

**A PACAP előfordulása a reproduktív rendszerben és  
hatásai trophoblast sejtek túlélésére és jelátviteli  
útvonalaira**

**PhD. értekezés**

**Dr. Brubel Réka**  
**PTE ÁOK Anatómiai Intézet**

**Témavezetők: Dr. Reglódi Dóra**  
**egyetemi docens**

**Dr. Lubics Andrea**  
**egyetemi adjunktus**

**Programvezető: Dr. Csernus Valér**  
**egyetemi tanár**

# **Tartalomjegyzék**

<b>Rövidítések</b> .....	4.
<b>Bevezetés</b> .....	5.
Hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP).....	5.
A PACAP előfordulása a szervezetben .....	6.
A PACAP-receptorok.....	7.
A PACAP élettani hatásai .....	8.
A PACAP gonadális funkciókra kifejtett hatásai .....	9.
A PACAP protektív hatásának mechanizmusai .....	10.
Choriocarcinoma .....	12.
<b>Célkitűzések</b> .....	13.
<b>Anyagok és módszerek</b> .....	14
A PACAP előfordulása a placentában .....	14.
RIA módszer leírása röviden.....	15.
Tömegspektrometriai vizsgálatok .....	17.
Sejtkultúra .....	19.
Sejtek életképességének vizsgálata .....	20.
Inváziós készség és proliferáció vizsgálata .....	23.
Western blot analízis .....	23.
Apoptózis és nekrozis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel.....	25.
Statisztika .....	27.
<b>Eredmények</b> .....	28.
A PACAP előfordulása a placentában .....	28.
Tömegspektrometriai vizsgálatok .....	30.
PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek túlélésére .....	34.
PACAP hatásai extravillosus cytotrophoblast sejtek túlélésére .....	36.
Inváziós készség és proliferáció vizsgálata .....	37.
PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek jelátviteli útvonalaira.....	38.

Apoptózis és nekrozis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel JAR sejteknél .... 44.  
Apoptózis és nekrozis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel HIPEC sejteknél 46.

<b>Megbeszélés</b> .....	48.
A PACAP előfordulása a placentában .....	48.
A PACAP előfordulása a reproduktív rendszer egyéb részeiben.....	48.
PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek túlélésére és jelátviteli útvonalaira.....	49.
PACAP hatásai extravillosus cytotrophoblast (HIPEC) sejtekre .....	51.
A PACAP általános sejtvédő hatásától eltérő hatásai egyes sejtekben .....	51.
PACAP által aktivált jelátviteli útvonalak .....	53.
<b>Új eredmények összefoglalása</b> .....	55.
<b>Irodalomjegyzék</b> .....	56.
<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	69.

## ***Rövidítések***

AIF	=	apoptosis indukáló faktor
Akt	=	protein-serine-threonine kináz B
Bcl-2	=	follikuláris B sejt lymphomában aktiválódó protoonkogén
CRE	=	cAMP-reszponzív elem
CREB	=	CRE-kötő protein
ERK1/2	=	extracelluláris szignál által regulált kináz
HBSS	=	Hank's balanced salt solution
JAR	=	choriocarcinomás cytotrophoblast sejtvonal
JNK	=	Jun N-terminális kináz
LPS	=	lipopoliszacharid
MTX	=	methotrexate
p38 MAPK	=	p38 mitogén-aktivált proteinkináz
PKA	=	protein kináz A
PKC	=	protein kináz C terméke
VIP	=	vazoaktív intesztinális polipeptid
HIPEC	=	human invasive proliferative extravillous cytotrophoblast
GnRH	=	gonadotropin releasing hormon
BSA	=	bovine serum albumin
DMEM	=	Dulbecco's modified eagle medium
FCS	=	fetal calf serum
MALDI-TOF	=	matrix-assisted laser desorption/ionisation- time of flight
RIA	=	radioimmunoassay
LCA	=	Leukocyte Common Antigen

## ***Bevezetés***

### **Hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)**

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet, vagy angol neve alapján mozaikszóval PACAP-ot (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), 1989-ben izolálták birka hypothalamusból, patkány hypophysisben kifejtett adenilát cikláz aktiváló hatása alapján. A PACAP-ot tartalmazó hypothalamikus neuronok az eminentia mediana területére vetülnek, ahol eléri a hypothalamo-hypophysealis portalis rendszer kapillárisait (Miyata et al., 1989). A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinális polipeptid (VIP) peptidcsalád tagja (1. ábra), melynek N-terminális szakasza (1-28) 68 %-ban megegyezik a VIP struktúrájával (Miyata et al., 1989), de adenilát-cikláz aktiváló hatása 1000-10000-szer nagyobb a VIP hatásánál. A PACAP génje a 18. kromoszómán helyezkedik el és 2681 nukleotidból áll. 1990-ben azonosították 27 aminosavból felépülő, rövidebb fragsment, a PACAP27-et (Miyata et al., 1990). A szervezetben két biológiailag aktív amidált forma kb. 90%-át a 38 aminosavból álló PACAP38, a kisebb részét a PACAP27 teszi ki. A peptidek szekvenciája azonos emlősökben, békában is csak egy aminosav eltérést mutat (Köves et al., 2001). A 38 aminosavból álló primér molekula megtalálható az előgerinchúros állatokban is, a struktúrája csak 1-4 aminosavban tér el a humán PACAP38-tól (Arimura, 1998). Ezen adatok azt sugallják, hogy a filogenetikai fejlődés során szinte változatlanul konzerválódott molekula alapvető élettani funkciókkal rendelkezik. A peptidet a dipeptidil-peptidáz IV (DPP IV) bontja le, és nagyon rövid felezési ideje van testfolyadékokban (Bourgauet et al., 2008a). A degradáció során N-terminális rövidebb peptidek keletkeznek, melyek már biológiailag nem aktívak. Az N-terminális vég szükséges a biológiai aktivitáshoz, de a receptorkötéshez nem. Az így keletkezett peptidek, például a DPP IV által előállított PACAP3-38, a legtöbb esetben antagonistaként viselkednek (Bourgauet et al., 2008a,b). Ezen rövidebb fragsmentek közül a leghatásosabb antagonisták a PACAP6-38 (Vandermeers et al., 1992).

PACAP38	HSDGIFTDSYSRYRQMAVKKYLAAVLGRYKQRFVFNK-NH <sub>2</sub>
PACAP27	-----NH <sub>2</sub>
VIP	---AV---N-T-L-----NSI-N-NH <sub>2</sub>
Secretin	----T--SEL--L-EGARLQRL-QGLV-NH <sub>2</sub>
GHRH	YA-A---N---KVLG-LSAR-L-QDIMSRRQGESNQERGARARL-NH <sub>2</sub>
Helodermin	---A---EE--KLLAKL-LQ----SI--S-TSPPP-NH <sub>2</sub>
Glucagon	--Q-T--SD--K-LDSRRRQDFVQWLHNT
GLP-2	-A--S-S-EMNTILDNL-ARDFINWLIQTKITD
PRP	DVAH--LNEA-RKVLG-LSAG-H-QSLVA
PHM	-A--V--SDF-KLLG-LSA----ESLH-NH <sub>2</sub>
GIP	YAE-T-ISR--IAMDKIHQQDFVNWLAQKQ-KNDWKNHTQ

1. ábra A szekretin/glucagon/vazoaktív intesztinális peptidcsaládba tartozó peptidek aminosav szekvenciái (Vaudry et al., 2009)

## A PACAP előfordulása a szervezetben

### A. Idegrendszer

A PACAP a központi idegrendszerben legnagyobb mennyiségben a hypothalamusban mutatható ki, ahol főleg a nucleus supraopticus és paraventricularis magno- és parvocelluláris rendszerhez tartozó neuronjaiban dekektálható (Köves et al., 1991; Kivipelto et al., 1992; Ando et al., 1994; Kimura et al., 1994; Hannibal et al., 1995a,b; Piggins et al., 1996). Más struktúrákban, így az agykéregben (Köves et al., 1991; Kivipelto et al., 1992, Hannibal et al., 2002), a középgyagban, a nyúltvelőben, a basalis ganglionokban, a thalamusban, a hypophysisben, a septumban, a hippocampus CA1-3 zónáiban (Köves et al., 1994), az amygdala centrális magjában, a cerebellumban és a retina különböző rétegeiben (Seki et al., 2000; Hannibal et al., 1997) is vannak PACAP tartalmú sejtek és rostok. A perifériás idegrendszerben a spinális ganglionok kis érzőidegsejtjei, valamint a vegetatív prae- és postganglionáris neuronok tartalmaznak PACAP-ot (Köves et al., 1990; Sundler et al., 1996; Hannibal et al., 2002; Seki et al., 2000).

### B. Nem-neuronális szövetek

A PACAP nemcsak a központi és perifériás idegrendszerben található meg, hanem más szövetekben is. Többek között az endokrin szervekben és a gastrointestinalis traktus teljes hosszában (Arimura et al., 1991; Ghatei et al., 1993). A peptidet kimutatták többek között az adenohypophysisben (Vígh et al., 1993; Kimura et al., 1994; Mikkelsen et al., 1995; Köves et al., 1998), a mellékvesében (Ghatei et al., 1993), az endokrin pancreasban (Hannibal és Fahrenkrug, 2000) és a mellékpajzsmirigyben (Luts és Sundler, 1994). Ezen kívül

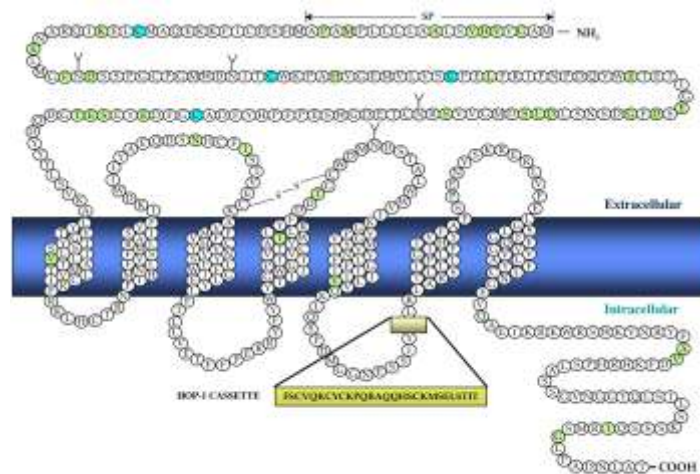
megtalálható a kiválasztó rendszerben (Fahrenkrug és Hannibal, 1998; Moller et al., 1993) és a légzőrendszerben (Moller et al., 1993).

