

Záróbeszámoló, K61766

A kutatási munkafolyamat alapvetően az előzetes terveknek megfelelően indult és zajlott le, a kutatásban résztvevő, a Pécsi Tudományegyetemen közalkalmazotti jogviszonyban levő személyek (dr. Reglődi Dóra és dr. Wilhelm Márta) a terveknek megfelelően járultak hozzá az elért eredményekhez. Az OTKA keret terhére alkalmazásra került személyek (dr. Telkes Ildikó, majd dr. Atlasz Tamás) közül az utóbbi meghatározó mértékben járult hozzá a kísérleti eredményekhez, valamint e témakörből védte meg PhD értekezését. Meg kívánom még említeni, hogy doktoranduszként volt tagja munkacsoportomnak dr. Babai Norbert és Szabadfi Krisztina, akik szintén kiemelkedő teljesítményt nyújtottak, és mindketten szép doktori értekezést nyújtottak be. Utóbbi személy közvetlenül az értekezés megvédése előtt áll. Hallgatói megbízási díjat kapott Lakk Mónika, aki a közeljövőben, mint doktorandusz hallgató csatlakozhat majd a kutatócsoporthoz.

A pályázati munka kivitelezéséhez műszerbeszerzésre OTKA keretből nem volt szükség, a Western Blot laboratóriumunk fejlesztése más forrásból történt meg. A személyi kifizetések rovaton megmaradt forrás azt tükrözi, hogy egyéni kutatói kifizetés nem történt, helyette készletbeszerzést bonyolítottunk le, mert ez tűnt a leghasznosabbnak a projekt eredményessége szempontjából.

A pályázat első évében a monosodium-glutamát (MSG)-indukálta retinális degeneráció részletes morfológiai leírását terveztük. Vizsgáltuk a posztnatális élet elején (P1-P10) 1x, 2x, 3x, 5x beadott MSG hatását a retina szerkezetére és fejlődésére. A fénymikroszkópos morfológiai és morfometriai vizsgálatok mellett, elektronmikroszkópos patológiai elemzést is készítettünk. Megállapítottuk, hogy a korai posztnatális MSG kezelés súlyos belső retinális degenerációt okoz (1. és 2. ábra). Eltűnik, illetve összeolvad a belső magvas réteg, a belső rostos réteg és a dúcsejtek rétege. Elektronmikroszkópos szinten leginkább mitokondriális degenerációt és a lizoszómális aktivitás megnövekedését észleltük, gliafilamentum feldúsulással kísérve. Morfometriai analízissel megállapítottuk, hogy mind a belső retinális rétegek vastagsága, mind a dúcsejtrétegben található sejtek száma szignifikánsan csökkent (közlemények 2, 3)

Ezt követően kialakítottuk a PACAP által okozott neuroprotekción vizsgálatához legalkalmasabbnak ítélt MSG kezelési sémát (3 x 2mg/g subcutan MSG P1, 5 és 9 napokon). Ezzel a kezelési rezsimmal megbízhatóan mindig ugyanolyan mértékű degenerációt tudunk előidézni, ami fontos volt a neuroprotektív kezelések hatásainak értékeléséhez. Ami szintén elengedhetetlen volt a további kísérletek szempontjából, az a PACAP üvegtestbe injektálásának kipróbálása, mert az már a kísérletek ezen fázisában világossá vált, hogy in vivo subcutan adva a PACAP nem jut át kielégítően a vér-agy gáton (közlemények 3, 4). Azt is megvizsgáltuk, hogy az intravitreális kezelések száma csökkenthető-e az optimalizált MSG-modellben, ugyanakkora mértékű protektív hatás kiváltása mellett. Megállapítottuk, hogy a háromszori MSG-beadást az első két alkalommal intravitreálisan bejuttatott PACAP csaknem teljesen ellensúlyozza. A degenerációs módszer standardizálása mellett, megállapítottuk azt a minimális számú PACAP bevittelt, ami érzékelhető neuroprotekción okoz, illetve meghatároztuk ebben a modellben a maximális neuroprotekción eléréséhez szükséges dózist is. Az e témakörhöz csatlakozó közleményekből PhD értekezés is készült (közlemények 7) a kutatócsoportunkban.

