

**EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**A HYPOPHYSIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP)  
HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ IDEGRENSZERI  
KÁROSODÁSOKAT MODELLEZŐ ÁLLATKÍSÉRLETEKBEN**

**Dr. Tamás Andrea**

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Anatómiai Intézet

Témavezetők: Dr. Reglődi Dóra, Dr. Lengvári István  
Programvezető: Dr. Csernus Valér

Pécs, 2005.



## I. BEVEZETÉS

Az idegrendszeri károsodást modellező állatkísérleteket széles körben használják az egyes klinikai kórképek etiológiájának, patomechanizmusának és terápiás lehetőségeinek vizsgálatára. Az egyes anyagokat a klinikai gyakorlatban csak akkor lehet alkalmazni, ha korábban *in vivo* állatkísérletben is bizonyítják védő hatásukat. Kutatócsoportunk célja a hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) neuroprotektív hatásának széleskörű megismerése, ezért hatását különböző állatkísérletes modellekben vizsgáljuk. Értekezésem a fokális cerebrális ischaemia, Parkinson-kór, Huntington-chorea és monosodium glutamát okozta retinális degeneráció modellekben elért eredményeket foglalja össze.

A cerebrovascularis elváltozások következményeképpen kialakuló súlyos kórképek és ezek komplikációi képezik fejlett országokban az egyik leggyakoribb halálokot a daganatos és a cardiovascularis betegségek mellett. Az ischaemiás károsodás egyik leggyakoribb oka az a. cerebri media vagy ágainak elzáródása embolisatio miatt (az összes agyi embólia 82%-a), ezért a kutatások során is az egyik gyakran alkalmazott fokális ischaemia modell, az a. cerebri media okklúzió. Vizsgálataink első részében arra kerestük a választ, hogy a PACAP csökkenti-e az infarktus nagyságát és javítja-e a neurológiai jeleket akkor, ha preventíven az okklúzió előtt adjuk. Korábbi kísérletekben már bebizonyították, hogy a PACAP védő hatást fejt ki globális és tranziens fokális ischaemiában, ezért mi permanens ischaemiában vizsgáltuk a peptid hatását.

A neurodegeneratív megbetegedésekre, mint például a Parkinson-kór és a Huntington-chorea, egy-egy sejtcsoport progresszív pusztulása jellemző. Kísérleteink során a Parkinson-kór modellben 6-hydroxidopamin (6-OHDA) segítségével a bal oldalon roncsoltuk a substantia nigra dopaminerg sejtjeit, míg a Huntington-chorea modellben a bal oldali striatumot károsítottuk lokálisan adott quinolinsav injekcióval.

A Parkinson-kór ismeretlen eredetű progresszív neurodegeneratív megbetegedés, melynek hátterében a substantia nigra pars compacta dopamin tartalmú sejtjeinek pusztulása áll. A nigrostriatalis rendszer dopamin szintjének csökkenése felelős a betegséghez kapcsolódó különböző motoros rendellenességekért. A betegség vezető klinikai tünetei a hipokinézis, a rigor és a tremor, későbbi stádiumban a tartási instabilitás. Jól ismert, hogy a betegség gyakrabban fordul elő az idősebb korosztályban, és a betegség progressziója is gyorsabb ebben az életkorban. Az is jól ismert, hogy a betegség nagyobb számban érinti a férfiakat, de a betegség progressziójának nemi különbségeiről számos ellentmondásos adat létezik. A legtöbb állatkísérletben, melyben a dopaminerg sejtpusztulás mechanizmusát és az esetleges neuroprotektív szerek hatását vizsgálják, fiatal hím állatokat használnak a betegség modellezésére, és csak kis százalékában használnak idős állatokat. Az elmúlt években néhányan már hangsúlyozták az idős állatok alkalmazásának jelentőségét a Parkinson-kór preklinikai kutatásában, mert a korosodó állatokon végzett kísérletek relevánsabban modellezik az embereknél is elsősorban idős korban jelentkező betegséget. Nagyon kevés olyan kutatási eredmény áll rendelkezésünkre, amely az öreg állatok komplex viselkedési mintázatát értékeli a dopaminerg rendszer neurotoxikus károsodását követően, és emellett a nőstény állatokra vonatkozóan is csak korlátozott számú adattal rendelkezünk. Vizsgálataink második részének célja az öreg és fiatal, hím és nőstény állatok részletes összehasonlító magatartási vizsgálata a substantia nigra 6-OHDA lézióját követően.

Korábbi kísérletekben már bebizonyították, hogy a PACAP kezelés megvédi a mesencephalicus sejtkultúrákat a 6-OHDA neurotoxikus hatásával szemben, ezért vizsgálataink harmadik szakaszában célul tűztük ki a különböző dózisz PACAP hatásának vizsgálatát 6-OHDA léziót követő neurológiai változásokra, és a substantia nigrában és a ventralis tegmentalis areában észlelt morfológiai eltérésekre.

A Huntington-chorea egy örökletes neurodegeneratív betegség, melyet a choreiform mozgások mellett pszichológiai és kognitív zavarok is jellemeznek. A striatális neuronok károsodása számos magatartásbeli eltérést okoz az állatokban. A léziót követően fokozódik az aktivitásuk, csökken a haloperidol indukálta katalépszia mértéke, ezen kívül károsodnak a kognitív funkciók is. A számos neurotoxikus anyag közül a quinolinsav lézió az, ami legjobban modellezi a betegséget. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a PACAP védő hatást fejt ki a neurodegeneratív sejtpusztulásért felelős folyamatokkal szemben (pl.: oxidatív stressz, inflammatorikus folyamatok és különböző toxikus hatások), ezért vizsgálataink negyedik részében a PACAP kezelés hatását Huntington-chorea modellben is megvizsgáltuk.

A leggyakrabban alkalmazott excitotoxikus anyagok közé sorolhatjuk a glutamát analógokat. Már régóta ismert, hogy a szisztémás monosodium glutamát (MSG) kezelés újszülött patkányokban, és intravitrealis kezelés felnőtt patkányokban a retina belső rétegeinek súlyos degenerációjához vezet. Eddig még nagyon kevés kísérletben vizsgáltak neuroprotektív szereket retinális károsodásban, és mivel a PACAP védő hatását már több neuronális károsodást modellező állatkísérletben leírták, vizsgálataink ötödik részében a PACAP védő hatását vizsgáltuk MSG kezelés következtében kialakuló retinális károsodásban.

## II. HYPOPHYSIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP)

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet, vagy angol neve alapján mozaikszóval PACAP-ot, 1989-ben izolálták birka hypothalamusból a hypophysisben kifejtette adenilát-cikláz aktiváló hatása segítségével. A PACAP tagja a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinalis polipeptid (VIP) peptidcsaládnak. Szerkezete 67%-ban megegyezik VIP struktúrájával.

A szervezetben két, biológiailag aktív amidált formában fordul elő, ennek kb. 90%-át a 38 aminosavból álló PACAP-38, a kisebb részét a 27 aminosavat tartalmazó PACAP-27 teszi ki. A peptidek szekvenciája csak kis mértékben különbözik az emberben található PACAP-tól birkában, patkányban, alacsonyabb rendű gerinces és előgerinchúros állatokban. Ezen adatok azt bizonyítják, hogy a filogenetikai fejlődés során szinte változatlanul konzerválódott molekula alapvető élettani funkcióval rendelkezik.

Megjelenését és funkcióját tekintve, az ún. „brain-gut” (neurointestinalis) peptidek közé sorolható, vagyis megtalálható nemcsak a központi és perifériás idegrendszerben, hanem más szövetekben is, többek között az endokrin mirigyekben és a gastrointestinalis tractus teljes hosszában.

Mivel kísérleteink során a PACAP hatását retinális degenerációban is vizsgáltuk ezért fontos kiemelni, hogy már számos fajban vizsgálták a PACAP eloszlását a retina különböző rétegeiben. Patkány retinában immunhisztokémiai módszerrel kimutatható a PACAP az amakrin és a horizontális sejtekben, a belső rostos rétegben (IPL), a ganglion sejtek rétegében (GCL) és az optikus rostok rétegében.

A PACAP felfedezése óta széles körben vizsgálják, és számos kísérletben bebizonyították már neurotrofik és neuroprotektív hatását.