### **PACAP-receptorok**

A PACAP hatását a szervezetben G-protein kötött receptorok közvetítik. A receptorok a VIP receptorcsaládba tartoznak, hét transzmembrán kart és egy intracellulárisan G-proteint kötő domént tartalmaznak. A PAC1 receptor két-három nagyságrenddel nagyobb affinitással köti a PACAP-ot, mint a VIP-et, míg a VPAC-1 és VPAC-2 receptorok mindkét peptidet egyforma erősséggel kötik. A humán PAC1 receptort kódoló gén a 7. kromoszómán található. A receptornak 8 splice variánsa ismert és a 3. intracelluláris karon található „hip” és „hop” szekvenciákat tartalmazó variánsokat PAC1R-hip, -hop1, -hop2, -hiphop1, -hiphop2, míg az ezt nem tartalmazó variánst short variánsak nevezték el (Arimura, 1998, 2. ábra). A „very short” variáns esetében az N-terminális végen hiányzik az extracelluláris domén. A PACAP receptorok szerkezetbeli eloszlása a receptor típusától függ.

A PACAP-ot nagyobb affinitással kötő PAC1 receptor típusok megtalálhatóak a központi idegrendszerben (a hypothalamus különböző területein, a cortexben, a thalamusban, a mesencephalonban, a ponsban és a kisagyban), az adenohipophysisben, a mellékvesevelőben és a herében (Masuo et al., 1992). PAC1-receptor van jelen többek között: a retinában (D'Agata és Cavallaro, 1998), a pancreasban, a májban, az ovarium granulosa-sejtjeiben (Usdin et al., 1994), a vesében (Peeters et al., 1999), a placentában (Koh et al., 2003).

A PACAP-ot és VIP-et egyforma erősséggel kötő VPAC receptorok közül a VPAC1 megtalálható a központi idegrendszer mellett a tüdőben, a májban, a lépben, a thymusban, az ovariumban és a gastrointestinalis tractusban (Hashimoto et al., 1996; Joo et al., 2004). A központi idegrendszer területén főleg a nagyagykéregben és a hippocampusban fordul elő (Usdin et al., 1994; Sheward et al., 1995). A VPAC2 receptor eltérő eloszlást mutat, mRNS-e nagy mennyiségben kimutatható a thalamusban, a nucleus suprachiasmaticusban, az amygdalában, illetve a ponsban (Ishihara et al., 1992). A VPAC1-, illetve VPAC-2 receptor eloszlása a hippocampus területén mutat csupán átfedést (Usdin et al., 1994).



2. ábra: A PAC1 receptor szerkezete (Arimura, 1998)

## A PACAP élettani hatásai

A PACAP számos élettani hatással rendelkezik a szervezetben. Mivel a PACAP-ot először a hypothalamusból mutatták ki, a hypophysis elülső és hátsó lebeny hormonok termelésére kifejtett hatásai váltak legkorábban ismertté. Számos egyéb endokrin hatása is ismert: befolyásolja a pajzsmirigyműködést (Okada et al., 2007), a gonádok szteroid termelését (El-Gehani et al., 2000), a spermiogenezist és az ovariális follicularis fejlődést (Apa et al., 2002; Barberi et al., 2007; Csaba et al., 1997; Gras et al., 2005; Li et al., 2004), stimulálja a mellékvese catecholamin szintézisét (Isobe et al., 2003), valamint a pancreas inzulintermelését (Winzell és Ahren, 2007).

A PACAP a glutamát mellett a retinohypothalamicus pálya másik fő transzmittere, és számos folyamatot befolyásol a nucleus suprachiasmaticusban és a corpus pinealéban (Hannibal, 2006; Rékási és Czömpöly, 2002). Kimutatták, hogy a PACAP fokozza a melatonin termelést a tobozmirigyben, mely már korai embrionális korban is megfigyelhető, azonban a melatonin cirkadián ritmusát nem befolyásolja (Csernus et al., 2004; Faluhelyi et al., 2004; Nagy és Csernus, 2007).

Emellett a PACAP-ról kimutatták, hogy részt vesz az alvásszabályozásban (Murck et al., 2007), a centrális sympathicus neuronális aktivitás szabályozásában (Farnham et al., 2008), a hőszabályozásban (Pataki et al., 2002) és befolyásolja a kemorecepciót a glomus caroticumban (Xu et al., 2008). A PACAP serkenti a memóriafolyamatokat, amit a PACAP és a PACAP receptor KO egerek memóriazavara is mutat (Matsuyama et al., 2003; Otto et al., 2001; Roberto és Brunelli, 2000). A PACAP számos viselkedésre gyakorolt hatását is leírták.



Befolyásolja többek között a szteroid-indukálta reprodukciós viselkedést patkányban és egérben (Apostolakis et al., 2004), növeli a lokomotoros aktivitást patkányban és egérben (Adamik és Telegdy, 2004; Masuo et al., 1995), részt vesz a stressz adaptációs magatartás szabályozásában (Agarwal et al., 2005; Légrádi et al., 2007) és antidepresszáns hatásai is vannak (Reichenstein et al., 2008).

Egyéb perifériás hatásokkal is rendelkezik a peptid: befolyásolja a gastrointestinalis és légúti motilitást és szekréciót (Barthó et al., 2000; Foda et al., 1995; Köves et al., 1993; Lázár et al., 2001; Oh et al., 2005; Tornoe et al., 2001), a szív ingerelhetőségét és a natriuretikus peptid szekrécióját (Hardwick et al., 2006), a húgyúti szervekben hat a vizeletürítési reflexre és az érzőbeidegzésre (Braas et al., 2006; Fahrenkrug és Hannibal, 1998), valamint simaizom relaxáns hatása van az erekben (Lenti et al., 2007). Ezenkívül hat a fájdalomérzés központi és perifériás szabályozására (Davis-Taber et al., 2008; Helyes et al., 2007).

### **A PACAP gonadális funkciókra kifejtett hatásai**

A PACAP-nak a hypophysis hormonok szekréciójára kifejtett hatását már röviddel a felfedezését követően kimutatták. A peptid a GnRH-val interakcióban a gonadális funkciók központi szabályozásában vesz részt (Counis et al., 2007). Későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a PACAP közvetlenül a gonadális sejtekre kifejtett hatással is rendelkezik, és fontos szerepet tölt be a genitális rendszerben. Immunhisztokémiai módszerekkel kimutatták a PACAP-ot és receptorait az ovariumban (Barberi et al., 2007; Kotani et al., 1997; Vaccari et al., 2006), ahol a PACAP fontos szerepet játszik a ovarialis szteroidszintézisben, a tüszőérés szabályozásában és a granulosa sejtek proliferációjában (Park et al., 2000; Usuki et al., 2001). Ezen kívül a PACAP kimutatható a vaginában és az uterusban is (Steenstrup et al., 1995). Valószínűleg az uteroplacentáris egység működésének szabályozásában is fontos szerepe van, mivel relaxációt okoz a bolyhok és a myometrium ereiben. A PACAP terhességben betöltött fontos szerepét támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a PACAP-knockout egerek fertilitása csökken (Steenstrup et al., 1996). Az endometriumban a PACAP expresszió a decidualizáció és a terhesség során változik (Spencer és mtsai, 2001). Radioimmunoassay módszerrel igazolták a PACAP27 és a PACAP38 jelenlétét a humán terhes uterusban és a placentában (Steenstrup et al., 1996), azonban a PACAP szintjének terhességi korrall történő változásáról és a placenta különböző területei között (anyai vagy magzati oldal, centrális vagy perifériás rész) fennálló esetleges különbségekről nem áll rendelkezésre adat.

## A PACAP protektív hatásának molekuláris mechanizmusai

A PACAP protektív hatású mind neuronális és nem neuronális sejtvonalakon számos különböző károsító tényező ellen *in vitro*. *In vivo* is számos állatkísérletes modellben bizonyult védő hatásúnak. Protektív hatásai elsősorban antiinflammatorikus és antiapoptotikus hatásainak köszönhetőek.

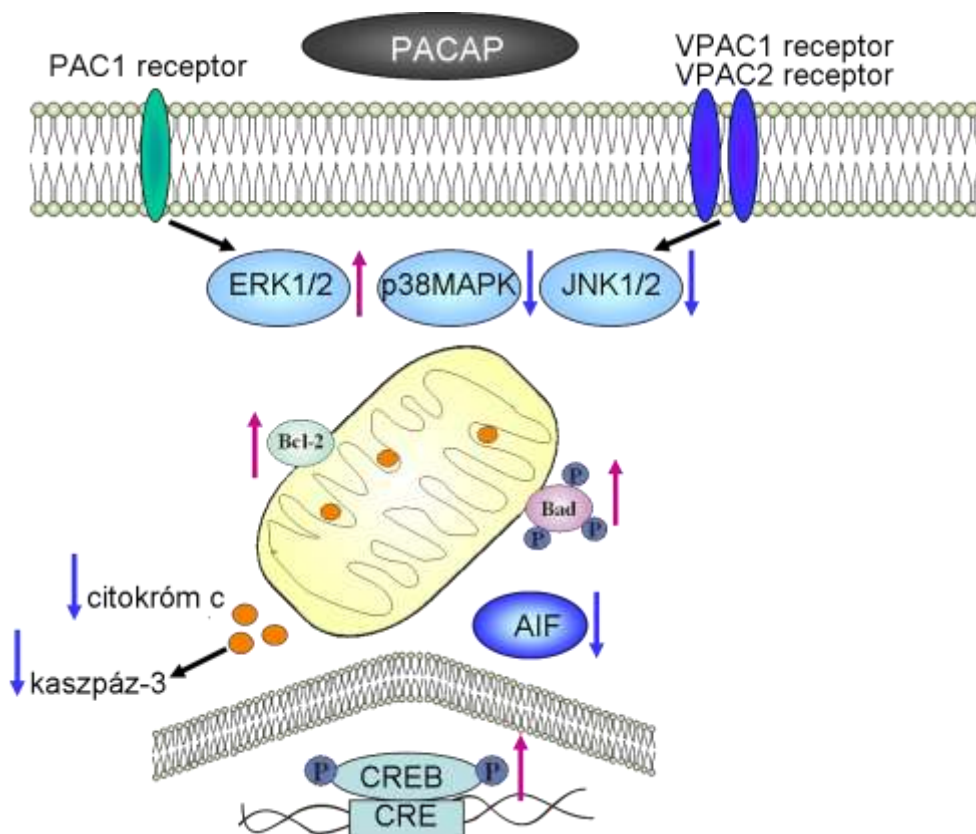
A PACAP immunrendszerben kifejtett hatása igen összetett (Ganea és Delgado, 2002). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a PACAP gátolja a hypoxia-indukálta microglia aktivációt (Suk et al., 2004). Ezen hatások többnyire nem a PAC1, hanem a VIP-pel közös, VPAC receptorokon keresztül valósulnak meg. Újabb megfigyelések arra utalnak, hogy az *in vitro* megfigyelt hatások *in vivo* körülmények között is érvényesülnek (Abad et al., 2006).

Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a PACAP mind neuronális, mind nem neuronális sejtvonalakon antiapoptotikus hatással rendelkezik (Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004). Az elmúlt években munkacsoportunk a PACAP antiapoptotikus hatását több nem neuronális sejt kultúrán is kimutatta. A PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette az oxidatív stressz indukálta apoptózist a szívizomsejtekben, ahol csökkentette a kaszpáz 3 aktivációt és emelte a Bcl-2 és a foszfo-Bad szintjét. A peptid növelte az endothelsejtek életképességét is oxidatív stresszel szemben, amely hatását a MAP kináz útvonalakon keresztül érte el (Rác et al., 2007). Más kutatócsoport bebizonyította, hogy a PACAP védő hatást fejt ki oxidatív stresszel szemben cerebelláris szemcsesejtekben, corticalis neuronokban, PC12 sejtekben és neuroblastokban (Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004; Vaudry et al., 2009).

