A PACAP-szerű fehérjék hatása az *Eisenia fetida* agyregenerációjára

XXXI. OTDK Biológia Szekció

PÁLYAMUNKA

készítette: STEIB ANITA
biológus MSc, II. évfolyam

témavezető: Dr. MOLNÁR LÁSZLÓ
PTE TTK Biológiai Intézet
Általános Állattani Tanszék

PÉCS, 2012.

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés **3**

A modellállat központi idegrendszerének anatómiája 3

A GABAerg rendszer újraszerveződése agyirtást követően 4

A PACAP felfedezése, típusai 7

A PACAP receptorai 8

A PACAP regenerációra gyakorolt hatása 8

Célkitűzések **10**

Anyagok és módszerek **11**

Kísérleti állatok 11

Agyirtás 11

PACAP antagonista, illetve Ringer oldat injektálása 11

A szövetminták rögzítése és beágyazása 12

Fénymikroszkópos preparátumok készítése 12

Totálpreparátumon végzett immunhisztokémia: GABA 12

Lemezes immunhisztokémia: GABA és PAC1 receptor 13

Western blot analízis: Caspase-3 és PAC1 receptor 13

Radioimmunoassay (RIA) 14

Eredmények **15**

Sebgyógyulás, sebzáródás a kísérleti állatoknál 15

Az agyregeneráció folyamata 16

A PACAP antagonisták hatása a regeneráció folyamatára 21

Az eredmények megbeszélése **27**

Összefoglalás **30**

Irodalomjegyzék **31**

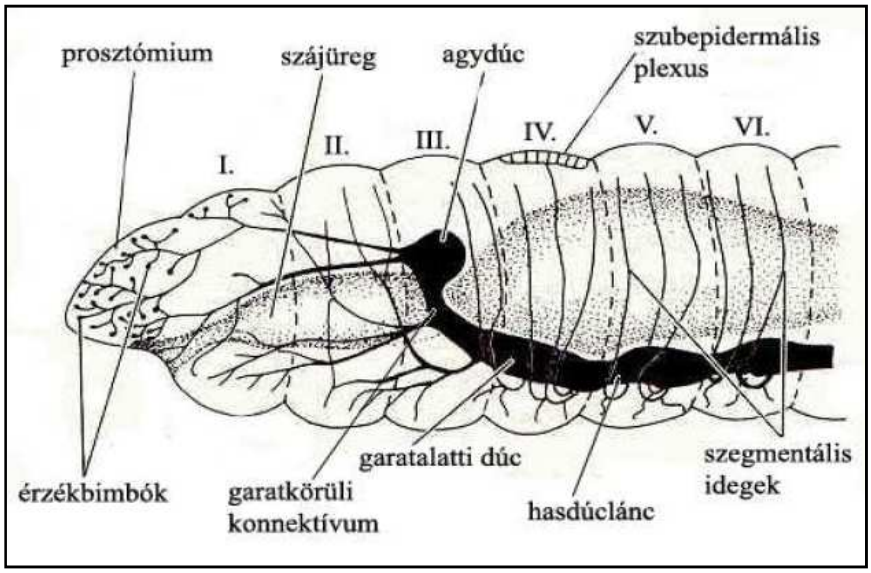
Köszönetnyilvánítás **34**

BEVEZETÉS

A modellállat központi idegrendszerének anatómiája

Modellállatunk, az *Eisenia fetida* a gyűrűsférgek törzsébe, a nyeregképzők osztályába és a kevéssertéjűek alosztályába tartozik. Az Oligochaeták idegrendszere centrális és perifériás részre tagolódik, amelyek közül jelen diplomamunkában a központi idegrendszerre, azon belül is az agydúc makroszkópos és mikroszkópos anatómiájára koncentrálunk.

A centrális idegrendszert a garatideggyűrű és a hasdúclánc (ventral nerve cord, VNC) alkotja. (Zboray, 1998.)



1. ábra: Az Oligochaeták központi idegrendszerének anatómiája az állat feji végében. A római számok a testszelvényeket jelölik. (Zboray, 1998.)

A garatideggyűrű részei a 3. szelvénybe tolódott, dorsalisan elhelyezkedő agydúc (ggl. cerebrale), a garatkörüli konnectivum és a 4. szelvény ventralis oldalán található garatalatti dúc (ggl. suboesophageale), ami három szelvény összeolvadt dúcpárjából áll. Belőle indul ki a hasdúclánc. (Hess, 1925.)

A hasdúclánc a szelvényenként ventrálisan elhelyezkedő egy-egy ganglionpárból áll. A dúcpárokat harántirányban komisszurák kötik össze, míg a szelvények közti hosszirányú kapcsolatot konnectivumok biztosítják. A hasdúclánc teljes hosszában végigfutó óriásrostrendszer jellemzője az igen gyors ingerületvezetés, ami a rostok különösen nagy

átmérőjére vezethető vissza. (Hess, 1925.) Ez a gyors ingerületvezetés az alapja a giliszták gyors menekülési és visszahúzódási reflexeinek. A dúcokból szelvényenként három pár szegmentális idegtörzs lép ki, amelyek mind afferens, mind efferens rostokat tartalmaznak, és főleg a testfalba futnak, de a belső szervekhez is adnak ágakat, és az epidermis alatt az egész testre kiterjedő ideghálózatot képeznek. (Zboray, 1998.)

Az agydúc a garat fölött elhelyezkedő, a többinél valamivel nagyobb, páros ganglion, mely a gerinctelen ganglionok tipikus képét mutatja. A dúcok perifériás részén helyezkednek el az idegsejtek perikaryionjai, míg a neuronok nyúlványai és a befutó rostok alkotják a centrálisan elhelyezkedő neuropilt, ami egy axonokban, denritekben és a köztük kapcsolatot teremtő szinapszisokban gazdag rostállomány. (Zboray, 1998.) Az agydúcból a garatkörüli konnectivumokon kívül prostomialis idegek is kilépnek, melyek az állat első szelvényéhez kapcsolódó, érzékbimbókban gazdag fejlebeny (prostomium) beidegzését végzik. (Langdon, 1895.)

A GABAerg rendszer újraszerveződése agyirtást követően

Egyes gerinctelenek jellemzője a kiemelkedő regenerációs képesség, mely nem csak az aszexuális szaporodást, hanem az egyes szervek regenerálását is jelenti. Általánosan elfogadott tény, hogy a regenerációs képesség az evolúciós fejlettség előrehaladtával csökken. (Barr, 1964., Hibbard, 1963.)

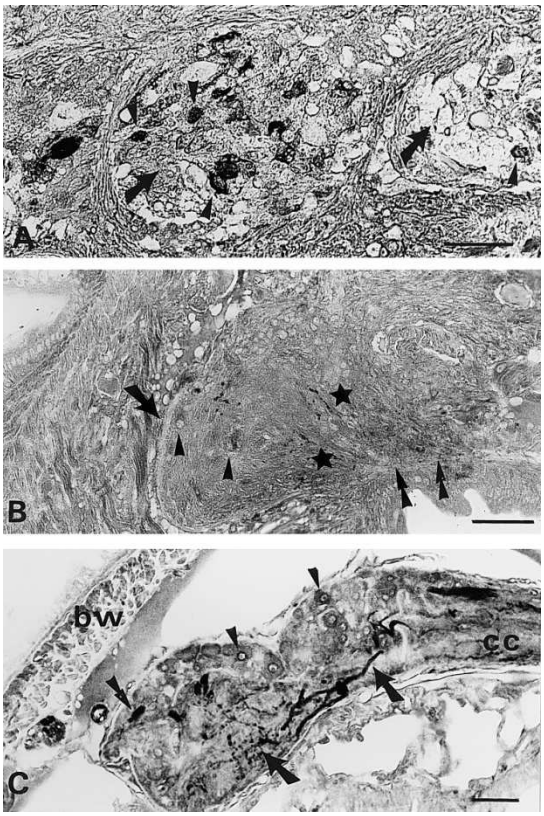
Az alacsonyabb rendű gerinctelenekben az idegrendszeri elemek regenerációja nem csak az axonok regenerálását foglalja magában (Hulsebosch és Bittner, 1981., Lyckman és Bittner, 1992.), hanem az idegsejtek perikaryonjainak regenerálódását is (Csoknya et al., 1993., Lyckman és Bittner, 1992.), azonban az axonregeneráció folyamata sokkal gyorsabb, mint az új sejttestek regenerálása. (Csoknya et al., 2002.) Az új neuronok eredetének tisztázása alapvető kérdés, amelyre több válasz lehetséges. Az új neuronok kialakulhatnak őssejtektől, a peritoneumban, annak környezetében és az intakt ganglionokban található neuroblastoktól vagy a differenciált neuronok dedifferenciálódást követő osztódásából. (Lyckman et al., 1992.) A neuroblastok feltehetőleg az agyirtás után proliferálnak, és a preganglionhoz migrálnak, míg az osztódó neuronokat a garat enterikus plexusában figyelték meg. (Csoknya et al., 2002.)

A regeneráció folyamatát befolyásolják külső (pl. hőmérséklet) (Needham, 1952.), illetve belső tényezők (pl. az állat fejlődési stádiuma, a neuronok típusa) (Baguna et al.,

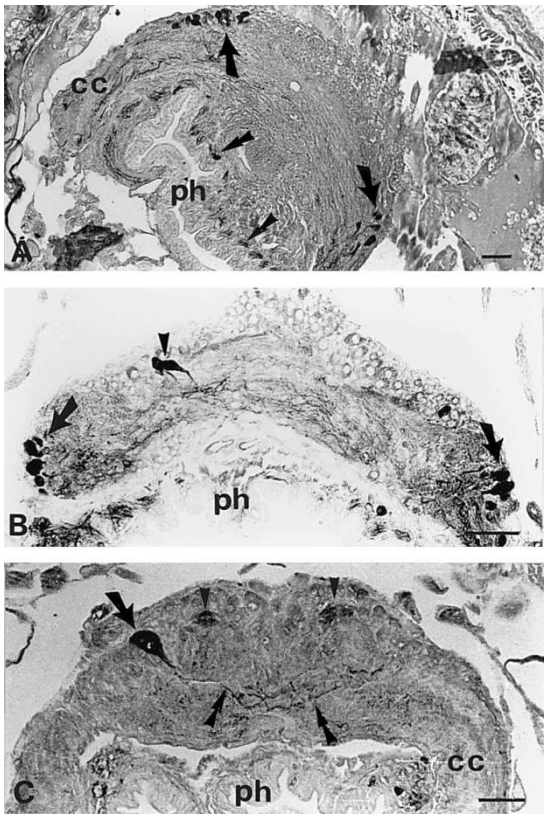
1990.) A neuroszekréciós sejtek aktivitása nő a regeneráció közben, mivel számos neuropeptid és neurohormon szabályozó szerepet játszanik a KIR újraszervezésében (Lender, 1974.), aktiválják a neuroblastokat (Baguna et al., 1990.), és stimulálják vagy gátolják a sejtosztódást. (Csoknya et al., 2003.)

A GABA (gamma-aminobutyric acid, gamma amino vajsav) az egyike az emlősök embrionális fejlődése során megjelenő első neuroaktív anyagoknak, és bizonyítottan befolyásolja a neuroblastok osztódását, azonban szerepe nem bizonyított a gerinctelenek központi idegrendszerének regenerációja során. GABA immunreaktív (továbbiakban: GABA-IR) neuronok megtalálhatóak a *Lumbricus terrestris* egész központi idegrendszerében, de az agydúcban számuk sokkal alacsonyabb, mint a hasdúláncban. (Csoknya et al., 2002.)

