

Összefoglalás

A vizsgált periodusban a vállalt feladat több neuropeptidnek mint a PACAP 38, orexin A és B endomorphin-1, a MERF, apelin-13, urocortin 1, 2 és 3, valamint a ghrelinnek vizsgálata olyan idegrendszeri funkciókban mint a tanulás és memória, az állat mozgás aktivitásában új környezetben, mint az open-field aktivitásban, és megszokott környezetben telemetriásan mérve, testhőmérséklet változásában, valamint a hypophysis-mellékvesekéreg rendszer aktivitásában.

A hatások mechanizmusára vonatkozó vizsgálatokban annak kiderítésére, hogy a kapott változásokban milyen transzmitterek vesznek részt, az állatokat a megfelelő receptor blokkolókkal vagy antiserumokkal kezeltük és vizsgáltuk a neuropeptid hatásában létrejövő változásokat.

Az egyes neuropeptidok hyperthermiával kapcsolatos vizsgálataink során angol kutatókkal végzett kooperációban találtunk rá az isatinra, amely olyan lázcsillapítónak bizonyult, amely a prostaglandin után fejti ki hatását és amelynek egyes analogjai ezerszer erősebb lázcsillapítók mint az isatin maga. Ezek az eredmények jelenleg szabadalmaztatási eljárás alatt állnak.

A részletekre vonatkozó eredmények a részletes részben találhatóak.

Summary

In the reported period the aim was to find out the action of certain neuropeptides on such brain function as learning and memory, locomotion in nonfamiliar environment (open-field activity) and familiar environment, in the animals home cage, measured by telemetric measurement, body temperature and pituitary-adrenal function. The following neuropeptides were used: PACAP 38, orexin A and B, endomorphin-1, MERF, apelin-13, urocortin 1, 2 and 3 as well as ghrelin.

In order to learn the mechanism of action, the involvement of transmitters in the action of neuropeptides, different receptor blockers or antisera against peptide were utilized.

During the study of the action of certain neuropeptides on body temperature, which was carried out collaboration with British partners, we discovered that isatin has strong antipyretic action and the action is located after the prostaglandin synthesis, because even the PG-induced higher temperature can be blocked by isatin. We have found that some analogues of isatin thousand times are more potent antipyretics than the isatin itself. These observation are under patenting procedure.

The details are in the following section.

Részletes beszámoló:

A kutatási periodusban a fő feladat több neuropeptidnek a központi idegrendszer működésének különböző aspektusaira kifejtett hatásának vizsgálata, valamint különböző neurotranszmitterekkel

történető interakció volt. Az alábbi neuropeptidok vizsgálatát végeztük:

-2-

PACAP 38, orexin A és B., endomorphin-1., proenkephalin derivátum (met-enkephalin-arg-phe, MERF), apelin-13, urocortin 1, urocortin 2, urocortin 3, ghrelin.

A vizsgálatokat kiterjesztettük a hatásmechanizmus vizsgálatára is nevezetesen, hogy a neuropeptidok által kiváltott hatásban milyen transzmitterek, esetleg más neuropeptidok vagy prostaglandinok vesznek részt.

Orexin A hypothermiát okoz, mely hatás az NPY-on keresztül realizálódik, NPY antagonisták hatást kivédi.

A orexin A és orexin B fokozta a hypothalamo-hypophysealis mellékvesekéreg rendszer aktivitását. A CRF antagonisták a CRF 9-41 és az NPY antagonisták kivédte az orexinek mellékvesekéreg szekréciót stimuláló hatását. Ez arra mutat, hogy az orexinek hatása centrális lenne, részben a CRF, részben az NPY-on keresztül mediált.

Az orexin A javította a passzív elhárításos magatartás folyamatait. A következő receptorok blokkolása gyengítette a tanulással kapcsolatos folyamatokat: dopaminerg, alfa- és beta-adrenerg, cholinerg, GABAerg és opiat, valamint nitrogén-monoxid képződés gátlása.

A PACAP 38 az oldalsó agykamrába adva átmenetileg csökkentette az állatok mozgásaktivitását főleg a 3 és 6 órás tesztben. A 24 órás tesztelésben a különbségek eltűnnek. A PACAP 38 mozgásaktivitásra kifejtette hatása felfüggeszhető volt az alábbi receptor blokkolókkal: propranolol, naloxon, PACAP antagonisták PACAP 6-38, valamint CRF antagonisták és PACAP antiserum. Atropin és nitro-L-arginin, bicucullin, methysergid hatástalan volt.