Az apoptózis döntő szerepet játszik a placenta fejlődésében és differenciálódásában is, aminek a placentáris betegségek kialakulásában bizonyíthatóan szerepe van (Hallmann et al., 2004). Oxidatív stressz és hypoxia indukálta apoptotikus folyamatok a trophoblast sejtekben nemcsak egyes patológiás esetekben mutathatók ki, mint amilyen a preeclampsia, hanem a normál differenciálódás során is (Robins et al., 2007). Arról viszont korábbról nem áll rendelkezésünkre adat, hogy a PACAP képes-e ezen védő hatását a trophoblast sejteken is kifejteni.

A PACAP komplex jelátviteli útvonalakon keresztül valósítja meg védő hatásait. A citoprotektív hatásokért csaknem minden esetben a PAC1 receptor felelős. A PACAP a PAC1 receptorokon keresztül aktiválja az adenilát ciklázt és a foszfolipáz C-t, melyek hatására cAMP- függő és attól független útvonalak aktiválódnak. A PKA aktiváció hatására általában a

védő hatású MAPK, az ERK foszforiláció megemelkedik, a sejtpusztulást elősegítő JNK és p38MAPK foszforiláció pedig gátlódik. A PKA downstream útvonalában a Rap1 és Ras aktiváción keresztül is aktiválja az ERK-et, valamint a CREB foszforilációt. Az apoptózis mitokondriális útvonalát is befolyásolja: a Bcl család antiapoptotikus tagjait aktiválja (Bcl-2, Bcl-xL), míg proapoptotikus tagjait inaktíválja (Bad, Bax). A PACAP erőteljesen gátolja a kaspáz aktivitást, de a kaspáz független apoptotikus folyamatokat is gátolja (Somogyvári-Vigh és Reglődi 2004) (3. ábra). Az apoptózis szabályozásában szerepet játszó jelátviteli útvonalak között az egyik fontos, túlélést biztosító utat a lipid-kinázok alkotják, melyeket a növekedési faktorok receptoraikon keresztül aktiválhatnak. Az út egyik kulcseleme a PI3K mely központi szerepet játszik például olyan jelátvivő foszforilációjában, mint az Akt. Az Akt-ből legalább hét jelátviteli útvonal indul ki, melyek mindegyike végső soron az apoptózis létrejöttét akadályozza.



3. ábra: PACAP hatásának molekuláris mechanizmusa.

## **Choriocarcinoma**

A dolgozat alapjául szolgáló kísérletek egy részében choriocarcinomás cytotrophoblast (JAR) sejtvonalat használtunk. A choriocarcinoma többnyire a placentából kialakuló rákos daganat. A betegség 80%-ban molaterhesség (üszögterhesség) következményeként jön létre, 15%-a vetélést vagy szülést követően lép fel, és közel 5%-a petefészek eredetű. Nagyon ritkán a szervezet egyéb helyeiről (pl.: húgyhólyag, férfiak esetében a here) kiinduló betegség. A choriocarcinoma gyorsan progrediáló, rosszindulatú megbetegedés, kezelés nélkül rövid időn belül (akár két hét alatt) halálhoz vezethet. Citosztatikus kezeléssel (methotrexat) az esetek 80-90%-ában végleges gyógyulás érhető el műtéti beavatkozás nélkül. Előfordulását tekintve, a molaterhességek mindössze 1-2%-a mutat choriocarcinomás elfajulást. A betegség jelentőségét nem a gyakorisága, hanem a gyógyíthatósága adja (Papp, 2007).

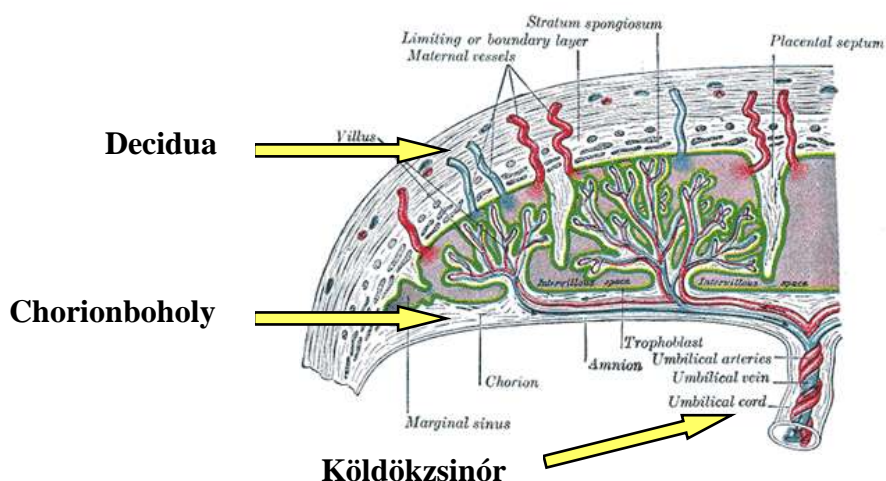
## ***Célkitűzések***

1. A PACAP27 és PACAP38 kimutatása illetve koncentrációváltozásának meghatározása az érett, humán placentából (anyai centrális és perifériás, illetve magzati centrális és perifériás placentarészekből), köldökzsinórból illetve 9 hetes abortumokból.
2. PACAP38 kimutatása MALDI TOF tömegspektrométer segítségével különböző humán reprodukív rendszerből származó mintákból.
3. PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés hatásának vizsgálata JAR sejtek (choriocarcinomás cytotrophoblast) jelátviteli útvonalaira illetve túlélésére normál körülmények között, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukálta oxidatív stresszben, CoCl<sub>2</sub>, lipopoliszacharid és etanol indukálta *in vitro* hypoxiában és citosztatikus kezelést követően.
4. PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés hatásának vizsgálata HIPEC sejtek (extravillosus cytotrophoblast) túlélésére normál körülmények között és citosztatikus kezelés hatására.
5. Primer cytotrophoblast sejtek izolálása placentából, PACAP kezelés hatásának vizsgálata ezen sejtvonalon normál körülmények között és citosztatikus kezelés hatására.

## Anyagok és módszerek

### A PACAP előfordulása a placentában

A vizsgálat alapjául szolgáló mintákat 9 hetes humán abortumokból (n=7) és humán érett placentákból (n=6) nyertük (4. ábra). A vizsgálat során különbséget tettünk a magzati oldalon elhelyezkedő chorionboholy, és az anyai oldalt reprezentáló decidua között. Mindkét esetben a placenta perifériás és centrális részéből egyaránt vettünk mintákat. Ezen kívül köldökzsinórból (n=6) is meghatároztuk a PACAP38 és a PACAP27 koncentrációját. A kísérlethez szükséges etikai engedéllyel rendelkezünk (2784, 3117 Pécsi Tudományegyetem és 8-28/92 009-10 I 8EKU, ETT TUKEB, Egészségügyi Minisztérium).



4. ábra: Sematikus ábra a mintavétel helyeiről

Első lépésben megmértük a szövetminták súlyát, majd jéghideg desztillált vízzel homogenizáltuk azokat. A homogenátumot lecentrifugáltuk (12000 rpm, 4 °C, 30 min), a felülúszót radioimmunoassay (RIA) módszerrel dolgoztuk fel, és meghatároztuk a PACAP38 illetve a PACAP27 koncentrációját.

### ***RIA módszer leírása röviden***

#### *Antiszérum:*

Az általunk használt PACAP38 antiszérumot carbodiimide által konjugált Cys<sup>23</sup>-PACAP24-28 és borjú thyreoglobulin antigén ellen termeltetik nyúlban. A „88111-3”-as számú antiszérum, 1:10000 hígításban bizonyult a legeredményesebbnek a RIA kifejlesztése során.

A PACAP27 esetén a „88123-3” számú antiszérumot használtuk 1:45000 hígításban. Az antiszérum előállítása az előzőben leírtaknak felel meg. Az antiszérumok Akira Arimura Professzor (Tulane University, New Orleans, USA) laboratóriumából származnak.

#### *Jelöletlen antigén:*

Saját laboratóriumban készült mono-<sup>125</sup>I izotóppal jódozott birka PACAP24-38 és birka PACAP27 (5000 cpm/ tubus).

#### *Standard:*

A RIA mérés során birka PACAP27 illetve PACAP38 peptidet (Sigma) használtunk standardként 0-1000 fmol/ml tartományban.

#### *Pufferoldat (assay-puffer)*

A RIA tesztek 1 ml 0,05 mol/l koncentrációjú (pH 7.4) foszfát pufferben végeztük. Az oldat összetevői:  
-0,25 % (w/v) BSA,  
-0,1 mol/l NaCl,

-0,05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$

*Immunoassay eljárás (Radioimmunoassay-k menete)*

A polipropilén RIA csövekbe (Merck) duplikátumban az alábbi inkubációs elegyet mértük be:

- 100  $\mu\text{l}$  PACAP 27 vagy PACAP 38 standard, ill. mérni kívánt/ismeretlen minta,
- 100  $\mu\text{l}$  antiszérum "88111-3" PACAP38 (1: 10000 hígításban), vagy „88123-3” PACAP27 (1:45000 hígításban),
- 100  $\mu\text{l}$  (kb. 5000 cpm)  $^{125}\text{I}$  izotóppal jelölt PACAP24-38 vagy PACAP27
- assay-puffer.

A mintákat az összekeverést követően 4 °C-on 48-72 óráig inkubáltuk. Ez után az antitesthez kötött jelölt antigén frakciót elválasztottuk a szabad jelölt peptidektől oly módon, hogy csövenként 100  $\mu\text{l}$  szeparáló oldatot mértünk hozzá, melynek összetétele:

- 10 g mosott szén,
- 1 g dextrans,
- 0,5 g zsírmentes tejpor,
- 100 ml desztillált víz.

A csöveket 4 °C-on 15 percig 3000 rpm-en centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük, és itatóspapírral leitattuk. A szénhez kötődött szabad peptidfrakció radioaktivitását (gammásugárzást) NZ310 típusú spektrométeren megmértük. Ebből következtethetünk az ellenanyaghoz kötött radioaktivitás értékére, majd egy kalibrációs görbéről leolvashatjuk az ismeretlen minta PACAP38 vagy PACAP27 koncentrációját (Németh et al., 2007; Jakab et al., 2004).



## ***Tömegspektrometriai vizsgálatok***

A tömegspektrometriai kísérletekhez a mintákat (tüszőfolyadék, magzatvíz, hüvelyváladék) rutin nőgyógyászati vizsgálatok alkalmával nyertük. A mintavételek külön beavatkozást nem igényeltek, az Intézmény Etikai Bizottság Kódex szabályainak betartásával történtek. A mintákhoz minden esetben peptidázgátlót (aprotinin) adtunk (30µl/ml), kivéve a hüvelyváladékot, orrváladékot és nyálat, amik gyűjtése filter papírra történt.