Az agyirtást követően a regeneráció folyamata a következő: kezdetben az operáció helyén megjelenik a testfal két rétege, az epidermis és az izomrétegek. A műtétet követő 2. napon kialakul a hegszövet az agy helyén, amivel egy időben GABAerg elemek jelennek meg benne. A 3. napon a hegszövet két szimmetrikus részre tagolódik, és GABA-IR rostok növekednek felé. Ezek a rostok a garatalatti dúcból erednek. A 3. naptól GABA-IR sejtek detektálhatók a peritoneum belső és külső membránjain, és a garat dorsalis izomrétegében, melyek között sok – valószínűleg osztódó – kétmagvú neuron van. Lehetséges, hogy ezek az idegsejtek a preganglion tokkal nem takart ventralis oldalán lépnek be. Az agyirtást követően GABA-IR elemek detektálhatóak a szomszédos szegmensek intakt dúcaiban is. A műtétet követő 2.-3. napon GABA-IR sejtek láthatóak a garatkörüli konnectivumokban, ahol számuk fokozatosan nő. A neuronok a konnectivumok átvágásának határánál akkumulálódnak, és a jelölt rostokkal együtt lépnek be a regenerálódó preganglionba. (2/A ábra.) A műtétet követő 25-27. napon az agydúcot már kötőszövetes tok veszi körül (2/B ábra), ami a regeneráció befejezéséig (80 nap) ventralis oldalon nyitott marad. A kapszula megjelenése után új GABA-IR neuronok lépnek be a garatkörüli konnectivumokon keresztül vagy a pharyngealis plexusból. Az 56. napon (3/B ábra) 40 dorsomedialis és 16 dorsolateralis GABA-IR sejt már a végső pozíciójában van, és a 24 sejtes lateralis GABA-IR neuroncsoport formálódása is megkezdődik. A 80. napon a GABA-IR neuronok elhelyezkedése nagyjából megegyezik az intakt agyban megfigyelhetővel: 20 GABA-IR neuron a dorsomedialis, 9 a dorsolateralis, 13 a lateralis, 12 a ventrolateralis részeken, és 19 sejt a circumpharyngealis konnectivumok eredésénél. Az intakt agyban megfigyelhető egy posterolateralis idegsejtcsoport is, de a regeneráció ezen szakaszában ez nem elkülöníthető a garatkörüli konnectivumok eredésénél található sejtcsoporttól. (Csoknya et al., 2002.)



2. ábra: A GABA-IR rendszer regenerációja agyirtást követően. **A:** Agyirtást követő 3. nap, GABA-IR neuronok (nyílhegy) a már két részre tagolódott hegszövetben (nyíl). bw: testfal. Aránymérték: 70 µm. **B:** 25-27. posztoperatív nap: kapszula formálódása dorsalisan és lateralisan a preganglion körül (nyíl). Csillag: GABA-IR rostok. Aránymérték: 70 µm. (Csoknya et al., 2002.) **C:** 56. posztoperatív nap: dorsomedialis (nyílhegy) és dorsolateralis (dupla nyílhegy) GABA-IR sejtcsoportok. Nyíl: GABA-IR rostok, bw: testfal, cc: garatkörüli konnectivum. Aránymérték: 70 µm (Csoknya et al., 2002.)



3. ábra: A: 56. posztoperatív nap: megkezdődik a lateralis GABA-IR neuronok (nyíl) újraszerveződése. Dupla nyílhegy: pharingealis plexus, cc: garatkörüli konnectivum, ph: pharynx. Aránymérték: 70 µm **B:** 56. posztoperatív nap. Nyíl: lateralis GABA-IR neuronok, nyílhegy: dorsolateralis GABA-IR neuronok, ph: phaynx. Aránymérték: 70 µm **C:** 80. posztoperatív nap: a regeneráció vége. Néhány dorsomedialis (nyílhegy) és dorsolateralis (nyíl) GABA-IR neuron a végső pozíciójában. Dupla nyílhegy: GABA-IR rostok a centrális komisszurában, cc: garatkörüli konnectivum, ph: pharynx. Aránymérték: 70 µm (Csoknya et al., 2002.)

A regeneráció során a GABA-IR rostok száma folyamatosan növekszik, ezek a rostok részben a komisszurákban találhatóak, melyek közül először a ventralis, majd a dorsalis és centralis komisszurák jelennek meg. (Csoknya et al., 2002.)

Az agy regenerálódása a 80. napon tekinthető befejezettnek, amikor a GABA-IR neuronok és a GABA-IR rostrendszer elhelyezkedése nagyjából megegyezik az intakt állatokban tapasztalhatóval. (Csoknya et al., 2002.)

A PACAP felfedezése, típusai

A PACAP-ot (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, pituitary adenilate cyclase activating polypeptide) bárány hipotalamusz extraktumból izolálták Miyata és munkatársai (1989) egy új hipotalamikus faktor vizsgálata közben. A peptid elnevezését a hipofízis elülső lebenyének sejtjeiben mutatott cAMP-szint megnövelő képességéről kapta (Mertens et al., 2007.)

A Miyata és mtsai által felfedezett peptid a PACAP-38 volt, ez a fehérje 38 aminosavból álló változata. Később találtak egy 27 és egy 44 aminosavat tartalmazó izoformát is, amelyet mindössze egy fajban mutattak ki, ezért ezzel részletesen nem foglalkozom a későbbiekben. A PACAP-27 egy csonka forma, amely ugyanabból a prekurzorból származik, mint a PACAP-38, a preproPACAP-ból. (Mertens et al., 2007.) A PACAP-27 a PACAP-38 poszt-transzlációs hasításának és a Gly^{28}-Lys^{29}-Arg^{30} amidálásának eredménye. (Miyata et al., 1990.) Emlős szövetekben a PACAP38 a domináns forma, míg a PACAP-27 az összes PACAP mennyiség kevesebb, mint 10%-a. Előgerinchúrosokkal (Prochordata, Urochordata, Tunicata) végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy a PACAP-27 a peptid egy sokkal ősibb formája lehet, mivel esetükben ez az izoforma bizonyult dominánsnak. De lehetséges, hogy a PACAP mindkét formájának jelentős funkciója van a gerinctelenekben, mert a PACAP38-hoz hasonló neuropeptid mediálta posztszinaptikus traszmissziót is kimutatták. (Somogyvári-Vigh et al., 2000.)

A szekvencia analízisek kimutatták, hogy az emlősök (Mammalia) PACAP-27 és -38-ai 100%-os szekvenciabeli hasonlóságot mutatnak. A humán PACAP-38-cal összehasonlítva a madár, hüllő és kétéltű PACAP-38 1 aminosavban, a halaké pedig 1-4 aminosavban tér el. (Somogyvári-Vigh et al., 2000.) A valódi csontoshalak és emlősök PACAP-38-a legalább 2, főleg a C-terminálison lokalizált aminosavban különbözik. (Cardoso et al., 2007.) Még az előgerinchúrosok PACAP-ja is jellegzetes, 96%-os hasonlóságot mutat a humán PACAP27-tel. (Somogyvári-Vigh et al., 2000.) A filogenetikailag távol eső organizmusok PACAP-jának figyelemreméltó

szekvenciabeli hasonlósága mutatja a PACAP erősen konzervált mivoltát, ami életbevágó fontosságára utal. (Somogyvári-Vigh et al., 2000.)

A PACAP receptorai

A PACAP három heptahelikális G-protein kapcsolt receptoron keresztül fejti ki hatását (Hirose et al., 2005.): a VIP-t és PACAP-ot hasonló affinitással megkötő VPAC1-en és VPAC2-n, és a PACAP-ot sokkal nagyobb affinitással megkötő PAC1-en keresztül. (Zhou et al., 2002.)

A PAC1 és VPAC receptorok jellegzetes struktúrával rendelkeznek, aminek jellemzője a 7 transzmembrán (TM) domén, nagy N-terminális szegmens, amihez a ligand kötődik, és az intracelluláris C-terminális régió, ami G-proteinnel áll kölcsönhatásban. (Laburthe et al., 2002) A TM domének között 3 intracelluláris és 3 extracelluláris hurok van, amiknek feltehetőleg a receptor aktiválásban és funkcióban van szerepük. A receptorok N-terminális régiója extracelluláris, és jellemzője hat konzervált cisztein és N-glikolizációs területek megléte. Mindkettőnek alapvető jelentősége van a receptor konformáció és ligand kölcsönhatás szempontjából. (Holtmann et al., 1995) Ligandkötés közben a receptorok G-protein komplexeken keresztül mediálják az intracelluláris szignálútvonalaikat. Ezek a komplexek a receptor 3. intracelluláris hurkához (intracellular loop 3 - IL3) és a C-terminális doménhez kötnek, és elindítják a szignál transzdukciós mechanizmust, ami inozitol-foszfát (IP) forgalommal vagy kalcium mobilizációval, és ciklikus AMP (cAMP) produkcióval jár. (Vaudry et al., 2000.) A PAC1 és VPAC receptorok feltehetőleg kölcsönhatásba lépnek járulékos proteinekkel, melyeknek szerepe van a receptor-ligand aktivációban. Például a VPAC1 receptorok kölcsönhatnak a receptor-aktivitás-módosító proteinekkel (RAMP), amelyek képesek heterodimert alkotni a GPCR-ekkel, megváltoztatva a ligand-kötő tulajdonságot, azonban a funkcionális következmény még tisztázásra vár. (Cardoso et al., 2007.)

A PACAP regenerációra gyakorolt hatása

A PACAP számos funkcióját kimutatták és elismerték a gerinces taxonban. Fontos szerepet játszik a sejtek differenciálódásában és növekedésében, illetve a gerinces idegrendszeri fejlődésben, mint neurotrófikus faktor. Neuroprotektív funkciója is bizonyított:

az exogén PACAP injektálása védelmet biztosított az in vitro toxicitás és in vivo agyi pathológiás modellekben. Védi a kisagyi granuláris neuronokat az apoptózist indukáló ágensek ellen, csökkenti az ischemiás stroke által okozott károsodásokat patkányban és egérben, és javítja a traumás idegrendszeri sérülések gyógyulási rátáját. A PACAP knockout állatokon végzett kísérletek további bizonyítékokat szolgáltattak a PACAP regenerációban betöltött szerepére. A PACAP-KO egerek nagyobb károsodást szenvednek az ischemiás stroke során, illetve abnormális idegi regenerációt és megnövekedett idegrendszeri gyulladásos reakciót mutatnak. (Várhalmi et al., 2008.)

A PACAP bizonyítottan gyorsítja a perifériás idegrendszer sérüléseinek gyógyulását. A nervus facialis anatómiai elhelyezkedése miatt gyakran szenved sérülést. A PACAP n. facialis sérüléseinek regenerálására gyakorolt hatását *Musculus orbicularis oris* tengerimalacon vizsgálták. A n. facialis buccalis ágának 2mm-es szakaszát eltávolították, majd exogén PACAP-pal kezelték. Az exogén PACAP hatására a kezelt állatok összetett izom akciós potenciálja (compound muscle action potential, CMAP) harmad akkora latenciával jelent meg, mint a kezeletlen kontroll egyedeké. Kimutatták, hogy a PACAP megemeli a glia sejtvonal eredetű (GDNF) és egyéb neurotrofinok koncentrációját a regenerálódó szövetekben, illetve hogy a PACAP hatására az axonok myelinizációja nagyobb rátát mutat. (Kimura et al., 2004.)

Az Oligochaeta *Eisenia fetidában* mRNS szekvenálással egyelőre még nem azonosított PACAP-szerű protein feltételezhetően szintén hatással van a regenerációra. Az *E. fetida* caudalis regenerációja során a coelomocytákban található PACAP-szerű vegyület rostrocaudalis koncentrációgrádiesét mutatták ki. A coelomocyták szállítják és talán szintetizálják is a PACAP-szerű proteint, ami feltehetőleg nem csak a regeneráció mediátoraként funkcionálhat, hanem befolyásolhatja egyes coelomocyták aktivitását, mint a fagocitotikus aktivitás, és erős gyulladás ellenes peptidként is működhet. Nagyszámú PACAP-ot expresszáló neoblastot detektáltak a regenerálódó szegmensekben, ami arra utal, hogy a PACAP-szerű vegyületnek szerepe lehet a neoblastok sejtciklusának és differenciálódásának szabályozásában. (Várhalmi et al., 2008.)

CÉLKITŰZÉSEK

A PACAP több lehetséges funkcióját leírták a felfedezése óta, és a névadó hipofízis adenilát-cikláz aktiváló képesség csak egyike a sok bizonyított és feltételezett funkciónak: főleg hipofiziotróp hormonként, neurotranszmitterként és neuromodulátorként működik. Az irodalmi adatok szerint gerincesekben szerepe van számos központi idegrendszeri funkcióban, beleértve a hipofiziotróp funkciót, tanulást és emlékképek képzését, pszichomotoros funkciót, és idegsérülésre adott reakciót, valamint sok bizonyíték utal az embrionális idegrendszeri fejlődésben betöltött szerepére is. (Hirose et al., 2005.)

Minthogy a gerinctelenek PACAP-jának lehetséges funkcióit még homály fedi, a jövőben végzett e peptidre irányuló kísérletek új és fontos információkat szolgáltathatnak a biológia, a farmakológia és az orvostudomány számára.

Kísérleteink során a gerinctelen PACAP-ról alkotott kép tisztábbá tételét tűztük ki célul. Gerincesekben megállapították, hogy a PACAP serkentő hatással van a szinaptogenezisre és axonregenerációra. (Cardoso et al., 2007.) Feltételezzük, hogy a PACAP-szerű fehérjék hatással vannak az Oligochaeták idegrendszeri regenerációjára is.