Vizsgáltuk továbbá a PACAP hatását önmagában és a glutamát analóg kainsavval kombinálva in vivo extracelluláris elvezetéssel kortikális neuronokon. A PACAP önmagában adva serkenti a kortikális neuronokat, csakúgy, mint a kainsav. Míg a kainsav egy igen gyors felfutású hatással rendelkezik, addig a PACAP lassú excitációt idéz elő. Kombinált bejuttatás esetén a PACAP ugyanakkor képes gátolni a kainsav excitátoros hatását (közlemények 1).

A pályázat második évében megkezdjük a neuroprotektív hatású PACAP retinára esetlegesen specifikus neurobiológiai hátterének felderítését. Vizsgálataink során az egyes retinális sejtípusok eltérő reakcióit MSG-kezelésre, majd az MSG-kezelés után a PACAP sejtvédő hatásának demonstrálására tettünk kísérletet. Célul tűztük ki továbbá más metabolikusan indukált retinadegenerációs modellek kifejlesztését és az összehasonlíthatóság érdekében a PACAP-tól eltérő szerkezetű és hatásmechanizmusú potenciálisan neuroprotektív ágensek tesztelését is (közlemények 5). A PACAP az MSG modellen kívül hatékony védőszernek bizonyult az arteria carotis communis kétoldali lekötése által előidézett ischaemiában (közlemények 6), az UV-A lézió hatására létrejött fokális retinakárosodásban is (közlemények 16).

Az MSG-indukálta neurodegenerációs modellben teszteltük azt a hipotézist, hogy vajon a kalcium-puffer fehérje tartalmú sejtek ellenállóbbak-e az MSG-okozta excitotoxicitásnak, mint a többi sejtfeleség. Megállapítható volt, hogy egyes belső retinális sejtípusok, mint pl. a horizontális sejt, gyakorlatilag MSG-rezisztensek (3. ábra), míg más sejtek (pálcika-bipolárisok, AII-es amakrin sejtek – 4. ábra) számának csökkenésére következtethetünk azáltal, hogy a bennük található marker molekulák expressziója is csökken. Ez alól kivételt képez a Müller-glia, mert ott a GFAP-expresszió fokozódása volt megfigyelhető, jelentős sejtszám-csökkenés nélkül (közlemények 10, 18). Bizonyítottuk a PACAP védő hatását *in vivo* elektrofiziológiai mérésekkel és anti-apoptotikus markerek aktivitásának fokozásával is (közlemények 21, 22). A fent leírt kísérletek is egy PhD disszertáció alapját képezték (közlemények 9).

A futamidő harmadik évében megkíséreltük rövidített peptidfragmentumok hatásának vizsgálatát. A 38 aminosavnyi PACAP és a PACAP 27 aminosavból álló természetes változatának hatékonysága mellett a még ennél is rövidebb fragmensek lehetséges hasznosítását is vizsgáltuk. Célul tűztük ki a legrövidebb hatékony peptidfragmens megtalálását, amely még a natív peptidhez mérhető, közel azonos mértékű neuroprotektív hatással rendelkezik, de bejuttatása és esetleges átjutása a vér-idegszövet gáton hatékonyabb, mint a természetes peptidé. E tervek közül azonban csak a 27-es természetes fragmens vizsgálatát váltottuk valóra, melyről megállapítottuk, hogy a 38-as teljes peptidhez hasonló biológiai hatással bír, míg az első 5 aminosavtól megfosztott 6-38-as és 6-27-es peptid antagonistá hatású (közlemények 12). Elkezdjük a munkát a 19-es pozíciónál hasított peptiddel, de sajnos Hubert Vaudry munkacsoportja megelőzött bennünket és leírta, hogy minimum az 1-13-as szekvencia szükséges a PACAP biológiai hatásának kifejtéséhez.

