

# **Perinatális kezelések hatása újszülött patkányok korai idegrendszeri fejlődésére**

**PhD. értekezés tézisei**

**Dr. Kiss Péter**

**PTE ÁOK Anatómiai Intézet**

**Programvezető: Dr. Csernus Valér**

**egyetemi tanár**

**Témavezető: Dr. Reglódi Dóra**

**egyetemi docens**

**2008**



# 1. Bevezetés

A perinatális időszak alapvető fontosságú az idegrendszer fejlődésében. Az ebben az időszakban bekövetkező károsító hatások súlyos következményekkel járhatnak, melyek a felnőtt élet minőségét is befolyásolhatják. Keveset tudunk a postnatális időszakot érintő változásokról annak ellenére, hogy a korai elváltozások prognosztikai jelentőségűek. Az idegrendszer -főleg gyermekkorban- nagyfokú plaszticitással és regenerációs képességgel bír, amely teszi a károsodások következményeinek kivédését. Igen fontos mindazon környezeti faktorok vizsgálata is, melyek ezt az át- és újjáépítési folyamatot befolyásolhatják.

Patkányokban a születés utáni első két hét egy kritikus fejlődési periódusa az idegrendszernek. A harmadik postnatális hét végére érik el a patkányok a felnőttkorra jellemző fejlettségi szintet.

Kísérleteink során összesen négyféle különböző kezelési módszert alkalmaztunk újszülött patkányokon.

Nátrium-glutamáttal kiváltott toxikus és hypoxiás/ischaemiás idegrendszeri károsodást modelleztünk. Harmadikként az ingergazdag környezet hatásait vizsgáltuk. Negyedik modellként a hypophysis adenilát cikláz aktiváló polypeptid (PACAP) általános fejlődési és neuroprotektív hatásait vizsgáltuk meg.

A patkányok fejlődését funkcionális tesztekkel vizsgáltuk az egyes kezeléseket követően.

## 1.1. A nátrium glutamát (monosodium-glutamate, MSG)

A glutamát a leggyakoribb excitátoros neurotranszmitter az agyban, de ugyanakkor excitotoxin is. Mivel érett vér-agy gáton nem jut át jelentős mennyiségben, így felnőttben idegrendszeri károsodást jelenlegi ismereteink szerint nem okoz. Ugyanakkor az újszülött rágcsálóknak adott nagy dózisu subcutan glutamát kezelés neuronpusztulást okoz.

## 1.2. Hypoxiás/ischaemiás lézió

A hypoxiás/ischaemiás agykárosodás a modern szülészeti és csecsemőellátási lehetőségek ellenére újszülöttekben súlyos és maradandó sérüléseket okozhat. Az egyik leggyakrabban alkalmazott állatkísérletes modell az egyoldali arteria carotis communis lekötéssel létrehozott ischaemiás, majd ezt követő hypoxiás expozíció.

### **1.3. A hypophysis adenilát cikláz aktiváló polypeptid (PACAP)**

1989-ben izolálták birka hypothalamusból. Ismert 38 illetve 27 aminosav hosszúságú formája, melyek közül a PACAP38 dominál. A PACAP neurotrophicus és neuroprotektív hatásokkal rendelkezik. A sejtproliferációt és a génexpressziót szabályozza a velőcső fejlődése során.

### **1.4. Ingergazdag környezet**

Egy véletlen felfedezés, hogy a háziállatként felnevelkedett patkányok jobb teljesítményt nyújtanak egyes problémamegoldó tesztekben, mint a laborban nevelkedettek, rávilágított a környezeti hatások szerepének fontosságára az idegrendszer fejlődésében. A szabványos ketrecmérethez képest nagyobb életteret biztosítva változatos és folyamatos új ingerekkel láthatjuk el az állatokat. Ez az ingergazdagság a pozitív környezeti hatásokat erősíti, így segíti a fejlődést.

### **1.5. Célkitűzések**

1. Újszülött patkányok idegi fejlődésének vizsgálata egy standardizált neurológiai tesztrendszer segítségével:

- toxikus (nátrium-glutamát által kiváltott) idegi léziót és
- hypoxiás/ischaemiás léziót elszenvedett,
- neurotrófikus faktorról (PACAP-pal) kezelt és
- ingergazdag környezetben nevelt állatok esetén.

2. Annak vizsgálata, hogy a toxicus lézió káros következményeit képes-e csökkenteni a PACAP kezelés vagy az ingergazdag környezet.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. Kísérleti állatok

KEZELÉSI MÓD	ÁLLATSZÁM
Nátrium-glutamát kezelés	30 kezelt és 15 kontroll a neurológiai reflexek és a motoros koordináció tesztelésére 14 kezelt és 12 kontroll az open-field tesztekben 12 kezelt és 12 kontroll az újdonságkereső tesztben
Hypoxia/ischaemia	12 kezelt és 12 sham operált állat neurológiai reflex, motoros koordináció és open-field tesztekben
PACAP	18 PACAP38, 20 PACAP6-38 és 14 kontroll a neurológiai reflexek és az open-field tesztben 15 MSG és PACAP38 kezelt állat neurológiai reflex és motoros koordinációs tesztekben
Ingergazdag környezet	8 kontroll és 4 MSG kezelt "ingerszegény" hagyományos ketrecben tartott, 12 kontroll és 16 MSG kezelt ingergazdag nagy ketrecben tartott állat neurológiai reflex, motoros koordinációs és open-field tesztekben

Az állatok elhelyezése, gondozása és felhasználása ellenőrzött protokollok szerint az intézeti ajánlások figyelembevételével történt (No: BA02/2000-31/2001, Pécsi Tudományegyetem).

### 2.2. Kezelések

2.2.1. Nátrium-glutamát kezelés: A nátrium-glutamátot subcutan injekciós formában adtuk az 1, 3, 5, 7, 9. illetve 1, 5, 9. posztnatalis napokon. A magas dózis 4 mg/testtömeg gramm, az alacsonyabb 2 mg/testtömeg gramm volt.

2.2.2. Hypoxiás/ischaemiás lézió: Egy hetes állatokon egy középilonali nyaki bemetszésen át felkerestük a bal oldali a. carotis communis és permanensen lekötöttük. A műtét után az állatokat egy légmentesen záró kamrába helyeztük, melybe 8% oxigént

és 92% nitrogént tartalmazó gázkeveréket vezettünk be. Az állatokat 2 óra hosszat tartottuk ebben a hypoxiás kamrában.

2.2.3. PACAP: Az állatok 1µg PACAP 38, vagy 10 µg antagonistá (PACAP 6-38) kezelést kaptak a születés napjától kezdve két héten keresztül subcutan injekciós formában.

2.2.4. Ingergazdag környezet: Az állatok első csoportját a hagyományos ketrecekben tartottuk. Az állatok második csoportját egy nagyobb alapterületű és magasabb ketrecben tartottuk születésük után (88x50x44 cm). A nagy ketrecbe különféle formájú, színű és anyagú játékokat helyeztünk, majd azok felét naponta cseréltük.

### **2.3. A neurológiai jelek és reflexek vizsgálata**

A neurológiai fejlődést naponta vizsgáltuk. Feljegyeztük a szemnyitás, a metszőfogkinövés és a fül kiegyenesedésének napját. Az állatok súlyát is mértük. A neurológiai jeleket és reflexeket munkacsoportunk által összeállított tesztrendszer segítségével vizsgáltuk.

#### 2.3.1. Felegyenesedési (righting) reflexek:

- (a) A patkányokat a hátukra fordítottuk, és mértük, hogy mennyi idő múlva fordult meg.
- (b) 50 centiméter magasból fejjel lefelé egy szivacsra ejtve az állatokat, a négy végtagjukra érkezésük első napját jegyeztük fel.

2.3.2. Negatív geotaxis: Az állatokat egy megdöntött rácsra helyeztük fejjel lefelé. Feljegyeztük azt a napot, amikor a patkány megfordult, és felmászott a rács tetejére. Mértük a teljesítés idejét is.

2.3.3. Keresztezett extenzor reflex: Fájdalominger adva a bal hátsó végtagra vizsgáltuk azt a napot, amikor eltűnt a keresztezett extenzor reflex.

