot a szopás kezdetén antagonizálva az OXY hatását. β -adrenerg blokkoló propranolol intracerebroventrikulárisan (*icv*) adva növelte a tejhozamot (Morales és mtsai 2001). Feltételezték a szerzők, hogy a β -adrenerg blokkoló tette lehetővé az OXY hatását az emlő kivezetőcsöveire, létrehozva a tejkilövellést. A gerincevelő átvágása a T3 és T4 segmentumok között és farmakológiai szimpatektómia, de nem az adrenalektómia vagy hipofizektómia, növelte a tejhozamot. A fenti eredmények arra utalnak, hogy a tejhozamot a szopás kezdetén egy reflex mechanizmus szabályozza, ami a központi idegrendszerben zárul. Az afferens szár a SÍPR pálya lehet, az efferens szarát a pre- és posztganglionáris neuronok képviselhetik, amelyek a gerincevelő nucleus intermedio-lateralisban az oldalszarvban illetve a truncus sympathicusban helyezkednek el. A centralis átkapcsoló állomás vagy állomások az agytörzsben és a hipotalamikus nucleus paraventricularisban (PV) lehetnek.

Jól ismert, hogy a posztganglionáris paraszimpatikus idegrendszer kolinerg neuronokból áll. Kolinerg neuronok képezik egy kis részét a szimpatikus postganglionáris neuronoknak is, ezek verejtékmirigyeket idegeznek be (Landis és Fredieu 1986; Schafer és mtsai 1997). Az emlő autonóm beidegzését transzinaptikus vírus jelöléses technikával vizsgálták Gerendai és mtsai (2001), azonban az nem tisztázott, hogy milyen neurotranszmitterek közvetítik a szimpatikus stimulust az emlő régiójához, ezek vajon kolinergek vagy adrenergerek.

CÉLKITŰZÉSEK

A SIPR pálya morfológiai vizsgálata

A vizsgálatoknak az volt a célja, hogy tovább tisztázzuk, vajon a középagyból felszálló pálya az ARC-ben vagy annak szomszédságában átkapcsolódva éri el a TIDA neuronokat, és ezeknek a középagyból felszálló rostoknak az eredete valóban a PPN. Vizsgáltuk azoknak a hipotalamikusan és középagyban elhelyezkedő neuronoknak kémiai természetét, amelyek résztvesznek a pálya kialakításában.

Élettani vizsgálatok

Összehasonlítottuk laktáló anyák TIDA neuronjaiban a TH és ENK mRNA expresszió változásának dinamikáját a szopás 3-4 órás megszakítása után. Tisztázni kívántuk 1) vajon egy rövid megszakítás teljes up-regulációt eredményez, amely tart egy darabig a kölykök visszaadása után (Hipotézis I), vagy vajon a szopás újratekzdése azonnal leállítja az upregulációs folyamatot mint egy kapcsoló (Hipotézis II). Szintén vizsgáltuk 3) vajon az ENK expresszió időbeli lefolyása ellentétes mintát mutat-e mint a TH mRNA expressziója, és 4) vajon az ENK expresszió összhangban van-e az ENK peptid szintézissel.

A TH expresszió folyamatát 24 órán át követtük a kölykök visszaadása után. A változás dinamikáját összehasonlítottuk olyan anyákkal, amelyek kölyküket nem kapták vissza. Ugyanezekben az állatokban vizsgáltuk az ENK mRNA szinteket és az ENK peptid változását az EM-ben. ENK esetében még két csoportot képeztünk, és ezeket 48 és 72 óra múlva áldoztuk fel.

Az emlő autonóm beidegzésének vizsgálata

A kísérlet célja volt tovább tisztázni az autonóm neuronális láncot, amely beidegzi az emlőbimbót és az emlőmirigyet laktáló állatban. Transzsinaptikus retrográd vírus jelölést használtunk, és kémiaileg jellemeztük a neuronális lánc tagjait, amelyek a szopás kezdetén résztvehetnek a tejhozam szabályozásában

MÓDSZEREK

Kísérleteinkhez Sprague-Dawley nőstény patkányokat használtunk. A SIPR pályát ciklusos nőstényeken tanulmányoztuk, a másik két kísérlethez primipara középlaktáló állatokat használtunk.

SIPR pálya tanulmányozása nem transzinaptikus tracerek és immunfestések segítségével

I. Kísérlet (7 állat). Hogy megvizsgáljuk a PPN neuronjainak hipotalamikus kapcsolatát biotinált dextrán-amine (BDA) tracer anterograd transzportját hasznosítottuk. A BDA-t iontoforetikusan adtuk be a PPN régióba. 10-14 nappal később az állatokat akrolein tartalmú paraformaldehiddel perfundáltuk. A hipotalamuszt kivágtuk, utánfixáltuk, majd krioprotektánsal kezeltük. Kriosztáton 25 µm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteket biotin antitesttel inkubáltuk. Az antigen-antitest kötés helyét ABC Elit Kit és nikkell intenzifikált diaminobenzidín-tetrahidroklorid (DAB) segítségével tettük láthatóvá. A metszetekben jelölt rostokat kerestünk a mediális bazális hipotalamuszban.

