

A PACAP expressziójának és funkciójának  
vizsgálata a  
gasztrointesztinális traktus gyulladásos meg-  
betegedéseiben és azok modelljeiben



Doktori (Ph.D.) értekezés

dr. Illés Anita

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Anatómia Intézet, I.sz.Belgyógyászati Klinika

2019

Doktori iskola vezetője:	Dr. Szekeres Júlia
Programvezető:	Dr. Reglődi Dóra
Témavezetők:	Dr. Reglődi Dóra Dr. Horváth Gabriella

# Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	5
1. A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)	5
1.1. A PACAP élettani hatásai	7
1.2. A PACAP gasztrointesztinális traktusra kifejtett hatásai	8
1.3. PACAP génhiányos egerek	11
2. Gyulladásos bélbetegségek patogenezise	14
3. Gasztritisz és gyomorfekély patomechanizmusa	19
II. Célkitűzés	22
III. Anyagok és módszerek	23
1. Sejtkultúra	23
1.1. INT407-sejtek	23
1.2. Caco-2 sejtek	24
2. PACAP38	24
3. A PACAP INT407-sejtek proliferációjára kifejtett hatása	25
3.1. Proliferációs teszt	25
3.2. Klonogén assay	25
3.3. Oncology array	25
4. A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása gamma-sugárzás mellett	27
4.1. A sejtek viabilitása	27
4.2. Klonogén assay	27
4.3. Phospho-ERK 1/2 western blot	28
5. A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása in vitro hipoxia mellett	28
6. A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása oxidatív stressz mellett	29
6.1. RNS-csendesítés	30
6.2. MTT-teszt	31
7. Statisztikai analízis	32
8. A PACAP hatásának vizsgálata a bakteriális adhézióra és a bélflórára	32
8.1. A bakteriális adhézió vizsgálata	32
8.2. Citokin array	33
8.3. A bélflóra összetételének vizsgálata PACAP KO és vad egereknél	35
8.3.1 Kísérleti egerek	35
8.3.2. A széklet bélflóra molekuláris analízise	35

8.3.3. Statsztikai analízis	35
9. A PACAP vizsgálata humán szöveti mintákban	36
IV. Eredmények	38
1. A PACAP INT407-sejtek proliferációjára kifejtett hatása	38
2. A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása gamma-sugárzás mellett	40
3. A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása in vitro hipoxia mellett	43
4. A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása oxidatív stressz mellett	44
5. A PACAP hatásának vizsgálata a bakteriális adhézióra	47
6. A PACAP citokin-expresszióra kifejtett hatásának vizsgálata	48
7. A bélflóra összetételének vizsgálata PACAP KO és vad egereknél	50
8. A PACAP vizsgálata humán szövetmintákban	53
V. Megbeszélés	59
1. INT407-sejteken végzett vizsgálatokkal kapcsolatos következtetések	59
2. A bakteriális adhézióra és a bélflórára kifejtett hatás vizsgálata	62
3. A PACAP humán szövetmintákban való vizsgálata	66
VI. Új eredmények összefoglalása	70
VII. Irodalomjegyzék	71
VIII. Köszönetnyilvánítás	93

## Rövidítések jegyzéke:

ADCYAP1	.....	a PACAP-ot kódoló gén
ATG16LI	.....	autofágia kapcsolt gén
Bad	.....	Bcl-2 kapcsolt promoter
Bax	.....	Bcl-2 kapcsolt X fehérje
Bcl	.....	B-sejtes limfóma
BDNF	.....	brain-derived neurotrophic factor
CagA	.....	citotoxin-asszociált gén
CARD15	.....	caspase recruitment domain - kaszpáz aktivációs domain
CDK	.....	ciklin-dependens kináz
CoCl <sub>2</sub>	.....	kobalt-klorid
COX	.....	ciklooxigenáz
CU	.....	colitis ulcerosa
CXCL-1	.....	C-X-C kemokin ligand
DMSO	.....	dimetil-szulfoxid
DPBS	.....	Dulbecco-féle PBS
DSS	.....	dextrán-szodium-szulfát
ECL	.....	enterokrómaffinszerű sejt
FBS	.....	foetal bovine serum
FoxO1	.....	forkhead box fehérje
GAPD	.....	gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
HIF1 $\alpha$	.....	hipoxia-indukálható faktor
HRP	.....	horseradish peroxidase – tormaperoxidáz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	.....	hidrogén-peroxid
H <sub>2</sub> S	.....	hidrogén-szulfid
IBD	.....	inflammatory bowel disease - gyulladós bélbetegség
IFN- $\gamma$	.....	interferon- $\gamma$
IL	.....	interleukin
KO	.....	knockout
LPS	.....	lipopoliszacharid
MDP	.....	muramil-dipeptid
MIF	.....	makrofág migrációt gátló faktor

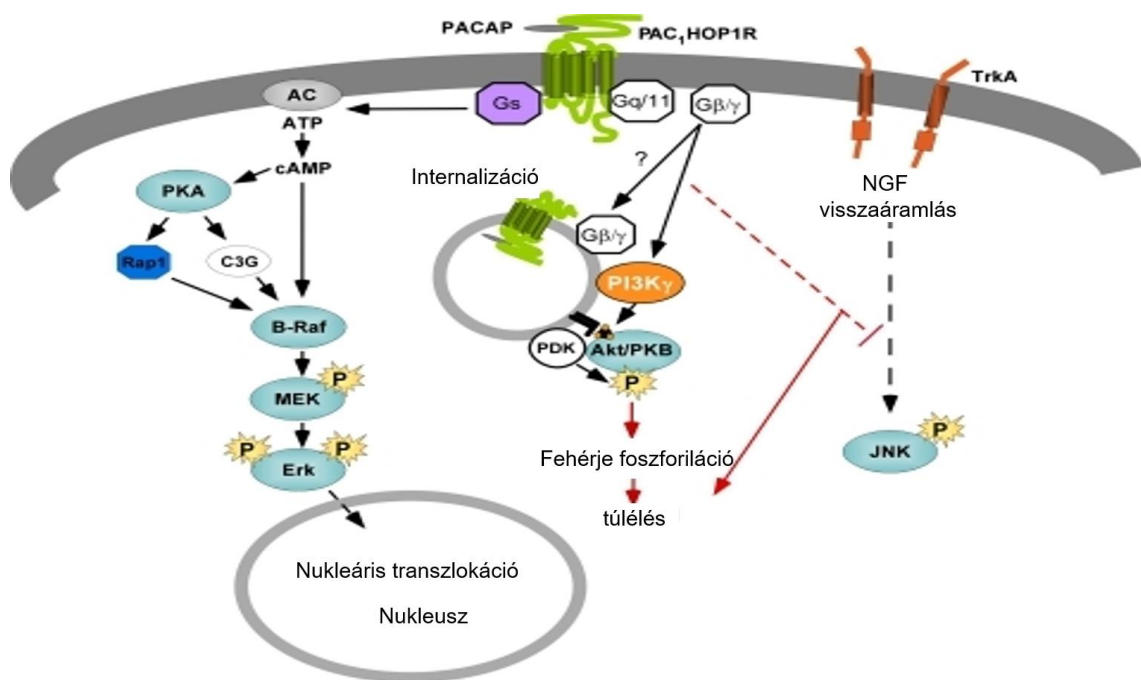
MTT..... 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid  
 NFkB1 ..... NF-κB-t kódoló gén  
 NO ..... nitrogén-monoxid  
 NOD2 ..... nukleotidkötési oligomerizációs domain  
 NSAID.....nonsteroidal anti-inflammatory drug – nem szteroid gyulladáscsökkentő  
 PAC1 ..... PACAP-specifikus receptor  
 PACAP.....pituitary adenylate cyclase activating polypeptide - hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid  
 PBS..... phosphate-buffered saline  
 PDGF..... platelet-derived growth factor  
 PGE2 ..... prosztaglandin E2  
 RNS ..... reaktív nitrogénszabadgyök  
 ROS ..... reaktív oxigénszabadgyök  
 RPMI ..... Roswell Park Memorial Institute  
 siRNS..... small interfering RNS  
 TGF-β ..... transzformáló növekedési faktor  
 TLR ..... toll-like receptor  
 TNF ..... tumor nekrozis faktor  
 TRPA-1 ..... tranziens receptor potenciál Ankyrin 1  
 VacA ..... vakuolizáló citotoxin A  
 VHL..... von Hippel-Lindau  
 VIP..... vazóaktív intesztinális polipeptid  
 VPAC..... a VIP-et és a PACAP-ot azonos affinitással kötő receptor

# I. Bevezetés

## 1. Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP) egy neuroprotektív peptid, melyet 1989-ben izoláltak először birka hipotalamuszból hipofízis sejt kultúrákban kifejtett adenilát cikláz aktiváló hatása révén (Miyata et al., 1989). A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) peptidcsalád tagja (Arimura, 1998; Mustafa és Eiden, 2008), mely a szervezetben két biológiailag aktív formában található meg: 38 aminosavból álló forma (PACAP38) és 27 aminosavból álló polipeptid (PACAP27). A PACAP mindkét formáját az ADCYAP1 gén kódolja. Szerkezete rendkívül konzervált, minden emlősben azonos és egyéb gerinces állatokban is csak 1-4 aminosav eltérés mutatható ki (Vincze és Köves, 2001; Vaudry et al., 2009). A 27 aminosavat tartalmazó PACAP27 a vazoaktív intesztinális polipeptiddel 68%-ban homológ (Vaudry et al., 2009). Az emlős szervezet szöveteiben a PACAP38 dominál, a szövetekben előforduló PACAP 90%-át a PACAP38 adja (Arimura et al., 1991; Somogyvári-Vigh és Reglödi, 2004). Hatásait G-proteinkapcsolt receptorokon fejti ki (1. ábra). Három receptortípusa ismert: VPAC1 és VPAC2, melyekhez a PACAP és a VIP egyenlő affinitással tud kötődni, ugyanakkor a PAC1-receptorhoz 1000-szer jobban kötődik a PACAP, mint a VIP (Harmar et al., 1998; Laburthe et al. 2007; Harmar et al., 2012). A PACAP legnagyobb mennyiségben a központi és a perifériás idegrendszerben található meg (Shioda és Nakamachi, 2015), azonban több korábbi tanulmány igazolta széles körű előfordulását a szervezetben az idegrendszeren kívül is. A központi idegrendszerben a hipotalamuszban mutatható ki legnagyobb mennyiségben, de jelen van a kéregállományban, középagyban, agytörzsben, cerebellumban, talamuszban, hipofízisben is (Hannibal, 2002; Oride et al., 2018; Hirabayashi et al., 2018). A perifériás idegrendszerben a spinális ganglionok érző idegsejtjeiben, valamint a vegetatív pre- és posztganglionáris neuronokban mutatható ki (Arimura, 1998; Köves et al., 1990; Vaudry et al., 2000a). Szinte valamennyi szervrendszerben megtalálható, többek között az urogenitális szervekben (Arimura et al., 1991; Tamás et al., 2016), endokrin mirigyekben (Arimura et al., 1991; Liu et al., 2016), kardiovaszkuláris rendszerben (Nandha et al., 1991; Ivic et al., 2017) és a

gastrointesztinális traktus egész hosszában (Köves et al., 1991; Arciszewski et al., 2015; Ji et al., 2013; Reglődi et al., 2018). PAC1 receptor az agyban, a gerincvelőben, az adenohipofízisben, a mellékvesevelőben és a herében található (Köves et al., 1991; Vaudry et al., 2009; Tokuda et al., 2006; Girard et al., 2017), míg VPAC1-receptor a központi idegrendszeren túl a tüdőben, a májban, a lépben, a tímuszban, az ováriumban és a gastrointesztinális traktusban is jelen van (Hashimoto et al., 1996; Joo et al., 2004; Bukowski és Wasowicz, 2015; Padua et al., 2016). A PACAP mindhárom receptora megtalálható a mukozában, az endotél- és simaizomsejtekben, a myentericus neuronokban és a neuroendokrin sejtekben (Schulz et al., 2004).



*1. ábra: A PACAP PAC1-receptoron történő hatásmechanizmusának sematikus jelátviteli útja a szimpatikus neuronokon. Gs-proteinen át ciklikus AMP aktiválódik, mely segíti az extracelluláris szignál regulált kináz (ERK) aktivációt és ezáltal a nukleáris transzlokációt. Emellett a gyors PAC1-receptor mediálta Gq-aktiváció foszfolipáz C úton át PI3K/Akt aktiválódást eredményez, mely fehérje foszforilációhoz és ezáltal a sejt túléléséhez vezet. (Forrás: May et al., J Biol Chem. 2010-módosítva)*

## 1.1. A PACAP élettani hatásai

Ma már jól ismert, hogy a PACAP rendkívül széles körű élettani hatásokkal rendelkezik, befolyásolja szinte valamennyi szervrendszer működését. A hipofízisben mind az elülső, mind a hátsó lebeny működésének szabályozásában részt vesz (Azuma et al., 2013; Oride et al., 2018). Az endokrin rendszerre kifejtett hatásai közül jól ismert, hogy befolyásolja a nemi hormonok elválasztását (Okada et al., 2007), a spermatogenezist (Reglődi et al., 2018a), a folliculusok érését (Reglődi et al., 2012c), fokozza a csont- és porcfejlődést (Juhász et al., 2015), serkenti a hasnyálmirigy inzulinelválasztását (Winzell és Ahren, 2007; Ma et al., 2015). Endokrin hatásain túl szerepet játszik a cirkadián ritmus szabályozásában (Hannibal et al., 2006; Hannibal et al., 2016), a hipotalamusz táplálkozást és hőszabályozást irányító központjainak szabályozásában (Bánki et al., 2014b), serkenti a memóriafolyamatokat (Matsuyama et al., 2003; Ago et al., 2017) és antidepresszáns hatású (Reichenstein et al., 2008; Seiglie et al., 2015). A PACAP mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben széles körű hatásokkal bír. Többek között részt vesz a neuronális differenciálódásban, a neuroszekretoros rendszer aktivációjában, a neuronális progenitor sejtek képződésében (Yan et al., 2013), valamint befolyásolja a szinapszisok plaszticitását (Starr és Margiotta, 2017). Hatással van a fájdalomingerek perifériás és centrális folyamataira (Dickinson és Fleetwood-Walker, 1999; Davis-Taber et al., 2008; Yokai et al., 2016; Tajti et al., 2015) és a stresszadaptációs magatartás szabályozásában is szerepet játszik (Agarwal et al., 2005; Gaszner et al., 2012). Részt vesz a belső szervek simaizom-kontrakciójának és mirigyelválasztásának irányításában és hatékony vazodilatátor hatással bír (Lenti et al., 2007; Vámos et al., 2014). Neuroprotektív hatása mellett neurotrófikus hatású is, segíti a neuronok növekedését és differenciálódását, valamint védi a neuronokat a különböző káros behatásokkal szemben (Lee és Seo, 2014). Neurotrófikus és neuroprotektív hatása direkt és indirekt mechanizmusokon keresztül valósulhat meg. Direkt védő hatása többek között a kaszpáz-3 apoptotikus enzim gátlása révén (Vaudry et al., 2000b), vagy proapoptotikus faktorok, így Bad és Bax expressziójának csökkentésével (Falluel-Morel et al., 2004), valamint antiapoptotikus Bcl-2, Bcl-xL és 14-3-3 szintjének növelésével érvényesül. Emellett csökken a mitokondriumból kiáramló citokróm C mennyisége is (Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004; Meyer, 2006; Botia et al., 2007; Atlasz et al., 2010). Indirekt neuroprotektív hatása a gliasejtek gyulladásoos válaszreakcióinak módosításával valósul



meg (Delgado és Ganea, 2003). Ismert neuroprotektív hatása mellett általános citoprotektív hatása is, az idegsejteken kívül védi a károsító hatásokkal szemben a szívizomsejteket (Gasz et al., 2006; Mori et al., 2010), a trofoblaszt sejteket (Horváth et al., 2014), az endotélsejteket (Rácz et al., 2007) és a pigmenthámsejteket is (Fábián et al., 2012). Citoprotektív hatásán túl számos in vivo és in vitro kísérlet igazolta antioxidáns és antiinflammatorikus védő hatását (Reglódi et al., 2012; Vaudry et al., 2009).

## **1.2. A PACAP gasztrointesztinális traktusra kifejtett hatásai**

A PACAP és receptorainak előfordulását számos korábbi tanulmány igazolta a gasztrointesztinális traktus teljes hosszában a neuroendokrin és az intersticiális sejtekben, a plexus myentericus és submucosus rostjaiban, valamint a hasnyálmirigyben, az epehólyagban és a májban is (Arciszewski et al., 2015; Ji et al., 2013; Köves et al., 1993; Oh et al., 2005; Vu et al., 2016; Zhang et al., 2006). A PACAP-nak számos, sokrétű hatását igazolták a gyomor-bél traktus egész területén (Fujimiya and Inui, 2000; Wu et al., 2015; Farre et al., 2006; Leung et al., 2001; Oh et al., 2005).

Immunhisztokémiai vizsgálatok igazolták a PACAP előfordulását a nyelőcsőben, az alsó nyelőcső záróizomban található plexus myentericus rostjaiban. Mind a PACAP27, mind a PACAP38 a VIP-hez hasonlóan elősegíti az alsó nyelőcső záróizom relaxációját (Farre et al., 2006; Farre és Sifrin, 2008).

A gyomorban hatással van a gyomor motilitására, a gyomorsav-szekrécióna és a gyomor vérellátására is. Az alsó nyelőcső záróizomhoz hasonlóan relaxálja a gyomorfundus izomzatát (Yasuyuki et al., 2016; Larsson et al., 1995). Patkány gyomorfundusából kivett izommintában VIP, szekretin és PACAP adása mellett relaxáció volt megfigyelhető (Robberecht et al., 1998), mely relaxáló hatás mind a hosszanti, mind a körkörös izomrétegben kimutatható (Azuma et al., 2016). PACAP knockout (KO) egerekben csökkent gyomorrelaxáció figyelhető meg (Hagi et al., 2008). Emellett a PACAP a pylorus ellazulását is elősegíti (Tadashi et al., 2000). In vivo intravénásan alkalmazott PACAP-injekció szignifikáns pylorus relaxációt okoz patkányoknál, mindezek alapján feltételezhető, hogy a PACAP gátló neurotranszmitterként hat a patkány pylorusban és ezáltal szabályozza a gyomor ürülését (Ishiguchi et al., 2000).

A PACAP gyomorsav-szekrécióna kifejtett hatása összetett. A kefalikus fázisban a vagális afferensek acetilkolin és PACAP felszabadítása révén stimulálják a gyomorsav

szekréciónját, míg a gasztrikus fázisban a G-sejtekből kiáramló gasztrin, a D-sejtekből felszabaduló szomatosztatin és az enterokromaffin-szerű sejtekből (ECL) felszabaduló hisztamin szabályozza a gyomorsav-szekréciónját (Vu et al., 2016). A gyomorban található ECL sejtek felszínén PAC1-receptor igazolható (Oh et al., 2005). In vitro körülmények között a PAC1-receptor aktivációja az ECL-sejtekből hisztamin felszabadulását eredményezi (Zeng et al., 1999) kalciumbeáramlást követően (Lindstrom et al., 2001). Élettani körülmények között a gasztrin, illetve a hisztamin fokozza a parietális sejtekből a gyomorsav felszabadulását. A PACAP-indukálta gyomorsav-szekréciónját foszfodiészteráz-4-gátló rolipram gátolja, amely megakadályozza a cAMP degradációját (Okuda et al., 2009). A PACAP ugyanakkor a gyomor D-sejtjein található VPAC1 receptorokon át szomatosztatin felszabadulását segíti elő, mely prosztaglandin E2 (PGE2) felszabadítása révén a gyomorsav szekréciónját erőteljesen gátolja (Lu et al., 2011; Li et al., 2000). PAC1-receptor génhiányos egerekben a gyomorban az alap savszekréción magas, az exogén gasztrin nagyobb hatással bír, ugyanakkor a hisztamin stimulációs út intakt marad (Lu et al., 2011).

PACAP-immunreaktív rostok a gyomor ereinek falában és az erek környezetében is kimutathatók (Sundler et al., 1992; Naruse et al., 1996). A PACAP általános vazodilatátor hatását számos kísérletben bizonyították (Ivic et al., 2017; Vámos et al., 2014; Bánki et al., 2014), ez a vazodilatátor hatás igazolható a gyomor ereinek esetében is (Tornoe et al., 2001). PACAPerg idegrostok jelentős mennyiségben a submukozában vannak, azonban kisebb mennyiségben a mukoza területén is kimutathatók, melyek elsősorban az erekhez kapcsolódnak, mindez jelzi a PACAP lehetséges szerepét a gyomor vérellátásában (Tornoe et al., 2001; Reglődi et al., 2018c).

Endogén PACAP38 és PACAP27 a gasztrointesztinális traktus teljes hosszában, így a vékonybélben is kimutatható, különösen nagy koncentrációban a jejunum és az ileum területén (Hannibal et al., 1998). Korábbi, PACAP intesztinális hatásait tárgyaló összefoglaló közleményünkben részleteztük a PACAP bélrendszerben kifejtett hatásait: számos hatása igazolt a vékonybélben, befolyásolja a bélfal motilitását, a záróizmok működését és az intesztinális szekréciónját (Horváth et al., 2016). Elősegíti bizonyos növekedési faktorok szekréciónját, így az intesztinális simaizomsejtekből felszabaduló brain-derived neurotrophic factor (BDNF) szekréciónját (Al-Qudah et al., 2015), valamint a sejt-migrációra is hatással van. Vékonybél autotranszplantáció során a PACAP védi a vékonybélsejteket az iszkémiás károsodástól. PACAP38-at tartalmazó University of Wisconsin

oldatban történt vékonybél-konzerválás és autotranszplantáció során a PACAP38 növeli a szöveti PACAP38- és PACAP27-szinteket és csökkenti a citokin-expressziót, mindez a PACAP38 citoprotektív és antiinflammatorikus hatását támasztja alá vékonybél autotranszplantációs modellben (Nedvig et al., 2013). Egereken *Toxoplasma gondii*-indukálta experimentális akut ileitisz esetén az infekciót követően profilaxisként vagy terápiaként alkalmazott exogén PACAP a gyulladásos folyamat súlyosságát enyhíti, a Th1-mediálta immunválaszt és az oxidatív stresszt csökkenti, ugyanakkor elősegíti az antiinflammatorikus citokin választ (Heimesaat et al., 2014). A vizsgálat során azt találták, hogy a PACAP-indukálta gyulladáscsökkentő hatás nem korlátozódott csak a vékonybélre, extraintesztinálisan is megnyilvánult, így a májban, vesében, tüdőben is igazolni lehetett (Heimesaat et al., 2014). Akut ileitisz esetén gyakran a kommenzális bélflóra tagja, így például az *Escherichia coli* transzlokálódik az epiteliális barrieren át az intesztinális lamina propria-ba, majd az átjutott baktérium, vagy a bakteriális sejtfal egyes alkotóeleme (pl.: lipopoliszacharid - LPS) a véráramba jutva szepszist vagy többszervi elégtelenséget okozhat (Bereswill et al., 2010). A profilaktikusan adott PACAP megelőzte a szepszist és a többszervi elégtelenséget azáltal, hogy a proinflammatorikus citokin-expressziót csökkentette, ugyanakkor antiinflammatorikus citokinek mennyiségét szisztémásan növelte. A vizsgálat alatt a májban az antiinflammatorikus hatású IL-4, a szérumban és a lépben az IL-10 mennyisége nőtt PACAP-profilaxist követően (Heimesaat et al., 2014).

A vékonybélhez hasonlóan PACAP-receptorok a vastagbélben is előfordulnak. A PACAP a vastagbélben gátolja az intersticiális Cajal-sejtek pacemaker aktivitását (Wu et al., 2015), ezáltal befolyásolja a vastagbél falának motilitását. Gonkowski és Calka sertés vastagbélbetegségeken vizsgálták a PACAP előfordulását (Gonkowski et al., 2012). A leszálló vastagbélben kémiai indukált gyulladás, idegsérülés és proliferatív enteropátia esetén megnövekedett a PACAP27-szerű immunreaktív (LI) idegrostok száma a körkörös izomrétegben. Wojtkiewicz és munkatársai (2012) leírták, hogy a colon alsó szakaszát ellátó ganglion mesentericum inferius neurokémiai összetételében gyulladás indukálta változás léphet fel sertések esetében. Habár a PACAP szintjét nem vizsgálták, azt találták, hogy a VIP immunreaktív neuronok száma csökken proliferatív enteropátiában (Wojtkiewicz et al., 2012). A PACAP és a PACAP-receptorok expressziójában történő változást írták le dextrán-szodium-szulfát (DSS)-indukálta colitis esetén is egerekben. A PACAP (és a VIP) mRNS fokozott expressziója volt kimutatható TRPA 1 (tranzien

receptor potenciál Ankyrin type 1) knockout egerekben is, míg a vad kontroll csoportban ez nem volt igazolható (Kun et al., 2014). Korábban számos humán vizsgálat igazolta a PACAP szintjének változását a vastagbél betegségei esetén is. A rektum és a szigma területén talált tumorok szövettani mintáiban szignifikánsan alacsonyabb PACAP-szintet találtak, mint a normál nyálkahártya területéről vett mintákban (Szántó et al., 2012), ugyanakkor tüneteket okozó vastagbél divertikuláris betegség, vagy manifeszt divertikulitisz esetén a colon biopsziás mintákban a PACAP szintje kifejezetten emelkedett (Simpson et al., 2009). Gyermekkori colitis ulcerosa esetén a gyulladt területekről vett mintákban a PACAP-tartalmú idegrostok csökkenését igazolták (Kaminska et al., 2006; Kaminska et al., 2007). Hirschprung-betegség esetén az aganglionáris szegmens területén ugyancsak csökken a PACAP szintje (Shen et al., 1992), míg IBD-ben szenvedő kutyák vékony- és vastagbelének mukozájában elhelyezkedő axonterminálisokban fokozott expressziót mutat (Gonkowski et al., 2013). Crohn-betegségben szenvedő betegek vékonybelében szintén fokozott PACAP-expressziót mutattak ki a plexus myentericus és a körkörös izomréteg idegrostjaiban (Bélai et al., 1997).

### **1.3. PACAP génhíányos egerek**

Az endogén PACAP hiánya számos biokémiai és viselkedésbeli eltéréssel társul. PACAP hiánya esetén a különböző in vivo és in vitro inzultusokra sokkal sérülékenyebben, sokkal érzékenyebben reagálnak az állatok. PACAP-hiányos egerek fertilitási rátája csökken (Shintani et al., 2002; Lajkó et al., 2018; Reglődi et al., 2018) továbbá a különböző anyagcsere-változások, légzőszervi abnormalitások, megnövekedett inzulinérzékenység miatt magasabb a mortalitási rátájuk, mint a vad egereké (Gray et al., 2001; Hashimoto et al., 2001; Reglődi et al., 2012b). A PACAP antidepresszáns hatással rendelkezik, valamint szerepe van a stressz szabályozásában, így a PACAP-hiányos egerek depressziószerű viselkedést mutatnak, súlyos abnormális válaszokat adnak a különböző stressz-szituációkra és hiperaktívak (Hashimoto et al., 2011; Mabuchi et al., 2004; Hame-link et al., 2002; Reglődi et al., 2012b; Farkas et al., 2017a). A PACAP fontos szerepet játszik a fogfejlődésben is. 1 éves egerek fogainak vizsgálata során azt találták, hogy KO egerek fogaiban a dentin mennyisége és a kalcium-hidroxiapatit denzitása alacsonyabb

a vad egerekben mértékhez képest (Sándor et al., 2016). PACAP génhányos egerek esetén korai öregedési jelenség is kimutatható, a szisztémás szenilis amiloidózis megjelenése gyorsított KO egerek esetén (Reglődi et al., 2018b). PACAP KO és vad egerek vizsgálata során azt találták, hogy fiatal PACAP KO egerek esetében mind a pre-szenilis, mind a szenilis amiloid fokozottan volt jelen, valamint generalizáltabban, súlyosabban jelent meg. A hisztopatológiai vizsgálatok korrrel összefüggő szisztémás amiloidózist igazoltak a vesében, lépben, májban, bőrben, pajzsmirigyben, bélben, légcsőben és a nyelőcsőben is. Habár a lokális amiloidogén fehérje expresszió zavart volt a KO állatokban, nem volt különbség a lipid paraméterek között, ami arra utal, hogy egy komplex út vezet a növekvő életkorral összefüggő amiloid depozícióhoz PACAP hiánya esetén (Reglődi et al., 2018b).

Jól ismert, hogy a PACAP neurotrófikus és neuroprotektív hatással rendelkezik. Globális és fokális agyi iszkémia esetén védő hatású (Dohi et al., 2002; Reglődi et al., 2002; Tamás et al., 2002). Fokális iszkémia esetén csökkenti az agyi infarktus területét, míg globális iszkémia mellett kb. 50%-kal csökkenti a hippocampus területén a neuronok pusztulását. Az arteria cerebri media elzáródásakor az agyi ödéma mértéke 25%-kal nagyobb PACAP-hiányos egerek esetén (Nakamachi et al., 2010). Exogén PACAP hozzáadásával az iszkémiás károsodás mértéke csökkenthető. Ugyanakkor az is igazolódott, hogy az iszkémia-indukálta antiapoptotikus hatású Bcl-2 fehérje mennyisége csökken PACAP-hiányos egerek esetén, míg a citokróm C citoplazmába történő beáramlása fokozódik a vad egerekhez képest (Ohtaki et al., 2006). Korábbi tanulmányok igazolták azt is, hogy a PACAP neuroprotektív hatása interleukin 6 (IL-6)-függő (Ohtaki et al., 2006). Mindezek mellett a PACAP-hiányos egerek mortalitása magasabb agyi iszkémiát követően (Nakamachi et al., 2010). Az iszkémia indukálta retinadegeneráció szövettanilag igazoltan súlyosabb PACAP-hiány esetén (Szabadfi et al., 2012). Szklerózis multiplex modellben, experimentális autoimmun enkefalomielitisz esetén a KO egerek esetében a gyulladás súlyosabb mértékű és nagyobb területet érint, az egereknek súlyosabb tünetek vannak. Mindez azt támasztja alá, hogy az endogén PACAP védő hatással rendelkezik szklerózis multiplex modellben (Tan et al., 2009; Abad and Washek 2011; Abad et al., 2016). A vesében szintén védő hatását sikerült igazolni a különböző inzultusokkal szemben, így iszkémia/reperfúziós sérülés, myelomás könnyűlánc protein okozta nefropátia, cisplatin és ciklosporin indukálta nefrotoxicitás esetén (Li et al., 2008; Reglődi et al., 2012a; Li et al., 2011; Szakály et al., 2008; László et al., 2015). PACAP

KO egerek veséiből izolált teljes sejttenyészetet hidrogén-peroxid alkalmazásával oxidatív stressznek kitéve, a sejtek életképessége csökken a vad egerek sejtjeihez képest. Ugyancsak hasonló eredmény született kobalt-klorid által *in vitro* hipoxiának kitétt sejttenyészet esetén is (Horváth et al., 2010a; 2010b).

