

Received: 2004.10.04
Accepted: 2004.11.09
Published: 2004.11.24

Neuroprotekcjna rola peptydów PACAP, VIP oraz PHI w ośrodkowym układzie nerwowym*

Neuroprotective role of PACAP, VIP, and PHI in the central nervous system

Paulina Sokołowska¹, Agnieszka Dejda¹, Jerzy Z. Nowak^{1,2}

¹ Centrum Biologii Medycznej, Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

² Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii i Farmakologii Klinicznej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową (PACAP), naczyniowo aktywny peptyd jelitowy (VIP) oraz peptyd histydyno-izoleucynowy (PHI) należą do strukturalnie zbliżonej nadrodziny polipeptydów, obecnej w wielu obszarach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Neuroprotekcynny potencjał peptydów PACAP, VIP i PHI stanowi przedmiot intensywnych badań prowadzonych na wielu modelach doświadczalnych. Badania *in vitro* ujawniły udział PACAP w ochronie neuronów przed naturalnie występującą apoptozą w czasie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (o.u.n.) oraz indukowaną przez wiele neurotoksyn, m.in. etanol, nadtlenek wodoru, ceramid C2, białko prionowe, β -amyloid, białko otoczki wirusa HIV (gp120), niedobór jonów potasu lub duże stężenia glutaminianu. Podobnie, doświadczenia prowadzone *in vivo* na modelach ischemii oraz choroby Parkinsona potwierdziły neuroprotekcynne właściwości tego peptydu. Ujawniono, że antyapoptotyczne działania PACAP mogą zachodzić bezpośrednio – przez aktywację szlaków przekazywania sygnału hamujących apoptozę neuronów lub pośrednio przez – uwalnianie z gleju czynników działających neuroprotekcynnie. W odróżnieniu od PACAP, neuroprotekcynne działanie VIP odbywa się przede wszystkim przez pobudzenie ekspresji oraz sekrecji czynników o silnych właściwościach neuroprotekcynnych: czynnika neurotroficznego zależnego od aktywności – ADNF oraz białka neuroprotekcynnego zależnego od aktywności – ADNP. Stwierdzono, że czynniki ADNF i ADNP oraz ich krótsze pochodne ADNF-9 i NAP chronią neurony przed blokadą aktywności elektrycznej, ekscytotoksycznością, niedoborem apoE, niedoborem glukozy, niedokrwieniem oraz toksycznym działaniem etanolu, β -amyloidu i gp120. Potencjał neuroprotekcynny PHI nie był dotychczas tak szeroko badany, ale ostatnie dane literaturowe potwierdziły, że peptyd ten również może spełniać funkcje neuroprotekcynne. Sądzi się, że endogenne peptydy PACAP, VIP i prawdopodobnie PHI mogą stanowić cel nowoczesnych strategii terapeutycznych różnorodnych procesów neurodegeneracyjnych.

Słowa kluczowe:

polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową • PACAP • naczyniowo aktywny peptyd jelitowy • VIP • peptyd histydyno-izoleucynowy • PHI • czynnik neurotroficzny zależny od aktywności • ADNF • białko neuroprotekcynne zależne od aktywności • ADNP

Summary

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), vasoactive intestinal peptide (VIP), and peptide histidine-isoleucine (PHI) belong to a structurally related family of polypeptides pre-

* Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych (KBN), grant nr 2 PO5A 097-26 i grant nr 3 PO4C 076-25 oraz przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, grant nr 502-11-93.

sent in many regions of the central and peripheral nervous system. The neuroprotective potential of PACAP, VIP, and PHI has become a matter of intensive investigations in many animal models. *In vitro* studies revealed that PACAP protects neurons against apoptosis occurring naturally during CNS development and apoptosis induced by a series of neurotoxins, such as ethanol, hydrogen peroxide (H₂O₂), prion protein, β -amyloid, HIV envelope glycoprotein (gp120), potassium ion deficit, and high glutamate concentrations. Similarly, *in vivo* investigations conducted in models of ischemia and Parkinson's disease confirmed the neuroprotective properties of PACAP. It was revealed that the anti-apoptotic action of PACAP can be directly associated with the activation of signal transduction pathways preventing apoptosis in neurons or involve glial cells capable of releasing other neuroprotective factors affecting neurons. In contrast to PACAP, the neuroprotective action of VIP depends mainly on stimulation of astrocytes to produce and secrete factors of extremely high neuroprotective potential, including activity-dependent neurotrophic factor (ADNF) and activity-dependent neuroprotective protein (ADNP). It was shown that ADNF and ADNP, as well as their shortened derivatives ADNF-9 and NAP, prevent neurons from electrical blockade, excitotoxicity, apoE deficiency, glucose deficit, ischemia, toxic action of ethanol, β -amyloid, and gp120. The neuroprotective potential of PHI has not been as thoroughly investigated yet, but recent data have confirmed that this peptide can also function as a neuroprotectant.

It is thought that PACAP, VIP, and possibly PHI may serve as a goal of modern therapeutic strategies in various neurodegenerative disorders.

Key words: pituitary adenylate cyclase activating polypeptide • PACAP • vasoactive intestinal peptide • VIP • peptide histidine-isoleucine • PHI • activity-dependent neurotrophic factor • ADNF • activity-dependent neuroprotective protein • ADNP

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/6595.pdf

Word count: 4660

Tables: 2

Figures: 5

References: 109

Adres autorki: mgr Paulina Sokołowska, Centrum Biologii Medycznej PAN, ul. Tylna 3, 90-950 Łódź; e-mail: psokolowska@cbmim.pan.pl

Wykaz skrótów: **PACAP** – polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide); **VIP** – naczyniowo aktywny peptyd jelitowy (vasoactive intestinal peptide); **PHI** – peptyd histydynoleucynowy (peptide histidine-isoleucine); **GHRH** – sekretyna, hormon uwalniający hormon wzrostu (growth hormone releasing hormone); **PHM** – peptyd histydyno-metioninowy (peptide histidine-methionine)

Polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową – PACAP, naczyniowo aktywny peptyd jelitowy – VIP oraz peptyd histydyno-izoleucynowy – są przedstawicielami rodziny hormonów polipeptydowych, do której należą również m.in. sekretyna, hormon uwalniający hormon wzrostu – GHRH, peptyd histydyno-metioninowy – PHM oraz glukagon [83].

PACAP powstaje z peptydu prekursorowego – preproPACAP – w procesie proteolizy katalizowanej przez konwertazy prohormonów (prohormone convertases – PCs). Peptyd ten występuje endogennie w dwóch postaciach – dominującej, zbudowanej z 38 aminokwasów (PACAP₃₈) oraz występującej w mniejszych stężeniach postaci 27-aminokwasowej (PACAP₂₇) [1,78,83]. Obie postaci różnią się od siebie rozmieszczeniem tkankowym, ale mają zbliżoną aktywność biologiczną.

28-aminokwasowy VIP [38] i 27-aminokwasowy PHI [91] powstają ze wspólnego prekursorowego peptydu, tzw. preproVIP [19,71,83]. Oba peptydy wykazują 48% podobień-

stwa, mając 13 identycznych reszt w sekwencji łańcucha aminokwasowego [54]. Stwierdzono, że prekursor VIP może być ponadto źródłem peptydu zbudowanego z 42 aminokwasów, który jest przedłużoną postacią PHI zwaną peptydem histydyno-walinowym (peptide histidine-valine – PHV) [19,25,106].

Struktura pierwszorzędowa VIP, PACAP i PHI jest dobrze ewolucyjnie zachowana, przy czym najbardziej konserwatywnym peptydem spośród wszystkich hormonów peptydowych jest PACAP (tab. 1). Ma on bowiem identyczną strukturę pierwszorzędową u wszystkich zbadanych dotychczas gatunków ssaków, różniącą się od peptydu ptaków (kura) i płazów (żaba) tylko jednym aminokwasem znajdującym się odpowiednio w pozycji 2 i 35 [2,78,82,83].

PACAP, VIP oraz PHI są szeroko rozpowszechnione w ośrodkowym (o.u.n.) i obwodowym układzie nerwowym kręgowców, gdzie wykazują plejotropową aktywność biologiczną. W o.u.n. VIP i PACAP, a prawdopodobnie również PHI, działają jako czynniki neuroregulatorowe, neuro-

Tabela 1. Porównanie sekwencji aminokwasowych peptydów PACAP, VIP, PHI u różnych gatunków kręgowców

	PACAP
człowiek, owca, mysz, świnka morska, szczur	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKNK
kura	HIDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKNK
żaba	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRIKKNK
łoś	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYRQRYRNK
sum	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGRRYRQRFRNK
jaszczurka	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVL
osłonice 1	HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYLAAVL
osłonice 2	HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYINALL
	VIP
człowiek, krowa, szczur, świnka, pies, koza, owca, mysz, małpa	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN
świnka morska	HSDALFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSVLN
opos	HSDAVFTDSYTRLLKQMAVKKYLDLNSILN
kura, indyk, żaba, aligator	HSDAVFTDNYSRFRKQMAVKKYLNSVLT
dorsz	HSDAVFTDNYSRFRKQMAVKKYLNSVLA
pstrąg	HSDAIFTDNYSRFRKQMAVKKYLNSVLT
	PHI
szczur	HADGVFTSDYSRLLGQISAKKYLESLI
krowa	HADGVFTSDYSRLLGQLSAKKYLESLI
świnia	HADGVFTSDFSRLGQLSAKKYLESLI
człowiek	HADGVFTSDFSRLGQLSAKKYLESLM
złota rybka	HADGLFTSGSKLLGQLSAKEYLESLI
kura	HADGIFTSVYSHLLAKLAVKRYLHSLI
indyk	HADGIFTTVYSHLLAKLAVKRYLHSLI

przekazniki, czynniki neurotroficzne oraz neuroprotektoryjne [1,2,19,36,38,41,45,53,55,64,71,83,87,90,92,98,105].