II. Kísérlet (5 állat). Ebben a kísérletben fluorogold (FG) retrograd transzportját hasznosítottuk. A FG-t iontoforetikusan jutattuk be a ARC-be. A metszeteket FG antitesttel inkubáltuk. Az antigen-antitest kötés helyét ABC Elit Kit és nikkell intenzifikált DAB segítségével tettük láthatóvá. Jelölt sejteket kerestünk a peripedunkuláris régióban.

Hogy felderítsük a kapcsolatot a ARC DYN és TIDA neuronjai és a felszálló BDA rostok között, BDA és TH, illetve BDA és DYN kettős festést használtunk ABC Kit segítségével. Hogy bemutassuk, van-e kapcsolat a FG és a peripedunkuláris régió CGRP és GAL idegelemei között FG és CGRP, illetve FG és GAL kettős festést alkalmaztunk ABC Kit segítségével. A FG és a TIP39 közti kapcsolatot kettős immunfluoreszcens módszer segítségével vizsgáltuk.

TH és ENK expresszió TIDA neuronokban *in situ* hibridizáció és immunfestések segítségével, ENK immunfestés

A kísérleti állatok kölykeit szülés után nyolcra redukáltuk. Az anyákat három csoportba osztottuk. Minden vizsgált időpontban 5-6 állat szerepelt.

I. Csoport. Az anyák folyamatosan szoptak a kísérlet egész időtartama alatt.

II. Csoport. A kölyköket elvettük az anyáktól, majd azokat 3-4, 7-8, 10-12, 16-20 vagy 24-28 óra után áldoztuk fel.

III. Csoport. A kölyköket 4 órára távolítottuk el (amikor a heteronukleáris TH mRNA egyértelműen up-regulációs stádiumban van), majd a kölyköket visszaadtuk az anyáknak. Az állatokat ezt követően 3-4, 6-8, 12-16 vagy 20-24 óra múlva áldoztuk fel. ENK esetében (mivel korábbi vizsgálatok lassú expresszió csökkenést jeleztek) még két csoportot öltünk meg 48 és 72 órával később.

IV. Csoport. Diösztrusz stádiumában lévő ciklusos nőstény állatokban is megvizsgáltuk az ENK mRNA expressziót.

Az állatokat általános altatásban paraformaldehid és akrolein keverékével fixáltuk. Az agyakat kivettük, utánfixáltuk, majd a hipotalamuszokat kivágtuk. Krioprotektáns cukor oldattal kezeltük, és fagyaszító mikrotómmal 25 μm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteket etilén-glikol oldatban tároltuk -20°C -on. A metszetek így akár 12 évig is tárolhatók az mRNA szint megtartása mellett. Az *in situ* hibridizációt biotinált riboprobe-bal végeztük. A TH mRNA jelenlétét anti-biotin ellenanyaggal történő immunfestéssel tettük láthatóvá. Az ENK peptidet az EM-ben immunfestéssel mutattuk ki.

mRNA képanalízis

Az ARC reprezentatív areáját tartalmazó három metszetet analizáltunk minden állatból. A metszeteket Nikon Eclipse 800 mikroszkóppal vizsgáltuk, amelyhez Cooke kamerát csatlakoztattunk. A végső analízist Macintosh G4 computerre telepített IP Spectrum Software (Vienna, VA) segítségével végeztük. Minden egyes TH vagy ENK mRNA-t tartalmazó sejt optikai denzitását (OD) egyenként határoztuk meg.

ENK peptid immunreaktivitás képanalizise EM-ban

Minden állatból az EM három metszetét tanulmányoztuk. A metszeteket Nikon Eclipse 800 mikroszkóppal vizsgáltuk, amelyhez Cooke kamerát A végső analízist Macintosh G4 computerre telepített IP Spectrum Software (Vienna, VA) segítségével végeztük.

Adat analízis

A TH és ENK mRNA *in situ* hibridizáció és az ENK immunfestés eredményeit One-way-Anova és Tukey-Kramer post hoc analízissel elemeztük.

Az emlő autonom beidegzésének tanulmányozása transzsinaptikus tracer és immunfestések segítségével

Négy Wistar és 9 Srague-Dawley első szülő 2-3 hónapos anyát használtunk a 7-15. napon szülés után. A kölykök számát nyolcra redukáltuk. Az anyák green fluoreszcens proteinnel (GFP) jelölt vírust kaptak 2 μ l fiziológiás sóoldatban (8x10⁸ plakk formáló egység). A vírust a jobb oldali első és második emlőbimbóba és emlőmirigybe fecskendeztük. Az állatokat a vírus beadása után 2-4 nappal áldoztuk fel.

