

A HUMÁN PORC ÖREGEDÉSÉNEK ÉS A PAC1 RECEPTOR EXPRESSZIÓJÁNAK LEHETSÉGES KAPCSOLATA

Debreceni Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Tóth Anna

1.évfolyam Biomérnök BSc

Témavezető:

Dr. Juhász Tamás

egyetemi adjunktus

Dr. Szücs Péter

Intézetvezető egyetemi docens

Dr. Matta Csaba

Intézeti TDK felelős adjunktus

Kelt: Debrecen, 2022

Tartalom

Rövidítések	3
Absztrakt.....	4
1. Bevezetés	5
1.1 A porcszövet	5
1.2 PACAP	6
2. Célkitűzés.....	8
3. Anyag és módszer	9
3.1 Minták előkészítése, metszetkészítés	9
3.2 HE festés és porcvastagság meghatározás	9
3.3 DMMK festés	9
3.4 Picrosirius vörös festés	10
3.5 Immunhisztokémia	10
4. Eredmények.....	12
4.1 Az ember térdízületének hialinporca 40 éves kort elérve sérülékenyebbé válik	12
4.2 A hialinporc porcmátrix termelődésének csökkenése figyelhető meg ortokromatikus festődésen keresztül	13
4.3 A kollagénrostok expressziója zavart szenved az öregedés során	15
4.4 PAC1 receptor lokalizációja	18
5. Diskusszió	21
6. Irodalomjegyzék	24
7. Függelék.....	27

Rövidítések

PACAP: hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid

PAC1: hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid receptor 1

VPAC1: Vasoactive intestinal polypeptide receptor 1

VPAC2: Vasoactive intestinal polypeptide receptor 2

HE: hematoxinilin-eosin

vDMMK: vizes dimetil-metilénkék

PS: picrosirius

ECM: extracelluláris mátrix

Sox9: SRY (sex determining region Y)-box 9

PKA: protein kináz A

CREB: cAMP response element-binding protein

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

PACAP KO: homozigóta PACAP hiányos

Absztrakt

Bevezetés: A PACAP (hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid) nevű neuropeptid bizonyítottan számos szövet fejlődését befolyásolja, ilyen módon a porcdifferenciációt is. A PAC1 egy olyan PACAP receptor, mely közel 1000x nagyobb affinitással köti a neuropeptidet VPAC1 és VPAC2 receptorokhoz képest. Valamint azt is tudjuk, hogy aktivációja a Sox9 transzkripciós faktoron keresztül a II-es típusú kollagén és más mátrixalkotó génjének aktivációját is pozitívan befolyásolja.

Célkitűzés: Kísérleteink célja, hogy feltérképezzük a PACAP legfontosabb receptorának szerepét a humán porc öregedése során betöltött funkciójáról.

Anyag és módszer: Munkánk során humán porcmentákat gyűjtöttünk a humán etikai engedélyek betartásával (28996-2/2018/EKU). A mintákból 10 évenkénti korcsoportokat alakítottunk ki, melyeken hematoxilín-eosin (HE), dimetil-metilénkék (DMMK) és picrosirius (PS) szövettani festéseket végeztünk. PAC1 helyét immunhisztokémiával vizsgáltuk konfokális mikroszkópban.

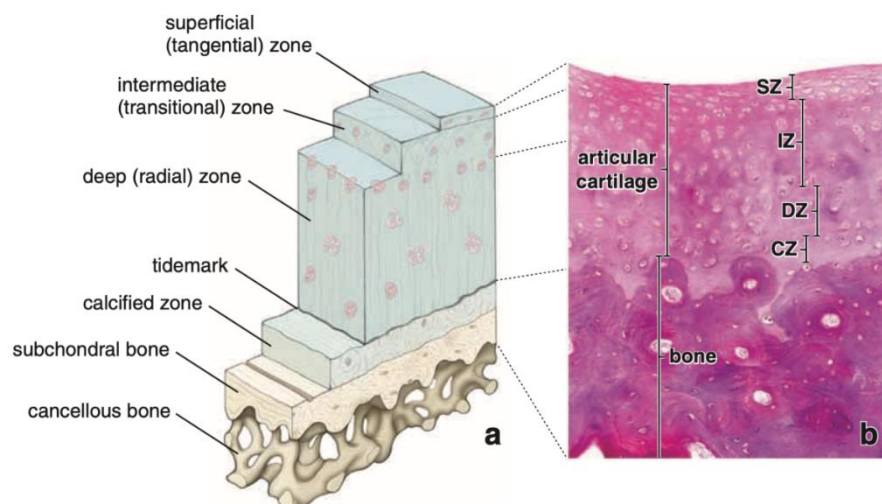
Eredmények: Az általános morfológiai paramétereket HE festéssel ítéltük meg és egy patológus bevonásával megvizsgáltuk a porcszerkezet elfajulását. Lemértük az általános porcvastagságot, mely csökkenő tendenciát mutat a kor előrehaladtával. A DMMK festéssel a porc extracelluláris mátrixának metakromatikus festődésének intenzitását ítéltük meg, mely jelentős csökkenést mutat az idősebb mintákban. A porcspecifikus II-es típusú kollagén lefutását PS festéssel polarizációs mikroszkópban vizsgáltuk. Megállapíthattuk, hogy a kollagénrostok orientációja zavart szenved, a máltai keresztek mintázatában változások következnek be az idősödő betegek ízületi porcában. Immunhisztokémiai vizsgálatainkból kiderült, hogy a PAC1 expressziója a kor előrehaladtával csökken az ízületi porc mindhárom zónájában.

Konklúzió: Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a PAC1 receptor expressziója és funkciója korreláltható a porc öregedésével, mely így akár egy terápiás célpont is lehet, melynek aktiválásán keresztül javítható porcmátrix termelése.

1.Bevezetés

1.1 A porcszövet

A chondrogenesis egy igen összetett szabályozás alatt álló fejlődéstani folyamat, mely embrionálisan a mesenchymális sejtek gyors osztódásával veszi kezdetét. Az osztódás során létrejönnek a chondroblastokat tartalmazó porctelepek, melyek elkezdik a porcmátrix alkotóit termelni, ezáltal a sejtek körül porcudvarokat hoznak létre. A chondroblastok ezt követően legfeljebb még kétszer osztódnak, létrehozva ezzel egy chondront, mely már érett chondrocytákat tartalmaz. A chondrocyták a porcmátrix termelés következtében viszonylag távolabb helyezkednek egymástól, és 2-4 chondrocyta fog alkotni egy chondront, melyet bonyolult szerkezetű és többrétegű porcudvar vesz körül. Az így képződött hialinporc az ízületekben speciális rétegzettséget mutat, mivel perichondriummal nem rendelkezik ezért regenerációra gyakorlatilag nem képes. Az ízületi porc zónákra osztható, melyekben elhelyezkedő chondrocyták a zónára jellemző orientációjú és összetételű mátrixszal veszik magukat körül. Az egyes zónákban, rétegekben a posztmitotikus porcsejtek a csonthoz közelebbi mélyebb régióban helyezkednek el, míg az aktív osztódásra képes sejtek a felszínhez közeli tangenciális rétegben találhatók meg. A középső átmeneti zónában a hypertrophiás sejtek helyezkednek el (1. Ábra).



1.Ábra: Az ízületi porc felépítésének sematikus rajza, mely jól bemutatja a porc rétegzettségét és eltérő szerkezetét.