### III. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során célul tűztük ki a PACAP neuroprotektív hatásának széleskörű megismerését, ezért a PACAP kezelés hatását különböző idegrendszeri károsodásokat modellező állatkísérletekben vizsgáltuk.

1., Először a preventív intracerebroventricularis PACAP kezelés hatását vizsgáltuk a cerebri media okklúziót követő fokális cerebrális ischaemiában. A vizsgálat során a léziót követően neurológiai és orientációs tesztet végeztünk a kialakuló magatartási eltérések detektálására. Az elhalt terület kimutatásához 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridot (TTC) használtunk. Ezen kívül vizsgáltuk a PACAP hatását a szisztémás vérnyomásra és a lokális agyi keringésre.

2., Ezt követő vizsgálatainkban az egyik gyakran használt Parkinson-kór modellt alkalmaztuk, ahol a substantia nigra sejtjeit lokálisan adott 6-OHDA injekcióval roncsoltuk az egyik oldalon. Mivel a legtöbb kísérletben a Parkinson-kór modellezéséhez fiatal hím állatokat alkalmaznak, ezért a PACAP-pal folytatott kísérleteink előtt a 6-OHDA lézió hatását különböző nemű és korú állatokon vizsgáltuk. A lézió után értékeltük a motoros aktivitási jeleket és a féloldali lézió következtében kialakuló aszimmetrikus tüneteket, majd tirozin-hidroxiláz immunhisztokémia segítségével jelöltük a substantia nigra és a ventralis tegmentalis area dopaminerg sejtjeit a lézió nagyságának megállapításához.

3., Ezen kísérleteket követte a lokális PACAP kezelés hatásának vizsgálata fiatal hím állatokban, ahol a korábban részletezett vizsgálatokat végeztük a 6-OHDA lézió után, de ezt apomorfín rotációs teszttel is kiegészítettük.

4., Ezután egy gyakran alkalmazott Huntington-chorea modellben, a quinolinsav indukálta egyoldali intrastriatalis lézióban vizsgáltuk a lokális PACAP kezelés hatását. A léziót követően a Parkinson-kór vizsgálata során is használt magatartási teszteket katepszin A teszttel egészítettük ki, és NADPH-diaforáz festéssel jelöltük a striatalis sejtjeit.

5., Végül az egyoldali intravitrealis PACAP kezelés hatását vizsgáltuk szisztémás glutamát kezelés indukálta retinális degenerációban. A léziót követően Nissl festéssel festettük meg a retina sejtjeit, és a rétegek vastagságának elemzésével állapítottuk meg a lézió mértékét.

### IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### *A. Állatok előkészítése*

Az állatok elhelyezése, gondozása és felhasználása a Pécsi Tudományegyetem ellenőrzött protokollja (No: BA02/2000-31/2001) szerint az intézeti ajánlások figyelembevételével történt. Ezt a protokollt követtük minden állatkísérletben.

#### *B. Állatkísérletes modellek*

##### *a. A fokális cerebrális ischaemia modell*

A vizsgálatokat 200-340 gramm súlyú felnőtt hím Wistar patkányokon végeztük. A műtét során elzártuk az a. cerebri mediát Longa módszere szerint. Az altatáshoz pentobarbitált alkalmaztunk (35 mg/kg), amit intraperitonealisan adtunk be.

### *b. A Parkinson-kór modell*

A Parkinson-kór modellezéséhez 200-300 gramm súlyú 3 hónapos hím (n=46) és nőstény (n=10) és 18-20 hónapos 350-450 gramm súlyú hím és nőstény (n=8 mindkét csoportban) Wistar patkányokat használtunk. Az állatok bal substantia nigráját 2 µl 4 µg/µl koncentrációjú 0,2% aszkorbinsavat is tartalmazó 6-OHDA-nal roncsoltuk. Az stereotaxiás műtét során az altatáshoz pentobarbitált használtunk ip (35mg/ttkg). A stereotaxiás műtét koordinátái: bregma ponttól 3 mm-re caudalisan és 2 mm-re balra, majd a kemény agyhártyától 8,5 mm-re az agyalap felé. Normál kontroll csoportként csak 2 µl fiziológiás sóoldattal kezelt állatokat használtunk.

### *c. Huntington-chorea modell*

A Huntington-chorea modellezéséhez 200-250 gramm súlyú hím Wistar patkányokat használtunk (n=22). Az állatok bal oldali striatumát 180 nmol/ 2 µl koncentrációjú quinolinsavval roncsoltuk. A stereotaxiás műtét koordinátái: bregma ponttól 1,3 mm-re caudalisan, 3 mm-re balra és a kemény agyhártyától 5 mm-re az agyalap felé.

### *d. A monosodium glutamát indukálta retinális degeneráció modell*

A vizsgálatsorozatot 1 napos Wistar újszülött patkányokon végeztük. Az újszülött hím és nőstény patkányokba szubkután juttattuk be a fiziológiás sóoldatban feloldott MSG-t 2 mg/testsúly dózisban 3 alkalommal a születést követő 1., 5. és 9. napon.

## **C. PACAP kezelés módja**

### *a. PACAP kezelés módja fokális cerebrális ischaemia modellben*

A vizsgálat során a különböző dózisu PACAP-ot stereotaxiás készülék segítségével icv adtuk be. A különböző dózisu PACAP-ot fiziológiás sóoldattal 2 µl-re hígítottuk. A vizsgálat első felében az állatokat 0,25 µg (n=8), 0,5 µg (n=10), 1 µg (n=10), 2 µg (n=9) valamint 4 µg (n=8) PACAP-pal kezeltük, és 12 órával az operáció után vizsgáltuk az infarktus nagyságát. A kontroll csoport állatai 2 µl fiziológiás sóoldatot kaptak (n=10). Mivel az alkalmazott dózisok közül csak a 2 µg PACAP bizonyult hatékonynak, ezért vizsgálatunk második felében csak ezen dózissal kezeltük az állatokat (n=12), és 24 órával az operáció után vizsgáltuk az infarktus nagyságát. A kontroll csoport 2 µl fiziológiás sóoldatot kapott (n=12). Végezetül vizsgálatunk harmadik szakaszában az állatokat 2 µg PACAP-pal (n=18) kezeltük a műtétet megelőzően 7 napig. A PACAP-ot naponta egy alkalommal megegyező időpontokban (13.00 és 15.00 óra között) adtuk be. A kontroll állatok itt is 2 µl fiziológiás sóoldatot kaptak (n=18).

### *b. PACAP kezelés módja Parkinson-kór modellben*

A PACAP kezelés során a fiatal hím Wistar patkányokat négy csoportba osztottuk. Az egyik csoport 0,01 µg (n=8), a második 0,1 µg (n=8), a harmadik 1 µg (n=12) PACAP kezelésben részesült a 6-OHDA lézió előtt, a negyedik csoport állatai 2 µl fiziológiás sóoldatot kaptak (n=8). A PACAP-ot 2 µl fiziológiás sóoldatban oldottuk fel, és Hamilton fecskendő segítségével juttattuk be a substantia nigrába, a lézióval megegyező korábban megadott koordinátákat alkalmazva.

*c. PACAP kezelés módja Huntington-chorea modellben*

A PACAP kezelés során az állatokat 0,2 µg (n=7) vagy 2 µg PACAP-pal kezeltük a quinolinsav lézió előtt (n=8), a harmadik csoport állatai 2 µl fiziológias sóoldatot kaptak (n=7). A PACAP-ot 2 µl fiziológias sóoldatban oldottuk fel, és Hamilton fecskendő segítségével juttattuk be a striatumba, a lézióval megegyező korábban megadott koordinátákat alkalmazva.

*d. PACAP kezelés módja monosodium glutamát indukálta retinális degeneráció modellben*

A PACAP kezelés során az első csoport állatainak egyik oldalon intravitrealisan 1 pmol (n=8) PACAP-ot adtunk postnatális 1., 5., és 9. napon az MSG kezeléssel egyidőben, míg a másik csoport egyedei 100 pmol (n=8) PACAP kezelésben részesültek. Mindkét esetben a PACAP-ot 5 µl fiziológias sóoldatban oldottuk fel. Vizsgálatunk során ugyanazon patkány jobb (PACAP kezelt) szeméhez bal (csak MSG kezelt) szemét kontrollként használtuk.