A vírus készítése (Boldogkői és mtsai 2000)

Genetikusan módosított pseudorabies vírus törzset (PRV) használtunk (memGreen-PVR). A vad típusú Kaplan PVR törzsből eltávolították a gE és GI gént, és így a vírus csak retrográd módon tud terjedni. Az eltávolított gének helyére GFP-t kódoló kazettát építettek be. Így a vírus jelölt sejtek fluoreszcens mikroszkóp alatt könnyen felfedezhetők.

A vizsgálandó szervek előkészítése

Az állatokat a kísérleti periódus végén általános altatásban 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk. Kivettük a jobb oldali második emlőbimbót és az alatta lévő emlőmirigy szövetet, a jobb truncus sympathicus felső két thoracalis ganglionját, a gerincvelő felső thoracalis szakaszát és az agyat. A kivett

szerveket előkezeltük krioprotektáns cukor oldattal, majd Cryomatrixba ágyasztuk. Kriosztáton 20 μm vastag metszeteket készítettünk. A metszetekben GFP jelölést kerestünk, ami a retrográd transzportált vírus jelenlétére utalt.

Immunfestés

A truncus sympathicus és a gerincvelőt megfestettük dopamin-- β -hidroxiláz (DBH) és vezikuláris acetilkolin transzporter (VAcHT) ellenanyaggal, a nyúltvelőt DBH ellenanyaggal, a hipotalamuszt OXY ellenanyaggal, az emlőbimbót és az emlőmirigy szövetet S-100 (a perifériás idegek Schwann-hüvelyében jelenlévő fehérje), VAcHT, DBH és CGRP ellenanyaggal. Az antigén-antitest kötés helyét immunfluoreszcens módszerrel vagy ABC Elit Kit használatával tettük láthatóvá.

Specificitási teszt

A primér antitest elhagyása után immunfestés nem volt. Az ellenanyagokkal megfestettünk olyan szöveteket, ahol az immunfestés valós jelenlétét korábban igazolták.

EREDMÉNYEK

I. A SIPR pálya morfológiai tanulmányozása

1. Kísérlet. Anterográd tracer (BDA) középgyba adása.

1/1. A középgyag és az ARC közti kapcsolat. Kizárólag a PPN-be történő BDA beadás után az ARC-ben nem találtunk jelölést, azonban jelölt rostokat láttunk a nucleus ventromedialisban. Ha a tracer beadás helye a PPN-től medialisban, az SPFPc területén volt, akkor az ARC-ben jelölt rostok voltak.

1/2. A középgyagból származó és az ARC-ben lévő DYN neuronok közti kapcsolat. A BDA rostokat tartalmazó hipotalamikus metszetekben az ARC ventrolateralis részében lévő DYN festett neuronokon számos BDA rostot találtunk szoros kontaktusban a sejttesttel. A DYN neuronok TIDA neuronokat idegeznek be az ARC dorzomediális részében.

2 Kísérlet. Retrográd tracer (FG) beadása az ARC ventrolateralis részébe. Ezekben az állatokban FG jelölt sejteket találtunk a SPFPc területén.

2/1. FG és CGRP kettős festés után a FG tartalmú sejtek egy része CGRP immunreaktivitást is mutatott.

2/2. FG és TIP39 kettős festés után a FG tartalmú sejtek egy része TIP39 immunfestést is mutatott.

2/3. FG és GAL kettős festés után nem találtunk GAL-t FG jelölt sejtekben.

II. Élettani vizsgálatok

TH mRNA kvantitatív analízise az ARC-ben OD méréssel

A TH mRNA szintek már 6 órával szignifikánsan magasabbak voltak azokban az anyákban, amelyek nem kapták vissza kölykeiket (II. Csoport), mint azokban, amelyek folyamatosan szoptattak (I. Csoport). A TH mRNA szintek tovább emelkedtek, és magasak voltak 28 órával később is. Ha a kölykök visszakerültek az anyákhoz négy órás elkülönítés után (III. Csoport), a TH mRNA szintek magasabbak voltak, mint a folyamatosan szoptató anyákban még 20-24 óra múlva is, bár a TH mRNA értékek csökkentek azokhoz képest, amelyek kölykeiket egyáltalán nem kapták vissza (III. Csoport v. II. Csoport). Ez azt jelenti, hogy a kölykök visszaadása után megkezdődött a TH mRNA csökkenése, de nem érte el a folyamatosan szoptatók szintjét.