VIP i PACAP wywierają swoje działania biologiczne poprzez aktywację swoistych receptorów błonowych, które należą do nadrodziny receptorów związanych z białkami G (G-protein coupled receptors – GPCRs). Na podstawie powinowactwa do różnych endogennych ligandów, receptory te podzielono na dwie klasy – receptory typu PAC₁ oraz typu VPAC (obejmujące VPAC₁ i VPAC₂) [47]. Receptory typu PAC₁ preferencyjnie wiążą PACAP, jednocześnie wykazując małe powinowactwo do VIP, natomiast receptory typu VPAC₁ i VPAC₂ mają zbliżone powinowactwo do PACAP i VIP [56,101]. Dane literaturowe wskazują, że także PHI wykazuje słabe powinowactwo do receptorów wspólnych dla VIP i PACAP, tj. receptorów VPAC₁ i VPAC₂. Oddziaływanie PHI z receptorami swoistymi dla PACAP, tj. receptorami PAC₁, wydaje się niewielkie [43,48].

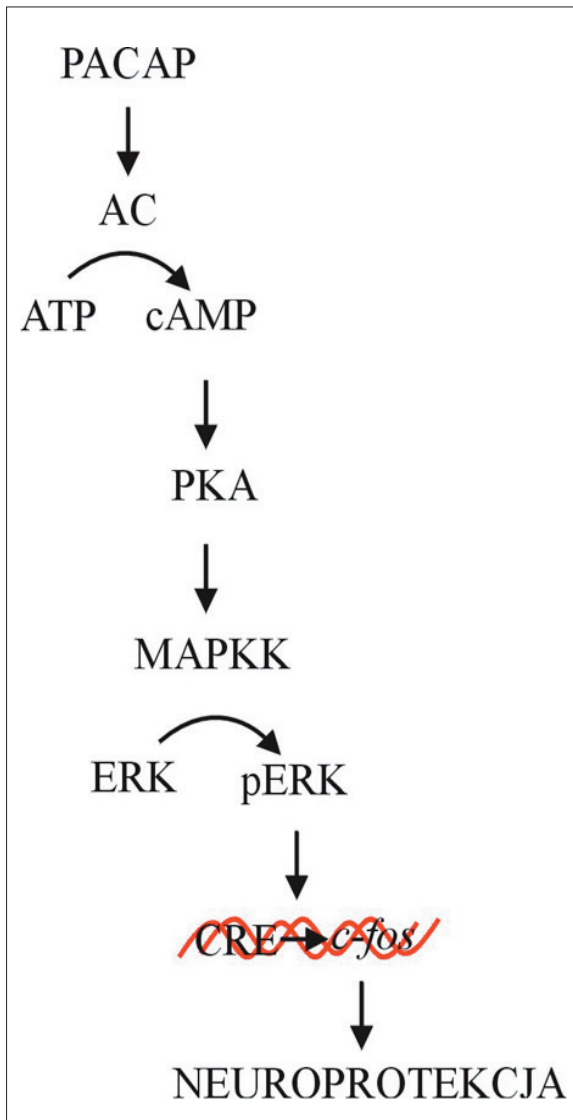
Pobudzenie receptorów PACAP/VIP powoduje uaktywnienie szlaku sygnałowego: cykloaza adenylanowa (AC) → cy-

kliczny AMP → kinaza białkowa A (PKA) [2,56,68,70]. Istnieją również doniesienia o stymulującym wpływie tych receptorów na szlak fosfolipazy C [60,67,69,70,82,94,105] oraz fosfolipazy D [61]. Pobudzenie receptorów PACAP/VIP może ponadto wywołać wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺ [2].

NEUROPROTEKCYJNA ROLA PACAP

Obecność dużych stężeń PACAP i jego receptorów w wielu obszarach rozwijającego się mózgu sugerowała wpływ tego peptydu na procesy proliferacji i dojrzewania neuronów. Okazało się jednak, że PACAP jest nie tylko silnym czynnikiem neurotroficznym, ale także neuroprotektoryjnym, zdolnym do ochrony niedojrzałych neuronów przed naturalnie występującą apoptozą.

Często wykorzystywanym modelem do badań nad neuroprotektoryjnym potencjałem PACAP są komórki ziarniste mózdzku szczurów ze względu na dużą immunoreaktywność dla tego peptydu w okresie intensywnego



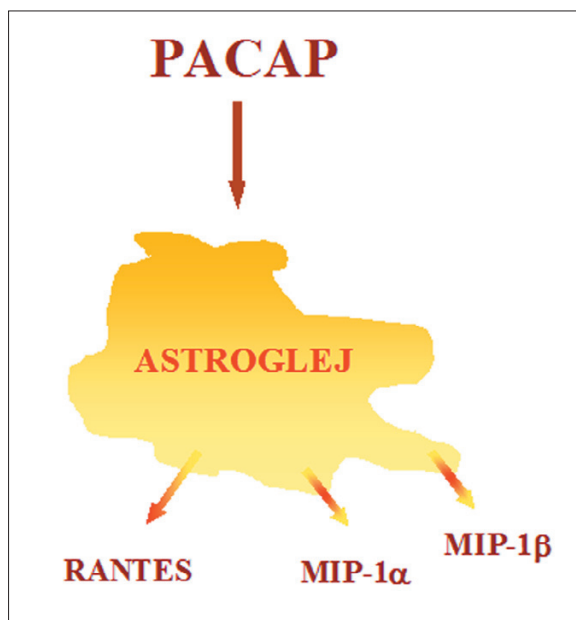
Ryc. 1. Mechanizm bezpośredniego działania PACAP. PACAP za pośrednictwem receptorów PAC₁ aktywuje szlak przekazywania sygnału związany z cyklazą adenylanową (AC)

rozwoju mózdzku oraz obecność dużego stężenia receptorów typu PAC₁ w zewnętrznej warstwie komórek ziarnistych kory mózdzku [5,18,85,98,100,101]. W tym modelu doświadczalnym Gonzalez i wsp. wykazali, że podanie PACAP spowodowało znaczący wzrost liczby żywych komórek mózdzku – nawet do 95% w porównaniu z kontrolą [33]. Badania nad mechanizmem działania ujawniły, że PACAP chronił neurony mózdzku aktywując, poprzez receptor PAC₁, szlak przekazywania sygnału: AC → cAMP → PKA. Aktywacja PKA doprowadziła z kolei do pobudzenia kaskady kinaz MAP (mitogen-activated protein kinase) czego wynikiem była transkrypcja onkogenu *fos* (ryc. 1) [65,95,97]. Wykazano ponadto, że krótkotrwała inkubacja komórek ziarnistych mózdzku z PACAP wywołuje długotrwałą, 48-godzinną ochronę komórek przed śmiercią, co potwierdza, że z neuroprotekcijnym działaniem PACAP jest związana aktywacja genów wczesnej odpowiedzi komórkowej [97,104].

Późniejsze badania przeprowadzone na tym samym modelu wskazują, że mechanizm neuroprotekcynnej aktywności PACAP jest związany z inhibicją aktywności kaspazy 3, enzymu aktywowanego podczas apoptotycznej śmierci niezróżnicowanych neuronów mózdzku. PACAP spowodował zależną od stężenia inhibicję aktywności kaspazy 3 przez aktywację szlaków przekazywania sygnału związanych zarówno z kinazą białkową A (PKA), jak i kinazą białkową C (PKC). W tym przypadku nie dochodziło do aktywacji kaskady kinaz MAP [99].

Ostatnie badania na modelu komórek ziarnistych mózdzku dowodzą, że PACAP chroni neurony nie tylko przed naturalnie występującą apoptozą w czasie rozwoju mózdzku, ale zapobiega także działaniu wielu neurotoksyn. Wykazano neuroprotekcynne działanie PACAP wobec nadtlenu wodoru (jedna z reaktywnych form tlenu, których akumulacja odgrywa podstawową rolę w śmierci neuronów związanej z chorobami neurodegeneracyjnymi i udarem) oraz wobec etanolu (spożycie alkoholu podczas rozwoju płodowego może powodować poważne opóźnienie wzrostu, a także wady rozwojowe płodu i gorszy rozwój dziecka, tzw. płodowy zespół alkoholowy) [102,103]. Podanie PACAP do hodowli komórek ziarnistych poddanych działaniu H₂O₂ spowodowało znaczący wzrost liczby żywych neuronów, co dowodzi, że PACAP zapobiegał apoptozie wywołanej stresem oksydacyjnym. Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach, mechanizm antyapoptotycznego działania PACAP polegał na aktywacji cykazy adenylanowej i w konsekwencji pobudzenia szlaku kinaz MAP. Wcześniejsze badania ujawniły, że apoptoza neuronów mózdzku jest związana z fosforylacją kinazy JNK (Jun N-terminal kinase), natomiast podanie czynnika działającego antyapoptotycznie prowadzi do fosforylacji kinazy ERK (extracellular signal regulated kinase) [46]. W oparciu o te fakty ujawniono, że H₂O₂ powoduje fosforylację JNK, podczas gdy PACAP stymuluje aktywację ERK, uniemożliwiając inicjację procesu apoptozy. Wykazano ponadto, że podanie PACAP wywołało całkowitą inhibicję zaktywowanej, przez reaktywne formy tlenu, kaspazy 3, co stanowi kolejny dowód antyapoptotycznych właściwości PACAP [102]. W przypadku apoptozy spowodowanej działaniem etanolu, PACAP chronił neurony mózdzku przez inhibicję aktywności kaspazy 3 (za pośrednictwem szlaku AC → cAMP) [103]. Peptyd VIP, który wraz z PACAP działa przez wspólne receptory typu VPAC, nie ujawnił neuroprotekcynnej aktywności w obu modelach doświadczalnych, co sugeruje, że PACAP wywiera swoje działania przez receptor PAC₁ [102,103].

Podobny mechanizm działania PACAP stwierdzono po podaniu innej neurotoksyny – ceramidu C2. Ceramidy pośredniczą w procesach odpowiedzi komórkowej na stres, szczególną rolę pełniąc w kontroli programowanej śmierci komórki. Najnowsze badania potwierdzają neurotoksyczny charakter ceramidów wobec komórek ziarnistych mózdzku. Stwierdzono, że podanie ceramidu C2 do hodowli neuronów mózdzku zaktywowało kinazę JNK oraz kaspazę 3, natomiast jednoczesne podanie PACAP i ceramidu C2 wywołało aktywację kinazy ERK, co w konsekwencji doprowadziło do inhibicji kaspazy 3 [96]. Te spostrzeżenia potwierdzają, że neuroprotekcynne działanie PACAP polega na natychmiastowej aktywacji szlaków przekazywania sygnału prowadzących do zahamowania apoptozy neuronów.