E kísérletek közben előkészítő munkát is végeztünk a kutatómunka szélesítéséhez. A dopaminerg amakrin sejt a retina egyik kulcsfontosságú eleme, mert részt vesz a fényadaptációs folyamatokban, de emellett trofikus faktorként a dopamin a retina szöveti integritásának fenntartásáért is felelős. Különleges tulajdonsága, hogy a sejtek egy része interplexiform jellegű, azaz nyúlványai a belső rostos réteg mellett a külső rostos réteg felé is futnak és ott nem szinaptikus transzmitter-kibocsátó felületként működnek. Lehetőség nyílt tehát a szinaptikus kapcsolatok és a nem-szinaptikus transzmitter-kibocsátó helyek protein masinériájának összehasonlítására szinaptikus folyamatokban résztvevő proteinek elleni antitestekkel. Ezen proteinek vizsgálatát tervezzük a jövőben az MSG-indukálta degenerációs modellben is azért, hogy információt kapjunk a szinapszisok szerkezeti épségének, illetve dezintegrálódásának időbeli lefolyásáról. Patkány és egér retinában egyaránt elvégeztük vizsgálatainkat, melyek során leírtuk, hogy bár dopaminerg varikozitások tartalmaztak vezikuláris monoamin transporter 2-t és vezikuláris GABA transzportert, de nem volt rajtuk feszültségfüggő kalcium-csatorna és szinaptikus vezikula protein 2 sem. Ezzel szemben ryanodin-receptor-immunreaktivitást mutattak, ezért feltételezhető, hogy ezen nyúlványok transzmitter-kibocsátása intracelluláris kalcium-raktárak segítségével történik (5. ábra). Ez igen fontos adalék a jövőbeli kísérlettervezéshez, ahol a külső és belső szinaptikus rétegben lezajló szinapszis-dezintegrációs folyamatokat tehát nem lehet majd tökéletesen azonos folyamatokkal jellemezni (közlemények 11).

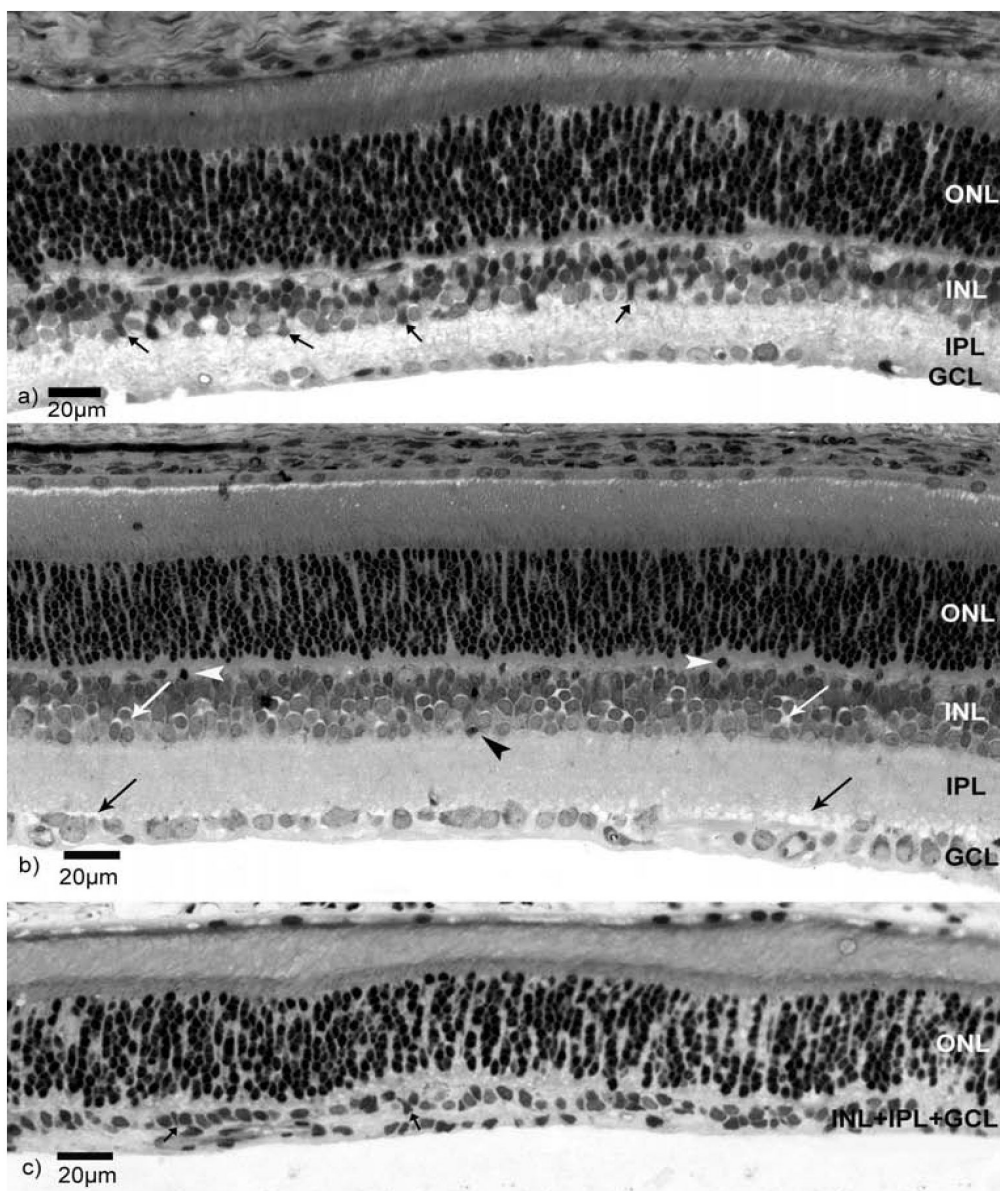
A pályázat negyedik évében és a féléves hosszabbítás alatt a PACAP sejtvédő hatásának intracelluláris mechanizmusait vettük górcső alá és folytattuk további potenciálisan