Vizsgálataink középpontjába az agyirtott egyedek hegszövetében fellelhető PACAP és PAC1 receptor jelenlétének igazolását, koncentrációjának meghatározását, és a receptort expresszáló sejtek azonosítását helyeztük, illetve azt a kérdést jártuk körül, hogy a különböző PACAP antagonisták adagolásával befolyásolgató-e a regeneráció folyamata.

Habár az *E. fetidaban* detektálható PACAP-szerű immunreaktivitást mutató peptid természetére csak az mRNS-szekvenálás biztosíthatna megdönthetetlen bizonyítékot, eredményeink hasznos információkat biztosíthatnak a peptid funkciójára vonatkozóan.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

Kísérleteink során ivarárett *E. fetida* (Savigny, 1826., Annelida, Oligochaeta) egyedeket használtunk fel. Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között (hőmérséklet 20 ± 1°C, napi 12 órás megvilágítás, folyamatos légcsere, a tenyésztalaj összetétele: 50% hansági tőzeg és 50% lótrágya, nedvességtartalma ~60%) tartott törzstenyészetből válogattuk ki, majd az agyirtás elvégzéséig nedves papírvattán tartottuk őket.

Agyirtás

Az agyirtást szén-dioxid oldattal és hűtéssel történő altatás után végeztük. A 2. és 5. szelvény között bemetszést végeztünk a bőrizomtömlőn, és az agydúcot a prosztómiális idegek és a garatkörüli konnektívumok átvágásával eltávolítottuk, vigyázva a garat sértetlenségére. A bőrizomtömlő átvágásánál ügyeltünk arra, hogy a bemetszés pontosan medialisan történjen, az állat háti pórusainak átvágásával. Ezzel megakadályoztuk, hogy a későbbi injektálások során az állatok a háti pórusaikon keresztül megszabaduljanak a PACAP antagonistától. Az egyedeket ez után nedves papírvattával fedett kerti földbe helyeztük, és a törzstenyészettel megegyező standard körülmények között tartottuk. A műtétet követő napon a túlélő egyedeket átválogattuk.

PACAP antagonista, illetve Ringer oldat injektálása

A PACAP antagonistákat giliszta Ringer oldatban oldottuk fel a kísérletnek megfelelő koncentrációra (1, 10, 50, 100 pmol/2 µl) és térfogatra (egyedenként 2 ill. 4 µl), majd Hamilton pipettára légmentesen rögzített elektródával juttattuk az agyirtott egyedek 3. szelvényébe. Az elektróda beszúrása sztereó mikroszkópos kontroll mellett az 1. és 2. szelvény határánál történt, majd a tűt hátravezettük a 3. szelvényig, ügyelve, hogy az injektálás ne a garat belsejébe történjék. Injektálás három kombinációban történt: az agyirtást követő 24. órában, 24. és 48. órában, vagy a 24., 48., 72. és 96. órában. Kontroll csoportként azonos módon, de giliszta Ringer oldattal injektált egyedeket használtunk. Az injektálást követő napon a túlélő egyedeket átválogattuk.

A szövetminták rögzítése és beágyazása

Fixálás az agyirtást követő 1., 2., 7., 21., és 35. napon történt. Az agyirtásnál leírt módon bódított egyedek első 5 szelvényét eltávolítottuk és a további feldolgozásnak megfelelő fixálóval rögzítettük. A PAC1 immunfluorescens jelölésre és haematoxilin-eozin festésre szánt mintákat 4%-os PFA-ban egy éjszakán át fixáltuk, GABA immunhisztokémiára pedig 3 órás Boer-oldatos (3 ml cc. pikrinsav, 1 ml glutáraldehid, 40 µl cc. ecetsav) fixálást alkalmaztunk, melyet 1 órás alkoholos és minimum 1 napos foszfát pufferes (PBS, 0,1 M, pH 7,4) mosás követett. Felszálló alkoholsorban történő víztelenítés után intermédium alkalmazásával paraffinba ágyaztuk a mintákat.

Fénymikroszkópos preparátumok készítése

A fénymikroszkópos általános szövettani vizsgálatra szánt blokkokból 10 µm-es sorozatmetszeteket készítettük Microm HM 315 típusú kerekesmikrotómmal, melyeket adhéziós anyaggal bevont, zselatinos tárgylemezre vittünk fel. A preparátumokat haematoxilin-eozin festéssel kontrasztosítottuk, majd DePeX-es fedéssel állandósítottuk. A vizsgálatokat és a dokumentálást NIKON Opiphot-2 típusú fénymikroszkóppal végeztük.

Totálpreparátumon végzett immunhisztokémia: GABA

Az agyregenerátumon való tájékozódásra és az antagonisták hatásának vizsgálatára a GABA immunhisztokémiát választottuk, mivel a GABA-IR neuronok jól definiált anatómiai viszonyítási pontok, melyek az embrionális fejlődés már korai szakaszában megjelennek, alacsony sejtszámmal rendelkeznek, és mintázatuk ismert. A kiboncolt idegrendszeri struktúrák sejtmembránjait a fixálást és mosást követően 2 hétig 3%-os PBS-ben oldott Triton-X100-zal permeabilizáltuk, majd endogén peroxidáz gátló (500 µl metanol, 30 µl H_2O_2, 470 µl desztillált víz) kezelés, mosás és TritonX-100-as ABS-ben történő előinkubálás után alkalmaztuk a primer antitestet (1:3000 higítás 3%-os TritonX-100-ABS oldatban), melyben 3 napig inkubáltuk. 1 napos 3%-os PBS-ben oldott Triton-X100-as mosás után a szekunder antitestet egy napig, 1:100 higításban (3%-os TritonX-100-ABS oldatban) alkalmaztuk, amit 1 napos PBS-es mosás követett. A tercier antitestet 1:100-as higításban, PBS-ben oldva, szintén 1 napig használtuk, majd PBS-es mosást követően a hívást 0,01%-os

H_2O_2 hozzáadásával 0,05%-os diamino-bezidinnel (DAB) végeztük. A DAB-ot PBS-sel kimostuk, és a háttér csökkentésére glicerines derítést alkalmaztunk.

Lemezes immunhisztokémia: GABA és PAC1 receptor

Deparaffinálást követően PBS-ben oldott, 0.1% koncentrációjú Triton X-100-at alkalmaztunk a membránok permeabilizálására. GABA immunhisztokémia esetén endogén peroxidáz gátlót (500 µl metanol, 30 µl H_2O_2, 470 µl desztillált víz) használtunk, majd előkezelés után borjú szérum albumin oldatában (ABS) előinkubáltunk. A nyúlban termeltetett anti-GABA primer antitestet 1:5000, a biotinilált szekunder antitestet és a tormaperoxidázhoz konjugált avidin-biotin komplexet 1:100 higításban alkalmaztuk. A hívást sztereó mikroszkóp alatt, 0,01%-os H_2O_2 hozzáadásával készített 0,05%-os diamino-bezidin (DAB) oldatában végeztük, és a lemezeket DePeX-es fedéssel állandósítottuk. A PAC1 immunfluorescens jelölést endogén peroxidáz gátlás nélkül, normál kecskeszérumos előinkubálással, a primer antitest 1:100 és a szekunder antitest 1:1000 koncentrációjának alkamazásával végeztük, és glicerinnel fedtünk.

Western blot analízis: Caspase-3 és PAC1 receptor

A Caspase-3 expresszió vizsgálatára agyirtott és PACAP6-27 antagonistával négyszer injektált egyedeket és kontrollként agyirtott, de nem injektált egyedeket használtunk. Az állatok 3. szelvényét eltávolítottuk, ezeket dorsalis és ventralis felekre vágtuk, melyeket szárazjégen külön lefagyasztottunk, és az analízis elvégzéséig -70 ºC-on tároltunk. A PAC1 receptor vizsgálatára 2 hetes regenerált állatok regenerációs blasztémáját, testfalát és 3. szelvényét használtuk, kontrollnak hasdúcláncot alkalmaztunk, melyeket szintén -70 ºC-on tároltunk. A mintákból szövethomogenizátumot készítettünk, melyhez RIPA puffert, foszfatáz inhibitort (Na-vanadát, Na-fluorid), általános proteázgátlót (aprotonin, leupeptin) és PMSF-et használtunk. A homogenizátumot centrifugáltuk (30 perc, 13.000 rpm), és Bioinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma) segítségével meghatároztuk a felülúszók fehérjekoncentációját, majd ezeket DTT, LDS és lízis puffer hozzáadásával azonos koncentrációra állítottuk be. Az oldatokat 70 ºC-on főztük, lehűtés után grádiens poliakrilamid gélen 160 mA áramerősség alkalmazásával futtattuk, majd nitrocellulózra blottoltuk. A blokkolást 5% szárított tejporral és 1% TBST-ben feloldott BSA-val végeztük. A kétszeresére higított blokkoló oldatban α-

tubulin és Caspase 3, illetve PAC1 primer, majd tormaperoxidázhoz konjugált szekunder antitestek hozzáadásával inkubáltunk. Az előhívást kemiluminescens kit segítségével végeztük.

Radioimmunoassay (RIA):

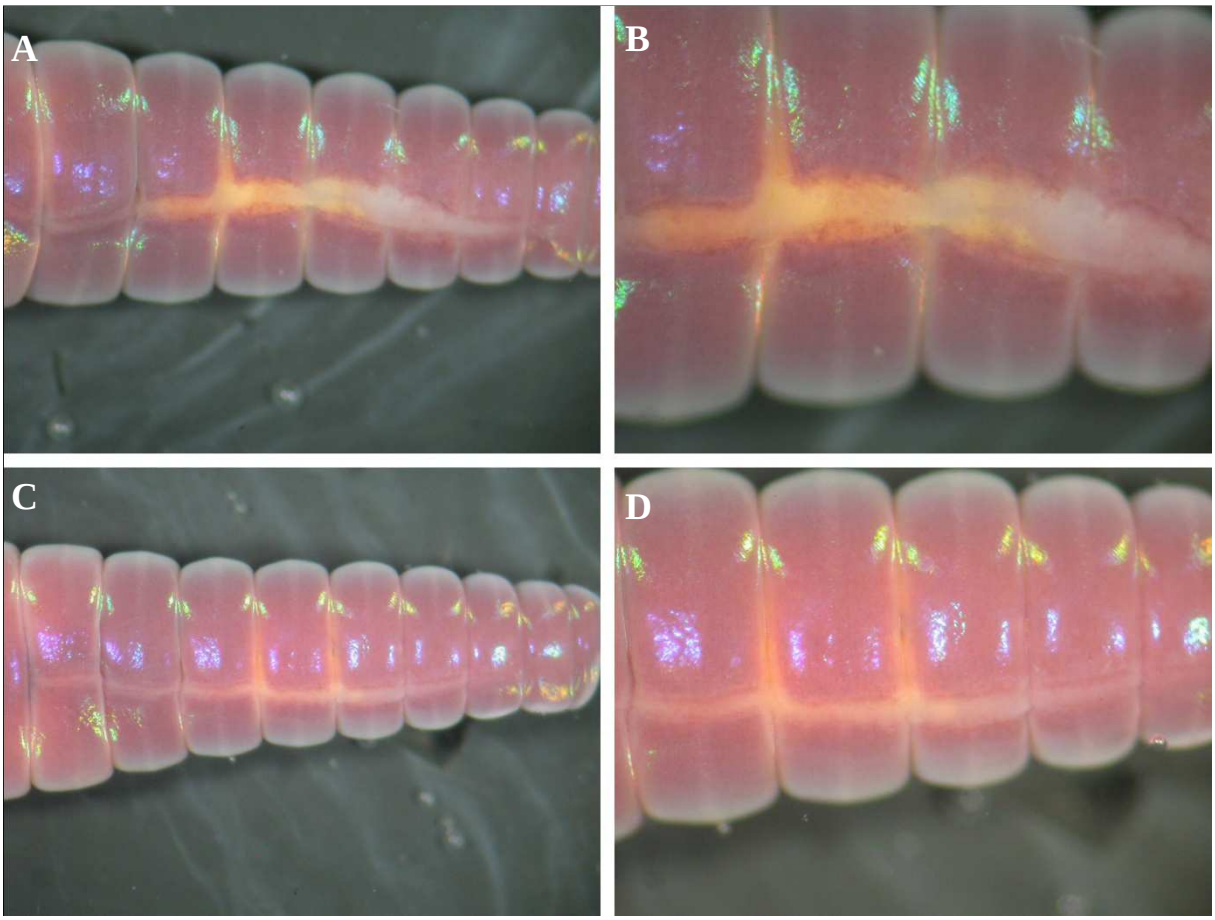
A radioimmunoassay vizsgálatra előkészített állatok garatkörüli konnectívumait kauterizáltuk az agyirtás során. A RIA vizsgálatra a 7. posztoperatív napon eltávolított idegrendszeri struktúrákat alkalmaztuk: a regenerációs blasztémát, a garatkörüli konnectívumokat, a garatalatti dúcot és a hasdúcláncot. Kontrollként intakt állatok és a garatkörüli konnectívumok kauterizálása nélkül agyirtott egyedek azonos struktúráit alkalmaztunk, illetve vizsgáltuk az intakt egyedek egyéb, nem idegrendszeri szöveteit is: a prostomiumot, az 1. szegmenst és a vért. Az előkészített mintákat radioimmunoassay-foszfát-pufferben (RIPA) -20°C-on tároltuk, majd a vizsgálat megkezdésekor homogenizáltuk.