Ryc. 2. Mechanizm pośredniego działania PACAP. PACAP stymuluje wydzielanie z astrogleju chemokin RANTES i MIP, które zapobiegają infekcji wirusem HIV

Wykazano także, że PACAP, w sposób zależny od stężenia, zwiększa przeżycie komórek ziarnistych mózdku inkubowanych w medium pozbawionym jonów potasu. Komórki ziarniste mózdku przeżywają i różnicują się w warunkach *in vitro* w obecności depolaryzujących stężeń KCl, co prawdopodobnie jest związane ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i aktywacją kinaz MAP. Niedobór jonów potasu wywołuje apoptozę komórek hodowlanych, którą hamuje podanie PACAP. W tym modelu doświadczalnym PACAP aktywował kinazy MAP przez stymulację szlaku $AC \rightarrow cAMP$ [18]. Najnowsze badania potwierdziły, że mechanizm antyapoptotycznych właściwości PACAP opiera się na hamowaniu aktywności kaspazy 3 przez szlak $AC \rightarrow cAMP \rightarrow PKA$. Jednocześnie aktywacja przez PACAP białkowej kinazy A prowadzi do zablokowania kanału potasowego i wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów potasu, co także hamuje aktywność kaspazy 3 [62].

PACAP jest również efektywnym czynnikiem neuroprotekcijnym wobec toksycznego działania dużych stężeń glutaminianu. Peptyd ten, w sposób zależny od stężenia, zapobiegał śmierci hodowanych neuronów korowych wywołanej działaniem 1 mM glutaminianu, wykazując największą skuteczność w bardzo małym stężeniu 10^{-15} M. Mechanizm działania PACAP w tym modelu doświadczalnym nie został wyjaśniony [63]. Kolejne badania, prowadzone na hodowli neuronalno-glejujowej dowodzą, że PACAP może chronić neurony przed toksycznym działaniem dużych stężeń glutaminianu, działając za pośrednictwem komórek astroglejowych. PACAP, pobudzając ekspresję transporterów glutaminianowych GLT-1 i GLAST intensyfikował wychwyty glutaminianu przez astrocyty, a ponadto – wpływając na ekspresję syntetazy glutaminianowej – pobudzał metabolizm glutaminianu do glutaminy [28].

Antyapoptotyczne właściwości PACAP stwierdzono także wobec neurotoksycznego działania ludzkiego białka prionowego,

fragmentu 106–126. Fragment 106–126 białka prionowego stanowi zasadniczy obszar, w którym dochodzi do inicjacji zmian konformacyjnych natywnego białka prionowego do postaci toksycznej. Podobnie jak w przypadku innych neurotoksyn, PACAP podany do hodowli komórek PC12 hamował aktywność kaspazy 3 przez aktywację szlaku $AC \rightarrow cAMP \rightarrow PKA$ [74]. Na tym samym modelu komórkowym wykazano neuroprotekcyjne działanie PACAP także wobec innej neurotoksyny – β -amyloidu, jednego z czynników wywołujących chorobę Alzheimera. PACAP hamował apoptozę indukowaną β -amyloidem przez inaktywację kaspazy 3 [73].

Neuroprotekcyjne właściwości PACAP wykazano także na modelu hodowlanych neuronów kory mózgowej szczura. PACAP chronił neurony korowe przed toksycznym działaniem gp120 – glikoproteiny otoczki wirusa HIV (glikoproteina ta przyczynia się do neurologicznego upośledzenia związanego z infekcją wirusem HIV powodując zmiany dystroficzne neuronów piramidowych kory mózgowej) [8, 51]. W tym przypadku neuroprotekcyjne działanie PACAP jest pośrednie i zachodzi przez uwalnianie z astrocytów chemokin RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) (ryc. 2) [16]. Chemokiny RANTES wraz z chemokinami MIP (macrophage inflammatory protein 1- α and 1- β) stanowią ligandy receptorów CCR3, CCR5, CXCR4, które funkcjonują jako tzw. „koreceptory” w oddziaływaniach między gp120 wirusa HIV i receptorem CD4 umożliwiającym fuzję wirusa z komórką gospodarza [10,57]. Ligandy wspomnianych receptorów – czyli chemokiny RANTES – hamują infekcję wirusem HIV. PACAP podany do hodowli neuronów korowych wywołał wzmożone wydzielanie chemokin RANTES z astrocytów i w ten pośredni sposób redukuje toksyczne działanie gp120 [16].

Neuroprotekcyjne działanie PACAP potwierdzone zostało także w badaniach *in vivo*, m.in. na szczurzym modelu choroby Parkinsona. Szczury, które poddano działaniu 6-hydroksydopaminy wykazywały utratę 95% komórek dopaminergicznych istoty czarnej. U zwierząt, którym podano PACAP, a następnie 6-hydroksydopaminę stwierdzono znacząco mniejszą utratę komórek dopaminergicznych istoty czarnej oraz osłabienie objawów zmian neurologicznych [79].

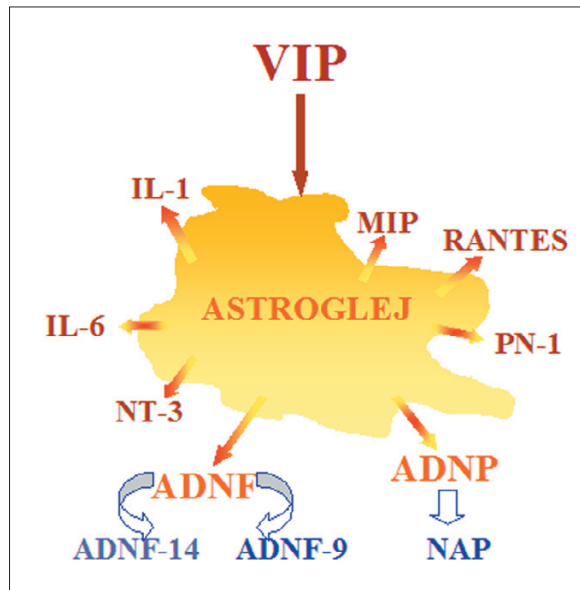
Liczne badania *in vivo* nad neuroprotekcijnym potencjałem PACAP dotyczą także neuronów piramidowych regionu CA1 hipokampa. Ze względu na dużą wrażliwość komórek piramidowych regionu CA1 na niedokrwienie wiele badań nad czynnikami neuroprotekcijnymi przeprowadzanych jest właśnie na tym modelu [24,80,84,86,93]. Pierwsze doświadczenia, wykonane na mieszanej hodowli neuronalno-glejujowej poddanej działaniu gp120, ujawniły neuroprotekcyjne właściwości PACAP wobec tej toksyny. PACAP znacząco zapobiegał śmierci neuronów zarówno w stężeniu 0,1 pM, jak i 0,1 nM, co sugeruje zaangażowanie receptorów swoistych dla PACAP – PAC₁, oraz wspólnych dla VIP i PACAP – receptorów typu VPAC [1]. W tym modelu doświadczalnym VIP także silnie chronił neurony hipokampa przed gp120 działając w bardzo niewielkich pikomolowych stężeniach [8].

Zawartość endogennego PACAP w hipokampie jest mała w porównaniu z innymi obszarami mózgu, ponadto endogenny PACAP może szybko zanikać w neuronach ulegających degeneracji wywołanej niedokrwieniem; jednak zwiększona immunoreaktywność oraz wzmożona ekspresja mRNA receptorów PAC₁ na astrocytach sugeruje możliwość oddziaływania egzogennego PACAP z receptorami PAC₁ w hipokampie [93]. Wykazano ponadto zdolność PACAP do przekraczania bariery krew-mózg [4,86]. Tym samym dożylne podanie PACAP zapobiegło śmierci neuronów obszaru CA1 [80,81,93]. To działanie ochronne utrzymywało się nawet po opóźnionym podaniu PACAP – do 12 godzin po wystąpieniu niedokrwienia z najsilniejszym efektem neuroprotecyjnym uzyskanym po 4 godzinach [80]. Kolejne badania przeprowadzone na szczurzym modelu niedokrwienia wykazały, że dokomorowe podanie PACAP przed wywołaniem ogniskowego niedokrwienia korowego spowodowało znaczące zmniejszenie obszaru martwicy niedokrwiennej (do 40% po 24 godzinach od wystąpienia niedokrwienia) oraz zmniejszyło zakres ubytków czuciwo-ruchowych przedniej części ciała [81].

Niedokrwienie wpływa na aktywność kinaz MAP, a w szczególności kinaz aktywowanych przez stres – JNK. W ciągu pierwszych 6 godzin po wystąpieniu niedokrwienia dochodzi do aktywacji kinaz JNK lub p38 (kinaza białkowa aktywowana przez stres, o masie cząsteczkowej 38 kDa) bądź obu, czego konsekwencją jest indukcja apoptozy neuronów. Podanie PACAP hamuje aktywację kinaz JNK i stymuluje wydzielanie z astrocytów interleukiny 6 (IL-6). IL-6 także hamuje aktywację szlaku kinaz JNK, a ponadto aktywuje kinazy ERK. Dane te wskazują, że PACAP może działać bezpośrednio na neurony lub pośrednio stymulując astrocyty do wydzielania czynników neuroprotecyjnych. Peptyd ten może regulować dynamiczną równowagę między aktywowanym przez czynniki wzrostu szlakiem kinaz ERK i aktywowanym przez czynniki stresowe szlakiem JNK lub/i p38, stanowiąc jeden z najsilniejszych czynników chroniących komórki piramidowe hipokampa przed uszkodzeniem i śmiercią apoptotyczną [24,80,84,85].