neuroprotektív szerek keresését is. Munkacsoportom egyik részével a PACAP receptoriális és másodlagos messenger rendszereinek vizsgálatát kezdtük meg, beleértve az MSG-indukálta apoptotikus masinéria felderítését és a PACAP védő hatásának biokémiai értelmezését is. Előremutató, a jövőben befejezendő szál az MSG hatás időbeli felbontására irányuló kísérletsorozat. Ebből kiderült, hogy az iniciátor kaspázok már három órával az MSG beadása után aktiválódnak a P1-es állatokban (6. ábra). Ez a munkát a hosszabbításként kapott fél évben fejeztük be, az ebből írt közleményt közlésre benyújtottuk. Egy korai fázisban elvégzett pilot munkában kísérletet tettünk az apoptotikus folyamatok biokémiai hátterének a feltárására, aminek eredményeképpen megállapítottuk, hogy alapvetően az ERK útvonal upregulációja és JNK útvonal gátlása játszódik le, de számos további faktor (pl. AIF, Bcl, Bad) szintje és foszforiláltsági állapota is módosul (közlemények 4, 17). A PACAP védő hatásának egyik valószínűsíthető mechanizmusát feltárva (7. ábra), e szál folytatásaként megállapítottuk, hogy a krónikus ischaemiás modellünkben a PARP másodlagos messenger útvonal gátlása is eredményre vezetett, jelentős neuroprotektív volt megfigyelhető, ahol az Akt intracelluláris foszforilációs kaskád útvonal serkentése illetve a JNK és p38 MAP kináz gátlása volt a hatást közvetítő lépés (közlemények 19).

Némi meglepetés volt számunkra, hogy a stressz-rendszer részeként számontartott urocortin 2 is retinoprotektívnek bizonyult az MSG-indukálta és a carotis-lekötéssel létrehozott retinális degenerációban, bár hatékonysága az MSG-indukálta degeneráció esetében, különösen a dúcsejtek tekintetében elmaradt a korábban tesztelt neuroprotektív szerekétől (közlemények 15, 17). Annál nagyobb meglepetést okozott, amikor kiderült, hogy a megnövelt, ingergazdag élettér is retinoprotektív mind az krónikus ischaemiás, mind az MSG-indukálta neuroprotektív modellben (közlemények 14). Egy most benyújtott PhD értekezés témáját adja ez utóbbi két felfedezés (közlemények 20), ami egyúttal arra is utal, hogy az ingergazdag környezet neuroprotektív hatásának hátterében valami nagyon általános biológiai mechanizmus állhat. Ez a kérdéskör továbbvizsgálásra érdemes, szeretnénk BDNF rendszer elemeit azonosítani és kvantitatív módon követni a neuroprotektív folyamat során, ami választ adhat arra a kérdésre, hogy vajon egy az agyban termelt neurotrofikus faktor okozhat-e a retinában antidegeneratív jelenségeket.

