

Zárójelentés - OTKA F048908

Dr Lubics Andrea

Idegi regeneráció és befolyásolási lehetőségei alacsonyabbrendű és emlős idegrendszerben

Az ifjúsági OTKA eredeti tervezete szerint két nagy kutatási téma köré csoportosítottam az elvégzendő feladatokat. Az első rész az idegi regeneráció vizsgálata volt alacsonyabbrendű idegrendszerben. A második részben az idegi lézió regenerációs lehetőségeit vizsgáltam patkányban.

A elmúlt évek során, részben ezen támogatás felhasználásával és feltüntetésével összesen 23 folyóirat közlemény született, melyek összesített impakt faktora 42,93. Ezenkívül számos idézhető absztrakt (27) és konferencia szereplés történt a támogatás segítségével. Az alábbiakban vázolom az elért fontosabb eredményeket, melyek egy része jelenleg áll közlés alatt. Ezért tisztelettel kérem az OTKA bizottságot, hogy a jelentésben foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa.

1. A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) alacsonyabbrendű idegrendszerben

Alacsonyabbrendű állatok idegrendszerében előforduló PACAP vizsgálatához a gyűrűsférgék (Annelida) közé tartozó *Eisenia fetida* és *Lumbricus terrestris* vizsgálatát választottam. Ezen állatfajokon munkacsoportunk már évek óta dolgozott a jelen OTKA támogatás előtt is, és jelentős tapasztalatokat gyűjtöttünk össze. PhD értekezésem is ebben a témában készült 2002-ben. A gyűrűsférgék több szempontból is rendkívül alkalmasak alapvető neurohisztológiai vizsgálatokra, valamint az idegrendszer regenerációjának tanulmányozására. Egyrészt a gyűrűsférgékben jelenik meg a filogenezis során először a mesoderma, mint önálló csíralemez, és ezzel összefüggésben a szelvényezettség, ami az idegrendszer szegmentálódását is kialakítja. Másrészt már megvalósul az idegrendszer egy elég jelentős centralizációja. További előny a vizsgálatok szempontjából, hogy az idegelemek száma alacsony, fajtól függően az agydúcban megközelítően 2000, a szegmentális dúcokban pedig 900-1500 idegsejt található

szelvényenként, ami lehetővé teszi a dúcok viszonylag komplett leírását. Több előnnyel is jár, hogy a mintegy 100-150 testszelvény, és így a ganglionok felépítése is néhány kivételtől eltekintve egyforma. Egyrészt egy átlagos szelvény vizsgálata is elegendő a hasdúcúclánc neuronjainak, azok kapcsolatainak majdnem teljes jellemzéséhez, másrészt összehasonlítható egy átlagostól eltérő szelvénnel, ami további hasznos információkkal szolgálhat.

A PACAP rendkívül konzervált szerkezetű peptid, aminosavsorrendje az emlős fajokban azonos, a csirke és béka PACAP csupán egy, a halakban található PACAP pedig 1-4 aminosavban tér el a humán PACAP aminosavsorrendjétől. Alacsonyabbrendűek közül eddig csak előgerinchúros fajokat vizsgáltak, melyeknél 96%-os homológiát írtak le a humán PACAP27-el. Ezen adatok szerint a PACAP az eddig ismert neuropeptidek közül az egyik legkonzerváltabb szerkezetű, mely alapján feltételezhető, hogy az idegrendszer filo- és ontogenezise során alapvető folyamatokban vesz részt. A felfedezése óta eltelt kb. másfél évtizedben számos hatását írták le, az idegrendszerben neurotranszmitter és neuromodulátor szerepet tölt be, ezenkívül a perifériás szervekben különböző endokrin és modulátor hatása ismert.