A vékonybélben iszkémia/reperfúziós sérülés esetén védő hatású a PACAP. PACAP-hiányos egerekben a szöveti oxidatív stressz paraméterek lényegesen magasabbak, mint a vad egerekben. PACAP KO egerek vékonybélének szövettani elemzése azt mutatja, hogy súlyosabban károsodik a bél mukozája, szubmukozája és a kripták (Ferencz et al., 2010a). Experimentális vékonybél-transzplantáció esetén a KO egerek esetén a szöveti sérülés súlyosabb, a mukoza, szubmukoza vastagsága és a kripták mélysége csökken. Ugyanakkor a konzerváló oldathoz adott PACAP védő hatásának bizonyult (Ferencz et al., 2010b). A vastagbélben az endogén PACAP védő hatása szintén kimutatható. Gyulladásos bélbetegség modellben, DSS-indukálta colitis esetén a KO egerekben a betegség tünetei, így a testsúlycsökkenés, vérzés, hasmenés sokkal súlyosabbak, a mortalitásuk 50%-kal magasabb, mint a vad egereké. Emellett a vastagbél rövidül. KO egerek esetén a proximális colonban az IL-1 $\beta$ , IL-6, míg a disztális colonban az IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 és a KC szintje 50%-kal magasabb, mint a vad egerekben (Azuma et al., 2008). Szövettani vizsgálatuk során a gyulladásos score 50-70%-kal magasabb, ugyanakkor a KO egerek 60%-ában colon tumor alakul ki (Nemetz et al., 2008).

A hasnyálmirigyben az intrapancreaticus ganglionokban és a vegetatív idegekben található PACAP, mely védi a  $\beta$ -sejteket a különböző inzultusokkal szemben (Onoue et al., 2008). PACAP KO egerek esetén a magas glükóz- és palmitátszint csökkenti a glükóz-indukálta intracelluláris kalciumszintet és az inzulinszekréciót, az egerek glükotoxicitás és lipotoxicitás iránti érzékenysége fokozott (Nakata et al., 2010; Sakurai et al., 2011a). Az endogén PACAP védő hatása igazolódott a szívben is, védi a szívizomsejteket az oxidatív stressz-szel, a doxorubicin okozta károsodással és az iszkémia/reperfúziós sérüléssel szemben (Gasz et al., 2006; Rácz et al., 2008; Alston et al., 2011). KO egerekben a doxorubicin-indukálta kardiomiopátia sokkal súlyosabb, vad egerekhez képest szignifikánsan magasabb a mortalitásuk. Endotoxin-indukálta légúti gyulladás súlyosabb PACAP hiánya esetén. Mind a peribronchiális gyulladás, mind a perivaszkuláris ödéma súlyosabb, emellett megnő a légúti hiperreaktivitás (Elekes et al., 2011).

PACAP-hiányos egerek esetén szignifikánsan magasabb a reaktív oxigén metabolitok szintje, ugyanakkor az antioxidánsok hatása alacsonyabb a plazmában (Ohtaki et al., 2010). Mindez alátámasztja, hogy az endogén PACAP citoprotektív hatású, hiánya esetén fokozódik a sejtek sérülékenysége a különböző külső behatásokkal szemben (Reglódi et al., 2012b).

A PACAP citoprotektív hatása mellett jól ismert antiinflammatorikus védő hatása is, ezért vizsgálataink során célul tűztük ki a gasztrointesztinális traktus egyes gyulladásos megbetegedéseiben a PACAP szerepének vizsgálatát. Emiatt a következő fejezetekben részletesen ismertetem a gyulladásos bélbetegség, a gasztritisz és a fekélybetegség patogenezisét.

## **2. Gyulladásos bélbetegségek patogenezise**

A gyulladásos bélbetegségek (inflammatory bowel disease - IBD) krónikus, ismeretlen etiológiájú megbetegedések, melyek két formája a colitis ulcerosa és a Crohn-betegség. Az IBD feltehetően genetikailag fogékony egyéneknél valamilyen külső tényező hatására elinduló, kórosan regulált, folyamatos immunválasz eredményeként jön létre (Zhang et al., 2014). A Crohn-betegség transzmurális, szegmentális gyulladást okoz, mely megjelenhet a gasztrointesztinális traktus bármely szakaszán, azonban leggyakrabban a terminális ileum és a coecum érintett. Ezzel szemben a colitis ulcerosa a bél nyálkahártyáján hoz létre fekélyes gyulladást és csak a vastagbelet érinti (Abraham és Cho, 2009). Szövettanilag a colitis ulcerosa aktív, florid stádiumában a limfociták, plazmasejtes beszűrődés mellett neutrofil granulociták, kriptakárosodás, kriptitisz, kriptabszcesszus is megjelenhet, míg a gyógyuló és az endoszkóposan negatív területeken plazmasejtes, limfociták beszűrődés figyelhető meg. Crohn-betegség esetén a limfociták, plazmasejtek, neutrofil granulociták mellett granulomákat lehet látni (Tizslavicz, 2011). Habár az IBD etiológiája továbbra is nagyrészt ismeretlen, számos kutatási eredmény bizonyítja, hogy a genetikai fogékonyság, a külső környezeti tényezők, a bélflóra és a megváltozott immunválasz mind része az IBD patogenezisének (Danese és Fiocchi, 2006).

A gyulladásos bélbetegségek kutatása során első alkalommal a Crohn-betegség kialakulásának elősegítésében gyanúsítható NOD2 (nucleotide-binding oligomerization

domain containing 2) gént írták le (Ogura et al., 2001). A NOD2/CARD15 (caspase recruitment domain) a monocitákban a muramil- dipeptidet (MDP) és a bakteriális lipopoliszacharidot érzékelő NOD2 fehérjét kódolja. Elsősorban monocitákban expresszálódik és az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktort aktiválja (Lala et al., 2003). A gén mutációi, polimorfizmusai a Crohn-betegség kialakulásának esélyét növelik. Gyulladásos bélbetegség esetén az immunválaszban jelentős szerepe van az autofágiának, az ATG16LI (autophagy-related gene like 1) polimorfizmusa szintén Crohn-betegséggel mutat szoros kapcsolatot (Rioux et al., 2007).

Az autofágia részt vesz az intracelluláris homeosztázisban, hozzájárul a citoszólban lévő szerves sejtek degradációjához és újrahasznosításához, valamint az intracelluláris mikrobák eltávolításához (Khor et al., 2011). Az elmúlt időszakban írták le az IBD és az IL23R gén közti kapcsolatot, mely gén a proinflammatorikus hatású IL-23-t kódolja. Az IL-23 kulcsfontosságú citokin mind a veleszületett, mind az adaptív immunitásban, és központi szerepe van a kórokozókkal szembeni védelemben. Az IL23R gén polimorfizmusa összefüggésben van mind a Crohn-betegség, mind a colitis ulcerosa előfordulásával (Takatori et al., 2009).

Kétségtelenül a környezeti tényezőknek is jelentős szerepe van az IBD patogenezisében. Számos környezeti tényezőt vizsgáltak mint lehetséges rizikó faktort a gyulladásos bélbetegségek kialakulásában, így a dohányzást, étkezési szokásokat, gyógyszereszedést, lakóhelyet, szociális helyzetet, stresszt, pszichés tényezőket (Loftus, 2004). Mindezek közül a dohányzás maradt a legszélesebb körben vizsgált rizikótényező. Paradox módon a dohányzás colitis ulcerosa esetén kedvező hatású, míg Crohn-betegség esetén egyértelműen rontja a tüneteket. Az aktív dohányzás csökkenti a colitis ulcerosa fellángolásának lehetőségét (Nakamura et al., 1994), műtét után ritkábban alakul ki pouchitis, dohányzás mellett ritkábban van szükség colectomiára (Silverstein et al., 1994). Ugyanakkor Crohn-betegségben a dohányzás kedvezőtlen hatású. Hajlamosít a betegség kialakulására és rontja a lefolyását (Franceschi et al., 1987), dohányosok körében gyakoribb a sztenotizáló és a fisztulázó lefolyás (Lindberg et al., 1992). A gyulladásos bélbetegségek rizikótényezői között vizsgálták vitaminhiány lehetőségét is. Az alacsony D- vitamin-szintnek szerepe lehet IBD kialakulásában. DSS-indukálta colitis esetén a gyulladás súlyossága méréselhető volt D-vitamin bevitelével (Cantorna et al., 2000). A nem-szteroid gyulladáscsökkentők (nonsteroidal anti-inflammatory drug-NSAID) vizsgálata kapcsán azt találták, hogy a nagy dózisban, hosszan szedett NSAID-terápia mellett növekedhet a Crohn-



betegség és a colitis ulcerosa rizikója (Ananthakrishnan et al., 2012). A stressz, a depresszió és a szorongás egyértelműen szerepet játszhat az IBD kialakulásában (Bitton et al., 2008).

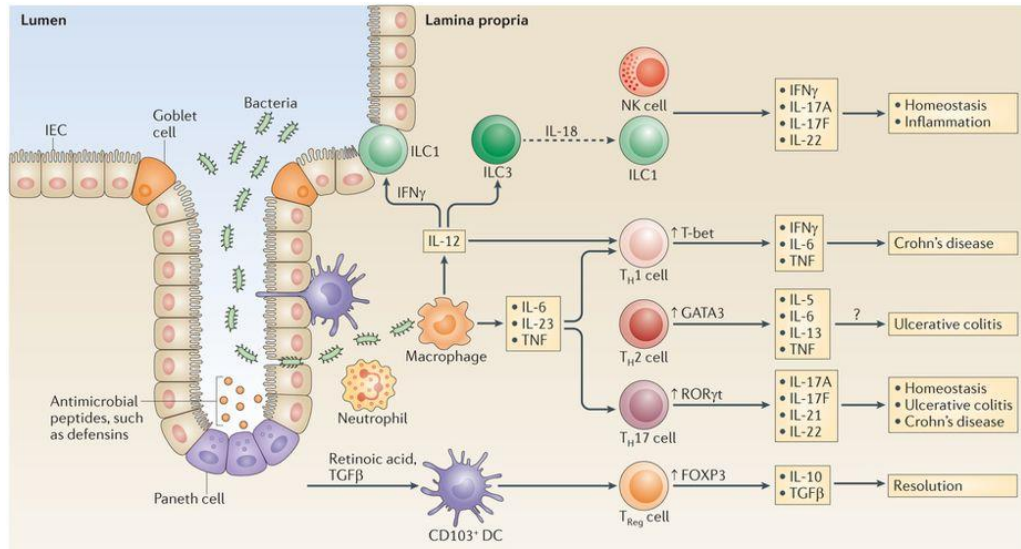
A normál bélflóra a születésünket követő hetekben alakul ki, majd egészséges körülmények között stabilan megmarad. Számos klinikai tanulmány igazolta, hogy IBD esetén megváltozik a normál bélflóra, szignifikánsan csökken a széklet mikrobiom biodiverzitása az egészséges kontrollhoz képest (Joossens et al., 2011). Az egészséges bélben a *Firmicuta* és *Bacteroides phyla* törzsek predominánsak, amelyek hozzájárulnak az epitélium metabolikus szubsztrátjainak képződéséhez. Ezzel szemben Crohn- betegségben a *Firmicuta* és *Bacteroides* törzsek relatív hiánya, valamint az *Enterobacteriumok* túlzott jelenléte figyelhető meg, míg colitis ulcerosa esetén a *Clostridium* törzsek csökkenése és az *Escherichia coli* törzsek fokozott jelenléte mutatható ki (Martinez et al., 2008). A normál bélflóra összetételének megváltozása kedvezőtlenül befolyásolja az epitel integritását és a mukoza immunvédekezését.

A gyulladással járó bélbetegség patogenezisében kiemelt jelentősége van a mukozális immunitásnak és a T-sejt-válasznak is. Feltehetően a veleszületett és a szerzett immunitás diszfunkciója vezet egy aberráns gyulladással járó válaszhoz a bélben. A Crohn-betegséget a hibás Th1-válasszal, míg a colitis ulcerosát a nem szokványos Th2-válasszal hozzák összefüggésbe (2. ábra) (Cobrin et al., 2005; Targan et al., 2005). Az újonnan leírt Th17-sejtek szintén részt vesznek a gyulladással járó válaszban IBD esetén (Geremia et al., 2012). A veleszületett immunrendszer egyik fontos eleme az epiteliális barrier működése, mely az első vonal a patogénekkal szembeni védekezésben, számos sejt aktiválhatja, így epitel-sejtek, makrofágok, neutrofil granulociták, monociták, dendritikus sejtek. A sejtfelszíni toll-like receptorok (TLR) és a citoszólban lévő NOD-like receptorok mikrobiális antigének felismerése által aktiválják az immunrendszert (Abreu et al., 2005). Számos klinikai vizsgálat igazolta, hogy a veleszületett immunitást közvetítő sejtek viselkedése, valamint a TLR és a NOD fehérjék expressziója és funkciója megváltozik IBD esetén. Egy angol tanulmány azt mutatja, hogy trauma hatására a mukozális neutrofilek IL-1 $\beta$  és IL-8 termelése szelektíven csökken Crohn-betegekben, míg colitis ulcerosa esetén nem változik (Marks et al., 2006). NOD2 mutáció esetén bakteriális antigén, LPS hatására fokozódik az IL-12 expresszió, így a NOD2 csökkent működése ellenére is termelődhetnek inflammatórikus citokinek (Bonen et al., 2003). Ugyanakkor a NOD2 funkciójának el-

vesztése a TLR2-stimuláció gátlásának hiányához vezet, ami gyulladási utak aktiválásához és túlzott Th1-válaszokhoz vezethet (Watanabe et al., 2004). A gyulladás aktiválásában, a relapszusok kialakulásában az NF- $\kappa$ B aktiválódása is megfigyelhető, az NF- $\kappa$ B azonban nemcsak proinflammatorikus faktorokat termel, hanem részt vesz a gyulladási folyamat eliminálásában is. Az NFKB1 kódoló gén polimorfizmusa növeli a colitis ulcerosa kialakulásának rizikóját (Karban et al., 2004). Az IL23 egy kulcsfontosságú citokin mind a veleszületett, mind a szerzett immunitásban, központi szerepe van a kórokozókkal szembeni védekezésben. Az IL23R gén polimorfizmusa összefüggésben van mind a Crohn-betegség, mind a colitis ulcerosa kialakulásával (Takatori et al., 2009). Jól ismert, hogy gyulladási bélbetegségben az epiteliális barrier sérült és fokozott az intesztinális permeabilitás (Salim et al., 2011). Az enterális kórokozók és az ételallergénekkel szemben az első fizikai barrier a mukozális felszínen az intesztinális epitél borító nyákréteg. A nyákréteg jelentősége a baktériumok átjutásának megakadályozása és ezáltal a bélgyulladás megelőzése (Van der Sluis et al., 2006). A második vonal a védekezésben az intesztinális epitélium, amely enterocitákból és speciális epiteliális sejtekből, így kehelysejtekből és Paneth-sejtekből épül fel. A fizikai védelem nyújtása mellett az epiteliális sejtek számos antimikrobiális peptidet is termelnek. Crohn-betegség esetén ezen antimikrobiális peptidok expressziója károsodik (Wehkamp et al., 2003).

A szerzett immunitás a veleszületett immunitással szemben specifikus, gyakran az immunválasz napokat vesz igénybe és függ a T-sejtek típusától és számától. Az IL-12 által aktivált Th1-sejtek IFN- $\gamma$  képzésében, míg a Th2-sejtek IL-4, IL-5 és IL-13 termelésében vesznek részt (Korn et al., 2009). Crohn-betegség esetén abnormális Th1-immunválasz figyelhető meg, Crohn-betegek mukozális T-sejtjeinek fokozott az IL-2 és IFN- $\gamma$  termelése (Breese et al., 1993). Ugyanakkor colitis ulcerosa esetén nagyobb mennyiségben szabadulnak fel atípusos NK-sejtek és Th2 által termelt IL-13 (Heller et al., 2005; Fuss et al., 2004). Mindezek alapján a Crohn-betegséget a hibás Th1-válasszal, míg a colitis ulcerosát a nem szokványos Th2-válasszal hozzák összefüggésbe (Cobrin et al., 2005; Targan et al., 2005). A Th17-sejtek IL-17A, IL-17F, IL-21 és IL-22 expressziójára alkalmasak, a sejtek IL-23, IL-6 és TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) kombinált hatására aktiválódnak (Zhou et al., 2007). A Th17-sejtek és különösen az általuk termelt IL-17A szerepét az intesztinális gyulladásban számos munkacsoport kutatja. Az IL-17A magas transzkripciós szintjét kimutatták mind Crohn-betegek, mind colitis ulcerosában szen-

védő betegek nyálkahártyájában (Kobayashi et al., 2008). Emellett a Th17-sejtek fontosak az IL-21 citokin termelésében, amely fokozottan van jelen IBD-s betegek nyálkahártyájában (Sarra et al., 2010).



Nature Reviews | Immunology

2.ábra. A citokinek szerepe az IBD patogenezisében. Környezeti triggerek, így mikroorganizmusok hatására dendritikus sejtek, neutrofilek, makrofágok, természetes ölü sejtek (NK) intesztinális epitél sejtek (IEC), természetes limfoid sejtek (ILC), mukozális effektor és regulátor T sejtek citokineket termelnek a gyulladt mukozában. A proinflammatórikus és antiinflammatórikus citokinek közötti egyensúly szabályozza a nyálkahártya gyulladás kialakulását. (forrás: Nature reviews Immunology, <https://www.nature.com/articles/nri3661/figures/2>)

A gyulladásoos bélbetegség esetén az oxidatív stressz, a reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) szerepe egyértelmű a betegség kialakulásában (Bhattacharyya et al., 2014). IBD esetén megnövekedett a ROS termékek szintje, ugyanakkor az antioxidánsok kisebb mennyiségben vannak jelen (Colgan et al., 2010; Iborra et al., 2011). A ROS termékek neutrofil granulociták aktiválásával fokozzák az immunreakciót és ezáltal további szövethkárosodást okoznak. A fagociták által szekretált  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  és  $OH^{\cdot}$  a gyulladás helyén felhalmozódva lipidperoxidációt eredményez (Bulger et al., 1998). Kísérletes körülmények között egerekben DSS-indukálta colitis esetén  $I\kappa B\alpha$  és  $NF-\kappa B$  útvonalak aktiválódnak.

nak a ROS-termékek által. A DSS megnöveli a sejtek szulfát terhelését, ami ROS termékek aktiválódásához és ezáltal a gyulladáshoz vezet (Bhattacharyya et al., 2009).

### 3. Gasztritisz és a gyomorfekély patomechanizmusa

A gasztritisz pontos definiálása nehéz, miután másként értelmezik a betegek, a klinikusok és a patológusok is. Általánosságban azonban elmondhatjuk, hogy ma már egyetértés van tekintetben, hogy a gasztritisz egy szövettani megjelölés, mely a gyomor nyálkahártyájának szövettanilag igazolt gyulladását jelenti (Lee et al., 2010). Sok esetben nincs összefüggés a beteg panaszai, az endoszkópos kép, valamint a patológiai lelet között. Szövettani vizsgálatuk során különböző eltérések alakulhatnak ki, amelyek egymással párhuzamosan is megjelenhetnek (Lash et al., 2009). A felszíni epiteliális sejtek károsodása szinte valamennyi gasztritiszes formánál megfigyelhető, de legmarkánsabban *Helicobacter pylori* infekció okozta gasztritisz esetén. A *Helicobacter pylori* a gyomor nyálkahártya epiteliáján kolonizálódik, mely lokális gyulladást vált ki. A baktérium virulenciafaktorai, így az ureáz, kataláz, flagella segítik elő a kolonizációt, majd a gyomormukozában proinflammatorikus faktorok gyulladást váltanak ki. A legismertebb proinflammatorikus faktorok a citotoxin-asszociált gén (CagA) és a vakuolizáló citotoxin (VacA), melyek jelenléte szoros összefüggést mutat a fekélybetegség kialakulásával is (Atherton, 2006; Müller, 2012). Az akut gyulladáshoz vezető reakció során a CagA fehérje epiteliális citokinek, így IL-8 felszabadulását stimulálja NF- $\kappa$ B aktiválásán keresztül (Brandt et al., 2005). A gyulladáshoz vezető citokinek hatására a mukozában neutrofil granulociták és makrofágok áramlanak, emellett szubepiteliálisan lizoszomális enzimek, leukotriének és oxigén szabadgyökök szabadulnak fel. A bakteriális antigének hatására T- és B-limfociták aktiválódnak, döntően Th1 típusú immunválasz indul el, melynek során további proinflammatorikus citokinek, így IL-1, IL-2, IL-6 és TNF- $\alpha$ , valamint *Helicobacter pylori* ellenes specifikus antitestek szabadulnak fel (Atherton, 2006). A baktérium hatására trombocita eredetű növekedési faktor (platelet derived growth factor-PDGF) expresszálódik, mely lokálisan trombusképződést okoz és következményesen iszkémiás károsodáshoz vezet (Mihály et al., 2014). Az epiteliális sejtek károsodása epés reflux esetén a nedvben lévő enzimek, epesavak hatására, míg nem-szteroid gyulladáscsökkentők esetén a prosztaglandinszintézis gátlása következtében jön létre (Mihály et al., 2014). Az epiteliális sejtek

károsodása mellett gasztritiszek esetén az alábbi szövettani eltérések alakulhatnak ki: foveoláris hiperplazia, hiperémia, ödéma, leukociták beszűrődés, limfoid aggregátumok, atrófia, intesztinális metaplázia, endokrin sejtes hiperplázia vagy interfoveoláris simaizomhiperplázia. Ezen szövettani eltérések egymással párhuzamosan is megjelenhetnek (Mihály et al., 2014).

Akut gasztritist elsősorban fertőzések okoznak, leggyakrabban a *Helicobacter pylori*, de egyéb károsító tényezők, mint az alkohol, vagy bizonyos gyógyszerek is okozhatnak heveny gyomornyálkahártya sérülést. Idült gasztritisz esetén elsősorban limfociták és plazmasejtek vannak jelen, neutrofil granulociták csak elvétve találhatók a mukozában. Az idült gasztritisz két leggyakoribb formája az „A” típusú, autoimmun metaplasztikus atrófiás gasztritisz, melyre elsősorban a corpus és a fundus mirigyeinek autoimmun károsodása jellemző, a másik a „B” típusú, *Helicobacter pylori* okozta idült gasztritisz (Mihály et al., 2014). Autoimmun gasztritisz esetén gyakran parietális sejt ellenes vagy a protonpumpa antigénjével szembeni antitestek jelennek meg. A mirigyek pusztulásában és a gyomornyálkahártya idült gyulladásának létrejöttében CD4+ limfociták játszanak szerepet, amelyek gyulladást okozó citokinek, így TNF- $\alpha$  felszabadulását eredményezik, melyek elősegítik a B-limfociták immunoglobulin-termelését. Emellett a CD4+ limfociták növelik a perforinmediált citotoxicitást és az apoptózist (D’Elios et al., 2001). Az idült gasztritiszek közül a leggyakrabban *Helicobacter pylori* okozta „B” típusú gasztritisszel találkozunk. Míg a *Helicobacter pylori* okozta gasztritisz heveny szakaszában a nyálkahártya heveny gyulladása, eróziók, apró fekélyek megjelenése a jellemző, úgy az idült szakaszban az epitelsejtek károsodása, a mononukleáris sejtes infiltráció és a limfoid folliculusok megjelenése figyelhető meg (Mihály et al., 2014).

*Helicobacter pylori* fertőzés következtében peptikus fekélybetegség is kialakulhat. Peptikus fekélyről akkor beszélhetünk, ha a gyomorsósav hatására aktiválódó pepszin nyálkahártya-sérülést okoz. A fekély patogenezisében jelentős szerepet játszik a gyomor védekező (nyák-bikarbonát réteg, prosztaglandinok, sejtregeneráció, mukozális vérátáramlás) és agresszív faktorai (sósav, pepszin, epesavak) közti egyensúly felbomlása. A peptikus fekélybetegség leggyakoribb okai a *Helicobacter pylori* fertőzés, valamint a NSAID-kezelés, ritkábban egyéb tényezők is állhatnak a fekély hátterében, így stressz, Zollinger-Ellison szindróma, Crohn-betegség. *Helicobacter pylori* fertőzés hatására a gyomornyálkahártyában gyulladást okozó citokinek, így IL-8 és IL-1 $\beta$  expresszálódik (Noach

et al., 1994), melyek hatására neutrofil granulociták és makrofágok lizoszomális enzimeket, leukotriéneket és reaktív oxigén szabadgyököket aktiválnak, melyek mukozális sérülést okoznak és elősegítik a fekély kialakulását. Emellett a *Helicobacter pylori* magas ureáz-aktivitással rendelkezik, mely ammónia képződését segíti elő. A nagy koncentrációban jelen lévő ammónia toxikus komplexek, így ammónium-klorid képződéséhez vezet, mely a bakteriális foszfolipázokkal együtt károsítja a gyomor epiteliális barrierjének integritását (Prabhu és Shivani, 2014). A mukozális integritás károsítása révén okoz fekélybetegséget a tartós NSAID-kezelés is, mely a gyomor prosztaglandinszintézisét gátolja (Wallace et al., 2008). Mind a ciklooxygenáz-1 (COX-1), mind a COX-2 enzim gátlása révén elősegítheti a nyálkahártya-károsodást. A ciklooxygenáz enzim gátlása mellett csökken a gyomormukoza vérátáramlása, a nyák- és a bikarbonát termelés. Jól ismert, hogy a nitrogén-monoxid (NO) és a hidrogén-szulfid (H<sub>2</sub>S) a mukoza integritásának megtartásában játszik fontos szerepet, emellett gátolja a gyomor nyálkahártyájában a neutrofil adherenciát is. A NSAID-ok a NO és a H<sub>2</sub>S gátlása révén is mukoza-károsodást okoznak. A neutrofil adherencia mellett oxigén szabadgyökök, proteázok szabadulnak fel, valamint csökken a kapilláris vérátáramlás (Wallace et al., 2008).

## II. Célkitűzés

1. A PACAP hatása sokrétű, antiapoptotikus, neuroprotektív, antiinflammatorikus, valamint sejttúlélést elősegítő hatása jól ismert. Vizsgálatunk célja volt meghatározni a PACAP hatását humán intesztinális epitéliumból származó INT407-sejtek esetén különböző károsító behatásokkal szemben, mint oxidatív stressz, in vitro hipoxia, gamma-sugárzás.

2. A bélrendszeri bakteriális infekciók kialakulása esetén döntő jelentőségű a baktériumok és az intesztinális epiteliális sejtek felszíne közt létrejövő adhézió. Célul tűztük ki a bakteriális adhézió vizsgálatát INT407 és Caco-2 sejttenyészetben a kommenzális flórában jelen lévő és patogénként is előforduló, valamint bélgyulladást okozó baktériumok esetén. Vizsgálatunkat kiterjesztettük az irányba, hogy további információt nyerjünk a PACAP hatásairól a bélrendszeri gyulladós folyamatok esetén INT407 sejttenyészet felhasználásával. Jól ismert, hogy PACAP KO egerek esetén a DSS-indukálta colitis súlyosabb formában jelenik meg, mint a vad egerekben. Ugyanakkor az intesztinális mikrobiom kulcsfontosságú számos megbetegedés, így az IBD patogenezisében is. Emiatt célul tűztük ki a bélflóra összetételének összehasonlítását PACAP KO és vad egerek esetében.

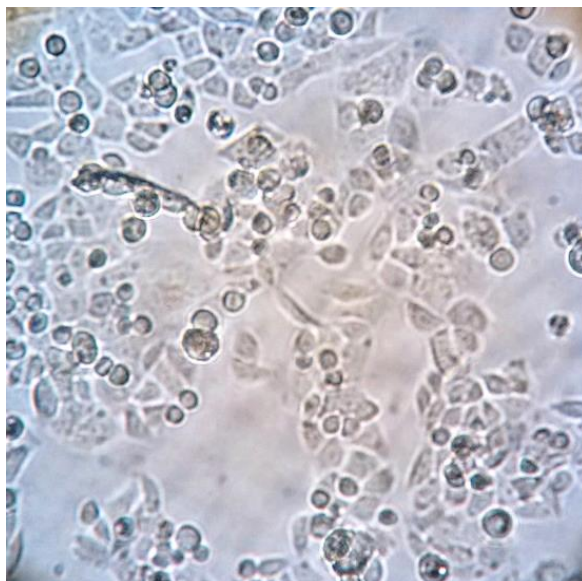
3. A PACAP és receptorai a gasztrointesztinális traktus teljes hosszában jelen vannak. Korábban számos közlemény igazolta a PACAP különböző hatását a gyomor-bél traktus egész területén. Vizsgálatunk során célul tűztük ki a PACAP szintjeinek meghatározását a gyomor-bél traktus egyes gyulladós megbetegedései esetén humán szöveti minták felhasználásával.

### III. Anyagok és módszerek

#### 1. Sejtkultúrák

##### 1.1. INT407-sejtek

Az INT407 sejt vonalat 2 hónapos humán embrió jejunumából és ileumából izolálták és széles körben alkalmazzák kutatási célokra (3. ábra). A sejteket Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) médiumban (Lonza, Switzerland) növesztették, melyhez 10% FBS-t (foetal bovine serum) (Biosera, USA) és 1% penicillin-streptomycint (Biosera, USA) adtunk. A sejteket tripszinnel (Trypsin/EDTA; Biosera, USA) történő izolálás után 96-lyukú microplate-re helyeztük és 10% FBS-t tartalmazó RPMI médiumban 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>-tartalom mellett inkubáltuk 24 órán keresztül.



