

Zárójelentés - OTKA T 046589

A T046589 OTKA pályázat szerves folytatása volt a korábbi T034491 sz. projektnek, melynek fő célkitűzése a PACAP neuroprotektív hatásainak vizsgálata volt. A jelenleg lezárásra kerülő pályázatban ezt a kísérletes munkát folytattuk, az eredeti terv szerint két fő téma köré csoportosítva: a PACAP hatása bazális ganglionok károsodásában és újszülöttkori agykárosodásban. Az eredeti tervben szereplő célkitűzések megvalósítása mellett több más idegrendszeri betegség modelljében igazoltuk ezt a neuroprotektív hatást, számos adatot szolgáltatunk a protekció hatásmechanizmusával kapcsolatban, valamint a vizsgálatokat kiterjesztettük nem idegrendszeri modellekre is. A jelen támogatás segítségével született közlemények összesített impakt faktora 139,807 (absztraktok nélkül).

PACAP neuroprotektív hatása idegrendszeri betegségek állatmodelljében

2004 végén, már részben ezen OTKA támogatás segítségével jelent meg egy összefoglaló munka, melyben az addigi ismereteket foglaltuk össze a PACAP neuroprotektív hatásaival kapcsolatban (*Somogyvari-Vigh et Reglodi, Curr Pharm Des, 2004*). Az előző években kimutattuk, hogy a PACAP icv adása jelentősen csökkenti a patkány Parkinson kór modellben kialakuló dopaminerg sejtpusztulást és ezzel együtt a neurológiai tüneteket. A féloldali 6-OHDA lézió következtében megközelítőleg 90%-os sejtpusztulás alakul ki a substantia nigra területén, melyet TH immunfestéssel igazoltunk. A féloldali lézió jellegzetes tünetegyüttese a hypokinesia mellett az aszimmetrikus forgás, ágaskodás és thigmotaxis. A PACAP kezelt állatokban csupán 50%-os sejtpusztulás volt megfigyelhető, és ezzel párhuzamosan a hypokinetikus jelek nem jelentkeztek, a féloldali tünetek pedig a 10. napra jelentős javulást mutattak a kontroll állatokkal ellentétben (*Reglodi et al., Behav Brain Res, 2004; Regul Pept 2004*). Ezek az eredmények összefüggést mutatnak a klinikumban megfigyelt tünetekkel, mely szerint csupán 70-80%-os sejtpusztulásnál válik nyilvánvalóvá a parkinsonos tünetegyüttes. Ezen vizsgálatokat, mint az irodalomban általánosan elterjedt, mi is fiatal hím patkányokon végeztük. Azonban a Parkinson kór idős betegeken fellépő dominanciájából, valamint nőkben (is) való előfordulásából kiindulva érdemesnek tartottuk a PACAP neuroprotektív hatásának vizsgálatát az állatok kora és neme függvényében. Ehhez először az általunk alkalmazott modellt vizsgáltuk idős és nőstény állatokban, valamint gonadektómiát követően. Azt találtuk, hogy a lézió jóval súlyosabb morfológiai és funkcionális következményekkel jár hím és ovariektomizált nőstény állatokban, mint fiatal nőstényekben és kasztrált hímeiben. Idősebb állatok pedig súlyosabb funkcionális jeleket mutatnak ugyanolyan sejtpusztulás mellett (*Tamás et al., Behav Brain Res, 2005; Endocrine, 2006*). Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban azt találtuk, hogy a PACAP jóval erőteljesebb javulást okoz fiatal hím állatokban és ovariektomizált nőstényekben, mely megfigyelésekkel az irodalomban még kevésbé ismert, a neuroprotektív szerek kor- és nemfüggését igazoltuk (*Reglodi et al., Neuropeptides 2006, Ann NY Acad Sci, 2006*). Egy másik neurodegeneratív betegség, a Huntington chorea patkánymodelljében is hasonló neuroprotektív hatást igazoltunk a striatum quinolinsavval történő toxicus léziójában (*Reglodi et al., Lett Drug Des Discov 2005; Tamás et al., Ann NY Acad Sci 2006*). A PACAP neuroprotektív hatását több más idegrendszeri betegség modelljében is vizsgáltuk. Az agy traumás léziójában, a diffúz axonális károsodás modelljében azt