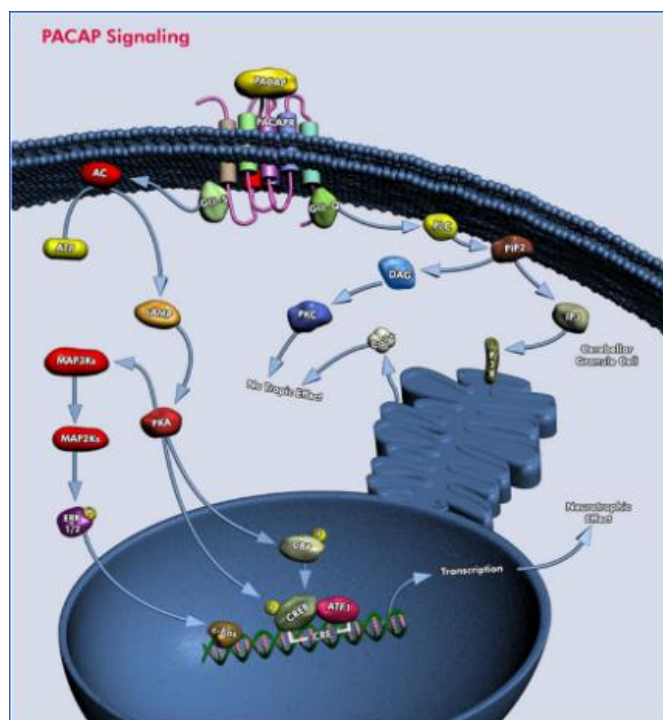
A chondronok körüli extracelluláris mátrix (ECM) alkotói többek között a kollagén, hialuronsav, glükózaminoglikánok (chondroitin-szulfát és keratán-szulfát) és aggregán. A porcspecifikus II-es típusú kollagén jellegzetes lefutású, kettősen fénytörő tulajdonságú rostokat hoz létre, mely a chondronok körül polarizációs mikroszkópban vizsgálva ún. máltai kereszttek formájában detektálható. Az aggregán és a hozzá kapcsolódó glükózaminoglikánok

a hialuronsavval aggregátumot alkot, mely erősen vízmegkötő tulajdonságú. Ez biztosítja a porc tömörségét és nagyfokú ellenállóképességét (Rölich 2002).

A chonrogenesis számos molekuláris jelátviteli útvonal által regulált folyamat, ilyen molekula például a Sox9, mely a chondrogenesis mestergénjeként ismert. Működését a PKA (protein kináz A) aktivitása befolyásolja ez utóbbi kináz foszforilációs aktivitása szoros kapcsolatban áll a PACAP nevű neuropeptid receptorával a PAC1-gyel. A porcszövet egyik különlegessége, hogy nem tartalmaz ereket és idegeket, a szövet számára szükséges anyagokat diffúzióval veszi fel a synoviális teret kitöltő synoviális folyadékból. Gyenge tápanyagellátottsága miatt regenerációra alig képes, ezáltal a különböző sérülések és porcdegenerációs folyamatok okozta károsodások gyógyszeres kezelése igen bonyolult és nem is minden esetben hozza meg a kívánt mértékű javulást.

1.2 PACAP

A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid, más néven a PACAP igen kis méretű, mindössze 38 aminosavból álló polipeptid, mely a VIP/Secretin/GHRH/Glucagon szupercsalád tagja. A PACAP-ot elsőnek a központi idegrendszerben izolálták (Miyata és mtsai., 1989), azonban számos perifériás szövetben is kimutatták (Vaudry és mtsai., 2009). A PACAP



2.Ábra: A PACAP által aktivált jelátviteli útvonalak
<https://proteinlounge.com/>

bizonyítottan pozitív irányba befolyásol több fejlődéstani folyamatot, például a chondrogenezist és az osteogenezist is (Juhász és mtsai., 2014). Három receptora ismert, a PAC1, a VPAC1 és a VPAC2, melyek közül a VPAC1 és VPAC2 a PACAP-on kívül VIP-et is köt. A G fehérje kapcsolt 7 transzmembrán doménnel rendelkező PAC1 1000x nagyobb affinitással köti a PACAP-ot, melynek konformáció változása az adenilát cikláz aktivitásának fokozódásán keresztül a protein kináz A-t (PKA) aktiválja, mely számos porcképződést szabályozó transzkripciós faktoron, például a Sox9-en keresztül porcspecifikus gének átírását szabályozza (2. Ábra). Fontos még megemlíteni a CREB transzkripciós faktort, mely a Sox9-hez hasonlóan foszforilált állapotban a nukleuszba transzlokálódik és az aggregán, valamint a II-es típusú kollagén átírását fokozza. Az is ismert, hogy a külsőleg adagolt PACAP az in vitro chondrogenezist fokozza (Juhász és mtsai. 2014), valamint a túlzott in vitro mechanikai inger káros hatásait is kivédi (Juhász és mtsai. 2015). Gátló hatással van a mátrix metalloproteinázok, aggregánázok és hialuronidázok aktivitására (Szentlélek és mtsai, 2019). Ezen túlmenően a PACAP számos egyéb szignalizációs útvonalat szabályoz, ezáltal perifériás szövetekben funkciója sokrétű és szerteágazó, de általánosságban elmondható, hogy preventív hatással rendelkezik a szövetet érő káros hatásokra.

2. Célkitűzés

Korábbi kísérletek alapján tudjuk, hogy a PACAP az in vitro chondrogenezist pozitív irányba befolyásolja (Juhász és mtsai. 2014), illetve csökkent aktivitása mutatható ki öreg egerek térdízületeiben (Szegeczki és mtsai. 2019), azonban nem áll rendelkezésünkre adat a humán porc öregedése során betöltött szerepéről.

Elsődleges célunk volt a humán porc öregedésének pontos és részletes vizsgálata, mind az általános morfológiai viszonyokat tekintve, mind a szövettani morfológiai változásokat tekintve.

Célul tűztük ki továbbá általános szövettani festésekkel nyomon követni a porcmátrix egyes alkotóelemeinek változásait a porc öregedése során.

Ezen túlmenően kísérleteink fő célja az volt, hogy feltérképezzük a PACAP legfontosabb receptorának expresszióját a porc öregedése során és esetleges korreláció megállapítása a humán porc öregedésével párhuzamosan.

3. Anyag és módszer

3.1 Minták előkészítése, metszetkészítés

Kísérleteinkhez humán porcmentákat gyűjtöttünk a humán etikai engedélyeknek megfelelően (28996 2/2018/EKU), majd a minták kor szerint eloszlását figyelembe véve csoportokat hoztunk létre. 10 évenként állítottunk fel egy kísérleti korcsoportot és minden korcsoportból legalább 3 független mintát használtunk. Az ízületi porc eltávolítását a DE Igazságügyi Orvostani Intézet munkatársai végezték. További szövettani és immunhisztokémia vizsgálatokhoz paraffinos metszeteket készítettünk. A metszést megelőzően a mintákat 4%-os formalinban fixáltuk, majd 10 héten át 4%-os EDTA-ban (etilén-diamin-tetraecetsav) dekalcináltuk, majd dehidratáltuk azokat felszálló alkoholsor segítségével és paraffinba ágyaztuk. 7 μ m vastagságú metszeteket készítettünk.