A tüszőfolyadékot önkéntes nőbetegektől nyertük (20-35 év között, n=40), akiken kontrollált petefészek hyperstimulálás után mesterséges megtermékenyítés miatt tüszőfolyadék punkciót végeztek. A mintához (100 µl) hozzáadtunk 10 µl 72%-os triklórecetsavat és 100 µl desztillált vizet, majd lecentrifugáltunk (13000 rpm, 10 min).

A magzatvizet önkéntes várandósoktól nyertük a 16. terhességi héten végzett amniocentesis során, melynek oka a 35 év feletti anyai életkor volt (n=25). A mintákból 200 µl mennyiséget lecentrifugáltunk (10000 rpm, 5 min), a felülúszót 100 µl 1%-os trifluorecetsavval (TFA) savanyítottuk, majd ismét centrifugáltuk (13000 rpm, 10 min).

A további tisztítás céljára C18-as bevonatú Zip-Tip pipettahegyet (Millipore) használtunk. A vizsgálni kívánt polipeptidet a Zip-Tip felszíne megkötötte, majd innen a protokollnak megfelelően leoldva közvetlenül detektáltuk. A Zip-Tip felszínéről történő közvetlen leoldást 50%-os acetonitril és 0,1%-os TFA 1:1 arányú keverékével végeztük.

A hüvelyváladék (n=10) gyűjtéséhez steril filter papírcsíkokat (Schirmer papír, Mediker) használtunk, a mintaadók a ciklusuk progeszteron fázisában voltak. A papírcsíkok hüvelyváladékkal való átítatása minden esetben egy steril csipesszel történt, amivel a filter papírcsíkot a hüvely falához illesztettük 10 másodpercig.

A humán orrváladék (n=10, 20-40 év közöttiek) és nyál (n=10, 20-40 év közöttiek) mintákat önkéntesektől nyertük steril filter papírcsíkok (Schirmer papír Mediker) használatával.

A humán csarnokvizet (n=10, 65-85 év közöttiek) önkéntesektől nyertük szürkehályog miatti műtét alkalmával.

A natív mintáinkat, illetve a PACAP-38 vizes oldatú standardjének (Sigma-Aldrich) 1–1 µl-ét felvittük a Bruker rozsdamentes acél mintatartó tálcára (MTP 384 massive target T, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Vizsgálataink során mátrixként  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-fahéjsav (CHCA) telített 0,1 %-os trifluor-ecetsav (TFA) – acetonitril (2/1 V/V) oldatát alkalmaztuk, melyből mintáinkhoz 1-1 µl-t csepegtettünk. Kalibráló oldatként minden esetben a Bruker Peptidkalibráló Standardot alkalmaztuk (#206195 Peptide Calibration Standard;

Bruker Daltonics). A minták beszáradását követően az elemzéseket a már fent említett Bruker Daltonics Autoflex II típusú MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel reflektor detektálási módban végeztük el. Az ionizáláshoz 337 nm-es nitrogén lézert alkalmaztunk (MNL-205MC model; LBT- Lasertechnik Berlin GmbH.; Berlin; Németország), ennek frekvenciája 50 Hz, a gyorsító feszültség 20 kV és a késleltetési idő pedig 120 ns volt. A tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban 1000 és 10000 m/z tartomány között regisztráltuk. Minden minta esetében a peptidkeverékre jellemző tömegspektrumokat (1000 lövés/minta) összesítettük. A műszer ellenőrzését Bruker FlexControl 2.4 szoftverrel, az értékelést pedig Bruker FlexAnalysis 2.4 szoftverrel végeztük (Börzsei et al., 2009).

## **Sejtkultúra**

### **Immortalizált sejtvonalak**

Kísérleteink során JAR sejteket illetve HIPEC sejteket használtunk. A JAR sejtek choriocarcinomás cytotrophoblast sejtek, tenyésztésük RPMI-1640 médiumban történik. A HIPEC sejtek extravillosus cytotrophoblast sejtek, ezek tenyésztését DMEM médiumban végeztük.

### **Primer sejtvonala**

A primer cytotrophoblast sejteket humán, érett placentából nyertük. Az izolálás a placenta tisztításával és mosásával kezdődött. Eltávolítottuk mind az anyai (decidua) felszínét, mind a magzati (chorion) felszínét. Ezután a placenta kisebb darabokra vágásával folytattuk, további felhasználásra csak azok a szövetdarabok kerülhettek, melyek nem tartalmaztak sem kalcifikálódott, sem nekrotizált területeket. Majd a placenta többszöri átmosása következett HBSS-el, hogy a lehető legtöbb vért eltávolítsuk a mintákból. A placenta első és második tripszines emésztése 37°C-os vízfürdőben történt 30 percen keresztül. Harmadszor már csak 20 percig, negyedszer pedig 15 percig emésztettük a szövetmintákat. Az egyes emésztések között összegyűjtöttük a felülúszót és megállítottuk az emésztést FCS-el. Az így kapott oldatokat 10 percig 2000 rpm-en centrifugáltuk. Ezek után a felülúszót leöntöttük, a sejteket pedig felszuszpendáltuk DMEM médiummal. Ez a médium már tartalmazott antibiotikumot, de FCS-t még nem. Ezen sejtszuspenziót átszűrtük egy 40 µm-es szűrőn, hogy minden nagyobb szövetdarabot eltávolítsunk, mivel zavarná a sejtek szétválasztását. A szűrletet ezek után 15 percig 2200 rpm-en centrifugáltuk, a felülúszót ismét leöntöttük és felszuszpendáltuk a sejteket 8 ml DMEM médiummal. A már előzőleg elkészített Percoll grádiensekre (4 db) pipettáztuk a 2-2 ml sejtszuspenziót. Ezután centrifugáltuk a grádienseket a sejtekkel 25 percig 1200 g-vel fék nélkül. A cytotrophoblast sejtek 35-40%-os koncentrációval rekednek meg a Percoll grádiensben, így az itt kialakult „gyűrűt” lepipettáztuk. Az így izolált sejteket újra szuszpendáltuk médiummal, centrifugáltuk 8 percig 2000 rpm-en, a felülúszót ismét eltávolítottuk, majd ezt a műveletet megismételtük és felszuszpendáltuk a sejteket DMEM médiummal. Ezek után LCA-t (Leucocyte Common Antigen) adtunk a sejtekhez 1:20 hígításban. A szuszpenziót 4°C-on 30 percig inkubáltuk, majd 1500 rpm-en 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót szintén eltávolítottuk, felszuszpendáltuk HBSS-el, majd újra

elvégeztük az előbb említett centrifugálást és végül 3 ml HBSS-el felfuszpendáltuk. Ezután a Dynabeads tartalmú tubusba pipettáztuk a sejteket és 20 percig 4°C-on inkubáltuk. A felülúszót ebben az esetben is eltávolítottuk, a sejteket pedig már FCS tartalmú médiummal felfuszpendáltuk. Végül tripán kék festék segítségével elvégeztük a cytotrophoblast sejtek számlálását.

### *Sejtek életképességének vizsgálata*

#### **JAR SEJTEK**

A JAR sejtek életképességének vizsgálatához kolorimetrikus MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) tesztet használtunk. A sejteket egy 96-lyukú tenyésztő edénybe választottuk szét, ahol a kezdeti koncentráció  $10^4$  sejt/200  $\mu$ l médium/lyuk volt. Ezt követően egy éjszakán át tenyésztettük őket RPMI médiumban.

#### ***A; PACAP38 hatása JAR sejtekre különböző toxikus hatások esetében***

A sejteket tizenkét különböző csoportra osztottuk:

- 1.)
  - a. kezelésben nem részesült csoport
  - b. 100 nM PACAP 38-al kezelt csoport
- 2.)
  - a. 0,45 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt csoport
  - b. 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 0,45 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt csoport
- 3.)
  - a. 0,9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt csoport
  - b. 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 0,9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt csoport
- 4.)
  - a. 75  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>-dal kezelt csoport
  - b. 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 75  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>-dal kezelt csoport
- 5.)
  - a. 1  $\mu$ g/ml lipopoliszacharid-al (LPS) kezelt csoport
  - b. 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 1  $\mu$ g/ml lipopoliszacharid-al (LPS) kezelt csoport
- 6.)
  - a. 200 mM etanollal kezelt csoport
  - b. 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 200 mM etanollal kezelt csoport

A kontroll sejteket nem kezeltük előzetesen PACAP38-al, azonban azon sejtcsoportok esetében, melyek 9 órán keresztül különböző toxikus hatásoknak voltak kitéve, 1 órával az expozíció előtt 100 nM PACAP38 kezelést is végeztünk.

***B; PACAP38 hatása JAR sejtekre citosztatikus kezelés esetében***

A sejteket huszonnégy különböző csoportra osztottuk:

- 1.) kezelésben nem részesült csoport
- 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport
- 3.) 1µM PACAP6-38-al kezelt csoport
- 4.) 100 nM PACAP1-38-al és 1µM PACAP6-38-al kezelt csoport
- 5.) 10 µM MTX-al kezelt csoport
- 6.) 100 nM PACAP1-38-al és 10 µM MTX-al kezelt csoport
- 7.) 1 µM PACAP6-38-al és 10 µM MTX-al kezelt csoport
- 8.) 100 nM PACAP1-38-al, 1 µM PACAP6-38-al és 10 µM MTX-al kezelt csoport
- 9.) 100 µM MTX-al kezelt csoport
- 10.) 100 nM PACAP1-38-al és 100 µM MTX-al kezelt csoport
- 11.) 1 µM PACAP6-38-al és 100 µM MTX-al kezelt csoport
- 12.) 100 nM PACAP1-38-al, 1 µM PACAP6-38-al és 10 µM MTX-al kezelt csoport
- 13.) kezelésben nem részesült csoport
- 14.) 1 nM PACAP1-38-al kezelt csoport
- 15.) 100 nM PACAP6-38-al kezelt csoport
- 16.) 1 nM PACAP1-38-al és 100 nM PACAP6-38-al kezelt csoport
- 17.) 10 µM MTX-al kezelt csoport
- 18.) 1 nM PACAP1-38-al és 10 µM MTX-al kezelt csoport
- 19.) 100 nM PACAP6-38-al és 10 µM MTX-al kezelt csoport
- 20.) 1 nM PACAP1-38-al, 100 nM PACAP6-38-al és 10 µM MTX-al kezelt csoport
- 21.) 100 µM MTX-al kezelt csoport
- 22.) 1 nM PACAP1-38-al és 100 µM MTX-al kezelt csoport
- 23.) 100 nM PACAP6-38-al és 100 µM MTX-al kezelt csoport
- 24.) 1 nM PACAP1-38-al, 100 nM PACAP6-38-al és 10 µM MTX-al kezelt csoport

A kontroll sejteket ebben az esetben sem kezeltük előzetesen sem PACAP1-38-al, sem PACAP6-38-al. Azon sejtcsoportok esetében, melyek 48 órán keresztül citosztatikum hatásának voltak kitéve, 1 órával az expozíció előtt PACAP1-38 vagy PACAP6-38, vagy együttes kezelést is végeztünk.