ENK mRNA kvantitatív analízise az ARC-ben OD méréssel

Az ENK mRNA analízise azt mutatta, hogy az mRNA OD gyorsan emelkedik a szopási stimulus megszűnte után, és 6 órával a kölykök elvétele után szignifikánsan magasabb, mint a folyamatosan szoptató anyákban. A legmagasabb szintet 7-8 óra múlva érte el, majd fokozatosan csökkent a folyamatosan szoptatók szintjére. A kölykök visszaadása 4 óra múlva, és így a szopási stimulus újra indulása után az ENK mRNA szint növekedő tendenciát mutatott, bár az értékek nem voltak szignifikánsan magasabbak, mint a folyamatosan szoptató anyákban. Az ENK mRNA értékek nem voltak szignifikánsan magasabbak folyamatosan szoptató anyákban, mint ciklusos nőstényekben a második diösztruszos napon.

A TH és ENK mRNA expresszió szövettani képe alátámasztja a kvantitatív mérés adatait. Folyamatosan szoptató anyák ARC-jének dorzomedialis részében csupán néhány TH expresszáló sejtet figyeltünk meg. Az expressziót jelző ezüstszemcsék nagyon halványak voltak. Huszonnégy órával a kölykök kimozdítása után a TH mRNA expresszió nagymértékben megemelkedett. Az ENK mRNA nagyon alacsony volt diösztruszban, de magasabb volt folyamatosan szoptató anyákban, és extrémén megemelkedett a kölykök kimozdítása után 8 órával.

Az ENK peptid kvantitatív analízise és szövettani képe az EM-ben

Az ENK immunfestés nagyon gyenge volt diösztruszos állatokban, és jelentősen megemelkedett folyamatosan szoptató anyákban, ahogy azt az OD változás már jelezte. Az OD emelkedése statisztikailag szignifikáns volt. Három-négy órával a kölykök kimozdítása után az EM peptid tartalma esett, és a kísérleti periódus végére elérte a diösztruszos szintet. A csökkenés 16 óra múlva már szignifikáns volt.

Amikor megvizsgáltuk az ENK peptid nagyságrendbeli változását az EM-ben, azt találtuk, hogy a folyamatosan szoptatókban kb. 9-szer magasabb volt, mint a diösztruszos állatokban, és a kölykök kimozdítása után folyamatosan esett.

III. Az emlő autonom beidegzése

Vírus jelölés az idegrendszer különböző szintjein

Amikor az állatokat két nappal a vírus beadás után áldoztuk fel, GFP jelölést találtunk az azonos oldali felső paravertebrális szimpatikus ganglionokban. A megfelelő ventrális gyökérszálakban jelölt rostokat láttunk. A gerincvelőben az azonos oldali oldalszár nucleus intermediolateralisban találtunk vírus jelölt sejteket. Tekintélyes számú jelölt sejt volt a Th2-Th5 szegmentumokban, és csak néhány a Th6 szegmentumban. Ezen szint alatt jelölést nem találtunk.

Amikor az állatokat a vírus beadás után három nappal áldoztuk fel, néhány jelölt sejtet az agytörzsben és a hipotalamuszban is láttunk.

Amikor az állatokat a vírus beadás után négy nappal áldoztuk fel, sok jelölt sejtet találtunk a medulla oblongata ventrolateralis részében, és szétszórt jelölt

sejteket néhány agytörzsi struktúrában, a locus ceruleusban, raphe magokban és az aqueductus cerebri körüli szürkeállományban. Sok jelölt sejt volt az azonos oldali PV-ben és kevés a túloldalon.

A vírus jelölt neuronok kémiai természete a PvG-ben

A PvG-ben sok kicsi DBH immunreaktív és néhány nagy VAcHT immunoreaktív neuront találtunk, és nagyon sűrű VAcHT rostozatot figyeltünk meg. GFP jelölt idegsejt testek DBH immunreaktivitást mutattak. A DBH immunreaktív anyag kitöltötte a sejtek citoplazmáját.

Az idegrostok kémiai természete az emlő mirigyben

Az emlőmirigy és az emlőbimbó ereit DBH rostok idegzik be, azonban DBH rostokat az alveolusok között és a kivezetőcsövek falában nem találtunk. VAcHT immunreaktív rostokat sem az erekben, sem az alveolusok között, sem a kivezetőcsövek falában nem találtunk.

MEGBESZÉLÉS

I. SIPR pálya morfológiája

A PPN területére szorítókozó BDA beadás nem jelölt rostokat az ARC-ben, jelölt rostok az ARC közelében és a nucleus ventromedialisban voltak. Ennek ellenére a PPN fontos szerepet tölthet be a laktációban. Szopási stimulus aktiválja a neuronokat, de ennek hiányában a kölykök látása, hangja és szaga is. A PPN féloldali léziója a szülés utáni hetedik napon károsította a laktációt, ami a szerzők szerint károsított OXY aktivitásnak tudható be (Factor és mtsai, 1993). A közepagyi tegmentum féloldali átvágása a PPN felett gátolta a tej kilövellést (Wang és mtsai 1996).