**D. Magatartásvizsgálatok**

*a. Magatartásvizsgálat fokális cerebrális ischaemia modellben, orientációs teszt*

Annak érdekében, hogy még pontosabban vizsgáljuk az ischaemia után kialakuló neurológiai eltéréseket és szenzomotoros változásokat, orientációs teszteket is végeztünk. A kísérlet során az első csoport 2 µl fiziológias sóoldatban oldott 2 µg PACAP-ot (n=8), a második csoport 2 µl fiziológias sóoldatot kapott (n=6) intracerebroventricularisan, majd elzártuk az a. cerebri media eredését. A harmadik és negyedik csoport egyedei hasonló kezelést kaptak (PACAP n=6, kontroll n=6), de itt csak áloperációt végeztünk. Az állatok különböző szenzoros stimuluskkal kiváltott orientációját két nappal az operáció után vizsgáltuk. A kísérlet során mértük az állatok reakcióidejét másodpercben.

*b. Magatartásvizsgálat Parkinson-kór modellben*

1. Motoros aktivitás és aszimmetrikus jelek vizsgálata

A Parkinson-kór ezen modelljében a legjellemzőbb tünetek a hipokinézia és az egyoldali roncsolás következtében kialakuló aszimmetrikus neurológiai jelek. Az aszimmetrikus jelek dominálnak a léziót követő napokban, de néhány nap múlva spontán részleges javulás észlelhető. Emiatt a magatartási vizsgálatokhoz több időpontot is választottunk. Open-field tesztet végeztünk 1 nappal a lézió előtt, 1 és 10 nappal a léziót követően.

A magatartási jeleket két fő csoportba osztottuk, vizsgáltuk a hipokinetikus jeleket valamint a féloldali lézió következményeképpen kialakuló aszimmetrikus jeleket. A motoros aktivitás értékelése során mértük a mozgással eltöltött időt és a 15 perc alatt megtett távolságot, az ágaskodások számát és a teljes nyugalmi időt. Az aszimmetrikus jelek értékelése kapcsán vizsgáltuk a spontán jobbra és balra irányuló forgásokat, az aszimmetrikus ágaskodást és thigmotaxist.

## 2. Apomorphin-teszt

A műtét utáni 2. héten apomorfinnal indukált forgási tesztet végeztünk. Az egyoldali roncsolás miatt oldalkülönbség alakult ki a dopamin receptor agonista apomorfinnal szembeni érzékenységre. Az állatok 0,1 mg/kg apomorfint kaptak szubkután, mely a lézióval ellentétes oldalra irányuló forgó mozgást váltott ki. Ezt a beadást követően 30 percig ellenőriztük, számoltuk a 360 fokos jobbra irányuló forgások számát. Mindezen motoros tesztek közül a lézió súlyosságára, illetve a javulási tendenciára tudunk következtetni.

### *c. Magatartásvizsgálat Huntington-chorea modellben*

#### 1. Motoros aktivitás és aszimmetrikus jelek vizsgálata

A Huntington-chorea ezen modelljében a legjellemzőbb tünetek a hiperkinézia és az egyoldali roncsolás következtében kialakuló aszimmetrikus neurológiai jelek. A magatartási vizsgálatot a Parkinson-kór modellnél részletezett protokoll alapján végeztük, de itt 30 nappal a lézió után is megvizsgáltuk az állatokat.

Az értékelés során vizsgáltuk az állatok aktív mozgással eltöltött idejét és az összes forgások számát, melyek a hiperkinézia súlyosságát mutatják. Az aszimmetrikus jelek közül értékeltük az aszimmetrikus forgást, ágaskodó magatartást és thigmotaxist.

#### 2. Katalepszia teszt

A műtét után 3 héttel haloperidol indukálta katalepszia tesztet végeztünk. Az állatokat 0,5 mg/kg haloperidollal kezeltük ip és két órával a beadást követően végeztük el a teszteket. A katalepszia teszt során az állatok mellső végtagjait egy 7 cm és egy 10 cm magasra helyezett rúdra, valamint egy oldalára döntött 7 cm átmérőjű befőttes üveg oladalára helyeztük, és mértük a mozdulatlansággal eltöltött időt .

## ***E. Morfológiai vizsgálatok***

### *a. A károsodott agyterület értékelése fokális cerebrális ischaemia modellben*

A vizsgálattól függően 12, 24 órával a műtét után éter narkózisban dekapitáltuk az állatokat. Az agyból szeletelő mátrix segítségével szeletet készítettünk. Az elhalt területek és az épen maradt részek arányának pontos megállapításához 2%-os fiziológiás sóoldatban oldott 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridot (TTC) használtunk. A festék a mitokondriális reduktázok kimutatására alkalmas, melyek az ép sejtekben a tetrazolium sötét egy sötétvörös vegyületté alakítják át, az elhalt terület pedig nem festődik. Az elhalt terület nagyságát az egész agyterület százalékában adtuk meg, így lehetőség nyílt az egyes infarktusok nagyságának összehasonlítására.

### *b. Szövetani vizsgálat Parkinson-kór modellben*

A viselkedési teszteket követően az állatok agyát fixálás után eltávolítottuk, és 50 µm-es frontális metszeteket készítettünk a substantia nigra területéből. A dopaminerg neuronokat tirozin-hidroxilázzal (TH), a dopamin szintézis enzimjének immunhisztokémiai kimutatásával azonosítottuk TH elleni monoklonális egér antitestet használva.

Mind az ipsilateralis oldalon a substantia nigra pars compacta területén (A9 sejtcsoport) és a ventralis tegmentalis areában (A10 sejtcsoport) megszámoltuk a TH-pozitív sejteket. A sérült oldal sejtszámát az ép oldal százalékában adtuk meg.

### *c. Szövetteni vizsgálat Huntington-chorea modellben*

A quinolinsav intrastriatális injekciója szelektív neuronális károsodást hoz létre a striatumban. Az aktivitási tesztek befejezése után az állatokat fixáltuk, és az agy striatumot tartalmazó részéből metszeteket készítve, NADPH-diaforáz festéssel megfestettük. A korábban leírt módszer szerint mind a contralateralis, mind az ipsilateralis oldalon a striatum területén megszámoltuk a NADPH-diaforáz pozitív sejteket. Ezután a sérült oldal sejtszámát az ép oldal sejtszámának százalékában adtuk meg.

### *d. Szövetteni vizsgálat monosodium glutamát indukálta retinális degeneráció modellben*

A patkányokat 3 hetes korukban dolgoztuk fel. Altatás után a patkányokat fixáltuk, és mindkét szemüket eltávolítottuk. A retinából készített félvékony metszeteket Nissl szerint megfestettük. A retinarétegek vastagságának értékeléséhez NIH Image 1.55 programot alkalmaztunk, ahol a különböző rétegek vastagságát azonos területről készült metszetben mértük le. Vizsgálatunk során lemértük a belső sejtes réteg (INL) és a belső rostos réteg (IPL) vastagságát, valamint a külső és a belső határhártya közti távolságot (ILM-OLM távolság), így módon kizártuk a külső fotoreceptorok nagyfokú variabilitása miatt kialakuló különbségeket.

### ***F. A testhőmérséklet, a szisztémás vérnyomás és lokális agyi keringés vizsgálata***

A műtét alatt az állatok hőmérsékletét rectalis hőmérővel ellenőriztük, ugyanis korábbi vizsgálatok során megfigyelték, hogy az infarktus következményeképpen kialakuló magas hőmérséklet befolyásolja a nekrotikus terület nagyságát.

A keringés nagymértékben befolyásolja az ischaemiás károsodás mértékét, ezért kísérleteink során regisztráltuk a patkány artériás vérnyomásának változását PACAP kezelés után aorta abdominalis kanül segítségével. Emellett az állat végtagjaira EKG-elektrodokat helyeztünk, így pulzusát is mérni tudtuk. A 2 µg PACAP-ot a mérés során intracerebroventricularisan adtuk be. A beadást követően 1, 5, 10, 15, 20, 25 perccel rögzítettük a vérnyomást.

Egy másik kísérletben (n=6) pentobarbitál anesztézia alatt a parietalis cortex keringését mértük lézer dopplerrel. A bregma mögött 1 mm-re, 5 mm-re balra 1 mm átmérőjű nyílást fúrtunk, majd a detektort az ép dura felszínére helyeztük. Fiziológias sóoldatot fecskendeztünk a detektor és a dura közé, hogy a vizsgálat során a direkt kontaktus fennmaradjon. Az állatok bal oldalkamrájába 2 µg PACAP-ot valamint fiziológias sóoldatot injektáltunk, és a lokális agyi keringés változását 1 órán keresztül mértük. Az értékeket a beavatkozás előtt mért értékek százalékában adtuk meg.