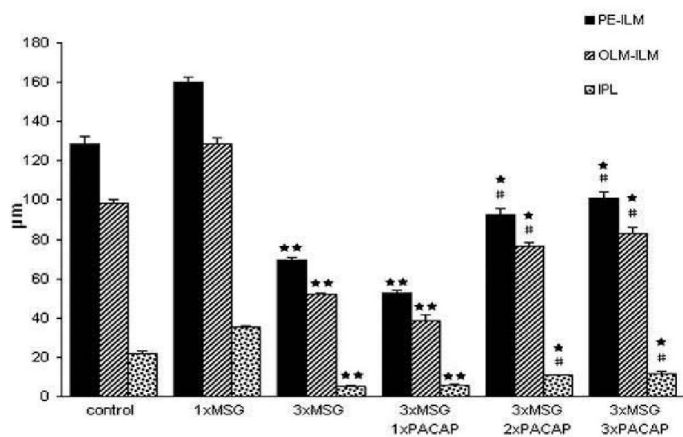
Végül, de nem utolsó sorban egy érdekes, még nem közölt kísérleti eredményről szeretnék beszámolni. Tényként kezeli a szakirodalom, hogy a PACAP a PAC1-receptoron keresztül adenilát cikláz enzim aktiválása útján fejti ki neuroprotektív hatását. Egyik kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy valóban az adenilát-cikláz enzim lenne-e a kulcselem ebben az anti-apoptotikus folyamatban. Eddigi, még nem közölt eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az adenilát-cikláz csak részlegesen felelős ezért a folyamatért, mert ha enzimgátlót alkalmazunk, a PACAP anti-apoptotikus hatása nem tűnik el teljesen (8. ábra). Hangsúlyozni kívánom, hogy ez egy nem közölt eredmény. Ugyanakkor, ha további ismétlésekkel meggyőződünk a kísérleti eredmény helytállóságáról, akkor adott a következő kutatási feladat: meg kell keresnünk azt a másik effektor útvonalat, amin keresztül a PACAP érvényre juttathatja hatását.

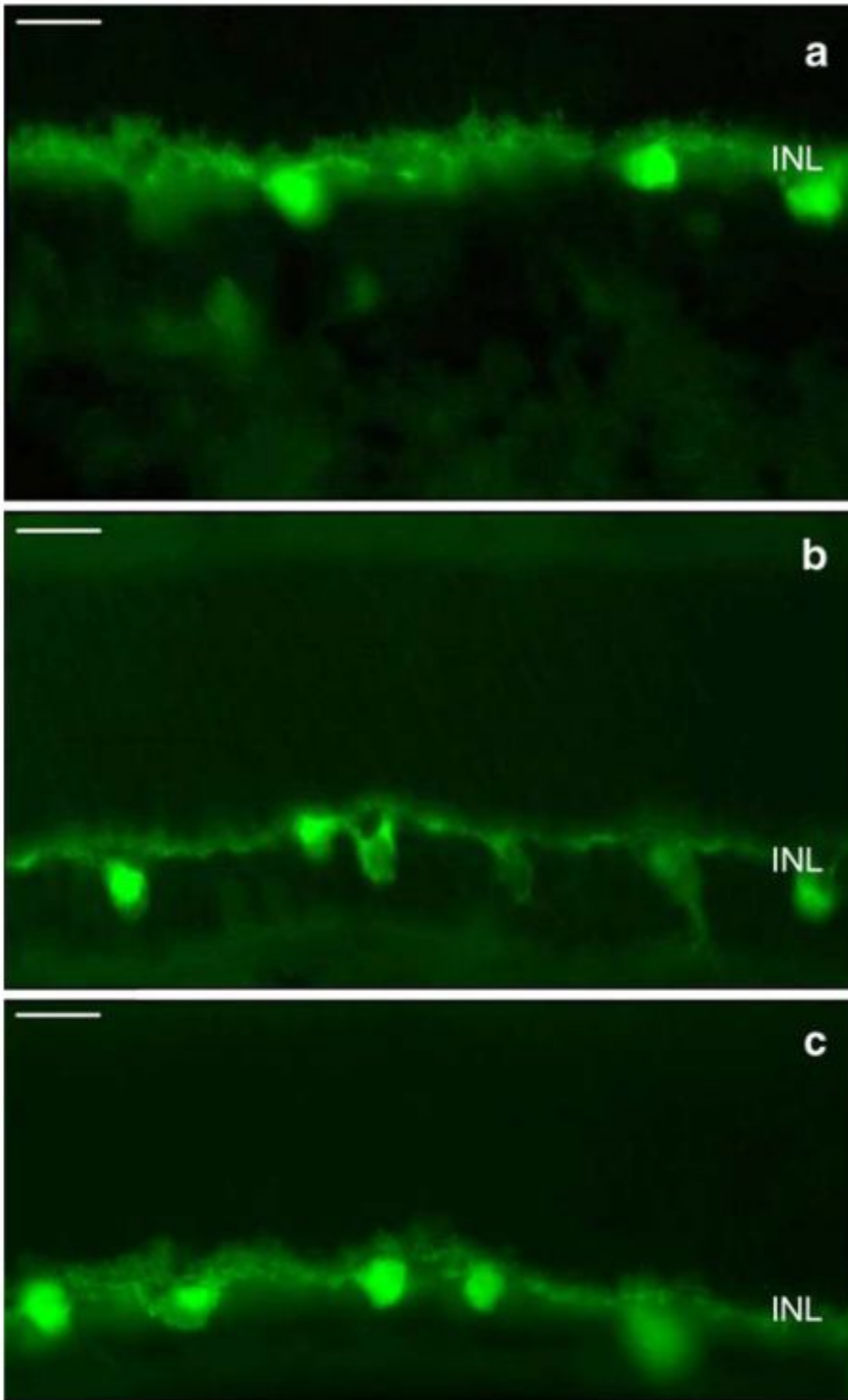
Illusztrációk a záróbeszámoló szöveges részéhez