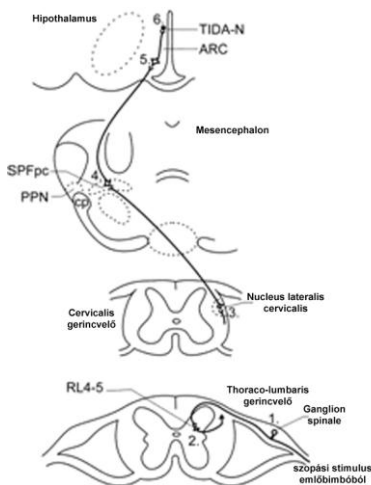
Saját vizsgálataink arra utalnak, hogy a PPN és a nucleus ventromedialis között van közvetlen neuronális kapcsolat. A nucleus ventromedialisnak fontos szerepe van a táplálék felvételben és viselkedésben. Ez azt jelenti, hogy a PPN

közvetíti a szopási stimulust a maghoz, és ez a szopatás alatti fokozott táplálékfelvételt szabályozza.

A SPFPc horizontálisan elnyúlt sejteket tartalmaz, fedi a lemniscus medialis. Az SPFPc területére szorítózkodó BDA beadás jelölt rostokat eredményezett az ARC ventrolateralis részében. Ez arra utal, hogy a két mag között közvetlen neuronális kapcsolat van, ugyanakkor BDA rostok nem lépnek közvetlen kapcsolatba TIDA neuronokkal. Az ARC neuronok valószínűleg átkapcsoló állomást jelentenek a TIDA neuronok felé. Korábbi irodalmi adatok szerint a TIDA neuronok 70 %-át DYN axonok idegzik be (Fitzsimmons és mtsai 1992). A SPFPc magból felszálló BDA rostok DYN neuronokkal alkottak szoros kontaktust, feltételezve a köztük lévő szinaptikus kapcsolatot.

A ARC területére szorítózkodó FG retrograd tracer beadása után jelölt sejteket találtunk a SPFPc-ban, ahol Dobolyi és mtsai (2003) TIP39 neuronokat írtak le, ezen neuronok egy része CGRP-t is tartalmazott. A FG jelölt sejtek részben TIP39-t, részben CGRP-t tartalmaztak.

Összefoglalva vizsgálati eredményeinket úgy tűnik, hogy a SIPR pálya kapcsoló állomása nem a PPN, hanem a SPFPc. Az ábrán feltüntetett módon a pálya 6 neuronból áll:



1) ganglion spinale (DRG), 2) gerincvelő hátsó szarva (Rexed lamina 4-5), 3) lateralis cervicalis nucleus (LCN), 4) SPFpc, 5) ARC ventrolaterális része, és 6) végül TIDA neuronok. Nincs kizárva, hogy még egy relé neuron van az ARC-ben.

II. Élettani eredmények: szopási stimulus hatása a TH és ENK mRNA szintekre

Élettani eredményeink megerősítik azt a feltevést, hogy a szopási stimulus a legfontosabb regulátora a TH expressziónak TIDA neuronokban. Ciklusos diösztruzos patkányokban a TH mRNA szint kb. tízszer magasabb, mint folyamatosan szoptató anyákban. Korábbi tanulmányok szerint a TH mRNA szint a kölykök kimozdítása után már 1.5 óra múlva emelkedett, és a heteronukleáris RNA szint 3 óra múlva csúcserőket mutatott, azután csökkent, ahogy az emelkedés megindult a citoplazmában. Így a kölykök négy órás kimozdítása után a TIDA neuronok egyértelműen upregulációs stádiumban voltak.

Eredményeink azt mutatják, hogy a TH mRNA upreguláció a kölykök visszaadása után, amikor a szopási stimulus az emlőbimbóból eléri az ARC-t, nem szűnik meg azonnal. A transzkripció upreguláció programja nagyon lassan kezd csökkenni 10-12 óra múlva a kölykök visszatérése után, és a csökkenés csak 16 óra múlva válik szignifikánssá azokhoz az anyákhoz képest, amelyek kölykeiket nem kapták vissza. Azoban a TH mRNA szint a kísérlet végéig magasabb maradt, mint a folyamatosan szoptató anyákban. Bár teoretikusan azt reméltük, hogy a kölykök visszaadása után a TH mRNA visszatér a folyamatosan szoptatók szintjére, után a TH mRNA félideje 6 óra (Maurer és Wray 1997). Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a TH mRNA-t termelő gépezet stabilitása az újra szoptatás alatt megváltozik.