2.3.4. Fülrángás reflex: Vattapálcával óvatosan megérintettük a fül szélét, és az erre következő fülrándítás megjelenésének napját regisztráltuk.

2.3.5. Szemhéjreflex: Vattapálcával óvatosan megérintettük a szemrést, és a válaszként következő izomkontrakció megjelenésének napját regisztráltuk.

2.3.6. Végtag kontakt ráhelyezési (placing) reflex: A mellső és hátsó mancs dorzális felszínét a vizsgálóasztal széléhez érintettük, és feljegyeztük azt a napot amikor az állat felemelte az adott végtagot és ráhelyezte az asztalra.

2.3.7. Taktilis fogóreflex (grasping): Egy vékony rúddal érintettük a patkány mellső és hátsó végtagjának ventralis felszínét, és regisztráltuk az első napot, amikor az érintésre a rúd megragadásával válaszolt.

2.3.8. Elmozdulási reflex: Egy 13 centiméter átmérőjű fehér papírkorong közepére helyeztük az állatokat. Mértük azt az időt, ami alatt az állat mindkét mellső mancsa elhagyta a korong területét.

2.3.9. Akusztikus megrettenési reflex: Regisztráltuk az első napot, amikor az állat egy hirtelen hangingerre (taps) összerezzen.

## **2.4. Motoros koordináció vizsgálata**

Az állatokat 2-5 hetes kor között teszteltük heti két alkalommal.

2.4.1. Lépésszám és lépéshiba teszt: 20x40 cm területű, 2x2 cm-es méretű acélrácsra helyeztük az állatokat. Egy perces időtartamig figyeltük az állat mozgását, feljegyeztük a mellső végtaggal végrehajtott összes lépés számát (külön számolva mindkét oldalt), illetve számoltuk lépéshibáikat, amikor a rács hézagaiba ejtették a lábukat. A lépéshibát mellső és hátsó végtagra is feljegyeztük.

2.4.2. Rota-rod (mókuskerek) teszt: Egy 14 cm átmérőjű mókuskereket egy motorral hajtottunk meg 13 rpm sebességgel, és mértük azt az időt amennyit az állat a kerék tetején fenn tudott maradni.

2.4.3. Mozcás iniciációs teszt: A patkányokat egy vízszintes felszínre helyeztük, melyen egy 10 cm-es belső, és egy 45 cm átmérőjű külső kör volt megjelölve. Mértük a mozgás kezdés idejét (ami alatt elhagyta a belső kisebb kör területét) és a nagyobb kör elhagyásának idejét.

2.4.4. Függeszkezési teszt kötélén: Egy 40 cm magasságban kifüggesztett kötélre helyeztük az állatok mellső végtagjait. Mértük azt az időt ameddig kapaszkodva fenn tudtak maradni a kötélén.

2.4.5. Kapaszkodási teszt megdőndött deszkán: 45°-ban döntött deszkára helyeztük az állatokat, majd 5 fokként emeltük a dőlésszöveget. Azt a fokot jegyeztük fel, ahol az állatok még fenn tudtak maradni a deszkán.

2.4.6. Függőleges rács teszt: A patkányokat egy 50x22 cm-es méretű, 15 mm-es rácsközű rács közepére helyeztük vízszintes helyzetben, majd a rácsot függőleges helyzetbe

hoztuk. Ha az állat fennmaradt a rácson, akkor 0; ha 5 másodpercen belül, 1; ha azonnal leesett, 2 pontot adtunk teljesítményére.

2.4.7. Testkilengés teszt: A patkányokat farkuknál fogva a levegőbe emeltük. 30 másodpercen át figyeltük az állatok magatartását. Feljegyeztünk ezalatt minden, a függőlegeshez képest körülbelül 10 foknál nagyobb elmozdulást mindkét irányba.

2.4.8. Rúdon egyensúlyozás teszt: Az állatokat egy négyszögletes alakú rúdra helyeztük (1x1x40 cm, a talajtól 40 cm magasságban). Mértük azt az időt amíg fenn tudtak maradni a rúdon.

## **2.5. Open field teszt**

Az állatok motoros és felfedezési viselkedését vizsgáltuk ezzel a teszttel, 3-6 hetes korig. A patkányokat egy 42x42 centiméteres, 31 centiméter magas fallal körülvett dobozba helyeztük. A doboz alapját 8x8-as zónákra osztottuk. Az egyedeket a tér közepére helyeztük, majd 5 percig mozgásukat videokamerával rögzítettük. A video kiértékelése során feljegyeztük a mozgásuk során érintett mezőket, amelyekbe a két mellső végtagjukat behelyezték. Regisztráltuk az állatok minden fejemelését, ágaskodását is. Ezek mellett a következő paramétereket számoltuk: az érintett mezők száma, ezáltal az összesen megtett távolság és az 5 percre vetített mozgási sebesség számítható, a centrális (középső 16 mező) és perifériás (külső 2 sor) zónákban eltöltött idő, a falak mellett illetve a sarkokban eltöltött idő, és az egy zónában eltöltött leghosszabb idő.

## **2.6. Újdonságkereső viselkedés**

A tesztelés 3 hetes életkorban történt. A teszt 4 egymást követő 5 perces próbából épül fel az open-fieldben. Az 1. próba ismerkedési periódusként szolgált, nem helyeztünk tárgyakat a dobozba. A 2-3. próbában két egyforma, rózsaszín, fehér tetővel rendelkező, homokkal töltött üvegtárggyal bővítettük a kísérleti elrendezést. A 4. próba előtt az egyik, már az állat által ismert üveget eltávolítottuk, és helyére egy új, fehér oldalú, kék tetejű műanyag tartályt helyeztünk a dobozba. Minden próba során kamerával rögzítettük az állatok viselkedését. A következő paramétereket vizsgáltuk: mozgással töltött idő, kockaváltások száma, a centrumban és a periférián töltött idő. Központi zónának a tárggyal közvetlenül érintkező, és az ezekkel szomszédos kockákat tekintettük. A 4. próbában a régi és az új tárgy közelében eltöltött időt külön-külön értékeltük. A



habituációs indexet az első 90 másodpercben megtett kockaváltások és az összes kockaváltások számának hányadosaként számítottuk ki.

## **2.7. Szövettan**

2.7.1. A glutamát kezelés szövettani verifikációja: A neonatális glutamát kezelés súlyos idegsejtkárosodást hoz létre az agy különböző területein, ezek közül a nucleus arcuatus és a retina területén bekövetkezett neuronpusztulás vizsgálható a legjobban. Hat hetes korban perfundáltuk az állatokat, agyukat eltávolítottuk, majd 50 microméter vastagságú frontális szeleteket készítettünk a hypothalamusból. A metszetek egy részét toluidinkékkel festettük, másik részét tirozin-hidroxiláz (TH) immunhisztokémiára dolgoztuk fel.

2.7.2. Hypoxiás leasio szövettani vizsgálata: A hat hetes állatokat perfundáltuk, agyukat eltávolítottuk, majd 50 microméter vastagságú frontális szeleteket készítettünk vibratómmal. A méréshez összesen 20 metszetet készítettünk egy állatból, a Bregmához képest 3.8 mm-el előre elhelyezkedő síktól 5.2 mm-el a Bregma mögött levő síkig terjedő agyterületből 0.5 mm-es távolságokkal. A metszeteket krezil-ibolyával festettük. Mértük a teljes agyterület nagyságát, és külön a cortex, hippocampus, striatum és az oldalkamra méretét mind kontra-, mind ipsilaterálisan.

## **2.8. Statisztikai elemzés**

A fizikális jelek megjelenését ANOVA teszttel, majd az egyes csoportokat Newman-Keul post-hoc analízissel hasonlítottuk össze. A napi értékek összehasonlítására Student féle t-tesztet is használtunk. A negatív geotaxis, felegyenesedési reflex és az elmozdulási reflexidők napi értékeinek javulását ismételt varianciaanalízissel értékeltük, míg az egyes csoportok reflexidejét ugyancsak Newman-Keul teszttel vizsgáltuk a varianciaanalízist követően. Az állatok súlya és a neurológiai jelek megjelenése közötti korrelációt a Spearman-féle korrelációanalízissel végeztük. Az open-field teszt nonparametrikus adatait Kruskal-Wallis teszttel értékeltük, melyet Dunn post-hoc analízis követett. Az open-field parametrikus adatait, valamint az állatok súlyát pedig Newman-Keul teszttel vizsgáltuk a varianciaanalízist követően. A hypoxiás állatok open-field tesztjének eredményeit Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze.