3.2 HE festés és porcvastagság meghatározás

A hematoxin-eosin (HE, Sigma-Aldrich MO, USA) egy alapszövettani festés, mellyel az általános morfológiai paramétereket tudjuk megítélni. Az általunk készített metszeteket deparaffináltuk, majd először Hematoxin komponenssel festettük és csap víz alatt kékítettük, ezt követően Eosinnal 4 percig festettük és DPX ragasztóval fedtük le. Az így kapott metszeteken a negatív töltésű molekulák és sejtszervek, pl. sejtmagok kéken látszanak és a pozitív töltésű molekulák pl. fehérjék pirosan látszanak. Ezzel a festéssel az általános morfológiai tulajdonságokat ítéljük meg. Ezt követően BX53 mikroszkóp segítségével 4x és 20x nagyítású objektívet használva felvételeket készítettünk a metszetekről. A felvételeken átlagos porcvastagság meghatározást végeztünk, mely során merőlegest állítottunk a porcfelszíntől a subchondrális csontig és ennek pixelszámát mértük le Image J szoftver felhasználásával. Egy metszeten 10 különböző helyen végeztük el a mérést, majd átlagot számítottunk. A szignifikancia szint meghatározásához kétmintás t próbát alkalmaztunk.

3.3 DMMK festés

A porcmátrix basophil festődésű a mátrixalkotók, anionként disszociáló, szulfát,- és karboxil-csoportjaik miatt. A dimetil-metilénkék (DMMK) (Sigma-Aldrich MO, USA) egy bázikus festék, mely metakromatikus festődést eredményez, azaz a megfestett porcszövet eltér a festék eredeti színétől. A folyamat lényege, hogy az erős negatív töltésű és sűrűn elhelyezkedő glükózaminoglikánokhoz kötődő festékmolekulák egymáshoz annyira közel kerülnek, hogy megváltoztatják az áteső fény abszorpció maximumát és egy új, ebben az esetben lila színt

látunk. A DMMK festék lehetőséget ad a mátrixalkotók termelődésének mennyiségének megítélésére és a mátrix egészséges mivoltáról ad információt. Amennyiben az ECM alkotóinak aránya megfelelő, lila színe metakromatikus festődés látható. Amennyiben ezek szerkezetében probléma lép fel, azaz a negatív töltésű molekulák nem helyezkednek egymáshoz elég közel a porcszövet kék színű ortokromatikus festődést mutat. Ezt követően BX53 mikroszkóp segítségével 4x és 20x nagyítású objektívet használva felvételeket készítettünk a metszetekről. A felvételeken metakromatikus festődő porcvastagság meghatározást végeztünk, mely során merőlegest állítottunk a porcfelszíntől a metakromatikus festődő területek végéig és ennek pixelszámát mértük le Image J szoftver felhasználásával. Egy metszeten 10 különböző helyen végeztük el a mérést, majd átlagot számítottunk. A szignifikancia szint meghatározásához kétmintás t próbát alkalmaztunk.

3.4 Picrosirius vörös festés

A picrosirius vörös festék (Sigma-Aldrich MO, USA) a kollagénrostokat piros színnel festi meg, és áteső fényben annak szerkezetének megítélése megegyezik akár egy HE festési elemzéssel. Azonban a kollagén kettősen fénytörő tulajdonságú makromolekula, ezért, ha a metszeteket polarizációs mikroszkópban vizsgáljuk és a polarizált fény síkját $\lambda/4$ -el elforgatjuk a kollagénrostokat tartalmazó területeken erősen világító területeket láthatunk. Az egészséges porcban a chondronok körül a II-es típusú kollagén körkörös lefutású, melyek polarizációs mikroszkópban kereszt alakú struktúrákat hoznak létre, ezeket máltai keresztnek nevezzük. Amennyiben a kollagénrostok lefutása zavart szenved a máltai kereszt deformálódhat és változatos alakot vehet fel. A fényerősség intenzitása arányos a kollagén expressziójával. A polarizációs fényben vizsgált metszeteken élénk pirosra festődnek a vastagabb kollagénrostok és a rostok elvékonyodásával párhuzamosan zöld szín jelenik meg. Az ízületi porcban lévő vastag és vékony kollagénrostok aránya így számszerűsíthető. Vizsgálataink során Image J szoftverrel lemértük egy tetszőlegesen kijelölt azonos méretű négyzetben a piros és zöld pixelpontokat és az adott terület integrált denzitását meghatároztuk, mely adatok segítségével a következtítettük az adott korcsoport ízületi porcában lévő vastag és vékony kollagénrostok számára.

3.5 Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során az általunk vizsgálni kívánt PAC1 receptor expresszióját és lokalizációját követhetjük nyomon. Az immunhisztokémia vizsgálatok során az antigén-antitest kötéseket használjuk a lokalizáció meghatározására. A mintákat a

rehidratálás után 3×10 percig mostuk PBS-ben, majd a blokkoltuk a metszeteket 1%-os BSA-ban. Primer antitestként poliklonális PAC1 antitesteket (Sigma-Aldrich MO, USA) használtunk 1:500 hígításban, ezt követően inkubáltuk a metszeteket 4°C-on egy éjszakán át. Alexa 555 anti nyúl fluoreszcens antitestet (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) alkalmaztunk szekunder antitestként 1:1000 hígításban. Háttérfestésnek DAPI-t használtunk a sejtmagok kimutatására. Eredményeink ellenőrzéséhez negatív kontrollt használtunk, mely során primer antitest nélkül alkalmaztuk az Alexa 555 szekunder antitestet. Konfokális mikroszkóp segítségével határoztuk meg a PAC1 receptor pontos lokalizációját, melyhez 60x objektívet használtunk, 543 nm hullámhosszúságú lézerrel megvilágítva, azonos lézerintenzitást használva és 1µm-es virtuális szeleteket pásztáztunk és fotókat készítettünk. A mintákról három régióban készítettünk felvételt: felszíni zónában, a „középső” átmeneti zónában és a mély zónában. A PAC1 receptor expresszióját mindhárom zónában külön vizsgáltuk

4. Eredmények

4.1 Az ember térdízületének hialinporca 40 éves kort elérve sérülékenyebbé válik

A HE-nal megfestett szövettani metszeteket megtekintve a porcvastagság csökkenése már szemmel is látható a középkorú mintákon. A fiatal embertársainkból származó minták felszínén rendellenességek nem láthatók, a festés intenzitása egyenletes (3a ábra). A 40-50 éves korcsoportból származó mintán megfigyelhetjük a felszíni zóna degradációját, mely az ennél idősebb korcsoportokban is megfigyelhető, illetve még súlyosabb elváltozásokat mutat. A felszíni zóna ilyen jellegű változása a porc elfajulásának jele lehet és patológiai elváltozások, pl. chondropátiák egyik jellemző tünetének tekinthetők. A festődés intenzitása se olyan egyenletes, mint a fiatalabb korosztályokban, a relatív porcvastagság csökkenése pedig már szemmel is észrevehető (3b ábra). A festődés intenzitása a chondronok körüli mátrix festődésének csökkenésére utal, valamint a porcvastagság csökkenése a fokozott mechanikai ingerlés következtében létrejövő porcintegritás csökkenésnek lehet az eredménye.