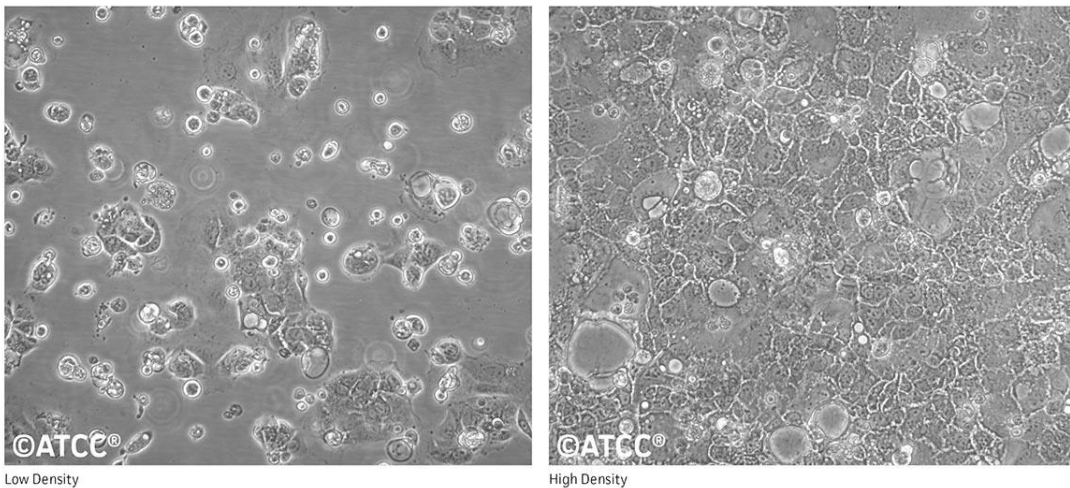
3. ábra: INT407 sejtenyészet fénymikroszkópos képe (saját anyag)



## 1.2. Caco-2 sejtek

A Caco-2 sejtvonalat (4. ábra) humán colon adenocarcinomából izolálták, számos területen alkalmazzák a klinikai kutatásban. A sejteket magas glükóztartalmú DMEM/F-12 médiumban (Biosera, USA) növesztették, melyet 10% FBS és 1% penicillin-streptomycin (Biosera, USA) hozzáadásával egészítettünk ki. A sejteket tripszinnel passzáltuk (Trypsin/EDTA; Biosera, USA), majd 10% FBS-t tartalmú DMEM médiummal hígítottuk. A vizsgálatokat megelőzően a sejteket 24 órán át, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó termosztátban inkubáltuk.

ATCC Number: **HTB-37**  
Designation: **Caco-2**



4. ábra: Caco-2 sejtenyészet fénymikroszkópos képe. (Forrás: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-37.aspx?geo\\_country=hu#characteristics](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-37.aspx?geo_country=hu#characteristics)).

## 2. PACAP38

Valamennyi vizsgálatunkhoz PACAP38-at használtunk, melyet Prof. Dr. Tóth Gábor laborjában szintetizáltak a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében (Józsa et al., 2005). A kísérletekhez használt koncentrációkat korábbi in vitro kísérleteink során határoztunk meg.

### **3. A PACAP INT407-sejtek proliferációjára kifejtett hatása**

#### *3.1. Proliferációs teszt*

A sejteket az alábbi csoportokra osztottuk:

1. kezelés nélküli kontroll csoport
2. 10 nM PACAP-pal kezelt sejtek
3. 100 nM PACAP-pal kezelt sejtek
4. 1  $\mu$ M PACAP-pal kezelt sejtek

24 órás inkubáció után a PACAP hatását a sejtproliferációra MTT-teszt ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, Hungary) segítségével vizsgáltuk.

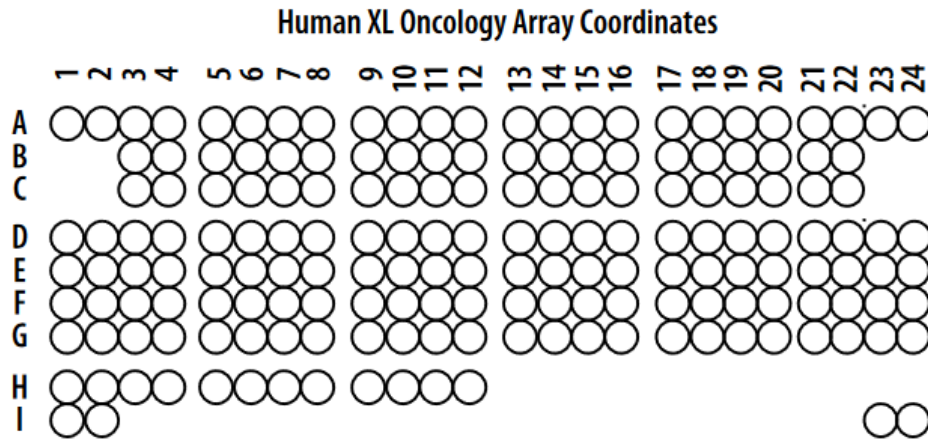
#### *3.2. Klonogén assay*

A PACAP INT407-sejtek klonogenitására kifejtett hatását klonogén assay segítségével vizsgáltuk. A sejteket 6-lyukú plate-re raktuk ki úgy, hogy 500 sejt/2ml médium jusson egy lyukba, majd a vizsgálat másnapján a sejteket vagy kezelés nélkül hagytuk, vagy 100 nM PACAP-pal kezeltük. 7 napos inkubációt követően a médiumot leöntöttük, a sejteket Coomassie brilliant blue-val festettük és a legalább 50 sejtet tartalmazó kolóniákat számoltuk.

#### *3.3. Oncology array*

Az oncology array segítségével vizsgáltuk a PACAP különböző tumorgenezisben szerepet játszó fehérje expressziójára kifejtett hatását (Proteome Profiler Human XL Oncology Array). A vizsgálathoz 6-lyukú plate-et használtunk, a kontroll csoportként használt INT 407-sejteket kezelés nélkül hagytuk, míg a másik sejtcsoporthoz 100 nM PACAP-ot adtunk, majd a vizsgálatot 24 órás inkubálást követően végeztük el. Inkubálás után a leöntött felülűszót felhasználva az array-t a gyártó leírása alapján készítettük elő és végeztük el. A membránokat egy órán át blokkoltuk, majd a felülűszóval egy éjszakán át 2-8°C-on rázógépen inkubáltuk. Lemosást követően a membránokat detektáló antitest koktéllal inkubáltuk egy órán át, majd ismételt mosást követően a membránokra HRP (horseradisch peroxidase)-

konjugált sztreptavidint tettünk 30 percre, ezután a membránokra kemilumineszcens reagenst pipettáztunk, majd röntgenfilmre előhívtuk. A filmet szkennelés után ImageJ szoftver segítségével analizáltuk és az 1. táblázatban feltüntetett tumor-függő proteineket vizsgáltuk.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ref	AFP	AREG	ANGPT1	ANGPTL4	ENPP-2 ATX	Axl	BCL-x	CA125 MUC16	E-Cadherin	VE- Cadherin	Ref
B		CapG	CA9	CTSB	CTSD	CTSS	CEACAM-5	DCN	Dkk-1	DLL-1	EGFR ErbB1	
C		ENG CD105	Endostatin	ENO2 NSE	eNOS	EpCAM TROP1	ERα NR3A1	ErbB2	HER3	HER4	FGF	
D	FoxC2	FoxO1 FKHR	Galectin3	GM-CSF	CG α/β (HCG)	MET	HIF1A	FoxA2	HSP32	ICAM-1 CD54	IL2RA CD25	IL-6
E	CXCL-8 IL-8	IL18BP	Kallikrein3	Kallikrein5	Kallikrein6	Leptin	Lumican	CCL-2 MCP-1	CCL-8 MCP-2	CCL-7 MCP-3	M-CSF	Mesothelin
F	CCL-3 MIP-1α	CCL-20 MIP-3α	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MSP MST-1	MUC-1	Nectin-4	OPN	p27 Kip1	p53	PDGF-AA
G	CD-31 PECAM-1	ProgR NR3C3	Progranulin	Prolactin	Prostasin	E-Selectin	Serpin B5	Serpin E1	Snail	SPARC	Survivin	TenascinC
H	THBS1	Tie-2	PLAU uPA	VCAM-1 CD106	VEGF	Vimentin						
I	Ref											Neg kontroll

1. táblázat. Proteome Profiler Human XL Oncology Array által detektálható tumorfüggő fehérjék.  
Az oncology array-vel mérhető faktorok táblázata.

#### **4. A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása gamma-sugárzás mellett**

Az INT407-sejtek irradációjához telekobalt külső besugárzó berendezést alkalmaztunk (Theratron 780C, átlagos foton energia: 1.25 MeV), a besugárzást 0,5, 1, 2, 3 vagy 4 Gray sugárdózissal végeztük.

##### *4.1. A sejtek viabilitása*

Az izolált sejteket 96-lyukú plate-re helyeztük (10000 sejt/well). A vizsgálathoz az alábbi sejtcsoportokat alkalmaztuk:

1. kezelés nélküli kontroll csoport
2. 100 nM PACAP-pal kezelt csoport
3. 0,5 Gy irradíciónak kitett sejtek
4. 0,5 Gy irradíciónak kitett sejtek 100 nM PACAP-pal előkezelve
5. 1 Gy irradíciónak kitett sejtek
6. 1 Gy irradíciónak kitett sejtek 100 nM PACAP-pal előkezelve
7. 2 Gy irradíciónak kitett sejtek
8. 2 Gy irradíciónak kitett sejtek 100 nM PACAP-pal előkezelve
9. 4 Gy irradíciónak kitett sejtek
10. 4 Gy irradíciónak kitett sejtek 100 nM PACAP-pal előkezelve

A PACAP-ot a kezelt csoporthoz a besugárzást megelőzően két órával adtuk. Az irradációt követően 24 órával sejttúlélést vizsgáltunk MTT teszt segítségével.

##### *4.2. Klonogén assay*

A fent leírtaknak megfelelően 6-lyukú plate-et használtunk, melybe a sejteket úgy raktuk ki, hogy lyukanként 500 sejt jusson. A vizsgálat másnapján a sejtek felét kezelés nélkül hagytuk, míg a másik felét 100 nM PACAP-pal kezeltük az irradációt megelőzően két órával. 7 napos inkubációt követően a médiumot eltávolítottuk, majd a sejteket Coomassie brilliant blue-val festettük és a legalább 50 sejtet tartalmazó kolóniákat számláltuk.

### 4.3. Phospho-ERK 1/2 western blot

A vizsgálathoz 6-lyukú plate-et használtunk, valamennyi lyukba  $10^6$  sejtet helyeztünk. A sejteket az alábbiak szerint csoportosítottuk:

1. kezelés nélküli kontroll csoport
2. 100 nM PACAP-pal kezelt
3. 0,5 Gy irradiációnak kitett sejtek
4. 0,5 Gy irradiációnak kitett sejtek 100 nM PACAP-pal előkezelve
5. 1 Gy irradiációnak kitett sejtek
6. 1 Gy irradiációnak kitett sejtek 100 nM PACAP-pal előkezelve

A vizsgálat másnapján, egy napos inkubáció után a sejtek membránját foszfatáz inhibitor ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )-tartalmú jéghideg lízis pufferben és proteáz inhibitor tartalmú PBS-ben lizáltuk (Sigma, Hungary), majd 5 percig,  $4^\circ\text{C}$ -on centrifugáltuk ( $12000\times g$ ) az oldatot. A fehérjemintákat 12%-os SDS-poliakrilamid gélen (SDS-PAGE) szeparáltuk, majd nitrocellulóz membránra vittük át. A következő lépésben a membránokat sovány tejpórral blokkoltuk, majd anti- $\beta$ -aktin és anti-p-ERK1/2 antitesttel (Cell Signaling Technology, USA) kezeltük. Másodlagos antitestként HRP-konjugált anti-nyúl IgG-t (Bio-Rad, Hungary) alkalmaztunk. Az előhívást ECL kemilumineszcens rendszer segítségével (Amersham Pharmacia Biotech, UK) végeztük.

### 5.A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása in vitro hipoxiában

In vitro hipoxia modellezésére  $\text{CoCl}_2$ -t alkalmaztunk  $500\ \mu\text{M}$  koncentrációban, mivel ilyen mennyiségben szignifikáns túlélés-csökkenést eredményez, ugyanakkor elegendő még az élő sejtek száma a kísérletek elvégzéséhez. In vitro hipoxia esetén a kobalt gátolja az interakciót a hipoxia-indukálható faktor ( $\text{HIF}1\alpha$ ) és a von Hippel-Lindau (VHL) faktor között. Megfelelő oxigénkoncentráció esetén a VHL kapcsolódik a  $\text{HIF}1\alpha$ -hoz, és annak lebontását indukálja. Kobalt alkalmazásakor azonban a  $\text{HIF}1\alpha$  nem degradálódik és a  $\text{HIF}1\beta$ -val dimerizálódva kifejti a génextpresszióra gyakorolt hatásait (Yuan et al., 2003), ezáltal utánozza az alacsony oxigénkoncentráció esetén létrejövő génextpressziós mintá-

zatot. A vizsgálatot két fázisban végeztük, első alkalommal a hipoxia modellezésére alkalmazott  $\text{CoCl}_2$  hozzáadása a sejtekhez a PACAP-előkezelést követően két órával történt, míg a következő kísérletben a PACAP-ot szimultán adtuk a sejtekhez. A vizsgálat-hoz az alábbi sejtcsoportokat alkalmaztuk:

I.fázisban alkalmazott sejtcsoportok:

1. kezelés nélküli kontroll csoport
2. 100 nM PACAP-pal kezelt csoport
3. 500  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ -dal kezelt csoport
4. 100 nM PACAP+ 2 órával később 500  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  kezelés

II.fázisban alkalmazott sejtcsoportok:

1. kezelés nélküli kontroll csoport
2. 100 nM PACAP-pal kezelt csoport
3. 500  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ -dal kezelt csoport
4. 100 nM PACAP+ szimultán adott 500  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  kezelés

A  $\text{CoCl}_2$ -kezelés 24 órán át tartott, majd a sejtek életképességét MTT assay-vel vizsgáltuk.

## **6. A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása oxidatív stresszben**

A vizsgálatot két fázisban végeztük, az első kísérletben PACAP-előkezelést követően 2 órával történt a  $\text{H}_2\text{O}_2$  sejtekhez való hozzáadása, míg a vizsgálat második fázisában a PACAP-ot és a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t szimultán adtuk a sejtekhez. A vizsgálat-hoz az alábbi sejtcsoportokat alkalmaztuk:

I. fázisban alkalmazott sejtcsoportok:

1. kezelés nélküli kontroll csoport
2. 100 nM PACAP-pal kezelt csoport
3. 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal kezelt csoport
4. 100 nM PACAP+2 óra múlva 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal kezelt csoport

II. fázisban alkalmazott sejtcsoportok:

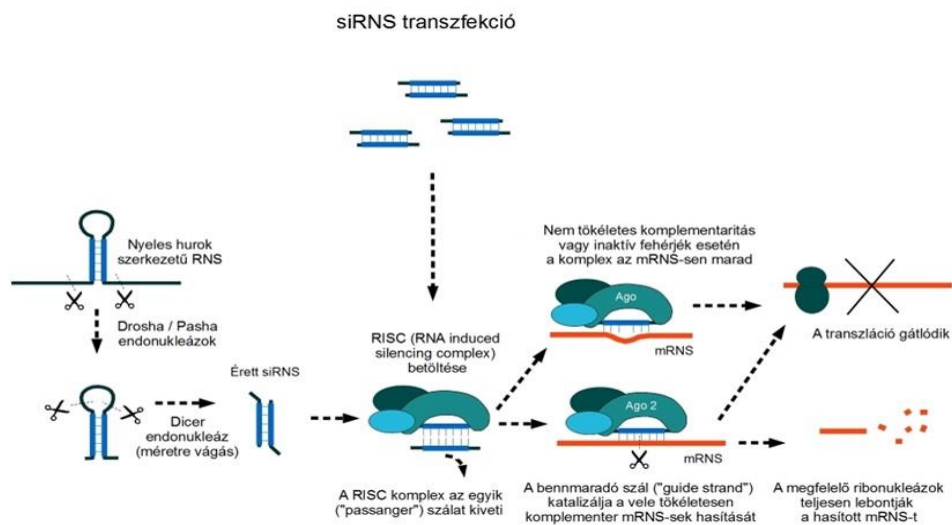
1. kezelés nélküli kontroll csoport
2. 100 nM PACAP-pal kezelt csoport
3. 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal kezelt csoport

#### 4. 100 nM PACAP+szimultán 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt csoport

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést 24 órán át végeztük, majd a sejtek viabilitását MTT assay segítségével vizsgáltuk meg.

#### 6.1. RNS csendesítés

Az exogén PACAP-pal történt vizsgálatok után olyan kísérletet végeztünk, melynek célja az endogén PACAP szerepének tisztázása RNS interferencia (5. ábra) segítségével. Vizsgálatunkhoz a ADCYAP1 génről átíródott PACAP mRNS-t célzó, mesterséges small interfering RNS-t (siRNS) (Dharmacon, GE Healthcare, Lafayette, CO, USA) használtunk. Pozitív kontrollként a GAPD (gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz) enzim mRNS-ére specifikus siRNS-t, míg negatív kontrollként Non-targeting poolt használtunk, amely nem specifikusan kötődő siRNS szekvenciákat tartalmaz. A kísérlet során 5-5 nmol GAPD kontroll pool, Non-targeting pool és ADCYAP1 specifikus siRNS-t oldottunk fel 1x RNáz-mentes pufferban (60 mM KCl, 6 mM HEPES-pH7, 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>). A kísérletek előtt wellenként 10<sup>4</sup> sejtet vettünk fel 96-lyukú lemezen. 25-25 nM GAPD kontroll pool, Non-targeting pool és ADCYAP1 siRNS-t oldottunk fel DharmaFECT1 transzfekciós reagens (Dharmacon, GE Healthcare, Lafayette, CO, USA) tartalmú, szérum mentes RPMI médiumban. A transzfekció után a sejteket 48 órán át inkubáltuk, majd a következő csoportokban kezeltük a mintákat: kezeletlen kontroll csoport, 100 nM PACAP-pal kezelt, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt, 100 nM PACAP-pal+1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt sejtek. A sejtek viabilitását MTT teszt segítségével mértük.

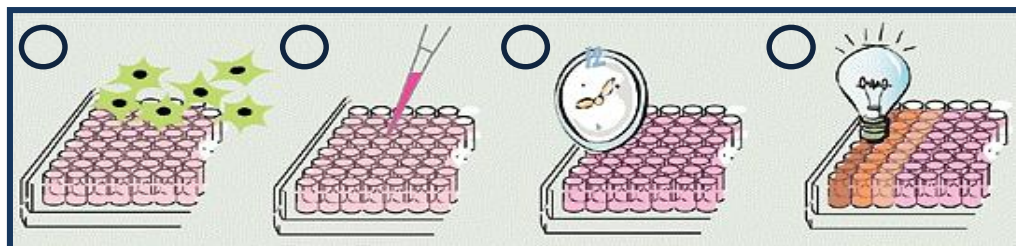


5.ábra: Géncsendesítés sejtenyészetben RNS interferencia alapú módszerrel (forrás: [elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/Gentechnologia/ch14s06.html](http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/Gentechnologia/ch14s06.html), módosítva)

## 6.2. MTT-teszt

Az inkubációs periódust követően a sejtek viabilitását MTT-teszt segítségével vizsgáltuk (6. ábra). A vizsgálathoz alkalmazott sárga színű MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid) festéket lila színű formazánná alakítják az élő sejtekben lévő mitokondriális enzimek, a lila formazán abszorpcióját vizsgálva tudunk az élő sejtek mennyiségére következtetni. Az inkubációs periódus végén a sejteket PBS-ben (Sigma, Hungary) átmostuk, majd 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT-t tartalmazó PBS-t adtunk a sejtekhez és 3 órán át 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> tartalmazó közegben inkubáltuk. Ezt követően az oldatot leszívtuk és a formazán tartalmú partikulumokat 200 µl DMSO-val (dimetil-szulfoxid) feloldottuk, majd ELISA olvasó (Dialab Kft, Hungary) segítségével, 570 nm hullámhosszon lemértük az abszorbancia értéket.





6.ábra: MTT teszt során a sárga színű MTT-festéket lila színű formazánná alakítják az élő sejtekben lévő mitokondriális enzimek, a festékabszorbancia értékét ELISA leolvasóval mérjük. (Forrás: <https://icbg.ucdavis.edu/ap3/therapeutics-screening-methods>) Az MTT-teszt lépései: sejtek kipipetázása a welllekbe(1), kezelés(2), inkubációs periódus(3), MTT hozzáadása, abszorbancia mérése ELISA leolvasóval(4). (Forrás: [http://www.itsbio.co.kr/main/goods\\_view.php?category2=57&no=119](http://www.itsbio.co.kr/main/goods_view.php?category2=57&no=119))

## 7. Statisztikai analízis

Valamennyi vizsgálatot legalább három alkalommal ismételtünk meg. A statisztikai analízist kétutas ANOVA segítségével végeztük,  $p < 0,05$  valószínűséget tartottuk szignifikánsnak.

## 8. A PACAP hatásának vizsgálata a bakteriális adhézóra és a bélflórára

### 8.1. A bakteriális adhézó vizsgálata

A vizsgálat megkezdése előtt az INT407 és Caco-2 sejteket tripánkékekkel való festést követően megszámoltuk. A vizsgálathoz 24-lyukú plate-et használtunk, valamennyi lyukba  $3 \times 10^5$  sejtet helyeztünk. Mind a vékonybélből származó INT407-sejteket, mind a vastag-

bél karcinómából származó Caco-2 sejteket 10% FBS-t tartalmazó médiumban növesztettük antibiotikum nélkül, 5% CO<sub>2</sub>-tartalom mellett, 37°C-on. A 24-lyukú plate welljeinek felébe a médiumhoz 400 ng/ml PACAP38-at adtunk. 24 órás inkubálást követően a sejteket három alkalommal átmostuk 1ml/well DPBS-el (Dulbecco's phosphate-buffered saline), majd  $3 \times 10^8$  baktérium hozzáadásával megfertőztük őket. 3 órán át, 5% CO<sub>2</sub>-tartalom mellett, 37°C-on inkubáltuk, majd ismét három alkalommal mostuk át DPBS-sel. A baktériummal fertőzött sejtek kinyerése céljából az INT407 és Caco-2 sejteket átmostuk, valamennyi well-be 1 ml 0,1% Triton-X100-at, 0,25% tripszint tettünk, majd a plate-eket 10 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A lizátumokat ismételt pipettázással homogenizáltuk, majd tízszeres hígítás után 10 µl-t raktunk Mueller-Hinton agarlemezre és 24 órán át, 37°C-on inkubáltuk. A következő napon megszámloltuk a kolóniákat, meghatározva ezzel a vékony- és vastagbélhámsejtekhez tapadt baktériumok mennyiségét.

A vizsgálat során az alábbi baktériumokat használtuk: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833, *Enterococcus faecalis*. A vizsgálatot hat alkalommal ismételtük meg.

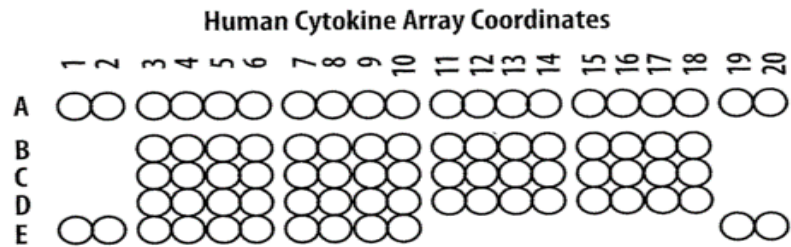
## **8.2. Citokin array**

A PACAP citokin-expresszióra kifejtett hatását Proteome Profiler Human Cytokine Array kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével vizsgáltuk. A vizsgált INT407-sejteket 6-lyukú plate helyeztük, majd a vizsgálatához az alábbi sejtcsoportokat alkalmaztuk:

1. kezelés nélküli kontroll csoport
2. 100 nM PACAP-pal 24 órán át kezelt csoport
3. 100 ng/ml lipopoliszachariddal (LPS) 24 órán át kezelt csoport
4. 100 nM PACAP-pal 2 órán át előkezelt, majd 24 órán át 100 ng/ml LPS-sel kezelt csoport

Az inkubációt követően a leöntött felülúszót összegyűjtöttük, majd a vizsgálatot a gyártói leírás alapján készítettük elő és végeztük el. A kit valamennyi szükséges összetevőt tartalmazta. A membránokat egy órán át blokkoltuk, majd detektáló antitest koktéllal inkubáltuk ismét egy órán át szobahőmérsékleten. Ezt követően a membránokat minta/antitest

koktéllal egy éjszakán át 2-8 °C-on inkubáltuk. Lemosást követően a membránokra HRP (horseradish peroxidase)-konjugált sztreptavidint tettünk 30 percre, majd a membránokra kemilumineszcens reagenst pipettáztunk, majd röntgenfilmre előhívtuk. Az adatokat ImageJ szoftver segítségével analizáltuk és a 2. táblázatban feltüntetett fehérjéket vizsgáltuk. A vizsgálatot három alkalommal ismételtük meg.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Ref	CCL-1	CCL-2 MCP-1	CCL-3 MIP-1 $\alpha$	CCL-5 RANTES	CD40LG TNFSF5	C5 C5a	CXCL-1 GRO $\alpha$	CXCL-10 IP-10	Ref
B		CXCL-11 I-TAC	CXCL-12 SDF-1	G-CSF	GM-CSF	ICAM-1 CD54	IFN- $\gamma$	IL-1 $\alpha$ IL-1F1	IL-1 $\beta$ IL-1F2	
C		IL-1ra IL-1F3	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12p70	
D		IL-13	IL-16	IL-17A	IL-17E	IL-18 IL-1F4	IL-21	IL-27	IL-32 $\alpha$	
E	Ref	MIF	SerpinE1 PAI-1	TNF- $\alpha$	TREM-1					Negatív kontroll

2. táblázat. Proteome Profiler Human Cytokine Array által vizsgált fehérjék. A citokin array-vel mérhető faktorok táblázata.

#### Statisztikai analízis:

A statisztikai analízist kétutas variancia analízis segítségével végeztük,  $p < 0,05$  valószínűséget tartottuk szignifikánsnak.

### **8.3. A bélflóra összetételének összehasonlítása PACAP KO és vad egereknél**

#### *8.3.1 Kísérleti egerek*

Mind a PACAP KO, mind a vad egerek nyitott ketrecekben nőttek fel standard körülmények között, 22-24 °C szobahőmérsékleten, 55±15 % páratartalom mellett a Pécsi Tudományegyetem Állatházában. Az egerek korlátlanul hozzáfértek sterilizált vízhez és standard élelemhez. A PACAP KO egerek genotípusa PCR segítségével volt megerősítve korábbi vizsgálataink során (Farkas et al., 2017b).

Valamennyi állatkísérlet során az állatok jólétéről szóló Európai Irányelveket követtük (2010/63/EU), etikai bizottság jóváhagyását követően (BA02/2000-15024/2011).

#### *8.3.2. A széklet bélflóra molekuláris analízise*

Friss székletet gyűjtöttünk össze 2 hetes, 1 hónapos, 3 hónapos, 6 hónapos, 12 hónapos és 15 hónaposnál idősebb (15-18 hónap közötti) KO és vad egerektől, majd azt azonnal folyékony nitrogénbe téve fagyasztottuk és a mintákat feldolgozásukig -80 °C-on tároltuk. A vizsgálatra a Berlini Charité Egyetem Mikrobiológiai Laborjában került sor, ahol az egerek bélflórájának vizsgálata során Enterobaktériumok, Enterococcusok, Lactobacillus, Bifidobaktérium, Bacteroides/Prevotella spp., egér intesztinális Bacteroides törzsek, *Clostridium coccooides* csoport, és *Clostridium leptum* vizsgálatára került sor kvantitatív real-time PCR (qRT-PCR) segítségével. tekintve, hogy a munka ezen része kollaborációban készült, jelen dolgozatban a DNS analízis pontos, részletes leírásától eltekintek.

#### *8.3.3. Statisztikai analízis:*

Mann-Whitney *U* teszt (GraphPad Prism v5, La Jolla, CA, USA) segítségével határoztuk meg a szignifikanciát,  $p < 0.05$  valószínűséget tartottuk szignifikánsnak.

## 9. A PACAP vizsgálata humán szövetmintákban

53 gyulladással járó bélbetegségben szenvedő (23 Crohn-beteg, 30 colitis ulcerosás), valamint 13 ép nyálkahártyával bíró, funkcionális hasmenés miatt colonoscopián átesett beteg szöveti mintáiban hasonlítottuk össze a PACAP38 és 27 szinteket. A betegeket a vizsgálat során vett szövettani minta alapján soroltuk 3 alcsoportba:

1. akut gyulladással járó csoport, szövettani mintáiban kriptitisz, kripta abszcesszus vagy neutrofil granulocita infiltráció észlelhető,
2. krónikus gyulladással bíró csoport, szövettani mintáiban limfocita vagy plazmasejtes infiltráció látható,
3. ép nyálkahártyával bíró csoport, szövettani mintáiban ép nyálkahártya észlelhető, gyulladással járó jelek nem láthatók.

Mindemellett megvizsgáltuk, hogy akut gyulladás esetén a betegek által szedett antibiotikus kezelés (metronidazol vagy metronidazol/ciprofloxacín) befolyásolja-e a minták PACAP szintjét.

8 antrum gasztritiszben és 6 gyomorfekélyben szenvedő beteg szöveti mintáit is megvizsgáltuk. Antrum gasztritisz esetén a gyulladt és ép (corpus) nyálkahártya adatait, míg fekély esetén a fekélyalap, fekélyszél és az ép gyomor nyálkahártya szöveti mintáit hasonlítottuk össze, emellett *Helicobacter pylori* pozitivitás alapján is elvégeztük a minták PACAP szintjeinek összehasonlítását.

A vizsgálatot az etikai bizottság előzetes engedélyével végeztük (2784,3117, Pécsi Tudományegyetem; 8-28/92 009-10 I 8EKU, ETT TUKEB). A vizsgált mintákat lemértük, majd jéghideg desztillált vízzel homogenizáltuk. A homogenizátumot lecentrifugáltuk (12.000 rpm, 4 °C, 30 min).