## 3. Eredmények

### 3.1. Glutamát kezelés

A többféle kipróbált kezelési protokoll közül az 1, 5, 9. napon adott 4 mg/testtömeg gramm dózisú kezelést használtuk. A kezelés során 2 kontroll és 12 kezelt patkány pusztult el. A hím és a nőstény egyedek között semmilyen jellegű eltérést nem találtunk. A szövettani analízis is kimutatta a kezelés sikerességét, jelentős neuronpusztulás igazolódott a nucleus arcuatus és a retina területén glutamát hatására.

3.1.1. Fizikális paraméterek: Nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a szomatikus fejlődésben vizsgált jelek megjelenésében, úgymint a szemnyitás, metszőfog kinövés, fül kiegyenesedés. Ugyanakkor a glutamát kezelt állatok testsúly növekedése a 6. naptól jelentősen alacsonyabb volt a kontrollokhöz képest, és a növekedési zavar az állatok testhosszában is megnyilvánult.

3.1.2. Neurológiai reflexek: A megfigyelt reflexek közül a mellső láb ráhelyezési- és fogóreflexe, valamint a felegyenesedési reflex (magasból leejtés) szignifikánsan később jelent meg a glutamát kezelt állatoknál. A felegyenesedési reflex (megfordulás), negatív geotaxis és elmozdulási reflex teszteknel a végrehajtási idő is megnyúlt.

3.1.3. Motoros koordináció: A lépésszámolásos tesztekben a kontroll és glutamát kezelt állatok ugyanannyi lépést tettek meg egy perc alatt. A lépéshibák száma magasabb volt a kezelt csoportban, a mellső, mind pedig a hátsó láb esetén. A glutamát kezelt egyedek rosszabb teljesítményt nyújtottak a mókuskeréken is.

3.1.4. Open-field magatartás: A glutamát-kezelt állatok az első 3 postnatalis héten aktívabbak voltak, különösen 2 hetes korban, amikor a kontroll egyedek még nagyon keveset mozogtak. A mozgási sebesség nem különbözött a két állatcsoportban. Három hetes életkorban a glutamát kezelt csoportban a mozgási sebesség jelentősen nagyobb volt a kontroll patkányok sebességénél, és ez nagyobb bejárt területet eredményezett. Négy hetesen a legtöbb különbség eltűnt. Nyolc hetes életkort elérve a glutamát-kezelt egyedek már kevesebbet mozogtak a kontrollokhöz képest. Három hetes életkorban a glutamát-kezelt állatok kevesebb fejmelgetés mellett több ágaskodási magatartást mutattak. A fal mellett töltött idő aránya (thigmotaxis) 2 hetes korban magasabb volt a glutamát-kezelt patkányokban, de ez annak tudható be, hogy a kontroll egyedek nagy

része olyan keveset mozgott, hogy el sem mászott a falig középről indulva. Az ezt követő heteken mindig a glutamát-kezelt állatok voltak kevesebbet a falak mentén.

3.1.5. Újdonságkereső magatartás (novelty seeking): A 2. és 3. próba során, mikor ugyanaz a tárgy volt a térbe helyezve, a glutamát-kezelt csoport szignifikánsan aktívabbnak bizonyult a kontrollcsoportnál. A kontroll patkányok aktivitása jelentősen emelkedett a 4. próba során, mikor behelyeztük az új tárgyat. A glutamát-kezelt egyedeknél pedig pont ellentétesen, csökkent az aktivitás a 4. próba során. A kontroll csoport egyedeinek habituációs indexe nem változott a 2. és 3. próba során, az állatok az egyes próbák első 90 másodpercében mozogtak a legtöbbet. A habituáció szignifikánsan lecsökkent a 4. próbában, az állatok nagyjából ugyanolyan aktivitással mozogtak a megfigyelés teljes időtartamában, mint az első 90 másodpercben. A glutamát-kezelt egyedek ellentétes mintázatot mutattak, lecsökkent a habituáció a 3., majd megemelkedett a 4. próba során. A mosakodó magatartás is ellentétes volt a két csoport között. A középén (vagyis az új tárgy közelében), és a periférián eltöltött idő arányának összehasonlításakor előtűnt, hogy a 2. próba során minden állat több időt töltött a periférián, mint középén. Ez az arány a kontroll egyedekben nem változott meg a 3. próba során sem, de a középén töltött idő szignifikánsan megemelkedett a 4. próba folyamán. A 4. próbában a középén és a periférián töltött idő hozzávetőlegesen megegyezett, az állatok tehát szignifikánsan több időt töltöttek el a behelyezett új tárgy közelében. A glutamát-kezelt patkányoknál, a középén és a periférián töltött idő nagysága már a 3. próba során körülbelül megegyezett. Ezek az állatok a 4. próbában sokkal kevesebb időt töltöttek az új tárgy mellett, mint a kontroll egyedek.

## **3.2. Hypoxia/ischaemia modell**

A beavatkozást követő 24 órában 2, majd a harmadik postoperatív héten 1 hypoxiás/ischaemiás állat pusztult el. A szomatikus fejlődés zavarát jelzi, hogy a hypoxiás állatok testsúlya szignifikánsan alacsonyabb a kontrollokéhoz képest. Az állatok születési súlya, és a műtét előtt mért súlya megegyezett.

3.2.1. Neurológiai reflexek: Csak a szemnyitás napja késett a vizsgált fizikális paraméterek közül a hypoxiás állatoknál a kontrollokhoz képest. A negatív geotaxis, a fülrángás, a mellső és hátsó végtagi fogóreflex, valamint az elmozdulási reflex jelent meg szignifikánsan később. A végrehajtás ideje is hosszabb volt a kontrollok reflexidejéhez

képezt a felegyenesedési reflex (megfordulás), negatív geotaxis, elmozdulási reflexekben. Ugyanakkor a megfigyelési idő végére a hypoxiás csoport egyedei beérték teljesítményükben a kontrollokat.

3.2.2. Motoros koordináció: A kötélén függeszkedés tesztben a hypoxiás állatok szignifikánsan kevesebb ideig maradtak a kötélén, ha csak a kontralateralis (jobb) mellső végtagjukat használhatták. Két mellső végtag használata esetén csak 4 hetesen volt eltérés. A mókuserék teszt nem mutatott különbséget. A lépésszámolás-lépéshiba tesztben a hypoxiás csoport egyedei szignifikánsan kevesebbet léptek 2 és 4 hetes korban. A lépéshibák száma hasonló volt a kontroll és a hypoxiás csoportban az ipszilaterális végtagoknál, azonban a hypoxiás egyedek jelentősen többet hibáztak a kontralaterális mellső végtagjukkal. A kapaszkodási tesztben csak 2 hetes korban volt szignifikáns különbség. A rúdon egyensúlyozásban is csak 2 hetesen volt különbség a kontroll és a hypoxiás patkányok között. A későbbi életkorban az összes állat fennmaradt a teljes megfigyelési idő folyamán.

