

Záróbeszámoló: OTKA K 100144

Témavezető: Dr. Gábrriel Róbert

Metabolikus eredetű retinadegenerációk és kivédési lehetőségek neuropeptidok és analógjaik segítségével

A jelen pályázat beadásakor két potenciálisan neuroprotektív neuropeptid, a szomatostatin és a hipofízis eredetű adenilát cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP), valamint analógjaik tesztelését tűztük ki célul két kiemelten fontos retinális kórkép állatmodelljében, az ischemiás retinakárosodásban és a diabéteszes retinopátiában. Előbbi az öregkori makuladegenerációt modellezi, a második pedig a cukorbetegség szövődményeként alakul ki emberben. Munkánk fő célja az volt, hogy lerakjuk az alapjait egy olyan preklinikai vizsgálat sorozatnak, ami potenciálisan gyógyszerfejlesztés irányába mutathat.

Hamar kiderült, hogy a szomatostatin retinális sst4-es receptorához fűzött reményeink nem váltják be a hozzájuk fűződő várakozást (sst4 receptor knockout (KO) állatok retinája sem ischemiában, sem diabéteszben nem reagál fokozottan a károsító hatásokra). Az sst2-es receptor neuroprotektív hatását és az sst2 receptoron ható peptid analóg, az oktreotid potenciális terápiás felhasználását korábban már más kutatócsoportok (Termos és munkacsoportja, Simo és munkacsoportja) leírták. Ezért ezt a kutatási irányt egy év után nem folytattuk tovább. Ugyanakkor a PACAP-hatás kutatása területén több ágon folyó, számos eredményt hozó kísérletet végeztünk el. Különösen érdekesnek bizonyultak a különböző PACAP receptorok (PAC-1, VPAC-1 és VPAC-2) által közvetített, olykor divergáló hatások. Ezeket az eredményeket az alábbiakban ismertetem:

1. A PACAP hatásmechanizmusának tanulmányozása ischemia-indukálta retinadegenerációban

Megállapítottuk, hogy bilaterális arteria carotis communis tranziens elkötése után vizsgálva a PACAP KO egerek retinája érzékenyebb volt a tranziens ischemiára, mint normál társaiké (Szabadfi és mtsai, Neurotox Res 2012). Hasonló, még nem publikált megfigyelést tettünk a szemnyomás növekedését előidéző beavatkozás után is. A szövettani és neurokémiai védelem mellett ebben a modellben egyértelműen kimutatható volt a funkcionális protekció is, amit elektroretinográfiás módszer alkalmazásával mutattunk be (Dányádi és mtsai, J Mol Neurosci 2014). Így ez volt a harmadik olyan retinakárosodás-modell, amiben a hisztológiai és neurokémiai protekcióval paralel bizonyítani tudtuk a PACAP funkcionális védőhatását is (korábban megmutattuk ezt az UV-A sugárzás indukálta és a monosodium-glutamát-indukálta retinadegenerációkban). **A PACAP-ot egyre inkább úgy tekintik az irodalomban, mint egy jótékony endogén protektív faktort, amely nézet kialakulásához számos fent is említett eredeti és egy review közleménnyel mi is hozzájárultunk (Reglodi és mtsai, J Mol Neurosci 2012). Ez a nézet mára már más idegrendszeri struktúrák esetében is elfogadottá vált.** Jelenleg áll publikálás alatt az a munka, ami PACAP KO egerek retinájának felgyorsult ütemű öregedését bizonyítja (Kovács-Valasek és mtsai, közlésre benyújtva), további adalékokat szolgáltatva e tézis bizonyításához.

A PACAP KO egértörzs retinájának neurokémiai elemzését is lefolytattuk mintegy 10 sejt-specifikus marker használatával. Ez a munka jelenleg is folyamatban van. Különösen érdekes, hogy a pigment epitél sejtek megemelkedett RAGE (receptor for advanced glycation end-products) szintet mutatnak. A western blot kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a GFAP szint időskorban drasztikusan megemelkedik. Emellett egyelőre mindössze a pálcika-bipoláris sejtek markere, a PKC α enzim szintjének a KO állatokra jellemző csökkenése és a PAC-1 receptor expressziós szintjének csökkenése mutatható ki. A munkát még folytatni kell, hogy publikálásra érett állapotba hozzuk. A kísérletek a végső fázisban vannak, a cikk megírása a jövő év közepére várható.

Ugyancsak megállapítottuk, hogy a PACAP peptid közeli rokona, a vazóaktív intestinális peptid (VIP) is mérsékelten protektív hatású, de ezt a hatást 2 nagyságrenddel nagyobb koncentrációban fejt ki, mint a PACAP (Szabadfi és mtsai, J Mol Neurosci 2012). A PACAP mind a három fent említett receptorhoz kötődik, de a PAC-1 receptor mintegy ezerszer hatékonyabban közvetíti a hatást szignál-transzdukcióján keresztül, mint a másik két receptor. A VPAC receptorok (különösen a VPAC-1 receptor) kevésbé hatékony szignál-transzdukcióval bír. Ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy a PACAP a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) útvonalon keresztül gyulladáshoz vezető folyamatokban résztvevő citokineket képes aktiválni (Szabo és mtsai, Neurosci Lett 2012). Valószínűsíthető, hogy ez az aktiváció a VPAC-2 receptorokon keresztül történik. Annak kiderítése, hogy ebben az aktivációban mely retinális sejt(ek) vesznek részt, még további vizsgálatokat igényel.