A kezelést követően a médiumokat lecseréltük egy 0,5%-os MTT tartalmú RPMI médiumra, melyben 4 óráig inkubáltuk a sejteket. A reakciót 10 mM HCl hozzáadásával termináltuk. Ezt követően az abszorbanciát ELISA leolvasó segítségével 570 nm hullámhosszon megmértük, amely arányos volt az élő sejtek számával. Minden kísérletet háromszor ismételtünk.

## **HIPEC SEJTEK**

A HIPEC sejtek életképességének vizsgálatához kolorimetrikus WST-1 tesztet használtunk. A sejteket szintén 96-lyukú tenyésztő edénybe választottuk szét, ahol a kezdeti koncentráció  $10^4$  sejt/100  $\mu$ l médium/lyuk volt. Ezt követően egy éjszakán át tenyésztettük őket DMEM médiumban.

A sejteket hat különböző csoportra osztottuk:

- 1.) kezelésben nem részesült csoport
- 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport
- 3.) 1  $\mu$ M PACAP6-38-al kezelt csoport
- 4.) 10  $\mu$ M MTX-al kezelt csoport
- 5.) 100 nM PACAP1-38-al és 10  $\mu$ M MTX-al kezelt csoport
- 6.) 1  $\mu$ M PACAP6-38-al és 10  $\mu$ M MTX-al kezelt csoport

A kontroll sejteket ebben az esetben sem kezeltük előzetesen sem PACAP1-38-al, sem PACAP6-38-al. Azon sejtcsoportok, melyek 48 órán keresztül citosztatikum hatásának voltak kitéve, 1 órával az expozíció előtt PACAP1-38 vagy PACAP6-38 kezelésben is részesültek. Az inkubációs idő lejártakor a 100  $\mu$ l médiumokhoz 10  $\mu$ l WST-1 reagenst adtunk. Ezt követően 2-3 órán keresztül inkubáltuk a sejteket. Az abszorbanciát ELISA leolvasó segítségével 420-480 nm hullámhosszon megmértük, amely arányos volt az élő sejtek számával. Minden kísérletet háromszor ismételtünk.

## ***Inváziós készség és proliferáció vizsgálata***

A HIPEC sejtek inváziós készségének vizsgálatát inváziós kamrákban végeztük a Boyden kamra protokoll alapján. Minden kamrában található egy beillesztés amelyben van egy 8  $\mu\text{m}$  pórus nagyságú polikarbonát membrán. Ezen kívül a membránokon található egy patkány farokból származó I. típusú kollagén bevonat ( $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). A beillesztéseket először DMEM médiummal mostuk majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután minden beillesztésbe  $5 \times 10^5$  sejtet helyezünk 100  $\mu\text{l}$  FCS mentes médiummal, a kamrákba szintén  $5 \times 10^5$  sejt kerül 400  $\mu\text{l}$  FCS mentes médiummal. A sejteket 72 órán át tenyésztjük inkubátorban ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Az inkubáció lejárta után a felülúszót eltávolítottuk és a kollagénbe betört életképes sejteket jelöltük 400  $\mu\text{l}$  crystal violet sejtfestékkel 20 percig szobahőmérsékleten. Majd leöblítettük a sejteket néhányszor vízzel és a kollagénbe nem betörő sejteket vattával eltávolítottuk. Ezek után a beillesztést egy teljesen új kamrába helyeztük és 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ :etanol:aceticétsav (49:50:1) keveréket adtunk hozzá. Ezekből az oldatokból 100  $\mu\text{l}$ -eket 96- lyukú tenyésztő edényekbe pipettáztunk ahol kolorimetrikus WST-1 tesztel 560 nm-en meghatároztuk a abszorbanciát, ami arányos a sejtkoncentrációval. A proliferációs vizsgálatot a kamrákban található sejteken végeztük paralell az inváziós készség meghatározásával. A médium eltávolítása után 400  $\mu\text{l}$  FCS mentes 20% 96 Aqueous One solution tartalmú reagenst adtunk a sejtekhez. Majd inkubáltuk 3 órán át inkubátorban ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Ezekből az oldatokból szintén 100  $\mu\text{l}$ -eket pipettáztunk 96- lyukú tenyésztő edényekbe majd kolorimetrikus WST-1 tesztel 560 nm-en meghatároztuk a abszorbanciát, ami arányos a sejtkoncentrációval.

## ***Western blot analízis***

A JAR sejteket 6 lyukú tenyésztő edénybe szeparáltuk szét, ahol a kezdeti koncentráció  $5 \times 10^5$  sejt/ml/lyuk volt.

### ***A.) PACAP1-38 és PACAP6-38 hatása JAR sejtekre***

JAR sejteket négy különböző csoportra osztottuk:

- 1.) kontroll csoport
- 2.) 1 órás 100 nM PACAP38-al kezelt csoport
- 3.) 1 órás 1  $\mu\text{M}$  PACAP6-38-al kezelt csoport

- 4.) 1 órás 100 nM PACAP38-al és 1  $\mu$ M PACAP6-38-al együttesen kezelt csoport

**B.) PACAP1-38 hatása JAR sejtekre  $H_2O_2$  kezelés esetében**

A JAR sejteket négy különböző csoportra osztottuk:

- 1.) kontroll csoport
- 2.) 9 órán keresztül 0,6 mM  $H_2O_2$ -dal kezelt csoport
- 3.) 1 órás 100 nM PACAP38-al előkezelt, majd 9 órás 0,6 mM  $H_2O_2$ -dal kezelt csoport
- 4.) 1 órás 100 nM PACAP38-al kezelt csoport

A sejteket a kezelést követően összegyűjtöttük, majd jéghideg Tris pufferben (50 mM, pH: 8,0) homogenizáltuk.

A puffer összetevői:

Foszfataz inhibitor  $Na_3VO_4$  (0,5 mM)

proteáz inhibitor

PBS

A sejtmembránokat ultrahanggal roncsoltuk, majd 10000 x g sebességgel centrifugáltuk 15 percen keresztül. A felülúszó protein koncentrációját BioRad assay módszer segítségével meghatároztuk, a minták protein tartalmát egyenlő koncentrációkra állítottuk be. Azonos mennyiségű fehérjét (10  $\mu$ g) 8, 12 és 15 %-os poliakrilamid gélben futtattunk. A blottolást követően, a nitrocellulóz membránt 3%-os zsírmentes tejben a következő polyclonalis nyúl vagy monoclonalis egér IgG ellen termeltetett antitesteket tartalmazó oldatban egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk:

- Phospho-protein kinase B (p-Akt) (1: 1000 hígítás)
- Phospho-p44/42 mitogen activated protein kinase (p-ERK1/2 Thr 202/Tyr204) (1: 1000 hígítás)
- Phospho-p38 mitogen activated protein kinase (p-p38 MAPK Thr180/Tyr 182) (1: 1000 hígítás)



A második antitest peroxidáz-konjugált anti-nyúl, valamint anti-egér IgG volt, a vizualizálást ECL Western blot meghatározó rendszer kemilumineszcens szubsztrát (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) használatával végeztük el. Az előhívott filmeket NIH's Image J szoftver segítségével értékeltük. Minden kísérletet legalább három alkalommal végeztünk el.

### ***Apoptózis és nekrozis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel***

#### *JAR sejtek*

A JAR sejteket 6 lyukú tenyésztő edénybe szeparáltuk szét, ahol a kezdeti koncentráció  $10^5$  sejt/2ml/lyuk volt.

JAR sejteket hat különböző csoportra osztottuk:

- 1.) kontroll csoport
- 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport
- 3.) 10  $\mu$ M MTX-al kezelt csoport
- 4.) 100  $\mu$ M MTX-al kezelt csoport
- 5.) 100 nM PACAP1-38-al és 10  $\mu$ M MTX-al kezelt csoport
- 6.) 100 nM PACAP1-38-al és 100  $\mu$ M MTX-al kezelt csoport

#### *HIPEC sejtek*

A HIPEC sejteket szintén 6 lyukú tenyésztő edénybe szeparáltuk szét, ahol a kezdeti koncentráció  $10^5$  sejt/2ml/lyuk volt.

HIPEC sejteket hat különböző csoportra osztottuk:

- 1.) kontroll csoport
- 2.) 100 nM PACAP1-38-al kezelt csoport

- 3.) 1  $\mu\text{M}$  PACAP6-38-al kezelt csoport
- 4.) 10  $\mu\text{M}$  MTX-al kezelt csoport
- 5.) 100 nM PACAP1-38-al és 10  $\mu\text{M}$  MTX-al kezelt csoport
- 6.) 1  $\mu\text{M}$  PACAP6-38-al és 10  $\mu\text{M}$  MTX-al kezelt csoport

Az eljárás a sejthalál típusainak elkülönítésére alkalmas. Az apoptózis korai szakaszában változások figyelhetők meg a plazmamembránban. Az apoptotikus sejtek membránjában a foszfolipid-foszfátidilszerin a belső felszínről a külső felszínre transzlokálódik. Az annexinV igen nagy affinitást mutat a foszfolipid-foszfátidilszerinhez. A fluoreszcens festékkel (FITC) jelzett annexinV alkalmas az apoptotikus sejtek áramlási citometriás kimutatására. Az annexinV-t propidium jodid festéssel együtt alkalmaztuk és így az annexinV pozitív apoptotikus sejtek elkülöníthetővé váltak a propidium jodid pozitív nekrotikus sejtektől (Vermes et al., 2000). A mintákat BD FACS Calibur flow citométerrel vizsgáltuk, az analízishez Cellquest software-t használtunk. Kvadráns dot plot segítségével meghatározható az élő, a nekrotikus (propidium jodid pozitív), a korai apoptotikus (annexin-V pozitív), valamint a késői apoptotikus (annexin-V és propidium jodid pozitív) sejtek százalékos aránya.