3.2.3. Open-field aktivitás: Nem találtunk durva eltéréseket az állatok általános aktivitása és mozgásmintázata tekintetében a két csoport között. Az állatok nagyon keveset mozogtak 2 hetes korban. A fejemelgetések és ágaskodások száma 3 hetes korra szignifikánsan megemelkedett, de nem volt jelentős eltérés a kontroll és hypoxiás állatok között. Hat hetes korban csak az ágaskodások száma emelkedett tovább, és a hypoxiás patkányok szignifikánsan többet ágaskodtak, mint a kontrollok. Hasonlóképpen a megtett távolság is nagyon alacsony volt 2 hetes életkorban, ekkor a hypoxiás állatok többet mozogtak. Három hetes életkorban nem mutatkozott különbség a csoportok között. A hypoxiás egyedek 6 hetesen szignifikánsan többet mozogtak, mint azt 3 hetesen tették, és ez szignifikáns a 6 hetes kontrollcsoporthoz képest is. Ugyanez figyelhető meg a mozgási sebességnél is, a hypoxiás egyedek gyorsabban mozognak 2 és 6 hetes korban, mint a kontrollok, míg 3 hetes korban nem volt különbség. A fal mellett és sarokban töltött idő szignifikánsan magasabb volt 2 hetes korban a hypoxiás csoportban. Későbbi életkorokban a kontroll állatok töltöttek több időt a falak mellett és a sarkokban. A hypoxiás állatokban nem változott meg a fal mellett töltött idő mennyisége ahogy idősebbek lettek, míg a sarkokban egyre kevesebb időt töltöttek.

3.2.4. Szöveti feldolgozás: A legtöbb esetben a hypoxia súlyos féltekei atrophíát okozott. Az ipsilaterális félteke térfogata az ép kontralateralishoz képest átlagosan 58% volt. A legsúlyosabb károsodás a hippocampusban volt megfigyelhető, aminek mérete csak 11%-a volt a károsodott féltekében az éphez képest. Körülberül 50%-os redukció volt a cortex és a striatum térfogatában, ami az oldalkamra következményes megnagyobbodásával járt.

### **3.3. PACAP és PACAP antagonist (PACAP 6-38) kezelés**

3.3.1. Fizikális jelek és neurológiai reflexek vizsgálata: A PACAP kezelés gyorsította a faciális jelek érést átlagosan 1-1.5 nappal, míg a PACAP 6-38 kezelés késleltette a szemnyitást és a fül kiegyenesedés megjelenését. A reflexek közül a keresztezett extenzor reflex eltűnése, a felegyenesedési reflex, a hátsó láb ráhelyezési, és mellső láb fogó reflexek megjelenése nem mutatott szignifikáns eltérést a PACAP kezelt és a kontroll csoport között. Minden egyéb jel átlagosan 1.5-2.5 nappal előbb jelentkezett a PACAP kezelés hatására. A PACAP 6-38 csak a hátsó láb fogó reflex megjelenését késleltette. A PACAP kezelés hatására az állatok rövidebb idő alatt teljesítették a kijelölt feladatokat. A negatív geotaxisban a PACAP-kezelt állatok a megfigyelési időtartam alatt végig jobban teljesítettek, mint a kontrollcsoport, ugyanakkor a kontroll és a PACAP 6-38-kezelt egyedek teljesítménye közt nem volt szignifikáns eltérés. Az elmozdulási reflexben a PACAP kezelés 12-20 napos korban mutatott jelentős hatást. Az PACAP 6-38 és a kontroll csoport között csak a 18. napon észleltünk szignifikáns különbséget. A felegyenesedési reflexben a PACAP antagonist kezelés hatására az állatok szignifikánsan hosszabb idő alatt fordultak meg, mint a kontrollcsoport egyedei 2-6 napos korban, míg a PACAP-nak nem volt kimutatható hatása a teljesítési időre.

3.3.2. Az open-field aktivitás: Két hetes korban a patkányok néhány másodpercig a középpontban mozogtak, majd a fal mellé mentek, ahol idejük legnagyobb részét egy mezőben töltötték. Minden állat szignifikánsan több mezőt érintett három hetes korban az egy héttel azelőttihez képest. Ekkor a PACAP kezelt állatok közel kétszer annyi zónába léptek be, mint a kontroll, vagy a PACAP 6-38 kezelt csoportok. Két hetes korban a falak mentén eltöltött idő hosszában nem volt különbség a csoportok között, minden egyed az összidő körülbelül 90%-át töltötte a falak mentén. Mindazonáltal ez a százalék jelentősen lecsökkent három hetes PACAP-kezelt állatok esetén, idejük kétharmadát töltötték a falak

mellett. A kontroll illetve PACAP 6-38 kezelt állatok esetén ez a változás elmaradt. Három hetes korban az PACAP 6-38 és a kontroll patkányok idejük több mint 50%-át a sarokban töltötték, a PACAP kezelt egyedek csupán 25%-át. Három hetes korban a PACAP-kezelt csoport egyedei idejük 14%-át töltötték el egy mezőben, míg a kontroll és a PACAP 6-38-kezelt csoportok 35%-át.

### **3.4. Glutamát és PACAP kezelés kombinációja**

Ebben a kísérletben a patkányok a posztnatális 1, 5 és 9. napon 4 mg/testtömeg gramm nátrium-glutamátot, és 1-14 napos korban napi 1 µg PACAP 38-at kaptak subcutan injekcióban.

3.4.1. A fizikális jelek és neurológiai reflexek megjelenésének alakulása: A glutamát kezelés a mellső végtagi ráhelyezési és fogó reflexek, valamint a felegyenesedési reflex (magasból leejtés) megjelenését késleltette, míg a PACAP kezelést is kapott állatokban ezek a reflexek korábban jelentek meg, hasonló időpontban, mint a normál állatoknál. A glutamát-kezelt csoport egyedeinek súlya a normál egyedekének körülbelül kétharmada volt. A PACAP-pal is kezelt állatok súlya hozzávetőleg egy grammal volt több a csak glutamáttal kezeltékhez képest. A glutamát-kezelt patkányok rosszabb teljesítményt nyújtottak a felegyenesedési reflexben (megfordulás) és az elmozdulási reflexben, és 2 hetes korban ezt a negatív hatást a PACAP kezelés kivédte.

3.4.2. Motoros koordinációs tesztek: A lépéshiba tesztben a PACAP-pal is kezelt állatok 2 hetes korban szignifikánsan kevesebbet hibáztak, mind a mellső, mind a hátsó végtaggal, mint a glutamát-kezelt csoport.

3.4.3. Szövettan: A nucleus arcuatus szövettani vizsgálata azt mutatta, hogy a glutamát kezelés hatására jelentősen lecsökken a tirozin-hidroxiláz pozitív sejtek száma. A PACAP-al is kezelt csoportban a sejtszám magasabb, de nem szignifikáns az eltérés.

### **3.5. Ingergazdag környezet**

3.5.1. Fizikális jelek és neurológiai reflexek: A 10. naptól kezdve az ingergazdag környezetben tartott állatok testsúlya szignifikánsan alacsonyabb. Egyéb fizikális paraméterben nem volt eltérés. A neurológiai reflexek megjelenését gyorsította az

ingergazdag környezet, és a reflexekben nyújtott teljesítmény is javuló tendenciát mutatott.

3.5.2. Motoros koordinációs tesztek: Az ingergazdag egyedek három hetes korban szignifikánsan többet mozognak a rácson, és arányaiban kevesebbet hibáznak. Jobban teljesítettek a mozgás iniciációs tesztben 3 hetes korban. A rota-rod (mókuserék) tesztben 4 és 5 hetesen az ingergazdag csoport egyedei tovább tudtak a keréken maradni, mint a hagyományos ketrecben tartott csoport állatai.

3.5.3. Open-field teszt: A mozgásmennyiségben nem volt jelentős eltérés a két állatcsoport között. 3 hetes életkorban az ingergazdag állatok többet mozogtak, de ez nem volt szignifikáns. A mozgási sebességben nem volt eltérés, a mozgásmennyiség különbözősége abból adódott, hogy az ingergazdag állatok szignifikánsan többet mozogtak a megfigyelési idő első 90 másodpercében. Három hetes korban az ingergazdag egyedek szignifikánsan többet ágaskodtak, mint a hagyományos ketrecben nevelt állatok, a többi megfigyelt időpontban nem volt eltérés. Négy és öt hetes életkorban pedig a hagyományos ketrecben tartott csoport egyedei szignifikánsan többet emelgették fejüket, mint az ingergazdag csoport.

### **3.6. Ingergazdag környezet hatása nátrium-glutamát indukálta toxikus lézióban**

Mindkét csoportban az egyedek egy részének alacsony dózisú (2mg/testtömeggramm) nátrium-glutamátot adtunk subcutan injekciós formában a posztnatális 1, 5. és 9. napon.