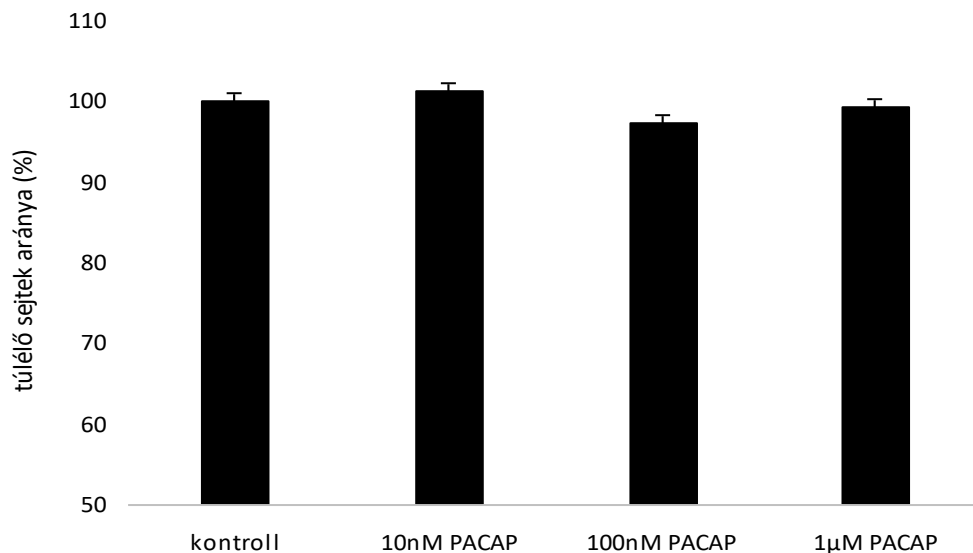
A vizsgálatok során a PACAP27 és 38 szinteket RIA módszerrel mértük. Az általunk használt PACAP38 antiszérumot karbodiimid által konjugált Cys23- PACAP24-28 és borjú thyreoglobulin antigén ellen termeltetik nyúlban, melyet 1:10000 hígításban használtuk. A PACAP1-27 esetén 1:45000 hígítást alkalmaztunk. Jelöletlen antigén: Saját laboratóriumban készült mono-<sup>125</sup>I izotóppal jódozott birka PACAP24-38 és birka PACAP1-27. A RIA mérés során birka PACAP1-27 illetve PACAP1-38 peptidet használtunk standardként 0-1000 fmol/ml tartományban. A RIA teszteket 1 ml 0,05 mol/l koncentrációjú (pH 7,4) foszfát pufferben végeztük. A polipropilén RIA csövekbe

duplikátumban az alábbi inkubációs elegyet mértük be: -100 µl PACAP1-27 vagy PACAP1-38 standard, ill. mérni kívánt/ismeretlen minta,-100 µl antiszérumszámú „88111-3” PACAP1-38 (1: 10000 hígításban), vagy „88123-3” PACAP1-27 (1: 45000 hígításban), -100 µl (kb. 5000cpm) <sup>125</sup>I izotóppal jelölt PACAP24-38 vagy PACAP1-27-assay-puffer. A mintákat az összekeverést követően 4 °C-on 48-72 óráig inkubáltuk. Ezután az antitesthez kötött jelölt antigén frakciót elválasztottuk a szabad jelölt peptidektől. A csöveket 4 °C-on 15 percig 3000 rpm-en centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük. A szénhez kötődött szabad peptidfrakció radioaktivitását NZ310 típusú spektrométeren megmértük. Ebből következtethetünk az ellenanyaghoz kötött radioaktivitás értékére, majd egy kalibrációs görbéről leolvashatjuk az ismeretlen minta PACAP1-38 vagy PACAP1-27 koncentrációját. A statisztikai analízist kétutas ANOVA-val végeztük.

## IV. Eredmények

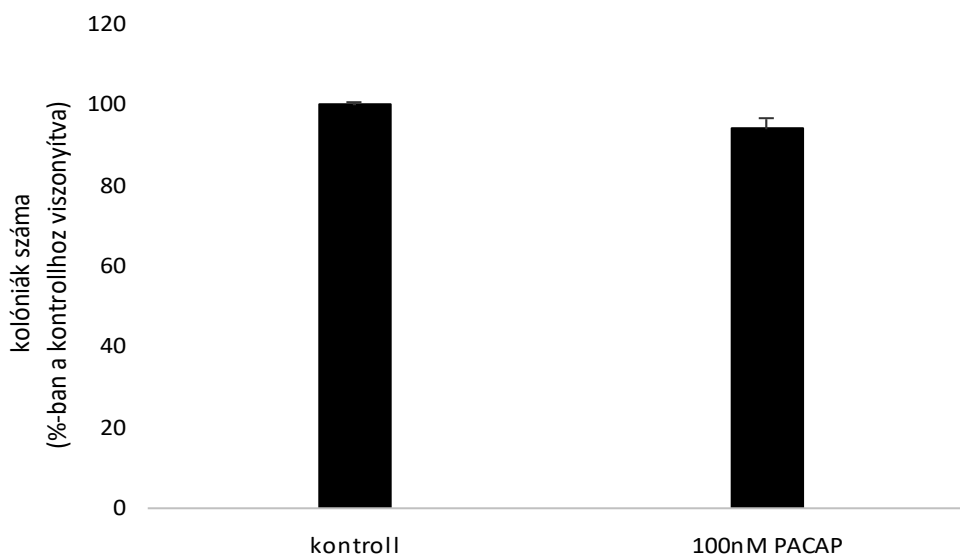
### 1.A PACAP INT407-sejtek proliferációjára kifejtett hatása

A PACAP sejtproliferációra kifejtett hatását MTT-teszt segítségével vizsgáltuk. A túlélő sejtek aránya tekintetében az alkalmazott PACAP-koncentrációk egyike sem okozott szignifikáns változást (7. ábra).



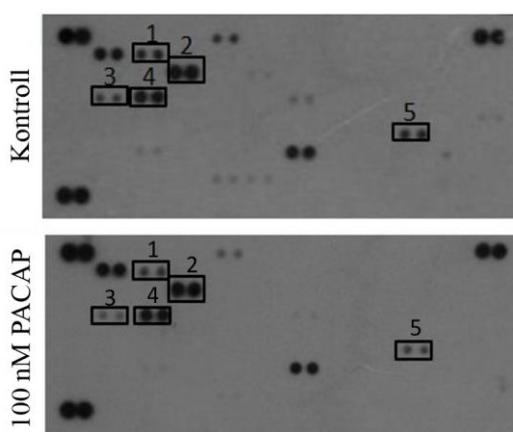
7.ábra. A túlélő INT407sejtek aránya különböző koncentrációjú PACAP-kezelést követően (túlélő sejtek aránya %-ban $\pm$ SEM).

Tekintettel arra, hogy az MTT-teszt csak arról ad információt, hogy a sejtek élnek-e vagy sem, míg a klonogén túlélési teszt a súlyosan sérült élő, de már replikációra nem képes sejteket is tudja vizsgálni, így az eredmények pontosabb értékelése végett klonogén túlélési assay-t is végeztünk. A vizsgálat során azt találtuk, hogy 100 nM koncentrációban alkalmazott PACAP nem befolyásolja a kolóniaszámot 7 napos inkubációs idő után (8.ábra).



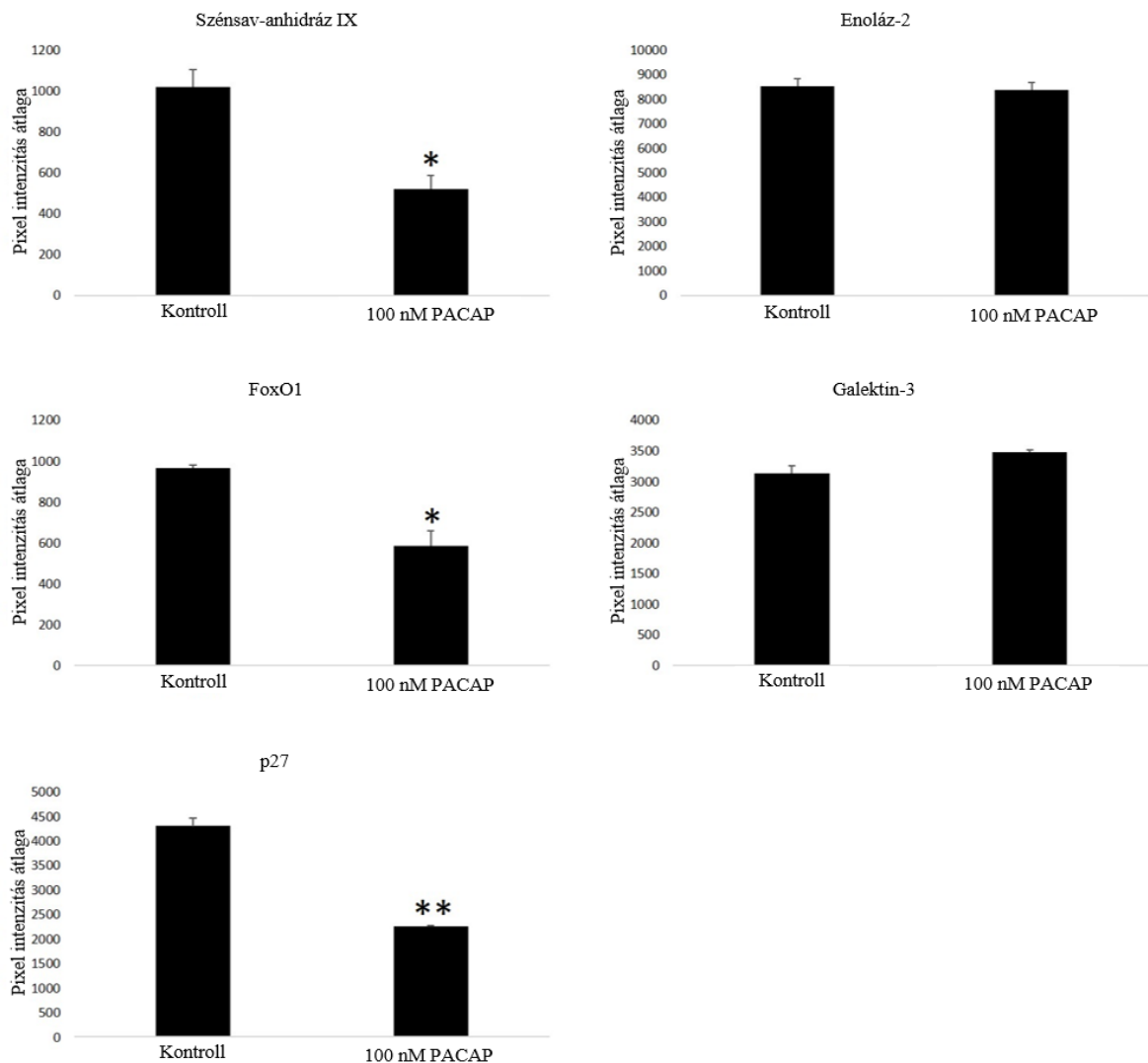
8.ábra. PACAP-kezelés hatása a sejt kolóniák számára  
(kolóniák száma a kontrollhoz viszonyítva, %-ban $\pm$ SEM)

A PACAP viabilitást és kolóniaszámot befolyásoló hatása mellett a különböző tumorképződés-asszociált faktorok expressziójára kifejtett hatását is vizsgáltuk oncology array segítségével. A Proteome Profiler Human XL oncology array (9. ábra) során a felülúszóban található szénsav-anhidráz IX, FoxO1 és p27 szintje szignifikánsan csökkent, míg az enoláz-2 és a galektin-3 expressziójában nem észleltünk változást (10.ábra).



9. ábra. A PACAP különböző tumorképződés asszociált faktorok expressziójára kifejtett hatása. Az eredmény az ábrán jelölt pontoknak megfelelő faktorok esetén volt reprodukálható: szénsav-anhidráz IX(1), enoláz-2(2), FoxO1(3), galektin-3(4), p27(5).

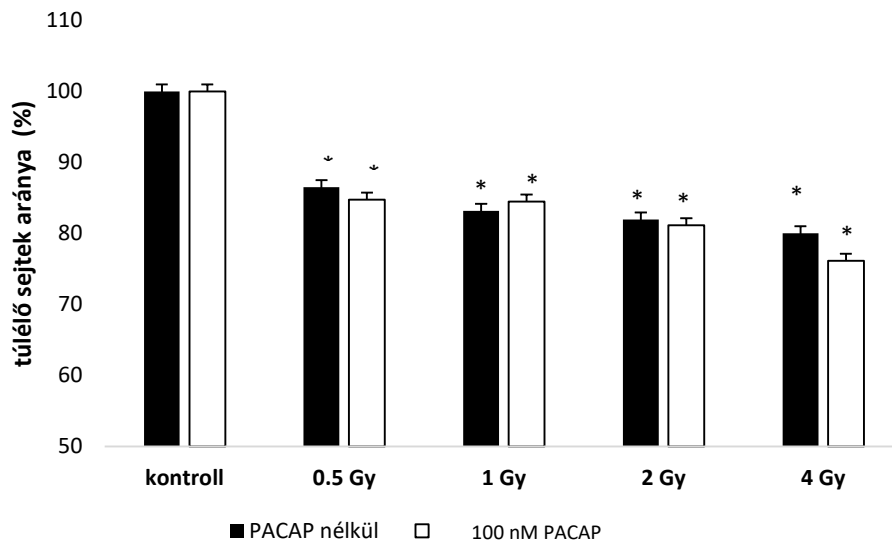




10. ábra. Az oncology array kvantitatív analízise (pixel intenzitás átlaga $\pm$ SEM; \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 vs. kontroll)

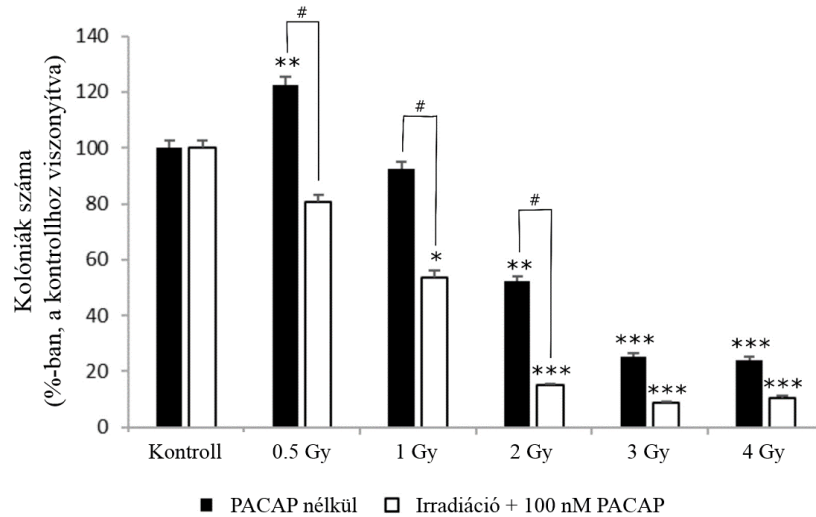
## 2.A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása gamma-sugárzás mellett

A sejtek életképességének MTT-teszt segítségével való vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy valamennyi alkalmazott sugárdózis csökkentette a sejtek viabilitását és az irradiációt megelőzően 2 órával történt PACAP-előkezelés nem befolyásolta a túlélő sejtek arányát (11. ábra).



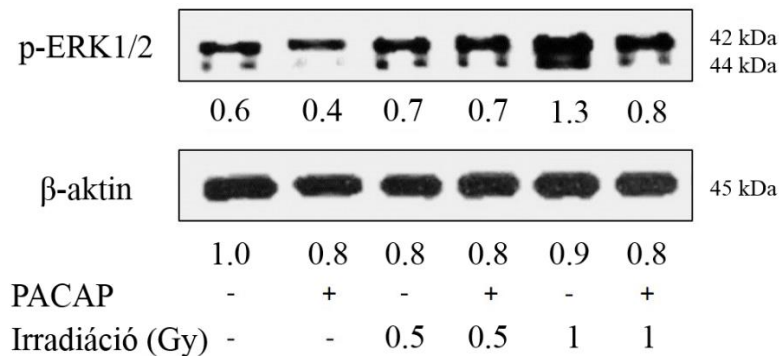
11. ábra. A túlélő sejtek aránya PACAP előkezelést követően gamma-sugárzás esetén (túlélő sejtek aránya %-ban $\pm$ SEM; \* $p < 0,05$  vs. kontroll)

Ezzel szemben az elvégzett klonogén assay azt mutatta, hogy a PACAP képes befolyásolni a gamma-sugárzásnak kitett sejtek klónképző képességét. Az irradiáció megváltoztatta a sejtek mitotikus aktivitását a használt dózistól függően, 0,5 Gy besugárzás esetén szignifikánsan nőtt, ugyanakkor 2, 3, illetve 4 Gy dózis alkalmazásakor jelentősen csökkent a klónképző potenciál. Mindemellet valamennyi esetben alacsonyabb proliferációs rátát eredményezett a PACAP-előkezelés, szignifikáns különbséget 0,5, 1 és 2 Gy sugárdózis alkalmazása esetén találtunk (12. ábra).



12.ábra. A PACAP hatása a gamma-sugárzásnak kitétt sejtek klónképző képességére (kolóniák száma a kontrollhoz viszonyítva, %-ban $\pm$ SEM; \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,001 vs. kontroll; # $p$ <0,05).

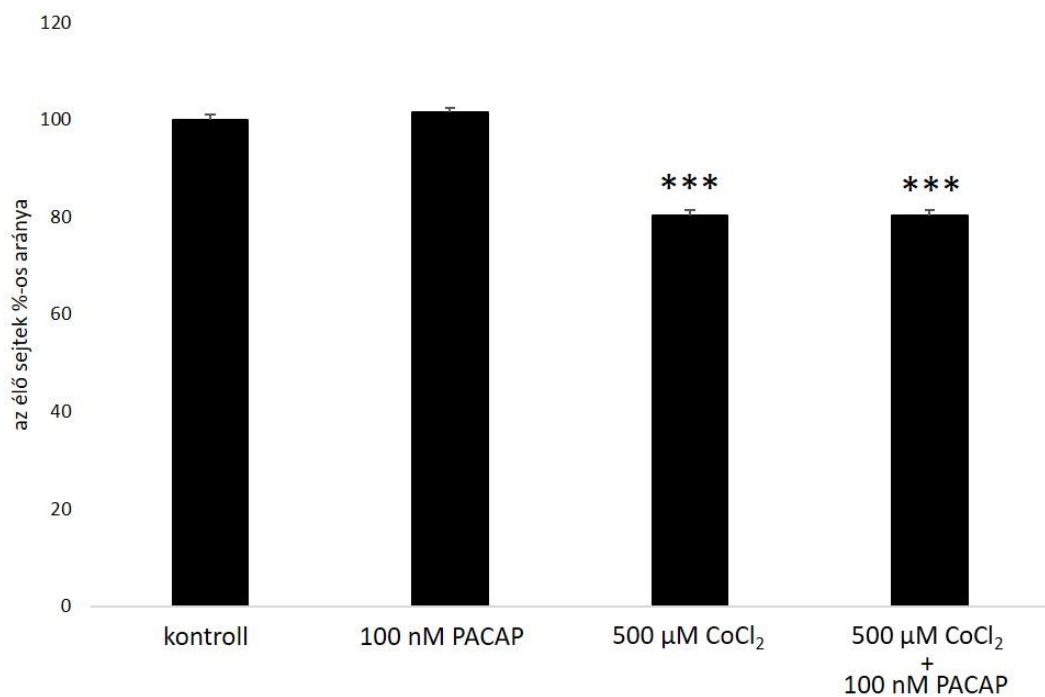
Ezen jelenség molekuláris biológiai hátterének elemzése céljából western blot vizsgálatot végeztünk, mely a p-ERK1/2 szintjének jelentős csökkenését mutatta PACAP-előkezelést követően 1 Gy dózisu irradiáció esetén (13.ábra).



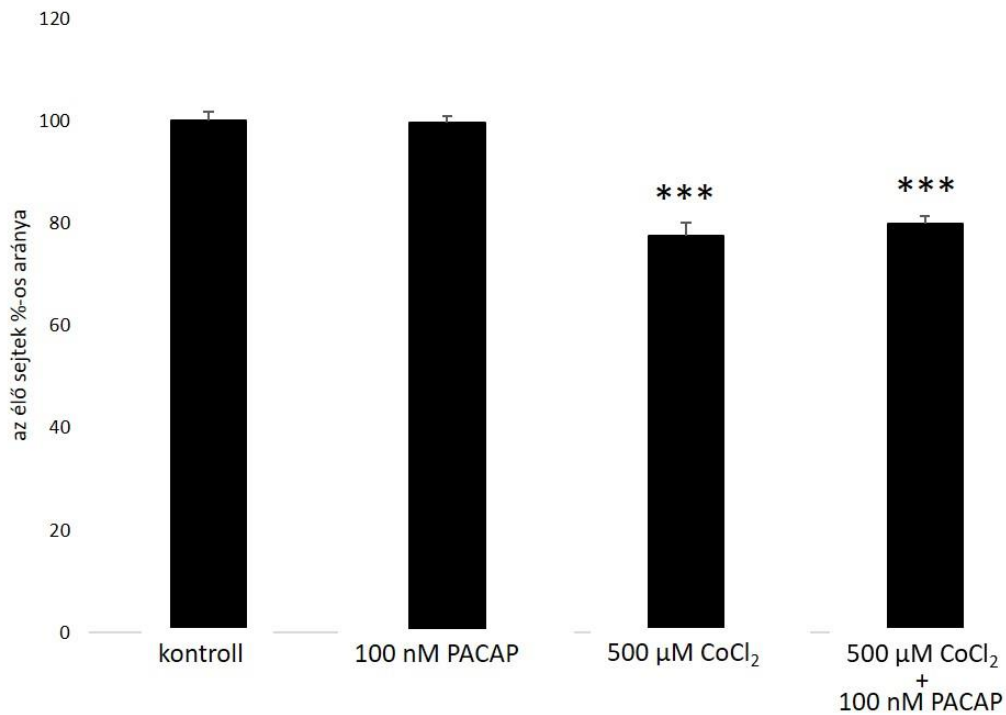
13.ábra. A p-ERK1/2 szintjének változása sugárkezelést követően PACAP-hatás mellett. A mért optikai denzitást a kontroll sejtek beta-aktin szintjéhez viszonyítva normalizáltuk.

### 3. A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása in vitro hipoxiában

A kobalt-kloriddal végzett vizsgálat során a sejtek viabilitása szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest. A vizsgálat előtt 2 órával adott PACAP a túlélő sejtek arányát nem változtatta meg (14. ábra), és hasonló eredményt értünk el a sejtekhez szimultán adott  $\text{CoCl}_2$ -kezelés kapcsán is, a túlélő sejtek aránya szimultán kezelés mellett sem változott (15. ábra).



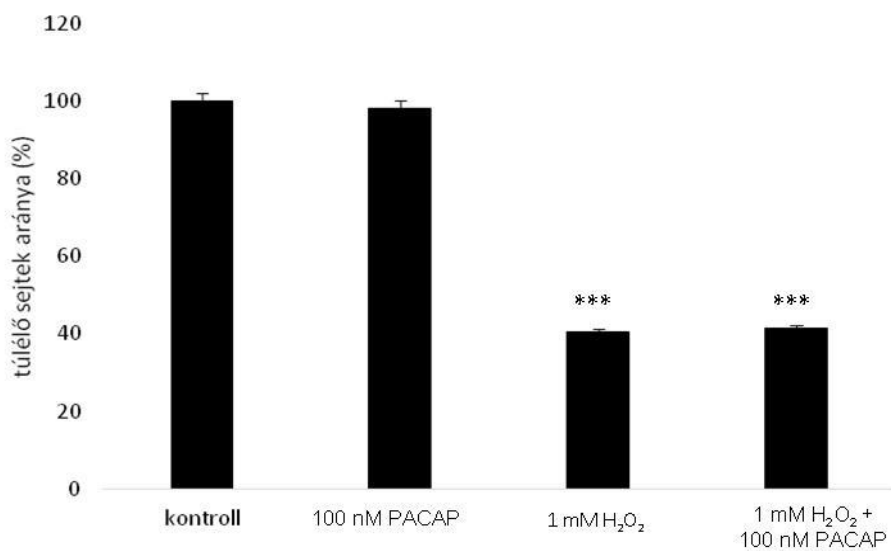
14. ábra. PACAP-előkezelés hatása a sejtek túlélőképességére in vitro hipoxiát követően. (túlélő sejtek aránya %-ban $\pm$ SEM; \*\*\* $p$ <0,001 vs. kontroll).



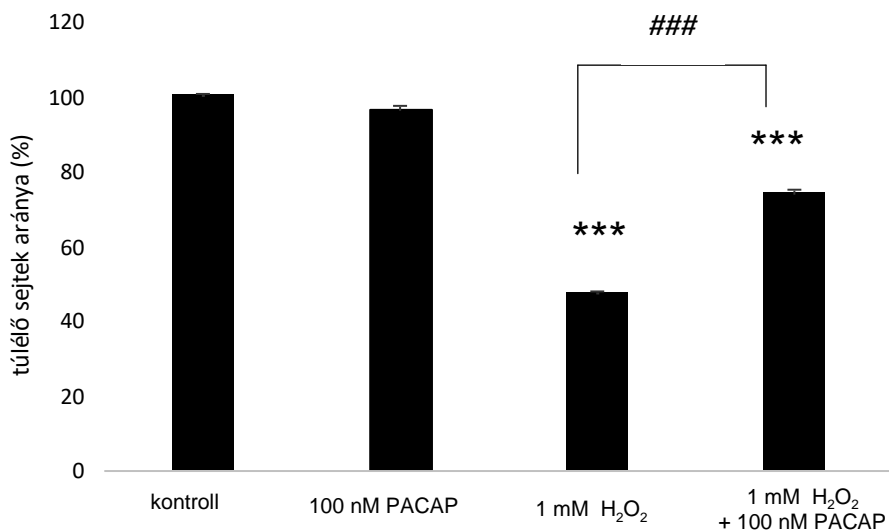
15. ábra. Szimultán alkalmazott PACAP-kezelés hatása a sejtek túlélőképességére *in vitro* hipoxiát követően. (túlélő sejtek aránya %-ban±SEM; \*\*\* $p < 0,001$  vs. kontroll).

#### 4. A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása oxidatív stresszben

Az oxidatív stresszt 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-koncentráció hozzáadásával modelleztük. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilyen mennyiségben szignifikáns túlélés-csökkenést eredményez, ugyanakkor elegendő még az élő sejtek száma a kísérletek elvégzéséhez. A PACAP-pal való előkezelés nem befolyásolta a túlélő sejtek arányát, ugyanakkor a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal szimultán adott PACAP szignifikánsan mérsékelte az oxidatív stressz hatását (16. ábra, 17. ábra).

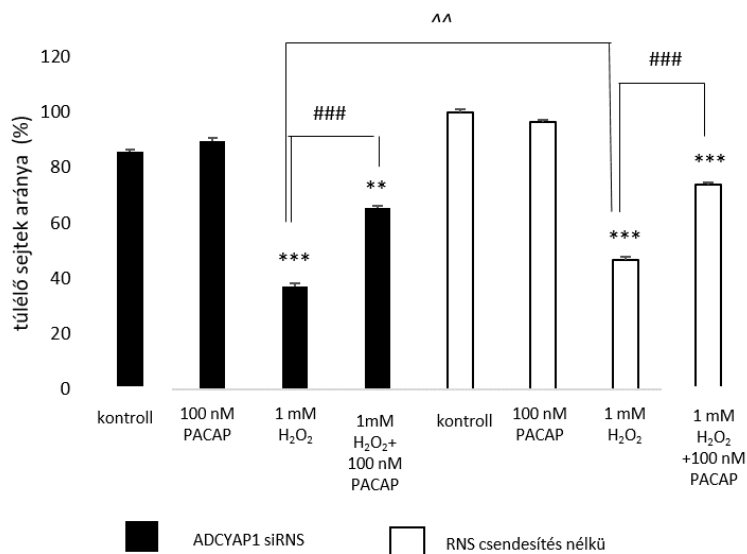


16. ábra. A PACAP-előkezelés hatása a sejtek túlélőképességére oxidatív stressz esetén (túlélő sejtek aránya %-ban $\pm$ SEM; \*\*\* $p$ <0,001 vs. kontroll; ### $p$ <0,001).



17. ábra. A szimultán PACAP-kezelés hatása a sejtek túlélőképességére oxidatív stressz esetén. (túlélő sejtek aránya %-ban $\pm$ SEM; \*\*\* $p$ <0,001 vs. kontroll; ### $p$ <0,001).

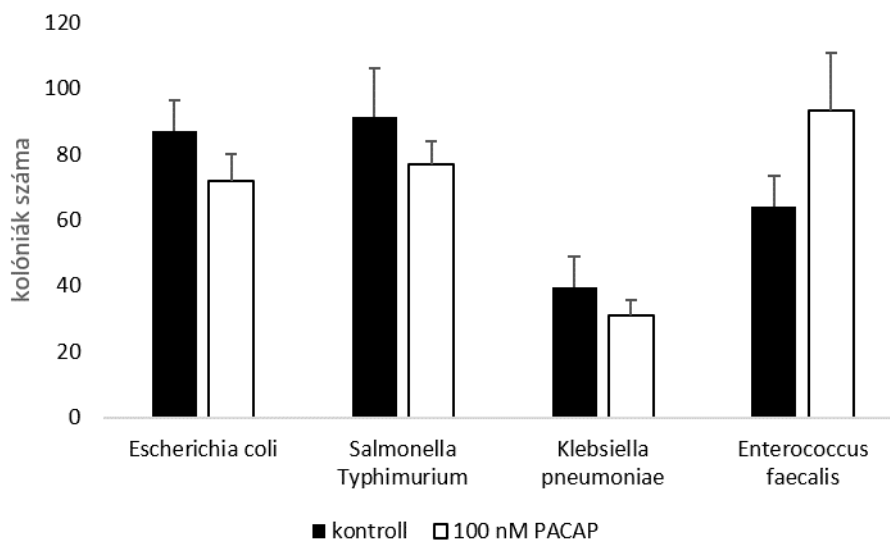
Az exogén PACAP hatásának vizsgálata után kísérleteink az endogén PACAP szerepének feltérképezésére irányultak. Ezen célból ADCYAP1 siRNS transzfekeciót végeztünk. A csendesítés után a sejtek életképességét MTT-teszt segítségével vizsgáltuk. Mind az siRNS-sel transzfekeciált, mind a nem csendesített csoportban a sejtek túlélését szignifikánsan csökkentette az oxidatív stressz. Ugyanakkor összehasonlítva a két csoport viabilitását, azt találtuk, hogy a csendesítésen átesett csoportban jelentősen alacsonyabb számú sejt maradt életképes, ezek a sejtek sokkal érzékenyebben reagáltak az oxidatív stressz károsító hatására. Exogén PACAP hozzáadása mellett mindkét csoportban mérsékelhető volt a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> okozta viabilitást-csökkentő hatás. A kontroll csoportok viabilitásában nem találtunk különbséget (18.ábra).



