

**NEUROPEPTIDEK (PACAP, VIP) ELŐFORDULÁSA ÉS SZEREPE
MADARAK KÖZPONTI IDEGRENSZERÉBEN**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Hollósy Tibor

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai Intézet



**Témavezető:
dr. Reglódi Dóra, dr. Józsa Rita**

Pécs, 2013.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	2
2. Célkitűzések	4
3. Módszerek	4
4. Eredmények.....	6
5. Megbeszélés	9
6. Az értekezéshez felhasznált saját közlemények.....	12

1. Bevezetés

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A 38 aminosavból álló peptidet 1989-ben izolálták először birka hypothalamusból, a hypophysisben kifejtett adenilát-cikláz aktiváló hatása alapján. Az emlősökben előforduló PACAP majdnem 90%-át a PACAP38 (továbbiakban PACAP) teszi ki. A rövidebb fragmensek antagonistá hatással bírnak, ezek közül legáltalánosabban használt a PACAP6-38. A PACAP tagja a vasoaktív intestinális polipeptid (VIP)/szekretin/glukagon peptidcsaládnak. Szerkezete 67%-ban megegyezik a VIP struktúrájával, de adenilát-cikláz hatása ezerszer-tízszerszer nagyobb a VIP-nél. A PACAP megtalálható előgerinchúros állatokban és alacsonyabbrendű gerinctelenekben is, melyek bizonyítják, hogy a filogenetikai fejlődés során szinte változatlanul konzerválódott molekula alapvető élettani funkciókkal rendelkezik. A felfedezése óta eltelt közel húsz év alatt a peptidet – nevével ellentétben – gyakorlatilag mindenhol kimutatták és leírták hatásait. Az irodalomban található – leginkább emlősökre vonatkozó – adatok szerint a PACAP nem csak a központi és perifériás idegrendszerben, hanem más szövetekben, többek között az endokrin mirigyekben és a gastrointestinalis tractusban is megtalálható. Emlősökben a PACAP legnagyobb mennyiségben a hypothalamus területén mutatható ki. A perifériás idegrendszer területén elsősorban a ganglion spinaleban, valamint a pre- és postganglionaris neuronokban figyelhető meg a PACAP.

A PACAP-nak szerepe van az agy fejlődésében, a neuroblastok differenciálódásában, proliferációjában, az axonnövekedésben, és a velőcső tagozódásában. Knockout egerekben, ahol a PACAP vagy annak receptora hiányzik, számos súlyos funkcionális rendellenességet észleltek, beleértve a memóriazavarokat.

A PACAP előfordulása nem emlős (madár) szervezetben

Madárban a PACAP központi idegrendszeri előfordulása hasonló elrendeződést, megoszlást mutat, mint emlősökben. A telencephalon területén megtalálható a PACAP a hippocampusban, a neostriatum intermediumban, a nucleus basalisban. Nagyon nagy sűrűségben mutatható ki PACAP-tartalmú idegsejt és -rost a bulbus olfactoriusban. A

diencephalonban a preopticus területen található nagyszámú PACAP-immunreaktív sejt és rost. A commissura anterior szintjében lévő bed nucleus szintén gazdag PACAP-ban, hasonlóan a hypothalamus dorsalis részéhez. Nagyszámú PACAP-pozitív idegsejt található a nucleus spiriformis medialisban és a nucleus pretectalis medialisban. A mesencephalonban a PACAP-tartalmú idegelemek eloszlása a tectum opticumban kifejezett. Az agytörzs területén nagyszámú PACAP-pozitív képlet található a nucleus lemnisci lateralis környékén, a nucleus parabrachialisban, nucleus subceruleus ventralisban és a locus ceruleusban. A kisagyi Purkinje-sejtekben szintén található PACAP.

PACAP-receptorok és előfordulásuk madarakban

A PACAP hatását a szervezetben specifikus G-proteinhez kötődő receptorok közvetítik. A PAC1 receptor két-három nagyságrenddel nagyobb affinitást mutat a PACAP-hoz, mint a VIP-hez, míg a VPAC1- és VPAC2-receptorok a PACAP-ot és a VIP-et egyforma erősséggel kötik. A madárban található PAC1 megoszlása nagyon hasonló a PACAP megoszlásához. Nagy sűrűségben található ez a receptor a telencephalon dorsalis területében, a neostriatumban, a bulbus olfactoriusban, a nucleus accumbensben és a ventralis paleostriatumban. Kisebb mennyiségben a PAC1 kimutatható a preopticus területen és a supraopticus-paraventricularis területen. Nagyszámú PAC1-tartalmú sejt található a nucleus infundibularisban, nucleus mamillarisban. A thalamusban, a kisagyi granularis rétegben, tectum opticumban hasonlóan nagy denzitásban mutatható ki a receptor.