A vizsgálatot korábbi leírás alapján végeztük el (Jakab és mtsai 2004). Röviden: az antitestet 88111-3" – antiszérum Cys23 – PACAP24-38 konjugátum ellen termeltették patkányban és szarvasmarha thyreoglobulinhoz kapcsolták carbodiimide-del. Birka PACAP24-38 - at a C-teminálisnál jódoztuk (125I, Inst. of Isotopes, Hungary) és a keveréket ellentétes fázisú HPLC-oszlopon választottuk szét. Birka PACAP38 –at és PACAP27-t (Sigma) használtunk standardként 0 és 1000 fmol/ml között. A mintákat 1 ml fosztát pufferben készítettük elő (0,05 mol/l. pH: 7,4), amely 0,1 M NaCl-ot, 0,05% NaN_3 és 0,25% szarvasmarha szérumalbumint tartalmazott (Sigma Co., Budapest). 100 µl antiszérumot (alkalmazott hígítás: 1:100000), 100 µl RIA nyomjelzőt (5000 cpm/cső) és 100 µl standard vagy ismeretlen mintát helyeztünk a puffert tartalmazó polipropilén csövekbe. 48-72 órás 4 ^{o}C-os inkubáció után 100 µl szeparáló oldat hozzáadásának hatására az antitestet kötött peptidek szeparálódtak a szabad peptidektől a (10 g szén, 1 g dextrán, 0,2 g zsírszegény tejpor 100 ml desztillált vízben oldva). Centrifugálás után (3000 rpm, 4 ^{o}C, 20 min) a tubusokat óvatosan kiürítettük és a minták radioaktivitását gamma-számlálóban vizsgáltuk. Az ismeretlen minták PACAP-38 koncentrációját kalibrációs görbével határoztuk meg. Az eredményeket fmol/mg PACAP-szerű koncentrációban adtuk meg. A PACAP tartalmak közötti különbséget ANOVA tesztet követő Neuman-Keul's posthoc analízissel vizsgáltuk.

EREDMÉNYEK

Sebgyógyulás, sebzáródás a kísérleti állatoknál

Az agydúc eltávolítása után a sértett szelvények izom-összehúzódását figyeltük meg, ami biztosítja a vérzéscsillapítást, majd hamarosan bekövetkezik a véralvadás, majd a gyulladás folyamata. A műtétet követő 12. órában már végbemegy a hámosodás. Ilyenkor az áttetsző testfalon keresztül sárga pigmentáltságú coeloma sejtes inváziót figyelhetünk meg. (4/A, B ábra) Az 1. posztoperatív napra a seb teljesen bezárul (4/C, D ábra) , kialakul a testfal hegszövete, ami szoros kapcsolatban van az agydúc regenerációs blasztémájával.



4. ábra: A hámosodás folyamata. **A, B:** 12. posztoperatív óra, végbement a hámosodás, az áttetsző epidermisen keresztül jól láthatók a sárga pigmentáltságú coeloma sejtek. **C, D:** 24. posztoperatív óra, a hegszövet képződése befejeződött, a seb lezárult. A szelvényhatároknál és a hegszövetnél továbbra is felfedezhető a coeloma sejtes invázió.

Az agyregeneráció folyamata

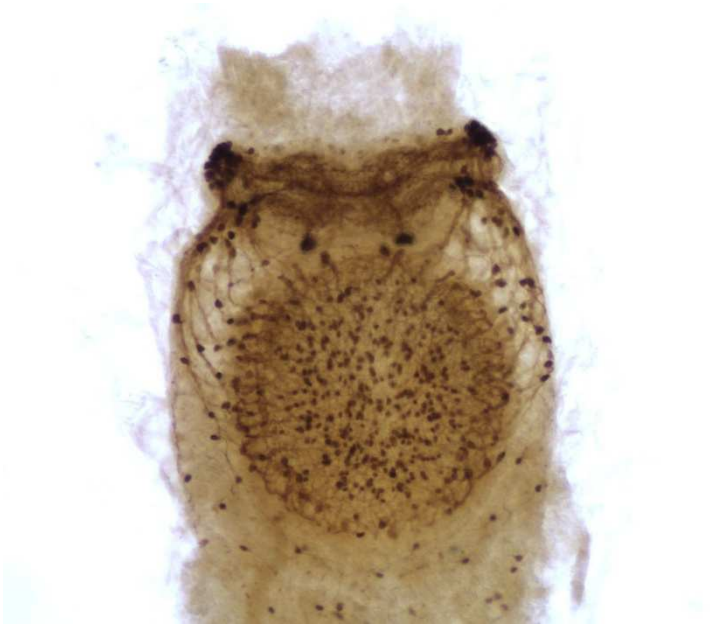
Az agydúc regenerálódása az általunk biztosított standard körülmények mellett viszonylag gyors folyamat. A 48. órában az agydúc helyén megfigyelhető a sarjszövet, amiben megjelennek a GABAerg elemek. (6/A ábra) Nagy számban detektálhatók nagy sejtmaggal rendelkező, totipotens tulajdonságú őssejtek, ún. neoblastok is, melyek intenzíven osztódnak, majd differenciálódnak, ezzel elősegítve a sérült hám-, izom- és idegszövetek regenerálását. (6/D ábra) Lehetséges, hogy az újonnan létrehozott agydúc neuronjai ezekből a neoblastoktól származtathatók.

Az agyirtást követő napokban a regenerációs blasztéma több szelvényre kiterjed, és hozzánő a sértetlen struktúrákhoz. A 7. posztoperatív napra a sarjszövet tovább differenciálódik, nő a GABAerg elemek száma, és nagymértékű érburjánzás figyelhető meg, ami a terület gazdag anyagcseréjére és anyagszállítására utal. (6/C ábra) Ebben a regenerációs stádiumban osztódó és apoptotikus sejtalakok detektálhatók a regenerációs blasztémában. (.ábra) Megkezdődik a sarjszövet két részre tagolódása, ami a 3. hétre teljesen kifejezett lesz, a preganglion morfológiailag egyező képet mutat egy intakt agydúccal, de mérete nem felel még meg a teljesen regenerált állapotnak.

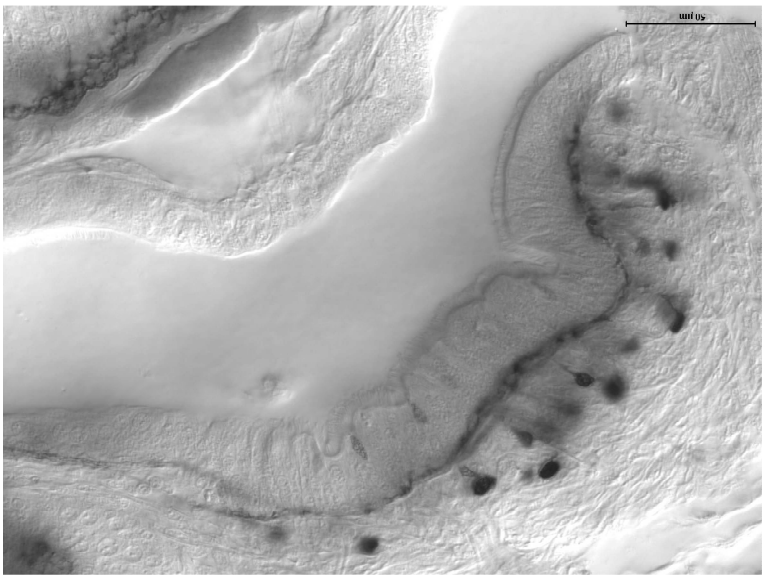
A 21. posztoperatív napon már kialakul a neuropil, amiben gazdag GABAerg rostrendszert figyelhetünk meg, illetve a legtöbb GABA-IR neuron is elfoglalja végső helyét.

Az agydúc regenerálása a 35. posztoperatív napon befejezettnek tekinthető, ekkora teljesen kialakul a neuropil, a GABAerg rostrendszer kifejezettebb, és a GABA-IR neuronok az agyirtás előtti helyüknek megfelelően helyezkednek el, tehát az 5 hetes agyregenerátum morfológiája megegyezik egy intakt agydúcéval. (6/E, F ábra)

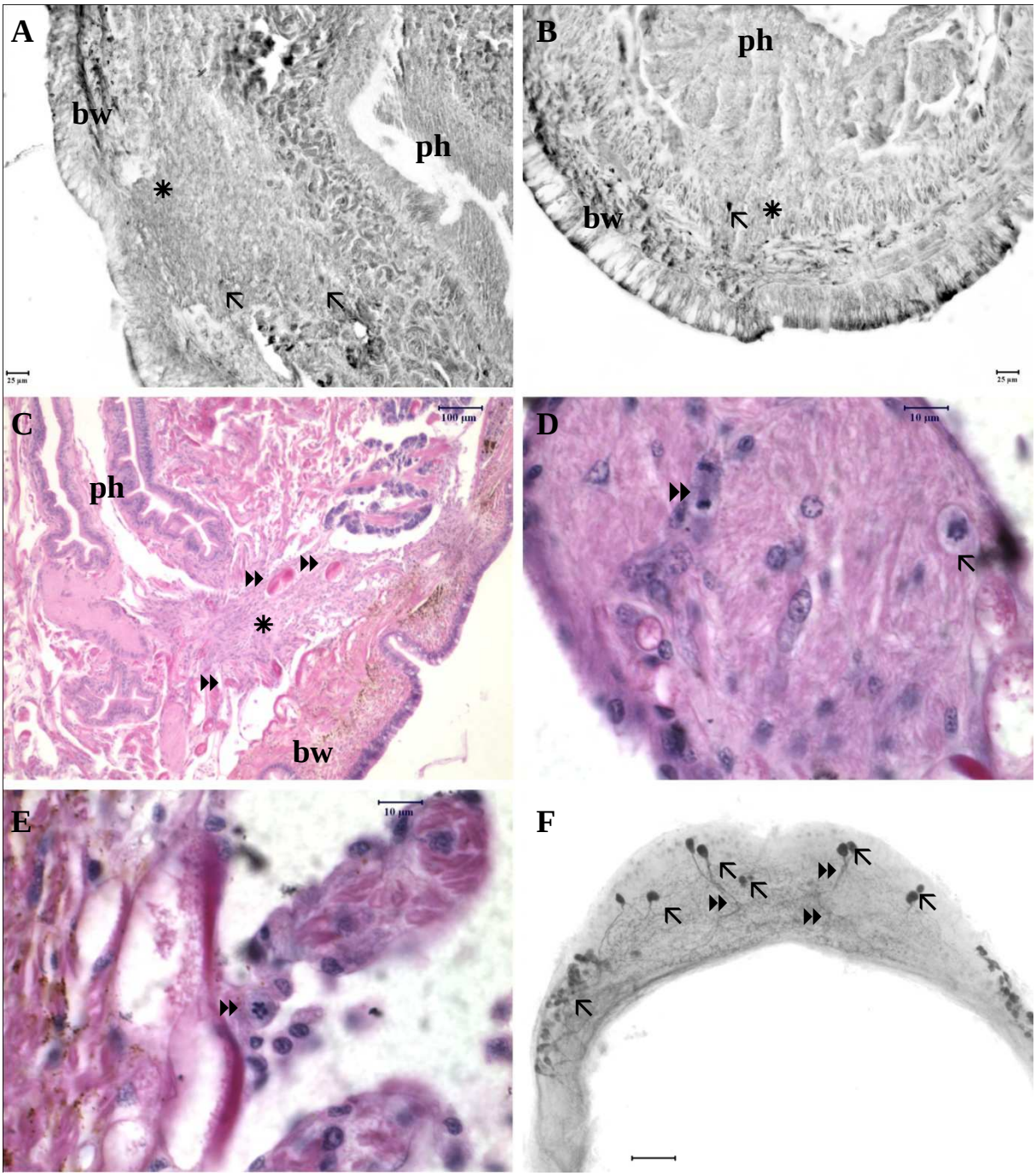
Meg kell jegyeznünk, hogy Csoknya és mtsai (2002) eredményeivel ellentétben GABA-IR neuronokat találtunk mind a regenerálódó, mind az intakt egyedek garatkörüli konnectivumaiban, és a garat GABA-IR neuronjai detektálhatók az intakt egyedekben is. (5. ábra)



x. ábra: Totálpreparátum immunhisztokémia, intakt embrió. Megfigyelhetők a garatkörüli konnectivumok GABA-IR sejtjei, és a garat nagyszámú GABA-IR neuronja. Aránymérték: 100 µm.