### ***G. Statisztika***

Az eredményeket átlag±SEM formában adtuk meg. A magatartásvizsgálatok parametrikus adatait ANOVA teszttel hasonlítottuk össze, melyet Neumann-Keul post-hoc analízis követett. A tesztek nonparametrikus adatait, valamint a forgások számát Dunn post-hoc analízissel értékeltük a nonparametrikus ANOVA tesztet követően. Az aszimmetria fokát egy csoporton belül Mann-Whitney teszttel vizsgáltuk. A TH-pozitív sejtek számát Dunn post-hoc analízissel hasonlítottuk össze a varianciaanalízist követően. A NADPH-diaforáz

pozitív sejtek számát a léziós és az ép oldalon Student-t teszttel hasonlítottuk össze. A különböző retinális rétegek vastagságának összehasonlításához ANOVA tesztet alkalmaztunk, majd ezután Neumann-Keul's posthoc analízis követett. A  $P < 0,05$  eredmények esetén az eltérést szignifikánsnak tekintettük.

## V. PREVENTÍV PACAP KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA FOKÁLIS CEREBRÁLIS ISCHAEMIÁBAN

### A. Eredmények

#### a. Orientációs teszt

Az orientációs tesztben nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportok között az operáció előtt. Az áloperált állatok értékei a műtét után sem változtak szignifikánsan. Ezzel szemben az a. cerebri media elzárása után a contralateralis oldalon mért reakcióidők szignifikánsan növekedtek mind a kontroll, mind a PACAP kezelt csoportoknál. A kontroll és a PACAP-pal kezelt léziós állatok értékei közt csak egy tesztben találtunk szignifikáns eltérést. A PACAP-pal kezelt állatok szignifikánsan rövidebb idő alatt reagáltak a hátsó testrészt érintésére, mint a kontroll állatok.

#### b. Károsodott agyterület nagyságának értékelése

A kísérletünk első felében az állatokat 12 órával a léziót követően dolgoztuk fel. A 250 ng-os, 500 ng-os, 1  $\mu$ g-os és 4  $\mu$ g-os PACAP dózissal nem értünk el szignifikáns csökkenést az infarktus nagyságában. Ezzel szemben a 2  $\mu$ g-os csoportban a PACAP szignifikánsan csökkentette az infarktus nagyságát, ugyanis az infarktus területe  $5,85 \pm 3,2\%$ -ra csökkent, míg a kontroll csoport infarktusának nagysága  $14,85 \pm 7,2\%$  volt. 24 órával a műtétet követően a 2  $\mu$ g PACAP itt is hatásosnak bizonyult, ugyanis a kontroll állatokban mért  $21,53 \pm 9,4\%$ -os agykárosodást  $10,25 \pm 5,3\%$ -ra csökkentette.

A preventív kezelés során, amikor az állatokat 7 napon keresztül kezeltük 2  $\mu$ g PACAP-pal, hasonló eredményt értünk el, mint az egyszeri dózissal, hiszen az infarktus nagysága  $10,6 \pm 2,1\%$ -a volt az egész agyterületnek, ami nem különbözött szignifikánsan az egyszeri dózistól mért  $10,25 \pm 5,3\%$ -os értéktől.

#### c. A testhőmérséklet, a szisztémás vérnyomás és a lokális agyi keringés vizsgálata

Az állatok hőmérsékletét a műtét után minden esetben ellenőriztük, és nem találtunk szignifikáns eltérést a kontroll állatokéhoz viszonyítva.

Az artériás vérnyomás vizsgálata során nem találtunk szignifikáns eltérést a 2  $\mu$ g PACAP intracerebroventricularis beadása után. A corticalis agyi keringést a PACAP intracerebroventricularis beadását követően mértük, ami a PACAP beadást követően emelkedett az első 15 percben, 20 perc múlva elérte a maximális értéket, amely szignifikánsan magasabb volt a kiindulási értéknél, majd fokozatosan visszatért az eredeti szintre.

## B. Az eredmények értékelése

Kísérletünkben kimutattuk, hogy a lézió előtt intracerebroventricularisan beadott 2 µg PACAP szignifikánsan csökkenti a károsodott agyterület nagyságát, és nem találtunk szignifikáns különbséget az egyszeri és a preventív kezelés hatékonysága közt.

Az orientációs test vizsgálata során azt találtuk, hogy a PACAP-pal kezelt állatok gyorsabban reagáltak a hátsó testfél érintésre, mint a kontroll állatok. Az jól ismert, hogy míg az elülső testfél reprezentációja az infarktus centrumában, addig a hátsó testfél a dorsomedialis cortexben található, ami a penumbra területéhez tartozik, és a legtöbb PACAP-pal kezelt csoportban épen maradt.

A PACAP nagy mennyiségben megtalálható az agy és a pia mater artériáinak falában, és az agyi erekben vasodilatációt hoz létre. Esetünkben a corticalis keringés a PACAP beadást követően az első 20 percben szignifikánsan emelkedett, majd fokozatosan visszatért az eredeti szintre. Hasonló eredmények születtek korábbi kísérletekben is, és bár a PACAP effektív vasodilatátora az agyi ereknek, hatását csak magasabb koncentrációban képes kifejteni.

## VI. 6-OHDA INDUKÁLTA EGYOLDALI SUBSTANTIA NIGRA LÉZIÓ VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ NEMŰ ÉS KORÚ PATKÁNYOKBAN

### A. Eredmények

#### a. Magatartásvizsgálat

A motoros aktivitás vizsgálata során a fiatal hím és nőstény állatok a 6-OHDA kezelést megelőzően szignifikánsan aktívabbak voltak, mint az öreg állatok, de az azonos korú nőstények és hímek között nem volt szignifikáns különbség. 1 nappal az operáció után az aktivitás szignifikánsan lecsökkent az összes állatcsoportban. Az öreg hímek sokkal súlyosabb hipokinetikus tüneteket mutattak, mint a fiatal hímek, de nem találtunk szignifikáns eltérést a fiatal és öreg nőstények aktivitásában 1 nappal az operációt követően. Bár az aktivitáscsökkenés sokkal súlyosabb volt a fiatal nőstény állatoknál, mint a fiatal hímeknél, az aktivitás mind a fiatal, mind az öreg nőstények esetében 10 nappal az operációt követően visszatért a normál szintre, míg a hím állatok még 10 nappal később is szignifikánsan kevesebbet mozogtak a 0 napos értékekhez képest.

Az operáció előtt az állatok közel azonos számban forogtak mindkét irányban. 1 nappal a 6-OHDA léziót követően az állatok szignifikánsan többet forogtak a bal oldalra. Az aszimmetria mind a fiatal mind az idős hímeknél 10 nappal az operációt követően is fennállt, míg a nőstény állatoknál eltűnt a bal oldali túlsúly.

1 nappal az operáció után az állatok ágaskodó mozgása is aszimmetrikus volt. Az ágaskodások számát az idős hím állatoknál nem tudtuk értékelni, mert az öreg hímek nem ágaskodtak egyet sem a megfigyelés ideje alatt. A 10. nappal az ágaskodásban csökkent a bal oldali dominancia, de a javulás csak a fiatal nőstényeknél volt szignifikáns, mivel itt az aszimmetria teljesen eltűnt. Hasonló eredményeket kaptunk a thigmotaxis vizsgálata során.