NEUROPROTEKCYJNA ROLA VIP

Pierwsze doniesienia o neuroprotecyjnych właściwościach VIP pojawiły się w latach 80. XX w. jako wynik poszukiwań czynników wpływających na elektryczną aktywność neuronów, determinującą ich przeżycie w czasie rozwoju układu nerwowego. Badania prowadzone na hodowlach niedojrzałych komórek nerwowych rdzenia kręgowego ujawniły, że po podaniu tetrodotoksyny (TTX), substancji która wiąże się specyficznie z kanałem sodowym, nastąpiła blokada elektrycznej aktywności i w konsekwencji obumieranie neuronów. Blokada spontanicznej aktywności elektrycznej może wywołać śmierć nawet 50% neuronów w czasie krytycznego okresu rozwoju – podanie VIP zapobiegło temu zjawisku [7]. Dalsze badania nad mechanizmem działania VIP w tym modelu doświadczałym dowiodły, że działanie tego peptydu jest związane z komórkami glejowymi mającymi swoiste dla VIP receptory typu VPAC. Stwierdzono, że peptyd ten stymuluje astrocyty do uwalniania czynników, które mogą chronić różniące się neurony przed blokadą ich aktywności elektrycznej. Do takich czynników należy interleukina 1 α



Ryc. 3. Mechanizm działania VIP. VIP stymuluje wydzielanie z astrogleju czynników o właściwościach neuroprotecyjnych, takich jak: IL-1, IL-6, proteasowa neksyna 1 (PN-1), chemokiny RANTES i MIP oraz działające najsilniej – czynnik neuroprotecyjny zależny od aktywności (ADNF) i białko neuroprotecyjne zależne od aktywności (ADNP). Peptydy ADNF-14 i ADNF-9 stanowią aktywne fragmenty białka macierzystego ADNF, natomiast peptyd NAP jest fragmentem białka ADNP

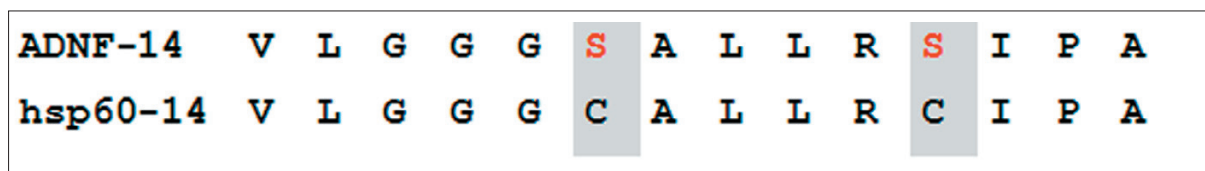
(IL-1 α), a także proteazowa neksyna 1, które podane jednocześnie z TTX zwiększały przeżycie neuronów rdzenia kręgowego [14,17,27].

Kolejne badania dowiodły, że pod wpływem VIP wydzielane są także inne czynniki o właściwościach neuroprotecyjnych, takie jak: interleukina 1 β (IL-1 β), interleukina 6 (IL-6), chemokiny RANTES i MIP oraz neurotrofina 3 (NT-3) [17].

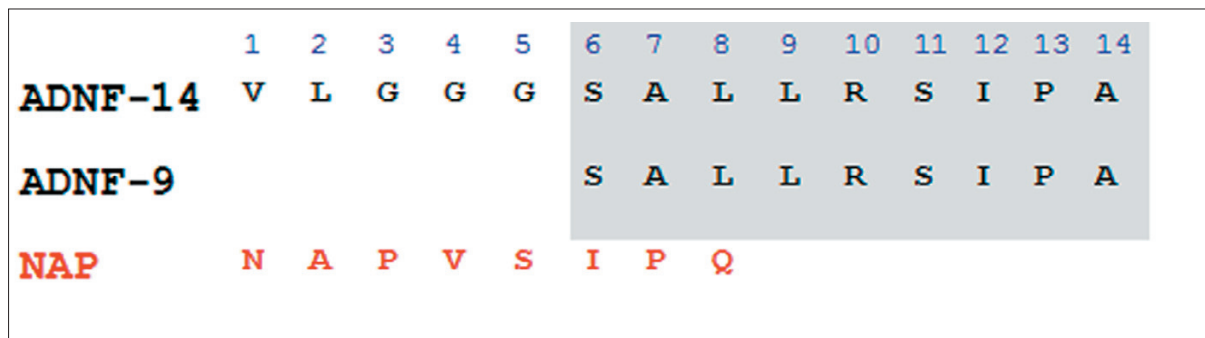
Ujawniono również, że neuroprotecyjne działanie VIP może polegać na hamowaniu uwalnianych z mikrogleju czynników prozapalnych indukujących śmierć neuronów w chorobach neurodegeneracyjnych. VIP znacząco blokował aktywację mikrogleju i wydzielanie czynnika martwicy nowotworów (TNF- α), interleukiny 1 β oraz tlenu azotu w modelach choroby Parkinsona i urazu mózgu [20,21].

Większość badań dotyczących neuroprotecyjnych właściwości VIP wskazuje, że mechanizm działania tego peptydu oparty jest przede wszystkim na stymulowaniu ekspresji i wydzielania czynników pochodzących z gleju (ryc. 3).

Najbardziej aktywnym czynnikiem pośredniczącym w ochronie neuronów przed blokadą aktywności elektrycznej okazało się niewielkie białko (masa cząsteczkowa 14 kDa), wydzielane z gleju w odpowiedzi na VIP określane jako czynnik neurotroficzny zależny od aktywności (activity-dependent neurotrophic factor – ADNF) [9]. ADNF charakteryzuje się strukturalnym pokrewieństwem z białkiem szoku cieplnego hsp60. Podobieństwo to dotyczy 14-aminokwasowego fragmentu białka ADNF, który



Ryc. 4. Porównanie sekwencji 14-aminokwasowych fragmentów białek ADNF i hsp60



Ryc. 5. Porównanie sekwencji aminokwasowych peptydów ADNF-14, ADNF-9 oraz NAP

Tabela 2. Skuteczność neuroprotekcynnego działania peptydów ADNF-14, ADNF-9 i NAP wobec neurotoksyn związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi

	ADNF-14	ADNF-9	NAP
TTX	10 ⁻¹⁶ –10 ⁻¹² M	10 ⁻¹⁷ –10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁸ –10 ⁻¹⁴ M
β-amyloid	10 ⁻¹⁸ –10 ⁻¹⁵ M	10 ⁻¹⁶ –10 ⁻¹¹ M	10 ⁻¹⁶ –10 ⁻¹⁵ M
gp120	≥10 ⁻¹⁷ M		10 ⁻¹⁵ –10 ⁻¹⁰ M
NMDA	≥10 ⁻¹⁷ M	≥10 ⁻¹⁷ M	≥10 ⁻¹⁶ M

Skróty: TTX – tetradotoksyna; gp120 – glikoproteina otoczki wirusa HIV; NMDA – N-metylo-D-asparaginian

jest homologiczny do również 14-aminokwasowego fragmentu białka hsp60. Dwie reszty serynowe obecne w sekwencji ADNF są niezbędne do pełnej biologicznej aktywności tego białka, bowiem ich podstawienie prowadzi do utraty aktywności ADNF (ryc. 4).

Ze względu na podobieństwo między hsp60 a ADNF przeprowadzone zostały dalsze badania, które miały na celu znalezienie związku między tymi dwoma białkami oraz zidentyfikowanie najkrótszej sekwencji niezbędnej do zachowania neuroprotekcynnej aktywności ADNF. Rezultatem było wykrycie 9-aminokwasowego peptydu określanego jako ADNF-9 (ryc. 5) [9,10,11,12,13,15,37].

Doświadczenia przeprowadzone na hodowli neuronów korowych szczura z użyciem tetradotoksyny wykazały unikatowe działanie peptydów pozyskanych z białka ADNF. Okazało się bowiem, że czynniki ADNF-14 i ADNF-9 już w femtomolowych stężeniach zapobiegają śmierci komórek, przy rosnących stężeniach ich działanie słabnie, natomiast przy stężeniach wyższych od 1 mM nie obserwuje się widocznych działań. Zastosowanie białka hsp60 nie wpłynęło na przeżycie neuronów poddanych działaniu TTX. Podobnie, podanie 14-aminokwasowego peptydu uzyska-

nego z białka hsp60 homologicznego do ADNF-14 wywołało słabszą o prawie 50% ochronę neuronów przed TTX. Te dane wskazują, że pomimo strukturalnego podobieństwa między hsp60 i ADNF, białka te charakteryzują się odmienną aktywnością biologiczną, a obecne w sekwencji ADNF dwie reszty serynowe mają podstawowe znaczenie dla neuroprotekcynnych właściwości ADNF i jego pochodnych. Ujawniono ponadto, że ADNF-14 wykazuje identyczną aktywność i skuteczność działania jak białko macierzyste ADNF, natomiast peptyd ADNF-9 przewyższa właściwości neuroprotekcynne obu tych cząsteczek.

Niezwykłe właściwości rodziny ADNF potwierdziły się wobec innych neurotoksyn związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi mózgu. Badania wykonane *in vitro* ujawniły, że rodzina cząsteczek ADNF, działając już w femtomolowych stężeniach, w zakresie 10⁻¹⁷–10⁻¹² M, zapewniała ochronę neuronów przed działaniem takich neurotoksyn jak: gp 120, β-amyloid (fragment aminokwasowy 25–35), a także wobec NMDA (N-metylo-D-asparaginian pobudza receptory NMDA odgrywające pierwszoplanową rolę w procesie ekscytotoksyczności) (tab. 2) [9,11,12,13,15,37].