Az elmúlt évek során leírtuk a PACAP lokalizációját gyűrűsférgek ventrális dúcláncában (*Molnár et al., Ann NY Acad Sci, 2006*). Whole mount immunhisztológiai vizsgálattal kimutattuk, hogy a PACAP-nak mindkét formája, a PACAP38 és a PACAP27 is előfordul a ventrális dúcláncban, mindkét vizsgált fajban (*Eisenia* és *Lumbricus*). A két fajban a PACAP immunreaktivitás eloszlása hasonló volt, ám a peptid két formája már eltérő eloszlási mintázatot mutatott. A PACAP38 immunreaktív elemek a dúc ventrolateralis és ventromedialis részében helyezkedtek el, a szegmentális idegek eredésénél. Az órásaxonok illetve az óriás motoneuronok sejttestjei nem festődtek. A PACAP27 elemek pedig ellenkező eloszlást mutattak, és jóval több sejt festődött. Ezen megfigyelés megegyeznek korábbi, radioimmunoassay méréseink eredményeivel, melyek szerint a domináns forma alacsonyabbrendűekben a PACAP27. Másrészt, a PACAP eloszlása a ventrális dúcláncban a korábbi tanulmányainkban leírt más neuropeptidekkel összehasonlítva is más mintázatot mutatott (pl. gastrin, cholecystokinin, substance P, proktolin). A következő ezzel kapcsolatos munkánkban leírtuk a PACAP specifikus receptorának, a PAC1 receptorának az Oligochaetákban való eloszlását fény- és

elektronmikroszkópos módszerekkel (*Molnár et al., Regul Pept 2008*). Ezen munkákban utolsó szerzőként szerepelek.

A gyűrűsférgék regenerációs képességét is tanulmányoztuk már munkacsoportunkban korábban. Tekintve, hogy a PACAP idegi regenerációban betöltött szerepe jól ismert, és hogy a PACAP jelentős upregulációja figyelhető meg emlősökben a perifériás ideg átvágásakor, a következő célunk annak kimutatása volt, hogy változik-e a PACAP szint a ventrális dúclánc átvágásakor. Vizsgálatunkhoz fény és elektronmikroszkópos immunhisztológiát, illetve radioimmunoassay (RIA) módszereket alkalmaztunk. A distális regeneráció során azt találtuk, hogy a PACAP RIA-val mérhető koncentrációja a regenerációt vezénylő, azaz az első ganglionban jelentős mértékben megemelkedik, míg a többi dúcban nem változik. A regenerációs blastema PACAP szintje nagyon magas, és abban számos PACAP immunreaktív elem figyelhető meg immunhisztokémiai módszert követően (*Várhalmi et al., J Mol Neurosci 2007*). A PACAP-pozitív sejtek nagy valószínűséggel toti-vagy multipotens blastok, melyek a testfal és egyéb szövetek újraképzését végzik. A PACAP eredete is igen érdekes kérdéseket vetett fel, mivel azt találtuk, hogy a coeloma sejtekben, melyek számos hormon és az idegi regenerációhoz szükséges trofikus faktor szállítását végzik, ugyancsak szignifikáns mértékben emelkedett a PACAP szint (*Somogyi et al., J Mol Neurosci 2007*). A PACAP-nak az emlősök embrionális fejlődésében betöltött szerepe jól ismert, és egyre több adat áll rendelkezésre azzal kapcsolatban, hogy a PACAP egy fontos neurotrofikus faktor az idegrendszeri fejlődés során. Nem ismert viszont, hogy a PACAP milyen szerepet játszik alacsonyabbrendűek embriogenezisében. Vizsgálatainkban *Eisenia* embriók kokonfolyadékából és embrionális szövetekből is kimutattuk a PACAP-ot RIA segítségével. Azt találtuk, hogy az embrió PACAP koncentrációja jelentős mértékben emelkedik a fejlődési stádiumok előrehaladtával, míg a kokonfolyadékban a PACAP-koncentráció ezzel párhuzamosan csökken (*Boros et al., J Mol Neurosci, 2007*). Az embrionális PACAP-szint-növekedés különösen feltűnő volt közvetlenül a kikelés előtti stádiumban. Vizsgáltuk ezenkívül a PACAP koncentráció változását a clitelláris régióban, mely közismerten az állatok szaporodásában játszik szerepet. Azt találtuk, hogy a PACAP immunreaktivitás szintje jóval magasabb ezen a területen, mint az állat más szegmentumaiban. Ivarérett és nem ivarérett egyedek

clitelláris régióit összehasonlítva azt találtuk, hogy ezen régiók jóval magasabb PACAP koncentrációval rendelkeznek ivarérett állatokban. A többi egyedben nem volt különbség a clitellum és egyéb szegmentumok PACAP szintje között. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PACAP vagy PACAP-szerű peptidek és receptorai Annelidák idegrendszerében és egyéb szerveiben is jelen vannak, és valószínűleg szerepet játszanak az embrionális fejlődésben, a szaporodásban és az idegi regenerációban. Ezen vizsgálatainkat a PTE TTK Általános Állattani Intézetével kollaborációban végeztük. A fent említett eredmények igen újak, az ezekből született közlemények bírálólat alatt állnak.