PACAP élettani hatásai

A PACAP számos élettani hatással rendelkezik a szervezetben. Elsőként leírt funkciója a hypophysis hormontermelésének szabályozása, az elülső és a hátsó lebenyben egyaránt. Egyéb endokrin hatásai is ismertek: szerepe van a pajzsmirigyműködésben és a gonádok szteroidtermelésének szabályozásában, a spermiogenezisben és az ovarialis follicularis fejlődésben, stimulálja a mellékvese katekolamin szintézisét, és a pancreas inzulintermelését.

A PACAP központi szerepet játszik a napi ritmus szabályozásában is. A corpus pineale melatonin termelésére kifejtett hatását munkacsoportunk is vizsgálta. Kimutattuk, hogy a PACAP fokozza a melatonin termelést a tobozmirigyben, mely már korai embrionális korban is megfigyelhető, azonban a melatonin cirkadián ritmusát nem befolyásolja. A PACAP szabályozza a migrációs viselkedést is. Több vándorló madárban kimutatták a ADCYAP1 gén variációit a migráció során. Ez az a gén, mely kódolja a PACAP-ot. A PACAP-ról kimutatták, hogy részt vesz az alvásszabályozásban, a hőszabályozásban és befolyásolja a kemorecepciót a glomus caroticumban. A PACAP serkenti a memóriafolyamatokat, amit a PACAP valamint a PACAP-receptor knock-out egerek memóriazavara is mutat. A PACAP számos viselkedésre gyakorolt hatását is leírták. Befolyásolja többek között a szteroid-indukálta reprodukciós viselkedést, növeli a lokomotoros aktivitást patkányban és egérben, részt vesz a stressz adaptációs magatartás szabályozásában és antidepresszáns hatásai is vannak. Az érzőidegvégződésekben fájdalom hatására felszabaduló szenzoros neuropeptid szekrécióra kifejtett hatását munkacsoportunk is vizsgálta.

A PACAP neurotrofikus és neuroprotektív hatásait felfedezése óta számos, in vivo és in vitro kísérlet bizonyította. Az embrionális fejlődésben szerepet játszó mechanizmusok újra fokozottabban aktiválódnak akkor, ha az idegrendszert károsító hatások érik. Az idegrendszerben a PACAP és receptorai igen korán megjelennek, és nagy szerepet játszanak a neurogenesisben, a neuronális differenciációban, a gliasejtek fejlődésében, valamint az idegrendszeri mintázat kialakításában is. Az idegrendszert ért sérülések után a PACAP upregulációját már több munkacsoport leírta, és endogén neuroprotektív szerepe is ismert a

PACAP KO egerek tanulmányozása, illetve a PACAP endogén antagonizálása révén. Intézetünkben mutatták ki a PACAP neuroprotektív hatásait számos agyi károsodásban, mint pl. Parkinson-kór, Huntington chorea, traumás agykárosodás és agyi ischemia patkány modelljeiben.

A VIP szerkezete, előfordulása emlősökben és madarakban

A VIP és a PACAP szerkezete a filogenezis során jól konzerválódott: az aminosav sorrendjeik majdnem azonosak az emlősökben. A VIP szerkezetéről a nem emlős gerincesekben kevés ismerettel rendelkezünk. A VIP idegrendszeri eloszlását számos fajban már leírták, bár a korai tanulmányok csak a bélben történő előfordulására koncentráltak. A VIP-receptort is kimutatták már számos emlős és egyéb gerinces fajokban is. A madárban található VIP szekvenciája csak négy aminosavban különbözik az emlősökben található VIP-től. A VIP-tartalmú neuronok megoszlása, elhelyezkedése és a génexpresszió feltérképezése csirkében megtörtént. A csirkeembriók idegrendszerében a VIP megtalálható a gerincvelőben, szimpatikus dúcokban, a plexus submucosusban továbbá az embrionális 15. naptól a hypophysisben. Azonban továbbra is kevés ismerettel rendelkezünk a VIP megoszlásáról és szerepéről az embrionális csirkeagyban.

2. Célkitűzések

A PACAP- és a VIP-tartalmú struktúrák megoszlásának vizsgálata csirkeagyban.

A PACAP előfordulásának és napi ritmusának vizsgálata a corpus pinealeban.

A pinealectomia és éhezés hatásának vizsgálata a PACAP-szintekre és a napi ritmusra.

Az in ovo PACAP kezelés hatásának vizsgálata a motoros és szociális viselkedésre.

A PACAP szerepének vizsgálata a szaglási memória kialakulásában.

3. Módszerek

Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez Hubbard Flex húshibrid tojásokat, illetve ugyanilyen típusú állatokat (*Gallus domesticus*) használtunk. Az állatok elhelyezése, gondozása és felhasználása a Pécsi Tudományegyetem ellenőrzött protokollja szerint, az intézeti ajánlások figyelembevételével történt.