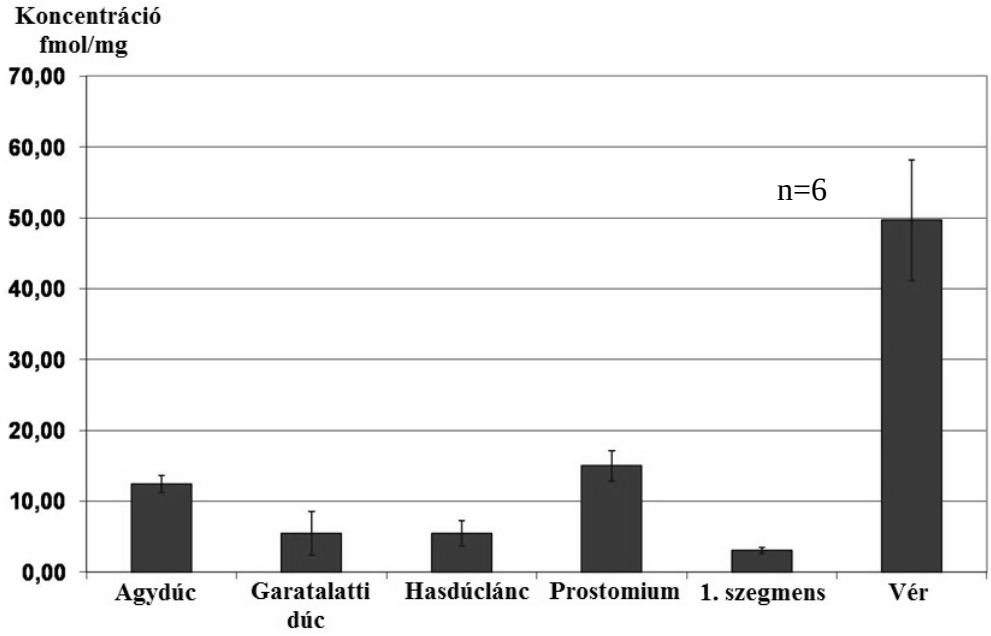
x. ábra: GABA immunhisztokémia, GABA–IR neuronok egy intakt egyed dorsalis garatizomzatában. Aránymérték: 50 µm.



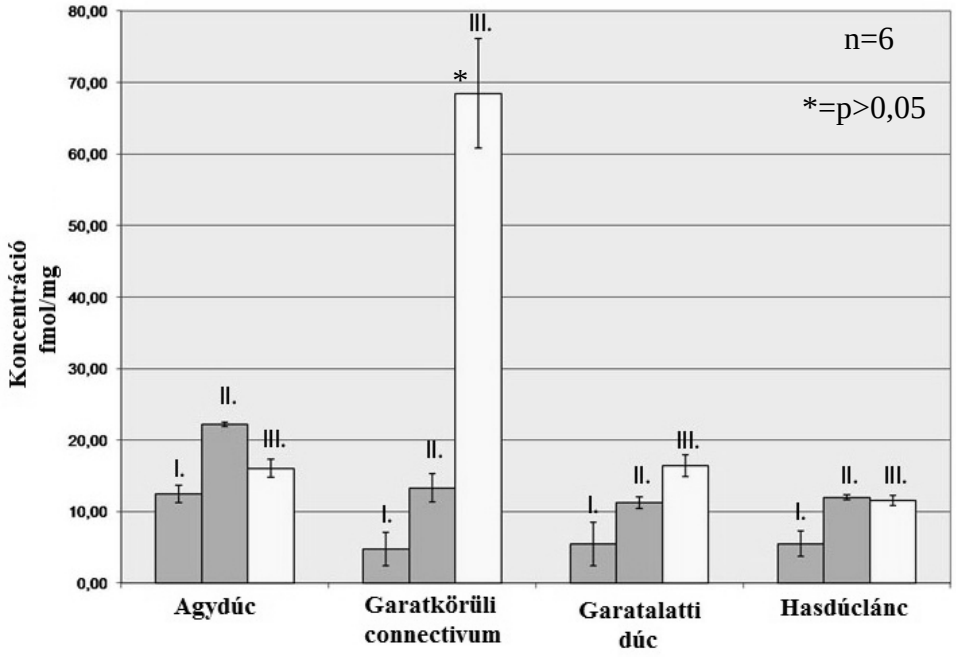
6. ábra: Kezeletlen agyirtott egyedek regenerációs blasztémája és agydúca. **A:** GABA immunhisztokémia, 48. posztoperatív óra. bw: testfal, ph: garat, csillag: regenerációs blasztéma, nyíl: GABA-IR neuron. Aránymérték: 25 µm. **B:** GABA immunhisztokémia, 7. posztoperatív nap. bw: testfal, ph: garat, csillag: regenerációs blasztéma, nyíl: GABA-IR neuron. Aránymérték: 25 µm. **C:** Hematoxilin-eozin festés, 7. posztoperatív nap. bw: testfal, ph: garat, csillag: regenerációs blasztéma, kettős nyílhegy: vérér. Aránymérték: 100 µm. **D:** Hematoxilin-eozin festés, 7. posztoperatív nap, a regenerációs blasztémában osztódó sejtalakok detektálhatók. nyíl: profázis, kettős nyílhegy: telofázis. Aránymérték:

10 µm. **E:** Hematoxilin-eozin festés, 7. posztoperatív nap, a regenerációs blasztémában apoptotikus sejtalakok detektálhatók. kettős nyílhegy: apoptotikus sejt. Aránymérték: 10 µm. **F:** Totálpreparátum GABA immunhisztokémia, 35. posztoperatív nap. Jól detektálhatók a GABA-IR sejtek és a GABA-erg rostrendszer, illetve a garatkörüli konnectivum GABA-IR neuronjai. nyíl: GABA-IR neuron, kettős nyílhegy: GABA-IR rostok. Aránymérték: 100 µm

Radioimmunoassay vizsgálataink eredményei alapján kimutattuk a PACAP vagy egy PACAP-szerű fehérje jelenlétét az *E. fetida* különböző szöveteiben. Az intakt egyedek idegrendszerében a PACAP vagy PACAP-szerű vegyület koncentrációja az agydúcban volt a legmagasabb. (RIA1) Az egyéb nem idegrendszeri szövetek eredményei közül a vérben tapasztalt PACAP-szerű protein koncentráció mutatta a legkiugróbb értéket. Érdemes még kiemelni a prostomiumnál mért koncentrációt, ami meghaladta az intakt agydúcnál tapasztalt eredményeket. (RIA2) A regenerálódó egyedek idegrendszeri struktúrái mind magasabb eredményt mutattak az intakt egyedekhez képest, illetve a garatkörüli konnectivumok kauterizálása után kiugró eltérést tapasztaltunk a KIR PACAP-szerű fehérje koncentrációjában. A kauterizálást követően a garatkörüli konnectivumokban mért PACAP koncentráció hozzávetőlegesen ötszöröse volt a normál regenerációs folyamaton áteső egyedeknél tapasztalhatónál, továbbá magasabb értékeket kaptunk a garatalatti dúcban is. Ezzel szemben az agydúcban mért eredmények alacsonyabbak voltak a kontroll csoporthoz viszonyítva. Mindez arra utal, hogy a KIR által expresszált PACAP-szerű vegyület a garatkörüli konnectivumokon keresztül szállítódik a regenerációs blasztémába.

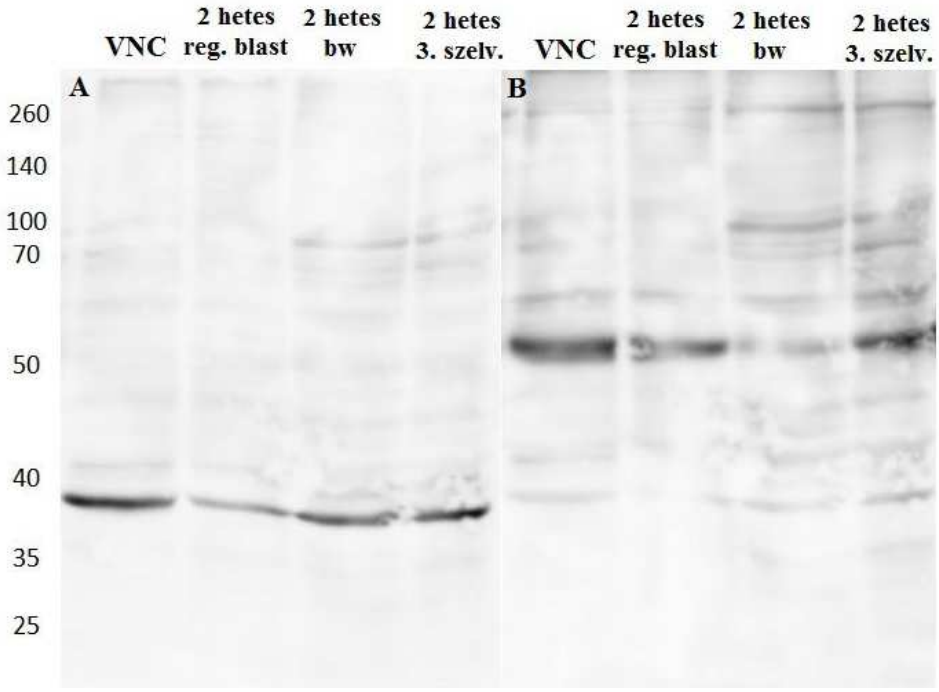


x. ábra: Intakt egyedek különböző szöveteiben mért PACAP-szerű vegyület koncentráció. A nem idegrendszeri szövetek közül kiugró értéket tapasztaltunk a fejlebenyben és a vérben.



x. ábra: Különböző idegrendszeri struktúrák PACAP-szerű fehérje koncentrációja. I.: intakt, II.: agyirtott, III.: agyirtott, garatkörüli konnectivum kauterizált. A PACAP szerű vegyület koncentrációja megnő a regenerálódó egyedek központi idegrendszerében. A garatkörüli konnectivum kauterizálása után rendkívül magas koncentráció tapasztalható a garatkörüli konnectivumokban, azonban a regenerációs blasztéma alacsonyabb értéket mutat a kontroll agyirtott egyedekhez képest.

A PACAP specifikus I. típusú receptorának, a PAC1 receptornak jelenlétét vizsgáltuk az *E. fetida* agyregenerátumokban Western blot analízissel. (7. ábra) Eredményeink azt mutatják, hogy a PAC1 receptornak megfeleltethető 39 kDa tömegű fehérje expresszálódik a 2 hetes regenerációs blasztémában és az egyedek testfalában, ami arra utal, hogy a PACAP szerepet játszhat az *E. fetida* agyregenerációjának már korai szakaszaiban.



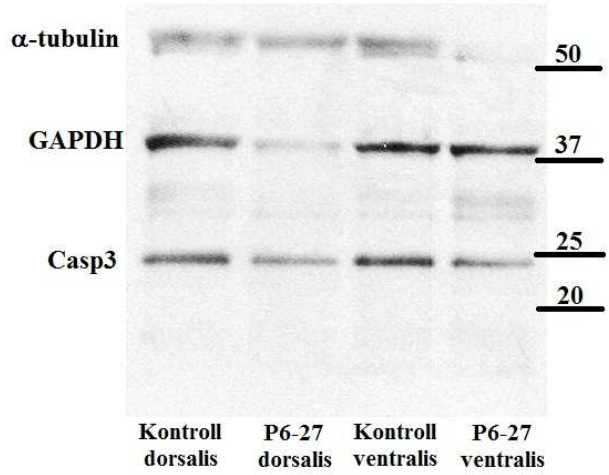
7. ábra: PAC1-R Western blot analízis eredménye. **A:** PAC1 receptor 40 kDA moláris tömeg alatt. **B:** α-tubulin 50 kDa moláris tömeg felett.

A PACAP antagonisták hatása a regeneráció folyamatára

Injektálásos kísérleteinkkel a különböző aminosav hosszúságú PACAP antagonisták hatását vizsgáltuk az *E. fetida* agyregenerációjára. Western blot analízisünk során PACAP6-27 antagonistával injektált (4x50 pmol/2µl) és kontroll agyirtott egyedek Caspase-3 expresszióját vizsgáltuk. Az emlős Caspase-3 15-20 kDa tömegű fehérje, azonban az *E. fetida* Caspase-3 20 kDa feletti moláris tömeggel jelent meg az analízis során. A Caspase-3 apoptotikus markerként ismert, ugyanis szerepe van az apoptózis során bekövetkező kromatin kondenzációban és DNS fragmentációban.