## ***Statisztika***

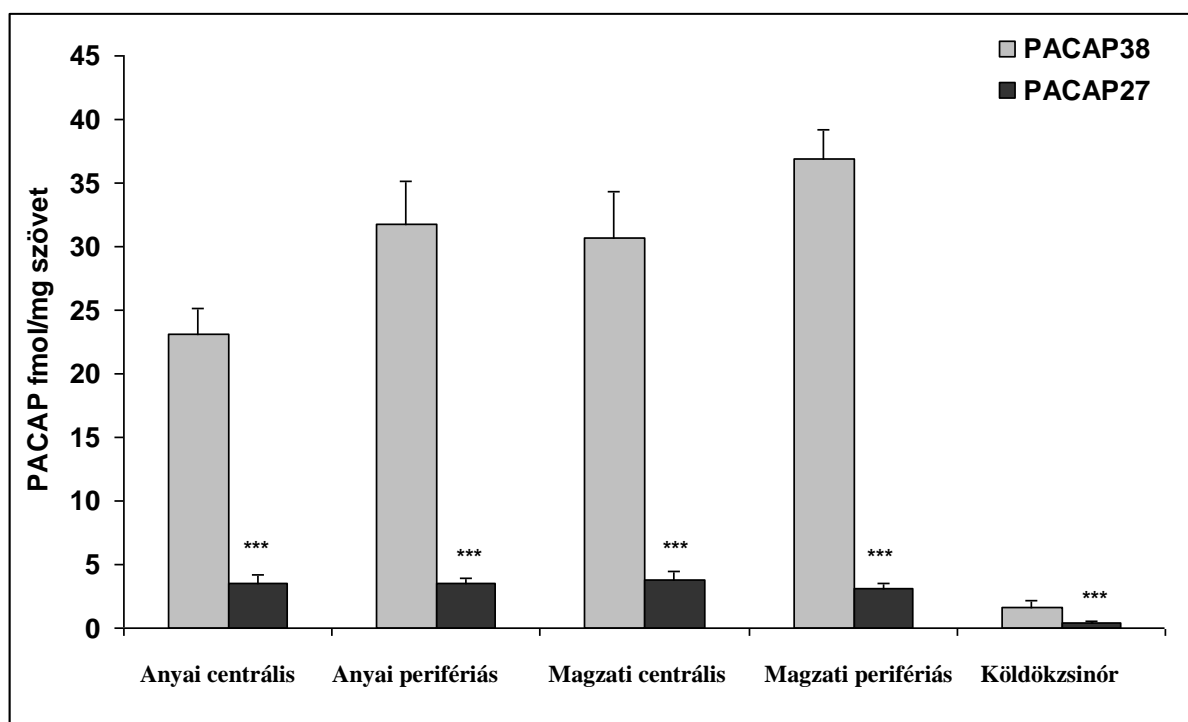
Eredményeinket átlag  $\pm$  S.E.M. formában adtuk meg. Az eredmények adatait ANOVA teszttel hasonlítottuk össze, melyet Neuman–Keul's *post hoc* analízis követett.

A  $P < 0.05$  eredmények esetén az eltérést szignifikánsnak tekintettük.

## Eredmények

### A PACAP előfordulása a placentában

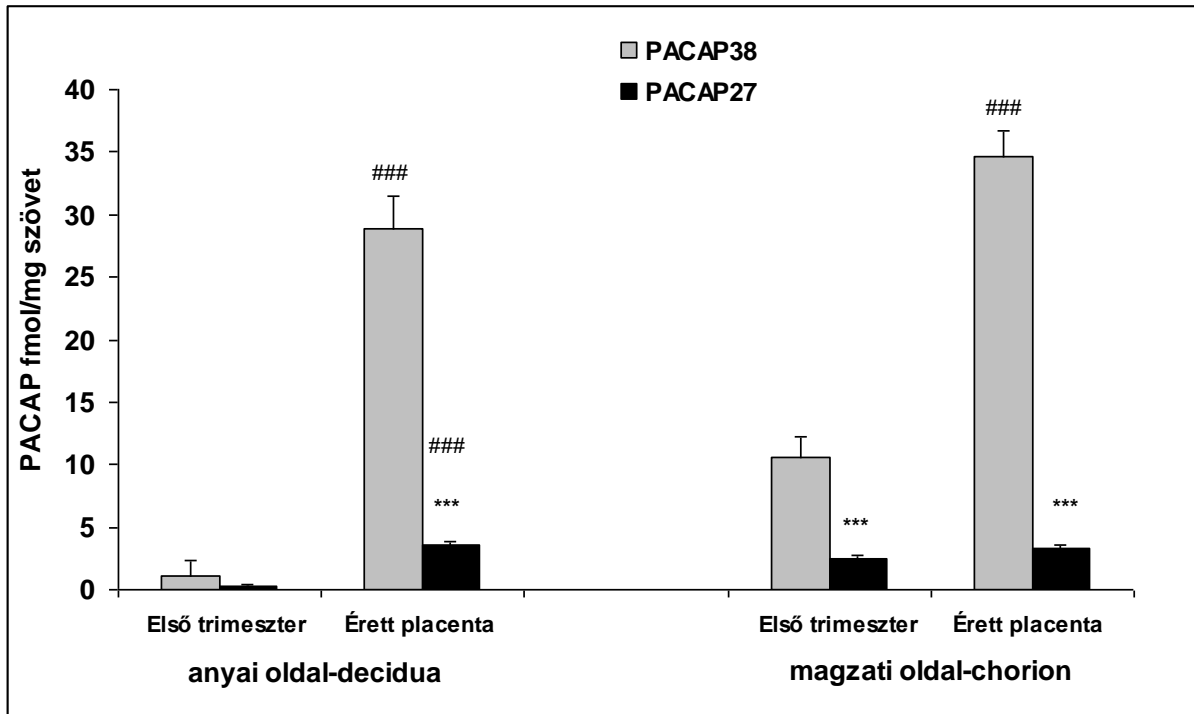
A RIA eljárás segítségével sikerült a PACAP38 és PACAP27 immunreaktivitást kimutatnunk humán placentából. A PACAP38 szignifikánsan magasabb koncentrációban fordult elő a humán placenta anyai centrális és perifériás illetve a magzati centrális és perifériás részében mint a PACAP27. A peptid mindkét formája alacsony koncentrációban volt jelen a köldökszínórban, de a PACAP38 szintje itt is szignifikánsan magasabb volt a PACAP27 szintjénél (5. ábra).



5. ábra: A placenta különböző részeiből vett minták PACAP koncentrációja fmol/mg-ban.

\*\*\* $P < 0,001$  vs PACAP38

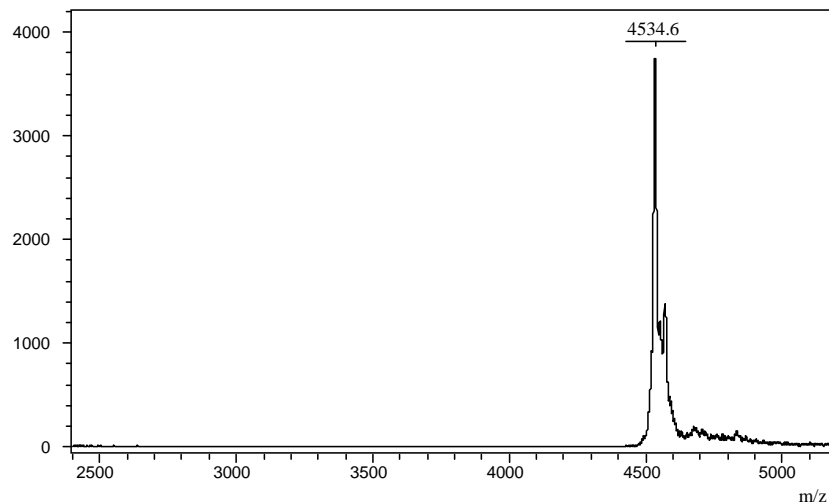
A PACAP mindkét formája detektálható volt a 9 hetes abortumok anyai és magzati oldalából vett mintákból egyaránt (6. ábra). A PACAP27 szintje csak a magzati oldalon mutatott szignifikáns emelkedést a terhesség előrehaladtával, ezzel szemben a PACAP38 koncentrációja mind a magzati, mind az anyai oldalon szignifikánsan emelkedett a terminushoz közeledve.



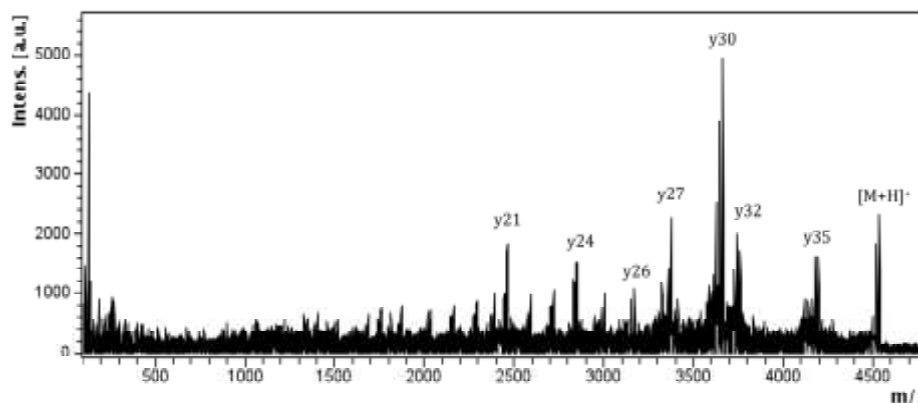
**6. ábra:** A 9 hetes abortumokból és érett placentákból származó minták PACAP38 és PACAP27 koncentrációjának összehasonlítása. \*\*\* $P < 0,001$  vs érett placenta PACAP38 és PACAP27 koncentrációja, ###  $P < 0,001$  vs hozzá tartozó első trimeszteres PACAP38 vagy PACAP27 koncentráció.

## Tömegspektrometriai vizsgálatok

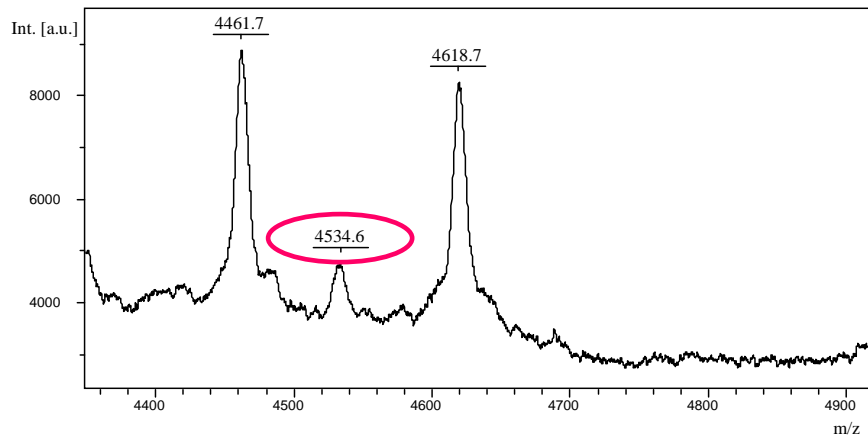
Kísérleteink során humán tüszőfolyadék, magzatvíz, hüvelyváladék, nyál, orrváladék és csarnokvíz mintákat a PACAP standarddal együtt MALDI TOF tömegspektrométer segítségével vizsgáltuk. A PACAP-38 kvázi-molekula ionját (MW: 4534.6 Da) a standardban (7A. ábra) és mind a 40 tüszőfolyadékban (8A. ábra) detektáltuk. A humán magzatvíz (9. ábra), hüvelyváladék (10. ábra), nyál (11. ábra), orrváladék (12. ábra) és csarnokvíz (13. ábra) esetében nem tudtuk kimutatni a PACAP38-ra jellemző csúcsot. Ezt követően a tüszőfolyadékban elvégeztük a PACAP38 csúcs fragmentációját MALDI TOF/TOF alkalmazásával. A kísérlet eredményeként kapott y fragmensek egyezést mutattak a korábbi vizsgálatok alapján rendelkezésre álló a PACAP38 szülő ion y fragmenseivel és aminosav szekvenciáival (7B és 8B. ábra). Így kapott eredményeink egyértelműen bizonyítják a PACAP-38 jelenlétét humán tüszőfolyadékban.