Kísérleti módszerek

Radioimmunoassay

Az eltávolított szöveteket tömegmérés után homogenizáltuk és centrifugáltuk. A szupernatánsokat használtuk a RIA mérésekhez. A PACAP38 mérésekhez a „88111-3” számú antiszérumot használtuk. Birka PACAP24-28 C-terminális fragmentet jódoltuk és a reakciókeveréket reverse HPLC oszlopon választottuk el. A VIP mérésekhez „85/24”-es, nyúlban előállított, glutáraldehiddel fixált sertés VIP és madár thyreoglobulin konjugált antiszérumot használtunk. A peptid-szinteket ANOVA teszttel analizáltuk.

A napi ritmus vizsgálata

A kísérlethez az állatokat négy csoportra osztottuk: az **LD** (light/dark) csoportot 14 órán át világosban és 10 órán át sötétben tartottuk. A **DL** (dark/light) csoportot fordított fényviszonyok között tartottuk. Az **LL** (light/light) csoport állatai folyamatos megvilágításban, míg a **DD** (dark/dark) csoport állatai folyamatos sötétben voltak. Három óránként minden csoportból négy állatot dekapitáltunk, és eltávolítottuk az agyat és a retinákat. Szétválasztottuk a diencephalont, agytörzset (pons és medulla oblongata), tectumot, corpus pinealét, a hypophysist, a telencephalon elülső részét, a cerebellumot és a retinát. RIA módszer után COSINOR analízissel állapítottuk meg a ritmikus folyamat meglétét vagy hiányát.

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai metszetek készítéséhez csirkéből távolítottuk el fixálás után a corpus pinealét. A szövetekből 15-50 µm-es metszeteket (frontalis, saggitalis) készítettünk. A PACAP38-immunreaktív képleteket a standard ABC módszerrel azonosítottuk.

Műtéti eljárás – pinealectomia

A megfelelő altatás után egy rövid metszést végeztünk a fejtetőn cranio-caudális irányban, majd a koponyán is. A csontdarab levétele után láthatóvá vált a dura mater és a sinus sagittalis superior. A durán kis nyílást vágunk és felhajtva alatta helyezkedett el a corpus pineale. A corpus pinealet megfogtuk és óvatosan kiemeltük úgy, hogy a nyele is épségben maradjon. Hasonló eljárást alkalmaztunk az álműtött állatoknál is, azzal a kivétellel, hogy a corpus pinealet nem távolítottuk el. Egy héttel az operáció után az állatokat dekapitáltuk, az agyat eltávolítottuk, majd a következő agyrészeket vizsgáltuk tovább: agytörzs (pons és medulla oblongata), diencephalon és a telencephalon frontális része, majd RIA módszerrel határoztuk meg a PACAP38 szinteket.

Az éhezés vizsgálata

A kísérlethez használt csirkék takarmánymegvonása este nyolc órakor kezdődött, az állatok agyát 12, 36 és 48 óra múlva távolítottuk el. A kontroll állatok agyát is ugyanebben az időpontban távolítottuk el. A hypothalamust, agytörzset, telencephalont elkülönítettük, megmértük, majd PACAP38- és VIP-RIA analízis történt. A statisztika elemzéseket ANOVA teszttel végeztük.

In ovo kezelések

A fertilizált tojásokat saját keltetőgépünkben inkubáltuk. A csirkeembriók kezelését az első és második embrionális életszakaszban végeztük. Steril tüvel kis ablakot vágunk a tojáshéjon. A bejuttatandó anyagot Hamilton fecskendővel injektáltuk a chorioallantois membránon keresztül. A csirkeembriókba 20 µg PACAP6-38-at adtunk 25 µl fiziológiás sóoldatban feloldva. A PACAP6-38 mennyiségét korábbi kísérletek alapján számítottuk ki. A kontroll tojásokba ugyanezzel az eljárással ugyanekkora volumenű sóoldatot injektáltunk.

A szaglási memória vizsgálata

Csirkeembriókba 20 µl PACAP6-38-at injektáltunk. A kontroll állatok fiziológiás sóoldat kezelést kaptak. A tizenötödiktől a huszadik embrionális napig a tojáshéjakat 300 µl eperkivonattal bekentük, mind a PACAP6-38 kezelt, mind a sókezelt tojásoknál. A kezeletlen kontroll csirkék nem kaptak eperkezelést, ezeket elkülönítve is keltettük. A kikelés után minden állatketrecbe két üvegpalackot tettünk, az egyik eperaromával kevert vizet

tartalmazott. Az illataromával kevert és nem kevert víz fogyasztását naponta mértük a kikelést követő hatodik napig.

Viselkedésvizsgálatok

Open field teszt

Az általános exploratórikus („felderítő”) és a lokomotoros aktivitást az open field berendezésben vizsgáltuk. A tesztet két napos és két hetes korban végeztük el. Minden teszt öt percig tartott és videóra rögzítettük, majd a következő viselkedési paramétereket vizsgáltuk: az első lépésig eltelt idő, az első csipogásig eltelt idő, a lépések száma, adott mezőkben tartózkodás ideje, megiramodások (futások) száma, menekülési kísérletek száma, csipegetések száma, tollcsipkedések száma, szárnycsapkodások száma, a fej előre-hátra és oldalra fordításának száma, székletürítések száma, fal melletti futás-tartózkodás ideje, átlósan futások száma és az ugrások száma. A teszt parametrikus adatait Student's t-teszttel, míg a nem parametrikus adatokat Man-Whitney teszttel értékeltük ki.