Jelenleg funkcionális vizsgálatokkal igyekszünk igazolni a PACAP gerinctelen szervezetekben betöltött szerepét. Első lépésként egy másik fajban, a *Helix pomatiában* végeztünk funkcionális vizsgálatot. Kimutattuk, hogy a PACAP emeli a cAMP-szintet, ami arra utal, hogy a PACAP adenilát cikláz aktiváló hatása gerincesekhez hasonlóan valószínűleg alacsonyabbrendű fajokban is érvényesül. A PACAP-nak egyik legismertebb és legtöbbet tanulmányozott hatása az antiapoptotikus hatása, melyet szintén ezen molluska fajban vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a PACAP képes csökkenteni az apoptosis mértékét, és a caspase-3 aktivitást a *Helix pomatia* nyálmirigyében (*Pirger et al., J Mol Neurosci 2007*). A PACAP koncentrációja a csiga idegrendszerében és nyálmirigyében is aktivitásfüggő változásokat mutat: aktív állatokban a PACAP szintje jóval magasabb, mely arra enged következtetni, hogy szerepet játszik az aktivitással összefüggő idegrendszeri és szekréciós funkciókban. A gerinctelen fajokban kapott adataink arra utalnak, hogy a PACAP-nak nemcsak a szerkezete konzervált, hanem funkcionálisan is egy konzervált peptidről van szó, mely alátámasztja azt a feltételezést, hogy a konzervált szerkezet egyben fontos biológiai folyamatok meglétét tükrözi. Ezen vizsgálatainkat az MTA Balatoni Limnológiai Kutatóintézetével kollaborációban végeztük, melyek jelenleg is folyamatban vannak csakúgy mint több közlemény előkészítése is. Az ebből a témából született első közleményt jelenleg a J. Mol. Neurosci. folyóirat javításra küldte vissza, melyet ha elvégeztünk, a közlemény valószínűleg elfogadásra kerül és még ebben az évben megjelenik.

Az elmúlt években kapcsolatot építettem ki több, Magyarországon gerinctelen kutatással foglalkozó kutatócsoporttal, mely kapcsolatrendszer segítségével a következő években további közös munkákat tervezünk.