18.ábra. Az ADCYAP1 siRNS transzfekeció hatása a túlélő sejtek arányára oxidatív stressz esetén (túlélő sejtek aránya %-ban±SEM; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. megfelelő kontroll; ###p<0,001; ^^p<0,01).

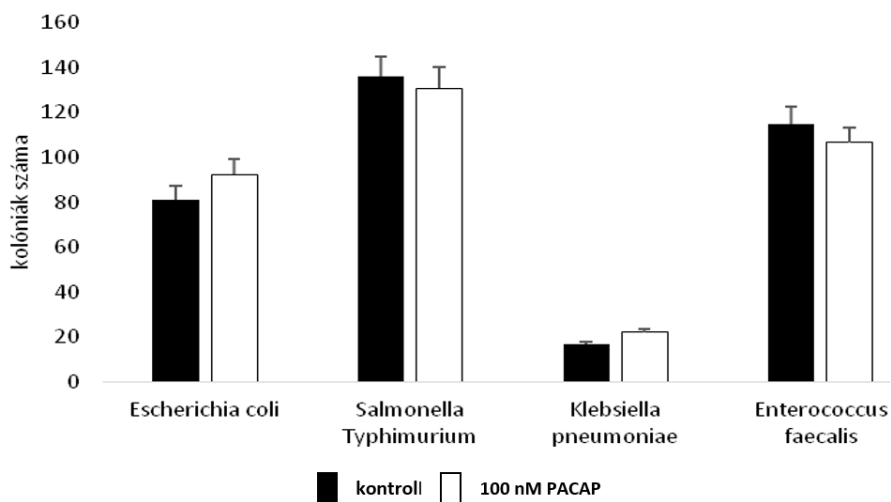
## 5. A PACAP bakteriális adhézióra kifejtett hatása

A PACAP bakteriális adhézióra kifejtett hatásának vizsgálata során INT407 és Caco-2 sejtkultúrák felhasználásával az alábbi baktériumokat vizsgáltuk: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833, és *Enterococcus faecalis* (klinikailag izolált). A vizsgált baktériumok közül egyik esetben sem észleltünk PACAP hozzáadása mellett szignifikáns változást a bakteriális adhézióban. A PACAP kezelés sem az INT407 (19.ábra), sem a Caco-2 sejtkultúra (20.ábra) esetén nem fejtett ki szignifikáns hatást a bakteriális adhézióra. Valamennyi vizsgálatot hat alkalommal ismételtük meg, minden esetben hasonló eredményt kaptunk, az észlelt különbségek biológiailag nem bizonyultak relevánsnak, így nem tekintettük azt szignifikánsnak.



19.ábra. A PACAP bakteriális adhézióra kifejtett hatásának vizsgálata INT407 sejtkultúra felhasználásával. A vizsgálat során szignifikáns különbséget nem észleltünk a baktérium kolóniák számában PACAP hozzáadása mellett.

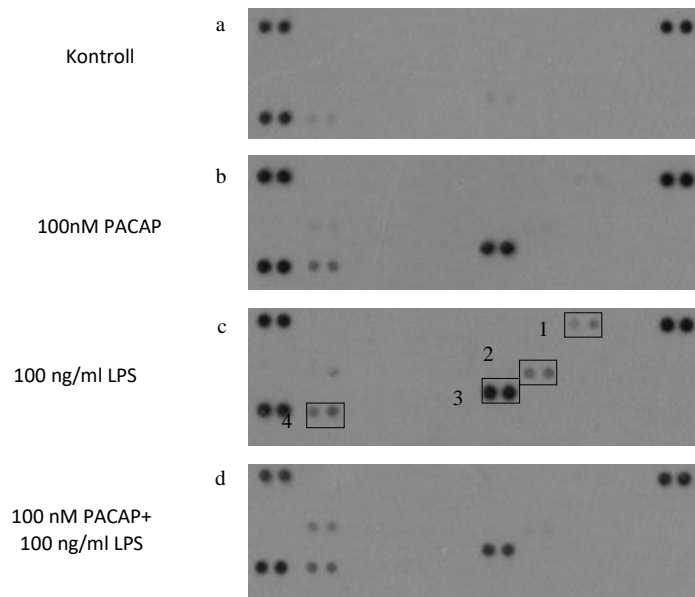




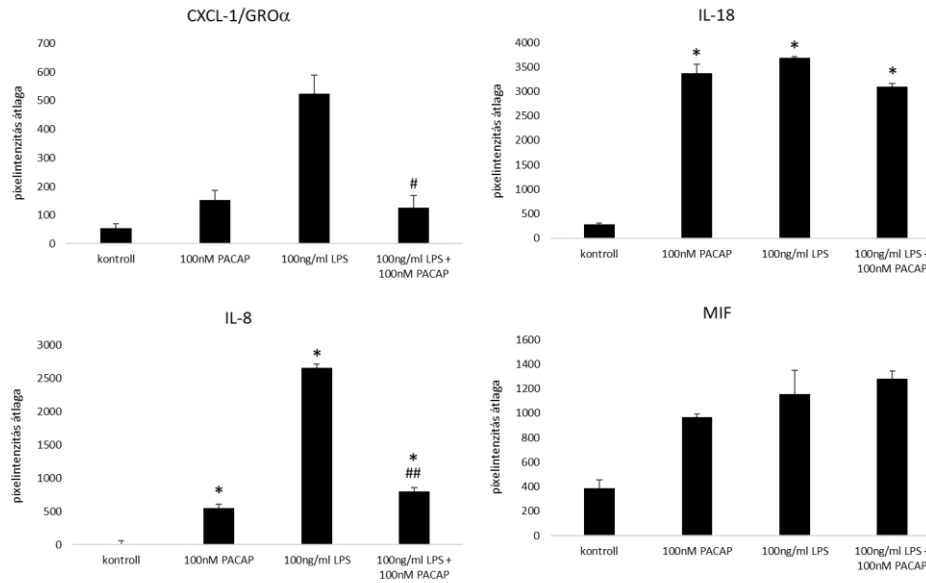
20.ábra. A PACAP bakteriális adhézióra kifejtett hatásának vizsgálata Caco-2 sejt kultúra felhasználásával. A vizsgálat során szignifikáns különbséget nem észleltünk a baktérium kolóniák számában PACAP hozzáadása mellett.

## 6. A PACAP citokin-expresszióra kifejtett hatásának vizsgálata

A PACAP bélrendszeri gyulladásos folyamatokra való hatásosságának vizsgálatához INT407 sejtenyészetet használtunk, a gyulladásos folyamatokban felszabaduló citokinek expresszióját humán citokin array segítségével vizsgáltuk. Vizsgálatunk során a PACAP önmagában szignifikánsan emelte az IL-8 és IL-18 expresszióját, kis mértékben változtatta a CXCL-1 (C-X-C motif ligand 1) és a MIF (macrophage migration inhibitory factor) expresszióját. 100 ng/ml lipopoliszacharid hatására magas CXCL-1, IL-8, IL-18 és MIF szinteket mértünk. Ez a változás IL-8 és IL-18 esetében szignifikáns volt. A PACAP-előkezelés csökkentette az LPS-indukálta emelkedett IL-8 és CXCL-1 expressziót. Mind a PACAP, mind az LPS egy enyhe, de nem szignifikáns, aktiváló hatást gyakorolt a MIF-re (21. ábra, 22. ábra).



21. ábra. A PACAP citokin-expresszióra kifejtett hatása INT407 sejt kultúra felhasználásával. (a) kontroll sejtek, (b) 100 nM PACAP-pal kezelt sejtek, (c) 100 ng/ml LPS-sel kezelt sejtek, (d) 100 nM PACAP-előkezelés után 100 ng/ml LPS-sel kezelt sejtek. Az eredmény az ábrán jelölt pontoknak megfelelő faktorok esetén volt reprodukálható: (1) CXCL-1, (2) IL-8, (3) IL-18, (4) MIF. Az LPS-indukálta változást CXCL-1 és IL-8 esetében tudta a PACAP-előkezelés ellensúlyozni. A további pontok, ahol szignifikáns eredményt nem találtunk (bal felső saroktól indulva, számozás nélkül): CCL-1, CCL-2, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, CD40 ligand, C5a, CXCL10 CXCL11, CXCL12, G-CSF, GM-CSF, ICAM-1, IFN- $\gamma$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, p70, IL-13, IL-16, IL-17, IL-21, IL-27, IL-32 $\alpha$ , Serpin E1, TNF- $\alpha$ , TREM-1.

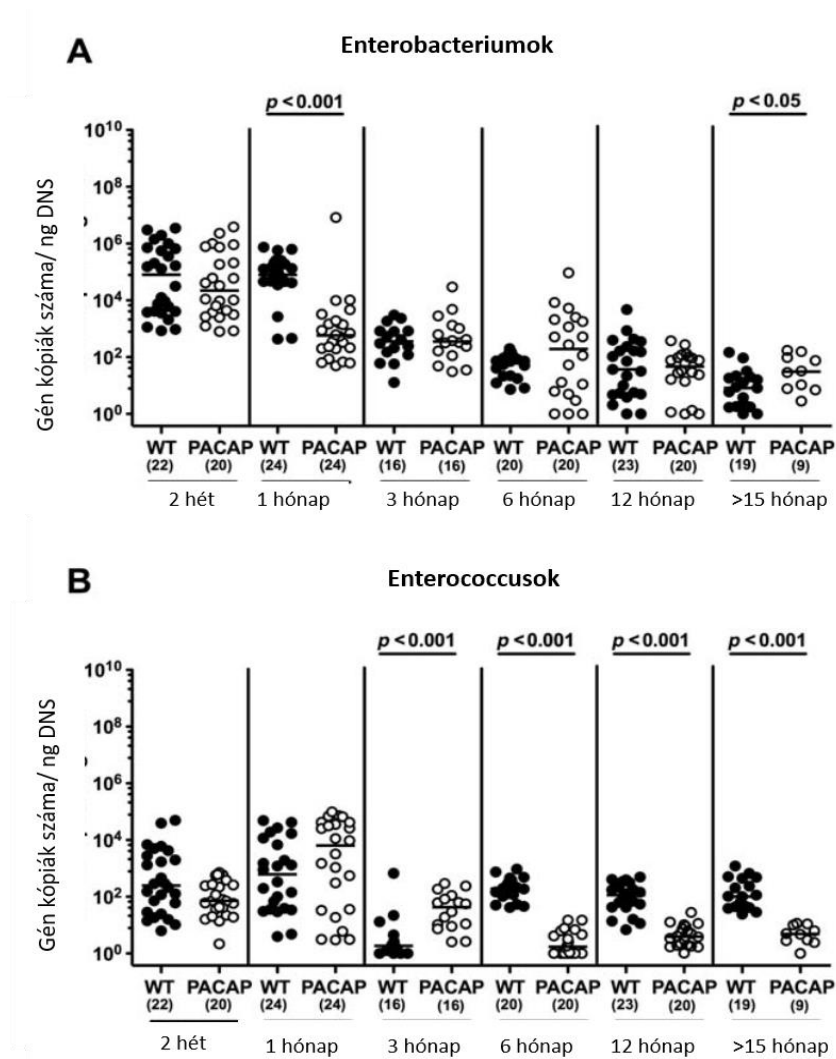


22. ábra. A citokin array kvantitatív analízise, pixel intenzitás átlaga $\pm$ SEM; \* $p$ <0,05 vs kontroll sejtcsoport, # $p$ <0,05, ## $p$ <0,01 vs LPS-kezelt csoport.

## 7. A bélflóra összetételének vizsgálata PACAP KO és vad egereknél

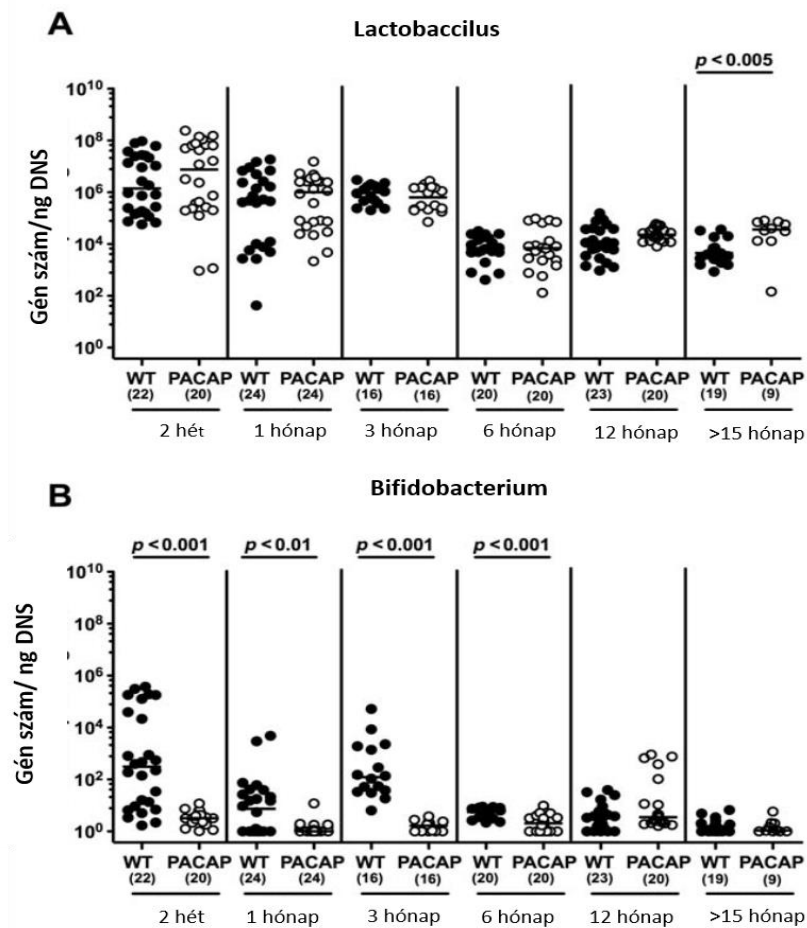
A bélflóra összetételének vizsgálata során 2 hetes kortól 18 hónapos korig vizsgáltuk a PACAP KO és vad egerek mintáit. Vizsgálatunk során életkor szerinti különbség is adódott, vad egerek esetén a 2 hetes és az 1 hónapos egerek esetében szignifikánsan több az Enterobaktériumok száma (23. ábra). PACAP KO egerekben az idősebb, 12 hónapos állatok szignifikánsan kevesebb Enterobaktériummal rendelkeznek, mint az 1 és a 3 hónapos társaik. 3 hónapos vad egerekben szignifikánsan alacsonyabb az Enterococcusok száma, mint a fiatalabb egerekben (23. ábra). PACAP KO egerek esetén az 1 hónapnál fiatalabb állatokban az Enterococcusok szignifikánsan magasabb számban vannak jelen, mint a három hónapnál idősebbekben (23. ábra). Lactobacillusok esetén szintén a 3 hónaposnál fiatalabb állatok esetében észleltünk jelentősen magasabb csíraszámot (24. ábra). A Bifidobaktériumok vizsgálata során vad egerekben 2 hetes életkorban találtuk a legnagyobb csíraszámot, míg 6 hónaposnál idősebb állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt a Bifidobaktériumok jelenléte (24. ábra). Ugyanakkor KO egerek esetében a

Bifidobaktériumok valamenyi életkorban nagyon alacsony számban voltak jelen (24. ábra). Az obligát anaerob, Gram negatív baktériumokat vizsgálva a *Bacterioides/Prevotella* törzsek fiatalabb állatokban nagyobb számban voltak jelen, mint idősek-nél vad egerekben. PACAP KO egerek esetében 3 hónapos korig volt észlelhető mérsékelt csökkenés, utána növekedést észleltünk. A *Clostridium coccooides* esetében vad egereknél enyhe csökkenés volt igazolható 15 hónapnál idősebb állatokban, míg PACAP KO egerek esetében 6 hónapos kor után észlelhető csökkenés a baktériumszámban a fiatalabb állatokkal összehasonlítva.



23. ábra. *Enterobacteriumok* (A) és *Enterococcusok* (B) génkópiáinak száma a székletben PACAP KO (PACAP-üres kör) és vad (WT-sötét kör) egerek esetén életkori megoszlás szerint. A szignifikancia meghatározás Mann-Whitney U teszt segítségével történt ( $p < 0.05$ )

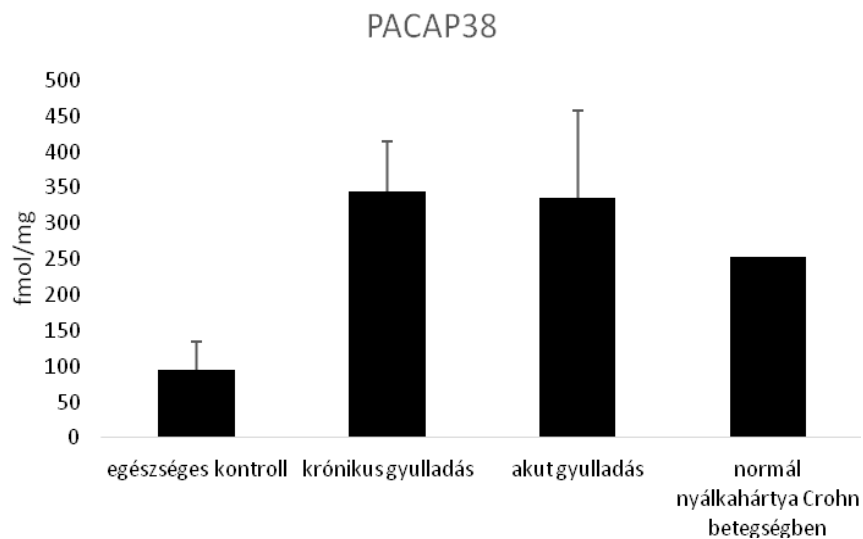
PACAP KO és vad egerek bélflórájának összetételét összehasonlítva azt találtuk, hogy a teljes baktériumgénszámot tekintve nincs különbség a két csoport között, ugyanakkor az egyes baktériumokat külön véve jelentős különbségek voltak igazolhatóak. Az Enterobaktériumok kisebb mennyiségben vannak jelen KO egerekben 1 hónapos életkorban, míg Enterococcusok esetében a 6 hónapnál idősebb állatokban észlelhető különbség, a vad egerekben magasabb számban mutatható ki (23. ábra). Az egér intesztinális *Bacteroides* törzsek mérsékelten nagyobb mennyiségben voltak kimutathatók PACAP KO egerek bélflórájában 1 és 6 hónapos korban, míg későbbi életkorban, 12 hónaposnál idősebb egerek esetén *Bacteroides/Prevotella* spp., 15 hónapos kor után *Lactobacillus*ok esetén volt hasonló változás igazolható. A legszembetűnőbb különbség azonban a *Bifidobacterium*ok esetén adódott, KO egereknél szinte hiányzott a bélflórából (24. ábra), aminek komoly patofiziológiai jelentősége lehet egyes betegségek kialakulása esetén.



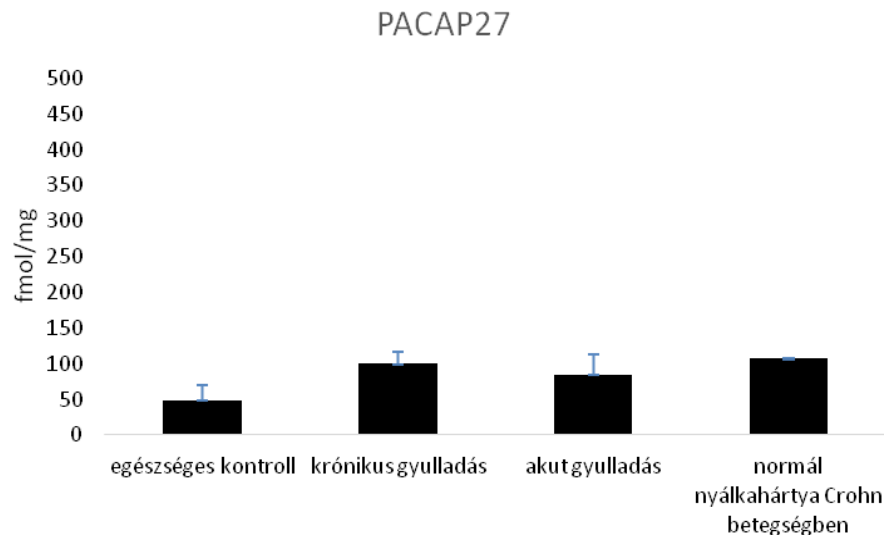
24. ábra. *Lactobacillus*ok (A) és *Bifidobacterium*ok (B) génkópiáinak száma a székletben PACAP KO (PACAP-üres kör) és vad (WT-sötét kör) egerek esetén életkori megoszlás szerint. A szignifikancia meghatározás Mann-Whitney U teszt segítségével történt ( $p < 0.05$ )

## 8. A PACAP vizsgálata humán szöveti mintákban

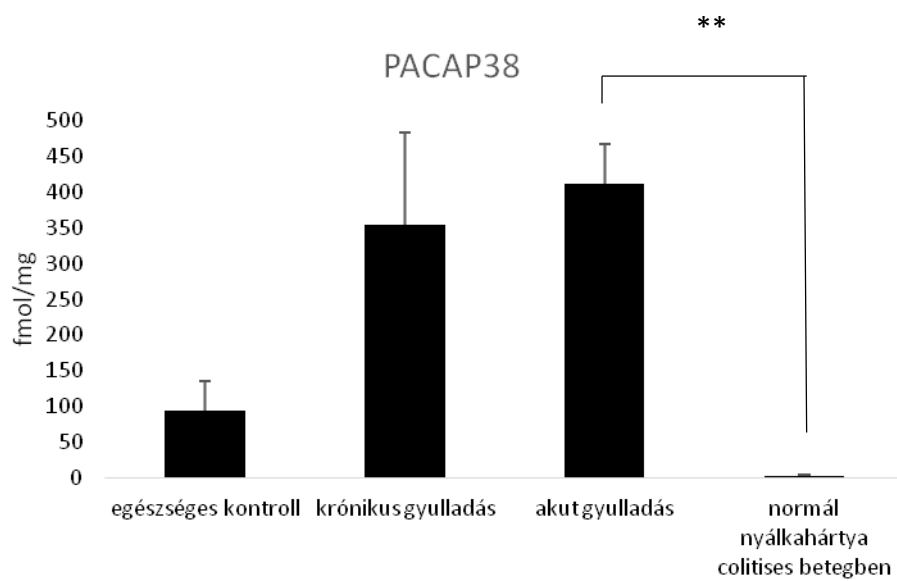
Gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek szöveti mintáiban mért PACAP38- és PACAP27-szintek vizsgálata kapcsán azt találtuk, hogy Crohn-betegség esetén nem volt jelentős különbség a PACAP-szintekben az ép és gyulladt nyálkahártya adatait összehasonlítva (25. ábra, 26. ábra), míg colitis ulcerosa esetén az akut gyulladással járó megbetegedés mellett vett minták PACAP-szintjei jelentősen magasabbak voltak a normál nyálkahártyában mértetekhez képest (27. ábra, 28. ábra).



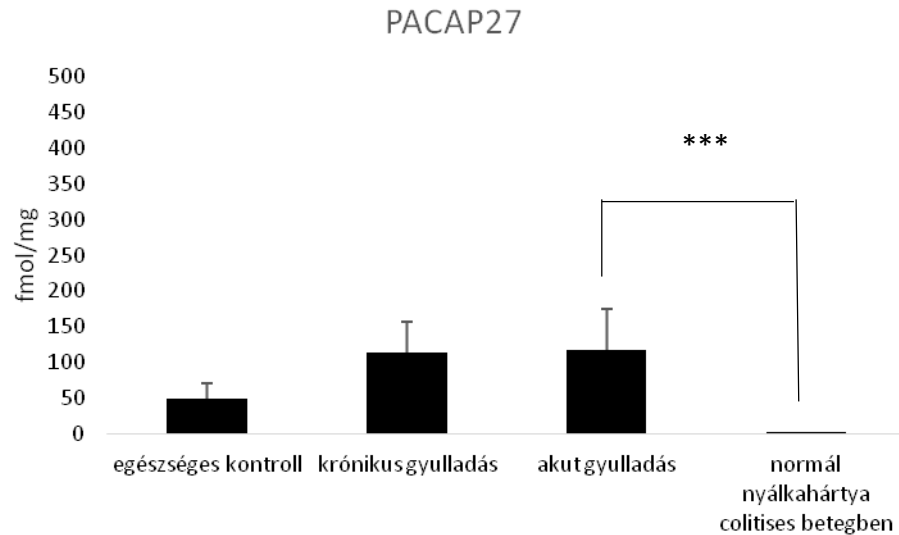
25. ábra. PACAP38 szintjeinek összehasonlítása Crohn-betegség esetén.



26. ábra. PACAP27 szintjeinek összehasonlítása Crohn-betegség esetén.

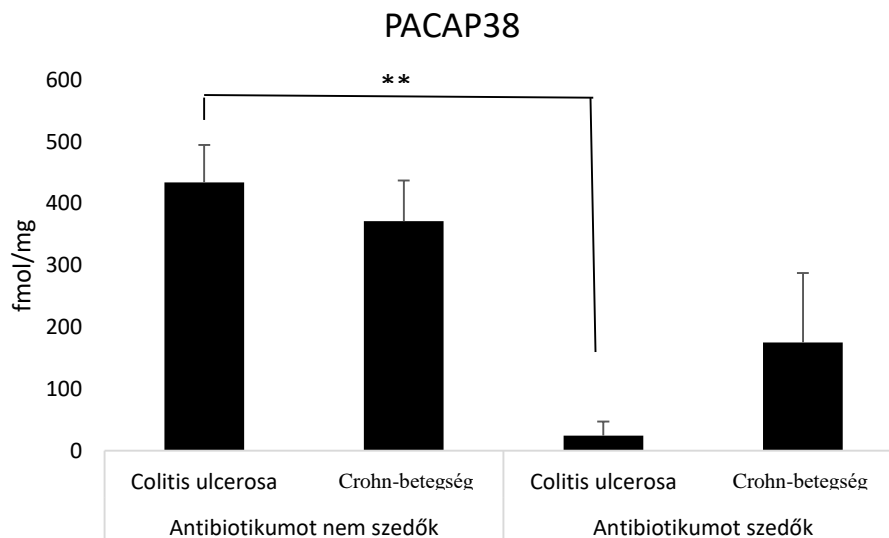


27. ábra. PACAP38 szintjeinek összehasonlítása colitis ulcerosa esetén. (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).



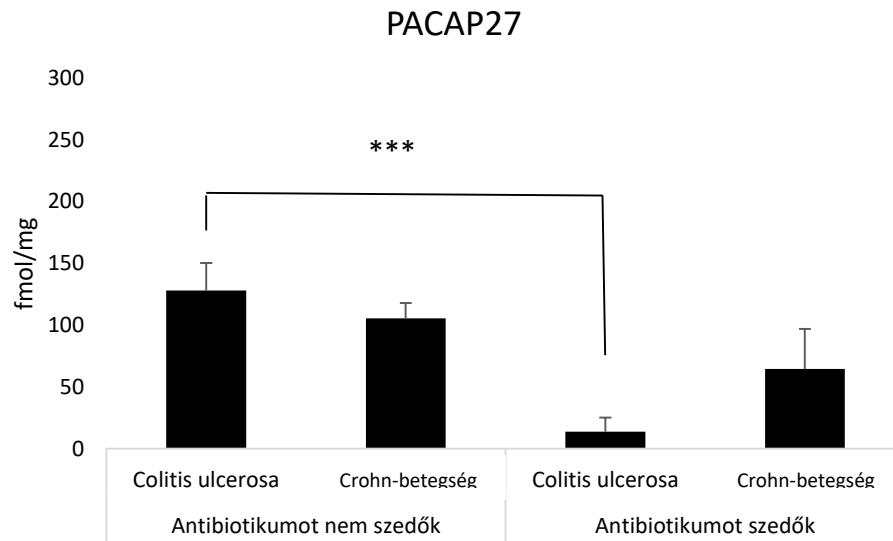
28. ábra. PACAP27 szintjeinek összehasonlítása colitis ulcerosa esetén. (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

Összehasonlítva az antibiotikumot szedő és antibiotikum-kezelésben nem részesülő colitis ulcerosás betegek mintáit, azt találtuk, hogy antibiotikum-szedés mellett szignifikánsan alacsonyabb mind a PACAP27, mind a PACAP38 szintje (29. ábra, 30. ábra).



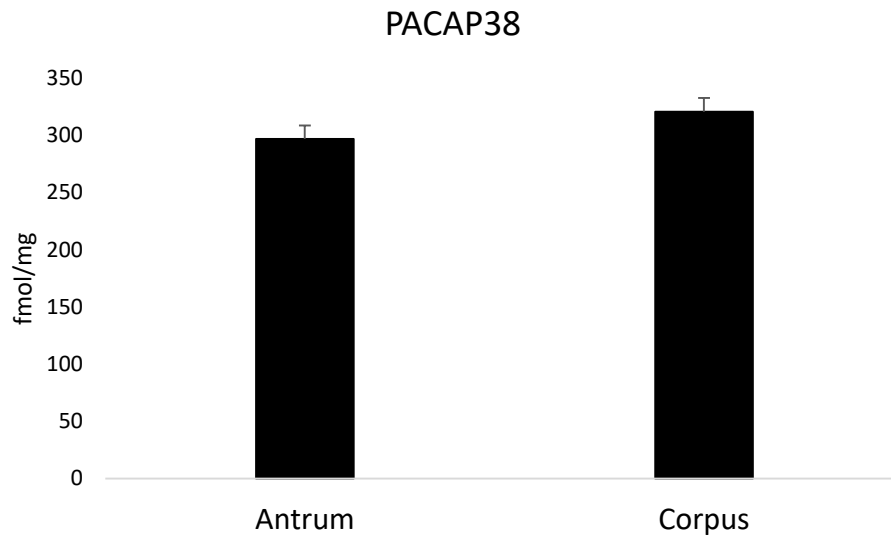
29. ábra. Antibiotikumot szedő és nem szedő betegek mintáiban a PACAP38 szintjeinek összehasonlítása. (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).