Az endogén opioidok is szerepet játszanak a szopás indukálta PRL szekréció szabályozásában laktáció alatt (Arbogast and Voogt 1998). A lehetséges jelölt az ENK, egy δ receptor agonista. Az ARC-ben ciklusos állatban csak néhány szétszórt ENK-t termelő sejt van, azoban laktáció alatt az ENK expresszió nagyon megnő a TIDA neuronokban (Merchenthaler 1993). Saját eredményeink is arra utalnak, hogy az ENK expresszió folyamatos szoptatás alatt a TIDA neuronokban szignifikánsan magasabb, mint ciklusos állatokban. A kölykök kimozdítása további növekedést eredményezett az OD-ban, és később kezdett csökkenni. Az EM-ben az

ENK peptid szint korábban kezdett csökkenni, mint az ENK mRNA az ARC-ben, már négy órával a kölykök kimozdítása után, míg az ENK mRNA csak 8 óra múlva. Ezen paraméterek egyike sem érte el a ciklusos szintet. Nem világos, hogy milyen mechanizmus felelős az ENK szintézis fenntartásáért a TIDA neuronokban hosszú idővel a szopás megszakítása után.

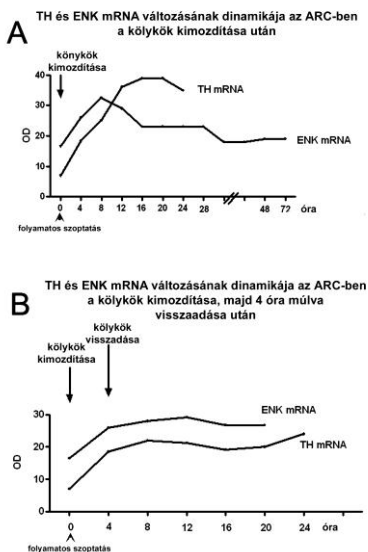
Merchenthaler és mtsai szerint (1995) az ENK upreguláció felelős a laktáció alatti hiperprolaktinemiáért. Egy sor kísérleti eredmény azt mutatja, hogy a megemelkedett PRL szintet megemelkedett ENK szint kíséri. A PRL szint gyors esése kb. két órán belül a szopás megszakítása után és a ciklus alatti relatíve kicsi PRL szint nem elegendő, hogy előidézze a szignifikáns ENK coexpressziót (Grosvenor és mtsai 1979).

Eredményeink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a DA szintézis upregulációja a szopás megszakítása után nem egy egyszerű kikapcsolás, hanem egy aktív folyamat, amelyet a szopás rövid megszakítása idéz elő. Eredményeink az I. Hipotézist támasztják alá. Ez a reguláló mechanizmus közép-laktáció alatt működik.

A laktáció emelkedést okoz az ENK mRNA expressziójában. Az ENK peptid szint az EM-ben folyamatos laktáció alatt magas, és nagy mennyiségben ürül a portális vérbe a szopás megszakítása után is még néhány óráig. A TIDA neuronok fokozott ENK expresszióval válaszolnak a fokozott ürítésre vagy ez egy stressz reakció a kölykök kimozdítása miatt? Ha a cél több ENK-t termelni, akkor ennek szerepe valószínűleg a TH (DA) gátló hatásával szembeni védekezés, aminek az mRNA szintje szintén emelkedik a szopási stimulus megszűnte után. A kölykök visszaadása megszünteti a TH mRNA upregulációt, de a folyamat lassú, még egy nap után is magasabb, mint folyamatosan szoptató anyákban. És ezalatt az ENK mRNA is magas.

Az ábra összefoglalva mutatja eredményeinket. Egyrészt a kölykök kimozdítása után mind a TH, mind az ENK upregulált, 8 órával később a TH mRNA még mindig emelkedik, de az ENK mRNA ellentétes változást mutat, mint a TH mRNA, elkezd esni. Ez azt mutatja, hogy a TH és ENK időbeli szabályozása a kölykök kimozdítása után különbözik, és az ENK lassabban válaszol, mint a TH (ábra A része). A kölykök négy óra múlva történő visszaadása után a TH és ENK

mRNA magasabb marad, mint a folyamatosan szoptató anyákban. Legalább 24 óráig mind a TH, mind az ENK időbeli szabályozása hasonló (ábra B része).



III. Az emlő autonom beidegzésének morfológiája.

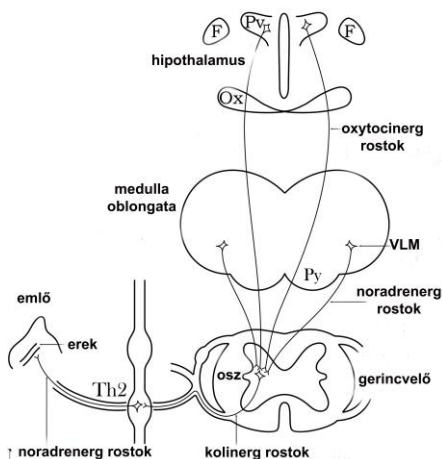
Eredményeink azt mutatták, hogy az emlő autonom beidegzése az általános szabályt követi. A postganglionáris neuronok a PVG-ben vannak, a preganglionáris neuronok a gerincvelő oldalszárvaiban. Az oldalszárv autonom idegsejtcsoportja afferenseket fogad az agytörzsből és a hipotalamikus PV-ből. Ezek az eredmények összhangban vannak Gerendai és mtsainak (2001) megfigyeléseivel.