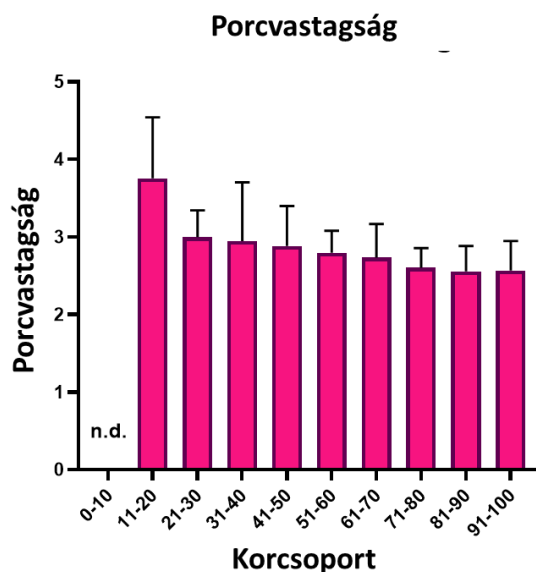
3a ábra: A porcfelszín a fiatal korcsoportokban jellemzően szabályos, kóros elváltozások nem jelentkeznek az érintett területen. A felvételek 4x nagyításon BX53 mikroszkóp segítségével készültek.



3b ábra: A 40-50 évtől megfigyelhető az ízület kezdetben felszíni zónát érintő változásai, majd az egyre idősebb korcsoportokban már a porcmátrix degradációjára utaló morfológia jegyek is megfigyelhetők. A felvételek 4x nagyításon BX53 mikroszkóp segítségével készültek.

A relatív porcvastagság eredményeit a 4. ábra tartalmazza. 0-10 éves korcsoportban a subchondrális csont hiánya miatt még nem megállapítható a porcvastagság. Az adatok arra utalnak, hogy 40 éves kor felett a porcvastagság jelentősen csökken. Ezt a vastagságcsökkenést

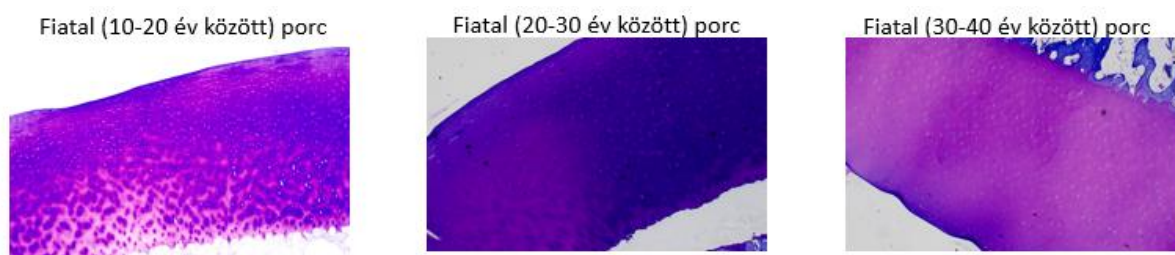
fokozatosan nyomon követhetjük a kor előrehaladtával, bár azt is el kell mondanunk, hogy valószínűen befolyásolja az egyes emberek fizikai aktivitása és genetikai érintettsége is.



4. ábra: A relatív porcvastagság eloszlása az egyes korcsoportokban. 40 éves kort elérve csökkenő tendencia figyelhető meg.

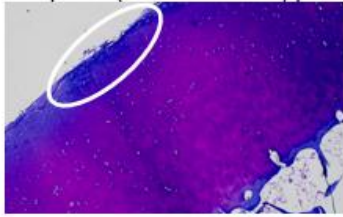
4.2 A hialinporc porcmátrix termelődésének csökkenése figyelhető meg ortokromatikus festődésen keresztül

A DMMK festékekkel a porcmátrix alkotóinak jelenlétére tudunk következtetni, mely a fiatal korosztályokban erős metakromáziás festődésben nyilvánul meg (5a ábra). Ez jelzi számunkra, hogy az ECM molekulák expressziója zavartalanul működik, míg a 40 éves korosztályban megfigyelhetők ortokromatikus elváltozások a tangenciális rétegben. Az ortokromázia a porclágyulási folyamatokat is jól tükrözi számunkra, mely az 50-60, de kifejezetten a 60-70 éves korcsoportból származó mintákon jól megfigyelhető (5b ábra). Tehát elmondhatjuk, hogy a hialinporc mátrixtermelésének zavarai 40 éves kortól kezdődnek meg.

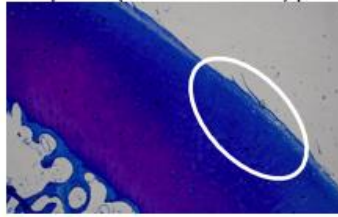


5a ábra: vDMMK festés a mintákon. A fiatal csoportokban nem látunk a porcmátrix szerkezeti sérüléseire utaló elváltozásokat, erős metakromatikus festődés figyelhető meg, mely a mátrix negatív töltésű, bázikus csoportok jelenlétét feltételezi. A mikroszkóp felvételek BX53 mikroszkóp segítségével 4x nagyításon készültek.

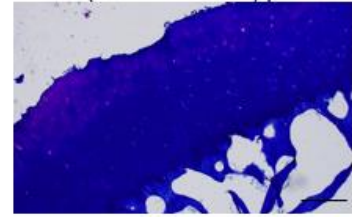
Középkorú (40-50 év között) porc



Középkorú (50-60 év között) porc

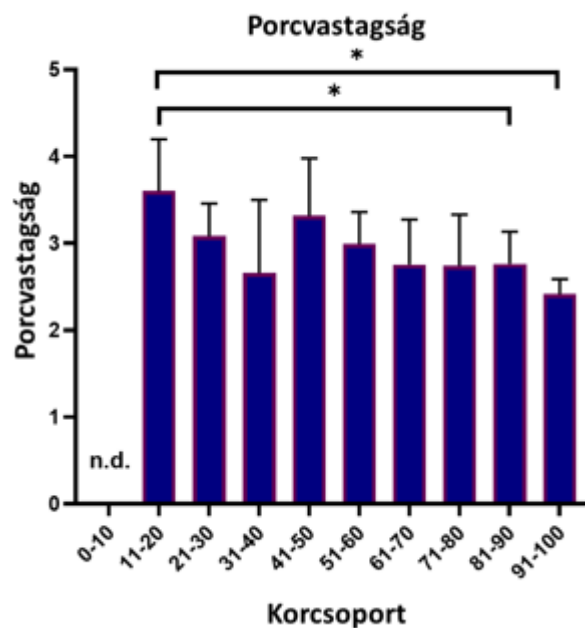


Idős (60-70 év között) porc



5b ábra: vDMMK festés a mintákon. Az idősödő mintákon erős ortokromatikus festődés figyelhető meg, mely kezdetben a felszíni zónákat érinti, majd a porc teljes terjedelmén látható. Ez az ECM egyes elemeinek hiányát feltételezi, ezáltal a porclágyulási folyamatok kezdete is. A mikroszkóp felvételek BX53 mikroszkóp segítségével 4x nagyításon készültek.