#### b. Szövetteni vizsgálat

TH-immunhisztokémia segítségével vizsgáltuk a dopaminerg sejtek számát a substantia nigra pars compactájában mind a léziós, mind az ép oldalon. A 6-OHDA léziót követően a hím állatokban szignifikánsan csökkent a substantia nigra pars compactájában található dopaminerg sejtek száma. A dopaminerg sejtek közel 94%-a pusztult el a léziós

oldalán a hím állatokban, de szignifikáns különbséget nem találtunk a fiatal és az öreg hím állatok sejtpusztulása között. Ezzel szemben a nőstény állatoknál szignifikánsan kisebb mértékű sejtpusztulást találtunk, ami megközelítőleg 60-70%-a volt az époldali sejtszámnak

## **B. Az eredmények értékelése**

Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a 6-OHDA léziót követően a nőstény állatoknál kevesebb dopaminerg sejt pusztult el a substantia nigrában, és a lézió következtében kialakuló magatartási eltérések is jóval enyhébbek voltak, mint a hím egyedeknél. Ebből arra következtethetünk, hogy a nőstény állatok kevésbé érzékenyek a 6-OHDA károsító hatására, mint a hím állatok. Bár az idős állatok magatartásbeli eltérései sokkal súlyosabbnak bizonyultak, a szövettani vizsgálat során nem találtunk nagyobb sejtpusztulást az öreg állatoknál, mint a fiatal patkányoknál.

Jelenleg széles körben vizsgálják az öregedés hatását a dopamin rendszerre, és az általa szabályozott magatartási jelekre, de a legtöbb esetben csak hím állatokon végeznek kísérleteket. Korábban már kimutatták, hogy a motoros aktivitás nagymértékben csökken az idős állatoknál, de az irodalomban közölt adatok közt számos ellentmondás van. Az ellentmondásos adatok ellenére azt az általános következtetést, hogy az idős állatok motoros aktivitása csökken, a mi kísérletünk is megerősítette. Ezen felül azt is kimutattuk, hogy az idős nőstények és hímek motoros aktivitása egyenlő mértékben csökken.

Az állatok különböző neurotoxikus hatásokkal szembeni érzékenységet számos faktor befolyásolja, mint például genetikai faktorok, egyedi endogén variabilitás és a kor. Az már ismert tény, hogy az idős állatok sokkal érzékenyebbek a különböző neurotoxikus károsító tényezőkkel szemben, mint a fiatal állatok. Különösen abban az esetben, amikor kis mennyiségű toxint adnak az állatnak. Saját kísérletünk során azt találtuk, hogy a sejtpusztulás azonos mértékű volt az öreg és a fiatal állatoknál, de a magatartási eltérések sokkal kifejezettebbek voltak az idős állatoknál. Hasonló eredményt írt le Linder munkacsoportja is. Kísérleteink során továbbá azt az érdekes eredményt kaptuk, hogy az idős és a fiatal hím állatok egyformán javultak a 10. napra, aminek az oka az lehet, hogy a substantia nigrában azonos mennyiségű sejt pusztult el.

Korábbi kísérletekben a magatartási jelek vizsgálata során számos eltérést találtak a nőstény és a hím állatok között. A nőstény állatok általában sokkal aktívabbak, még gonadectomiát követően is, ami azt igazolja, hogy a nagyobb aktivitás hátterében nem csak a gonadális hormonok állnak. Vizsgálatunk során mi nem találtunk szignifikáns különbséget a fiatal nőstény és hím állatok aktivitása közt az operáció előtt, de 10 nappal az operáció után feltűnő különbség volt a két nem között: mind a fiatal és az idős nőstények szignifikánsan aktívabbak voltak, mint a hím állatok, vagyis a nőstények hipokinetikus jelei sokkal gyorsabban javultak.

Mint azt már korábban említettük, a neurotoxikus hatásokkal szembeni érzékenységet számos faktor befolyásolja. Néhány kísérletben a nemi különbségeket is vizsgálták, de ezen eredmények száma nagyon kevés. A mi eredményeink is alátámasztották ezen korábbi megfigyeléseket, ugyanis a nőstény állatok léziós oldali substantia nigrájában szignifikánsan több TH-immunpozitív sejtet találtunk 6-OHDA léziót követően, mint a hím állatokban. Ráadásul ezen eltérést az idős nőstény és hím állatok között is ki tudtuk mutatni. A magatartási vizsgálatok azt mutatták, hogy a fiatal nőstények szignifikánsan jobban javultak az operációt követően, és az idős nőstények kezdeti hipokinetikus jelei sem voltak olyan súlyosak, mint a többi csoportban.

Korábbi irodalmi adatokból ismert, hogy az aszimmetrikus jelek a posztoperatív időszakban részleges javulást mutatnak, és a javulás dinamikáját nagymértékben befolyásolja a károsodott dopaminerg sejtek száma. Azok az állatok, amelyek dopaminerg sejtjei súlyosan

károsodtak, nem mutatnak javulást az operációt követő első héten, míg a kisebb lézióval rendelkező állatok részlegesen vagy teljesen megjavulnak. Kísérletünk során azt találtuk, hogy a hím állatoknál a dopaminerg sejtek 90%-a pusztult el a léziós oldalon, míg a nőstény állatoknál a károsodás csak 50-60%-os volt. A szövettani vizsgálattal észlelt szembetűnő különbség magyarázatot adhat arra, hogy miért javultak sokkal gyorsabban a nőstény állatok hipokinetikus és aszimmetriás jelei. Az idős nőstények aszimmetrikus jelei az aszimmetrikus forgás kivételével azonban nem tűntek el teljesen 10 nappal az operáció után, aminek hátterében a kissé súlyosabb sejtkárosodás és a kompenzatórikus mechanizmusok ineffektív működése állhat.

Jelenlegi kísérletünkkel további adatokat szolgáltatunk arra, hogy 6-OHDA indukálta substantia nigra károsodás eltérő magatartási és szövettani eltéréseket okoz különböző nemű, és korú állatoknál. Ezzel a vizsgálattal is bizonyítottuk azt, hogy az egyes betegségek preklinikai kutatásában fontos szerepet töltenek be a nemi és az életkori különbségeket vizsgáló munkák, hiszen ezek nagy segítséget nyújthatnak a betegségek hatékonyabb klinikai terápiájának kidolgozásában.

## VII. PACAP KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PARKINSON-KÓR MODELLBEN

### A. Eredmények

#### *a. Magatartásvizsgálat*

A motoros aktivitás vizsgálata során a Parkinson-kórra jellemző hipokinetikus jeleket találtunk a kontroll, csak 6-OHDA-nal kezelt állatcsoportban mindkét vizsgált időpontban. Ezzel szemben csak néhány esetben találtunk szignifikáns eltérést a PACAP-pal kezelt csoportok, és a normál illetve a fiziológias sóoldattal kezelt állatok eredményei között. Legaktívabbak a 0,1  $\mu\text{g}$  PACAP-pal kezelt állatok voltak a léziós csoportok közül.

Az aszimmetrikus jelek vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a 6-OHDA lézió átesett állatok szignifikáns balra irányuló forgó mozgást végeztek 1 nappal az operáció után. A 10. npra ezen aszimmetria teljesen eltűnt a PACAP-pal kezelt csoportoknál, míg a kontroll csoport egyedei későbbi időpontban is szignifikáns bal oldali túlsúlyú aszimmetriát mutattak. Hasonló eredmények születtek az aszimmetrikus ágaskodás és thigmotaxis vizsgálata során is.

#### *b. Apomorfín indukálta forgó mozgás vizsgálata*

A fiziológias sóoldattal kezelt állatoknál apomorfínnal nem tudtunk rotációs mozgást indukálni. A 6-OHDA-nal kezelt kontroll csoportban a forgások átlag mennyisége 30 perces megfigyelés alatt  $186,5 \pm 33,4$  volt. A PACAP-pal kezelt csoportok egyedei szignifikánsan kevesebbet forogtak, a forgások átlag száma  $65,0 \pm 26,8$ ,  $17,06 \pm 6,9$  és  $14,5 \pm 9,5$  volt az 1, 0,1 és 0,01  $\mu\text{g}$  PACAP-pal kezelt csoportokban.

#### *c. Szövettani vizsgálat eredménye*

A kontroll állatcsoportban TH-immunohisztokémia segítségével súlyos dopaminerg sejtkárosodást találtunk a substantia nigra pars compactájában. A dopaminerg sejtek megközelítőleg 90%-a pusztult el a kezelés hatására a lézió oldalán. A PACAP-pal kezelt csoportoknál szintén szignifikáns mértékű sejtkárosodást észleltünk a lézió oldalán a normál állatokhoz viszonyítva, de a sejteknek itt csak az 50%-a pusztult el a kezelés hatására.