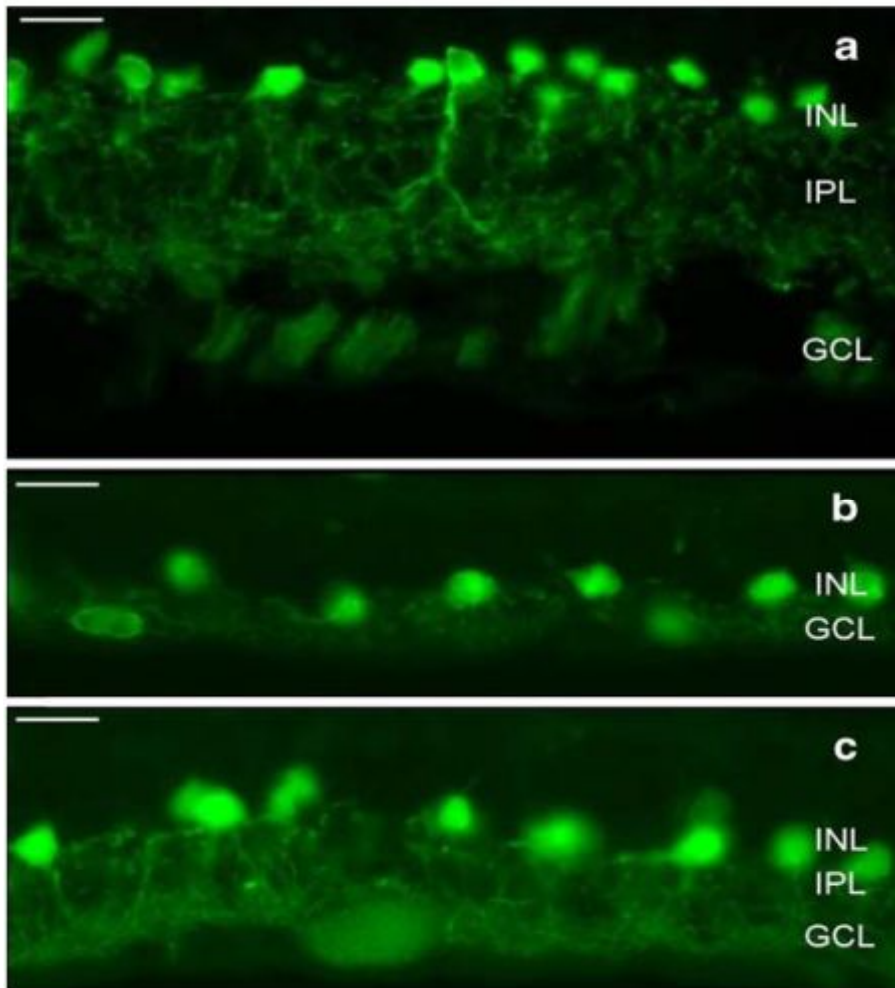
1. ábra. MSG okozta retinális károsodás. A: kontroll, B: 1 x 2 mg/g MSG, C: 3X 2 mg/g MSG hatása a retina morfológiájára.

2. ábra. Retinális rétegvastagságok különböző kezelések hatására.