A metakromatikusan festődő porc vastagsága is fontos információval szolgál a porc glükózaminoglikán tartalmát illetően. Így megvizsgáltuk a DMMK-kel festődő porcmátrix vastagságát is. Hasonló eredményeket kaptunk az általános morfológiai analízishez, hiszen itt is folyamatos csökkenést állapítottunk meg a kor előrehaladtával (6.ábra). Ebben az esetben a 40-50 év közötti minták esetében kis kiugró értéket kaptunk, valamint a szórásértékek lényegesen nagyobbak voltak. Ezen adatok is arra utalnak, hogy az egyes emberek esetében befolyásolja a porc szerkezetét a fokozott mechanikai behatás, de általánosságban elmondható, hogy a kor előrehaladtával a porcmátrix metakromatikusan festődő komponensei csökkenést mutatnak.



6 ábra: Porcvastagság meghatározása a VDMMK festést követően. A porcvastagság értékek szignifikáns mértékben csökkennek az idősödő korcsoportokban. A szignifikancia szint meghatározását kétmintás t próbával határoztuk meg. $p < 0,05$

4.3 A kollagénrostok expressziója zavart szenved az öregedés során

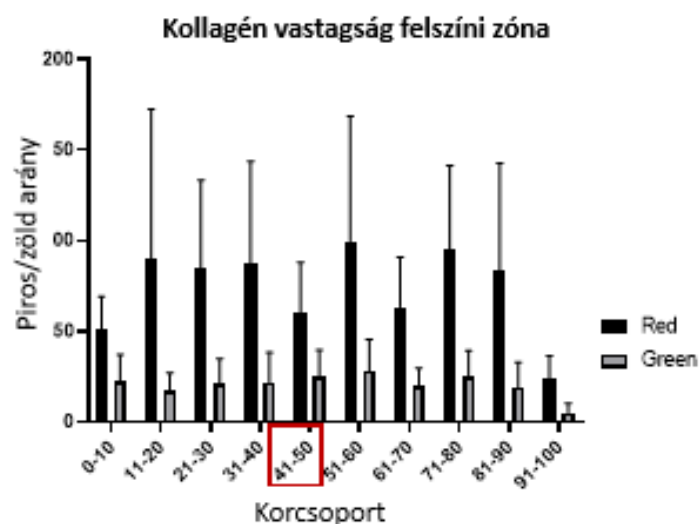
A II-es típusú kollagénrostok lefutása a hialinporc rétegeiben eltérő, a felszíni zónában eleinte a felszínnel párhuzamosan, majd tangenciális és később a felszínre merőleges lefutást mutat. A fiatal porcban a vékonyabb, majd az egészséges felnőtt porcban vastag és precízen elhelyezkedő kollagénrostok a jellemzőek, a vékonyabb orientációt nélkülöző kollagénrostok aránya az egyes patológiás elváltozások során növekszik. Azonban a chondronok körül a kollagénrostok lefutása körkörös és festődésük intenzívebb. Ez a speciális lefutás polarizált fényben, a fény síkját $\lambda/4$ -gyel elforgatva picrosirius vörös festést alkalmazva jól megfigyelhető. A vastag kollagénrostok intenzív vörös színnel jelennek meg, míg a vékonyabb kollagénrostok zöld fényben tűnnek fel. A chondronok körül úgynevezett máltai kereszt formájában láthatók, melyek jellegzetes mintázatot mutatnak egészséges porcban és fiatal mintákban ezek a struktúrák élénk piros színnel láthatók (7a ábra). A porc öregedésével a kereszt alakja deformálódhat, ahogy a 40-50 éves korcsoportban is megfigyelhető ez a jelenség, az idősebb korcsoportokban vagy teljesen eltűnnek a máltai kereszt, vagy érdekes körkörös formát vesznek fel. A deformitás a II-es kollagén expressziójának zavarára utal, mely a polarizációs mikroszkópos felvételek alapján 40 éves kor körül kezdődik. A porclágyulási folyamatok során a kollagénrostok szinte teljesen eltűnhetnek, vagy rendellenes körkörös formát vehetnek fel (7b ábra).



7a ábra: A fiatal mintákon láthatóak az úgynevezett Máltai-kereszt. Ez a kollagénrostok zavartalan expressziójára és zavartalan lefutására utal, mely nélkülözhetetlen a porcmátrix megfelelő stabilitásának fenntartásához. Polarizációs mikroszkópban fény síkját $\lambda/4$ -gyel elforgatva 20x nagyításon a felszíni zónákban készült felvételek.

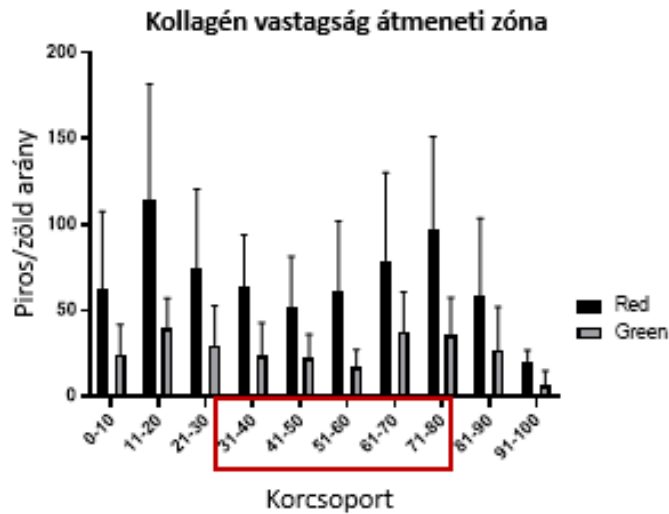
7b ábra: A 40-50 éves korcsoporttól kezdve a kollagénrostok lefutása szabálytalanná válik, mely összhangban lehet a porclágyulási folyamatokkal és a II-es típusú kollagén expressziójának változásával. Polarizációs mikroszkópban fény síkját $\lambda/4$ -gyel elforgatva 20x nagyításon a felszíni zónákban készült felvételek.

Az egyes mintákban korcsoportonként és zónáknak megfelelően lemértük a piros és zöld pixelek intenzitását. A felszíni zónában, mely leginkább kitett a mechanikai behatásoknak a vastag kollagénrostok aránya lényegesen magasabb, mint a vékony rostok jelenléte. A vastag kollagén jelenléte nem változott szignifikánsan a korcsoportokban. Azonban a sokkal kisebb arányban jelenlévő zöld, vékonyabb rostok aránya a 30-60 éves korcsoportokban szignifikánsan nő (8. ábra).



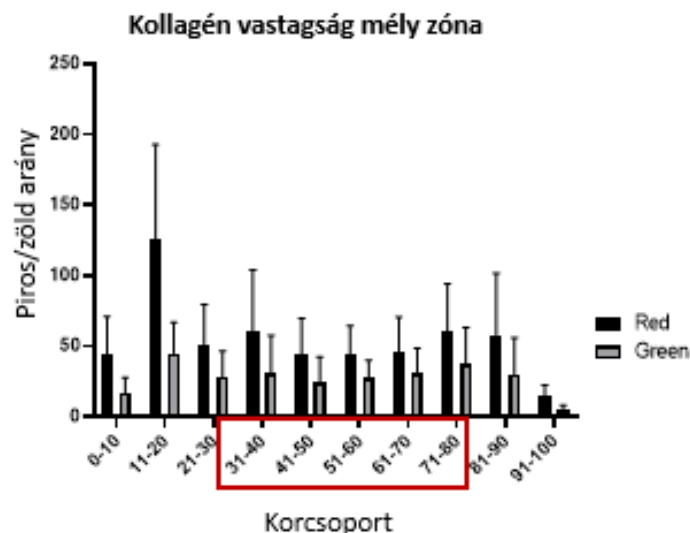
8. ábra: A picrosirius festést követően a piros-zöld színintenzitás aránya a felszíni zónákban. A vastag kollagénrostok aránya minden korcsoportban nagyobb, mint a vékony rostoké, azonban szignifikáns növekedése tapasztalható a vékony kollagénrostoknak a középkorú minták esetén. A szignifikancia szint meghatározásához kétmintás t próbát alkalmaztunk. $p < 0,05$

A középső, átmeneti zónában megvizsgálva a vastag és vékony kollagénrostok arányát érdekes eredményeket kaptunk. A kezdetben vastagabb kollagénrostok a felnőtté válás során csökkennek, majd érdekes módon a 60-80 éves korig kiugró eredményeket mutatnak (9. ábra). Hasonló eredmények figyelhetők meg a vékonyabb zölden festődő rostok esetében is.