Általános magatartás (general behavior) teszt

Az állatokat saját ketrecükben, saját környezetükben vizsgáltuk. A teszt alatt 15 számolás történt, egy számolás egy percig tartott és minden számolás között egy perc szünetet tartottunk. A tesztet 21 napos korig naponta elvégeztük, egyszer a délelőtti órákban, és egyszer a délutáni időszakban. A következő paramétereket vizsgáltuk: evés, ivás, állás, ülés, mozgás, tollászkodás, csipegetés, agresszíven másik állat csípése, saját maga csípése. A mérési eredményeket százalékban fejeztük ki. Az eredményeket Student's t-teszttel értékeltük ki.

Szocializációs teszt – runway test

A runway teszttel az állatok szociális viselkedését lehet vizsgálni. A futófolyosó két méter hosszú, egy végén egy doboz található (start box), a másik végén pedig két, azonos ketrecből származó állat egy ketrecben (goal box). A teszt akklimatizációval kezdődött, a start boxban az állat két percet töltött, miközben végig láthatta a másik két állatot. Két perc eltelte után a start box ajtaját kinyitottuk és mértük az időt, amíg az állat a futófolyosóra lép. A goal box előtti 20 cm-es szakaszba való belépést már pozitívnak értékeltük. Majd mértük az időt, amit az állat a goal box előtti területen töltött. A teszt tíz percig tartott, melyet az állatok négy és tizennégy napos korban végeztünk. Az eredmények összehasonlítását Student's t-teszttel végeztük.

4. Eredmények

PACAP és a VIP megoszlása csirkeagyban embrionális és felnőtt korban

A RIA mérések eredményeképpen kapott adatok azt mutatják, hogy a PACAP és a VIP nagy mennyiségben jelen van az embrionális fejlődés második felében. A PACAP38 szintje minden vizsgált agyterületen szignifikánsan magasabb volt, mint a VIP. A legmagasabb PACAP szintet az agytörzsben mértük, majd csökkenő sorrendben a hypothalamusban, kisagyban, míg a telencephalonban volt a legalacsonyabb a szint. Ezek a szintek csökkenő tendenciát mutattak az embrionális kor második felében valamennyi vizsgált agyterületen. Szignifikáns különbséget az agytörzsben és a hypothalamusban találtunk a 15. és a 20. nap között. A PACAP szintjének változása az embrionális korban, majd a kikelés utáni és a

későbbi felnőttkorban a következő megoszlást mutatta: az embrionális kor első felében érte el a peptid a maximumát (E8 és E9 napokon), és ezek a csúcsok szignifikánsan különböztek az összes többi értéktől. Ezután a PACAP-értékek a csúcs előtti szintre csökkentek. Az embrionális kor második felében a szintek nem különböztek a embrionális kor első felében tapasztalt szintektől. A kikelés előtt és a kikelés napján további csökkenést láttunk. A kikelés utáni és a későbbi felnőttkorban szignifikáns változásokat nem tapasztaltunk.

A VIP-szintek is csökkenést mutattak a fejlődés során, ez az agytörzsben bizonyult szignifikánsnak. Összehasonlítva a PACAP38-cal, a VIP-szintek szignifikánsan mindig alacsonyabb értéket mutattak az összes vizsgált agyterületen.

A PACAP napi ritmusa

Agytörzs:

A PACAP38 napi ritmusa az *LD*, *LL* és *DD* csoportban egyaránt észlelhető volt. A szubjektív világos órák alatt nem volt szignifikáns különbség a csoportok között, az értékek 4-10 ng/mg fehérje között ingadoztak. A szubjektív sötét órák alatt a PACAP szintje 12-19 ng/mg fehérje szintre emelkedett. A PACAP átlagos szintje a szubjektív sötét órák alatt szignifikánsan magasabb volt ebben a három csoportban, mint a szubjektív világos órák alatt mérhető szint. Az *LD* csoportban egy magas csúcs volt észlelhető éjjelkor, mely különbözött az összes többi időpontban mérhető értéktől. Az *LL* csoportban a csúcserték 21 órakor volt mérhető, szintén szignifikánsan különbözött a többi értéktől. A *DD* csoportban is 21 órakor volt a csúcs, és ez is különbözött az alacsonyabb értékektől. A legalacsonyabb koncentráció 15 és 18 órakor volt, és ezek az értékek szignifikánsan különböztek az összes előző nappali értéktől. A *DL* csoportban két csúcs volt mérhető 15 és 21 óra között, szignifikánsan eltértek az összes korábbi és későbbi időpontban mérhető értékektől. A Cosinor analízis szerint az *LD* és *DL* csoport mutatott cirkadián ritmus, míg az *LL* és *DD* csoport nem.