találtuk, hogy a PACAP icv adása jelentősen csökkenti a piramispálya területén megfigyelhető axonális károsodás mértékét. Ezt megfigyeltük különbözőképpen előidézett léziók esetén és akkor is, ha a PACAP adása egy órával a traumát követően történik (*Farkas et al., Regul ept 2004; Tamás et al., J Neurotrauma 2006; Kövesdi et al., Progr Brain Res 2007; Neurotox Res, 2008*). Kimutattuk továbbá, hogy az intracerebrálisan microiontoforesissel beadott kainát excitotoxicus hatását jelentősen mérsékli a PACAP kezelés (*Atlasz et al., Ann NY Acad Sci 2006*).

A PACAP rendelkezik retinális védőhatással is. Első kísérleteinkben azt mutattuk ki, hogy a PACAP intravitrealis beadása szignifikánsan mérsékli a glutamát okozta gyakorlatilag teljes belső retinapusztlást újszülöttkori retinadegeneráció modellben (*Tamás et al., Neurosci Lett 2004*). Az újszülöttkori nátrium glutamát (monosodium glutamat=MSG) okozta retinális degeneráció modelljét standardizálva leírtuk a károsodás összefüggését a kezelések gyakoriságával és az alkalmazott dózissokkal (*Babai et al., Neurotox Res 2005*). További kísérletekben igazoltuk a toxicus lézióknak azt a mértékét, mely még kivédhető PACAP-pal (*Babai et al., Neurotox Res 2005; Ann NY Acad Sci 2006*). Ez a védő hatás szisztémás adás során is érvényesül, bár szerényebb mértében, melynek oka a peptid gyors metabolizmusa lehet (*Kiss et al., Ann NY Acad Sci 2006*). Vizsgáltuk a leggyakrabban alkalmazott PACAP fragmensek hatását is ebben a modellben (*Atlasz et al., Ann NY Acad Sci 2008*). Igazoltuk, hogy a PACAP protektív hatása más retinális léziókban is érvényesül, mint például bilaterális carotis elzárást követően kialakuló retinális ischemiában (*Atlasz et al., Gen Comp Endocrinol 2007*). Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy ez a védő hatás UV fény okozta lézióban is és diabeteses retinopathiában is megfigyelhető. Ugyancsak részben folyamatban vannak azok a kísérletek, melyekben arra keressük a választ, hogy a glutamát kezelés mely sejteket roncsolja, illetve a PACAP kezelés pontosan mely retinális sejtekben fejti ki a védő hatását. Ezt immunhisztokémiai analízissel vizsgáljuk (vezikuláris glutamát transporter, vezikuláris GABA transporter, calbindin, calretinin, TH és parvalbumin immunfestéssel). Első eredményeink azt mutatják, hogy a MSG kezelés az eddig vizsgált sejtpopulációk közül csupán a calbindin pozitív horizontális sejteket nem roncsolja, és hogy a PACAP által védett sejtpopuláció egybeesik azokkal a sejtekkel, melyeken PACAP receptorokat mutattak ki (*Atlasz et al., J Mol Neurosci 2008*). Tekintve, hogy a MSG és bilaterális carotis okklúzió okozta retinális degeneráció modellek standard módon végezhetőek, más neuroprotektív szerek tesztelését is végezzük, ezek közül eddig megjelent publikáció a diazoxid védő hatását igazolta (*Atlasz et al., Neurotox Res 2007*). A PACAP szemészeti vonatkozásait tovább vizsgálva tömegspektrometriai módszerekkel kimutattuk, hogy PACAP kezelés hatására a könny fehérjeösszetétele megváltozik, mely hatást jelenleg vizsgáljuk részletesebben (*Gaál et al., J Mol Neurosci 2008*).

A PACAP, mint általános citoprotektív peptid vizsgálata, valamint a protektív hatásmechanizmus vizsgálata

A PACAP az irodalmi adatok alapján több útvonalon keresztül fejti ki védő hatását. Az egyik legfontosabb hatása az antiapoptotikus hatás, mely igen kis koncentrációan is érvényesül, és elsősorban a PAC1 receptoron keresztül, több jelátviteli útvonal aktiválásával illetve gátlásával. Kísérleteinkben elsősorban az antiapoptotikus hatásokat vizsgáltuk, részben in vivo, részben in vitro körülmények között.