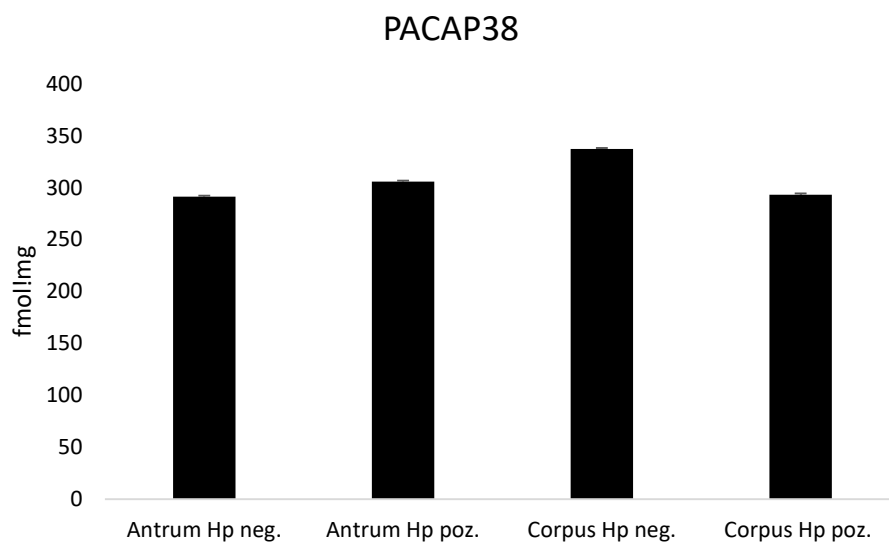


30. ábra. Antibiotikumot szedő és nem szedő betegek mintáiban a PACAP27 szintjeinek összehasonlítása. (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

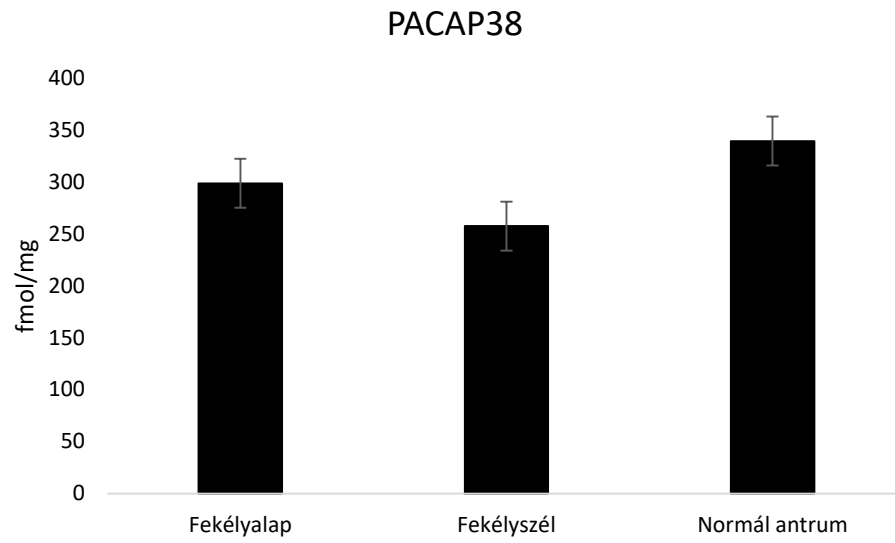
Az antrum gasztritiszben szenvedő betegek mintáinak vizsgálata során nem észleltünk jelentős különbséget a gyulladt antrum és az ép corpus minták PACAP38-szintjeinek összehasonlítása során (31. ábra). Összehasonlítva a *Helicobacter pylori* pozitív és negatív mintákat szintén nem találtunk szignifikáns különbséget (32. ábra). A gyomorfekély esetén a fekélyalap, fekélyszél és az ép gyomornyálkahártya mintáiban mérhető PACAP38 értékeiben szintén nem észleltünk szignifikáns különbséget (33. ábra).



31. ábra. Antrum gasztritiszben szenvedő betegek mintáinak vizsgálata során a gyulladt antrum és az ép corpus nyálkahártya PACAP38-szintjeinek összehasonlítása.



32. ábra. Antrumból és corpusból származó szövetminták PACAP38-szintjeinek összehasonlítása *Helicobacter pylori*-pozitivitás alapján.



33.ábra. Fekélyalap, fekélyszél és normál nyálkahártya PACAP38 értékeinek összehasonlítása.

## V. MEGBESZÉLÉS

### 1. INT407-sejteken végzett vizsgálatokkal kapcsolatos következtetések

Vizsgálatunk célja volt a PACAP humán intesztinális hámsejtekre kifejtett hatását vizsgálni. Korábbi irodalmi adatokat áttekintve az található, hogy humán colon tumor sejtvonalhoz (HCT-8) adva a PACAP növelni képes az életképes sejtek számát (Le et al., 2002.), ugyanakkor négy másik colon tumoros sejtvonal esetében csökkentette a sejtek proliferációját (HT29, SW403, DLD-1, Caco-2) (Lelièvre et al., 1998). PACAP KO egerek esetén gyulladáshoz vezető bélbetegségmodellben, DSS-indukálta colitis esetén a KO egerekben a betegség tünetei sokkal súlyosabbak, mint a vad egerek esetében. Emellett a KO egerek 60%-ában colon tumor alakul ki (Nemetz et al., 2008). Kutatócsoportunk korábbi vizsgálata során vastagbél-tumorképzés mûtéti preparátumában jelentősen alacsonyabb PACAP38-szint volt kimutatható (Szántó et al., 2012). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a PACAP befolyásolja a colon tumorok növekedését, és feltehetően specifikus hatása van a vastagbélben. Ugyanakkor – vizsgálatainkat megelőzően - az irodalomban nem volt fellelhető adat a PACAP vékonybélben kifejtett in vitro hatásait illetően. A PACAP vékonybélhámsejtekre kifejtett hatásának vizsgálatához humán embrionális jejunumból és ileumból izolált INT407-sejteket használtunk. Vizsgálatunk első részében a PACAP sejtproliferációra és a sejtek klónképző képességére kifejtett hatását vizsgáltuk, majd a sejtciklusban szereplő, tumorképződésben részt vevő faktorok expressziójára kifejtett hatását teszteltük Proteome Profiler Human XL Oncology Array segítségével. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a PACAP önmagában alkalmazva nem változtatta meg a sejtek viabilitását MTT-teszt során, ugyanakkor klonogén assay esetén sem befolyásolta a klónképző képességet. Mindez korábbi megfigyeléseinkkel összhangban van, mely szerint a PACAP önmagában való exogén adása nem befolyásolja in vitro az élő sejtek arányát (Rácz et al., 2007; Horváth et al., 2011; 2014). Kísérleteink során a PACAP szignifikánsan csökkentette a szénsav-anhidráz IX, FoxO1 és p27 expressziójának szintjét. A szénsav-anhidráz IX a vesetumorképzésben játszó faktor (Tostain et al., 2010), szintje szignifikánsan csökken PACAP-kezelés hatására. A FoxO1 az apoptózist és a sejtciklus felfüggesztését elősegítő peptid (Lu and Huang, 2011), melynek szintje szintén szignifikánsan csökken PACAP hatására. A p27 (vagy Kip1) a ciklin-dependens kináz

(CDK) inhibitorok közé tartozik, melynek mind pozitív, mind negatív hatása lehet a ciklin-dependens kináz aktivitást illetően (Moller, 2000). A FoxO1 aktivációja növeli a p27 génjének transzkripcióját és féléletidejét (Lu és Huang, 2011), így ezen szabályozó fehérjék feltehetően együtt, egymással összhangban működnek. Mindezen adatok alapján feltelezhetjük, hogy a PACAP részt vesz a sejtciklus szabályozásában INT407-sejtek esetén, de nincs jelentős hatása normál körülmények között.

Vizsgálatunk következő részében a PACAP különböző stresszorok mellett kifejtett hatását vizsgáltuk. Első lépésben *in vitro* hipoxiát modellezve  $\text{CoCl}_2$ -ot adtunk az INT407-sejtekhez, majd emellett vizsgáltuk a PACAP hatását. Eredményeinkben azt találtuk, hogy sem a PACAP-előkezelés, sem a  $\text{CoCl}_2$ -vel együtt adott PACAP nem javította jelentősen a sejtek túlélését. A következőkben a PACAP gamma-sugárzás mellett kifejtett hatását vizsgáltuk. Tekintettel arra, hogy a sugárterápiának a gyors turnoverű bélműhámsejteket károsító hatása és az ennek következtében kialakuló hasmenés egy igen komoly szövődménye, ezért vizsgálatunk célja volt meghatározni, vajon a PACAP befolyásolja-e a besugarazott vékonybélhámsejtek túlélését. A hipoxiánál tapasztaltakhoz hasonlóan azt találtuk, hogy a PACAP az irradiált sejtek túlélését nem befolyásolta, viszont meglepő módon csökkentette a sejtek klonogén potenciálját, azaz felerősítette a sugárzás károsító hatását. A háttérben zajló molekuláris mechanizmusok feltérképezése céljából végzett western blot során a p-ERK1/2 szintjének csökkenése volt detektálható 1 Gy sugárdózis esetén alkalmazott PACAP-előkezelés mellett. Az ERK egy antiapoptotikus hatású szignáltranszdukciós útvonal tagja, így a PACAP sugárzás okozta sejt-károsító hatásának fokozását támasztotta alá ez a vizsgálatunk is.

A következő stresszor alkalmazása esetén a PACAP az oxidatív stressznek kitett sejtek túlélését javította, de csak abban az esetben, amikor a PACAP-ot  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal együtt adtuk a sejtekhez. Az ionizáló sugárzás sejt-károsodáshoz vezető mechanizmusa több ponton megegyezik az oxidatív stressz esetén zajló folyamattal, amelynek során a hidrogén-peroxid-kezelés reaktív oxigéngyökök felszabadulásával vezet a sejtek károsításához. A gamma-sugárzás nagyon gyorsan ROS-képződéshez vezet, hidroxilgyök ( $\text{OH}^\cdot$ ), ionizált víz ( $\text{H}_2\text{O}^+$ ), hidrogén gyök ( $^\cdot\text{H}$ ) és hidrált elektronok ( $e_{\text{aq}}^-$ ) keletkeznek, majd szekunder ROS-termékek alakulnak ki ( $\text{O}_2^{\cdot-}$  és  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Ezek a ROS-termékek reaktív nitrogéngyökökkel (reactive nitrogen species, RNS) együtt számos kaskádot indítanak el, melyek kölcsönhatásba lépve a sejtek egyes elemeivel azok károsodását okozzák (Reisz et al., 2014).

A PACAP gamma-sugárzás mellett kifejtett hatásának vizsgálata során azt találtuk, hogy a sejtek viabilitását a gamma-sugárzás csökkentette, ugyanakkor azonban a sejtek életképességét a PACAP-előkezelés egyik esetben sem befolyásolta. A PACAP csak abban az esetben javította a sejtek túlélését, ha hidrogén-peroxiddal együtt, szimultán adtuk a sejtekhez, viszont a kísérleti elrendezés miatt a besugarazott sejteket szimultán kezelni nem lehetett.

A sejtek életképességének vizsgálatát mind MTT-teszt, mind klonogén assay segítségével elvégeztük, mivel az MTT-teszt csak arról ad információt, hogy a sejt a károsító faktor hatására elpusztult-e, vagy sem, ugyanakkor a szenzitívebb klonogén assay arról is információt ad, hogy az élő sejt milyen mértékben károsodott, mivel a súlyosan károsodott sejtek nem képesek osztódásra, klónképzésre. Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a PACAP csökkentette az irradiált sejtek klonogén potenciálját valamennyi sugárdózis alkalmazása esetén, ugyanakkor a PACAP-kezelés irradiáció nélkül nem rontotta az INT407-sejtek klónképző képességét. A klonogén assay-t  $H_2O_2$ -kezelt sejtek esetén nem tudtunk alkalmazni, mivel ezek a sejtek nem élik túl a klonogén assay-vel járó hosszú kísérleti procedúrát. Mindezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a PACAP hatásai nagymértékben függenek az alkalmazás időpontjának megválasztásától. Ezt támasztja alá munkacsoportunk egy korábbi vizsgálata is, melynek során a PACAP protektív hatású volt a HTR8/SVneo humán trofoblaszt sejtekre 2 órával az oxidatív stressz kezdete előtt adva, de ugyanakkor a PACAP és a  $H_2O_2$  együttes alkalmazásakor nem befolyásolta az oxidatív stressz hatását (Horváth et al., 2014) szemben a jelen vizsgálati eredménnyel, ahol a PACAP a  $H_2O_2$  hatását szimultán alkalmazás mellett befolyásolta. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az exogén PACAP hatásai nemcsak a sejt típusától, hanem az alkalmazás időpontjától és a celluláris stresszor fajtájától is függenek.

Az exogén PACAP hatásainak vizsgálatát követően a sejtekben lévő, endogén PACAP szerepét vizsgáltuk poszttranszkripciós géncsendesítés segítségével. A vizsgálataink során használt sejtvonalat embrionális szövetből izolálták, ezek az embrionális sejtek az enteroendokrin sejteknek is prekursorai, így feltehetően tartalmaznak endogén PACAP-ot. Korábbi vizsgálatok során immunhisztokémiailag már igazolták csirke vékonybélhámsejtekben a PACAP jelenlétét (Pirone et al., 2011) és miután a PACAP az evolúció során nagymértékben konzerválódott, feltételezhető, hogy az emberi INT407-sejtek is expresszálják. Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy  $H_2O_2$ -indukálta oxidatív

stressz-szel szemben az ADCYAP1 siRNS-sel történt transzfekció a sejtek fokozott érzékenységét váltotta ki, mely korábbi vizsgálati eredményeinkkel összhangban van, azaz a PACAP-génhiányos egerek különféle károsító hatással szemben sokkal sérülékenyebbek, mind a vad típusú egerek (Reglődi et al., 2012). Ugyanakkor PACAP KO egerekből származó primer vesesejtkultúrát vizsgálva azt találtuk, hogy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indukálta oxidatív stressz mellett a sejtek túlélése rosszabb, annak ellenére, hogy normál körülmények között nincs különbség a PACAP-génhiányos és a vad egerekből származó sejtek között (Horváth et al., 2010). Mindemellett számos korábbi közlemény eredményei is azt támasztják alá, hogy a PACAP KO egerek valamennyi stresszor hatására sérülékenyebbek, mint a vad társaik, így renális iszkémia/reperfúzió mellett (Szakály et al., 2011), de a magasabb vulnabilitást leírták kisagyi szemcsesejtek esetén in vitro (Vaudry et al., 2005), vékonybél-iszkémia (Ferencz et al., 2010a,b), és DSS-indukálta colitis (Azuma et al., 2008) in vivo modelljeiben. PACAP KO egerek esetében mind a pre-szenilis, mind a szenilis amiloid generalizáltabban, súlyosabban jelenik meg. A hisztopatológiai vizsgálatok korral összefüggő szisztémás amiloidózist igazoltak számos szervben, de a bélben kifejezetten súlyosan jelent meg (Reglődi et al., 2018b). Mindezek az adatok jelenlegi vizsgálati eredményeinkkel összhangban azt támasztják alá, hogy az endogén PACAP-nak védő szerepe van a különböző szövetekben, különböző körülmények között, különböző stresszorok mellett. Mind az exogén, mind az endogén PACAP-nak szabályozó szerepe van a vékonybél epiteliális sejtjeiben, de ez bizonyos keretek között érvényesül csak, elsősorban a stresszor típusától és a PACAP alkalmazási idejétől függően. A három különféle stresszorral (hipoxia, oxidatív stressz, ionizáló sugárzás) végzett vizsgálatunk adatait összehasonlítva arra a következtetésre juthatunk, hogy a PACAP védi az oxidatív stressz-szel szemben a sejteket mind exogén, mind endogén formában, de nem képes az INT407-sejtek életképességét javítani gamma-sugárzás és in vitro hipoxia mellett, sőt a klonogén potenciált csökkentheti is.

## 2. A bakteriális adhézióra és a bélflórára kifejtett hatás vizsgálata

A bélrendszeri bakteriális infekciók kialakulása esetén döntő jelentőségű a baktériumok és az intesztinális hámsejtek felszíne közt létrejövő adhézió. Akut ileitisz esetén sok esetben a kommenzális bélflóra tagja, így például az *Escherichia coli* transzlokálódik az epiteliális barrieren át az intesztinális lamina propriába, majd az átjutott baktérium, vagy a bakteriális sejtfal egyes alkotóeleme (pl.: LPS) a véráramba jutva szepszist vagy többszervi elégtelenséget okozhat (Bereswill et al., 2010). Egereken *Toxoplasma gondii*-indukálta akut ileitisz esetén profilaxisként vagy terápiaként alkalmazott exogén PACAP a gyulladáshoz vezető folyamat súlyosságát enyhíti, a Th1-mediálta immunválaszt és az oxidatív stresszt csökkenti, ugyanakkor elősegíti az antiinflammatorikus citokinválaszt (Heimesaat et al., 2014). A PACAP bakteriális adhézióra és bélrendszeri gyulladáshoz vezető folyamatokra való hatásosságának vizsgálata során azt találtuk, hogy a PACAP önmagában is, de különösen LPS beadása után befolyásolja a citokin-expressziót INT407 vékonybélhámsejtek esetén. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az endotoxinhatás után mérhető csökkent citokin-expresszió egy további tényező lehet a PACAP gyulladáscsökkentő hatásmechanizmusában a bélrendszer gyulladáshoz vezető folyamatai esetén. Vizsgálatunk során nem találtunk direkt hatást a bakteriális adhézióra, ami azt sugallja, hogy a PACAP nem befolyásolja közvetlenül a baktériumok bélhámsejtekhez való tapadását, azonban részt vesz a különböző kórokozók által indukált gyulladáshoz vezető reakciókban. Korábbi irodalmi adatok alapján is feltételezhető, hogy a PACAP közvetlen hatással lehet a baktériumokra és más kórokozókra. A PACAP első közvetlen antimikrobiális hatását bizonyítottan a *Tetrahymena thermophila* protozoon esetében írták le, ahol a PACAP kemorepellens hatást mutatott (Mace et al., 2000), ennek kapcsán ugyanazon a receptoron keresztül hatott, mint a lizozim (Hassenzahl et al., 2001). Egy későbbi tanulmány igazolta egyéb parazita, így a *Trypanosoma brucei* elleni hatásosságát is. Mind a VIP, mind a PACAP elpusztította a parazita véráramba jutó, fertőző formáját, ugyanakkor a nem fertőző parazitákra nem voltak hatással (Gonzalez-Rey et al., 2006). A paraziták integritását a citoszólba jutva és ott felhalmozódva károsították (Gonzalez-Rey et al., 2006). Egy a közelmúltban publikált vizsgálat igazolta, hogy a PACAP, valamint a vele rokon peptidek és analógok képesek közvetlen antibakteriális hatást kifejteni (Starr et al., 2018). Mind a PACAP38, mind a PACAP27, valamint a vele rokon VIP és szekretin rendelkezik antibakteriális hatással a



Gram-negatív kórokozók, így például az *Escherichia coli*-val szemben. A PACAP ugyanakkor hatással van a Gram-pozitív *Staphylococcus aureus*-ra is. Egy másik vizsgálat emellett azt mutatta, hogy a PACAP mérsékelt sterilizáló hatást gyakorolt a *Pseudomonas aeruginosa*-val és az *Escherichia coli*-val szemben, míg ezt a hatást a többi peptid esetében nem lehetett ilyen markánsan bizonyítani. A PACAP emellett mérsékelt aktivitást mutatott a *Bacillus cereus* ellen is (Starr et al., 2018). A PACAP antibakteriális hatásmechanizmusát membrán-permeabilizációs hatásnak találták anélkül, hogy toxikus mellékhatásokat okozna. Ezt támasztja alá a vörösvérsejtek zavartalan hemolitikus aktivitása (Starr et al., 2018). A PACAP direkt antimikrobás hatását igazolta Debbabi és munkatársai közelmúltban elvégzett vizsgálata is, ahol számos baktérium mellett a *Burkholderia cenocepacia* törzssel szemben mutatott kifejezett antibakteriális hatást a PACAP (Debbabi et al., 2018). Mindezen adatok mellett szólnak, hogy a PACAP közvetlenül a baktériumokra hat. Vizsgálatunk során felvetettük, hogy a PACAP hatással van a baktériumok bélhámsejtekhez való adhéziójára is, azonban ezt igazolni nem tudtuk. Következésképpen jelenlegi tudásunk alapján úgy tűnik, hogy a PACAP védő hatást fejt ki a bélgyulladásos megbetegedéseiben mind direkt antibakteriális hatásával, mind citoprotektív hatásán keresztül anélkül, hogy befolyásolná a baktériumok bélfalhoz történő tapadását. A következő lépésben emiatt megvizsgáltuk a PACAP citokin-expresszióra való hatását INT407 sejt kultúra felhasználásával. Miután ismert, hogy a PACAP hatással van a gyulladásos citokinek és kemokinek képződésére különböző sejtek esetén, ezért célul tűztük ki ezen hatás vizsgálatát vékonybélhámsejtek esetén. Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy a PACAP megváltoztatta számos citokin expresszióját. Az IL-8 a kemokincsalád tagja, mely erős kemotaktikus hatással rendelkezik (Baggiolini et al., 1989), ugyanakkor fontos szerepet játszik a gyulladásos, autoimmun és fertőző megbetegedések esetén (Harada et al., 1994; Koch et al., 1992; Smyth et al. 1991). Jelen vizsgálatunk során azt találtuk, hogy LPS hatására szignifikánsan megnőtt az IL-8 expressziója, amit a PACAP-kezelés képes volt megakadályozni. Eredményünk összhangban van Zhang és munkacsoportjának vizsgálati eredményével (2005), akik a PACAP expresszió-csökkentő hatását írták le IL-1 $\beta$ -vel stimulált ARPE sejtek esetén. Vizsgálatunkban az IL-8 mellett LPS hatására szignifikáns IL-18 expressziót találtunk, melyet azonban a PACAP-kezelés nem befolyásolt. LPS hatására emelkedet CXCL-1-expressziót mértünk, melyet a PACAP-előkezelés szignifikánsan csökkentett. A CXCL-1 neutrofil granulociták, makrofágok és

epitélsejtek által termelt kemoattraktáns aktivitással rendelkező citokin, mely fontos szerepet játszik a neutrofil granulociták aktiválásában (Sawant et al., 2016). Delgado és munkatársai korábban leírták a PACAP expresszió-csökkentő hatását LPS-stimulálta peritonealis makrofágok és mikrogliaesetek esetén (Delgado et al., 2001, 2002). Összességében elmondható, hogy a PACAP képes számos citokin expresszióját befolyásolni. Ezt bizonyították már számos sejt és szövet esetében, így limfociták (Wang et al., 1999), asztrociták és mikrogliaesetek esetén (Gottschall et al., 1994; Delgado et al., 2002), retina krónikus hipoperfúziós modelljében (Szabó et al., 2012) és a vesében diabéteszes és iszkémiás nefropátia esetén (Horváth et al. 2010; Bánki et al. 2013). A PACAP citokin-expresszióra kifejtett hatása különböző az egyes sejtek esetén és függ a károsító tényező típusától is. Számos esetben a PACAP önmagában nem hat a citokin-expresszióra, de ellensúlyozza a károsító tényező okozta változásokat (Szabó et al., 2012). Összességében megfigyeléseink azt mutatják, hogy a PACAP nincs közvetlen hatással a baktériumok bélfalhoz történő adhéziójára, ugyanakkor képes ellensúlyozni az endotoxinnal kiváltott citokin-expressziót, ami valószínűleg hozzájárul a peptid jól ismert bélvédő hatásaihoz

A bélflóra kulcsfontosságú szerepet tölt be a szervezet védekező rendszerében, megváltozása számos - nem csak gasztrointesztinális - megbetegedés kialakulásában játszhat szerepet (Ekmekciu et al., 2017). A béltraktus bakteriális kolonizációja közvetlenül a születés után kezdődik fakultatív anaerob, kommenzális baktériumok, így Enterobaktériumok, Enterococcusok, Lactobacillusok kolonizációjával (Tojo et al., 2014). Genotípustól függetlenül a székletben a bakteriális génszámok fokozatosan csökkennek az életkor előrehaladtával különösen 3 hónapos kor után. Ezzel szemben az obligát anaerob baktériumok, mint a *Bacteroides* és *Clostridium* törzsek és a *Bifidobaktérium* is általában folyamatosan jelen vannak (Langille et al., 2014). Vizsgálati eredményeink ennek megfelelőek voltak tekintetben, hogy az egér intesztinális *Bacteroides* törzsek száma egy hónapos korra megnőtt, habár a *Bacteroides/Prevotella* spp. száma alacsonyabb volt 15 hónapos kor után vad egerekben. Ugyanakkor a *Bifidobaktériumok* PACAP KO egerekben szinte alig voltak kimutathatók már 2 hetes korban is, míg vad egerekben 2 hetes korban volt a legmagasabb a szintjük, majd 3 hónapos kor után volt megfigyelhető egy enyhe csökkenés. A *Bifidobaktériumok* fontos szerepet töltenek be az intesztinális homeosztázisban, az alacsony *Bifidobaktérium* számmal jellemezhető diszbiózis számos immunpatológiai folyamatban játszhat szerepet, így például IBD, irritábilis bél szindróma, cöliákia

és atópiás megbetegedések esetén (Tojo et al., 2014). Arra, hogy pontosan mivel magyarázható a Bifidobaktérium jótékony hatása genom alapú elemzések során derült fény (Klijn et al., 2005). Ezek közül kiemelendő a laktát- és ecetsavtermelés, ezáltal az intraluminális pH csökkentése, a funkcionális oxidatív stressz mechanizmusok aktiválása, mely az enterális patogénekkal szembeni védekezésben segít, emellett a Bifidobaktériumnak metabolikus hatásai vannak, így vitaminképzés, epesavak hidrolízise, konjugált lenolajsav termelés, oxalátlebomlás (Klijn et al., 2005). A számos jótékony hatása közül is talán a legfontosabb, hogy a *Bifidobacterium dentium* képes a béltraktusban a viszcerális szenzitivitást módosítani  $\gamma$ -amino-vajsav termelés által, amely egy primer gátló neurotransmitter a központi idegrendszerben emlősöknél (Pokusavea et al., 2017). Bifidobaktérium-tartalmú probiotikum javítja IBD-s betegek panaszait és a remissziót képes nyújtani (Tojo et al., 2014). Ezek alapján nagyon valószínű, hogy PACAP KO egerek esetén a Bifidobaktérium hiánya egy kulcsfaktor a különböző toxikus ágensek mellett észlelt fokozott sérülékenységekben és a különböző intesztinális és extraintesztinális immunpatológiai folyamatokra észlelt fokozott fogékonyság esetén.

### **3. A PACAP humán szöveti mintákban való vizsgálata**

A PACAP izolációját követően számos humán szöveti mintában igazolták jelenlétét (Palkovits et al., 1995). A legnagyobb koncentrációban az agyban és az endokrin mirigyekben volt kimutatható, de számos vizsgálat során igazolták jelenlétét a vérben is (Hansen et al., 2013). Jellemző ugyanakkor az is, hogy a PACAP szintje a plazmában, illetve számos más testfolyadékban változik a különböző fiziológiai, illetve patofiziológiai körülmények között (Reglődi et al. 2010; Han et al., 2014). Terhesség alatt jelentősen megnő a szintje, míg szülés közben rapidan csökken (Reglődi et al., 2010). A központi idegrendszer és a perifériás szövetek sérülései esetén megnő a PACAP-szint (Somogyvári-Vígh és Reglődi, 2004). Pszoriázisos betegek bőrében (Steinhoff et al., 1999), illetve iszkémiás szívbetegség esetén a szív szöveteiben ugyancsak magasabb PACAP-szint mérhető (Szántó et al., 2012), míg tüdő-, vagy colon tumoros mintákban alacsony a PACAP szintje (Szántó et al., 2012). Húgyhólyagdaganat esetén nincs különbség az egészséges és tumoros mintákat vizsgálva, azonban vesetumoros mintákban alacsonyabb, míg prosztatatumor esetén magasabb a szöveti PACAP-szint (Tamás et al., 2016). Mindezek alapján a PACAP-szint változásnak akár diagnosztikus/prognosztikus értéke is lehet

egyeb megbetegedések esetén. Gyulladásos bélbetegség esetén felmerül védő hatása, IBD-ben szenvedő kutyák vékony- és vastagbelének mukozájában elhelyezkedő axonterminálisokban fokozott expressziót mutat (Gonkowski et al., 2013). A gyulladásos bélbetegség pontos patomechanizmusa a mai napig sem ismert, azonban az oxidatív stressz, a reaktív oxigén metabolitok szerepe egyértelmű a betegség kialakulásában (Bhattacharyya et al., 2014). INT407-sejteken végzett vizsgálataink igazolták, hogy a PACAP védő hatást fejt ki az oxidatív stressz-szel szemben. Emiatt vizsgálatunk további célja volt meghatározni gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek szöveti mintáiban a PACAP szintjét, összehasonlítva ép, egészséges vastagbélnyálkahártyából vett szöveti minták PACAP-szintjeivel. A gyulladásos bélbetegség két ismert formáját, a Crohn-betegséget és a colitis ulcerosa-t külön kezeltük, a mintákat a szövettani vizsgálat alapján akut és krónikus gyulladással járó csoportokba soroltuk. Az irodalmi adatokat áttekintve humán szöveti minták PACAP-szintjét csak Kaminska és munkatársai vizsgálták, akik gyermekkori colitis ulcerosa esetén a gyulladt területekről vett mintákban a PACAP-tartalmú idegrostok csökkenését igazolták (Kaminska et al., 2006; Kaminska et al., 2007). Vizsgálataink során Crohn-betegség esetén a szöveti mintákban mért PACAP38- és PACAP27-szintekben nem volt jelentős különbség az ép és gyulladt nyálkahártya adatait összehasonlítva sem az akut, sem a krónikus gyulladásos csoport esetén. Kaminska és munkatársainak eredményeivel szemben vizsgálatunk során felnőtt, colitis ulcerosában szenvedő betegek mintái esetén az akut gyulladással járó megbetegedés mellett vett szöveti minták PACAP-szintjei jelentősen magasabbak voltak a normál nyálkahártyában mértékhöz képest. Feltehetően a különbség abból adódott, hogy a szöveti PACAP-szint összefüggésben lehet a betegség klinikai aktivitásával, és míg Kaminska és munkatársai a különböző aktivitású betegeket együttesen vizsgálta, addig munkacsoportunk külön értékelte a betegeket betegségük klinikai aktivitása szerint. Krónikus gyulladás mellett a colitis ulcerosás betegcsoportban sem találtunk jelentős különbséget a PACAP-szinteket a normál nyálkahártya adataival összehasonlítva. Akut gyulladás mellett észlelt magas PACAP-szinteket elsősorban a szövetekben jelen lévő gyulladásos citokinek hatásának tarthatjuk.