Diencephalon:

Az *LD*, *LL* és *DD* csoportban a PACAP 6-10 ng/mg fehérje között volt a szubjektív világos órák alatt. A szubjektív sötét órák alatt ebben a három csoportban a szint emelkedett (11-14 ng/mg fehérje), legmagasabb 21 órakor volt az *LL* és *DD* csoportban, és 24 órakor az *LD* csoportban. A szubjektív sötét órák alatt mérhető átlagos PACAP-értékek nem különböztek szignifikánsan egymástól, de különböztek a szubjektív világos órák alatt mérhető értékektől, tekintet nélkül a fényviszonyokra. A *DL* csoport értékei is hasonlóak, mint az agytörzs esetén: legmagasabb érték a sötét periódus végén, és a világos kezdetén (15-21 óra között) volt. A Cosinor analízis mindegyik csoportban szignifikáns napi ritmust mutatott ki.

Telencephalon:

Az *LD*, *LL* és *DD* csoport adatai hasonló napi változást mutatnak. A szubjektív világos órák alatt csökkenő mintázatot mutatnak 12-21 óra között, legalacsonyabb érték 21 órakor, 12-15 óra között és 18 órakor volt mérhető ezekben a csoportokban. Az alacsony és magas értékek szignifikánsan különböztek egymástól. A *DL* csoportban két csúcs látható: 18 és 3 órakor (körülbelül a világos szakasz kezdetén és végén). A *DL* csoport kivételével a többiben ritmikus folyamatot találtunk.

Retina:

A négy csoport hasonló változásokat mutatott: 6 óra után az értékek csökkeni kezdtek, a legalacsonyabb érték 12-15 óra között volt mérhető. A szubjektív sötét periódus kezdetére az értékek az eredeti szintre emelkedtek, függetlenül a megvilágítási feltételektől. A különbség a

legalacsonyabb és legmagasabb érték között szignifikáns volt mindegyik csoportban. Az *LD* csoportban magas értékek mutathatók ki 3, 6, 21 és 24 órákor, alacsony értékek 9, 12 és 15 órákor. Hasonló mintázat látható a *LL* csoportban, de az *LL* értékek mindig alacsonyabbak voltak, mint az *LD* értékek. A *DL* csoportban magas értékek mérhetőek 6 és 24 órákor. A *DD* csoportban a legmagasabb értékek 3 és 6 órákor láthatók. Az *LD* és *LL* csoport átlagos értékei között szignifikáns különbség van. A Cosinor analízis mindegyik csoportban kimutatta a napi ritmust.

Tectum, cerebellum, hypophysis, corpus pineale:

Ezekben az agyterületekben nem találtunk napi ritmikus változásokat egyik statisztikai teszttel sem. A tectumban és a kisagyban a PACAP koncentrációja 4-5,5 és 2-3,3 ng/mg fehérje között változott. A *DL* csoportban – bár nem szignifikáns – emelkedés tapasztalható a szubjektív világos órák alatt a tectumban és a szubjektív sötét órák alatt a kisagyban. A corpus pinealeban szignifikáns emelkedés volt látható, de csak a *DL* csoportban a sötét órák alatt. A hypophysis esetén az *LD* és *DD* csoportban enyhe – nem szignifikáns – emelkedés mérhető a szubjektív sötét órák alatt.

A PACAP-szintek változásának vizsgálata külső beavatkozások hatására: pinealectomia és éhezés

Pinealectomia:

Jelen vizsgálatainkban azt tanulmányoztuk, hogy a pinealectomia milyen hatással van a PACAP és a cAMP nappali-éjszakai szintjére 14 óra világos és 10 óra sötét körülmények között tartott madarak különböző agyterületein. Előző tanulmányunkban magas PACAP-szintet és napi eltérést tapasztaltunk az agytörzsben és a diencephalonban. Ezeken a területeken a PACAP-szint 15 és 18 óra között alacsony volt, de 21 és hajnali 3 óra között magasnak bizonyult. Jelen kísérletünkben egy lehetséges összefüggést találtunk a tobozmirigy és a PACAP különböző agyterületeken mért szintje között. A PACAP szintjét különböző agyterületeken vizsgáltuk fiatal és prepubertás állatokban. A PACAP szintje szignifikánsan magasabb az agytörzsben és a diencephalonban pinealectomizált állatokban.

A PACAP szintje egyformán növekedett az agytörzsben, és a diencephalonban. Az agytörzsben 68 és 41%-os volt az emelkedés 15 és 24 órákor, és ez szignifikánsnak bizonyult. A diencephalonban a változás tendenciája hasonló volt: a PACAP szintjének emelkedése pinealectomia után 21 és 28%-os volt 15 és 24 órákor. Összehasonlítva az álműtött állatokkal a 15. és 24. órás adatokat azt találtuk, hogy a nappali értékek szignifikánsan magasabbak voltak az éjszakai értékeknél a pinealectomizált és az álműtött állatoknál egyaránt, mindkét agyterületen. A telencephalonban a PACAP szintje szignifikánsan magasabb 15 órákor, de nem találtunk szignifikáns különbséget a pinealectomizált és az álműtött állatok között egyik időpontban sem.