Több irodalmi adat alapján a PACAP nemcsak az idegrendszerben, hanem számos más sejtben is képes védő hatást kifejteni. Ezt mi is vizsgáltuk több rendszerben. Ezek részben a neuroprotektív hatás fokozásához is hozzájárulhatnak, mint pl. az endothelsejtekben megfigyelt védő hatás. In vitro elsőként igazoltuk, hogy a PACAP a szívizomsejteket képes oxidatív stresszel és ischemia/reperfúzióval szemben védeni (*Gasz et al., Peptides 2006; Rácz et al., Regul Pept 2008; Roth et al., Ann NY Acad Sci 2008*). Hasonló módon, elsőként igazoltuk, hogy a PACAP antiapoptotikus hatású endothel sejtekben is: csökkenti az oxidatív stressz okozta apoptotikus sejtpusztulást (*Rácz et al., Gen Comp Endocrinol, 2007*). Legújabb in vivo kísérletekben pedig kimutattuk, hogy a PACAP jelentős védelmet nyújt vese ischemia/reperfúzió okozta lézióban: intravénás adása markánsan csökkenti a mortalitást és javítja a vesében kialakuló fokális tubuláris atrophia mértékét (*Szakály et al., J Mol Neurosci 2008*). Hasonló eredményeket kaptunk vékonybél ischemia/reperfúziós károsodásban, ahol azt is igazoltuk, hogy a PACAP tartalmú oldatban tartott vékonybél kisebb oxidatív károsodást mutat, melynek autotransplantációnál lehet jelentősége (*Ferencz et al., J Mol Neurosci 2008*).

A PACAP antiapoptotikus hatásmechanizmusát részben a fent említett rendszerekben vizsgáltuk. Igazoltuk, hogy a PACAP jelentősen csökkenti a proapoptotikus caspase-3 aktivitást, növeli a mitochondriális bel család antiapoptotikus fehérjéinek foszforilációját, ugyancsak növeli az ERK és CREB foszforilációt és csökkenti a JNK és p38 foszforilációt (*Gasz et al., Peptides 2006; Ann NY Acad Sci 2006; Rácz et al., Gen Comp Endocrinol, 2007*). A PACAP in vivo antiapoptotikus hatását először patkány stroke modellben vizsgáltuk: arteria cerebri media occlusiót követően a PACAP-kezelt állatokban jelentős mértékben csökkent az apoptotikus sejtek száma az infarctus magjában és a penumbrában egyaránt (*Reglődi et al., Regul Pept 2004*). Később az in vivo hatásmechanizmus vizsgálatához a jóval standardabb léziót, a retinális MSG okozta degenerációt választottuk. Kimutattuk, hogy a PACAP in vitro jól ismert antiapoptotikus hatása in vivo is érvényesül ebben a rendszerben: a PACAP kezelés jelentősen gátolta az MSG kezelésben aktiválódott proapoptotikus szignál transzdukciós útvonalakat és molekulákat, mint caspase-3, JNK foszforiláció, csökkentette az apoptózis indukáló faktor és citochrom c citoszolba való kiáramlását, és eltolta a mitochondriális apoptotikus fehérjék foszforilációjának egyensúlyát az antiapoptotikus irányba (*Rácz et al., Regul Pept 2006, Ann NY Acad Sci 2006; Int J Neuroprot Neurodegen 2006*). Részben ezen modellben, részben in vitro szívizomsejt ischemia/reperfúzió okozta károsodásban elsőként írtuk le, hogy a PACAP protektív hatásában szerepet játszhat a PKA-Bad-14-3-3 és az Akt-Bad-14-3-3 fehérje szignál transzdukciós útvonalak is (*Rácz et al., Neurotox res 2007; Regul Pept 2008*). Ezen kísérletekben a PACAP hatását a PACAP széles körben alkalmazott antagonistája a PACAP6-38 gátolta. Későbbi vizsgálataink újabb adattal bővíthetik az ismereteket a PACAP jelátviteli utakra kifejtett hatásával kapcsolatban: a fent említett általánosan alkalmazott antagonistáról elsőként mutattuk ki, hogy bizonyos rendszerekben a PACAP6-38 agonistaként is viselkedhet, mint pl. cytotrophoblast sejtekben és szenzoros idegvégződéseken (*Reglődi et al., J Mol Neurosci 2008*). Ugyancsak az eddigi irodalmi adatokkal részben ellentmondó eredmények születtek a PACAP trophoblast sejtekben kifejtett hatásaival kapcsolatban: azt találtuk, hogy JAR choriocarcinoma sejtekben a PACAP nem rendelkezik védő hatással, sőt, potenciózza bizonyos toxicus anyagok, mint