Jak już wspomniano, peptyd ADNF-9 przewyższa neuroprotekcynne właściwości zarówno macierzystego białka ADNF, jak i peptydu ADNF-14. Działania ADNF-9 są długotrwałe nawet po krótkiej inkubacji, bowiem już dwugodzinna inkubacja komórek korowych mózgu szczura z ADNF-9 zapewniała 5-dniowy okres ochronny przed działaniem TTX. Co więcej, w dalszych doświadczeniach ujawniono brak biologicznie aktywnego peptydu już 15 minut po podaniu ADNF-9 do hodowli, co sugeruje, że wpływ tego peptydu na neurony prowadzi do zmian na poziomie transkrypcji poprzez stymulację ekspresji czynników zapewniających długotrwałą ochronę komórki [15]. Potwierdzeniem tej hipotezy mogą być wyniki badań Glaznera i wsp. [32], które wykazały, że 1-godzinna inkubacja neuronów hipokampa z ADNF-9 wywołała znaczący wzrost aktywnej postaci NF-κB (nuclear factor κB) – czynnika transkrypcyjnego, ulegającego zwiększonej ekspresji pod wpływem

stresu oksydacyjnego. Czynniki NF- κ B uczestniczą w regulacji ekspresji genów odpowiadających m.in. za supresję apoptozy. Po przemieszczeniu do jądra komórek czynniki ten aktywuje regulowane przez siebie geny łącząc się z sekwencją „ κ B” w ich promotorach. Z kolei białkowe produkty tych genów zapewniają przeżycie komórek, w których ulegają ekspresji [32]. Stwierdzono ponadto, że ADNF-9 chronił hodowlane neurony hipokampa przed apoptozą hamując akumulację reaktywnych form tlenu powstałych na skutek stresu oksydacyjnego [30]. Inne badania nad mechanizmem działania ADNF-9 ujawniły natomiast związek między tym peptydem a białkiem szoku cieplnego hsp60. Na modelu hodowlanych neuronów korowych wykazano, że ADNF-9 powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu hsp60, a ponadto, podany jednocześnie z β -amyloidem, zapobiega zmniejszeniu ekspresji hsp60 wywołanej toksycznym działaniem β -amyloidu [107]. Dane te wskazują, że prawdopodobnie działa jeden z potencjalnych mechanizmów ADNF-9.

Oprócz badań *in vitro* nad neuroprotekcjami właściwościami ADNF-9 przeprowadzone zostały doświadczenia *in vivo*. Badania na embrionach szczurzych z wykorzystaniem modelu naśladującego opóźnienie wzrostu – powszechne u niemowląt urodzonych przez matki zarażone wirusem HIV, potwierdziły rolę ADNF-9 w ochronie przed gp120. Jednoczesne podanie ADNF-9 z gp120 zapobiegło opóźnieniu wzrostu embrionów [22]. W innych badaniach, ADNF-9 okazał się silnym czynnikiem stymulującym wzrost embrionów, co wskazuje, że może on działać jako endogenne czynniki regulujące wzrost w czasie rozwoju embrionalnego [31,52].

Obiecujące okazały się także badania z wykorzystaniem modelu myszy z niedoborem apolipoproteiny E (apoE). Niedobór apoE stanowi jeden z czynników patogenetycznych modelu zwierzęcego choroby Alzheimera. Zwierzęta te charakteryzowały się upośledzeniem pamięci krótkotrwałej oraz zdolności uczenia się na skutek dysfunkcji neuronów cholinergicznym. Codzienne podawanie ADNF-9 (przez 7 dni) spowodowało poprawę pamięci krótkotrwałej i zdolności uczenia się zwierząt [37,39].

Ze względu na znaczące neuroprotekcje właściwości ADNF-14 i ADNF-9 podjęto kolejne badania, których celem było zidentyfikowanie innych czynników działających neuroprotekcje w femtomolowych stężeniach. Rezultatem było odkrycie 8-aminokwasowego peptydu nazwanego NAP (ryc. 5). Aktywność neuroprotekcja peptydu NAP została oceniona na podstawie zablokowania elektrycznej aktywności hodowlanych neuronów korowych szczura za pomocą TTX. Otrzymano zdumiewające wyniki: NAP w stężeniach w zakresie 10^{-18} – 10^{-14} M chronił neurony przed blokadą aktywności elektrycznej. W przypadku innych neurotoksyn (gp120, β -amyloid, NMDA) NAP także działał neuroprotekcje w femtomolowych stężeniach (tab. 2) [6,15,37].

Peptyd NAP jest fragmentem endogennego białka o masie cząsteczkowej 92 kDa. Ze względu na niezwykle neuroprotekcje właściwości NAP pokazane w doświadczeniach z TTX, macierzyste białko tego peptydu nazwane zostało białkiem neuroprotekcje zależnym od aktywności – ADNP (activity-dependent neuroprotective prote-

in) [29,37,40,108]. Strukturalne i funkcjonalne podobieństwo między rodziną czynników ADNF i nowo odkrytym białkiem ADNP skłoniło do podjęcia badań nad potencjalnym związkiem między ADNP i VIP. Wykazano, że stężenie mRNA dla ADNP w astrocytach szczura zwiększyło się 2–3-krotnie w odpowiedzi na inkubację z VIP, co potwierdziło przypuszczenia, że ADNP oraz pozyskany z tego białka niezwykle aktywny 8-aminokwasowy peptyd NAP, to kolejne czynniki pośredniczące w neuroprotekcje działaniach VIP [6].

Neuroprotekcje działanie NAP obserwowane w stężeniach femto- i pikomolowych potwierdziły kolejne badania *in vitro*. Doświadczenia nad wpływem niedoboru glukozy na przeżycie neuronów wskazywały na rolę NAP jako czynnika zapobiegającego śmierci neuronów związanej z osłabionym metabolizmem glukozy. Ujawniono ponadto, że NAP, podany bezpośrednio do hodowli, chronił neurony w nieobecności komórek glialnych [109].

W podobnie małych stężeniach NAP zapobiegał apoptozie hodowlanych komórek PC12 oraz ludzkiej neuroblastomy wywołanej przez toksyczne działanie dużych stężeń dopaminy oraz 6-hydroksydopaminy (duże stężenia dopaminy, a zwłaszcza produkty jej utleniania wywołują śmierć komórek dopaminergicznym w chorobie Parkinsona). W modelu tym wykazano także antyapoptotyczne właściwości NAP wobec obniżonego poziomu glutationu, co sugeruje potencjalny mechanizm działania NAP oparty na ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym, związanym z nieprawidłowym metabolizmem glutationu [72]. Podobny mechanizm działania NAP związany z ochroną komórek przed stresem oksydacyjnym wykazano także na modelu komórek PC12 poddanych działaniu nadtlenu wodoru [89].

Inny mechanizm działania NAP sugerują doświadczenia przeprowadzone na modelu choroby Alzheimera. Ujawniono, że NAP – w stężeniach femtomolowych – hamował agregację β -amyloidu łącząc się z dużym powinowactwem do jego fragmentu 25–35. Przyłączenie NAP zapobiegło zmianie konformacji prawidłowego β -amyloidu do postaci toksycznej [3].

Niedawne badania wykazały zdolność peptydu NAP do interakcji z jednym z istotnych białek budujących cytoszkielet komórki – tubuliną α – białkową podjednostką mikro-tubul. NAP podany do hodowlanych astrocytów poddanych działaniu cynku (jony cynku powodują demontaż mikro-tubul) zainicjował polimeryzację mikro-tubul przywracając prawidłową strukturę szkieletu komórki [23].

Neuroprotekcje właściwości peptydu NAP potwierdzono również na wielu modelach *in vivo*. Doświadczenia na modelu szczurów z niedoborem apoE ujawniły, że codzienne podawanie tego 8-aminokwasowego peptydu nie tylko poprawiło zdolności uczenia się zwierząt oraz zapobiegło utracie pamięci krótkotrwałej, ale ponadto NAP chronił przed utratą aktywności acetylotransferazy cholinowej czego nie obserwowano po podaniu ADNF-9. Co więcej, identyczny wynik uzyskano po donosowym podaniu tego peptydu. Doświadczenia ze znakowanym NAP wykazały, że peptyd ten przekraczał barierę krew-mózg, a odpowiedź uzyskana po podaniu NAP świadczy o tym, że donosowe zastosowanie małych dawek (3 μ g/kg m.c.) tego

peptydu jest wystarczające do osiągnięcia efektywnego stężenia w mózgu [34,37,39,42].

NAP i ADNF-9 wykazały dużą skuteczność działania *in vivo* także na modelu płodowego zespołu alkoholowego. Podanie NAP ciężarnym myszom poddanych działaniu alkoholu etylowego spowodowało znaczący wzrost liczby żywych płodów, natomiast jednoczesne podanie NAP i ADNF-9 zapobiegło upośledzeniu wzrostu oraz mikrocefalii. Działanie obu peptydów oceniono po upływie 10 dni od podania, co sugeruje wydłużony okres ich neuroprotektynowego działania. Podanie NAP i ADNF-9 zapobiegło także wywołanym przez etanol zmianom poziomu zredukowanej i utlenionej postaci glutationu u płodów, co wskazuje na potencjalny mechanizm działania oparty na ochronie neuronów przed zmianą w metabolizmie glutationu prowadzącą w konsekwencji do stresu oksydacyjnego [88].

Niezwykle efektywne działanie neuroprotektynowe tych krótkich peptydów, a przede wszystkim peptydu NAP oraz to, że peptyd ten jest fragmentem endogennego białka macierzystego ADNP zidentyfikowanego w tkankach embrionów mysich, skłoniło do podjęcia badań nad rolą ADNP na modelu płodowego zespołu alkoholowego [76]. Alkohol znacząco zwiększa ekspresję mRNA dla ADNP obecnego w embrionach mysich (ósmy dzień ciąży) oraz w błonie podstawnej. Podwyższona ekspresja mRNA dla ADNP utrzymywała się przez 10 dni od podania alkoholu [77]. Spostrzeżenia te sugerują, że ADNP może działać jako endogenne czynniki neuroprotektynowe.

Badania przeprowadzone na modelu niedokrwienia mózgu u szczurów ujawniły, że NAP podany dożylnie znacząco obniża utratę zdolności ruchowych oraz rozmiar obszaru martwicy niedokrwiennej. Co więcej, NAP działał neuroprotektynowo także po podaniu opóźnionym – 4 godziny po wystąpieniu niedokrwienia. Dalsze doświadczenia wykazały, że obszar martwicy niedokrwiennej i utrata zdolności ruchowych pozostały niewielkie przez 30 dni u zwierząt poddanych działaniu NAP. To, że podanie tego peptydu znacząco obniżyło liczbę komórek apoptotycznych świadczyć może o zahamowaniu aktywności głównych czynników wyzwalających apoptozę [58].