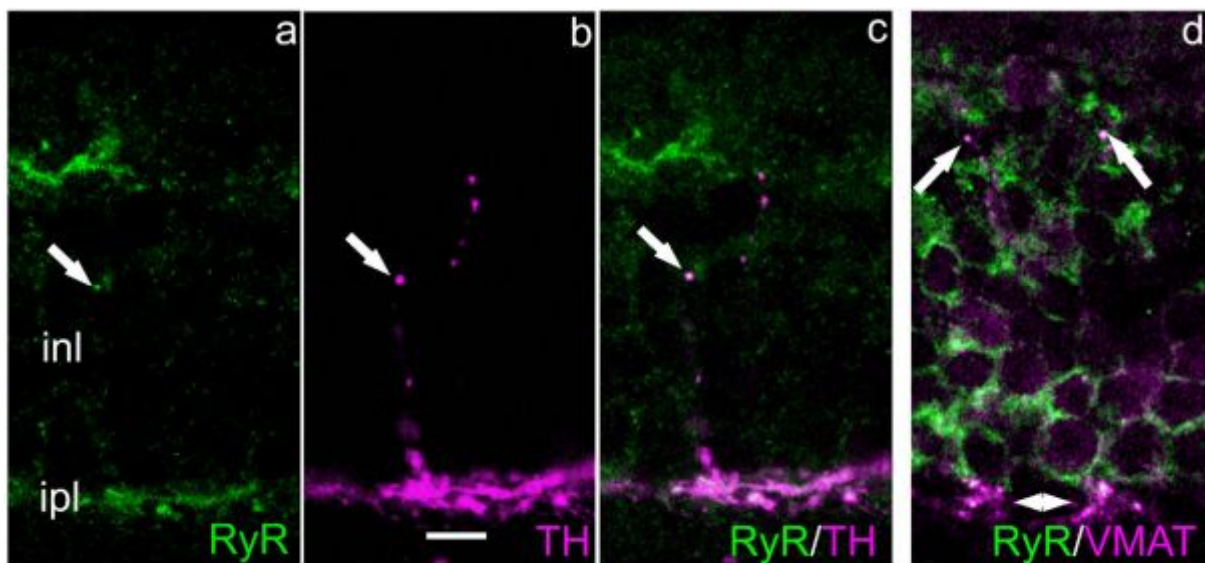




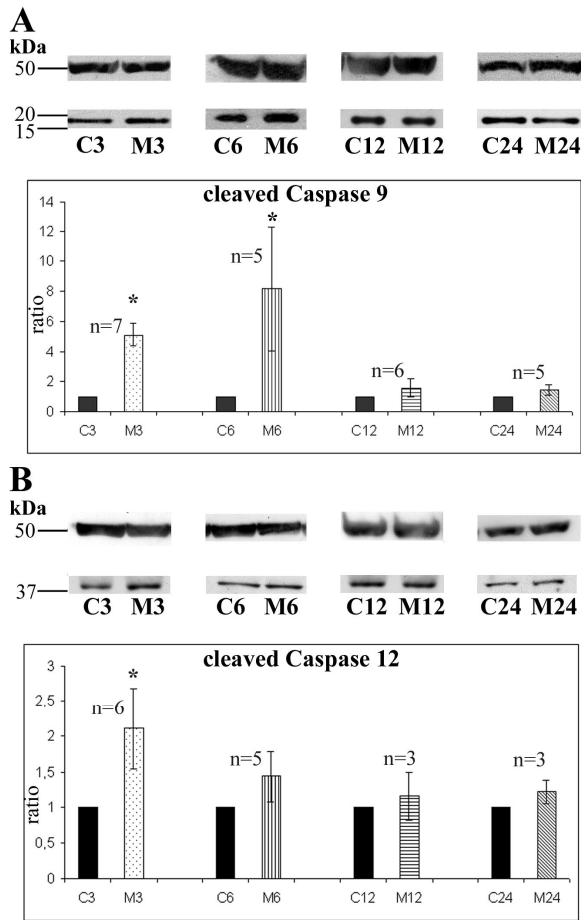
3. ábra. Calbindin-immunreaktív horizontális sejtek. A: kontroll, B: MSG-kezelés, C: MSG+ PACAP-kezelés.



4. ábra. AII-es amakrin sejtek. A: kontroll, B: MSG-kezelés, C: MSG+ PACAP-kezelés.