9. ábra: Az átmeneti zónában a kollagénrostok arányának meghatározása. Ebben a zónában mind a vastag, mind a vékony kollagénrostok esteében is láthatunk kiugró értékeket, melyek a vastag kollagénrostok esetén 40-50 éves korig csökkenő tendenciát mutatnak, majd arányuk nőni kezd. Ez a vékony rostok esetén is látható tendencia.

A mély zónában megvizsgálva a vastag és vékony II-es típusú kollagénrostok arányát elmondhatjuk, hogy ebben az esetben csak fiatal korban magas a vastagabb kollagénrostok aránya, majd a vastag és vékony kollagénrostok közel azonos mennyiségben találhatók meg az egyes korcsoportokban (10. ábra). Hasonlóan a középső réteghez 70 -90 éves korig kiugró értékeket kaptunk, jellemzően a 40-50 éves korig lévő emberek esetében itt is csökkenést tapasztaltunk (10. ábra).

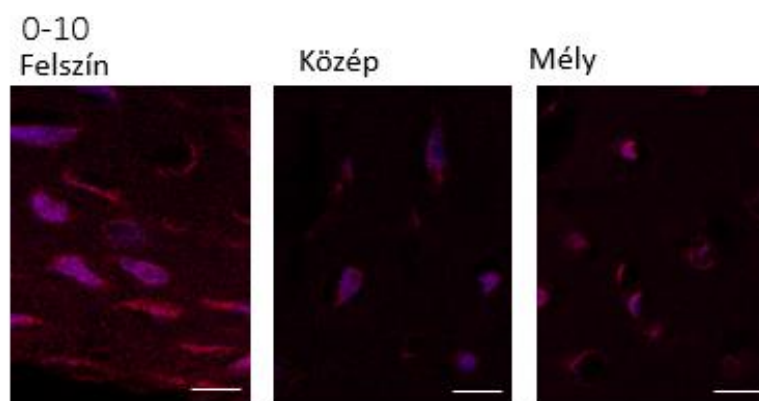


10. ábra: Mély zónákban a zöld és piros színintenzitás meghatározása. Ebben a zónában is megfigyelhető a csökkenő, majd növekvő tendencia a vékony és vastag kollagénrostok esteén, azonban itt fiatal korban kiugróan magas a vastag kollagénrostok aránya.

4.4 PAC1 receptor lokalizációja

Immunhisztokémiai vizsgálataink során a PAC1 receptor pontos lokalizációját követtük nyomon konfokális mikroszkóp segítségével. A PAC1 receptor jelenlétét zónák szerint vizsgáltuk, és a teljesség igénye nélkül a jellemző korcsoportokból, illetve az öregedés lényeges szakaszaiból mutatunk be néhány reprezentatív képet. A receptor jelenlétét minden korcsoportban ki tudtuk mutatni zónáktól függetlenül, azonban az egyes zónákban eltérő intenzitással.

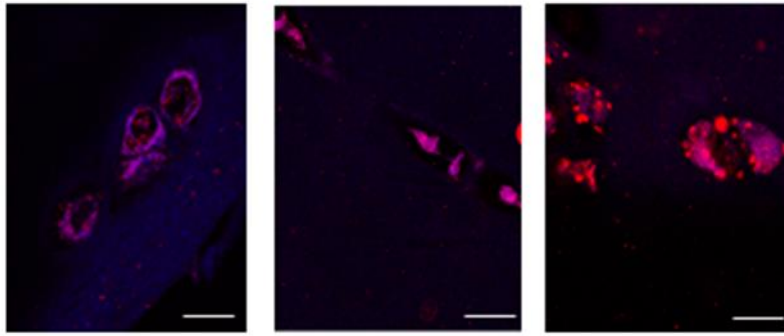
Az újszülöttekből, illetve gyermekekből származó mintákon a felszíni zóna sejtjei intenzív immunpozitivitást mutatnak, mind membrán és mind citoplazmatikus lokalizációt tekintve. A középső és mélyebb zónákban a jel intenzitás erőssége csökken, de lokalizációt tekintve hasonló eredményeket kaptunk (11. ábra).



11. ábra: Immunhisztokémia a legfiatalabb korosztály esetén. Itt a felszíni zónában nagyon erős a PAC1 receptor aktivitása, mely főleg citoplazmatikus lokációt mutat. Konfokális mikroszkóppal készült 60x nagyítású felvételek. Scale bar 20µm.

Fiatal felnőttekben a PAC1 receptor erős immunpozitivitást mutat a felszíni zónában azonban a receptor lokalizációja inkább a membránra jellemző. Az átmeneti zónában ezekben a mintákban is kimutatható a receptor, bár alacsonyabb intenzitással és mind citoplazmatikus mind membránlokalizációt is mutat. A mély zónában jelerősség intenzitása nő és citoplazmatikus és membránlokalizációt is mutat (12. ábra).

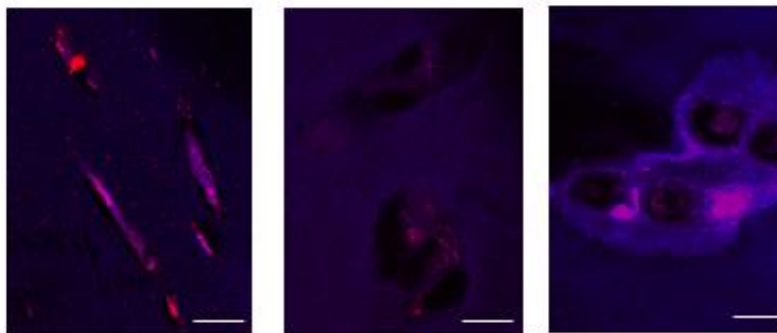
10-20



12. ábra: PAC1 receptor expressziójának lokalizációja a 10-20 év közötti korosztályban. Ebben a korcsoportban a mély zónában látható erős PAC1 expresszió, mind a felszíni, mind az átmeneti zónában jellemző a membránlokalizáció is. Konfokális mikroszkóppal készült 60x nagyítású felvételek. Scale bar 20µm.

Középkorú emberekből származó minták esetében a jel intenzitás jelentősen csökken PAC1 receptor esetében. A felszíni zónában még jól kimutatható, de az átmeneti zónában a PAC1 receptor immunpozitivitás alig detektálható, de membránjelet láthatunk jellemzően. A mély zónában is jelentősen csökkent az immunpozitivitás és jellemzően citoplazmatikus (13. ábra).