Mechanizm neuroprotektynowego działania wydzielanych z głębi pod wpływem VIP czynników ADNF i ADNP nadal pozostaje niewyjaśniony. Dane doświadczalne uzyskane w ciągu ostatnich kilku lat wskazują na działania ukierunkowane na ochronę neuronów przed stresem oksydacyjnym, ekscytotoksycznością, blokadą aktywności elektrycznej, niedoborem glukozy, demontażem mikrotubul oraz zmianą konformacji natywnych białek do postaci toksycznych. Badania wskazują też na długotrwałe ochronne działanie tych czynników, trwające od kilku dni do kilku tygodni po podaniu. Sądzi się więc, że właściwości neuroprotektynowe tych czynników mogą być także związane z wpływem na ekspresję genów odpowiadających za długotrwałą ochronę komórek [35,37,41].

NEUROPROTEKTYNOWA ROLA PHI

W pierwszej połowie lat 90 ubiegłego stulecia Hill i wsp. [49, 50] wykazali w mózgu szczura obecność receptorów VIP zależnych i niezależnych od GTP. Receptory zależne od GTP reprezentują wspomniane receptory typu VPAC,

natomiast receptory niezależne od GTP stanowią najprawdopodobniej nową klasę receptorów VIP i PACAP. Występowanie receptorów VIP niewrażliwych na nukleotydy guanylowe wykazano także w wątrobie 4-dniowych kurycząt [75]. Receptory te rozpoznawały, oprócz VIP i PACAP, także PHI. W preinkubowanym w obecności Gpp(NH)p preparacie błonowym wątroby, niezależne od GTP miejsca wiążące (¹²⁵I)VIP (Mr=48 kDa) wykazywały 17 razy większe powinowactwo do PHI niż w preparacie kontrolnym, tj. nietraktowanym Gpp(NH)p [75].

Prace z ostatnich kilku lat pochodzące z renomowanych laboratoriów, kierowanych m.in. przez Gozes (Tel-Aviv University) i Brennemana (NIH, Bethesda), czy Gressensa (INSERM, Paryż), sugerują, że opisywane właściwości neurotroficzne VIP mogą wynikać z aktywacji receptorów VIP, niewrażliwych na GTP i sprzężonych z torem sygnalizacyjnym niezależnym od cAMP [26,45,50,52,66,87]. Za możliwością udziału tego typu receptora w procesach wzrostu i różnicowania komórek i tkanek przemawia także ekspresja tego typu receptorów we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego szczura (E9,5) [44,50].

Powyższe obserwacje, jak i wielokrotnie wykazany w warunkach eksperymentalnych neuroprotektynowy potencjał VIP i PACAP skłoniły naukowców do rozpoczęcia badań nad potencjalnym działaniem neuroprotektynowym PHI – peptydu strukturalnie i funkcjonalnie zbliżonego do VIP.

W badaniach wykonanych na hodowlach mysich komórek neuroblastoma (Neuro2a) Lelievre i wsp. [59] wykazali hamujący wpływ PHI na proliferację badanych komórek, przy czym PHI działał w stężeniu mniejszym niż VIP. W modelu tym PACAP zastosowany w małych stężeniach aktywował proliferację komórek neuroblastoma. W przeciwieństwie do VIP, który stymulował wytwarzanie cAMP, PHI nie wpływał na poziom tego nukleotydu. Ponadto, działanie VIP hamowane było przez inhibitory PKA, natomiast działanie PHI było niezależne od PKA. Działanie PHI i PACAP było sprzężone z torem sygnalizacyjnym kinaz MAP. Kolejne doświadczenia wykazały na użytych w tych badaniach komórkach neuroblastoma obecność miejsc wiążących PHI, które nie reagowały z VIP. Obserwacja ta potwierdza, że w działaniu PHI w omawianym modelu nie uczestniczyły receptory VIP i PACAP. Mechanizm działania PHI pozostaje nieznany, jednakże uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że peptyd ten może odgrywać istotną rolę we wzroście guzów neuroblastoma.

Innym dowodem na to, że PHI może spełniać funkcje neuroprotektynowe jest wpływ tego peptydu na hodowlę neuronów rdzenia kręgowego szczura [55]. PHI stymulował wzrost neurytów w hodowli brzusznych neuronów rdzenia kręgowego. Zdaniem badaczy, neurotroficzny wpływ PHI na neurony rdzenia kręgowego wskazuje, że peptyd ten – wraz z podobnie działającym w tym układzie VIP – może okazać się czynnikiem terapeutycznym w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak np. stwardnienie zanikowe boczne (amyotrophic lateral sclerosis – ALS).

PERSPEKTYWY

VIP i PACAP oraz peptydy typu ADNF czy ADNP, są endogennymi substancjami mającymi znaczący, a w przypadku ADNF i ADNP ogromny potencjał neuroprotektynowy. Można

zatem przypuszczać, że w przypadku występującego procesu neurodegeneracyjnego wymienione peptydy – skoro funkcjonują w zdrowym organizmie – stanowią element naturalnego mechanizmu obronnego. W warunkach doświadczenia, a więc w sytuacji indukowanej neurodegeneracji przez zastosowanie dużych stężeń neurotoksyn, ochronne mechanizmy endogenne wydają się zbyt słabe i niewystarczające, by skutecznie przeciwdziałać gwałtownie rozwijającemu się procesowi destrukcyjnemu. Dopiero ich aktywacja – przez podanie egzogennych, jednak naturalnych peptydów „anty-neurodegeneracyjnych”, takich jak np. PACAP, VIP, ADNF czy ADNP, a być może i innych, uruchamia, a właściwie potęguje istniejące endogenne mechanizmy obronne tkanki-narządu-organizmu. Wyniki badań zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* z zastosowaniem modeli zwierzęcych lub ludzkich linii komórkowych sugerują prawdopodobne mechanizmy molekularne, leżące u podstaw indukowanego farmakologicznie lub niedotlenieniem procesu neurodegeneracyjnego, jednakże nie upoważniają do prostego ich przeniesienia do podobnych chorób człowieka. Choroby neurodegeneracyjne, takie jak chociażby choroba Alzheimera czy Parkinsona, rozwijają się podstępnie przez wiele lat, dając wyraźne objawy kliniczne dopiero wówczas, kiedy proces patologiczny jest już

mocno zaawansowany. Podejmowane w takim stanie leczenie, które często nie niweluje przyczyny a redukuje jedynie objawy schorzenia, okazuje się mało skuteczne. Czy zatem ów proces patologiczny rozwija się dlatego, że endogenne mechanizmy ochronne są zbyt słabe? Nie jest wykluczone, że tak jest – chociaż dowodów bezpośrednich potwierdzających taką tezę wciąż brakuje. Przyjmując jednak taki punkt widzenia za prawdopodobny, słusznymi wydają się próby „terapeutycznego” wykorzystywania takich substancji endogennych, o których już wiadomo (z doświadczeń na modelach zwierzęcych), że mają potencjał neuroprotekcyny. W opinii autorów niniejszego przeglądu, takie peptydy jak VIP, PACAP, PHI, ADNF i ADNP, a także ich syntetyczne analogi, mogą wytyczać drogę ku skuteczniejszej terapii różnorodnych procesów neurodegeneracyjnych – terapii opartej na aktywacji naturalnych (endogennych) procesów ochronnych przed tego typu patologiami. Dane literaturowe – o których mowa w niniejszej pracy - wskazują, że poszukiwanie efektywnych, silnie działających i swobodnie przenikających przez błony komórkowe peptydowych substancji neuroprotekcyny ma już swoje spektakularne osiągnięcia, a najbliższe lata najprawdopodobniej przyniosą ich jeszcze więcej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Arimura A: Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn. J. Physiol.*, 1998; 48: 301–331
- [2] Arimura A., Shioda S.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front. Neuroendocrinol.*, 1995; 16: 53–88
- [3] Ashur-Fabian O., Segal-Ruder Y., Skutelsky E., Brenneman D.E., Steingart R.A., Giladi E., Gozes I.: The neuroprotective peptide NAP inhibits the aggregation of the beta-amyloid peptide. *Peptides*, 2003; 24: 1413–1423
- [4] Banks W.A., Uchida D., Arimura A., Somogyvari-Vigh A., Shioda S.: Transport of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide across the blood-brain barrier and the prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1996; 805: 270–277; discussion 277–279
- [5] Basille M., Gonzalez B.J., Leroux P., Jeandel L., Fournier A., Vaudry H.: Localization and characterization of PACAP receptors in the rat cerebellum during development: evidence for a stimulatory effect of PACAP on immature cerebellar granule cells. *Neuroscience*, 1993; 57: 329–338
- [6] Bassan M., Zamostiano R., Davidson A., Pinhasov A., Giladi E., Perl O., Bassan H., Bhat C., Gibney G., Glazner G., Brenneman D.E., Gozes I.: Complete sequence of novel protein containing femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *J. Neurochem.*, 1999; 72: 1283–1293
- [7] Brenneman D.E., Eiden L.E.: Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986; 83: 1159–1162
- [8] Brenneman D.E., Westbrook G.L., Fitzgerald S.P., Ennis D.L., Elkins K.L., Ruff M.R., Pert C.B.: Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. *Nature*, 1988; 335: 639–642
- [9] Brenneman D.E., Gozes I.: A femtomolar-acting neuroprotective peptide. *J. Clin. Invest.*, 1996; 97: 2299–2307
- [10] Brenneman D.E., Phillips T.M., Festoff B.W., Gozes I.: Identity of neurotrophic molecules released from astroglia by vasoactive intestinal peptide. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1997; 814: 167–173
- [11] Brenneman D.E., Glazner G., Hill J.M., Hauser J., Davidson A., Gozes I.: VIP neurotrophism in the central nervous system: multiple effectors and identification of a femtomolar-acting neuroprotective peptide. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998; 865: 207–212
- [12] Brenneman D.E., Hauser J., Neale E., Rubinraut S., Fridkin M., Davidson A., Gozes I.: Activity-dependent neurotrophic factor: structure-activity relationships of femtomolar-acting peptides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998; 285: 619–627
- [13] Brenneman D.E., Hauser J., Phillips T.M., Davidson A., Bassan M., Gozes I.: Vasoactive intestinal peptide. Link between electrical activity and glia-mediated neurotrophism. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1999; 897: 17–26
- [14] Brenneman D.E., Hauser J., Spong C.Y., Phillips T.M.: Chemokines released from astroglia by vasoactive intestinal peptide. Mechanism of neuroprotection from HIV envelope protein toxicity. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2000; 921: 109–114
- [15] Brenneman D.E., Spong C.Y., Gozes I.: Protective peptides derived from novel glial proteins. *Biochem. Soc. Transac.*, 2000; 28: 452–455
- [16] Brenneman D.E., Hauser J., Spong C., Phillips T.: Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. *Neuropeptides*, 2002; 36: 271–280
- [17] Brenneman D.E., Phillips T.M., Hauser J., Hill J.M., Spong C.Y., Gozes I.: Complex array of cytokines released by vasoactive intestinal peptide. *Neuropeptides*, 2003; 37: 111–119
- [18] Cavallaro S., Copani A., D'Agata V., Musco S., Petralia S., Ventura C., Stivala F., Travalì S., Canonico P.L.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide prevents apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *Mol. Pharmacol.*, 1996; 50: 60–66
- [19] Dejda A., Matczak I., Nowak JZ.: Peptyd histydyno-izoleucynowy i jego ludzki analog peptyd histydyno-metioninowy: występowanie, receptory i funkcja biologiczna. *Post. Hig. Med. Dośw.(online)*, 2004; 58: 18–26
- [20] Delgado M., Ganea D.: Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma. *FASEB J.*, 2003; 17: 1922–1924
- [21] Delgado M., Ganea D.: Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *FASEB J.*, 2003; 17: 944–946
- [22] Dibbern A.D., Glazner G.W., Gozes I., Brenneman D.E., Hill J.M.: Inhibition of murine embryonic growth by human immunodeficiency virus envelope protein and its prevention by vasoactive intestinal peptide and activity-dependent neurotrophic factor. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 2837–2841
- [23] Divinski I., Mittelman L., Gozes I.: A femtomolar acting octapeptide interacts with tubulin and protects astrocytes against zinc intoxication. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 28531–28538
- [24] Dohi K., Mizushima H., Nakajo S., Ohtaki H., Matsunaga S., Aruga T., Shioda S.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regul. Pept.*, 2002; 109: 83–88
- [25] Eriste E., Norberg A., Bonetto V., Nepomuceno D., Lovenberg T.W., Sillard R., Jornvall H.: A C-terminally elongated form of PHI from porcine intestine. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999; 56: 709–713