3.6.1. Fizikális jegyek és neurológiai reflexek: A glutamát kezelés nagymértékben hátráltatja a szomatikus fejlődést, a kezelt állatok alacsonyabb súlyúak, mint a kontroll (fiziológiás sóval kezelt) egyedek. Ez a különbség eltűnt az ingergazdag környezetben, a glutamát- kezelt és kontroll egyedek súlya megegyezik a megfigyelési idő során. Az egyéb fizikális jegyek megjelenését nem befolyásolta a glutamát kezelés. A neurológiai reflexek megjelenése és az azokban nyújtott teljesítmény az ingergazdag környezetben tartott glutamát-kezelt állatoknál jobb volt, mint a hagyományos ketrecben tartott glutamát-kezelt állatoké, de ez a javulás nem szignifikáns.

3.6.2. Motoros koordinációs tesztek: A lépéshiba tesztben a hagyományos ketrecben tartott glutamát-kezelt egyedek rosszabb teljesítményt nyújtanak a kontrolloknál. Az ingergazdag környezet teljes mértékben kivédte ezt a károsító hatást, ugyanis az

ingergazdag környezetben tartott glutamát-kezelt egyedek szignifikánsan kevesebbet hibáztak a teszt során, teljesítményük az ingergazdag környezetben tartott (fiziológiás sóoldattal kezelt) kontroll egyedekéhez hasonló volt.

3.6.3. Open-field teszt: A nátrium-glutamát kezelés az open-field tesztben hiperaktivitást okoz fiatal korban, ami a szignifikánsan nagyobb megtett távolságban és a nagyobb mozgási sebességben nyilvánult meg. Ez a különbség eltűnt ingergazdag környezetben tartott állatok esetén.

## **4. Megbeszélés**

### **4.1. Nátrium-glutamát kezelés**

A szomatikus jelek vizsgálata során megfigyeltük a növekedés visszamaradását mind a testsúly, mind a testhossz tekintetében. A glutamát kezelés magasabb perinatális mortalitáshoz is vezetett. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a neurológiai tesztekben számos esetben késleltetett fejlődési ütemet mutattak a kezelt egyedek a vizsgálatok egy részében, míg más tesztekben nyújtott teljesítményt nem befolyásolt a kezelés. Noha csak kevés korábbi irodalmi adat van a glutamát kezelés hatásairól ezekre a reflexteljesítményekre, van adat arra vonatkozóan, hogy egyes aktivitási paramétereket nem befolyásol a glutamát. A motoros koordinációs tesztekben a különböző szerzők egymásnak ellentmondó adatokat közöltek. Legkifejezettebb eltéréseket munkacsoportunk a mókuserék és a lépéshiba tesztben talált. Az irodalomban már leírták, hogy glutamát kezelés után a patkányok a mókuserék tesztben rosszabbul teljesítenek, mint a kezeletlen patkányok. A lépéshiba teszt a mozgáskoordináció fejlődésének és az abban bekövetkező zavaroknak a vizsgálatára alkalmas. A glutamát kezelt egyedek szignifikánsan rosszabb teljesítményt nyújtottak ebben a tesztben.

Az open-field tesztben a glutamát kezelés hatásaként átmeneti hiperaktivitást találtunk 2-3 hetesen, amit egy enyhe fokú hypoaktivitás váltott fel 8 hetes életkorban. A glutamát kezelés emellett csökkentette a thigmotaxis mértékét 3 hetes kortól.

A glutamát-kezelt állatoknál jelentősen megváltozott az újdonságkereső viselkedés is. Az explorációs magatartás vizsgálatakor a glutamát kezelésben részesült állatok minden tesztelt paraméter esetén eltérő magatartási mintát mutattak. A kontroll állatok egyértelműen érdeklődtek az ismeretlen tárgy iránt az utolsó kísérleti elrendezésben: több



időt töltöttek mozgással, a habituációjuk lecsökkent, nagyobb területet jártak be, kevesebbet mosakodtak és hosszabb időt töltöttek az új tárgy közelében. A glutamát kezelt állatok ezzel szemben kevésbé voltak aktívak, több időt töltöttek tisztálkodással és szignifikánsan kevesebbet tartózkodtak az ismeretlen tárgy közelében a 4. próbában. A kontroll egyedek tehát élénken érdeklődnek a korábban ismeretlen tárgy iránt, míg a glutamát kezelt egyedek elkerülik azt, inkább a számukra már ismert tárgy közelében tartózkodnak.

A glutamát kezelés hatásosságát a nucleus arcuatus szövettani vizsgálatával igazoltuk, amely hasonlóan mások eredményeihez nátrium-glutamát kezelést követően neuronális degenerációt és a TH-immunpozitivitás csökkenést mutatott. Ezenkívül a neonatalis glutamát kezelés a hippocampus CA1 régiójában is neuronvesztést és morfológiai eltéréseket okoz. A lokomotoros aktivitásról ismert, hogy emelkedik amikor az állatokat számukra addig ismeretlen környezetbe helyezük. Ez a magatartásváltozás szorosan kapcsolódik a hippocampushoz. Így az általunk megfigyelt változások az újdonságkereső magatartásban glutamát kezelt patkányokban is valószínűleg a hippocampus szerkezeti és neurokémiai változásaival magyarázhatók. Hasonlóképpen, szoros kapcsolat van a mesolimbikus dopaminerg rendszer, az újdonságkereső magatartás és a nucleus arcuatus között. Feltételezhető tehát, hogy a nucleus arcuatus pusztulása és a dopaminerg rendszer egyéb elváltozásai okozhatják a tapasztalt viselkedésbeli eltéréseket.

Irodalmi adatok szerint a nátrium-glutamát számos hatása nemtől függ, míg más hatások attól függetlenek, és nem mutatnak sexuális dimorfizmust. Jelen kísérleteinkben semmilyen nemi eltérést nem tapasztaltunk egyik vizsgált paraméterben sem hím és nőstény egyedek közt, mely összhangban áll a reflexfejlődés és a motoros aktivitás fejlődését leíró korábbi irodalmi adatokkal

## **4.2. Hypoxiás modell**

A hypoxiás félteke hozzávetőleg 50%-os atrófiája az idegrendszeri fejlődés retardációját eredményezi, ami a neurológiai reflexek késleltetett megjelenésében és rosszabb reflexteljesítési időkből, valamint a motoros koordinációs tesztekben nyújtott rosszabb teljesítményben nyilvánul meg. Azonban a maradandó súlyos cerebrális károsodás ellenére a legtöbb állat 6 hetes korra utolérte a kontroll egyedek szintjét a legtöbb tesztben, kivéve a lépéshiba tesztet. Az open-fieldben a hypoxiás állatok aktívabbak