pl H_2O_2 és $CoCl_2$ (in vitro hypoxiát előidéző szer) hatását (Boronkai *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 2008). Ugyancsak úgy tűnik, hogy a PACAP eltérően viselkedik porcsejtekben, az eddig publikált eredményünk a porcsejtek hiperozmotikus stressz okozta apoptotikus pusztulásával kapcsolatosak, ezt folytatjuk jelenleg PACAP kezeléssel (Rácz *et al.*, *Bone* 2007).

A PACAP-ról jól ismert, hogy szerepet játszik a biológiai ritmus szabályozásában is, és mivel a legtöbb ismert intracelluláris jelátviteli mechanizmus ritmikus szabályozás alatt áll az idegrendszerben is, több kísérletet végeztünk ezzel kapcsolatban is. Először pinealocitákon vizsgáltuk a PACAP ritmust befolyásoló hatását. Kimutattuk, hogy a PACAP fokozza a melatonin szekréciót, azonban a melatonin endogén ritmusát ez nem befolyásolja, valamint hogy ez a hatás már az embrionális korban is megfigyelhető (Faluhelyi *et al.*, *Ann NY Acad Sci*, 2005, 2006). Később a jelátviteli útvonalakat vizsgálva azt találtuk, hogy a PACAP a corpus pineale sejtekben megfigyelhető p38MAPK és 14-3-3 fehérje napi ritmusát dóziszfüggően befolyásolja, valamint a hatás erőteljesen függ attól, hogy a PACAP adása a napnak mely szakaszában történik (Rácz *et al.*, *J Mol Neurosci* 2008). Összességében megfigyeléseink in vivo is jelentőséggel bírhatnak, hiszen ezek alapján a PACAP (és már neuroprotektív szerek) hatása nemcsak a sejttípustól, az állatok korától és nemétől, hanem a napi ritmustól is függhetnek.

Az antiapoptotikus hatás mellett a PACAP antiinflammatorikus hatásának is szerepet tulajdonítanak számos idegrendszeri és egyéb degenerációs folyamatban megfigyelt védő szerepében. Kimutattuk, hogy a PACAP gátolja a gyulladáshoz vezető neuropeptidok felszabadulását, valamint az endogén PACAP szintje emelkedik gyulladáshoz vezető folyamatokban (Németh *et al.*, *Neuroscience* 2006). Ezt patkány és egér neurogén és nem-neurogén gyulladáshoz vezető modellekben is igazoltuk (Helyes *et al.*, *Peptides* 2007).

A PACAP, mint neurotrofikus faktor hatásainak vizsgálata

Az eredeti tervben szereplő másik nagy témakör az újszülöttkori neuronális léziók vizsgálata és a PACAP lehetséges protektív szerepének igazolása volt. Ehhez a már fent leírt MSG okozta lézió is hozzátartozik. Az újszülöttkori MSG kezelés nemcsak a retinában okoz degenerációt, hanem számos más agyterületen is, melyek összességében viselkedésszerű anomáliákat is okoznak. Az irodalomból ismertek az MSG kezelés okozta magatartásbeli eltérések, azonban a számos ellentmondás mellett az sem volt ismert korábban, hogy ez a kezelés hogyan befolyásolja a neuronális fejlődést a korai posztnatális szakaszban. A korábban már jól bevált több tucatnyi reflexet, fejlődési jelet és motoros koordinációt vizsgáló tesztskála felhasználásával leírtuk a neonatális MSG kezelés okozta eltéréseket, mely szerint a legtöbb fejlődési jel és reflex jóval később jelenik meg, és az állatok rosszabb reflexteljesítményt is nyújtanak a kontroll állatoknál (Kiss *et al.*, *Neurotox Res* 2005). Ezenkívül vizsgáltuk a glutamát kezelés hatását az open-field és az újdonságkereső magatartásra. Ez utóbbiban azt találtuk, hogy a kezelt állatok a kontrollokkal teljesen ellentétes magatartást mutatnak (Kiss *et al.*, *Neurotox Res* 2007). Az újszülöttkori PACAP kezeléssel már korábban kimutattuk, hogy gyorsítja az idegrendszeri fejlődést. MSG kezeléssel párhuzamosan alkalmazva azt találtuk, hogy a PACAP számos reflex MSG-ozta késlekedését tompítja (Kiss *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 2006). Azonban az újszülöttkori PACAP (és PACAP antagonisták) kezelés az újdonságkereső magatartásbeli eltéréseket nem befolyásolja (Kiss *et al.*, *J Mol Neurosci*,