A ventralis tegmentalis areában a sejtek kevésbé sérültek a 6-OHDA kezelés hatására, mint a substantia nigra sejtjei. A kontroll csoportban a dopaminerg sejtek 60%-a pusztult el a léziós oldalon, ami szignifikáns különbségnek bizonyult a fiziológiás sóoldattal kezelt állatok sejtpusztulásához képest. Minden PACAP kezelt csoportban a sejtpusztulás aránya csak 10% volt, ami szignifikánsan kevesebb, mint a kontroll csoport sejtpusztulásának mértéke.

## **B. Az eredmények értékelése**

A leírt eredményeink arra engednek következtetni, hogy a PACAP képes kivédeni a 6-OHDA neurotoxikus hatása következtében kialakuló hipokinéziát és elősegíti a kialakuló tünetek mielőbbi javulását. A legjobb eredményeket a 0,1 µg PACAP-pal kezelt állatoknál találtuk. Kísérletünk során kimutattuk, hogy a PACAP kezelés mindkét vizsgált agyterületben nagy mennyiségben megvédte a dopaminerg sejteket, és a neurológiai tünetekben észlelt szignifikáns javulás e két területben észlelt védő hatás együttes következménye lehet.

Korábbi kísérletekben mások kimutatták, hogy az intracerebroventricularis PACAP kezelés képes fokozni a patkányok spontán motoros aktivitását és az ágaskodásaik számát. Ezen korábbi megfigyelések alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP motoros aktivitásra kifejtett hatása is ellensúlyozni képes a dopaminerg károsodás következtében kialakuló magatartásbeli eltéréseket.

Eredményeink azt mutatják, hogy bár a PACAP-pal kezelt állatok is súlyos aszimmetrikus jeleket mutattak a műtét után, de ezek a jelek a 10. napra teljesen eltűntek. Ezen megfigyelések szoros összefüggésben állnak az épen maradt dopaminerg sejtek mennyiségével.

Azon megfigyeléseink, mely szerint a kisebb dózisu PACAP hatásosabbnak bizonyult, megegyeznek más kutatások eredményeivel. Számos kísérletben kimutatták a PACAP dózis függő hatását, melynek háttérében az állhat, hogy a különböző dózisu PACAP más jelátviteli utakon keresztül fejti ki hatását.

## **VIII. PACAP KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA HUNTINGTON-CHOREA MODELLBEN**

### **A. Eredmények**

#### *a. Magatartásvizsgálat*

A motoros aktivitás vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a quinolinsav léziós kontroll állatok hiperkinetikusak voltak, szignifikánsan többet mozogtak 1 nappal az operációt követően a normál állatokhoz képest, de a mozgással töltött idő a 10. napra a normál szintre csökken. A 2 µg PACAP-pal kezelt állatok szintén szignifikánsan többet mozogtak, mint a normál állatok 1 és 10 nappal az operáció után. Ezzel szemben a 0,2 µg PACAP kezelésben részesült állatok egyik vizsgált időpontban sem mozogtak szignifikánsan többet, mint a normál állatok.

Az aszimmetrikus jelke rendkívül szembetűnőek volt a quinolinsavval kezelt kontroll állatoknál és a 2 µg PACAP-pal kezelt állatoknál 1 nappal az operációt követően, ami részlegesen javult a 10. napra, de további javulást nem mutatott. Ezzel szemben a 0,2 µg PACAP-pal kezelt állatok bár szignifikáns aszimmetriát mutattak 1 nappal a kezelés után, ez az aszimmetria teljesen eltűnt a 10. napra.

#### *b. Katalepszia teszt*

A rigiditási jelek vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a kontroll léziós állatok és a 2 µg PACAP-pal kezelt állatok szignifikánsan kevesebb időt töltöttek mozdulatlanul mindhárom tesztnél, mint a normál állatok. A 0,2 µg PACAP-pal kezelt állatok a normál állatokhoz hasonlóan teljesítettek a magasabb rúdon és az üveg tesztben, hiszen mindkét csoport egyedei hosszú ideig képesek voltak megtartani abnormális helyzetüket.

### c. Szövetteni vizsgálat

A szövetteni vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a léziós oldalon a kontroll állatoknál a NADPH-diaforáz pozitív neuronok száma kb. 20%-al kevesebb volt, mint az ép oldalon, míg a PACAP-pal kezelt állatoknál a sejtelhalás csak 10%-a volt az ép oldalnak.

## B. Az eredmények értékelése

Kísérletünkben bebizonyítottuk, hogy a quinolinsav léziót megelőző PACAP kezelés felére csökkentette a károsodott sejtek számát a striatumban, megakadályozta a hiperaktivitás kialakulását, és elősegítette a féloldali lézió következtében kialakuló aszimmetrikus jelek gyors javulását.

A kísérlet során észlelt sejtkárosodás mértéke nagymértékben eltért korábban a Parkinson-kór modellben a substantia nigra területén észlelt közel 80%-os sejtpusztulástól. Ez azzal magyarázható, hogy kísérletünk során a NADPH-diaforáz festést alkalmaztuk, amely a közepes méretű tüske nélküli neuronokat festi, amelyek relatíve megkíméltebbek a quinolinsav lézió során. Azért választottuk mégis ezt a léziót, mert az így létrejött striatalis károsodás modellezi legjobban az emberi Huntington-chorea pathomorfológiai sajátosságait. PACAP kezelés hatására megközelítőleg fele annyi sejt pusztult el a lézió után, mint a kontroll állatokban, ezzel magyarázhatóak a PACAP-pal kezelt állatok szignifikánsan jobb neurológiai tünetei.

A Parkinson-kór modellben elért eredményekhez hasonlóan itt is az alacsonyabb dózis volt a hatékonyabb, míg a nagyobb dózis esetében a kontroll állatokhoz hasonló hiperaktivitást találtunk a motoros aktivitás vizsgálata során. Mint ahogy azt már a korábbi fejezetekben részletesen leírtuk ezen eredmények háttérében a PACAP dózisfüggő hatása, valamint a magasabb koncentrációjú PACAP aktivitást fokozó hatása állhat.

A PACAP védő hatásának pontos mechanizmusa a Parkinson-kórhoz hasonlóan a Huntington-chorea modellben sem ismert. Mégis ismerve a betegségek pathomechanizmusát, és a PACAP korábban *in vitro* kísérletekben kimutatott védő hatásait számos lehetséges mechanizmus számításba jöhet. Ezeket az utolsó fejezetben tárgyaljuk.

## IX. PACAP KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA MONOSODIUM GLUTAMÁT KEZELÉS KÖVETKEZTÉBEN KIALAKULÓ RETINÁLIS DEGENERÁCIÓBAN

### A. Eredményeink

Az újszülött patkányokban MSG kezelést követően súlyos retinadegeneráció alakult ki. A kezelt állatok retinájának ILM-OLM távolsága megközelítőleg fele akkora volt ( $79.7 \pm 4.5 \mu\text{m}$ ), mint a kezeletlen állatokban mért távolság ( $163.7 \pm 5.4 \mu\text{m}$ ). A károsító hatások leginkább a belső retinális rétegeket érintették. A MSG kezelt állatoknál a fotoreceptor rétegben, a külső sejtes és rostos rétegben szignifikáns elváltozást nem találtunk, de a belső sejtes réteg és a ganglion sejtek rétege a háromszori MSG kezelést követően teljesen összeolvadt. Ezen rétegek vastagsága több mint felére csökkent, a köztük elhelyezkedő belső rostos réteg eltűnt. Az MSG kezelés mellett 1 pmol PACAP-pal is kezelt állatok retinája

(91,5±5,38 μm) nem különbözött szignifikánsan a kontroll, a csak MSG-vel kezelt állatok retinájának szerkezetétől. Ezzel szemben a 100 pmol intravitreális PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette az MSG kezelés indukálta retinális károsodást (116,1±5,14 μm). Bár ezen csoport állatainak retinái szignifikánsan vékonyabbak voltak, mint a normális retina vastagsága, a belső rétegek nem szenvedtek olyan súlyos károsodást, mivel mindhárom belső réteg (INL, IPL és GCL) jól láthatóan elkülönült egymástól. A belső rétegek szignifikánsan szélesebbek voltak, mint az MSG kezelt kontroll állatok belső retinális rétegei, és a retina szerkezete a normális retina struktúráját mutatta.