Éhezés:

A PACAP szignifikáns emelkedése látható az éhezés kezdete után 36 órával a hypothalamusban, agytörzsben és a telencephalonban. A későbbi időpontokban az értékek visszatértek a kontroll csoport értékeihez.

A VIP-szintek csirkékben a következő változást mutattak: az értékek egyenletesen csökkentek mindhárom vizsgált agyterületen, de szignifikáns különbség a 36 órás időpontban látható. 84 óra múlva a koncentrációk – a telencephalon kivételével – a normál értékhez közelítettek.

Az adatokat összehasonlítottuk patkányok adataival is. A PACAP szignifikánsan emelkedett az éhezés után, már a 12. órában a hypothalamusban, agytörzsben és a telencephalonban. Ezután az értékek visszatértek a normál kontroll állatok értékeihez. A VIP esetén a koncentrációk folyamatosan emelkedtek a hypothalamusban és a telencephalonban, majd az értékek csökkentek. Az agytörzsben azonban az éhezés utáni 84. órában mértünk magas szintet.

In ovo kezelés hatása a motoros és szociális viselkedésre

Az E8 napos korban kezelt állatok általános magatartása azt mutatta, hogy az antagonistával kezelt csoport a megszokott környezetben aktívabb volt, az állatok szignifikánsan többet futottak, tollászkodtak, csipkedtek. Az embrionális kor második felében kezelt állatoknál semmilyen különbséget nem figyeltünk meg. Az E8 korban PACAP6-38-cal kezelt állatok a két napos korban végzett open-field tesztben is aktívabbak voltak, majd ez a különbség megszűnt két hetes korra. A szociális magatartás vizsgálatánál lényegesen nagyobb változást tapasztaltuk. A startbox elhagyási idejében nem volt különbség, de a PACAP6-38-cal kezelt állatok 50%-a nem érte el a célzónát négy napos korban, szemben a kontroll csoportban mért 25%-kal. Tizennégy napos korban már a legtöbb állat elérte a célzónát, bár ez még mindig kisebb arány volt a PACAP6-38-cal kezelt csirkéknél. Az az idő, ami alatt elérték az állatok a célzónát, szignifikánsan magasabb volt a PACAP antagonistával kezelt csoportban. Ezenfelül a célzónában töltött idő lényegesen kevesebb volt, mint a kontroll állatoknál. Az E16 napos korban kezelt állatoknál már ilyen különbséget nem tapasztaltunk.

PACAP szerepe a szaglási memória kialakulásában

A normál kontroll állatok – melyeket nem kezeltünk az embrionális fejlődés alatt – az epres vízből szignifikánsan kevesebbet ittak, mint a tiszta vízből. Napokra lebontva az eredményeket azonban azt látjuk, hogy szignifikáns különbség van a kétféle víz fogyasztása között. A két különböző víz fogyasztása között nem volt szignifikáns különbség azoknál az állatoknál, melyeket in ovo eperrel kezeltünk, szemben a normál kontroll állatokkal. A kikelés utáni egy-két napban az eperillatú vízből többet fogyasztottak mint a normál vízből.

A PACAP6-38-cal kezelt csirkék szignifikánsan kevesebbet ittak az epres vízből, mint a tiszta vízből, hasonlóan azokhoz a normál kontroll csirkékhez, melyek nem kaptak eperkezelést az embrionális fejlődés alatt. Az eperillatú vízből több mint 50%-kal kevesebbet fogyasztottak, mint a tiszta vízből. A vizsgált hat nap alatt szignifikáns különbséget találtunk a vízfogyasztások között.

5. Megbeszélés

PACAP és a VIP megoszlása csirkeagyban embrionális és felnőtt korban

A RIA mérések eredménye szerint az embrionális fejlődés második szakaszában mind a PACAP, mind a VIP nagy mennyiségben kimutatható. A PACAP-szintek szignifikánsan magasabb értékeket mutattak, mint a VIP-szintek minden vizsgált agyterületen. Legmagasabb PACAP-szintet az agytörzsben mértünk, ezt követte a hypothalamus és a kisagy, legkisebb szint a telencephalonban volt mérhető. Mindkét peptidszint később csökkenő tendenciát mutatott. A VIP-értékek alacsonyabb szintje arra enged következtetni, hogy a PACAP-nak

dominánsabb hatása van a szabályozó mechanizmusokban az embrionális életkor második felében. Az, hogy a PACAP-nak magas, míg a VIP-nek alacsonyabb szintje mutatható ki ebben a fejlődési időszakban, azt valószínűsíti, hogy mindkét peptidnek fontos életkor- és régióspecifikus szerepe van.