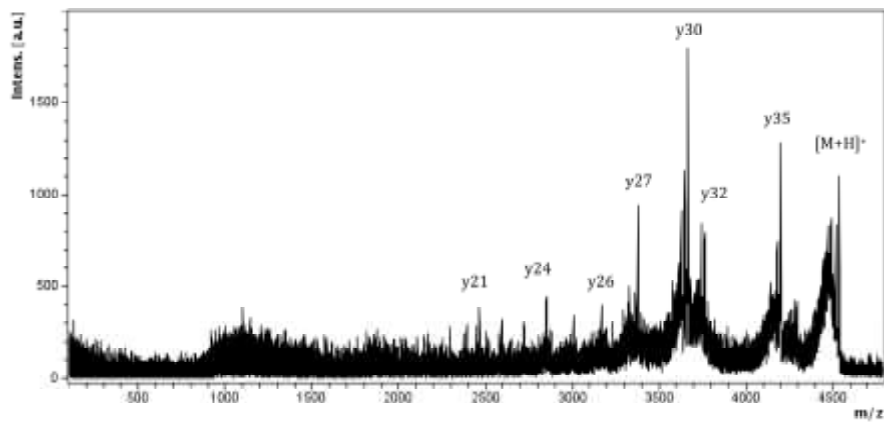
7A. ábra: Tömegspektrum a PACAP38 protonált kvázi molekula ionjáról standardban.



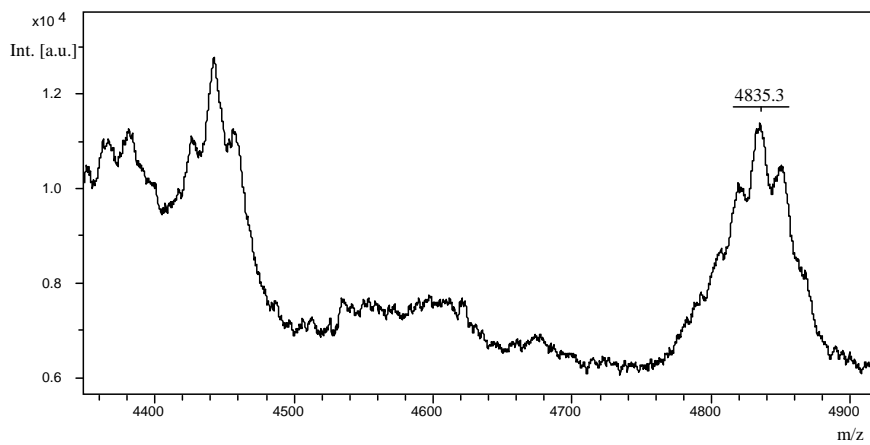
7B. ábra: PACAP38 standard tömegspektruma MALDI TOF/TOF mérést követően kapott y fragmensekkel.



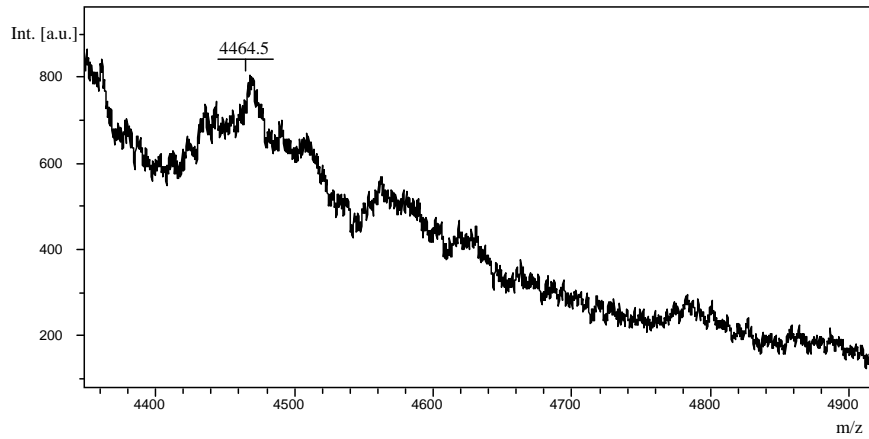
8A. *ábra:* Humán tüszőfolyadék tömegspektruma PACAP38-ra jellemző csúccsal.



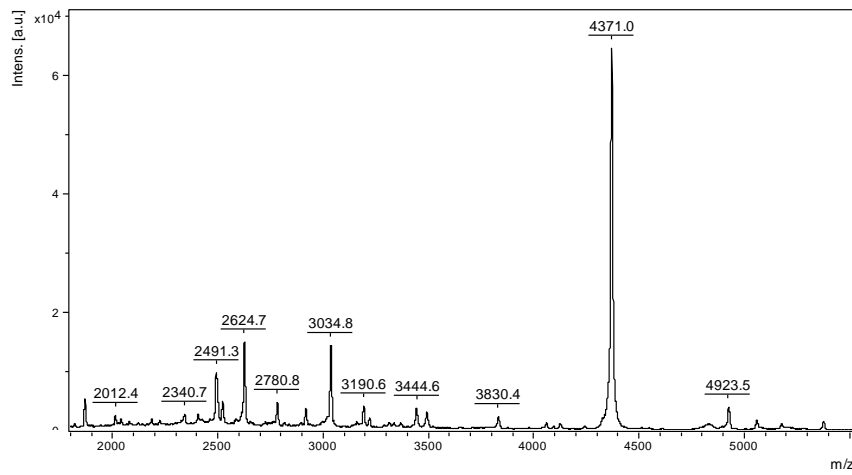
8B. *ábra:* Humán tüszőfolyadék tömegspektruma MALDI TOF/TOF mérést követően kapott y fragmensekkel.



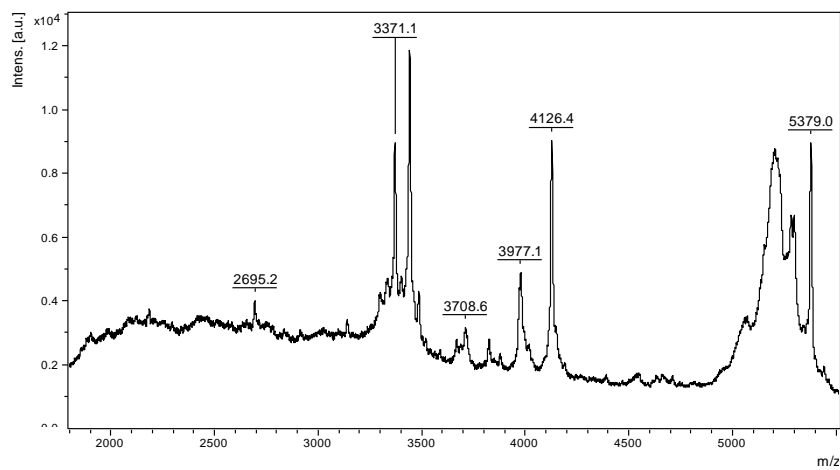
9. *ábra:* Humán magzatvíz tömegspektruma a PACAP38-ra jellemző csúcs nélkül.