## B. Az eredmények értékelése

Az előzőekben leírt kísérletünkben kimutattuk, hogy az intravitreális PACAP kezelés szignifikánsan csökkenti az MSG kezelés következtében kialakuló retinális károsodás mértékét. Az ismételt magas dózisu MSG kezelés rendkívül súlyos retinális degenerációt okozott legfőképpen a retina belső rétegeiben. Az még pontosan nem ismert, hogy milyen sejtek élnek túl az MSG kezelést. A belső rétegek sejtjei az ON bipoláris sejtek kivételével egyaránt rendelkeznek ionotrop glutamát receptorokkal, emiatt ezek a sejtek egyaránt lehetnek az MSG toxicitás célpontjai. Azonban a sejtek hasonló eloszlásban rendelkeznek PACAP receptorokkal is, ami magyarázhatja ezen sejtek ellenállását az exitotoxikus károsodással szemben. A belső rostos réteg nagymértékben degenerálódott MSG hatására, de a PACAP kezelt állatoknál a károsodás jóval kisebb volt. Ezen eredmény háttérében az feltételezhető, hogy az OFF bipolar sejtek rendelkeznek non-NMDA ionotrop glutamát receptorokkal, de PACAP receptor nincs a felszínükön, és emiatt lehetnek érzékenyebbek a károsító hatásokkal szemben.

## X. MEGBESZÉLÉS

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a PACAP neuroprotektív hatású fokális cerebrális ischaemiában, Parkinson-kór modellben, Huntington-chorea modellben és glutamát okozta retinális károsodásban. Ezen idegrendszeri elváltozások pathomechanizmusában más-más folyamatok vesznek részt, de végül minden körképben a neuronpusztulás fő oka az oxidatív stressz és a glutamát indukálta apoptotikus sejthalál. Ezen léziókon kívül a fokális cerebrális ischaemiában és a neurodegeneratív megbetegedésekben mind állatkísérletes modellben, mind emberben az inflammatorikus hatások is fontos szerepet töltenek be. A PACAP felfedezése óta számos *in vitro* és *in vivo* kísérletben bebizonyították már neuroprotektív hatását. *In vitro*, a PACAP stimulálja a neuronok növekedését, elősegíti túlélésüket, antiapoptotikus hatással rendelkezik, és védi a neuronokat a különböző neurotoxikus hatásokkal szemben, ezenkívül segíti a neuronok differenciálódását és proliferációját a fejlődés közben, és segíti más trofikus faktorok expresszióját és hatását. A PACAP antiinflammatorikus hatását is bebizonyították már mind *in vivo*, mind *in vitro* kísérletekben. *In vivo*, a PACAP védi a hippocampus CA1 sejtjeit globális ischaemiában és a cholierg neuronokat a fornix átmetszése után. A PACAP patkányban csökkenti a károsodott agyterület nagyságát, és javítja a neurológiai jeleket fokális cerebrális ischaemiát követően. Nemrégiben bebizonyították, hogy a PACAP neuroprotektív tranziens fokális ischaemiában, és más neuronális károsodások esetén, mint például a gerincvelő, a nervus facialis sérülése esetén és a nervus opticus átmetszése után patkányban. A különböző neuropatológiás elváltozásokat követő PACAP upregulációból is arra következtethetünk, hogy fontos szerepe lehet a posztraumás regenerációs folyamatokban.

Az ischaemiás és a neurodegeneratív elváltozások mellett a retina patológiás elváltozásainak háttérében is számos esetben a glutamát indukálta idegkárosító folyamatok állnak. Mivel több kísérletben bebizonyították már a PACAP védő hatását a glutamát

indukálta neuropatológiás folyamatokban, ezért ez magyarázatul szolgálhat arra, hogy kísérleteinkben az ischaemiás és a neurodegeneratív modelleken kívül, a glutamát indukálta retinális degenerációban is csökkenteni tudtuk a lézió nagyságát.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a PACAP hatásosnak bizonyult az általunk vizsgált idegrendszeri károsodást modellező állatkísérletben, így tovább gyarapítottuk azon kísérleti eredményeket, amely a PACAP jövőbeli klinikai alkalmazásának alapjai lehetnek.

A PACAP azonban csak egyike azon számos neuroprotektív hatású anyagoknak, melyek *in vivo* kísérletekben csökkentik a károsodás mértékét különböző idegrendszeri sérülésekben. Bizonyították már többek között az ösztrogén és a hypothermia neuroprotektív hatását cerebrális ischaemiában, de a glutamát antagonisták,  $Ca^{2+}$ -csatorna blokkolók, antioxidánsok, antiinflammatorikus készítmények az ischaemián kívül a különböző neurodegeneratív és egyéb toxikus károsodások terápiájában is fontos szerepet töltenek be. A gyógyszerkísérletek középpontjában álló szerek többsége a klinikai kipróbálásban egyelőre nem bizonyult hatékonynak részben a mellékhatások, részben a nagyon szűk terápiás ablak miatt. Ezenkívül egyes szerek toxikus mellékhatásokkal rendelkeznek, és nem képesek átjutni a vér-agy gáton, ami szintén nagy problémát jelent ezen anyagok szisztémás alkalmazásában.

A PACAP klinikai alkalmazását elősegíti az, hogy endogén peptidként az emberi szervezetben számos helyen megtalálható, így a fiziológiás koncentráció exogén alkalmazása során toxikus hatásokat nem fejt ki. Ezenkívül nemcsak lokális kezelésre nyújt lehetőséget, hanem szisztémásan is alkalmazható, mivel intravénás beadását követően képes átjutni a vér-agy gáton, azonban a PACAP koncentrációja a vérben hamar csökken, ezért a folyamatos infúziós kezelés hatásosabbnak bizonyult egyes kísérletekben, mint az egyszeri dózis. Kísérleteink további célja a PACAP hatásmechanizmusának még részletesebb vizsgálata, és olyan biológiailag aktív fragmentumok előállítására, ami könnyebbé tenné a klinikai alkalmazást, hogy a PACAP egy ígéretes terápiás lehetőség legyen az idegrendszeri sérülések klinikai ellátásában.

## XI. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1., Kimutattuk, hogy az a. cerebri media elzárása előtt intracerebroventricularisan beadott PACAP szignifikánsan csökkenti a károsodott agyterület nagyságát, és nem találtunk szignifikáns különbséget az egyszeri és a 7 napig tartó kezelés hatékonysága közt. A neurológiai vizsgálat során nem volt szignifikáns eltérést a PACAP-pal kezelt és a kontroll állatok között, ezzel ellentétben az orientációs tesztben a hátsó testfél érintését követő reakcióidő szignifikánsan csökkent a PACAP-pal kezelt állatokban a kontroll csoporthoz képest. A PACAP intracerebroventricularis beadása után a szisztémás vérnyomásban nem észleltünk változást, míg a corticalis agyi keringés a PACAP beadást követően az első 20 percben szignifikánsan emelkedett, majd fokozatosan visszatért az eredeti szintre.

2., Adatokat szolgáltatunk arra, hogy 6-OHDA indukálta substantia nigra károsodás eltérő magatartási és szövettani eltéréseket okoz különböző nemű, és korú állatoknál. Azt találtuk, hogy mind a fiatal, mind az idős hím állatok sokkal érzékenyebbek a 6-OHDA lézióra, mint a nőstény állatok, mivel a nőstényeknek szignifikánsan kevesebb dopaminerg sejtje károsodott, és emiatt szignifikánsan jobban javultak magatartási tüneteik is az operációt követően. A szövettani vizsgálat során nem találtunk nagyobb sejtpusztulást az öreg állatoknál, mint a fiatal patkányoknál, pedig az idős állatok magatartásbeli eltérései sokkal súlyosabbnak bizonyultak.

3., Bizonyítottuk a PACAP neuroprotektív hatását 6-OHDA indukálta substantia nigra lézióban. Kimutattuk, hogy a neurotoxikus lézió előtt lokálisan beadott 0,01-1  $\mu$ g dózisú PACAP megvédi a dopaminerg sejtek nagy részét a substantia nigrában, és majdnem a sejtek 100%-át a ventralis tegmentalis areában. A PACAP kezelt állatok szignifikánsan jobban

teljesítettek a magatartási tesztekben, nem mutattak súlyos hipoaktivitási jeleket, és az aszimmetrikus jelek is szignifikánsan gyorsabban javultak, mint a kontroll csoport tünetei.