A Western blot analízis során az azonos protein koncentrációra beállított homogenizátumok közül a PACAP6-27 antagonistával injektált egyedek mintái mind a

dorsalis, mind a ventralis oldalon gyengébb jelet adtak Caspase-3-ra, mint a kontroll agyirtott egyedek mintái. (8. ábra) Ez a regeneráció során végbemenő apoptotikus folyamatok gyengülésére, a regeneráció folyamatának lassulására utal.



8. ábra: A Caspase-3 Western blot analízis eredménye. A Caspase-3 20 és 25 kDa moláris tömeg között jelent meg az elválasztás során, és csökkent expresszióját lehet megfigyelni az PACAP6-27 antagonistával kezelt egyedek esetében.

Szövettani vizsgálataink szintén bizonyos antagonisták regenerációt lassító hatását igazolták. Ehhez kontrollként Ringer oldattal injektált egyedeket használtunk, melyeknél megfigyeléseink többnyire megegyeztek a kezeletlen egyedeknél leírt regenerációs folyamattal. (9. ábra) Különbség azonban, hogy a 7. posztoperatív napon fixált állatok testfalában megfigyelhető hegszövet a kontrollal ellentétben ekkor még kapcsolatban volt a regenerációs blasztémával. Ez minden bizonnyal a négyszeri injektálás során történő újbóli sebzésnek tudható be. (9/A, B ábra)

Morfológiai vizsgálataink alapján a PACAP6-38 antagonista befolyásolta legjobban a regeneráció folyamatát. (10, 11. ábra) Az antagonistát négyszer injektáltuk 100 pmol/2 µl koncentrációban. Legszembetűnőbb különbség a kontroll csoporthoz képest az agyregenerátum neuropiljének fejletlensége volt. A 3 hetes agyirtott egyedek neuropilje jellemzően erőteljesen fejlett, azonban a PACAP6-38 antagonistával injektált állatok agyregenerátumainak a neuropilje a 3. héten még nem jelent meg. (10. ábra) A GABAerg rostrendszer szintén fejletlen volt, alig megfigyelhető, csak egy-egy GABA-IR sejt jelölt nyúlványa volt detektálható. A GABA-IR neuronok száma a kontroll csoporthoz képest kevesebb volt, és nyúlványaik ritkán láthatók. Az agyregenerátum mérete szintén kisebb volt

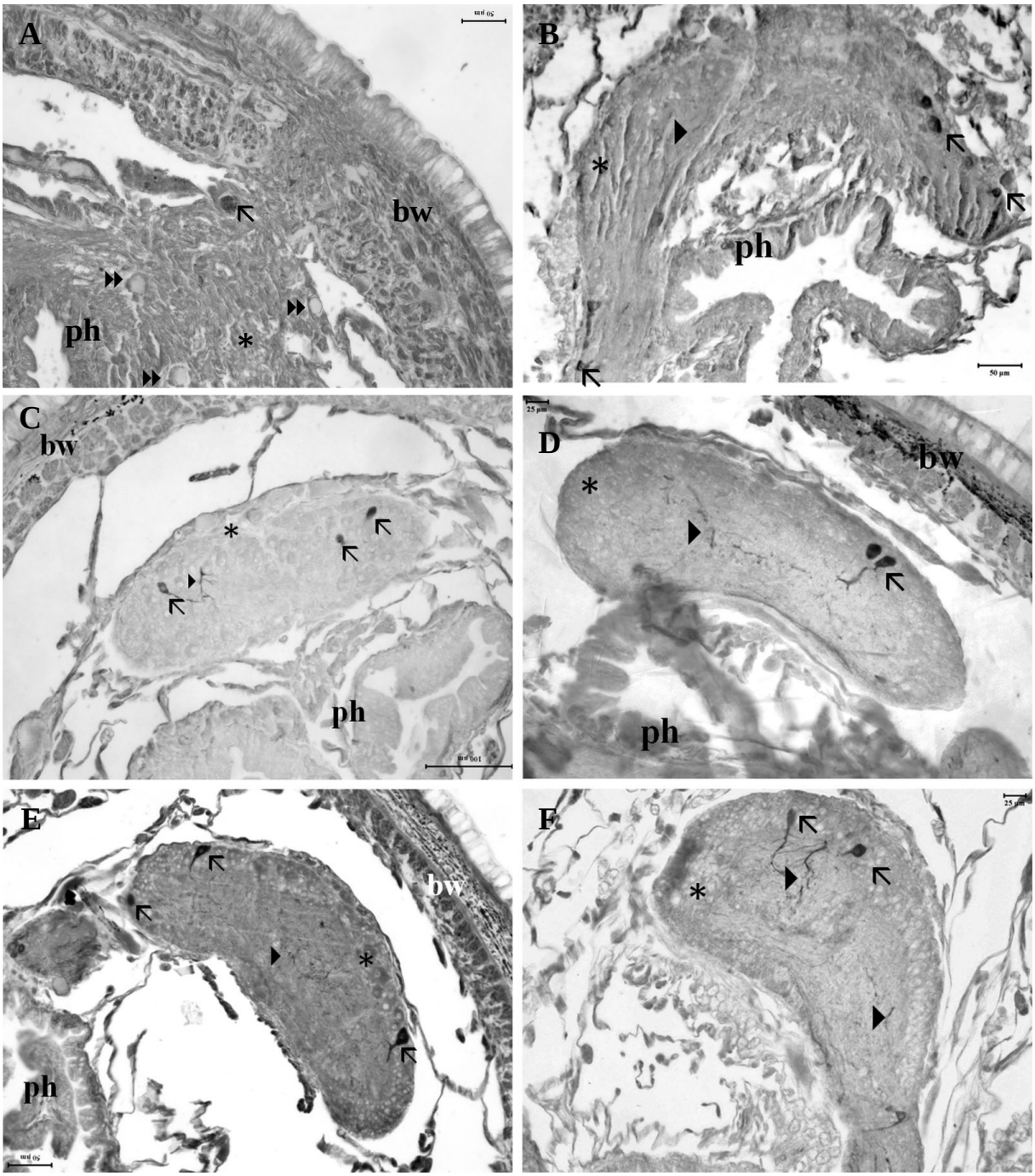
a kontrollhoz viszonyítva, és nem volt figyelhető meg a kontroll csoportra jellemző kifejezett érburjánzás.

A PACAP6-38 antagonistával injektált egyedek lelassult agyregenerációja az 5. héten is megfigyelhető volt. (11. ábra) Neuropiljük fejlettebb volt a 3 hetes állapothoz képest, azonban nem közelítette meg a kontroll csoportok neuropiljének fejlettségét. A GABAerg rostrendszer szintén kifejezettebb volt a 21. posztoperatív naphoz viszonyítva, és a GABA-IR sejtek száma és elhelyezkedése megközelítette az intakt agyban tapasztalható helyzetüket. A preganglion mérete továbbra is kisebb volt a kontroll csoporthoz képest.

A PACAP6-10 antagonista 1pmol/2 µl koncentrációban történő egyszeri injektálása, majd a minták haematoxilin-eozinos kontrasztosítása utáni egyszerű szövettani vizsgálataink során megállapítottuk, hogy ez az antagonista ezzel a koncentrációval és kezelési gyakorisággal nincs hatással az agyregeneráció folyamatára, morfológiai különbséget nem lehetett kimutatni a kontroll csoporthoz képest. Ezek után a koncentrációt megnöveltük 10 illetve 100 pmol/2 µl-re, és az injektálások gyakoriságát és mennyiségét megváltoztattuk 2x4, illetve 4x2µl-re. Minden kezelés azonos eredményt mutatott hisztológiai vizsgálataink után: a PACAP6-10 antagonista nem befolyásolja az agyregeneráció folyamatát.

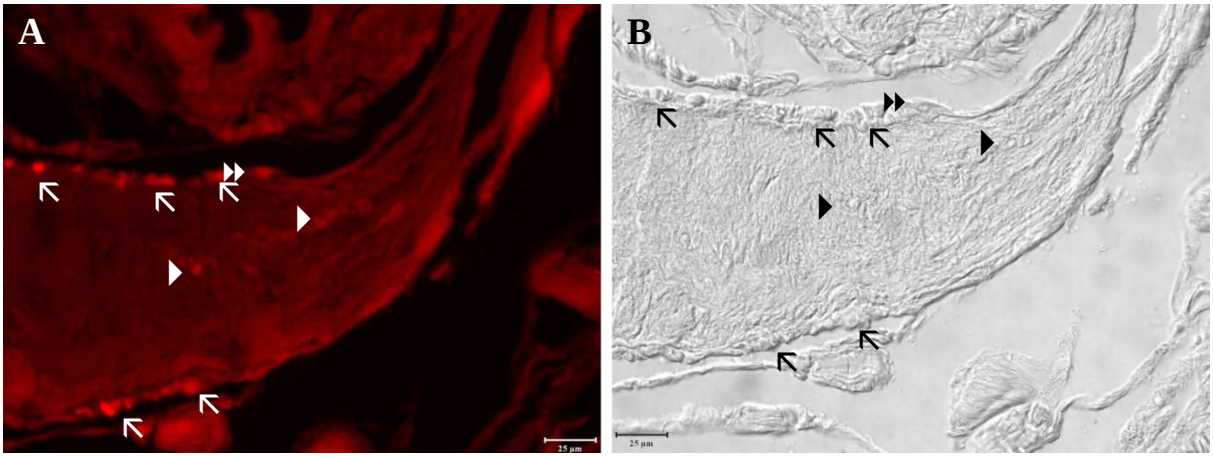
GABA immunhisztokémiai vizsgálataink megerősítették a fenti megállapítást. A vizsgálatra 100 pmol/2 µl koncentrációjú PACAP6-10 antagonistával négyszer injektált egyedeket alkalmaztunk. Az 5 hetes agyregenerátum képe teljesen megegyezett a kontroll csoportnál tapasztalhatóval. A neuropil fejlett volt, a GABAerg rostrendszer kifejezett, a GABA-IR neuronok az intakt állapothoz megfelelő elhelyezkedésben voltak a regenerátumban, és az agyregenerátum mérete sem mutatott eltérést a kontroll csoporthoz képest. (12. ábra)

A negyedik antagonistánk a PACAP6-15 volt, melyet négyszeri injektálással, 100 pmol/2 µl koncentrációban alkamaztunk. Az 1 hetes regenerált mintákat PAC1 receptorra vizsgáltuk immunfluorescens eljárással. A jelölés sikerességét bizonyítja, hogy az intakt idegrendszeri struktúrákban pozitív PAC1 jelölést detektáltunk egyes nyúlványos idegsejteknél. (13, 14. ábra) Ki kell emelnünk, hogy az alkalmazott primer antitest aspecifikusan jelöli a vérerek endothelját, illetve a pigmentek autofluoreszcenciája aspecifikus jelet adott, ezért vizsgálataink és dokumentációnk során ezeket a jelölődéseket figyelmen kívül hagytuk. Mind a kezeletlen, mind a Ringer oldattal és PACAP antagonistával kezelt egyedeknél erős jelölődést mutattak a már a GABA immunhisztokémiánál megfigyelt neoblastok, és detektáltunk nyúlványos neuronokat és jelölt rostokat is. (15, 16. ábra) Ezzel a módszerrel morfológiai különbséget nem tudtunk kimutatni az egyes csoportok között.