2007 absztrakt). Egy másik újszülöttkori károsodás, a hypoxiás agykárosodás modelljében is leírtuk a korai idegrendszeri fejlődést (Lubics *et al.*, *Behav Brain Res* 2005). A PACAP kezelés hatása jelenleg áll vizsgálat alatt, illetve vizsgáljuk a neurológiai fejlődést és a lehetséges neuroprotektív hatásokat számos más újszülöttkori károsodás modellben.

Az endogén PACAP vizsgálata

Részben a hatásmechanizmus vizsgálatával függ össze az endogéne jelenlévő PACAP lehetséges szerepének vizsgálata. Kimutattuk, hogy az endogén PACAP blokkolása PACAP antagonistá kezeléssel (roncsolás nélkül) a retinában a jelátviteli útvonalakat az proapoptotikus utak felé mozdítja el (Rácz *et al.*, *Regul Pept* 2006). Az endogén PACAP szerepének vizsgálatával függenek össze a PACAP koncentráció mérések is RIA segítségével. Mind a PACAP38 és PACAP27 RIA mérését standardizáltuk szövetekben és serumban egyaránt (Németh *et al.*, *J Radioanal Nucl Chem* 2007; Helyes *et al.*, *Peptides* 2007), különböző fajokban és eltérő beavatkozások után vizsgáltuk a PACAP koncentráció változásait. Kimutattuk, hogy az agy különböző területein az endogén PACAP szintek érzékenyen reagálnak éhezés, szomjazás, valamint gonadectomia hatására (Németh *et al.*, *Ann NY Acad Sci*, 2006; Józsa *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 2006; Kiss *et al.*, *Gen Comp Endocrinol* 2007). Az endogén PACAP intrauterin fejlődésben kifejtett lehetséges szerepét eddig csirkemodellben vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy az in ovo PACAP antagonistá kezelés jelentős magatartásbeli eltéréseket okoz a csirkékben kikelés után, pl. a szociális magatartás markánsan károsodik, valamint kimutattuk az olfaktorius memóriai károsodását is (Hollósy *et al.*, *Regul Pept* 2004; Józsa *et al.*, *Peptides* 2005). Ez összefüggésben lehet a nagyon magas endogén PACAP szintekkel, melyeket más munkacsoportok eredményeivel összehangban mi csirkében is igazoltunk (Józsa *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 2006).

A PACAP, mint ősi protektív peptid vizsgálata

A PACAP az egyik legkonzerváltabb szerkezetű neuropeptid, az eddig vizsgált gerinces fajokban 0-4 aminosav eltérést mutattak ki. A PACAP és PACAP receptor immunoreaktív elemek feltérképezését elvégeztük az alacsonyabbrendű gyűrűsféreg és puhatestű idegrendszerben (Molnár *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 2006; *Regul Pept* 2008; Hernádi *et al.*, *Neuroscience* 2008). Legújabb eredményeink azt mutatják, hogy nemcsak a szerkezet, de a funkció is részben konzervált: kimutattuk, hogy a PACAP antiapoptotikus hatása gerinctelen szervezetben is érvényesül (Pirger *et al.*, *J Mol Neurosci* 2008). A PACAP neurotrofikus és neuroprotektív hatásai eddigi eredményeink alapján ugyancsak konzerváltak tűnnek, hiszen a PACAP a gyűrűsféreg *Eisenia* fejlődése során a tápláló kokonfolyadékban kimutatható, valamint az emlősökben leírt idegrendszeri léziót követő upregulációt a giliszta kaudális idegrendszeri regeneráció során sikerült igazolnunk (Boros *et al.*, *J Mol Neurosci* 2008; Várhalmi *et al.*, *J Mol Neurosci* 2008).