A PACAP napi ritmusa

Eredményeink szerint a legmagasabb PACAP-szintet a diencephalonban és az agytörzsben találtuk, majd ezeket követte az agykéregben, tectumban és kisagyban mért PACAP-szintek. A legalacsonyabb értékek a hypophysisben, corpus pinealeban és a retinában voltak mérhetőek. A PACAP-szintek napi változása hasonló a diencephalonban és az agytörzsben. Az *LD*, *DD* és *LL* csoportoknál a PACAP emelkedett a sötét periódus alatt. Az *LD* csoport adatai nagyfokú egyezést mutatnak patkány agytörzsben mért adatokkal, ahol a PACAP, VIP és számos más hormon magas koncentrációban mutatható ki az éjszakai órák alatt. A fordított megvilágításban tartott csoport (*DL*) PACAP-értékei nem követték a másik három csoportnál tapasztalt ritmust. A PACAP napi változásai a telencephalonban az *LD*, *DD* és *LL* csoportnál figyelhetőek meg. A PACAP és a cAMP szintje emelkedett pinealectomiát követően, mely arra utal, hogy a tobozmirigynek (ill. a melatoninnak) jelentős szabályozó szerepe lehet a PACAP-neuronrendszer napi működésében. A PACAP cirkadián ritmusának kialakításában a corpus pineale (ill. a melatonin) moduláló szerepet játszik ugyan, de nem ez az elsődleges szabályozója. Erre utal az is, hogy a sötét periódusban jóval magasabb értékeket találtunk. A PACAP szintje szignifikánsan magasabb volt a világos periódusban dekapitált pinealectomizált állatokban a diencephalonban és az agytörzsben, mint az álműtött kontroll állatokban. A sötét periódusban az emelkedés nagyobb mértékűnek bizonyult, elsősorban az agytörzsben. A PACAP-szint napi változása az agytörzsben és a diencephalonban különbséget mutatott fiatal és idősebb csirkékben.

A PACAP-szintek változásának vizsgálata külső beavatkozások hatására: pinealectomia és éhezés

Kísérleteinkben sikerült kimutatnunk, hogy pinealectomia után a PACAP- és cAMP-szintek emelkedtek az agytörzsben és a diencephalonban. Az adatokból arra következtetünk, hogy a corpus pinealnak egyfajta gátló hatása lehet a PACAP által szabályozott hatásokra. Ugyanez a gátló hatás elmondható a VIP-ről is, mely a legszorosabb szerkezeti rokonságban van a PACAP-pal. Az adatok szerint a corpus pineale felelős a diencephalon PACAP-szintjének szabályozásáért, és indirekt módon azokért a szabályozó mechanizmusokért, melyek eredménye az éjszakai cAMP emelkedése a diencephalonban pinealectomia után. Azonban valószínűsíthető, hogy a corpus pineale nem az elsődleges szabályozó faktor az agytörzsi PACAP-szintek napi ritmikus változásában. A pinealectomia befolyásolja bizonyos hormonok napi ritmusát, míg más hormok szintjét nem érinti. Ezen korábbi tanulmányok szerint csirkében a corpus pineale az elsődleges pacemaker a hormonok és neuropeptidok napi ritmikus változásainak. A jelenlegi adatok arra mutatnak rá, hogy csak bizonyos élettani modalitásokért felelős a corpus pineale és a melatonin. Az éhezéssel kapcsolatos tanulmányok eredményei szerint a vizsgált agyterületeken a PACAP- és VIP-szintek alakulása azt mutatja, hogy a PACAP-szintek emelkedtek a táplálékmegevonás utáni 24. órától. Ugyanakkor a VIP-szintek megoszlása összetett mintázatot mutattak: patkányok esetén a hypothalamusban, telencephalonban emelkedtek, és az agytörzsben csökkentek. Csirkékben szignifikánsan csökkentek a VIP-szintek minden agyterületen 36 órával a éhezés kezdete után.