- [26] Fatatis A., Holtzclaw L.A., Avidor R., Brenneman D.E., Russell J.T.: Vasoactive intestinal peptide increases intracellular calcium in astroglia: synergism with alpha-adrenergic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994; 91: 2036–2040
- [27] Festoff B.W., Nelson P.G., Brenneman D.E.: Prevention of activity-dependent neuronal death: vasoactive intestinal polypeptide stimulates astrocytes to secrete the thrombin-inhibiting neurotrophic serpin, protease nexin I. *J. Neurobiol.*, 1996; 30: 255–266
- [28] Figiel M., Engele J.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 3596–3605
- [29] Gibney G., Glazner G., Brenneman D.E., Gozes I.: Complete sequence of novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *J. Neurochem.*, 1999; 72: 1283–1293
- [30] Glazner G.W., Boland A., Dresse A.E., Brenneman D.E., Gozes I., Mattson M.: Activity-dependent neurotrophic factor peptide (ADNF) protects neurons against oxidative stress-induced death. *J. Neurochem.*, 1999; 73: 2341–2347
- [31] Glazner G.W., Gressens P., Lee S.J., Gibney G., Gozes I., Gozes Y., Brenneman D.E., Hill J.M.: Activity-dependent neurotrophic factor: a potent regulator of embryonic growth and development. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 1999; 200: 65–71
- [32] Glazner G.W., Camandola S., Mattson M.: Nuclear factor- κ B mediates the cell survival-promoting action of activity-dependent neurotrophic factor peptide-9. *J. Neurochem.*, 2000; 75: 101–108
- [33] Gonzalez B.J., Basille M., Vaudry D., Fournier A., Vaudry H.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience*, 1997; 78: 419–430
- [34] Gozes I., Bardea A., Reshef A., Zamostiano R., Zhukovsky S., Rubinraut S., Fridkin M., Brenneman D.E.: Neuroprotective strategy for Alzheimer disease: intranasal administration of a fatty neuropeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 427–432
- [35] Gozes I., Divinsky I., Pilzer I., Fridkin M., Brenneman D.E., Spier A.D.: From vasoactive intestinal peptide (VIP) through activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) to NAP. *J. Mol. Neurosci.*, 2003; 20: 315–322
- [36] Gozes I., Fridkin M., Hill J.M., Brenneman D.E.: Pharmaceutical VIP: prospects and problems. *Curr. Med. Chem.*, 1999; 6: 1019–1034
- [37] Gozes I., Brenneman D.E.: A new concept in the pharmacology of neuroprotection. *J. Mol. Neurosci.*, 2000; 14: 61–68
- [38] Gozes I., Brenneman D.E.: VIP: molecular biology and neurobiological function. *Mol. Neurobiol.*, 1989; 3: 201–236
- [39] Gozes I., Giladi E., Pinhasov A., Bardea A., Brenneman D.E.: Activity-dependent neurotrophic factor: intranasal administration of femtomolar-acting peptides improve performance in a water maze. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 2000; 293: 1091–1098
- [40] Gozes I., Zamostiano R., Pinhasov A., Bassan M., Giladi E., Steingart R.A., Brenneman D.E.: A novel VIP responsive gene. Activity dependent neuroprotective protein. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2000; 921: 115–118
- [41] Gozes I.: Neuroprotective peptide drug delivery and development: potential new therapeutics. *Trends Neurosci.*, 2001; 24: 700–705
- [42] Gozes I., Alcalay R., Giladi E., Pinhasov A., Furman S., Brenneman D.E.: NAP accelerates the performance of normal rats in the water maze. *J. Mol. Neurosci.*, 2002; 19: 167–170
- [43] Gourlet P., Vandermeers A., Van Rampelbergh J., De Neef P., Cnudde J., Waelbroeck M., Robberecht P.: Analogues of VIP, helodermin, and PACAP discriminate between rat and human VIP1 and VIP2 receptors. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998; 865: 247–252
- [44] Gressens P., Hill J.M., Gozes I., Fridkin M., Brenneman D.E.: Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured mouse embryos. *Nature*, 1993; 362: 155–158
- [45] Gressens P., Marret S., Hill J.M., Brenneman D.E., Gozes I., Fridkin M., Evrard P.: Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain. *J. Clin. Invest.*, 1997; 100: 390–397
- [46] Harada J., Sugimoto H.: An inhibitor of p38 and JNK MAP kinases prevents activation of caspases and apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1999; 73: 369–378
- [47] Harmar A.J., Arimura A., Gozes I., Journot L., Laburthe M., Pisegna J.R., Rawlings S.R., i wsp: IUPHAR. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol. Rev.*, 1998; 50: 265–270
- [48] Haschimoto H., Ishihara T., Shigemoto R., Mori K., Nagata S.: Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuron*, 1993; 11: 333–342
- [49] Hill J.M., Harris A., Hilton-Clarke D.I.: regional distribution of guanine nucleotide-sensitive and guanine nucleotide-insensitive vasoactive intestinal peptide receptors in rat brain. *Neuroscience*, 1992; 48: 925–932
- [50] Hill J.M., Agoston D., Gressens P., McCune S.K.: Disitribution of VIP mRNA and two distinct VIP binding sites in the developing rat brain: relation to ontogenetic events. *J. Comp. Neurol.*, 1994; 342: 186–205
- [51] Hill J.M., Mervis R.F., Avidor R., Moody T.W., Brenneman D.E.: HIV envelope protein-induced neuronal damage and retardation of behavioral development in rat neonates. *Brain Res.*, 1993; 603: 222–233
- [52] Hill J.M., Glazner G.W., Lee S.J., Gozes I., Gressens P., Brenneman D.E.: Vasoactive intestinal peptide regulates embryonic growth through the action of activity-dependent neurotrophic factor. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1999; 897: 92–100
- [53] Hill J.M., Lee S.J., Dibbern J.R., Fridkin M., Gozes I., Brenneman D.E.: Pharmacologically distinct vasoactive intestinal peptide binding sites: CNS localization and role in embryonic growth. *Neuroscience*, 1999; 93: 783–791
- [54] Hokfelt T., Fahrenkrug J., Tatemoto K., Mutt V., Werner S.: PHI, a VIP-like peptide, is present in the rat median eminence. *Acta Physiol. Scand.*, 1982; 116: 469–471
- [55] Iwasaki Y., Ikeda K., Ichikawa Y., Igarashi O.: Vasoactive intestinal peptide influences neurite outgrowth in cultured rat spinal cord neurons. *Neurol. Res.*, 2001; 23: 851–854
- [56] Journot L., Spengler D., Pantaloni C., Dumuis A., Sebben M., Bockaert J.: The PACAP receptor: generation by alternative splicing of functional diversity among G protein-coupled receptors in nerve cells. *Semin. Cell Biol.*, 1994; 5: 263–272
- [57] Kmiecik D., Trzeciak W H: Efekty cytotoksyczne w infekcji wirusem HIV-1, wywołane za pośrednictwem glikoproteiny 120. *Post. Biol. Kom.*, 2000; 27: 53–68
- [58] Leker R.R., Teichner A., Grigoriadis N., Ovadia H., Brenneman D.E., Fridkin M., Giladi E., Romano J., Gozes I.: NAP, a femtomolar-acting peptide, protects the brain against ischemic injury by reducing apoptotic death. *Stroke*, 2002; 33: 1085–1092
- [59] Lelievre V., Pineau N., Du J., Wen Ch-H, Nguyen T., Janet T., Muller J-M, Waschek J.A.: Differential effects of peptide histidine isoleucine (PHI) and related peptides on stimulation and suppression of neuroblastoma cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 19685–19690
- [60] MacKenzie C.J., Lutz E.M., McCulloch D.A., Mitchell R., Harmar A.J.: Phospholipase C activation by VIP1 and VIP2 receptors expressed in COS 7 cells involves a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1996; 805: 579–584
- [61] McCulloch D.A., Lutz E.M., Johnson M.S., MacKenzie C.J., Mitchell R.: Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2000; 921: 175–185
- [62] Mei Y.A., Vaudry D., Basille M., Castel H., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J.: PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I_k in the anti-apoptotic action of PACAP. *Eur. J. Neurosci.*, 2004; 19: 1446–1458
- [63] Morio H., Tatsuno I., Hirai A., Tamura Y., Saito Y.: Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide protects neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Res.*, 1996; 741: 82–88
- [64] Morio H., Tatsuno I., Tanaka T., Uchida D., Hirai A., Tamura Y., Saito Y.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a neurotrophic factor for cultured rat cortical neurons. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1996; 805: 476–481
- [65] Morio I., Tatsuno I., Uchida D., Tanaka T., Saito J., Saito Y., Hirai A.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat astrocytes. *Brain Res.*, 1998; 795: 191–196
- [66] Muller J.M., Lelievre V., Becq-Giraudon L., Meunier A.C.: VIP as a cell-growth and differentiation neuromodulator role in neurodevelopment. *Mol. Neurobiol.*, 1995; 10: 115–134
- [67] Niewiadomski P., Sędkowska P. (Sokołowska P.), Nowak J.Z.: Receptory dla VIP i PACAP. W: Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału, red.: J.Z. Nowak, J.B. Zawilska. PWN, 2004: 491–504
- [68] Nowak J.Z., Kuba K., Zawilska J.B.: Stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on cyclic AMP formation in the hypothalamus and cerebral cortex of four avians and rat. *Pol. J. Pharmacol.*, 1999; 51: 87–91
- [69] Nowak J.Z., Pigulowska A., Kuba K., Zawilska J.B.: Stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on inositol phosphates accumulation in avian cerebral cortex and hypothalamus. *Neurosci. Lett.*, 2002; 323: 179–182