voltak 2 és 6 hetes korban. Az alkalmazott hypoxia/ischaemia modell kiterjedt súlyos cerebrális atrofiát okoz, azonban az emberrel ellentétben a patkányok még ilyen súlyos mértékű neonatalis hypoxia/ischaemia hatására sem mutatnak durva eltéréseket. Ez magyarázható az embernél nagyobb mértékű idegrendszeri plaszticitással. Ugyanakkor számos funkcionális tesztben kimutatható rövid és hosszú távú deficit a behatást követően. Ezen eltérések közül több esetben tapasztalható javulás idővel. Az irodalmi adatokkal megegyezően azt találtuk, hogy a hypoxián átesett állatok szignifikánsan kisebb tömegűek, mint a kontroll egyedek. Eredményeink azt mutatják, hogy a hypoxiás állatok rosszabbul teljesítenek a negatív geotaxisban, a felegyenesedési és elmozdulási reflexekben a mért reflexidők alapján. A felegyenesedési reflex lassabb volt a megfigyelési idő egésze alatt, az elmozdulási reflex a 10-12. napokon, a geotaxis a 14-16. napon volt lassabb hypoxiás patkányokban, mint a kontroll állatoknál. Később azonban a különbségek eltűnnek, ami arra utal, hogy a hypoxiás állatokban egy gyógyulási folyamat zajlott le. A motoros koordináció vizsgálatára a mi megfigyeléseink szerint a legmegbízhatóbb vizsgálóeljárás a kontralaterális mellső végtag lépéshibáinak számolása. A hypoxiás állatok a megfigyelési idő során végig többet hibáztak, mint a kontroll egyedek. Az, hogy a mellső végtag jobban károsodott azzal magyarázható, hogy a motoros kéregben a mellső végtag reprezentációs területét sokkal nagyobb mértékben érintette a sérülés, mint a hátsó végtagét. Ez a megfigyelés egybevághat azzal az irodalmi adattal, miszerint felnőtt patkányban féloldali arteria cerebri media okkluziót követően a hátsó végtag mozgásai kevésbé károsodtak. Ugyanakkor a tapasztalt eltérések 5 hetes életkorra eltűntek, és a legtöbb hypoxiás állat erre az életkorra ugyanolyan teljesítményt mutatott, mint a kontroll egyedek. Noha a felnőtt patkányban is kimutatható gyógyulás a szenzoros és motoros tünetekben féloldali cerebrális ischaemiát követően, az újszülött patkányok szignifikánsan gyorsabban és nagyobb mértékben regenerálódnak. Ez az újszülött agy nagyobb mértékű plaszticitásának köszönhető. Az open-field magatartással kapcsolatban mind hyper-, mind hypoaktivitásról beszámoltak a különböző szerzők hypoxiás/ischaemiás léziót követően. A mi eredményeink azt mutatják, hogy a hypoxiás állatok 2 hetes életkorban hyperaktívak, azonban ebben az életkorban a kontroll egyedek még alig mutatnak mozgási aktivitást. A kontroll egyedek annyira keveset mozogtak, hogy sok el sem hagyták az open-field közepén levő kiindulási helyet, míg a hypoxiás

állatok a falak mellé másztak. Ez magyarázza azt, hogy mért töltöttek a hypoxiás állatok több időt 2 hetesen a falak mellett. A patkányok természetes védekező reflexe az open-fieldben, hogy a számukra biztonságot nyújtó fal mellé mozogtak. Mivel ez a thigmotaxisban megfigyelhető eltérés a későbbi életkorokban eltűnt, a két hetesen észlelt eltérés feltehetőleg nem a fokozott anxietással magyarázható. Három hetes életkorban a kontroll egyedek aktívabbak, mint két hetesen, ekkor nem találtunk eltéréseket a kontroll és hypoxiás egyedek között. A hypoxiás állatok aktivitása tovább fokozódott 6 hetes életkorban, melyet az ágaskodások megnövekedett száma, a teljes megtett távolság, a mozgással töltött idő mértéke és a mozgási sebesség emelkedése jelez. Érdekesnek találtuk, hogy az open-fieldben tapasztalt nagyobb lépésszám ellenére a hypoxiás állatok kevesebbet léptek a lépésszám és lépéshiba teszt során a rácson. Ez arra utal, hogy mikor a mozgáshoz nagyobb mértékű koordinációs képesség kell, mint amilyen a rácson való járás, a hypoxiás állatok nem képesek azt olyan mértékben teljesíteni, kevésbé aktívnak bizonyulnak, mint a kontrollok. Az éretlen idegrendszer jelentős mértékű kompenzatorikus reorganizációra képes sérülés után. Egyes szerzők a kontralaterális félteke kompenzatorikus megnagyobbodását írták le. Szövetani eredményeink azt igazolják, hogy a hippocampus súlyosan károsodik, mérete mindössze 10%-a az ép oldalnak. Egyéb agyterületek, és a teljes agyfélteke mérete körülbelül 50%-os csökkenést mutat. Az ilyen méretű károsodás megfelel az irodalomban leírt eltéréseknek.

### **4.3. PACAP hatása a fejlődésre**

Jelen munkánkban igazoltuk, hogy a születés napjától kezdve PACAP-kezelt újszülött patkányok szignifikánsan gyorsabb fejlődést mutatnak a kontroll csoporthoz képest egyes fizikális jellemzők megjelenésének napjában, számos neurológiai jelben és a felfedezési magatartásban. Kísérletünkben azt találtuk, hogy a PACAP-kezelt állatok faciális fejlődése felgyorsult, míg a PACAP 6-38-kezelt egyedek fül kiegyenesedése és szemnyitása késett a kontroll csoporthoz képest. A legtöbb neurológiai jel és reflex megjelenését serkentette a PACAP kezelés, míg az PACAP antagonistá kezelés csak a hátsó láb ráhelyezési reflexben mutatott késleltető hatást. A mellső láb ráhelyezési- és a hátsó láb fogóreflexet az állatok PACAP kezelés hatására napokkal korábban mutatták, mint a kontroll egyedek, míg a PACAP antagonistá kezelés késleltette a hátsó láb ráhelyezési reflex megjelenését. A PACAP kezelt állatok az elmozdulási reflexben és

negatív geotaxisban gyorsabban teljesítették a feladatot, mint a kontrollcsoport, míg a PACAP antagonisták ezekre nem volt hatással. A PACAP antagonisták kezelését kapott patkányok lassabbak voltak a felegyenesedési reflexben 2-6 napos korban a kontrollcsoportnál. Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a PACAP gyorsítja az összetett motoros képességek fejlődését. A PACAP kezelés szignifikáns javulást okozott a három hetes korban mért open-field magatartásban is. A PACAP kezelt csoport egyedei többet mozogtak, kevesebb időt töltöttek el egyes mezőkben, többször tértek vissza és több időt töltöttek a középpontban. Ezzel ellentétes eredményt mutattak a kontroll és PACAP antagonisták kezelt állatok, miszerint több időt töltöttek el a falak mentén. A környezet határainak, a falak közelében való tartózkodás (thigmotaxis) a patkányok természetes védekező magatartásainak egyike, s mint ilyen, jelezheti számunkra az állat félelmét. Jelen tanulmányunkban a PACAP-kezelt állatok ugyanígy többször mutattak ágaskodó magatartást, ami a jobban fejlett vizsgálódó aktivitás jele. Az open-field tesztben nyújtott jobb teljesítmény egyértelműen utal a PACAP kezelt állatok fejlettebb mozgási és felfedezési magatartására, de ezt részben okozhatja az állatok csökkent félelme is.

#### **4.4. PACAP kezelés hatása glutamát-indukált lézióban**

A normál állatok fejlődését meggyorsító dózisú PACAP kezelés képes volt enyhíteni a glutamát-indukálta késleltetett fejlődést a felegyenesedési, mellső láb ráhelyezési és fogó reflexekben, és szignifikánsan javította a reflexteljesítményt az elmozdulási és a felegyenesedési reflexekben, valamint a motoros koordinációban két hetes életkorban. Ugyanakkor nem volt képes kivédeni a glutamát hatását a testsúly alakulására, és a nucleus arcuatusban bekövetkezett neuronpusztulást. Mivel a PACAP bizonyítottan képes átjutni a vér-agy gáton, legvalószínűbb az, hogy az alkalmazott szisztémás dózis nagysága nem volt elegendő a neuroprotekciónak az érintett területeken. Ez magyarázhatja azt az irodalmi megfigyelést, hogy a PACAP *in vivo* védő hatását csak lokális kezelések után tudja kifejteni. Az általunk megfigyelt enyhe védő hatás azonban mindenképpen reménykeltő, és további vizsgálatokra ösztönöz az optimális kezelési mód és dózis megtalálásához.

## **4.5. Ingergazdag környezet**

Az idegrendszer fejlődése során alapvető jelentőségűek környezeti ingerek. Az ingergazdag környezet számos változást idéz elő az idegrendszerben, neurokémiai és morfológiai szinten egyaránt. A cortex vastagsága nő, növekszik a dendritkék denzitása a neuronokon, egyes neurotrófikus faktorok és receptoraik expressziója emelkedik és számos agyterületen fokozódik a neurogenesis.