In ovo kezelés hatása a motoros és szociális viselkedésre

Egyszeri PACAP6-38 adása az embrionális élet első felében átmeneti változásokat okozott az általános és a motoros viselkedésben, összehasonlítva a kontroll állatok viselkedésével. A viselkedésbeli változások többsége a kikelés utáni 14. napon megszűnt. Az embrionális élet második felében adott kezelés nem okozott változásokat a viselkedési mintázatokban. Az embrionális 8. napon (E8) kezelt állatok különböző agyterületein végzett vizsgálatokban a PACAP-szintek csökkentek, de nem volt különbség a PACAP-szinteknél a kontroll és PACAP6-38 kezelt állatok között. Az állatok általános viselkedésének napi vizsgálata kimutatta, hogy a PACAP6-38 kezelt állatok sokkal aktívabbak voltak minden vizsgált viselkedésformában a saját familiáris kertecükben. Szignifikáns különbség volt a futásban, csipkedésben és tollászkodásban. Az aktivitásbeli különbség a második hétre eltűnt, és a két hetes állatok kevésbé voltak szorongóbbak, amit jól mutat az, hogy kevesebb időt töltöttek a fal közelében az open-field dobozban, valamint többször tettek kísérletet a menekülésre. A locomotoros viselkedésváltozások átmeneti jellege az érzékeny embrionális periódusban adott egyszeri injekciónak köszönhető. A PACAP6-38 hatása sokkal feltűnőbb volt a szociális viselkedésre, mint a motoros viselkedésre. Az embrionális fejlődés első felében kezelt csirkék lassabban közelítették meg a célzónát és szignifikánsan kevesebb időt töltöttek társaik közelében. Ez a fajta viselkedés a 14. napon volt legjobban látható, ellentétben más viselkedésmintázatokkal, amik erre az időre már eltűntek. A kezelt csirkék később érték el a goalzone-t, mint a kontroll állatok, ami azért érdekes, mert ezek a kezelt állatok jobban teljesítettek (többet mozogtak) az open-field tesztekben. Eredményeink kimutatták, hogy a PACAP-tartalom szignifikánsan csökkent a fejlődés alatt minden vizsgált agyterületen. Ezek az adatok aláhúzzák a PACAP jelentőségét a viselkedési mintázatok fejlődésében. A PACAP6-38 kezelés nincs hatással a PACAP-tartalomra, nem volt szignifikáns különbség egyik időpontban sem. Egyszeri PACAP6-38 injekció az érzékeny periódus alatt csekély, jelentéktelen viselkedésbeli változásokat okozott.

PACAP szerepe a szaglási memória kialakulásában

Az in ovo eperaromával kezelt állatok a kikelés után nem válogattak az ízes és ízetlen vízből, ellentétben a kontroll állatokkal. Azok az állatok, melyeket in ovo eperaromával valamint PACAP6-38-cal is kezeltünk, a tiszta vizet preferálták, hasonlóan a kontroll állatokhoz. Az eredmények szerint a PACAP-nak szerepe van a szaglási memória kialakulásában. Az PACAP előző hatásaihoz hasonlóan a PACAP ezen mechanizmusa sem teljesen ismert, viszont nagyon jól ismert a PACAP és receptorainak előfordulása és megoszlása. Knockout egerekben, ahol hiányzik a PACAP vagy a PAC1 receptor, a tanulási mechanizmusok illetve az ezzel kapcsolatos tanulási faktorok működése hiányosak voltak. A VIP, hasonlóan a PACAP-hoz, kimutatható a memória folyamatokért felelős struktúrákban. Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a PACAP-nak hatása van az idegrendszer fejlődésében, és az embrionális memória kialakulásában.

7. Az értekezéshez felhasznált közlemények

1. **Hollósy T.**, Józsa R., Jakab B., Németh J., Lengvári I., Reglődi D.: Effects of in ovo treatment with PACAP antagonist on general activity, motor and social behavior of chickens. Regul. Pept. 2004; 123:99-106. (IF: 2,531)
2. 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)
3. Józsa R., Somogyvári-Vigh A., Reglődi D., **Hollósy T.**, Arimura A.: Distribution and daily variations of PACAP in the chicken brain. Peptides 2001; 22:1371-1377. (IF: 2,137)
4. Józsa R., **Hollósy T.**, Tamás A., Tóth G., Lengvári I., Reglődi D.: PACAP plays a role in olfactory memory formation in chicken. Peptides 2005; 26:2344-2350. (IF: 2,231)
5. Józsa R., **Hollósy T.**, Németh J., Tamás A., Lubics A., Jakab B., Olah A., Arimura A., Reglődi D.: Presence of PACAP and VIP in embryonic chicken brain. Ann. NY. Acad. Sci. 2006; 1070: 348-353. (IF: 1,9)
6. 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 brain of rat and chicken. Ann. NY. Acad. Sci. 2006; 1070:354-358. (IF: 1,93)
7. 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)
8. Somogyvári-Vigh A., Józsa R., Reglődi D., **Hollósy T.**, Meggyesi R., Lengvári I., Arimura A.: Influence of pinealectomy on levels of PACAP and cAMP in the chicken brain. Regul. Peptides 2002; 109:9-13. (IF: 3,205)
9. Németh J., Jakab B., Józsa R., **Hollósy T.**, Tamás A., Lubics A., Lengvári I., Kiss P., Oberitter Zs., Horváth B., Szilvássy Z., Reglődi D.: PACAP-27 radioimmunoassay: Description and application of a novel method. J. Radioanal. Nucl. Chem., 2007; 273:327-332. (IF: 0,499)
10. Csernus V., Józsa R., Reglődi D., **Hollósy T.**, Somogyvári-Vigh A., Arimura A.: The effect of PACAP on rhythmic melatonin release of avian pineals. Gen. Comp. Endocrinol. 2004; 135:62-69. (IF: 1,751)

Összesített impakt faktor: 20,757.