4., Bebizonyítottuk, hogy a quinolinsav léziót megelőző PACAP kezelés felére csökkentette a károsodott sejtek számát a striatumban, megakadályozta a hiperaktivitás kialakulását, és elősegítette a féloldali lézió következtében kialakuló aszimmetrikus jelek gyors javulását, ezen kívül a PACAP-pal kezelt állatok a normál állatokhoz hasonlóan teljesítettek a katepszia tesztben is.

5., Elsőként mutattuk ki a PACAP glutamát indukálta neurotoxikus károsodással szembeni védő hatását patkány retinában *in vivo* körülmények között.

#### XIV. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Reglődi Dórának és Dr. Lengvári Istvánnak, valamint programvezetőmnek Dr. Csernus Valér professzornak, valamint Dr. Lázár Gyula professzornak, akik diákkörös korom óta támogatják tudományos tevékenységemet.

Ezúton szeretném megköszönni munkacsoportunk tagjainak Dr. Lubics Andreának és Szelier Mártának a szövettani munkában nyújtott segítséget.

Továbbá köszönetet mondok az Élettani Intézetből Dr. Lénárd László professzornak és munkacsoportjának a magatartásvizsgálatokban nyújtott segítségért, az Általános Állattani és Neurobiológiai Tanszékről Dr. Gábrriel Róbert professzornak és munkacsoportjának a retinális degeneráció vizsgálatában nyújtott segítségért, valamint a Sebészeti Klinikáról Dr. Szántó Zalának a lézer doppleres vizsgálatban és a grafikus ábrák elkészítésében nyújtott segítségért. Köszönöm az Anatómiai Intézet valamennyi dolgozójának kedvességét, segítőkészségét és támogatását.

Végül de nem utolsósorban ezúton mondok köszönetet családom tagjainak, akik segítése, támogatása és megértése nélkül ez a munka nem születhetett volna meg.

#### XV. A DOLGOZATBAN FELHASZNÁLT PUBLIKÁCIÓK

1. **Tamás A**, Reglődi D, Szántó Z, Borsiczky B, Németh J, Lengvári I. Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neuroendocrinol Lett* 2002; 23: 249-254. IF.: 1,278.
2. **Tamás A**, Gábrriel R, Rácz B, Dénes V, Kiss P, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neurosci Lett* 2004; 372: 110-113. IF.: 2,019.
3. **Tamás A**, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I, Reglődi D. Age- and gender differences in behavioral and morphological outcome after 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Behav Brain Res* 2005; 158: 221-229. IF.: 2,992.
4. **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
5. **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of age, gender, and gonadectomy on neurochemistry and behavior in animal models of Parkinson's disease. *Endocrine* (közlésre elfogadva) IF.: 1,515.
6. Reglődi D, **Tamás A**, Somogyvári-Vígh A, Szántó Z, Kertes E, Lénárd L, Arimura A, Lengvári I. Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 2002; 23: 2227-2234. IF.: 2,635.

7. Reglődi D, **Tamás A**, Lengvári I. Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Bull* 2003; 59: 459-466. IF.: 2,609.
8. Reglődi D, Lubics A, **Tamás A**, Szalontay L, Lengvári I: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson`s disease. *Behav Brain Res* 2004;151: 303-312. IF.: 2,992.
9. Reglődi D, **Tamás A**, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I. Morphological and functional effects of PACAP in a 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul Pept* 2004; 123: 85-95. IF.: 2,531.
10. Reglődi D, **Tamás A**, Somogyvári-Vigh A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in animal models of neurodegenerative disorders - implications for Huntington and Parkinson`s diseases. *Lett Drug Des Disc* 2005; 2: 311-315.
11. Reglődi D, **Tamás A**, Lengvári I, Tóth G, Szalontay L, Lubics A. Comparative study on the effects of PACAP in young, aging, and castrated males in a rat model of Parkinson`s disease. *Ann NY Acad Sci (közlésre elfogadva)* IF.: 1,789.

Tézishez kapcsolódó idézhető absztraktok száma: 13; ezek impakt faktora:12,063

Tézishez kapcsolódó előadások száma: 15

Tézishez kapcsolódó poszterek száma: 25

## XV. EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

1. Németh J, Jakab B, Reglődi D, Lubics A, Józsa R, Hollósy T, **Tamás A**, Lengvári I, Görcs T, Szolcsányi J. Comparative distribution of VIP in the central nervous system of various species measured by a new radioimmunoassay. *Regul Pept* 2002; 109: 3-7. IF.: 3,205.
2. Reglődi D, Kiss P, **Tamás A**, Lengvári I. The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. *Behav Brain Res* 2003; 140: 131-139. IF.: 2,817.
3. Jakab B, Reglődi D, Józsa R, Hollósy T, **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Oroszi G, Szilvássy Z, Szolcsányi J, Németh J. Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Meth* 2004; 61: 189-198. IF.: 1,302.
4. Reglődi D, Fábíán Zs, **Tamás A**, Lubics A, Szeberényi J, Alexy T, Tóth K, Márton Zs, Borsiczky B, Róth E, Szalontay L, Lengvári I. Effects of PACAP on *in vitro* and *in vivo* neuronal cell death, platelet aggregation, and production of reactive oxygen radicals. *Regul Pept* 2004; 123: 51-59. IF.: 2,531.
5. Farkas O, **Tamás A**, Zsombok A, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishok JT, Dóczi T. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in a rat model of traumatic brain injury. *Regul Pept* 2004; 123: 69-75. IF.: 2,531.
6. Lubics A, Reglődi D, **Tamás A**, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic/ischemic injury. *Behav Brain Res* 2005; 157: 157-165. IF.: 2,992.
7. Józsa R, Hollósy T, **Tamás A**, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide plays a role in olfactory memory formation in chicken. *Peptides* 2005; 26: 2344-2350. IF.: 2,511.
8. Kiss P, **Tamás A**, Lubics A, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I, Reglődi D. Development of neurological reflexes and motor coordination in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox Res* 2005 (közlésre elfogadva)
9. Gasz B, Rác B, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, **Tamás A**, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating

- polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 2005 (közlésre elfogadva) IF.: 2,511.
10. **Tamás A**, Zsombok A, Farkas O, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishock JT, Dóczi T. Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. *J Neurotrauma* (közlésre elfogadva) IF.:2,866.
  11. Rác B, **Tamás A**, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Gallyas F Jr, Róth E, Reglődi D. Involvement of ERK and CREB signalling pathways in the protective effect of PACAP on monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
  12. Kiss P, **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Hauser D, Horváth Zs, Rác B, Gábel R, Babai N, Tóth G, Reglődi D. Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
  13. Babai N, Atlasz T, **Tamás A**, Reglődi D, Kiss P, Gábel R. Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retina degeneration. *Neurotox Res* 2005 (közlésre elfogadva)
  14. Babai N, Atlasz T, **Tamás A**, Reglődi D, Tóth G, Kiss P, Gábel R. Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
  15. Molnár L, Pollák E, Boros Á, Reglődi D, **Tamás A**, Lengvári I, Arimura A, Lubics A. Comparative anatomy of PACAP-immunoreactive structures in the ventral nerve cord ganglia of lumbricid *Oligochaetes*. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
  16. Németh J, **Tamás A**, Józsa R, Horváth JE, Jakab B, Lengvári I, Arimura A, Lubics A, Reglődi D. Changes in PACAP levels in the central nervous system after ovariectomy and castration. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
  17. Atlasz T, Kőszegi Zs, Babai N, **Tamás A**, Reglődi D, Kovács P, Hernádi I, Gábel R. Microiontophoretically applied PACAP blocks excitatory effects of kainic acid in vivo. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
  18. Józsa R, Németh J, **Tamás A**, Hollósy T, Lubics A, Jakab B, Oláh A, Lengvári I, Arimura A, Reglődi D. Short-term fasting differentially alters PACAP and VIP levels in the brains of rats and chickens. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
  19. Gasz B, Rác B, Róth E, Borsiczky B, **Tamás A**, Boronkai Á, Tóth G, Reglődi D. PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.

Tézishez nem kapcsolódó idézhető absztraktok száma: 22; ezek impakt faktora: 33,199

Tézishez nem kapcsolódó előadások száma: 3

Tézishez nem kapcsolódó poszterek száma: 37

Témához kapcsolódó publikációk impakt faktora: 22,149

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 59,326

Összes idegen idézettség: 33

Összes idézettség: 56