Az aktív elhárító magatartás kioltását a PACAP 38 átmenetileg fokozta. PACAP antagonisták és a PACAP ellenes antiserum a hatást felfüggesztette. Az alábbi receptorblokkolókkal a hatás kivédhető volt: propranolol, haloperidol, naloxon, bicucullin és nitro-L-arginin. A phenoxybenzamin és az atropin hatástalan volt. 24 óra múlva a kioltás kontroll fölé emelkedett. Az ezt követő 10 napon keresztül elvégzett tesztelés azt mutatta, hogy az egyszeri PACAP kezelés a memória rögzülését hosszú távon jelentősen erősítette. A kontroll állatok a 7-ik napon már a tanult feleletet elfelejtették, míg a PACAP kezelt állatok 70 % pozitív választ adtak.

A PACAP 38 az oldalsó agykamrába adva hyperthermiát okoz. A noraminophenazon, valamint a PACAP 38 ellenes antiserum, kivédte a PACAP 38 hyperthermiás hatását. Az apomorphin és a bromocriptin, mint dopamin agonisták, erősítették a PACAP hatását, a haloperidol csökkentette azt.

A PACAP 38 és az endogén indol (indol-2,3-dion)-al kapcsolatos vizsgálatainkban a következő megállapításokat tettük: A PACAP 38 az oldalsó agykamrába adva patkányokban emeli az állatok testhőmérsékletét a 2 órában, mely hatás a 6-ik óráig tart, majd a hyperthermia csökken. Az isatin előkezelés kivédi a PACAP hyperthermiás hatását, azonban egymagában nem volt hatással a alap testhőmérsékletre.

Korábbi vizsgálatok folytatásaként megvizsgáltuk az endorfin-1

-3-

(EMI) endokrin és magatartási hatásában milyen transmitter mechanizmusok játszanak közre.

In vitro eredmények arra mutatnak, hogy az EMI hypophysis-mellékvesekéreg rendszert aktiváló hatása a hypothalamuson keresztül történik, mert a hypophysis ACTH szekrécióját vagy a mellékvesekéreg corticosteron szekrécióját közvetlenül nem befolyásolta.

Nitro-L-arginin, amely gátolta a nitrogen monoxid képződést, gátolta az EMI által kiváltott corticosteron szekréció fokozódást az állatok lokomotoros aktivitását és az ágaskodási reakcióját open-field tesztben. Ezzel szemben a haloperidol gátolta az EMI magatartási hatását, de nem befolyásolta a mellékvesekéreg stimulációját. Az EMI in vitro rendszerben a dopamin kibocsátását nem befolyásolta, azonban potenciozta az elektromos ingerlés által kiváltott dopamin kibocsátását. Ez a hatás nitro-L-argininnel gátolható volt.

A proenkephalin derivátum, a met-enkephalin-arg-phe (MERF) hatását vizsgáltuk a fenti tesztekben. A MERF fokozta a mellékvesekéreg szekréciót és az open-field aktivitást. A nem-szelektív opioid antagonist, a naloxon és a kappa antagonist nor-binaltorphin (nor-BNI) gátolta a mellékvesekéreg stimuláló hatást. Naloxon kivédte az open-field aktivitásra kifejtette hatást, míg a nor-BNI hatástalan volt. A CRH antagonist blokkolta mind a mellékvesekéregre, mind az open-field aktivitásra kifejtett hatást. A haloperidol csak az open-field aktivitásra kifejtette hatást védte ki. A MERF hatástalan volt in vitro rendszerben, mind a dopamin alapszekrécióra, mind az elektromos ingerrel kiváltott szekréció fokozásra.

A 4-aminopiridinnel kiváltott görcsaktivitás összefüggését vizsgáltuk a striatum különböző transmitterek kibocsátására mikrodialízissal és a c-Fos immunaktivitásra. A 4-aminopiridin magasfrekvenciájú görcsaktivitást eredményezett és emelte a microdializátum glutamát, aspartát, GABA, serotonin, noradrenalin és dopamin szintjét. A c-fos aktivitás fokozódása legjobban a glutamát szinttel korrelál. A görcs megszűnése a GABA emelkedésével mutatott összefüggést.