A PV-ben lévő vírus jelölt neuronok egy alcsoportja OXY-t szintetizál. Az irodalomból jól ismert, hogy az OXY kidobást számos stresszor befolyásolja, ilyenek az immobilizációs és a pszichés stressz. Akut fizikális és mentális stressz károsítja a tejkidobást, csökkentve az OXY ürítést. Michaloudi és mtsai (1997) leírták, hogy a magnocelluláris oxytocinerg neuronoknak noradrenerg beidegzésük van. Kettős festésű immunhisztokémiai megfigyeléseink egyértelműen arra utalnak, hogy az emlőhöz a PV-ből leszálló autonom pálya első-rendű neuronjai részben

oxytocinergek, és az is világos, hogy ezek noradrenerg beidegést kapnak (Semeniken és mtsai 2009). Ezek az eredmények jó összhangban vannak korábbi megfigyelésekkel, hogy a centrálisan beadott β -adrenerg blokkoló propranolol megnöveli a tejhozamot segítvén az OXY tejkilövellő hatását az emlőben (Morales és mtsai 2001). Ez azt jelenti, hogy a noradrenalin az OXY kibocsátásra gátló hatású.

Az emlőhöz leszálló neuronális pálya további jellemzése megerősítette, hogy a gerincevelő oldalszarvában lévő másod-rendű neuron kolinerg, a harmad-rendű neuron a PvG-ben noradrenerg.

A kísérlet második részében az emlőbimbó és az emlőmirigy beidegését vizsgáltuk. CGRP rostokat nem találtunk az alveolusok között és a kivezetőcsövek falában, de előfordultak az erek falában és az emlőbimbó kötőszövetében és hámja alatt. DBH immunreaktív rostokat csak az erek falában találtunk. Ez megmagyarázza a kolokalizációt a virus jelölés és DBH immunreaktivitás között a PvG-ben, és szintén magyarázatot ad arra, hogy denerváció befolyásolja a folyadékátáramlást az emlőmirigyben (Grosvenor és Fidlay 1968). Sem DBH, sem VACHT immunreaktív rostokat nem találtunk az alveolusok között vagy a kivezetőcsövek falában.



Az ábra összefoglalva mutatja következtetéseinket. A leszálló autonóm pálya, amely beidegzi az emlőbimbó és az emlőmirigy ereit, és résztvesz a tejhozam szabályozásában, három neuronból áll. Az első-rendű neuron a hipotalamikus PV-ben van, és részben oxytocinerg. Első-rendű neuronok vannak az agytörzsben is, ezekről tudjuk, hogy noradrenergik. Másod-rendű neuronok a gerincvelő oldalszárzában (osz) vannak, és ezek kolinergik. Az utolsó harmad-rendű neuronok a paravertebrális szimpatikus dúcláncban vannak (PvG) és ezek noradrenergik. Innen származó noradrenerg rostok idegzik be az ereket, és szabályozzák az emlő vérellátását.

Eredményeink morfológiai alapját adják annak a korábbi teóriának, hogy a szopás kezdetén a tejhozamot centrálisan ható noradrenerg hatások befolyásolják, a PV-ben lévő oxytocinerg neuronokon keresztül. Két lehetőség merül fel. Az egyik ismert mechanizmus, hogy noradrenerg (stressz) hatások az OXY ürítést gátolják a hipofízis hátsó lebenyéből az általános keringésbe, így hatva az emlőmirigy kivezetőcsöveire. Másik lehetőség, hogy a PV-ből az oldalszárzhoz leszálló oxytocinerg hatások módosíthatják a leszálló autonóm pálya működését, azon keresztül az emlő vérellátását. Feltételezzük, hogy a supranukleáris oxytocinerg befolyás és a hormonális oxytocinerg befolyás egyensúlya szabályozza a tejhozamot a szopás kezdetén.

ÚJ EREDMÉNYEK

- 1) Az emlőből felszálló érző pálya legalább hat neuronból áll. Korábbi vizsgálatok alapján feltételezték, hogy a közepagi kapcsoló állomás a PPN-ben van. Eredményeink azt mutatják, hogy ez a kapcsoló állomás a SPFpc areája.
- 2) Elsőként írtuk le, hogy a SPFpc-ből TIP39 rostok szállnak fel a ARC ventrolateralis részébe.
- 3) Az ARC-ben olyan DYN neuronokat találtunk, amelyek szoros kontaktust mutattak az SPFpc-ből felszálló rostokkal, feltételezve, hogy ezek között szinaptikus kapcsolat van. Valószínűleg ezek a DYN neuronok közvetítik a szopási stimulust a TIDA neuronokhoz.
- 4) Eredményeink azt mutatják, hogy a szopás befejezése után a DA upreguláció egy aktív folyamat, és nem egy egyszerű lekapcsolása a szopási stimulusnak.
- 5) A laktáció növekedést eredményez az ENK expresszióban, folyamatos szopatás alatt nagy mennyiségben ürül az ENK peptid a portális keringésbe, ez a szopás befejezése után tovább tart legalább egy napig. Feltételezzük, hogy ez a magas ENK kidobás a növekvő DA szinttel szemben védő hatású.
- 6) Az emlőmirigyhez leszálló autonóm pálya, amely három neuronból áll, annak ereit idegzi be, és a szopás kezdetén befolyásolja a tejhozamot. A pálya három neuronját kémiaiilag jellemeztük. Az első-rendű neuronok oxytocinergek és noradrenergiek, a másod-rendű neuronok kolinergeek, a harmadrendű neuronok noradrenergiek.