2. A diabéteszes retinopátia streptozotocin-indukálta modelljének beállítása, a PACAP védő hatásának kimutatása

Az időskori retinabetegségek egyik leggyakoribb formája a cukorbetegség szövődményeként alakul ki. Ennek modellezése és kísérletes vizsgálata folyt a jelen pályázat keretei között. Mint azt a szakirodalom bőségesen bizonyítja, az akut streptozotocin-indukálta diabétesz modell jól működik patkányokban. Munkacsoportunk vizsgálta, hogy a PACAP kifejti-e védő hatását ebben a modellben a patkány retinában, és hogy ennek mi a manifesztációja szöveti, sejt és molekuláris szinteken. Sikeresen bizonyítani, hogy a fotoreceptorok, a dopaminerg sejtek és a dúcsejtek diabétesz-indukálta degenerációja lassul PACAP kezelés hatására. A dopaminerg amakrin sejtek mozaikja szétesik, és maguk a sejtek is degeneratív elváltozásokat mutatnak, végül elhalnak. PACAP hatására ez a folyamat lelassul, sőt visszafordulni látszik az egyes dopaminerg sejtek vonakozásában. Ennek valószínűleg az a fő oka, hogy a PAC-1 receptor upregulálódik egyes dopaminerg sejtekben (Szabadfi és mtsai, Cell Tissue Res 2012). A PACAP hatás elsősorban az apoptózis gátlásán alapszik, és ez a hatás azokban a dopaminerg sejtekben egyértelmű, ahol a PAC-1 receptor a károsodás hatására megjelent (Szabadfi és mtsai, Neurochem. Int 2014). PACAP adásakor felszaporodik az anti-apoptotikus útvonalak aktivált (foszforilált) proteinjeinek a mennyisége és csökken a pro-apoptotikus útvonalak aktivitása. Megmutattuk továbbá, hogy a PACAP nemcsak a neuronális elemeket védi, hanem hatása kiterjed a pigment epitél sejtekre és a belső határhártya (inner limiting membrane –gliasejtek által létrehozott határfelület a szem üvegtestje felé) elemeire is (Szabadfi és mtsai, Neurotox Res 2016). Meg kell jegyeznünk ugyanakkor, hogy a legeredményesebb diabéteszes retinakárosodás elleni védelemnek krónikus diabéteszben a hosszútávú, lassan adagolt inzulin bizonyult (Hajna és mtsai, J Pharmacol Toxicol Meth 2016). **Ez fontos közegészségügyi indikáció: a diabétesz alapbetegség megfelelő kezelése/kordában tartása jótékony hatással van a diabétesz indukálta egyéb tünetekre (retinopátia, nefropátia és neuropátia) is.**

3. A PAC-1 receptor expressziójának változása és hatásmechanizmusának analízise

A PAC-1 receptor izoformák posztnatális fejlődésének elemzése során kimutattuk, hogy a P5-P10 periódusban a Hip izoforma dominanciája megszűnik és a Hop1 izoforma kerül túlnyomó többségbe (ez a felnőttre jellemző mintázat is). Ez az eredmény előrevetíti annak lehetőségét, hogy a fejlődés egyes kulcslépései (a neurogenesis lezárása és a szinaptogenezis második fázisának megkezdése) összefüggésben lehet a receptor izoforma váltással (Lakk és mtsai, Invest Ophthalmol Vis Sci 2012). Az izoforma váltást a P6 és P7 napra tesszük vizsgálataink alapján. Úgy tűnik, hogy az izoformaváltás szabályozásában két microRNS, a miR137 és a miR147 is részt vehet, ennek bizonyítása további vizsgálatokat igényel.

Az izoforma váltást Taqman és SybrGreen-alapú kvantitatív PCR vizsgálatokkal is megerősítettük. Ezután elkezdtük PAC1-R-expresszáló retinális sejtek neurokémiai azonosítását. Immuncitokémiai vizsgálatokban a PAC1-R ellenes antitestekkel együtt, egyszerre alkalmaztuk az anti-calbindin, anti-protein kinase C, anti-glutamine synthetase, anti-HPC1 és az anti-Brn3a antitesteket. A kettős jelölés megmutatta, hogy P5 és P10 között ganglion, amakrin és horizontális sejtek, valamint kisebb mértékben pálcika-bipolárisok és a Müller-féle gliasejtek nyúlványai tartalmaztak PAC1-receptort. PACAP hatására több horizontális és ganglion sejt, de kevesebb bipoláris és amakrin sejt képződik. Ezeket az eredményeket alaposan kvantifikáljuk jelenleg, amint a mennyiségi elemzés elkészül, megírjuk közlésre ezt a rendkívül érdekes anyagot. **A felfedezésnek elvi jelentősége is van, mert ez azt is jelenti, hogy az egyes endogén faktorok belső egyensúlya meghatározhatja a fejlődés során képződő sejtek fenotípusát.**