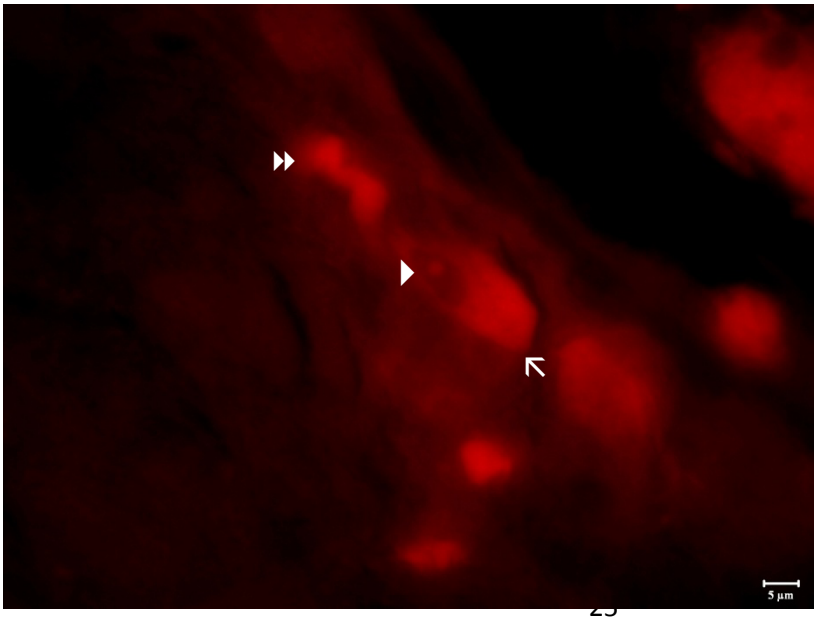


x. ábra: GABA immunhisztokémia. **A:** Ringer oldattal injektált egyed regenerációs blasztémája, 7. posztoperatív nap. ph: garat, bw: testfal, csillag: regenerációs blasztéma, nyíl: GABA-IR neuron, kettős nyílhegy: vérér. Aránymérték: 100 µm. **B:** Ringer oldattal injektált egyed regenerációs blasztémája, 21. posztoperatív nap. ph: garat, csillag: agydúc, nyíl: GABA-IR neuron, nyílhegy: GABA-IR rost. Aránymérték: 50 µm. **C:** PACAP6-38 antagonistával injektált egyed regenerációs blasztémája, 21. posztoperatív nap. ph: garat, bw: testfal, csillag: agydúc, nyíl: GABA-IR neuronok, nyílhegy: GABA-IR nyúlvány. Aránymérték: 100 µm. **D:** Ringer oldattal injektált egyed regenerációs blasztémája, 35.

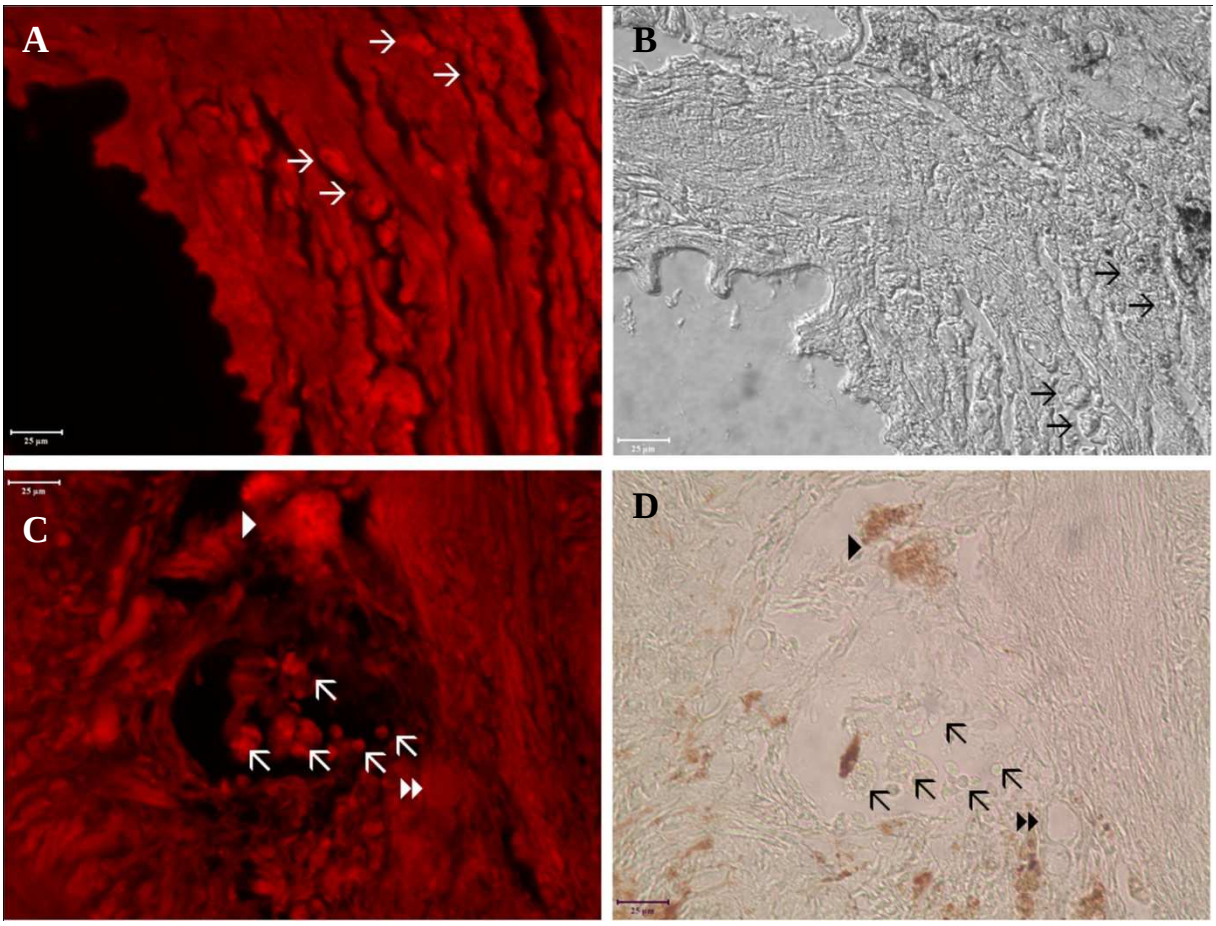
posztoperatív nap. ph: garat, bw: testfal, csillag: agydúc, nyíl: GABA-IR neuron, nyílhegy: GABA-IR rost. Aránymérték: 25 µm. **E:** PACAP6-38 antagonistával injektált egyed regenerációs blasztémája, 35. posztoperatív nap. ph: garat, bw: testfal, csillag: agydúc, nyíl: GABA-IR neuron, nyílhegy: GABA-IR rost. Aránymérték: 50 µm. **F:** PACAP6-10 antagonistával injektált egyed regenerációs blasztémája, 35. posztoperatív nap. csillag: agydúc, nyíl: GABA-IR neuron, nyílhegy: GABA-IR rostok. Aránymérték: 25 µm.



13. ábra: Garatalatti dúc. **A:** PAC1 immunhisztokémia. A kötőszövetes tokban PAC1-IR sejtek (nyíl) detektálhatók. A kettős nyílheggyel jelölt sejt nyúlványos idegsejt. A dúc belsejében idegrendszeri struktúrák pozitív jelölődése látható (nyílhegy). Aránymérték: 25 µm. **B:** Nomarsky-optika. A PAC1 jelölődésű sejtek egyértelműen beazonosíthatók. nyíl: PAC1-IR sejtek, nyílhegy: PAC1-IR idegrendszeri struktúrák, kettős nyílhegy: PAC1-IR neuron.



14. ábra: PAC1-IR neuron. Jól látható a nyúlvány (kettős nyílhegy), a sejtmag (nyílhegy) és a perikaryon (nyíl). Aránymérték: 5 µm



x. ábra: Regenerációs blasztémák, 7. posztoperatív nap. **A: A**gyirtott, Ringer oldattal injektált egyed regenerációs blasztémája, PAC1 immunfluoreszcencia. nyíl: PAC1-IR neoblastok. Aránymérték: 25 µm. **B:** Nomarsky-optika, az A ábrának megfeleltethető terület. nyíl: neoblastok. Aránymérték: 25 µm. **C:** PACAP6-15 antagonistával injektált egyed, PAC1 immunfluoreszcencia. nyíl: PAC1-IR neoblastok, nyílhegy: pigmentanyag, kettős nyílhegy: vérér. Aránymérték: 25 µm. **D:** Nomarsky-optika, a C ábrának megfeleltethető terület. nyíl: neoblastok, nyílhegy: pigmentanyag, kettős nyílhegy: vérér. Aránymérték: 25 µm.

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Az általunk biztosított standard körülmények között az agydúc regenerálása hozzávetőlegesen a 35. posztoperatív napra befejezettnek tekinthető. A bevezetőben tárgyalt, Csoknya és mtsai (2002) által végzett kísérletsorozat eredményei alapján az *E. fetida* agyregenerálásának ideje 80 nap. A két eredmény közti különbséget a műtött állatok számára biztosított körülmények különbözősége adja. Csoknya és mtsai (2002) 60% nedvességtartalmon és 10 °C-on tartották az agyirtott egyedeket az operáció elvégzése után, viszont az általunk használt protokoll mellett a hőmérséklet 20-21 °C volt. Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy a regeneráció sebességét a környezet hőmérséklete nagymértékben befolyásolja. (Needham, 1952.) Az *E. fetida* hőmérsékleti optimuma 20-22 °C, az ezen tartományon kívül eső hőmérsékleti értékek az állatban stresszfolyamatokat indítanak el, amelyeknek kizárása érdekében tartottuk az állatokat 20-21 °C-on.

Az agydúc regenerálásának folyamatában a külső tényezőkön kívül belső kémiai anyagoknak is szerepük van. Feltételezhetően ilyen anyag a PACAP. Radioimmunoassay vizsgálattal kimutattuk agyirtott állatokban a regenerációs blasztéma PACAP koncentrációjának jelentős növekedését, illetve kisebb mértékű növekedést az idegrendszer teljes területén. Nagymértékű növekedést tapasztaltunk a garatkörüli konnectivumok kauterizálása után a konnectivumok csonkjaiban, ami arra utal, hogy a PACAP a garatkörüli konnectivumokon keresztül szállítódik a regenerációs blasztémába. (Molnár et al., 2011.)

Eredményeink alátámasztják a PACAP regenerációra gyakorolt serkentő hatását. Kimutattuk a PACAP specifikus I. típusú receptorának, a PAC1 receptornak expresszióját a regenerációs blasztémában, és a megfelelő PACAP antagonista injektálásával képesek voltunk lelassítani az agydúc regenerálását.

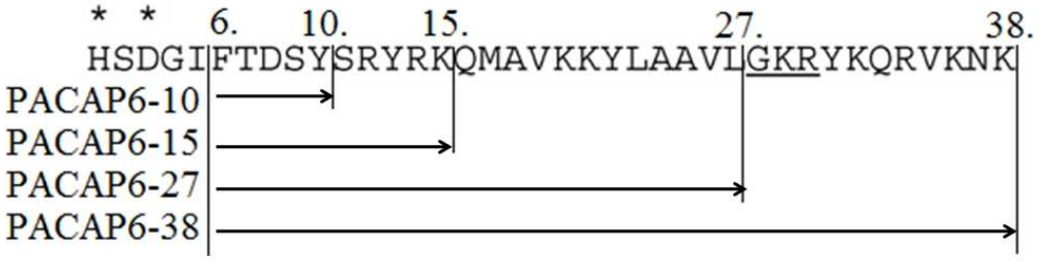
A PACAP6-27 antagonista injektálása az apoptotikus markerként ismert Caspase-3 expressziójának csökkenését okozta, ami az apoptótikus folyamatok intenzitásának csökkenésére utal. A regeneráció folyamatában nagy jelentősége lehet a programozott sejthalálnak, amit igazol az a Mátyás Mónika (2011) által dokumentált eredmény is, miszerint az 5. hetes agyregenerátum tömege meghaladja az intakt agydúc tömegét, majd a regenerátum tömege a 7. héten stabilizálódik az eredeti állapotra. Ezt az elméletet alátámasztották az agyregenerátumban detektált apoptotikus sejtalakok is.

A PACAP6-38 antagonista szintén lassította az agydúc regenerálását. Az antagonista hatására a neuropil fejlődése erősen elmaradt, a GABA-IR neuronok száma kevesebb volt, a

GABAerg rostrendszer megjelenése szintén elmaradt az injektálatlan egyedekhez képest. Korábbi irodalmi adatok szerint a PACAP-nak szerepe van az axonnövekedésben és szinaptogenezisben (Cardoso et al., 2007.), amely megállapítás magyarázhatja a GABAerg rostrendszer fejlődésének lelassulását a PACAP-antagonista hatására. Továbbá fontos kiemelni a kezeletlen egyedeknél tapasztalható érburjánzás hiányát az antagonistával injektált egyedeknél. Radioimmunoassay vizsgálataink során kimutattuk a PACAP rendkívül magas koncentrációját a vérben, ami újabb kapcsolatra mutat rá a PACAP és a regeneráció folyamata között. (Molnár et al., 2011.)

A PACAP6-15 antagonista injektálása után sem a morfológiában, sem a PAC1 receptor eloszlásban nem tudtunk különbséget kimutatni. Pozitív PAC1 receptor jelölődést mutattunk ki a regenerációs blasztéma neoblastjaiban és egyes nyúlványos idegsejtekben. Korábbi adatok alapján az újonnan létrehozott agydúc sejttestjei eredhetnek őssejtektől, a peritoneumban, annak környezetében és az intakt ganglionokban található neuroblastoktól és differenciált neuronok osztódásából. (Lyckman et al., 1992.) A neuroblastok feltehetőleg az agyirtás után proliferálnak, és a preganglionhoz migrálnak. (Csoknya et al., 2002.) Az általunk dokumentált eredmények az előzőekkel összhangban arra utalnak, hogy a PAC1-LI sejteknek feltehetőleg szerepük van az új agydúc struktúráinak létrehozásában.