Azonban nem csak morfológiai, hanem funkcionális eltérések is tapasztalhatók. Ingergazdag környezet hatására egyes tanulási tesztekben, a szociális viselkedésben és az explorációs magatartásban is javul az állatok teljesítménye, valamint csökken anxiásuk mértéke. Irodalmi adatok alapján az ingergazdag környezet képes csökkenteni változatos idegi károsodások negatív hatásait. Adoleszcens korban alkalmazott ingergazdag környezet csökkenti a prenatális stressz negatív hatásait. Az ingergazdag környezet hatásait vizsgáló tanulmányok többsége azonban felnőtt állatokon történetek, ahol az ingergazdag környezetbe csak az anyától való elválasztást követően, vagy felnőttkorban kerültek a kísérleti egyedek. Keveset tudunk azonban arról, hogy a korai, születést követő időszakban milyen hatásai vannak az ingergazdag környezetnek.

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy összességében nézve az ingergazdag környezetnek önmagában nincs jelentős hatása újszülött patkányok fejlődésére, annak ellenére, hogy bizonyított, hogy számos növekedési faktor expresszióját fokozza. A súlyban tapasztalt csökkenés valószínűleg abból adódik, hogy az ingergazdag ketrecben az állatok többet mozognak a nagyobb élettérben az egymással és a rendelkezésükre álló tárgyakkal való játék során. A bonyolultabb motoros koordinációs tesztekben azonban szignifikánsan jobban teljesítenek az ingergazdag környezetben tartott állatok, mint a hagyományos ketrecben nevelkedettek. Az open-field tesztben az ingergazdag állatok három hetes korban aktívabbnak bizonyultak, ez elsősorban a habituációban nyilvánult meg.

## **4.6. Ingergazdag környezet hatása nátrium-glutamát kiváltotta toxicus lézióban**

Ebben a kísérletben csak az alacsony dózisú nátrium-glutamát kezelést alkalmaztuk. Ez a dózis képes már előidézni a súlyos neurodegenerációt a retinában és a nucleus arcuatusban. Ugyanakkor ennek a dózishoz csupán enyhébb hatása van az általunk

vizsgált neurológiai, motoros koordinációs és open-field tesztekben. Ezt az enyhébb fokú károsodást azonban nagymértékben csökkentette az ingergazdag környezet. Ezek alapján úgy tűnik számunkra, hogy önmagában az ingergazdagság nem változtatja jelentősen a fejlődés menetét, azonban egyfajta rezervet képez, ami a károsító behatásokkal szembeni nagyobb ellenállóképességet, és az azokból való jobb felépülést eredményez.

## **Új eredmények összefoglalása**

Az irodalomból vett különböző neurológiai és motoros koordinációs, valamint viselkedési tesztekben egy standardizálható rendszert hoztunk létre. Ennek segítségével vizsgálható újszülött patkányokban széles spektrumban a korai posztnatális idegi fejlődés.

Kimutattuk a perinatális nátrium-glutamát kezelés negatív, a fejlődést jelentősen késleltető hatását. Ezt a károsító hatást ingergazdag környezet és a (neurotrofikus faktorok családjába tartozó) PACAP kezelés képes volt csökkenteni.

Perinatális hypoxia/ischaemia modellen is kimutattuk a kezelés rövid távú negatív következményeit, melyek prognosztikai jelentőségűek lehetnek.

Kimutattuk, hogy normál újszülött patkányok posztnatális fejlődését szisztémásan adott PACAP kezelés önmagában gyorsítani képes, míg az antagonistá hatású PACAP 6-38 adása nem késlelteti a fejlődést.

Az ingergazdag környezetnek önmagában csak csekély hatása van a fejlődés ütemére, egyes bonyolultabb, fejlett motoros koordinációt igénylő tesztekben azonban jobban teljesítenek az ingergazdag környezetben nevelt állatok.

## **Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények:**

- Kiss P**, Hauser D, Tamás A, Lubics A, Rácz B, Horváth Zs, Farkas J, Zimmermann F, Stepien A, Lengvári I, Reglődi D (2007). Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox. Res.* 12, 85-93. (IF: 5.234).
- Kiss P**, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Hauser D, Horváth Zs, Rácz B, Gábrriel R, Babai N, Tóth G, Reglődi D (2006). Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1070, 365-370. (IF: 1,971)
- Kiss P**, Tamás A, Lubics A, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I, Reglődi D (2005). Development of neurological reflexes and motor coordination in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox. Res.* 8, 235-244. (IF: 1,664)
- Lubics A, Reglődi D, Tamás A, **Kiss P**, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic/ischemic injury. *Behav. Brain Res.* 157, 157-165. (IF: 2,865)
- Reglődi D, **Kiss P**, Tamás A, Lengvári I (2003). The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. *Behav. Brain Res.* 140, 131-139. (IF: 2,817)

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények összes impact faktora: 14,551

## **Egyéb közlemények:**

- Somogyi I, Boros A, Engelmann P, Nemeth J, Lubics A, Tamás A, **Kiss P**, Reglődi D, Pollák E, Molnár L. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like compounds could modulate the activity of coelomocytes in earthworm. *Ann NY Acad Sci* in press (IF: 1.731).
- Atlasz T, Szabadfi K, Reglődi D, **Kiss P**, Tamás A, Tóth G, Molnár A, Szabó K, Gábrriel R. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP1-38) and

- its fragments on retinal degeneration induced by neonatal MSG treatment. Ann NY Acad Sci in press (IF: 1.731).
- Boronkai A, Brubel R, Racz B, Tamas A, **Kiss P**, Horvath G, Lubics A, Szigeti A, Bellyei Sz, Toth G, Lakatos A, Reglodi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the survival and signal transduction pathways in human choriocarcinoma cells. Ann NY Acad Sci in press (IF: 1.731).
- Roth E, Weber G, **Kiss P**, Horvath G, Toth G, Gasz B, Ferencz A, Gallyas F, Reglodi D, Racz B. Effects of PACAP and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. Ann NY Acad Sci in press (IF: 1.731).
- Varhalmi E, Somogyi I, Kiszler G, Nemeth J, Reglodi D, Lubics A, **Kiss P**, Tamas A, Pollak E, Molnar L. Expression of PACAP-like compounds during the caudal regeneration of the earthworm *Eisenia fetida*. J Mol Neurosci in press (IF: 1.735).
- Racz B, Horvath G, Faluhelyi N, Nagy AD, Tamas A, **Kiss P**, Gallyas F, Toth G, Gaszner B, Csernus V, Reglodi D. Effects of PACAP on the circadian changes of signaling pathways in chicken pinealocytes. J Mol Neurosci in press (IF: 1.735).
- Boros A, Reglodi D, Herbert Z, Kiszler G, Nemeth J, Lubics A, **Kiss P**, Tamas A, Shioda S, Matsuda K, Pollak E, Molnar L. Changes in the expression of PACAP-like compounds during the embryonic development of the earthworm *Eisenia fetida*. J Mol Neurosci in press (IF: 1.735).
- Hernadi L, Pirger Zs, Kiss T, Nemeth J, Mark L, **Kiss P**, Tamas A, Lubics A, Toth G, Shioda S, Reglodi D. The presence and distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) in the snail *Helix pomatia*. Neuroscience 2008;155:387-402 (IF: 3.352).
- Reglodi D, Borzsei R, Bagoly T, Boronkai A, Racz B, Tamas A, **Kiss P**, Horvath G, Brubel R, Nemeth J, Toth G, Helyes Z. Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. J Mol Neurosci in press (IF: 1.735)
- Pirger Zs, Nemeth J, Hiripi L, Toth G, **Kiss P**, Lubics A, Tamas A, Hernadi L, Kiss T, Reglodi D. PACAP has anti-apoptotic effect in the salivary gland of an invertebrate species, *Helix pomatia*. J Mol Neurosci in press (IF: 1.735)