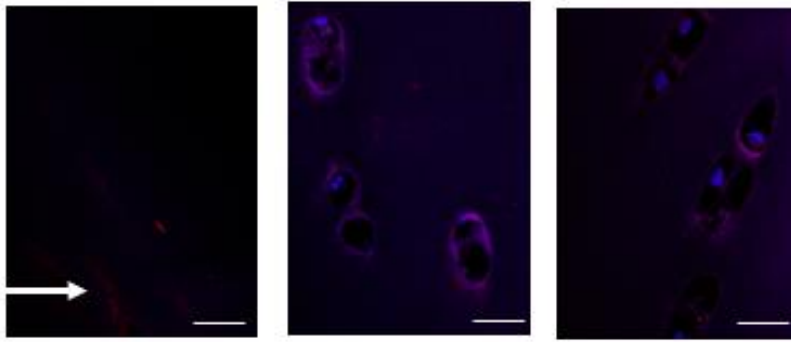
40-50



13. ábra: A középkorú mintákban a PAC1 expressziója inkább membránlokalizáció formájában figyelhető meg, azonban az átmeneti és mély zónákban már alig kimutatható mértékben van jelen. Konfokális mikroszkóppal készült 60x nagyítású felvételek. Scale bar 20µm.

Időskorban a PAC1 receptor expressziója jelentősen csökken. A PAC1 immunpozitivitás nagyon halványan mutatható ki a felszíni zónában, de jelen van a receptor a chondrocytákon. A középső és mély zónákban a PAC1 receptor kimutatható és ezekben a mintákban is membránlokalizációt mutat (14. ábra).

80-90



14. ábra: Pac1 receptor immunhisztokémiai kimutatása az idő korosztályban. Ebben a korcsoportban a felszíni zónában alig észrevehető immunpozitivitás figyelhető meg, azonban mindhárom zónában kimutatható a PAC1 receptor jelenléte. Konfokális mikroszkóppal készült 60x nagyítású felvételek. Scale bar 20µm.

5. Diszkusszió

A PACAP széles körben kutatott neuropeptid, melyet az 1980-as években történt izolálása óta (Miyata és mtsai., 1989) számos egyéb szövetben kimutattak már (Vaudry és mtsai., 2009). Az is bizonyított, hogy sokoldalú szabályozó funkciókat lát el egyes fejlődéstani folyamatok során, például az őrlőfogak megfelelő zománctermelésének szabályozásában is fontos szereppel bír (Sándor és mtsai., 2014). Indirekt módon szabályozhatja a fejlődéstani folyamatokat, mivel számos jelátviteli útvonallal kapcsolatban áll, melyek több szövet fejlődésében is részt vesznek (Juhász és mtsai., 2015). Ezek működését úgynevezett „crosstalk”-ok segítségével regulálhatja például a fog növekedésének szabályozása esetén is. A központi idegrendszert érő káros hatásokban védő szerepe bizonyított (Vaudry és mtsai., 2009), retinopatiában és ischémiában is pozitív szerepét bizonyították (Kvarik és mtsai., 2021, László és mtsai., 2019). A PACAP génhiányos egerek esetében az öregedés során fokozott amyloidózist detektáltak (Reglődi és mtsai., 2018), valamint a csontképződésük is zavart szenved (Józsa és mtsai., 2018), emellett a herékben is eltéréseket detektáltak (Reglődi és mtsai., 2018). Ezen túlmenően a chondrogenezist és osteogenezist is pozitívan befolyásolja (Juhász és mtsai., 2014), a PACAP hiányában a csonttörés gyógyulása zavart szenved (Józsa és mtsai., 2019), illetve öreg PACAP KO egerek térdízületeiben jelentős porcdegradációt is kimutattak (Szegeczki és mtsai., 2019). Ugyanakkor az is bizonyított, hogy in vitro porctenyészetekben kivédi a fokozott oxidatív stressz hatásait (Juhász és mtsai., 2014) valamint a túlzott mechanikai inger porckárosítóhatásait is kompenzálja (Szentlélek és mtsai., 2019). A PACAP receptorairól ismert, hogy megtalálható in vitro csirke porcosodó kultúrákban (Juhász és mtsai., 2014), valamint az öreg PACAP KO egerekben is csökkent expressziót mutatnak (Szegeczki és mtsai., 2019). Humán viszonylatban annyi adattal rendelkezünk, hogy az osteoarthritis során a receptor kifejeződést detektálták (Lauretta és mtsai., 2020), viszont az öregedés során betöltött szerepe és esetleges funkciója nem tisztázott.

Az articulatio genus, azaz a térdízület, az emberi test egyik legfontosabb és legbonyolultabb ízülete. Károsodása és a porcfelszín elvesztése súlyos következményekkel járhat a járásmechanizmus pontos megvalósításában. A térdízületünkben lévő sejtek azonban regenerációra nem, vagy alig képesek. Ezek a posztmitotikus sejtek adott esetben az ember születésétől kezdve halálunkig velünk öregednek és újak nem képződnek, vagy a sejteket körülvevő mátrix termelésében egyre lassabban vesznek részt. Annak érdekében, hogy pontosan feltérképezzük a porcszövet öregedését és az öregedés során bekövetkező változásokat kísérleteinkhez humán porcminákat gyűjtöttünk, majd 10 évenkénti

korcsoportokat hoztunk létre. Ezen korcsoportokban morfológiai vizsgálatokat végeztünk, valamint a porc mátrix szerkezetét adó II-es típusú kollagén szerkezetét és orientációját követtük nyomon, illetve azon glükózaminoglikánokat is megvizsgáltuk, melyek a porcra specifikus metakromatikus jelenséget is adják. Eredményeink rámutatnak az idő múlásával bekövetkező morfológia elváltozásokra, melyek súlyosan károsítják a porc szerkezetét, ezáltal gyengítve annak ellenállóképességét. Ezen porcdegenerációs folyamatok 40 éves kor körül kezdődnek és a porcszövet gyenge regenerációs képessége miatt az idő múlásával az elváltozások súlyosbodnak. Azt is egyértelműen kimutattuk, hogy az öregedés és kollagén lefutás és vastagság között zónák szerinti eltéréseket tudunk kimutatni. Ezek az eredmények nem meglepőek, hiszen a felszíni zónák vannak kitéve a legtöbb mechanikai, valamint nyíró erőnek (Basso és mtsai., 2020) és regeneráció hiánya ezen területek patológiai elváltozásával párosul. Ugyanakkor a mély zónákban lévő kollagénexpressziós változások inkább a szubchondrális csont felől érkező hatásokkal hozhatók összefüggésbe (Yu és mtsai., 2016). Azaz kísérleteink során pontosan feltérképeztük a porc felszíni és mély zónáiban lévő változásokat, melyek felelősek lehetnek a porc időskori szerkezeti átalakulásának és sérülések, degenerációs folyamatok korfüggő elfordulásának gyakoriságával. Ahhoz, hogy ezen eseményeket valamilyen szinten kontrollálni, vagy esetleg terápiásan kezelni tudjuk, kerestünk egy olyan lehetséges mechanizmust, mely általános védő szereppel bír és a mellékhatásai minimálisak. Ezért esett választásunk a korábban részleteiben tárgyalt PACAP neuropeptidre. Azonban arról nem rendelkezünk pontos információval, hogy a PACAP legfontosabb receptorának a PAC1-nek milyen a zonális eloszlása és a kor előrehaladtával. változik-e expressziója az ízületi porc egyes területein.