- [70] Nowak J.Z., Zawilska J.B.: PACAP in avians: origin, occurrence, and receptors – pharmacological and functional considerations. *Curr. Pharm. Des.*, 2003; 9: 467–481
- [71] Nussdorfer G.G., Malendowicz L.K.: Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides*, 1998; 19: 1443–1467
- [72] Offen D., Sherki Y., Melamed E., Fridkin M., Brenneman D.E., Gozes I.: Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents neurotoxicity in neuronal cultures: relevance to neuroprotection in Parkinson's disease. *Brain Res.*, 2000; 854: 257–262
- [73] Onoue S., Endo K., Ohshima K., Yajima T., Kashimoto K.: The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides*, 2002; 23: 1471–1478
- [74] Onoue S., Ohshima K., Endo K., Yajima T., Kashimoto K.: PACAP protects neuronal PC12 cells from the cytotoxicity of human prion protein fragment 106–126. *FEBS Lett.*, 2002; 522: 65–70
- [75] Pineau N., Lelievre V., Goursaud S., Hilairat S., Waschek J.A., Janet T., Muller J.M.: The polypeptide PHI discriminates a GTP-insensitive form of VIP receptor in liver membranes. *Neuropeptides*, 2001; 35: 117–126
- [76] Poggi S.H., Vink J., Goodwin K., Hill J.M., Brenneman D.E., Pinhasov A., Gozes I., Spong C.Y.: Differential expression of embryonic and maternal activity-dependent neuroprotective protein during mouse development. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2002; 187: 973–976
- [77] Poggi S.H., Goodwin K., Hill J.M., Brenneman D.E., Tendi E., Schinelli S., Abebe D., Spong C.Y.: The role of activity-dependent neuroprotective protein in a mouse of fetal alcohol syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2003; 189: 790–793
- [78] Rawlings S.R., Hezareh M.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endocr. Rev.*, 1996; 17: 4–29
- [79] Reglodi D., Lubics A., Tamas A., Szalontay L., Lengvari I.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.*, 2004; 151: 303–312
- [80] Reglodi D., Somogyvari-Vigh A., Vigh S., Kozicz T., Arimura A.: Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*, 2000; 31: 1411–1417
- [81] Reglodi D., Tamas A., Somogyvari-Vigh A., Szanto Z., Kertes E., Lenard L., Arimura A., Lengvari I.: Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides*, 2002; 23: 2227–2234
- [82] Sędkowska P. (Sokołowska P.), Niewiadomski P., Zawilska J.B., Nowak J.Z.: Peptydy PACAP i VIP: występowanie, receptory i rola fizjologiczna. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30: 525–547
- [83] Sherwood N.M., Krueckl S.L., McRory J.E.: The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr. Rev.*, 2000; 21: 619–670
- [84] Shioda S., Ozawa H., Dohi K., Mizushima H., Matsumoto K., Nakajo S., Takaki A., Zhou C.J., Nakai Y., Arimura A.: PACAP protects hippocampal neurons against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998; 865: 111–117
- [85] Shioda S.: Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the brain. *Acta Anat. Nippon.*, 2000; 75: 487–507
- [86] Somogyveri-Vigh A., Pan W., Reglodi D., Kastin A.J., Arimura A.: Effect of middle cerebral artery occlusion on the passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood – brain barrier in the rat. *Regul. Pept.*, 2000; 91: 89–95
- [87] Spong C.Y., Lee S.J., McCune S.K., Gibney G., Abebe D.T., Alvero R., Brenneman D.E., Hill J.M.: Maternal regulation of embryonic growth: the role of Vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology*, 1999; 140: 917–924
- [88] Spong C.Y., Abebe D.T., Gozes I., Brenneman D.E., Hill J.M.: Prevention of fetal demise and growth restriction in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001; 297: 774–779
- [89] Steingart R.A., Solomon B., Brenneman D.E., Fridkin M., Gozes I.: VIP and peptides related to activity-dependent neurotrophic factor protect oxidative stress. *J. Mol. Neurosci.*, 2000; 15: 137–145
- [90] Takei N., Torres E., Yuhara A., Jongsma H., Otto C., Korhonen L., Abiru Y., Skoglosa Y., Schultz G., Hatanaka H., Sofroniew M.V., Lindholm D.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes the survival of basal forebrain cholinergic neurons *in vitro* and *in vivo*: comparison with effects of nerve growth factor. *Eur. J. Neurosci.*, 2000; 12: 2273–2280
- [91] Tatemoto K., Mutt V.: Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature*, 1980; 285: 417–418
- [92] Tatemoto K., Carlquist M., McDonald T.J., Mutt V.: Isolation of a brain peptide identical to the intestinal PHI (peptide HI). *FEBS Lett.*, 1983; 153: 248–252
- [93] Uchida D., Arimura A., Somogyvári-Vigh A., Shioda S., Banks W.A.: Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Brain Res.*, 1996; 736: 280–286
- [94] Van Rampelbergh J., Poloczek P., Francoys I., Delporte C., Winand J., Robberecht P., Waelbroeck M.: The pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP I) and VIP (PACAP II VIP1) receptors stimulate inositol phosphate synthesis in transfected CHO cells through interaction with different G proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1357: 249–255
- [95] Vaudry D., Basille M., Anouar Y., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J.: The neurotrophic activity of PACAP on rat cerebellar granule cells is associated with activation of the protein kinase A pathway and c-fos gene expression. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998; 865: 92–99
- [96] Vaudry D., Falluel-Morel A., Basille M., Pamantung T.F., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.*, 2003; 72: 303–316
- [97] Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Anouar Y., Fournier A., Vaudry H.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates both c-fos gene expression and cell survival in rat cerebellar granule neurons through activation of the protein kinase A pathway. *Neuroscience*, 1998; 84: 801–812
- [98] Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Fournier A., Vaudry H.: Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 9415–9420
- [99] Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Pamantung T.F., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H.: The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-3/ CPP32. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 13390–13395
- [100] Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Pamantung T.F., Fournier A., Vaudry H.: PACAP acts as a neurotrophic factor during histogenesis of the rat cerebellar cortex. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000; 921: 293–299
- [101] 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
- [102] Vaudry D., Pamantung T.F., Basille M., Rousselle C., Fournier A., Vaudry H., Beauvillain J.C., Gonzalez B.J.: PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.*, 2002; 15: 1451–1460
- [103] Vaudry D., Rousselle C., Basille M., Falluel-Morel A., Pamantung T.F., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 6398–6403
- [104] Villaba M., Bockaert J., Journot L.: Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) protects cerebellar granule cells from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J. Neurosci.*, 1997; 17: 83–90
- [105] Waschek J.A.: Multiple actions of pituitary adenylate cyclase activating peptide in nervous system development and regeneration. *Dev. Neurosci.*, 2002; 24: 14–23
- [106] Yiangou Y., Di Marzo V., Spokes R.A., Panico M., Morris H.R., Bloom S.R.: Isolation, characterization, and pharmacological actions of peptide histidine valine 42, a novel prepro-vasoactive intestinal peptide-derived peptide. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 14010–14013
- [107] Zambostiano R., Pinhasov A., Bassan M., Perl O., Steingart R.A., Atlas R., Brenneman D.E., Gozes I.: A femtomolar-acting neuroprotective peptide induces increased levels of heat shock protein 60 in rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.*, 1999; 264: 9–12
- [108] Zambostiano R., Pinhasov A., Gelber E., Steingart R.A., Seroussi E., Giladi E., Bassan M., Wollman Y., Eyre H.J., Mulley J.C., Brenneman D.E., Gozes I.: Cloning and characterization of human activity-dependent neuroprotective protein. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 708–714
- [109] Zemlyak I., Furman S., Brenneman D.E., Gozes I.: A novel peptide prevents death in enriched neuronal cultures. *Regul. Pept.*, 2000; 96: 39–43