- Gaál V, Márk L, **Kiss P**, Kustos I, Tamás A, Kocsis B, Lubics A, Németh V, Németh A, Lujber L, Pytel J, Tóth G, Reglődi D. Investigation of the effects of PACAP on the composition of tear and endolymph proteins. *J Mol Neurosci* 2008 in press (IF: 1.735)
- Szakály P, **Kiss P**, Lubics A, Magyarlaki T, Tamás A, Rácz B, Lengvári I, Tóth G, Reglődi D. Effects of PACAP on survival and renal morphology in rats subjected to renal ischemia-reperfusion. *J Mol Neurosci* 2008 in press (IF: 1.735).
- Atlasz T, Szabadfi K, **Kiss P**, Babai N, Kőszegi Z, Tamás A, Reglődi D, Gábrriel R. PACAP-mediated neuroprotection of neurochemically identified cell types in MSG-induced retinal regeneration. *J Mol Neurosci* in press (IF: 1.735)
- Rácz B, Gasz B, Gallyas F Jr., **Kiss P**, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Róth E, Reglődi D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul Pept* 2008; 145: 105-115. (IF: 2,422).
- Atlasz T, Babai N, Reglődi D, **Kiss P**, Tamás A, Bari F, Domoki F, Gábrriel R. Diazoxide is protective in the rat retina against ischemic injury induced by bilateral carotid occlusion and glutamate-induced degeneration. *Neurotox Res* 2007; 12: 105-111. (IF: 5.234)
- Rácz B, Gallyas F Jr, **Kiss P**, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Róth E, Tóth G, Hegyi O, Verzár Zs, Fabricsek Cs, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the PKA-Bad-14-3-3 signaling pathway in glutamate-induced retinal injury in neonatal rats. *Neurotox Res* 2007; 12: 95-104.(IF: 5.234)
- Kiss P**, Reglődi D, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Józsa R, Somogyvári-Vigh A, Szilvássy Z, Németh J. Changes of PACAP levels in the brain show gender differences following short-term water and food deprivation. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 152: 225-230. (IF: 2.562).
- Atlasz T, Babai N, **Kiss P**, Reglődi D, Tamás A, Szabadfi K, Tóth G, Hegyi O, Lubics A, Gábrriel R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in

- bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153: 108-114. (IF: 2,562)
- Rácz B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamás A, Józsa R, Lubics A, **Kiss P**, Róth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglódi D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153: 115-123. (IF: 2,562)
- Németh J, Jakab B, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, **Kiss P**, Oberitter Zs, Horváth B, Szilvássy Z, Reglódi D. PACAP-27 radioimmunoassay: Description and application of a novel method. *J Radioanal Nucl Chem* 2007; 273: 327-332. (IF: 0,499).
- Rácz B, Reglódi D, **Kiss P**, Babai N, Atlasz T, Gábrriel R, Lubics A, Gallyas F Jr, Gasz B, Tóth G, Róth E, Hegyi O, Lengvári I, Tamás A. In vivo neuroprotection by PACAP in excitotoxic retinal injury: review of effects on retinal morphology and apoptotic signal transduction. *Int J Neuroprot Neurodeg* 2006; 2: 80-85
- Reglódi D, Lubics A, **Kiss P**, Lengvári I, Gaszner B, Tóth G, Hegyi O, Tamás A. Effect of PACAP in 6-OHDA-induced injury of the substantia nigra in intact young and ovariectomized female rats. *Neuropeptides* 2006; 40: 265-274. (IF: 2,155)
- Rácz B, Tamás A, **Kiss P**, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Gallyas F Jr, Róth E, Reglódi D. Involvement of ERK and CREB signalling pathways in the protective effect of PACAP on monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 507-511. (IF: 1,971)
- Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglódi D, Tóth G, **Kiss P**, Gábrriel R. Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 149-155. (IF: 1,971)
- Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglódi D, **Kiss P**, Gábrriel R. Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retina degeneration. *Neurotox Res* 2005; 8: 227-233. (IF: 1,664)
- Tamás A, Gábrriel R, Rácz B, Dénes V, **Kiss P**, Lubics A, Lengvári I, Reglódi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration

induced by monosodium-glutamate. *Neurosci Lett* 2004; 372: 110-113. (IF: 2,019)

Tudományos közlemények összesített impact faktora (absztraktok nélkül): 71,529

### **Folyóiratban megjelent idézhető absztraktok:**

Reglődi D., **Kiss P.**, Tamás A., Farkas B., Lengvári I.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) enhances neurobehavioral development in newborn rats. - *Clin. Neurosci./Ideggy. Szle.* 56. 74. 2003.

Lubics A., Reglődi D., Tamás A., Szalontay L., **Kiss P.**, Szalai M., Lengvári I.: Behavioral effects of neonatal hypoxic-ischemic injury during the first six postnatal weeks. - *Clin Neurosci/Ideggy Szle* 57. Suppl. 1: 42. 2004.

Reglődi D., Tamás A., Rácz B., Dénes V., **Kiss P.**, Lengvári I., Gábrriel R.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects against monosodium-glutamate toxicity in the rat retina. - *Regul. Pept.* 122: 36. 2004.

Reglődi D., **Kiss P.**, Tamás A., Lubics A., Szalontay L., Szalai M., Lengvári I.: Effects of monosodium glutamate treatment on neurological reflex performance, motor coordination and open-field behavior in neonatal rats. - *Psychopharm. Biol. Narc.* 4(2-3): 753. 2004.

**Kiss P.**, Tamás A., Lubics A., Lengvári I., Szalai M., Hauser D., Horváth Zs., Reglődi D.: Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes. - *Regul. Pept.* 130. 147. 2005.

Rácz B., Tamás A., **Kiss P.**, Gasz B., Borsiczky B., Gallyas F Jr., Sümegi B., Tóth G., Róth E., Reglődi D.: Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. - *Regul. Pept.* 130. 174. 2005.

**Kiss P.**, Tamás A., Lubics A., Szalontay L., Szalai M., Lengvári I., Reglődi D.: Effects of monosodium glutamate treatment on the neurobehavioral development of newborn rats. - *Clin Neurosci/Ideggy. Szml.* 58(S1): 51. 2005.

- Rácz B., Tamás A., Dénes V., **Kiss P.**, Lengvári I., Gábrriel R., Reglődi D.: PACAP attenuates the monosodium-glutamate-induced retinal degeneration in the rat. - Clin Neurosci/Idegy. Szml. 58(S1): 78. 2005.
- Babai N, Atlasz T, Schaffer D, Reglődi D, Tamás A, **Kiss P**, Szalai M, Gábrriel R. Comparison of three different neurodegeneration models in the rat retina: monosodium glutamate (MSG), hypoxic insult combined with unilateral carotis occlusion and bilateral carotis occlusion. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2006; 59(S1): 8.
- Kiss P**, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Rácz B, Babai N, Gábrriel R, Reglődi D. Systemic PACAP administration attenuates monosodium glutamate-induced neurobehavioral changes. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2006; 59(S1): 34.
- Rácz B, Tamás A, **Kiss P**, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tóth G, Róth E, Reglődi D. Signaling pathways involved in the protective effects of PACAP in MSG-induced retinal degeneration. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2006; 59(S1): 54.
- Kiss P**, Nemeth J, Tamas A, Lubics A, Lengvari I, Jozsa R, Reglodi D. Changes in endogenous PACAP levels in the brain following food and water deprivation. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2007; 60(S1): 33.
- Racz B, Gallyas F, Gasz B, Tamas A, Lubics A, **Kiss P**, Roth E, Toth G, Lengvari I, Hegyi O, Wittmann I, Reglodi D. Effects of the neuropeptide PACAP on the survival of endothelial cells. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2007; 60(S1): 54.
- Reglodi D, **Kiss P**, Farkas J, Szalai M, Lubics A, Tamas A, Lengvari I, Szogyi D, Atlasz T, Babai N, Gabriel R, Koppan M. Effects of hypoxic/ischemic injuries on neurobehavioral development of newborn rats. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2007; 60(S1): 55.
- Babai N, Atlasz T, **Kiss P**, Gábrriel R, Bari F, Domoki F, Fekete É, Zorilla EP, Reglődi D. The effects of various neuroprotective compounds on different retina degeneration models. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2007; 60(S1): 6.
- Rácz B, Reglődi D, Tamás A, Lubics A, **Kiss P**, Gallyas Jr. F, Wittmann I, Fabricsek Cs, Tóth G, Hegyi O, Borsiczky B, Ferencz A, Wéber Gy, Róth E. A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása az endothél sejtek oxidatív stressz okozta apoptotikus sejthalálában. Folia Hepatologica. 2007; 11: 31-32.