2. Idegi léziók vizsgálata patkányban, PACAP kezelés neuroprotektív hatásai

A kutatási terv második részében patkány idegi lézió regenerációs lehetőségeinek vizsgálatát tűztem ki célul. A kutatócsoport, melynek aktív tagja vagyok, az elmúlt években számos közleményben beszámolt a PACAP neuroprotektív hatásairól. Patkány nervus ischiadicus lézójának vizsgálatára vonatkozó terveinknek eleget téve standardizáltuk a pályázatban szereplő módszereket: a magatartási vizsgálatokhoz használt tesztek, valamint elektromiográfiás vizsgálatokat. Ezek segítségével felmértük az ideglézió következtében fellépő funkcionális károsodás mértékét, majd leírtuk az idegi regeneráció lefolyásának funkcionális és elektrofiziológias jellemzőit (Nagy *et al. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 58(S1): 58. 2005*). A PACAP terápiás hatásának vizsgálata jelenleg még folyamatban van. Azonban számos más, a PACAP sérülést csökkentő illetve regenerációt fokozó hatásával kapcsolatos eredmény született a támogatás segítségével. Kimutattuk, hogy a PACAP a neuronokhoz hasonlóan, a szívizomsejteket is védi az oxidatív stresszel szemben, csökkenti az apoptózist, növeli az antiapoptotikus fehérjék szintjét és csökkenti a proapoptotikus molekulák expresszióját (Gasz *et al., Peptides 2006*). Hasonló eredményeket értünk el endothel sejteken is (Racz *et al., Gen Comp Endocrinol 2007*). In vivo, retinális károsodás modellben lokális PACAP adása védelmet nyújt a retinális degenerációban, és itt is kimutattuk, hogy a PACAP antiapoptotikus hatása szerepet játszik a retinális károsodás elleni védelemben: számos stressz-szignál szintjét csökkenti (JNK, p38 MAPK, caspase-3, Bad, cytochrome c felszabadulás, apoptosis signal kinase), míg a sejtvédelmi funkciókat növeli (bcl-2, ERK, CREB, bcl-XL, 14-3-3 protein) (Atlasz *et al., Gen Comp Endocrinol, 2007, Racz et al., Regul Pept 2006, Int J Neuroprot Neurodegen 2006, Neurotox Res 2007*). További in vivo eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP protektív hatást fejt ki excitotoxicus striatalis lézióban (Tamas *et al., Ann NY Acad Sci, 2006*) valamint csökkenti a glutamát idegrendszeri fejlődésre kifejtett káros hatásait (Kiss *et al., Ann NY Acad Sci, 2006*). Ezenkívül kimutattuk, hogy intracerebrális PACAP kezelés csökkenti a neuropusztulást és javítja a funkcionális tüneteket 6-hydroxydopamin okozta substantia nigra sérülésben, mely a Parkinson kór modellje (Tamas *et al., Endocrine, 2006*). Ebben a modellben

összehasonlítottuk a PACAP hatását kor és nem szerint is, és azt találtuk, hogy a PACAP legerőteljesebb védő hatását fiatal hím állatokon fejt ki, míg nőstényekben a védő hatás jóval gyengébbnek bizonyult (*Reglodi et al., Ann NY Acad Sci, 2006, Reglodi et al., Neuropeptides, 2006*). Újabb vizsgálatainkban hasonló hatást találtunk vese ischemia-reperfúzió károsodásban: 45 és 60 perces arteria renalis lekötést követően a mortalitást is csökkentette a PACAP kezelés, valamint a vese tubuláris károsodása is jelentősen enyhébb volt (*Szakály et al., J Mol Neurosci 2007, 2008*). Legújabb eredményeink szerint a PACAP ebben a modellben is javítja az ischemia-reperfúzió okozta antiapoptotikus anyagok endogén csökkenését.

Az elmúlt években felvetődött, hogy az endogén PACAP jelentős szerepet játszik a neuronális károsodások elleni védelemben, így az endogén PACAP szintek vizsgálata jelentőséggel bírhat. Ezzel kapcsolatban standardizáltuk az endogén PACAP szint mérését radioimmúnassay módszerrel (*Németh et al., J Radioanal Nucl Chem, 2007*), és kimutattuk, hogy az endogén PACAP szintek változnak az embrionális fejlődés során, gonadektómiát követően (*Németh et al., Ann NY Acad Sci, 2006, Józsa et al., Ann NY Acad Sci 2006*) illetve éhezést és szomjazást követően (*Józsa et al., Ann NY Acad Sci, 2006, Kiss et al., Gen Comp Endocrinol 2007*).

Mindezek alapján az elmúlt években számos eredményt értünk el a PACAP neuroprotektív hatásainak vizsgálatában. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a PACAP nemcsak emlősökben játszik fontos szerepet az embrionális fejlődés során és az idegi regenerációban, hanem a filogenetikailag jóval ősbibb fajokban is hasonló hatásokkal bír. Erre utal az Annelida fajokban leírt PACAP eloszlás, és a mintázat és koncentráció változása a regeneráció és az embrionális fejlődés során. Ezenkívül a PACAP egy mollusca fajban kifejtett antiapoptotikus hatása alapján elmondható, hogy egy ősi, konzervált hatásról van szó, melyet az elmúlt évek során számos setjvonalonban és in vivo szöveti sérülésben is igazoltunk. Tekintve, hogy eredményeink számos újabb kérdést vetnek fel, a következő években tovább vizsgáljuk ezen hatásokat, részben egyéb OTKA támogatások segítségével.