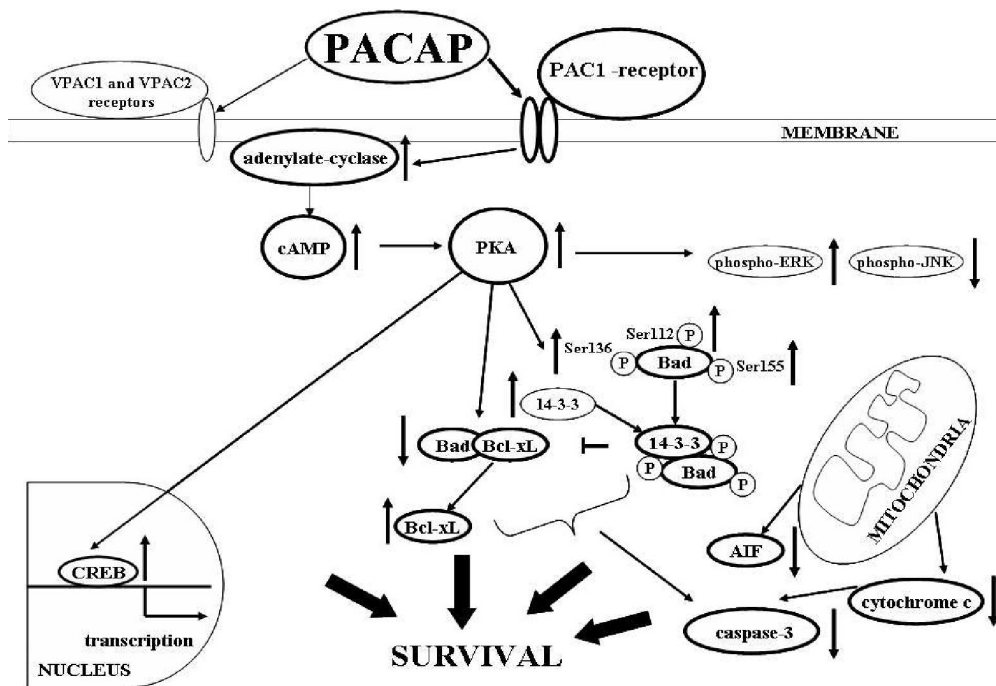


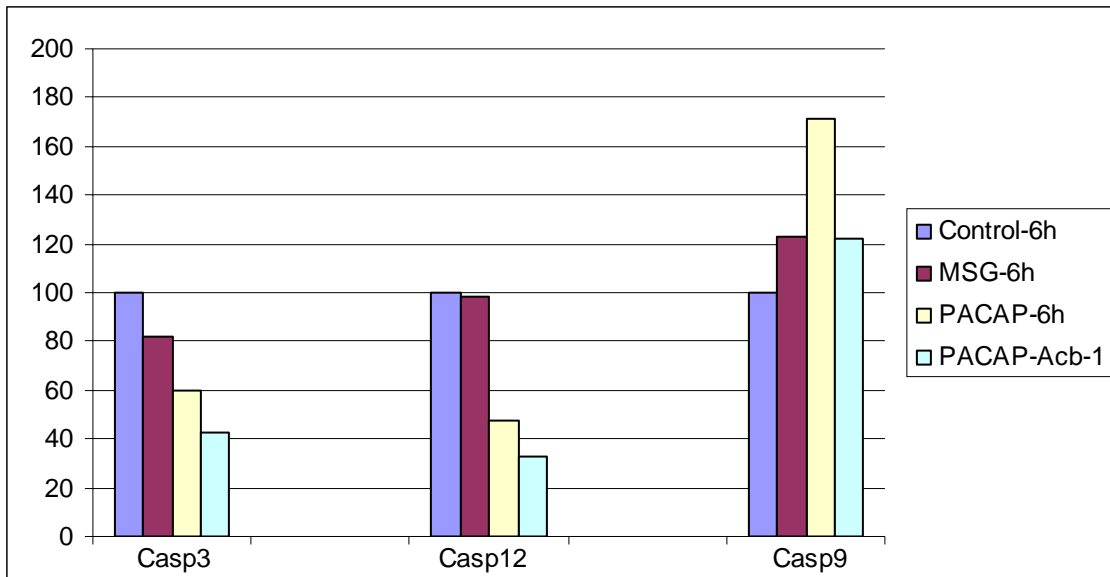
5. ábra. A: Ryanodin-receptor és B: tirozin-hidroxiláz immunreaktivitás, valamint C: az összegzett kép bizonyítja a kolokalizációt. D: Ugyanígy kolokalizál a rianodin-receptor immunreaktivitás a vezikuláris monoamin transzporter immunreaktivással is.



6. ábra. Az MSG-indukálta apoptózis iniciátor kaszpázainak indukciója.

7. ábra. A PACAP pro- és antiapoptotikus faktorokra gyakorolt valószínűsíthető hatásai.





8. ábra. A PACAP az adenilát-cikláz enzim blokkolása esetén is kifejti gátló hatását az apoptotikus enzimek expressziójára.