A HÁROM KÍSÉRLET RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA

I. Az emlőbimbóból a hipotalamikus TIDA neuronokhoz felszálló pálya, amely szabályozza a PRL szekréciót legalább hat neuronból áll. Ezek közül azonosítottunk két relé neuron csoportot: a SPFPc-t és a z ARC ventrolateralis részét.

II. TH és ENK mRNA szintek laktáló patkányok ARC-jében parallel változnak a kölykök eltávolítása után, azaz a TH és ENK időbeli szabályozása hasonló a kölykök kimozdítása után legalább 24 óráig.

III. Leszálló autonóm pálya szabályozza a szopás elején a tejhozamot. Ez a pálya noradrenerg befolyás alatt áll. Munkánkban tisztáztuk a pálya neuronjainak neuropeptid és neurotranszmitter tartalmát. Patkányban az emlőben csak az ereket idegzik be autonóm rostok, amelyek noradrenergiek. Leírtuk, hogy a hipotalamikus PV-ből leszálló autonóm pálya első neuronjai között vannak OXY-t szintetizáló neuronok is.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Glória Hoffman professzor asszonynak, hogy lehetőséget adott, hogy vezetése alatt laboratóriumában dolgozzak. Köszönet illeti Natalie Snyder és Wei-Wei Le-t, hogy segítségemre voltak minden technikai munkában. Köszönöm Dr. Takisha Shultebrandtnak, barátomnak a lelki támogatást.

Köszönöm Takács Annának a Humánmorfológiai Intézetben nyújtott kitűnő technikai segítségét. Alig tudom kifejezni hálás köszönetemet mentoromnak, Köves Katalin professzor asszonynak, aki önzetlenül nyújtott szakmai és lelki segítséget éveken keresztül PhD gyakornoki éveim alatt.

És végül, köszönöm Szél Ágoston professzor úrnak, hogy mint a Doktori Iskola korábbi Elnöke engedélyezte külföldön végzett kísérleti munkám és kurzusaim elfogadását, és dolgozatom megvédését a Humán Morfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetben.

Az értekezés témájában megjelent közlemények

- 1. Szabo, F. K.,** Snyder, N., Usdin, T. B., Hoffman, G. E. 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, 2010 (IF 1.342)
- 2. Szabo, F. K.,** Le, W. W., Snyder N., Hoffman, G. E. Comparison of the temporal programs regulating tyrosin hydroxylase and enkephalin expressions in TIDA neurons of lactating rats following pup removal and then pup return. *J. Mol. Neurosci.* 45: 110-118, 2011 (2.922)
- 3. Köves, K., Györgyi, Z., Szabó, F. K.,** Boldogkői, Z. Chemical characterization of the autonomic innervation of the nipple and the mammary gland of lactating rats studied by retrograde trans-synaptic virus labeling and immunohistochemistry. *Acta Physiologica Hungarica* (accepted, 2012) (IF 1.227)

Egyéb közlemények

- 1. Szabó, F. K.,** Horváth, J., Heinzlmann, A., Arimura, A., Köves, K. Neonatal PACAP administration in rats delays puberty through the influence of the LHRH neuronal system. *Regul. Pep.* 109: 49-55, 2002 (IF 3.205).
- 2. Köves, K., Vereczki, V., Kausz, M., Kántor, O., Molnár, J., Nemeskéri, Á.,** Heinzlmann, A., Szabó, E., **Szabó, F. K.,** Fögel, K., Lakatos, A., Szeiffert, G., Arimura, A. PACAP and VIP in the photoneuroendocrine system (PNES). *Med. Sci. Mon.* 8: SR5-20, 2002.
- 3. Köves, K., Kántor, O., Molnár, J., Heinzlmann, A., Szabó, E., Szabó, F. K.,** Nemeskéri, Á., Horváth, J., Arimura, A. The role of PACAP in gonadotropic hormone secretion at hypothalamic and pituitary levels. *J. Mol. Neurosci.* 20: 141-152, 2003 (IF 1.735).
- 4. Szabo, F. K.,** Lomenick, J. P. Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion in an infant with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin. Pediatr (Phila)* 47: 840-2, 2008 (IF 1.5)