Az újonnan felfedezett apelinrel kapcsolatban az alábbi vizsgálatokat végeztük: Az apelin fokozta az állatok open-fieldben mért lokomócióját és az ágaskodások számát, növelte a magtemperaturát telemetrikusan mérve, azonban nem volt hatással az állatok spontán aktivitására. A dopamin antagonist haloperidol és a nitro-L-arginin csökkentette az állatok open-field aktivitását. Az apelin okozta magtemperatura emelkedés cyclooxygenáz gátló noraminophenazonnal kivédhető, ha azt 2 órával adtuk az apelin után. CRH és nitro-L-arginin hatástalan volt.

Isatinnal kapcsolatos vizsgálataink folytatásaként megvizsgáltuk, hogy az isatin hogyan hat a patkány vérlemezkék eicosanoid szintézisére in vitro körülmények között.

Az isatin kezelés in vivo történt, majd ezt követően a patkány

vérlemezekék eicosanoid szintézisét mértük in vitro C-14 jelölt arachidonsavból. Az isatin 50 mg/kg dózisban csökkentette a lipoxigenázok szintézisét, míg a cyclooxygenáz bioszintézisét

-4-

stimulálta. A vasoconstrictor cyclooxygenáz metabolitok szintézise fokozódott, a vasodilatátor PGE₂ és a PGD₂ szignifikánsan csökkent, ugyanakkor a 12-hydroxyheptadecatriénsav szint emelkedett.

Az elmúlt évben kimutattuk, hogy az isatin képes több neuropeptid mint az ANP, BNP, CNP és PACAP 38 által kiváltott hyperthermiát kivédeni. Egyes analogjai kitűnő lázcsillapítók és a lázcsillapítás mechanizmusában a hatás a prostaglandin után következik be, amely egy új hatásmechanizmusu lázcsillapításra utal. Az ezzel kapcsolatos eredmények szabadalmaztatási eljárás alatt vannak.

Az elmúlt években a CRF család új neuropeptidjeit fedezték fel mint az urocortin 1-t, urocortin 2-t és az urocortin 3-at.

Kimutattuk, hogy az urocortin 1 javítja a passzív egytársításos elhárító tanulást, a memória konszolidációját és a visszahívás folyamatait.

A memória rögzülés folyamataiban a következő receptorok vesznek részt : dopamin , acetilcholin, alfa-adrenerg, GABA, CRF 1 és serotonerg. Az opiátok és nitrogén-monoxid hatástalan.

Urocortinok (Uro 1, uro 2 és uro 3) agykamrába adva átmenetileg dózishatás összefüggésben fokozták a colon temperaturát. Cyclooxygenáz gátló noraminophenazon az urocortin hatását kivédte mutatva, hogy az urocortinok testhőmérséklet fokozó hatását a prostaglandinokon keresztül fejtik ki. (Közlésre elküldve a Reg.Peptides-ba).

Az urocortinok további vizsgálataiban a patkányok striatum szeleteinek dopamin kibocsátását vizsgáltuk elektromos ingerlés hatására in vitro körülmények között. Kimutattuk, hogy a CRH és az urocortin 1 fokozza a dopamin release-t. Ez a hatás CRF1 receptor blokkolóval, antalarminnal felfüggeszthető, a CRF2 receptor blokkoló, az astressin-2B hatástalan. Az urocortin 2 és urocortin 3 hatástalan volt. (Közlésre elfogadva a Neurochemical Res.-ben).

Újabb vizsgálatainkban a ghrelin hatását analizáltuk az állatok mozgásaktivitására, a mellékvesekéreg működésére és a colon temperaturára.

Megállapítottuk, hogy ghrelin hatására az "open fieldben " mért mozgásaktivitás fokozódik, míg a spontán aktivitásra csak a nagyobb dózis volt hatással. A CRH antagonistá és a haloperidol ezt a hatást kivédte.

A ghrelin növelte a perifériás vér corticosteron szintjét, amely hatás serotonin receptor blokkoló cyprohetidinnel kivédhető volt .

A ghrelin emelte az állatok colon temperaturáját. Ez a hatás a cyclooxygenáz gátló noraminophenazonnal volt kivédhető. (közlésre elküldve a Hormone and Behaviour-ba).