Kísérletein során ezért immunhisztokémiai módszerrel azonosítottuk a PAC1 receptort lokalizációját és a jelintenzitásból megpróbáltunk következtetni annak expressziós változásaira. Eredményeinkből kiderül, hogy a PAC1 receptor az kortól függetlenül azonosítható a felszíni zónákban, bár expressziója és membránjelenléte folyamatosan csökken a kor előrehaladtával. Ugyanakkor az is elmondható, hogy a mélyebb zónákban is jelen van a receptor és csont-porc átalakulásban is fontos szerepet játszik. Korábban már laboratóriumunkban kimutatták, hogy a csontosodást is pozitívan befolyásolja UMR-106 sejteken (Juhász és mtsai., 2014), valamint a callusképződést is pozitívan befolyásolja (Józsa és mtsai., 2021) azaz nem meglepő, hogy a porc mély zónáiban is erős expressziót detektáltunk. Számunkra azonban lényeges eredmény felszíni zónában való jelenléte, hiszen egy jövőben intraarticulárisan alkalmazott PACAP

injekció leginkább ezeken a felszíni zónában elhelyezkedő chondrocytákon fejtheti ki jótékony hatását.

Kísérleteink során kapott eredményeink így felvetik annak a lehetőségét, hogy egyébként az emberi szervezetben normál körülmények között is termelődő neuropeptid alkalmazása intraarticulárisan fokozhatja a porcmátrix termelődését és gátolhatja a porcdegenerációs folyamatokat. Így további kísérleteket tervezünk ennek bizonyítására állatmodelleken, oly módon, hogy patkányok térdízületeiben mesterségesen osteoarthritiszt indukálunk és PACAP intraarticulárisan adagolva nyomon követjük a neuropeptid porcvédő hatásait.

6. Irodalomjegyzék

Józsa G. ; Fülöp B.; Kovács L.; Czibere B. ; Szegeczki, V.; Kiss T.; Hajdú T.; Tamás A.; Helyes Zs.; Zákány R.; Reglődi D.; Juhász T.: Lack of Pituitary Adenylate Cyclase–Activating Polypeptide (PACAP) Disturbs Callus Formation
JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE (2019)

G. Józsa, V. Szegeczki, A. Pálfi, T. Kiss, Zs. Helyes, B. Fülöp, Cs. Cserhádi, L. Daróczy, A. Tamás, R. Zákány, D. Reglődi and T. Juhász:
Signalling Alterations in Bones of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Gene Deficient Mice.
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2018

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, 567–574.

Juhász T.; Helgadottir S. L.; Tamás A.; Reglődi D.; Zákány R.
PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis
PEPTIDES 66 pp. 51-57. , 7 p. (2015)

Juhasz, T ; Matta, C ; Katona, E ; Somogyi, C ; Takacs, R ; Gergely, P ; Csernoch, L ; Panyi, G ; Toth, G ; Reglodi, D; Zákány R.
Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Signalling Exerts Chondrogenesis Promoting and Protecting Effects: Implication of Calcineurin as a Downstream Target. PLOS ONE 9 : 3 Paper: e91541 , 15 p. (2014)

Rölich Pál Szövektan 4.kiadás ISBN: 9789633313220

E. Szentlélek, V. Szegeczki, E. Karanyicz, T. Hajdú, A. Tamás,
G. Tóth, R. Zákány, D. Reglődi and T. Juhász
Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Reduces Oxidative and Mechanical Stress-Evoked Matrix Degradation in Chondrifying Cell Cultures
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2019

Sandor, B ; Fintor, K ; Felszeghy, S ; Juhasz, T ; Reglodi, D ; Mark, L ; Kiss, P ; Jungling, A ; Fulop, BD ; Nagy, AD et al.
Structural and Morphometric Comparison of the Molar Teeth in Pre-eruptive Developmental Stage of PACAP-Deficient and Wild-Type Mice.
JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE 54 : 3 pp. 331-341. , 11 p. (2014)

Szegeczki, Vince* ; Bauer, Balázs* ; Jungling, Adél ; Fülöp, Balázs Daniel ; Vágó, Judit ; Perényi, Helga ; Tarantini, Stefano ; Tamás, Andrea ; Zákány, Róza ; Reglődi, Dóra**;

Juhász, Tamás**.

Age-related alterations of articular cartilage in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene-deficient mice

GEROSCIENCE: OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN AGING ASSOCIATION (AGE) 41 : 6 pp. 775-793. , 19 p. (2019)

Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H.

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery.

Pharmacol Rev. 2009 Sep;61(3):283-357.

G. Józsa, B. D. Fülöp, L. Kovács, B. Czibere, V. Szegeczki, T. Kiss, T. Hajdú, A. Tamás, Zs. Helyes, R. Zákány, D. Reglődi, T. Juhász

Lack of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Disturbs Callus Formation.

Journal of Molecular Neuroscience (2021) 71:1543–1555

G. Lauretta, S. Ravalli, M. A. Szychlinska, A. Castorina, G. Maugeri, A. G. D'Amico, V. D'Agata, G. Musumeci,:

Current knowledge of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in articular cartilage.

Histol Histopathol 35(11):1251– 1262 (2020)

T. Kvarik, D. Reglodi, D. Werling, A. Vaczy, P. Kovari, E. Szabo, K. Kovacs, H. Hashimoto, T. Ertl, J. Gyarmati, T. Atlasz.:

The Protective Effects of Endogenous PACAP in Oxygen-Induced Retinopathy

JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE (2021) 71:2546–2557

E. Laszlo, T. Juhasz, A. Varga, B. Czibere, K. Kovacs, P. Degrell, G. Horvath, G. Jancso, P. Szakaly, A. Tamas, D. Reglodi.

Protective Effect of PACAP on Ischemia/Reperfusion-Induced Kidney Injury of Male and Female Rats: Gender Differences.

JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE 2019 Jul;68(3):408-419.

D. Reglodi, T. Atlasz, E. Szabo, A. Jungling, A. Tamas, T. Juhasz, B. D. Fulop, A. Bardosi

PACAP deficiency as a model of aging.

GeroScience (2018) 40:437–452

Szentlélek E, Szegeczki V, Karanyicz E, Hajdú T, Tamás A, Tóth G, Zákány R, Reglődi D, Juhász T.

Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Reduces Oxidative and Mechanical Stress-Evoked Matrix Degradation in Chondrifying Cell Cultures.

Int J Mol Sci. 2019 Jan 4;20(1):168. doi: 10.3390/ijms20010168. PMID: 30621194 Free PMC article.

Basso PR, Carava' E, Protasoni M, Reguzzoni M, Raspanti M.

The synovial surface of the articular cartilage. *Eur J Histochem.* 2020 Jul 1;64(3):3146. doi: 10.4081/ejh.2020.3146.

Yu D, Xu J, Liu F, Wang X, Mao Y, Zhu Z.

Subchondral bone changes and the impacts on joint pain and articular cartilage degeneration in osteoarthritis.

Clin Exp Rheumatol. 2016 Sep-Oct;34(5):929-934. Epub 2016 Aug 31.

7. Függelék

Önállóan végzett munkák:

- Metszetkészítés
- Szövetteni festések
- Immunhisztokémia
- Relatív porcvastagság meghatározás

Segítséggel végzett munkák:

- Konfokális mikroszkóp használata