A legrövidebb PACAP fragmens, a PACAP6-10 nem volt hatással az agyregeneráció sebességére, és a GABAerg rendszer újraszerveződésére. Az antagonisták hatásainak különbözőségét a fragmensek hosszának eltérései okozzák. (19. ábra) Az antagonisták nem tartalmazzák a PACAP N-terinálisának első 5 aminosavát. Irányított mutagenezissel kimutatták, hogy a polipeptid N terminális végének a biológiai aktivitásban van szerepe, pl. az Asp^3 szubsztitúciója Asn-nal csökkenti a peptid AC (adenilát cikláz) stimuláló képességét. Az N-terminális létfontosságú a receptor aktiválásában, de nincs köze a receptor-kötő régió felismerésében, amiben valószínűleg a C-terminális régió aminosavai játszanak szerepet. (Cardoso et al., 2007.)



19. ábra: A humán PACAP és az általunk alkalmazott PACAP antagonisták aminosav szekvenciája. A csillagozott aminosavak funkcionálisan konzerváltak, az aláhúzás a poszttranszkripcionális hasítás és amidálás helyét jelöli. (Cardoso et al., 2007., módosítva)

Mivel az általunk alkalmazott antagonisták aminosav szekvenciája megegyezik a humán PACAP C-terminálisának szekvenciájával, de nem tartalmazzák a biológiai aktivitásban szerepet játszó N-terminálist, ezért a receptor azonos régiójához kapcsolódnak, de nem váltanak ki belső aktivitást, így kompetitív antagonistáknak tekinthetők. Az antagonistákban a C-terminális régió hossza feltehetőleg jelentősen befolyásolja a receptorkötés hatékonyságát, ezért a rövidebb, 5-10 aminosav hosszúságú peptidek nem voltak az endogén PACAP hatékony kompetítorai a receptorkötés terén, így az képes volt kiváltani a biológiai aktivitását.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy PACAP vagy PACAP-szerű fehérjék, és a PACAP specifikus recepora, a PAC1 receptor expresszálódik az agyirtott *Eisenia fetida* egyedek regenerációs blasztémájában, és feltehetőleg szerepük van az agyregeneráció folyamatában. A regenerációs blasztémában nagyszámú PAC1 receptort expresszáló neoblastot detektáltunk, ami alapján feltételezhetjük, hogy az újonnan létrehozott idegi struktúra (agydúc) nagy valószínűséggel az őssejtekből alakul ki.

ÖSSZEFOGLALÁS

A PACAP különböző antagonistáinak hatását vizsgáltuk az *Eisenia fetida* agyregenerációjára az agydúc szimmetrikus kiirtása után, amely alapján következtethetünk a fajban már korábban azonosított PACAP-szerű vegyület (Reglődi et al., 2000.) gerinctelenek idegrendszeri regenerációjában betöltött szerepére. Vizsgálatainkhoz egyszerű szövettani, immunhisztokémiai, radioimmunoassay és Western blot analíziseket alkalmaztunk.

Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a PACAP6-10 antagonista nincs hatással a sem a regeneráció sebességére, sem a GABAerg rendszer újraszerveződésére.

A PACAP6-15 antagonista injektálásával morfológiai különbségeket szintén nem detektáltunk, és a PAC1 receptor eloszlási mintázata sem mutatott különbséget a kontroll csoporthoz képest. PAC1 immunfuorescens jelölődést tapasztaltunk nagyszámú neoblastnál és nyúlványos idegsejtnél. Ezek az eredmények alátámasztják azt a korábbi feltételezést, miszerint az újonnan létrehozott agydúc neuronjai őssejtes eredetűek lehetnek.

A PACAP6-27 antagonista injektálása egyértelműen hatással volt a regeneráció során tapasztalható apoptotikus folyamatokra. Western blot analízissel kimutattuk az apoptotikus markerként elfogadott Caspase-3 csökkent koncentrációját az injektált egyedek harmadik szelvényében, ami a programozott sejthalál és ez alapján a regeneráció kisebb intenzitására utal.

A PACAP6-38 antagonistával injektált agyirtott egyedek regenerációs blasztémája nagyfokú eltérést mutatott a kontroll csoporthoz képest. Az agydúc neuropiljének fejletlensége, a GABAerg rendszer újraszerveződésének visszamaradottsága és a vérerek burjánzásának hiánya mind arra utalnak, hogy a PACAP6-38 antagonista lassítja az *E. fetida* agyregenerációjának folyamatát.

Az antagonisták injektálásával elért eredményeinket továbbá alátámasztotta egy Western blot analízis eredménye, ami alapján a PACAP specifikus I. típusú receptora, a PAC1 receptor expresszálódik az agyirtott egyedek 2 hetes regenerációs blasztémájában, illetve radioimmunoassay vizsgálatainkkal kimutattuk a PACAP vagy PACAP-szerű fehérje koncentrációjának megnövekedését a regenerációs blasztémában.

Mindezek alapján levonhatjuk a következtetést, hogy a már korábban detektált PACAP-szerű vegyület hatással van az *E. fetida* agyregenerációjára, és a megfelelő hosszúságú PACAP fragmens injektálása lassítja a regeneráció folyamatát.

IRODALOMJEGYZÉK

BAGUNA, J., ROMERO, R., SALÓ, E., COLLET, J., AULADELL, C., RIBAS, M., RIUTORT, M., GARCIA-FERNANDEZ, J., BURGAYA, F., BOENO, D.: Growth, degrowth and regeneration as developmental phenomena in adult freshwater planarians, In: MARTHY, H. (ed.), Experimental Embryology in Aquatic Plants and Animals. Plenum Press, New York, 1990, 129–162.

BARR, H., J.: Regeneration and natural selection, Am. Natural J., 1964, 118: 183–186.

CARDOSO, J., C., R., VIERIA, F., A., GOMES, A., S., POWER, D., M.: PACAP, VIP and their receptors in the metazoa: Insights about the origin and evolution of the ligand-receptor pair, Peptides, 2007, 28: 1902-1919.

CSOKNYA, M., BARNA, J., HIRIPI, L., HÁMORI, J., ELEKES, K.: Reorganization of monoaminergic systems in the earthworm *(Eisenia fetida),* following brain extirpation, J. Exp. Zool., 2003, 296A: 8-29

CSOKNYA, M., LENGVÁRI, I., HIRIPI, L., ELEKES, K., VINCZE, J., SZELIER, M., HÁMORI, J.: Serotonin content during the regeneration of nervous system in earthworm *(Lumbricus terrestris L., Oligochaeta),* Acta Biol., 1993, 39: 39–49.

CSOKNYA, M., BARNA, J., ELEKES, K.: Reorganization of the GABAergic system following brain extirpation in the earthworm (*Eisenia fetida,* Annelida, Oligochaeta), Acta Biol. Hung., 2002, 53: 43-58

HESS, W., N.: The nerve plexus of earthworm Lumbricus terrestris, Anat. Rec., 1925, 31: 335-336.

HIBBARD, E.: Regeneration in the severed spinal cord of the cordate larvae of *Petromyzon marinus*, Exp. Neurol., 1963, 7: 175–185.

HIROSE, M., HASHIMOTO, H., SHINTANI, N., NAKANISHI, M., ARAKAWA, N., IGA, J., NIWA, H., MIYAZAKI, J., BABA, A.: Differential expression of mRNAs for PACAP and its receptors during neural differentation of embryonic stem cells, Regulatory Peptides, 2005, 126: 109-113.

HOLTMANN, M., H., HADAC, E., M., MILLER, L., J.: Critical contributions of amino-terminal extracellular domains in agonist binding and activation of secretin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. Studies of chimeric receptors, J. Biol. Chem., 1995, 270:14394–14398.

HULSEBOSCH, C. E., BITTNER, G., D.: Regeneration of axons and nerve cell bodies in the CNS of Annelids, J. Comp. Neurol., 1981, 198: 77–88.

KIMURA, H., KAWATANI, M., ITO, E., ISHIKAWA, K.: PACAP facilitate the nerve regeneration factors int he facial nerve injury, Reg Pept, 2004, 123: 135-138

KOVÁCS, A.: Az idegrendszer és a neuroendokrin rendszer, In: ZBORAY, G. (ed): Összehasonlító anatómiai praktikum I., Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., Budapest, 1998., 117-119.

LABURTHE, M., COUVINEAU, A., MARIE, J., C.: VPAC receptors for VIP and PACAP, Recept Channels, 2002, 8:137–153.

LANGDON, F., E.: The Sense Organs of *Lumbricus agricola*. Jour. Morph., 1985, 11: 194-235.

LENDER, T.: The role of neurosecretion in freshwater planarian, In: RISER, N., W. AND MORSE, M., P. (eds): Biology of the Turbellarian, McGraw-Hill Book Co., New York, 1974, 460–475.

LYCKMAN, A., W., BITTNER, G., D.: Axonal conduction and electrical coupling in regenerating earthworm giant axons, Exp. Neurol., 1992, 117: 299–306.

LYCKMAN, A., W., HEILDELBAUGH, S., M., BITTNER, G., D.: Analysis of neuritic outgrowth from severed giant axons in *Lumbricus terrestris*, J. Comp. Neurol., 1992, 318: 426–438.

MÁTYÁS, M.: Az anterior regeneráció kvalitatív és kvantitatív vizsgálata kontroll és paraquat mérgezett *Eisenia fetida* egyedekben, szakdolgozat, Pécs, 2011.

MERTENS, I., HUSSON, S., J., JANSSEN, T., LINDEMANS, M., SCHOOFS, L.: PACAP and PDF signaling in the regulation of mammalian and insect circadian rhythms, Peptides, 2007, 28: 1775-1783.

MIYATA, A., ARIMURA, A., DAHL, R., R, MINAMINO, N., UEHARA, A., JIANG, L., CULLER, M.,D., COY, D., H.: Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989, 164: 567–74.

MIYATA, A., JIANG, L., DAHL, R., D., KITADA, C., KUBO, K., FUJINO, M.: Isolation of a neuropeptide corresponding to the Nterminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38), Biochem. Biophys. Res. Commun., 1990, 170:643–648.

REGLŐDI, D., LENGVÁRI, I., SZELIER, M., VIGH, S., ARIMURA, A.: Distribution of PACAP-like immunreactivity in the nervous system of oligochaeta, Peptides, 2000, 21: 183-188.

SOMOGYVÁRI-VIGH, A., REGLŐDI, D., LI, M., LENGVÁRI, I., VIGH, S., ARIMURA, A.: Tissue distribution of PACAP27 and -38 in oligochaeta: PACAP27 is the predominant form in the nervous system of *Lumbricus polyphemus*, Peptides, 2000, 21: 1185-1191.

VÁRHALMI, E., SOMOGYI, I., KISZLER, G., NÉMETH., J., REGLŐDI, D., LUBICS, A., KISS, P., TAMÁS, A., POLLÁK, E., MOLNÁR, L.: Espression of PACAP-like Compounds During the Caudal Regeneration of the Expression of the Eisenia fetida, J Mol Neurosci, 2008, 36: 166-174

VAUDRY, D., GONZALEZ, B.J., BASILLE, M., YON, L., FOURNIER, A., VAUDRY, H.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions, Pharmacol. Rev., 2000, 52:269–324

ZHOU, C., J., SHIODA, S., YADA, T., INAGAKI, N., PLEASURE, S., J., KIKUYAMA, S.: PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways, Curr. Prot. Pept. Sci., 2002, 3: 423–39.

A témában megjelent saját közlemények:

MOLNÁR, L., HORVÁTH, B., GUNSZT, D., SOMOGYI, I., ENGELMANN, P., **STEIB, A.,** NÉMETH, J., LUBICS, A., REGLŐDI, D., POLLÁK, E.: PACAP-like molecules in earthworms and their influence on the brain regeneration, Acta Physiologica, 2011, 202: 81.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, **DR. MOLNÁR LÁSZLÓ**nak a bizalmát, rám fordított figyelmét és idejét, hogy munkám segítette és tanácsaival könnyítette.

Külön köszönet **DR. POLLÁK EDIT**nek, hogy észrevételeivel és útmutatásaival megóvott számos hibától, és baráti tanácsaival segített abban, hogy munkám jól végezzem a jövőben.

Továbbá köszönöm GUNSZT DÓRÁnak és SOMOGYI ILDIKÓnak a baráti és technikai segítséget, valamint DR. DÉNES VIKTÓRIÁnak és DR. SZABADFI KRISZTINÁnak, hogy közreműködésükkel segítették e pályamunka megírását.