Emellett az antibiotikumot szedő és antibiotikum-kezelésben nem részesülő colitis ulcerosás betegek mintáit összehasonlítva azt találtuk, hogy antibiotikum-szedés mellett szignifikánsan alacsonyabb mind a PACAP27, mind a PACAP38 szintje. A bélflóra fontos szerepet játszik a gyulladásos bélbetegség pathogenezisében és a szövődmények

kialakulásában (Loh and Blaut, 2012; Scott et al., 2015). A bélflóra megváltozása, különösen az intesztinális flóra diverzitásának csökkenése összefüggésben áll a krónikus bélgyulladással (Ott et al., 2004; Loh and Blaut, 2012). Bizonyos kórokozók, mint a virulens *Escherichia coli* törzsek (Darfeuille-Michaud et al., 2004), bizonyos *Bacteroides* speciek (Swidsinski et al., 2005) és a *Mycobacterium avium* (Sartor, 2005) szerepét már korábban összefüggésbe hozták a gyulladós bélbetegség patogenezisével. Az antibiotikumok csökkenthetik ezen baktériumok koncentrációját a bél lumenében, valamint megváltoztatják a bélflóra összetételét (Scott et al., 2015; Sartor 2004). A klinikai gyakorlatban elsősorban a ciprofloxacint és a metronidazolt alkalmazzuk gyulladós bélbetegség esetén. Vizsgálatunkban a betegek metronidazolt vagy kombinált ciprofloxacinnal és metronidazollal kezelést kaptak, mely mellett feltehetően csökkent a szövetekben a gyulladós és immunsejtek jelenléte, feltehetően ezzel összefüggésben csökkent le a PACAP mennyisége is.

A vékony és vastagbél mellett a PACAP a gyomor működésére is hat. Ahogy összefoglaló közleményünkben is részleteztük, a PACAP a gyomor motilitását, vérátáramlását, savszekréció szabályozását befolyásoló hatásán túl a sejtproliferációra és a sejtek differenciálódására is hatással van (Reglődi et al., 2018c). A PAC1-receptorokon keresztül hatva a PACAP fontos szerepet játszik a gyomorsav-szekréció szabályozásában nemcsak egészséges nyálkahártya mellett, hanem a gyomor különböző megbetegedései esetén is (Lu et al., 2011). Egy korábbi vizsgálat során patkányokban változó PACAP szöveti expressziót találtak a gyomorfekély gyógyulása kapcsán. Lokálisan adott ecetsavval indukált fekély esetén a PACAP és a VIP mennyiségét vizsgálva azt találták, hogy míg a VIP immunreaktivitása nem változott az idegrostokban, addig a vizsgálat első napján a PACAP-szint jelentősen lecsökkent a fekély széli részén. Ugyanakkor a fekély gyógyulásának 10. napján a PACAP immunreaktivitása megnőtt, a fekély mellett található myentericus ganglionokban fokozódott a VIP és a PACAP mRNS expresszió (Mei és Sundler, 1998). A szerzők véleménye alapján a szelektív PACAP-csökkenés a fekélyszélnél vagy a túlzott kibocsátás, vagy a szintézis csökkenésének következménye. Duodenális fekély esetén a PACAP szintén védő hatást nyújt (Yagi et al., 1998) korábbi irodalmi adatokból ismert duodenális bikarbonát szekréciót fokozó hatása által (Konturek et al., 2004). Intravénásan alkalmazott PACAP1-27 injekció vagy infúzió megnöveli a duodenális bikarbonát szekréciót anélkül, hogy a savszekréciót befolyásolná, ezáltal szignifikánsan csök-

kenti a duodenális lézió súlyosságát (Yagi et al., 1998). Vizsgálataink során humán szöveti mintákban vizsgáltuk a PACAP-szinteket, ennek kapcsán 8 antrum gasztritiszben és 6 gyomorfekélyben szenvedő beteg szöveti mintáit vizsgáltuk meg. Antrum gasztritisz esetén a gyulladt antrum és ép corpusnyálkahártya adatait, míg fekély esetén a fekélyalap, fekélyszél és az ép gyomor nyálkahártya szöveti mintáit hasonlítottuk össze. Tekintettel arra, hogy gyomornyálkahártya-gyulladás hátterében gyakran találunk *Helicobacter pylori*-pozitivitást, így vizsgálatunk során *Helicobacter pylori*-pozitivitás alapján is elvégeztük a szöveti minták PACAP-szintjeinek összehasonlítását. A gasztritiszes minták vizsgálata során nem találtunk jelentős különbséget a gyulladt és ép nyálkahártya adatait összehasonlítva, ugyancsak nem volt szignifikáns különbség a *Helicobacter pylori*-pozitív és -negatív betegek szöveti mintáiban mérhető PACAP38-szintek között. Fekélybetegség esetén látható volt különbség a fekély széli részéből vett minták PACAP-szintje és a normál nyálkahártya adatai között. Tehát a tendencia hasonló volt, mint a korábban, patkányoknál kísérletes körülmények között talált különbség esetén, mely szerint a fekély széli részén csökkent a PACAP-expresszió (Mei és Sundler, 1998), azonban az értékeket kielemezve a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Feltehetően a különbség oka az, hogy állatkísérletek során kontrollált, egyéb betegségektől mentes, teljesen homogén csoportok vannak, viszont humán vizsgálatok során a betegek sokkal diverzebbek, mint az indukált fekélymodellben a patkányok.

## VI. Új eredmények összefoglalása

A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatásának vizsgálata során azt találtuk, hogy a PACAP védi az oxidatív stressz-szel szemben a sejteket mind exogén, mind endogén formában, de nem képes az INT407-sejtek életképességét javítani gamma-sugárzás és in vitro hipoxia mellett.

A PACAP nincs közvetlen hatással a baktériumok bélfalhoz történő adhéziójára, ugyanakkor képes ellensúlyozni az endotoxinnal kiváltott citokin-expressziót. LPS hatására szignifikánsan megnőtt az IL-8 expressziója, amit a PACAP-kezelés képes volt megakadályozni.

PACAP KO és vad egerek bélflórájának vizsgálata során azt találtuk, hogy KO egerek esetében a Bifidobaktérium csaknem hiányzott a bélflórából.

Colitis ulcerosa aktív stádiumában szignifikánsan magasabb PACAP-szintek mérhetők a szöveti mintákban az ép nyálkahártya adataival összehasonlítva. Antibiotikum szedése mellett szignifikánsan csökken a PACAP mennyisége colitis ulcerosa esetén.

Antrum gastritisz esetén nincs különbség a nyálkahártyában mérhető PACAP-szintek között az ép és a gyulladt nyálkahártya adatait összehasonlítva. Ugyancsak nincs különbség *Helicobacter pylori*-pozitív és -negatív betegek szöveti mintáiban mérhető PACAP38-szintekben.

Gyomorfekély esetén a fekély széli részéből vett minták PACAP38-szintje és a normál nyálkahártya adatai között csökkenő tendencia volt látható, mely eltérés hasonló volt, mint a korábban, patkányoknál kísérletes körülmények között észlelt különbség.

## VII. Irodalomjegyzék

Abad C, Waschek JA. Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis. *Current Pharmaceutical Design*. 2011;17:1025–1035.

Abad C, Jayaram B, Becquet L, Wang Y, O'Dorisio MS, Waschek JA, Tan YV. VPAC1 receptor (Vipr1)-deficient mice exhibit ameliorated experimental autoimmune encephalomyelitis, with specific deficits in the effector stage. *Journal Neuroinflammation*. 2016;13(1):169.

Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*. 2009;361:2066-2078.

Agarwal A, Halvorson LM, Legradi G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Molecular Brain Research*. 2005;138(1):45-57.

Ago Y, Hayata-Takano A, Kawanai T, Yamauchi R, Takeuchi S, Cushman JD, Rajbhandari AK, Fanselow MS, Hashimoto H, Waschek JA. Impaired extinction of cued fear memory and abnormal dendritic morphology in the prelimbic and infralimbic cortices in VPAC2 receptor (VIPR2)-deficient mice. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2017;145:222-231.

Alston EN, Parrish DC, Hasan W, Tharp K, Pahlmeyer L, Habecker BA. Cardiac ischemia-reperfusion regulates sympathetic neuropeptide expression through gp130-dependent and independent mechanisms. *Neuropeptides*. 2011;45:33–42.

Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *Journal of Immunology*. 2005;174:4453-4460.

Al-Qudah M, Alkahtani R, Akbarali HI, Murthy KS, Grider J. Stimulation of synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor from intestinal smooth muscle cells by substance P and pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *Neurogastroenterology and Motility*. 2015;27:1162-74.

Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT. Aspirin, nonsteroidal antiinflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Annals of Internal Medicine*. 2012;156:350-359.

Arciszewski MB, Mozel S, Sienkiewicz W. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-27 (PACAP-27) is co-stored with galanin, substance P and corticotropin releasing factor (CRF) in intrapancreatic ganglia of the sheep. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2015;18,343–350.

Arimura A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Japanese Journal of Physiology*. 1998;48:301-331.



- Arimura A, Somogyvári-Vígh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology*. 1991;129:2787-2789.
- Assche G, Depoortere I, de Vos R, Geboes K, Janssens JJ, Collins SM, Peeters TL. Region-specific antiproliferative effect of VIP and PACAP-(1-38) on rabbit enteric smooth muscle. *American Journal of Physiology*. 1999;276:G303-10.
- Atherton JC. The pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastro-duodenal diseases. *Annual Review of Pathology*. 2006;1:63-96.
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Rác B, Gallyas F, Tamás A, Gaál V, Márton Z, Gábiel R, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the retina: focus on the retinoprotective effects. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1200:128–139.
- Atlasz T, Váczy A, Werling D, Kiss P, Tamás A, Kovács K, Fábíán E, Kvarik T, Mammel B, Dányádi B, Lokos E, Reglődi, D. Neuroprotective effects of PACAP in the retina. In: Reglodi, Dora, Tamas, Andrea (Eds.), Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP. Springer Nature, New York, 2016; 501–527.
- Azuma YT, Hagi K, Shintani N, Kuwamura M, Nakajima H, Hashimoto H, Baba A, Takeuchi T. PACAP provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis. *Journal of Cellular Physiology*. 2008;216:111–119.
- Azuma YT, Hayashi S, Nishiyama K, Kita S, Mukai K, Nakajima H, Iwamoto T, Takuchi T. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger heterozygote knockout mice display increased relaxation in gastric fundus and accelerated gastric transit in vivo. *Neurogastroenterology and Motility*. 2016;28:827–36.
- Azuma M, Suzuki T, Mochida H, Tanaka S, Matsuda K. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates release of somatolactin (SL)- $\alpha$  and SL- $\beta$  from cultured goldfish pituitary cells via the PAC<sub>1</sub> receptor-signaling pathway, and affects the expression of SL- $\alpha$  and SL- $\beta$  mRNAs. *Peptides*. 2013;43:40-47.
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*. 1989;84:1045-1049.
- Bánki E, Degrell P, Kiss P, Kovács K, Kemény A, Csanaky K, Duh A, Nagy D, Tóth G, Tamás A, Reglődi D. Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides*. 2013;42:125-130.
- Bánki E, Hajna Z, Kemény A, Botz B, Nagy P, Bölcskei K, Tóth G, Reglődi D, Helyes Z. The selective PAC<sub>1</sub> receptor agonist maxadilan inhibits neurogenic vasodilation and edema formation in the mouse skin. *Neuropharmacology*. 2014; 85:538–47.
- Bánki E, Pakai E, Gaszner B, Zsiborás C, Czett A, Bhuddi PR, Hashimoto H, Tóth G, Tamás A, Reglődi D, Garami A. Characterization of the thermoregulatory response to

pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rodents. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2014b;54:543-554.

Belai A, Boulos PB, Robson T, Burnstock G. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut*. 1997;40:767-774.

Berswill S, Munoz M, Fischer A, Plickert R, Haag LM. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS One*. 2010;5:e15099.

Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews*. 2014;94: 329-354.

Bhattacharyya S, Dudeja PK, Tobacman JK. ROS, Hsp27, and IKKbeta mediate dextran sodium sulfate (DSS) activation of IkappaBa, NFkappaB, and IL-8. *Inflammatory Bowel Disease*. 2009;15:673-683.

Bitton A, Dobkin PL, Edwardes MD, Sewitch MJ, Meddings JB, Rawal S, Cohen A, Vermeire S, Dufresne L, Franchimont D, Wild GE. Predicting relapse in Crohn's disease: a biopsychosocial model. *Gut*. 2008;57:1386-1392.

Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nuñez G. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*. 2003;124:140-146.

Botia, B, Basilla M, Allais A, Raoult E, Falluel-Morel A, Galas L, Jolivel V, Wurtz O, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Burel D, Gonzalez BJ, Vaudry D. Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides*. 2007;28:1746-1752.

Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the Helicobacter pylori CagA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102:9300-9305.

Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, Mac-Donald TT. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology*. 1993;78:127-131.

Bukowski R, Wasowicz K. Expression of VPAC1 receptor at the level of mRNA and protein in the porcine female reproductive system. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2015;18:199-206.

Bulger EM, Helton WS. Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology Clinics of North America*. 1998;27:403-419.

Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *Journal of Nutrition*. 2000;130:2648-2652.

- Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunological Reviews*. 2005;206:277-295.
- Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2010;7:281-287.
- Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12:4807-4812.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127:412-421.
- Davis-Taber R, Baker S, Lehto SG, Zhong C, Surowy CS, Faltynek CR, Scott VE, Honore P. Central pituitary adenylate cyclase 1 receptors modulate nociceptive behaviors in both inflammatory and neuropathic pain states. *Journal of Pain*. 2008;9:449-456.
- Debbabi S, Groleau MC, Létourneau M, Narayanan C, Gosselin LL, Iddir M, Gagnon J, Doucet N, Déziel E, Chatenet D. Antibacterial properties of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: A new human antimicrobial peptide. *PloS One*. 2018;21:13:e0207366.
- Delgado M, Ganea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *Journal of Immunology*. 2001;167:966-975.
- Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma. *FASEB Journal*. 2003;17(13):1922-4.
- Delgado M, Jonakait GM, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia*. 2002;39:148-161.
- D'Elios MM, Bergman MP, Azzurri A, Amedei A, Benagiano M, De Pont JJ, Cianchi F, Vandembroucke-Grauls CM, Romagnani S, Appelmelk BJ, Del Prete G. H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (proton pump) is the target autoantigen of Th1-type cytotoxic T cells in autoimmune gastritis. *Gastroenterology*. 2001;120:377-386.
- Diane A, Payne W, Gray S. Multifaces of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP): From Neuroprotection and Energy Homeostasis to Respiratory and Cardiovascular Systems. *Journal of Metabolic Syndrome*. 2014;3:4.
- Dickinson T, Fleetwood-Walker SM. VIP and PACAP: very important in pain? *Trends in Pharmacological Sciences*. 1999;20:324-329.
- Dickson L, Finlayson K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacology and Therapeutics*. 2009;121:294-316.

- 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. *Regulatory Peptides*. 2002;109:83–88.
- Ekmekciu I, von Klitzing E, Fiebiger U, Escher U, Neumann C, Bacher P, Scheffold A, Köhl AA, Bereswill S, Heimesaat MM. Immune responses to broad-spectrum anti biotic treatment and fecal microbiota transplantation in mice. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8:397
- Elekes K, Sándor K, Móricz A, Kereskai L, Kemény A, Szőke E, Perkecz A, Reglődi D, Hashimoto H, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays an anti-inflammatory role in endotoxin-induced airway inflammation: in vivo study with gene-deleted mice. *Peptides*. 2011;32:1439–1446.
- Fábian, E, Reglődi D, Mester L, Szabó A, Szabadfi K, Tamás A, Tóth G, Kovács K. Effects of PACAP on intracellular signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2012;48:493–500.
- Falluel-Morel A, Aubert N, Vaudry D, Basille M, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry*. 2004;91(5):1231-43.
- Farkas J, Kovács LA, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Újvári B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D, Gaszner B. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience*. 2017a;354:11-29.
- Farkas J, Sándor B, Tamás A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, Fülöp BD, Juhász T, Manavalan S, Reglődi D. Early neurobehavioral development of mice lacking endogenous PACAP. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2017b;61:468-478.
- Farre R, Auli M, Lecea B, Martinez E, Clave P. Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;316:1238–1248.
- Farre R, Sifrim D. Regulation of basal tone, relaxation and contraction of the lower oesophageal sphincter. Relevance to drug discovery for oesophageal disorder. *British Journal of Pharmacology*. 2008; 153: 858–869.
- Ferencz A, Kiss P, Wéber Gy, Helyes Z, Shintani N, Baba A, Reglődi D. Comparison of intestinal warm ischemic injury in PACAP knockout and wild-type mice. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2010a;42:435–442.
- Ferencz A, Wéber Gy, Helyes Z, Hashimoto H, Baba A, Reglődi D. Presence of endogenous PACAP-38 ameliorated intestinal cold preservation tissue injury. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2010b;42:428–434.

Franceschi S, Panza E, La Vecchia C, Parazzini F, Decarli A, Bianchi Porro G. Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking. *American Journal of Epidemiology*. 1987;125:445-52.

Fujimiya M, Inui A. Peptidergic regulation of gastrointestinal motility in rodents. *Peptides*. 2000;21:1565–1582.

Fujimoto Y, Hayashi S, Azuma YT, Mukai K, Nishiyama K, Kita S, Morioka A, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T. Overexpression of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger 1 display enhanced relaxation in the gastric fundus. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2016;132:181-186.

Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113:1490-1497.

Gasz B, Rácz B, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides*. 2006;27:87–94.

Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Z. The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. 2012;202:283-99.

Geremia A, Jewell DP. The IL-23/IL-17 pathway in inflammatory bowel disease. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. 2012;6:223-237.

Girard BM, Tooke K, Vizzard MA. PACAP/receptor system in urinary bladder dysfunction and pelvic pain following urinary bladder inflammation or stress. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2017; 11:1–23.

Gonkowski S, Calka J. Changes in pituitary adenylate cyclase-activating peptide 27-like immunoreactive nervous structures in the porcine descending colon during selected pathological processes. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2012;48:777–87.

Gonkowski S, Rychlik A, Calka J. Pituitary adenylate cyclase activating peptide-27 – like immunoreactive nerve fibers in the mucosal layer of canine gastrointestinal tract in physiology and during inflammatory bowel disease. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2013;57:375-380.

Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. VIP: an agent with license to kill infective parasites. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1070:303-308.

Gottschall PE, Tatsuno I, Arimura A. Regulation of interleukin-6 (IL-6) secretion in primary cultured astrocytes: synergism of interleukin-1 (IL-1) and pituitary adenylate

- cyclase activating polypeptide (PACAP). *Brain Research*. 1994;637:197-203.
- Gray SL, Cummings KJ, Jirik FR, Sherwood NM. Targeted disruption of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene results in early postnatal death associated with dysfunction of lipid and carbohydrate metabolism. *Molecular Endocrinology*. 2001;15:1739–1747.
- Hagi K, Azuma YT, Nakajima H, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Takeuchi T. Involvements of PHI-nitric oxide and PACAP-BK channel in the sustained relaxation of mouse gastric fundus. *European Journal of Pharmacology*. 2008;590:80–86.
- Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, Eiden LE. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99:461–466.
- Han P, Liang W, Baxter LC, Yin J, Tang Z, Beach TG. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is reduced in Alzheimer disease. *Neurology*. 2014;82:1724-1728.
- Hannibal J, Georg B, Fahrenkrug J. Altered circadian food anticipatory activity rhythms in pacap receptor 1 (pac1) deficient mice. *PLoS One*. 2016;11:1469-1481.
- Hannibal J. Roles of PACAP-containing retinal ganglion cells in circadian timing. *International Review of Cytology*. 2006;251:1-39.
- Hannibal J, Ekblad E, Mulder H, Sundler F, Fahrenkrug J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract of the rat: distribution and effects of capsaicin or denervation. *Cell and Tissue Research*. 1998;291:65-79.
- Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology*. 2002;453:389-417.
- Hansen JM, Fahrenkrug J, Peterson J, Wienecke T, Olsen KS, Ashina M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the circulation after sumatriptan. *Scandinavian Journal of Pain*. 2013;4:211-216.
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 1994;56:559-564.
- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacological Reviews*. 1998;50:265-70.
- Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR, Vaudry D, Vaudry H, Waschek JA, Said SI. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal

peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. *British Journal of Pharmacology*. 2012;166:4–17.

Hashimoto H, Nogi H, Mori K, Ohishi H, Shigemoto R, Yamamoto K, Matsuda T, Mizuno N, Nagata S, Baba A. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology*. 1996;371:567-577.

Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98:13355–13360

Hashimoto H, Shintani N, Tanida M, Hayata A, Hashimoto R, Baba A. PACAP is implicated in the stress axes. *Current Pharmaceutical Design*. 2011;17:985–989.

Hassenzahl DL, Yorgen NK, Keedy MD, Price AR, Hall JA, Myzcka CC, Kuruvilla HG. Chemorepellent signaling through the PACAP/lysosome receptor is mediated through cAMP and PKC in *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Comparative Physiology*. 2001;187:171-176.

Heimesaat MM, Dunay IR, Schulze S, Fischer A, Grundmann U, Alutis M, Kühl AA, Tamás A, Tóth G, Dunay MP, Göbel UB, Reglődi D, Bereswill S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates experimental acute ileitis and extra-intestinal sequelae. *PLoS One*. 2014;9(9):e108389.

Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005; 129: 550-564.

Hirabayashi T, Nakamachi T, Shioda S. Discovery of PACAP and its receptors in the brain. *Journal of Headache and Pain*. 2018;19(1):28.

Horváth G, Brubel R, Kovács K, Reglődi D, Opper B, Ferencz A, Szakály P, László E, Hau L, Kiss P, Tamás A, Rácz B. Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2011;43:67–75.

Horváth G, Illés A, Heimesaat MM, Bárdosi A, Bárdosi S, Tamás A, Fülöp BD, Opper B, Németh J, Ferencz A, Reglődi D. 2016. Protective intestinal effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. In: Reglődi Dóra, Tamás Andrea (Eds.), *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP*, Springer Nature., New York, pp. 271–288.

Horváth G, Márk L, Brubel R, Szakály P, Rácz B, Kiss P, Tamás A, Helyes Z, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Fürjes G, Németh J, Reglődi D. Mice deficient in

pituitary adenylate cyclase activating polypeptide display increased sensitivity to renal oxidative stress in vitro. *Neuroscience Letters*. 2010a;469:70-74.

Horváth G, Rácz B, Szakály P, Kiss P, László E, Hau L, Tamás A, Helyes Z, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Reglődi D. Mice deficient in neuropeptide PACAP demonstrate increased sensitivity to in vitro kidney hypoxia. *Transplantation Proceedings*. 2010b;42:2293–2295.

Horváth G, Reglődi D, Brubel R, Halász M, Barakonyi A, Tamás A, Fábíán E, Opper B, Tóth G, Cohen M, Szereday L. Investigation of the possible functions of PACAP in human trophoblast cells. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2014;54:320–330.

Iborra M, Moret I, Rausell F, Bastida G, Aguas M, Cerrillo E, Nos P, Beltran B. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochemical Society Transactions*. 2011;39:1102–1106.

Ishiguchi T, Nishioka S, Takahashi T. Inhibitory neural pathway regulating gastric emptying in rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 2000;79:45–51.

Ishiguchi T, Takahashi T, Itoh H, Oxyang C. Nitrenergic and purinergic regulation of the rat pylorus. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000;279: G740–G747.

Ivic I, Fulop BD, Juhasz T, Reglodi D, Toth G, Hashimoto H, Tamas A, Koller A. Backup mechanism maintains PACAP/VIP-induced arterial relaxations in Pituitary adenylate cyclase-deficient mice. *Journal of Vascular Research*. 2017;54:180–92.

Ji H, Zhang Y, Shen XD, Gao F, Huang CY, Abad C, Busuttil RW, Waschek JA, Kupiec-Weglinski JW. Neuropeptide PACAP in mouse liver ischemia and reperfusion injury: immunomodulation by the cAMP-PKA pathway. *Hepatology*. 2013;57:1225–1237.

Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, Cha CI. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*. 2004;476:388-413.

Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*. 2011;60:631-637.

Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide plays a role in olfactory memory formation in chicken. *Peptides*. 2005;26:2344-2350.

Juhász T, Helgadottir SL, Tamás A, Reglődi D, Zákány R. PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides*. 2015;66:51-57.



Kaminska B, Landowski P, Gonkowski S, Majewski M, Renke J, Korzon M. Changes in the number of neuroprotective transmitter containing mucosal nerve fibres in children with ulcerative colitis. *Medycyna Wieku Rozwojowego*. 2006;10:483–491.

Kaminska B, Landowski P, Gonkowski S, Szlagatys-Sidorkiewitz A, Majewski M, Dobosz M, Ismail H, Korzon M. Analysis of enteral nervous system in children with drug resistant ulcerative colitis. *Medycyna Wieku Rozwojowego*. 2007;11:117–122.

Karban A, Okazaki T, Panhuysen C, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, Silverberg MS, Duerr RH, Cho JH, Gregersen PK, Wu Y, Achkar JP, Dassopoulos T, Mezey E, Bayless TM, Novet FJ, Brant SR. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk of ulcerative colitis. *Human Molecular Genetics*. 2004;13:35-45.

Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:307-317.

Klijn A, Mercenier A, Arigoni F: Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005;29:491–509.

Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2008;57:1682-1689.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophag-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 1992;258:1798-1801.

Konturek PC, Konturek SJ, Hahn EG. Duodenal alkaline secretion: its mechanisms and role in mucosal protection against gastric acid. *Digestive and Liver Disease*. 2004;36:505–12.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*. 2009;27:485-517.

Köves K, Arimura A, Görös TG, Somogyvári-Vigh A. Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology*. 1991;54(2):159–169.

Köves K, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Miller J. Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology*. 1990;127:264-271.

Köves K, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miller J. Immunohistochemical localization of PACAP in the ovine digestive system. *Peptides*. 1993;14:449–455.

Kun J, Szitter I, Kemény A, Perkecz A, Kereskai L, Pohóczky K, Vincze A, Gódi S, Szabó I, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z. Upregulation of the transient receptor potential

- ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles. *PLoS One*. 2014;9:e108164.
- Laburthe M, Couvineau A, Tan V. Class II G protein/coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides*. 2007;28:1631-1639.
- Lajkó A, Meggyes M, Fülöp BD, Gede N, Reglődi D, Szereday L. Comparative analysis of decidual and peripheral immune cells and immune-checkpoint molecules during pregnancy in wild-type and PACAP-deficient mice. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2018; 9:e13035.
- Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology*. 2003;125:47-57.
- Langille MG, Meehan CJ, Koenig JE, Dhanani AS, Rose RA, Howlett SE, Beiko RG. Microbial shifts in the aging mouse gut. *Microbiome*. 2014;2(1):50.
- Lash, R. H., Robert, G. Y. L., Odze, R. D. Genta inflammatory disorders of the stomach. In: Odze R. G. (ed.): Surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract and pancreas. Second ed. Saunders Elsevier, 2009.
- László E, Varga A, Kovács K, Jancsó G, Kiss P, Tamás A, Szakály P, Fülöp B, Reglődi D. Ischemia/reperfusion-induced kidney injury in heterozygous PACAP-deficient mice. *Transplantation Proceedings*. 2015;47:2210-2215.
- Le SV, Yamaguchi DJ, McArdle CA, Tachiki K, Pisegna JR, Germano P. PAC1 and PACAP expression, signaling, and effect on the growth of HCT8, human colonic tumor cells. *Regulatory Peptides*. 2002;109, 115–125.
- Lee EH, Seo SR. Neuroprotective roles of PACAP in neurodegenerative diseases. *BMB Reports*. 2014;47:369-375.
- Lee ELFM. Gastritis and gastropathies. In: Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. 9th Ed. Saunders, 2010
- Lelievre V, Meunier AC, Caigneaux E, Falcon J, Muller JM. Differential expression and function of PACAP and VIP receptors in four human colonic adenocarcinoma cell lines. *Cellular Signalling*. 1998;10:13–26.
- Lenti L, Domoki F, Kis D, Hegyi O, Tóth GK, Busija DW, Bari F. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces pial arteriolar vasodilation through cyclooxygenase-dependent and independent mechanisms in newborn pigs. *Brain Research*. 2007;1165:81-88.
- Leung PS, So SC, Lam SY, Tsang LL, Chung YW, Chan HC. Local regulation of anion secretion by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in human colonic T84 cells. *Cell Biology International*. 2001;25:123–129.

- Li M, Balamuthusamy S, Khan AM, Maderdrut JL, Simon EE, Batuman V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents cisplatin-induced renal failure. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2011;43:58–66.
- Li M, Maderdrut JL, Lertora JJ, Arimura A, Batuman V. Renoprotection by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in multiple myeloma and other kidney diseases. *Regulatory Peptides*. 2008;145:24–32.
- Li P, Chang TM, Coy D, Chey WY. Inhibition of gastric acid secretion in rat stomach by PACAP is mediated by secretin, somatostatin, and PGE<sub>2</sub>. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000;278: G121–G127.
- Lindberg E, Jarnerot G, Huitfeldt B. Smoking in Crohn's disease: effect on localisation and clinical course. *Gut*. 1992;33:779-82.
- Lindstrom E, Eliasson L, Bjorkqvist M, Hakanson R. Gastrin and the neuropeptide PACAP evoke secretion from rat stomach histamine-containing (ECL) cells by stimulating influx of Ca<sup>2+</sup> through different Ca<sup>2+</sup> channels. *Journal of Physiology*. 2001;535:663–77.
- Liu N, Zhang Y, Xiong JY, Liu S, Zhu J, Lv S. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects adrenal function in septic rats administered etomidate. *Neuropeptides*. 2016;58:53-59.
- Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126:1504-1517.
- Loh G, Blaut M. Role of commensal gut bacteria in inflammatory bowel diseases. *Gut Microbes*. 2012;3:544-555.
- Lu H, Huang H. FOXO1: a potential target for human diseases. *Current Drug Targets*. 2011;12, 1235–1244.
- Lu Y, Germano P, Ohning GV, Vu JP, Pisegna JR. PAC1 deficiency in a murine model induces gastric mucosa hypertrophy and higher basal gastric acid output. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2011;43:76–84.
- Ma Y, Fang S, Zhao S, Wang X, Wang D, Ma M, Luo T, Hong a. A recombinant slow-release PACAP-derived peptide alleviates diabetes by promoting both insulin secretion and actions. *Biomaterials*. 2015;51:80-90.
- Mabuchi T, Shintani N, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Hashimoto H, Muratani T, Minami T, Baba A, Ito S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is required for the development of spinal sensitization and induction of neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience*. 2004;24:7283–7291.
- Mace SR, Dean JG, Murphy JR, Rhodes JL, Kuruvilla HG. PACAP-38 is a chemorepellent and an agonist for the lysozyme receptor in tetrahymena thermophila. *Journal of Comparative Physiology A*. 2000;186:39-43.