Miután a Hop1 receptor másféle szignál-útvonalakat tud aktiválni, mint a Hip izoforma, az izoformaváltás egyúttal sejtфизиологiai változásokat is eredményezhet ebben a nagyon szenzitív retinális fejlődési periódusban (Dénes et al., Cell Tissue Res., 2014; Lakk Mónika, PhD értekezés, 2015). Ugyancsak a PhD értekezésben került leírásra, hogy a **PACAP korai posztnatális intravitreális injekciója számos gén expresszióját megváltoztatja, kiemelten a növekedési és differenciációs faktorokét** (Gdf3, Bmp 4 és 9, Fgf 1,2 és 4). Az expresszió mRNS szintű változásának protein szintű validációja folyamatban van, az eredményeket várhatóan 2017-ben tudjuk benyújtani közlésre. Kimutatásra került ugyanakkor, hogy egyes estekben és életkorokban a PACAP nem a klasszikus PAC-1 receptor-cAMP útvonalon fejti ki neuroprotektív hatását, hanem a foszfolipáz C útvonalat aktiválja (Lakk és mtsai, Neurochem Res 2015). Ennek a felfedezésnek az elméleti jelentősége abban áll, hogy a PACAP hatás már a receptorkötés után közvetlenül diverzifikálódik, megsokszorozva a degeneratív hatásokra adott sejt szintű válasz lehetőségeit.

4. Volatilis anesztetikumok, ingergazdag környezet és szociális izoláció hatása retinadegeneráció során

A PACAP hatás vizsgálatára irányuló kísérleteink „mellékterméke” volt két érdekes, még nem teljesen tisztázott háttérű neuroprotektív eljárás bemutatása a retina esetében. Nagy meglepetésünkre, volatilis altatószerekkel mind pre- és posztoperatív kondicionálással ischémia elleni védelmet tudunk elérni (Szabadfi és mtsai, J Mol Histol 2012). Ezek hatásmechanizmusa teljesen tisztázatlan, de biztosan nem a szokványos G-protein kapcsolt szignál-transzdukción keresztül közvetítettek. Az idegrendszer fejlődését és regenerációját nagyon sok esetben segíti az ingergazdag környezet és a társas kapcsolatok élénkítése. Munkánk során kimutattuk, hogy nemek közötti különbség figyelhető meg a folyamatban. A gazdagított környezet mérsékelten retinoprotektív hatásának bizonyult. Ha azonban szociális izolációt idézünk elő, erre a nőstény állatok sokkal rosszabbul reagálnak, náluk a gazdagított környezet védő

hatása szociális izolációban gyakorlatilag elenyészik. A hím állatok jobban viselik az izoláltságot, regenerációs kapacitásuk kevésbé csökken ilyen körülmények között (Kiss és mtsai, Int J Mol Sci 2013).

5. A kutatás témájához kapcsolódó Review közlemények

A fent már említett review-n kívül három további fontos review közleményt is írtunk az elmúlt időszakban. Ebből kettőt alapvetően kötődik a pályázat témájához. Az egyikben áttekintettük a humán diabéteszes retinopátia peptiderg terápiás lehetőségeit (Gábrriel, Brit J Clin Pharm 2013). Lényegesen hosszabban és részletesebben, eredeti kísérleti anyagot is bemutattunk egy másik cikkben (Szabadfi és mtsai, Int R Cell Mol Biol 2014), ahol bizonyítottuk a retina gliális (Müller) sejtjeinek aktivációját diabéteszben és megmutattuk, hogy a protektív folyamatok során immunelemeket is mozgósít a szervezet a diabéteszes károsodás elleni védekezésben.

A harmadik review kicsit messzebb esik a pályázat eredeti tematikájától. Ebben a retinális elektromos szinapszisok szerkezetét és működését vettük górcső alá. Ez utóbbi azért fontos, mert mint az utóbbi időben kiderült, a gap junction-ok potenciális halál-szignált terjesztő útvonalként is megjelentek az elmúlt időszak irodalmában. Ugyanakkor elégtelen működésük is komoly zavarokat okozhat a retinális információ-feldolgozásban (Völgyi és mtsai, Prog Retinal Eye Res 2013).

Összegezve, a pályázati futamidő alatt a munkatervben leírt főbb célkitűzések megvalósultak. Csoportunk 25 tudományos közlemény (összesített hatástényező mintegy 80) közölt, ebből 15-öt (összesített hatástényező mintegy 50) ennek a pályázati forrásnak a támogatásával.



Dr. Gábrriel Róbert

vezető kutató

Pécs, 2016.november 28.