- Marks DJ, Harbord MW, MacAllister R, Rahman FZ, Young J, Al-Lazikani B, Lees W, Novelli M, Bloom S, Segal AW. Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet*. 2006;367:668-678.
- Martinez C, Antolin M, Santos J, Torrejon A, Casellas F, Borruel N, Guarner F, Malagelada JR. Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *American Journal of Gastroenterology*. 2008;103:643-648.
- Matsuyama S, Matsumoto A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A. Impaired long-term potentiation in vivo in the dentate gyrus of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) or PACAP type I receptor-mutant mice. *Neuroreport*. 2003;14:2095-2098.
- May V, Lutz E, MacKenzie C, Braas K. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PAC1HOP1 receptor activation coordinates multiple neurotrophic signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285:9749-61.
- Mei Q, Sundler F. Changes in pituitary adenylate cyclase activating peptide and vasoactive intestinal peptide innervation of rat oxyntic mucosa during ulcer healing. *Neuropeptides*. 1998;32:527-35.
- Meyer, D. K. The effects of PACAP on neural cell proliferation. *Regulatory peptides*. 2006;137:50-57.
- Mihály E, Micsik T, Juhász M, Herszényi L, Tulassay Zs. Gastritis and gastropathy. *Orvosi Hetilap*. 2014;155:43-61.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;164:567-574.
- Moller MB. P27 in cell cycle control and cancer. *Leukemia & lymphoma*. 2000;39:19-27.
- Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A, Endo K, Iso Y, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S. Cardioprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on Doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Circulation Journal*. 2010;74:1183-1190.
- Mustafa T, Eiden LE. Secretin superfamily: PACAP, VIP, and Related Peptides. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Ed: Lajtha A. Springer. 2008; pp: 463-500.
- Müller A. Multistep activation of the Helicobacter pylori effector CagA. *Journal of Clinical Investigation*. 2012;122: 1192-1195.
- Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Mori H, Sato A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A Shioda S. Endogenous pituitary adenylate cyclase activating

polypeptide is involved in suppression of edema in the ischemic brain. *Acta Neurochirurgica Supplements*. 2010;106:43–46.

Nakamura Y, Labarthe DR. A case-control study of ulcerative colitis with relation to smoking habit and alcohol consumption in Japan. *American Journal of Epidemiology*. 1994;140:902-911.

Nakata M, Shintani N, Hashimoto H, Baba A. Intra-islet PACAP protects pancreatic beta-cells against glucotoxicity and lipotoxicity. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2010;42:404–410.

Nandha KA, Benito-Orfila MA, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR. Action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on the rat vascular system: effects on blood pressure and receptor binding. *Journal of Endocrinology*. 1991;129:69-73.

Naruse S, Nakamura T, Wei M, Ando E, Nokihara K, Wray V, Ozaki T, Kitagawa M, Hayakawa T. Effects of PACAP-VIP hybrid peptides on gastric blood flow in conscious dogs. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996; 805: 511-515N.

Nedvig K, Szabó G, Csukás D, Sándor J, Németh J, Kovács K, Reglődi D, Kemény A, Wéber G, Ferencz A. Examination of cytoprotective and anti-inflammatory effect of PACAP-38 on small bowel autotransplantation. *Magyar Sebészet*. 2013;66:250-255.

Nemetz N, Abad C, Lawson G, Nobuta H, Chhith S, Duong L, Tse G, Braun J, Waschek JA. Induction of colitis and rapid development of colorectal tumors in mice deficient in the neuropeptide PACAP. *International Journal of Cancer*. 2008;122:1803–1809.

Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJ, Tytgat GN. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1994;29:425–429.

Ny L, Larsson B, Alm P, Ekström P, Fahrenkrug J, Hannibal J, Andersson KE. Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase activating peptide in cat and human lower oesophageal sphincter. *Andersson British Journal of Pharmacology*. 1995;116:2873-2880.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411: 603-606.

Oh DS, Lieu SN, Yamaguchi DJ, Tachiki K, Lambrecht N, Ohning GV, Sachs G, Germano PM, Pisegna JR. PACAP regulation of secretion and proliferation of pure populations of gastric ECL cells. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2005;26:85–97.

Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A, Shioda S. Pituitary

adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103:7488–7493.

Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H, Ohara K, Miyamoto K, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Matsunaga M, Shioda S. Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2010;42:397–403.

Okada R, Yamamoto K, Ito Y, Mochida H, Tonon MC, Fournier A, Leprince J, Vaudry H, Kikuyama S. VIP and PACAP stimulate TSH release from the bull frog pituitary. *Peptides*. 2007;28:1784-1789.

Okuda S, Honda M, Ito Y, Aihara E, Kato S, Mitsufuji S, Yoshikawa T, Takeuchi K. Phosphodiesterase isozymes involved in regulating acid secretion in the isolated mouse stomach. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009;60(Suppl 7):183–90.

Onoue S, Hanato J, Yamada S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide attenuates streptozotocin-induced apoptotic death of RIN-m5F cells through regulation of Bcl-2 family protein mRNA expression. *FEBS Journal*. 2008;275:5542–5551.

Oride A, Kanasaki H, Kyo S. Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in modulating hypothalamic-pituitary system. *Reproductive Medicine and Biology*. 2018;17:234-241.

Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, Timmis KN, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004;53:685-693.

Padua D, Vu JP, Germano PM, Pisegna JR. The Role of Neuropeptides in Mouse Models of Colitis. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2016;59:203-210.

Palkovits M, Somogyvári-Vigh A, Arimura A. Concentrations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human brain nuclei. *Brain Research*. 1995;699:116-120.

Pirone A, Baoan D, Piano I, Della Santina L, Baglini A, Lenzi C. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunoreactivity distribution in the small intestine of the adult New Hampshire chicken. *Acta Histochemica*. 2011;113: 477–483.

Pokusaeva K, Johnson C, Luk B, Uribe G, Fu Y, Oezguen N, Matsunami RK, Lugo M, Major A, Mori-Akiyama Y, Hollister EB, Dann SM, Shi XZ, Engler DA, Savidge T, Versalovic J. GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterology and Motility*. 2017;29(1): e12904.

Prabhu V, Shivani A. An Overview of History, Pathogenesis and Treatment of Perforated Peptic Ulcer Disease with Evaluation of Prognostic Scoring in Adults. *Annals of Medical and Health Science Research*. 2014;4:22-29.

Rácz, B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Kiss P, Róth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglódi D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *General and comparative endocrinology*. 2007;153:115–123.

Rácz B, Gasz B, Gallyas F, Kiss P, Tamás A, Szántó Z, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Róth E, Reglódi D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regulatory Peptides*. 2008;145:105–115.

Reglódi D, Cseh S, Somoskői B, Fülöp BD, Szentleky E, Szegeczki V, Kovács A, Varga A, Kiss P, Hashimoto H, Tamás A, Bárdosi A, Manavalan S, Bakó E, Zákány R, Juhász T. Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient mice. *Reproduction*. 2018a;155:129-139.

Reglódi D, Jungling A, Longuespée R, Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann M, Juhász T, Bárdosi S, Tamás A, Fülöp BD, Kovács K, Nagy Z, Sparks J, Miseta A, Mazzucchelli G, Hashimoto H, Bárdosi A. Accelerated pre-senile systemic amyloidosis in PACAP knockout mice - a protective role of PACAP in age-related degenerative processes. *Journal of Pathology*. 2018b;245:478-490.

Reglódi D, Gyarmati J, Ertl T, Börzsei R, Bódis J, Tamás A. Alterations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2010;33:443-445.

Reglódi D, Illés A, Opper B, Schäfer E, Tamás A, Horváth G. Presence and effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide under physiological and pathological conditions in the stomach. *Frontiers of Endocrinology*. 2018c;9:90.

Reglódi D, Kiss P, Horváth G, Lubics A, László E, Tamás A, Rácz B, Szakály P. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the urinary system, with special emphasis on its protective effects in the kidney. *Neuropeptides*. 2012a;46:61–70.

Reglódi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gábrriel R, Horváth G, Szakály P, Sándor B, Lubics A, László E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze Á, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamás A. PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2012b;48:482-492.

Reglódi D, Tamás A, Koppán M, Szőgyi D, Welke L. Role of PACAP in Female Fertility and Reproduction at Gonadal Level - Recent Advances. *Frontiers of Endocrinology (Lausanne)*. 2012c;3:155.

Reglódi D, Tamás A, Somogyvári-Vigh A, Szántó Z, Kertes E, Lénárd L, Arimura A, Lengvári L. Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides*. 2002;23:2227–2234.

- Reichenstein M, Rehavi M, Pinhasov A. Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the mechanism of antidepressant action. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2008; 36:330-338.
- Reisz J A, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdui CM. Effects of ionizing radiation on biological molecules-mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;21:260–292.
- Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhardt AH, Rotter JI, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature Genetics*. 2007;39:596-604.
- Robberecht P, De Neef P, Lefebvre RA. Influence of selective VIP receptor agonists in the rat gastric fundus. *European Journal of Pharmacology*. 1998;359:77–80.
- Sakurai Y, Shintani N, Hayata A, Hashimoto H, Baba A. Trophic effects of PACAP on pancreatic islets: a mini-review. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2011a;43:3–7.
- Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Disease*. 2011;17:362-381.
- Sándor B, Fintor K, Reglódi D, Fülöp BD, Helyes Z, Szántó I, Nagy P, Hashimoto H, Tamás A. Structural and Morphometric Comparison of Lower Incisors in PACAP-Deficient and Wild-Type Mice. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2016;59:300-308.
- Sarra M, Monteleone I, Stolfi C, Fantini MC, Sileri P, Sica G, Tersigni R, Macdonald TT, Pallone F, Monteleone G. Interferon-gamma-expressing cells are a major source of interleukin-21 in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Disease*. 2010;16:1332-1339.
- Sartor RB. Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut*. 2005;54:896-898.
- Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*. 2004;126:1620-1633.
- Sawant K, Poluri KM, Dutta AK, Sepuru KM, Troshkina A, Garofalo R, Rajarathnam K. Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interaction. *Scientific Reports*. 2016;6:33123.
- Schulz S, Rocken C, Mawrin C, Weise W, Hollt V, Schulz S. Immunocytochemical identification of VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptors in normal and neoplastic human tissues with subtype-specific antibodies. *Clinical Cancer Research*. 2004;10:8235-8242.



Scott KP, Antoine JM, Midtvedt T, van Hemert S. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2015;26:25877.

Seiglie MP, Smith KL, Blasio A, Cottone P, Sabino V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces a depressive-like phenotype in rats. *Psychopharmacology*. 2015;232:3821-3831.

Shen Z, Larsson LT, Malmfors G, Absood A, Håkanson R, Sundler F. A novel neuropeptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), in human intestine: evidence for reduced content in Hirschsprung's disease. *Cell and Tissue Research*. 1992;269:369-74.

Shintani N, Mori W, Hashimoto H, Imai M, Tanaka K, Tomimoto S, Hirose M, Kawaguchi C, Baba A. Defects in reproductive functions in PACAP-deficient female mice. *Regulatory Peptides*. 2002;109:45-48.

Shioda S, Nakamachi T. PACAP as a neuroprotective factor in ischemic neuronal injuries. *Peptides*. 2015, 72:202-207.

Silverstein MD, Lshner BA, Hanauer SB. Cigarette smoking and ulcerative colitis: a case-control study. *Mayo Clinic Proceedings*. 1994;69:425-9.

Simpson J, Sundler F, Humes DJ, Jenkins D, Scholefield JH, Spiller RC. Post inflammatory damage to the enteric nervous system in diverticular disease and its relationship to symptoms. *Neurogastroenterology and Motility*. 2009;21:847-e58.

Smyth MJ, Zachariae CO, Norihisa Y, Ortaldo JR, Hishinuma A, Matsushima K. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. *Journal of Immunology*. 1991;146:3815-3823.

Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Current Pharmaceutical Design*. 2004;10:2861-89.

Starr CG, Maderdrut JL, He J, Coy DH, Wimley WC. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent broad-spectrum antimicrobial peptide: structure-activity relationships. *Peptides*. 2018;104:35-40.

Starr ER, Margiotta JF. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide induces long-term, transcription-dependent plasticity and remodeling at autonomic synapses. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2017;85:170-182.

Steinhoff M, McGregor GP, Radleff-Schlimme A, Steinhoff A, Jarry H, Schmidt WE. Identification of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP and PACAP type 1 receptor in human skin: expression of PACAP38 is increased in patients with psoriasis. *Regulatory Peptides*. 1999;80:49-55.

Sundler F, Ekblad E, Absood A, Håkanson R, Köves K, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating peptide: a novel vasoactive intestinal peptide-like neuropeptide in the gut. *Neuroscience*. 1992; 46:439-454.

Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43:3380-3389.

Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Dányádi B, Tamás A, Helyes Z, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Tóth G, Gábrriel R, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotoxicity Research*. 2012;21:41–48.

Szabó A, Dányádi B, Bognár E, Szabadfi K, Fábrián E, Kiss P, Mester L, Manavalan S, Atlasz T, Gábrriel R, Tóth G, Tamás A, Reglődi D, Kovács K. Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neuroscience Letters*. 2012;523:93-98.

Szakály P, Kiss P, Lubics A, Magyarlaki T, Tamás A, Rác B, Lengvári I, Tóth G, Reglődi D. Effects of PACAP on survival and renal morphology in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2008;36:89–96.

Szakály P, László E, Kovács K, Rác B, Horváth G, Ferencz A, Lubics A, Kiss P, Tamás A, Brubel R, Opper B, Baba A, Hashimoto H, Farkas J, Matkovits A, Magyarlaki T, Helyes Z, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides*. 2011;45:113–121.

Szántó Z, Sárszegi Z, Reglődi D, Németh J, Szabadfi K, Kiss P, Varga A, Bánki E, Csánaky K, Gaszner B, Pintér O, Szalai Z, Tamás A. PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2012;48:667–73.

Tajti J, Tuka B, Botz B, Helyes Z, Vécsei L. Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in nociception and migraine CNS. *Neurological Disorders- Drug Targets*. 2015;14:540–553.

Takatori H, Kanno Y, Watford WT, Tato CM, Weiss G, Ivanov II, Littman DR, O’Shea JJ. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *Journal of Experimental Medicine*. 2009; 206:35-41.

Tamás A, Jávornházy A, Reglődi D, Sarlós DP, Bányai D, Semjén D, Németh J, Lelesz B, Fülöp DB, Szántó Z. Examination of PACAP-Like Immunoreactivity in Urogenital Tumor Samples. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2016;59:177-83.

Tamás A, Reglődi D, Szántó Z, Borsiczky B, Németh J, Lengvári I. Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neuroendocrinology Letters*. 2002;23:249–254.

Tan YV, Abad C, Lopez R, Dong H, Liu S, Lee A, Gomariz RP, Leceta J, Washek JA. Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106:2012–2017.

Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunological Reviews*. 2005;206: 296-305.

Tiszlavicz L. Gyulladásos bélbetegségek. Patológia. In: Lonovics J, Nemesánszky E, Simon L, Tulassay Zs, Wittmann T. Varró Gasztroenterológia. Medicina könyvkiadó. 2011;396-398.

Tojo R, Suarez A, Clemente MG, de los Reyes-Gavilan CG, Margolles A, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. Intestinal microbiota in health and disease:role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20:15163–15176.

Tokuda N, Arudchelvan Y, Sawada T, Adachi Y, Fukumoto T, Yasuda M, Sumida H, Shioda S, Fukuda T, Arima A, Kubota S. PACAP receptor (PAC1-R) expression in rat and rhesus monkey Thymus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1070:581–585.

Tornøe K, Hannibal J, Georg B, Schmidt PT, Hilsted L, Fahrenkrug J, Holst JJ. PACAP 1-38 as neurotransmitter in the porcine antrum. *Regulatory Peptides*. 2001;101:109–21.

Tostain J, Li G, Gentil-Perret A, Gigante M. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment. *European Journal of Cancer*. 2010;46, 3141–3148.

Vámos Z, Ivic I, Cséplő P, Tóth G, Tamás A, Reglődi D, Koller A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induces relaxations of peripheral and cerebral arteries, which are differentially impaired by aging. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2014;54:535–42.

Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuning I, Renes IB, Einerhand AW. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*. 2006;131:117-129.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological Reviews*. 2009;61:283-357.

Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacological Reviews*. 2000a;52:269-324.

- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, 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. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2000b;97:13390-13395.
- Vaudry D, Hamelink C, Damadzic R, Eskay RL, Gonzalez B, Eiden LE. Endogenous PACAP acts as a stress response peptide to protect cerebellar neurons from ethanol or oxidative insult. *Peptides*. 2005;26:2518–2524.
- Vincze E, Köves K. A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerkezete, előfordulása és szerepe az élettani működésekben. *Orvosi Hetilap*. 2001;142:491-496.
- Vu JP, Benhammou JN, Goyal D, Luong L, Oh S, Germano P. PACAP regulation of gastrointestinal function and obesity. In: Reglodi D, Tamas A editors. *Current Topics of Neurotoxicity 11 Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide-PACAP*. Switzerland: Springer International Publishing AG 2016.p. 261–270.
- Wallace JL, Vong L. NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2008;9:1151–1156.
- Wang HY, Jiang X, Gozes I, Fridkin M, Brenneman DE, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide inhibits cytokine production in T lymphocytes through cAMP-dependent and cAMP-independent mechanisms. *Regulatory Peptides*. 1999;84:55-67.
- Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature Immunology*. 2004;5:800-808.
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Disease*. 2003;9:215-223.
- Winzell MS, Ahrén B. Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides*. 2007;28:1805-13.
- Wojtkiewicz J, Rowniak M, Gonkowski S, Crayton R, Majewski M, Robak A, Bialkowska J, Barczewska M. Proliferative enteropathy (PE)-induced changes in the calbindin-immunoreactive (CB-IR) neurons of inferior mesenteric ganglion supplying the descending colon in the pig. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2012;48:757–65.
- Wu MJ, Kee KH, Na J, Kim SW, Bae Y, Shin DH, Choi S, Jun JY, Jeong HS, Park JS. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits pacemaker activity of colonic interstitial cells of Cajal. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2015;19:435–40.
- Yagi K, Takehara K, Kitamura M, Takeuchi K. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-27 on alkaline secretory and mucosal ulcerogenic responses in rat duodenum. *Life Science*. 1998;63:317–325.

- Yan Y, Zhou X, Pan Z, Ma J, Waschek JA, DiCicco-Bloom E. Pro-and anti-mitogenic actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in developing cerebral cortex: potential mediation by developmental switch of PAC1 receptor mRNA isoforms. *The Journal of Neuroscience*. 2013;33:3865-3878.
- Yokai M, Kurihara T, Miyata A. Spinal astrocytic activation contributes to both induction and maintenance of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor-induced long-lasting mechanical allodynia in mice. *Molecular Pain*. 2016;12:1-13.
- Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:15911-15916.
- Zeng N, Athmann C, Kang T, Lyu RM, Walsh JH, Ohning GV, Sachs G, Pisegna JR. PACAP type I receptor activation regulates ECL cells and gastric acid secretion. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;104:1383-1391.
- Zhang XY, Hayasaka S, Chi ZL, Cui HS, Hayasaka Y. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on IL-6, IL-8, and MCP-1 expression in human retinal pigment epithelial cell line. *Current Eye Research*. 2005;30:1105-1111.
- Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20: 91-99.
- Zhang,ZH, Wu SD, Gao H, Shi G, Jin JZ, Kong J, Zhong T, Yang S. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 1 and 2 receptor mRNA in gallbladder tissue of patients with gallstone or gallbladder polyps. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12:1468-1471.
- Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology*. 2007;8:967-974.

## **VIII. Köszönetnyilvánítás**

Tisztelettel köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Dr. Reglódi Dóra professzor asszonynak és Dr. Horváth Gabriella docensnek a rengeteg segítségért, amit a tudományos munkám során nyújtottak nekem és ezáltal lehetővé tették a dolgozatom létrejöttét. Külön köszönet illeti Mercz Tünde asszisztensnőt a laboratóriumban elvégzett sok-sok munkáért, támogatásért és biztatásért. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Kerényi Mónika és Dr. Boronkai Árpád docenseknek, valamint Markus Heimesaat Profesz-szor Úrnak, akik segítségükkel hozzájárultak a dolgozatom elkészültéhez. Szeretnék köszönetet mondani a PTE I. Belgyógyászati Klinika Gasztroenterológiai Tanszék munkatársainak a szövettani minták gyűjtésében való segítségükért.

Végül köszönet illeti az Anatómiai Intézet valamennyi munkatársát, akik tudományos munkámat segítették, lehetővé tették.

GINOP-2.3.2-15- 477 2016-00050 “PEPSYS”

### **PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények:**

**Illés A**, Opper B, Reglődi D, Kerényi M, Czétány P, Boronkai Á, Schäfer E, Tóth G, Fábíán E, Horváth G. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on small intestinal INT407 cells. *Neuropeptides*. 2017; 65:106-113. (IF: 2,915)

**Illés A**, Horváth G, Schäfer E, Kerényi M, Opper B, Tóth G, Reglődi D. Effect of PACAP on bacterial adherence and cytokine expression in intestinal cell cultures. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2018; DOI: 10.1007/s10989-018-9748-z. (IF: 1,132)

Reglődi D, **Illés A**, Opper B, Schäfer E, Tamás A, Horváth G. Presence and effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide under physiological and pathological conditions in the stomach. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2018;19:9:90.(IF: 3,519)

Heimesaat MM, Reifemberger G, Vicena V, **Illés A**, Horváth G, Tamás A, Fülöp BD, Bereswill S, Reglődi D. Intestinal microbiota changes in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)- Bifidobacteria make the difference. *European Journal of Microbiology and Immunology*. (Bp). 2017;11;7:187-199.

Horváth G, **Illés A**, Heimesaat MM, Bárdosi A, Bárdosi S, Tamás A, Fülöp BD, Opper B, Németh J, Ferencz A, Reglődi D. 2016. Protective intestinal effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. In: Reglődi Dóra, Tamás Andrea (Eds.), *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP*, Springer Nature., New York, pp. 271–288.

### **Egyéb, a dolgozat témájához nem kapcsolódó közlemények:**

Balázs A, Ruffert C, Hegyi E, Hritz I, Czakó L, Takács T, Szepes Z, Németh BC, Gervain J, Izbéki F, Halász A, Kelemen D, Szmola R, Novák J, Crai S, **Illés A**, Vincze Á, Molnár Z, Varga M, Bod B, Farkas G Jr, Sümegi J, Szepes A, Dubravcsik Z, Lásztity N, Párniczky A, Hamvas J, Andorka C, Veres G, Szentkereszty Z, Rakonczay Z Jr, Maléth J, Sahin-Tóth M, Rosendahl J, Hegyi P, ; Hungarian Pancreatic Study Group.

Genetic analysis of the bicarbonate secreting anion exchanger SLC26A6 in chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2015;15:508-513. ( IF: 2,406)

Horváth G, Opper B, Czétány P, **Illés A**, Tóth G, László E, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human proximal tubule cells against gentamicin toxicity. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2017; doi.org/10.1007/s10989-017-9666-5. (IF 2017: 1,132)

**Illés A**, Farkas N, Hegyi P, Garami A, Szabó I, Solymár M, Pétervári E, Balaskó M, Pár G, Sarlós P, Bajor J, Szűcs Á, Czimmer J, Szemes K, Vincze Á. Is Heller myotomy better than balloon dilation? A meta-analysis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*. 2017;26:121-127. (IF: 1,964)

**Illés A.**, Király Á. A székrekedés okának felderítése és a terápiás lehetőségei. *Magyar Radiológia*. 2007; 81:24-30.

**Illés A.**, Vincze Á., Solt J. A cardia pneumatikus tágításának hatékonysága achalasiában *Magyar Belorvosi Archivum*. 2012;65:45-49.

Kalmár K, Baracs J, **Illés A**, Czimmer J, Weninger C, Horváth OP. Functional proctology at the University of Pécs. *Magyar Sebészet*. 2012;65:370-379.

Király Á, Czimmer J, **Illés A**, Mózsik Gy, Sütő G. Otilonium bromide enhances sensory thresholds of volume and pressure in patients with irritable bowel syndrome *Digestive Diseases and Sciences*. 2003;48:1872.

Király Á, Csizmadia Cs, **Illés A**, Undi S. Investigation of visceral hyperesthesia in irritable bowel syndrome. *Orvosi Hetilap*. 2006;147:23-28.

Király Á., **Illés A.**, Undi S., Varga G., Kalmár K., Horváth Ö.P. Gastroesophageal reflux disease progressing to achalasia. *Diseases of the Esophagus*. 2005;18:355-358.

Márta K, Farkas N, Szabó I, **Illés A**, Vincze Á, Pár G, Sarlós P, Bajor J, Szűcs Á, Czimmer J, Mosztbacher D, Párniczky A, Szemes K, Pécsi D, Hegyi P. Meta-analysis of early nutrition: the benefits of enteral feeding compared to a nil per os diet not only in severe, but also in mild and moderate acute pancreatitis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;20;17. (IF: 3,226)

Mikó A, Pótó L, Mátrai P, Hegyi P, Füredi N, Garami A, **Illés A**, Solymár M, Vincze Á, Balaskó M, Pár G, Sarlós P, Bajor J, Tenk J, Rostás I, Pétervári E. Gender difference in the effects of interleukin-6 on grip strength-a systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatrics*. 2018;18:107. (IF: 2,866)

Pár G, Trosits A, Pakodi F, Szabó I, Czimmer J, **Illés A**, Gódi S, Bajor J, Sarlós P, Kenyeres P, Miseta A, Vincze A, Pár A. Transient elastography as a predictor of oesophageal varices in patients with liver cirrhosis. *Orvosi Hetilap*. 2014;155:270-276.

Párniczky A, Kui B, Szentesi A, Balázs A, Szűcs Á, Mosztbacher D, Czimmer J, Sarlós P, Bajor J, Gódi S, Vincze Á, **Illés A**, Szabó I, Pár G, Takács T, Czákó L, Szepes Z, Rakonczay Z, Izbéki F, Gervain J, Halász A, Novák J, Crai S, Hritz I, Góg C, Sümegi J, Golovics P, Varga M, Bod B, Hamvas J, Varga-Müller M, Papp Z, Sahin-Tóth M, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Prospective, multicentre, nationwide clinical data from 600 cases of acute pancreatitis. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165309. (IF: 2,806)



Pécsi D, Farkas N, Hegyi P, Balaskó M, Czimmer J, Garami A, **Illés A**, Mosztbacher D, Pár G, Párniczky A, Sarlós P, Szabó I, Szemes K, Szűcs Á, Vincze Á. Transpancreatic sphincterotomy has a higher cannulation success rate than needle-knife precut papillotomy—a meta-analysis. *Endoscopy*. 2017;49:874-887. (IF: 6,629)

Rostás I, Pótó L, Mátrai P, Hegyi P, Tenk J, Garami A, **Illés A**, Solymár M, Pétervári E, Szűcs Á, Párniczky A, Pécsi D, Rumbus Z, Zsiborás C, Füredi N, Balaskó M. In middle-aged and old obese patients, training intervention reduces leptin level: A meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182801. (IF: 2,766)

Rumbus Z, Matics R, Hegyi P, Zsiborás C, Szabó I, **Illés A**, Pétervári E, Balaskó M, Márta K, Mikó A, Párniczky A, Tenk J, Rostás I, Solymár M, Garami A. Fever is associated with reduced hypothermia with increased mortality in septic patients: A meta-analysis of clinical trials. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170152. (IF: 2,766)

Sarlós P, Szemes K, Hegyi P, Garami A, Szabó I, **Illés A**, Solymár M, Pétervári E, Vincze Á, Pár G, Bajor J, Czimmer J, Huszár O, Varjú P, Farkas N. Steroid but not biological therapy elevates the risk of venous thromboembolic events in inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2018;12:489-498. (IF: 6,637)

Szabó IL, Matics R, Hegyi P, Garami A, **Illés A**, Sarlós P, Bajor J, Szűcs A, Mosztbacher D, Márta K, Szemes K, Csekő K, Kövári B, Rumbus Z, Vincze Á. PPIs Prevent Aspirin-Induced Gastrointestinal Bleeding Better than H2RAs. A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*. 2017;26:395-402. (IF:1,1964)

Szűcs Á, Marjai T, Szentesi A, Farkas N, Párniczky A, Nagy G, Kui B, Takács T, Czakó L, Szepes Z, Németh BC, Vincze Á, Pár G, Szabó I, Sarlós P, **Illés A**, Gódi S, Izbéki F, Gervain J, Halász A, Farkas G, Leindler L, Kelemen D, Papp R, Szmola R, Varga M, Hamvas J, Novák J, Bod B, Sahin-Tóth M, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Chronic pancreatitis: multicentre prospective data collection and analysis by the Hungarian Pancreatic Study Group. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171420. (IF: 2,766)

Varjú P, Farkas N, Hegyi P, Garami A, Szabó I, **Illés A**, Solymár M, Vincze Á, Balaskó M, Pár G, Bajor J, Szűcs Á, Huszár O, Pécsi D, Czimmer J. Low fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols (FODMAP) diet improves symptoms in adults suffering from irritable bowel syndrome (IBS) compared to standard IBS diet: A meta-analysis of clinical studies. *PLoS One*. 2017 Aug 14;12(8):e0182942. (IF: 2,766)