**10. ábra:** Humán hüvelyváladék tömegspektruma a PACAP38-ra jellemző csúcs nélkül.

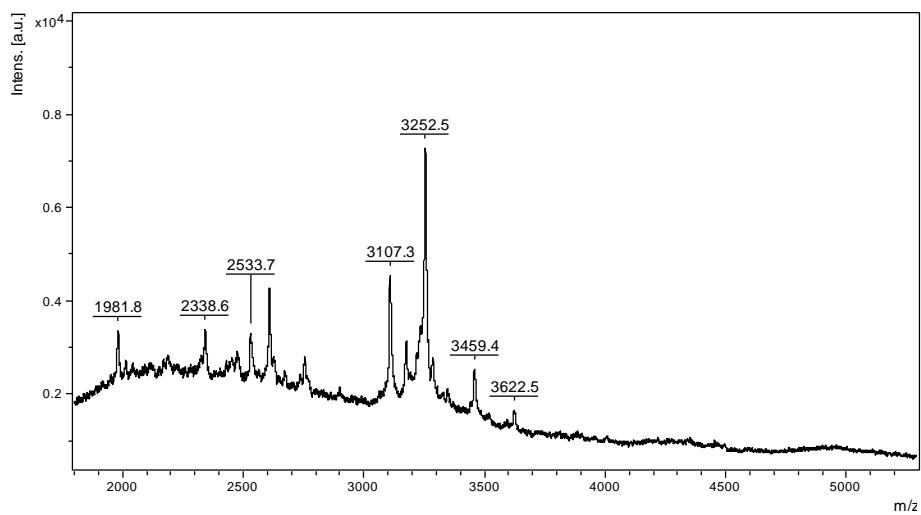


**11. ábra:** Humán nyál tömegspektruma a PACAP38-ra jellemző csúcs nélkül.



**12. ábra:** Humán orrváladék tömegspektruma a PACAP38-ra jellemző csúcs nélkül.



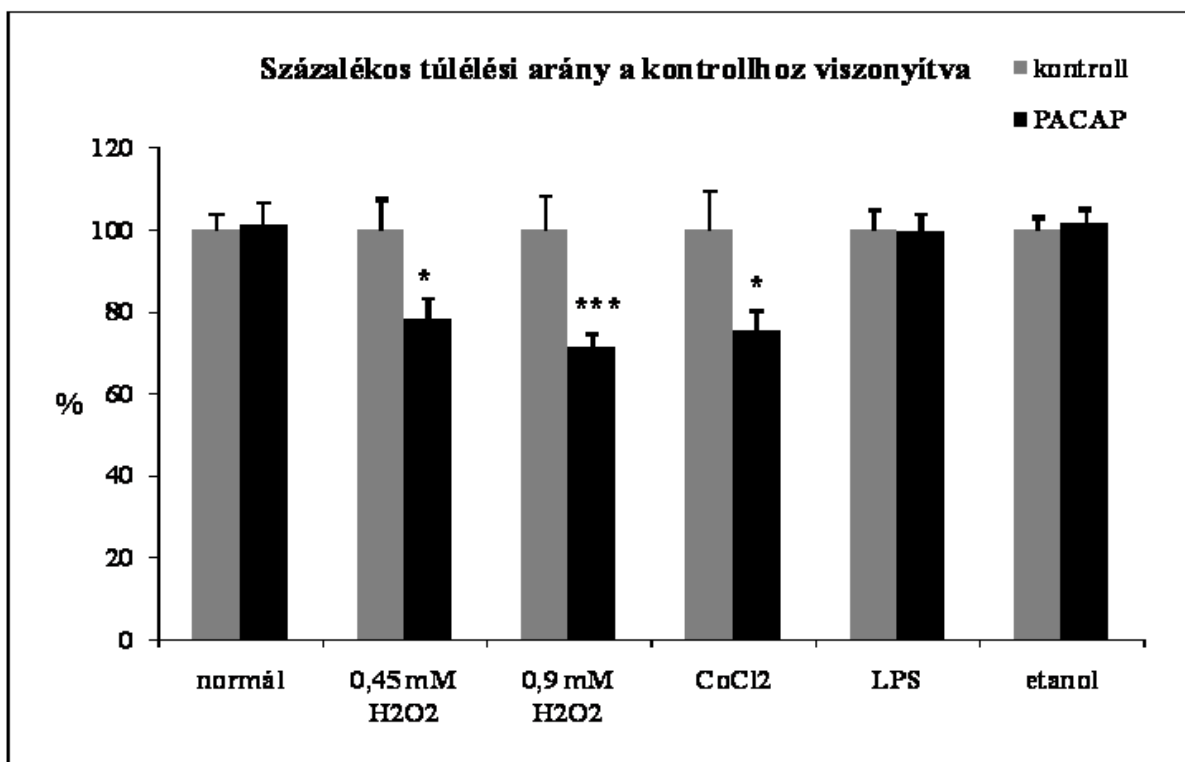


**13. ábra:** Humán csarnokvíz tömegspektruma a PACAP38-ra jellemző csúcs nélkül.

## *PACAP hatása choriocarcinoma sejtek túlélésére*

### **A. PACAP38 hatása JAR sejtekre különböző toxikus hatások esetében**

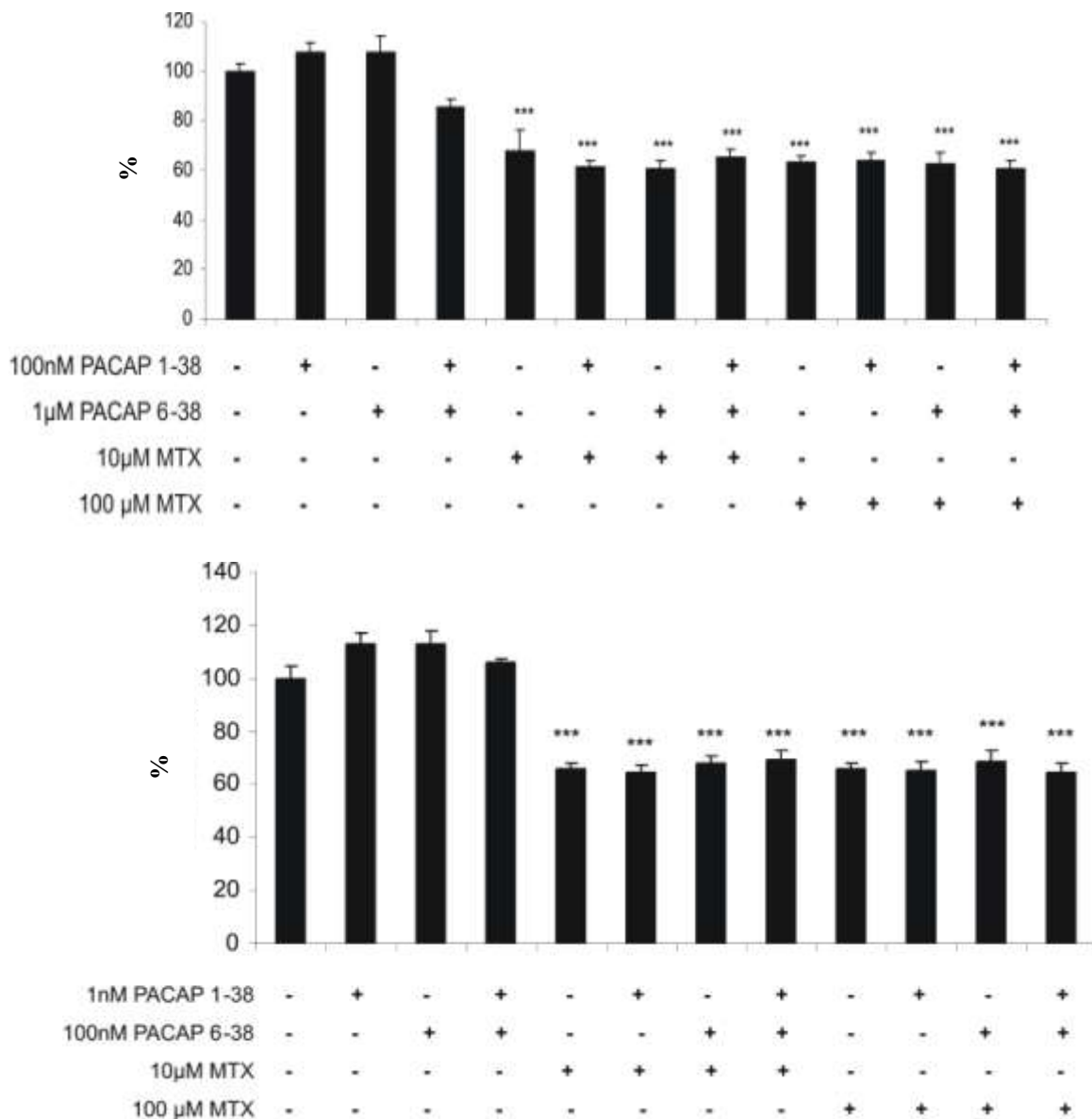
A PACAP38 kezelés önmagában nem befolyásolta a JAR sejtek túlélését. Meglepő módon nem találtunk protektív hatást azon sejteknél sem, melyek eltérő koncentrációjú H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal és PACAP38-al lettek kezelve. Sőt, ezen sejtek túlélési arányát az oxidatív stressz és a PACAP38 együttes alkalmazása csökkentette, ez a hatás erőteljesebben mutatkozott azonban a magasabb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentráció esetén. Hasonló eredményt láttunk azon csoportnál, amely CoCl<sub>2</sub> okozta kémiai hypoxiában szenvedett, itt is csökkentette a sejtek túlélési arányát a kettős kezelés. Nem figyelhető meg szignifikáns változás a túlélési arányban LPS vagy etanol hatására sem (14. ábra).



**14. ábra:** JAR sejtek túlélési aránya a kontroll sejtekhez viszonyítva különböző toxikus kezeléseket követően. \* $P < 0,05$  vs kontroll sejtek túlélési aránya, \*\*\* $P < 0,001$  vs kontroll sejtek túlélési aránya

**B. PACAP38 hatása JAR sejtekre citosztatikus kezelés esetében**

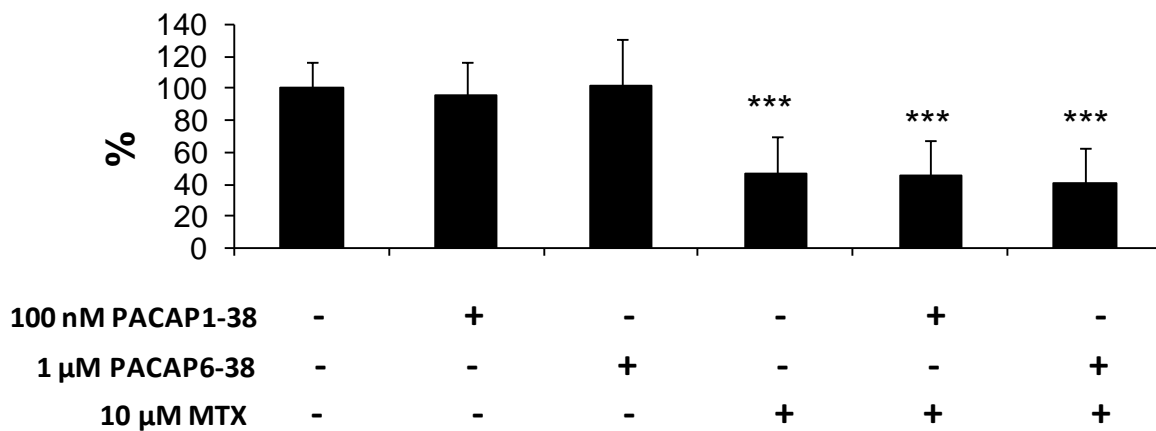
A JAR sejtek túlélését sem a PACAP1-38, sem a PACAP6-38 kezelés önmagában, sem együttes alkalmazásuk nem befolyásolta. A citosztatikus kezelés hatására a sejttúlélés szignifikáns mértékben lecsökkent. Meglepő módon abban az esetben sem találtunk sem protektív, sem toxikus hatást azon sejteknél, melyek eltérő koncentrációjú MTX-al és PACAP1-38-al vagy PACAP6-38-al vagy ezek kombinációjával lettek kezelve (15. ábra)



**15. ábra:** JAR sejtek túlélési aránya a kontroll sejtekhez viszonyítva citosztatikus, PACAP1-38 és PACAP6-38, valamint kombinált alkalmazásukat követően. \*\*\* $P < 0,001$  vs kontroll sejtek túlélési aránya.

## *PACAP hatása extravillosus cytotrophoblast sejtek túlélésére*

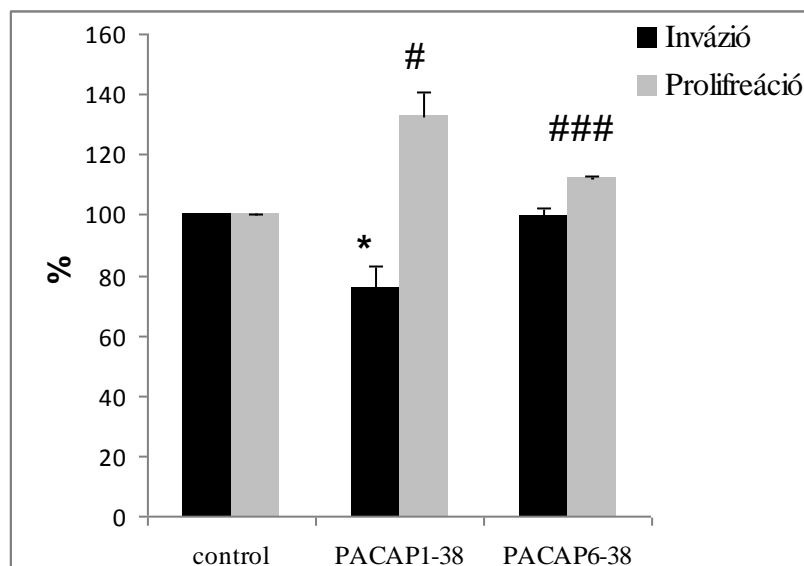
A HIPEC sejtek túlélését sem a PACAP1-38, sem a PACAP6-38 kezelés önmagában nem befolyásolta. Ezen sejtvonal esetében sem találtunk védő, vagy toxikus hatást azoknál a sejtcsoportoknál, melyek MTX-al és PACAP1-38-al vagy PACAP6-38-al lettek kezelve (16. ábra).



**16. ábra:** HIPEC sejtek túlélési aránya a kontroll sejtekhez viszonyítva citosztatikus, PACAP1-38 és PACAP6-38 illetve ezek kombinált alkalmazását követően. \*\*\* $P < 0,001$  vs kontroll sejtek túlélési aránya.

## ***PACAP hatása extravillosus cytotrophoblast sejtek inváziójára és proliferációjára***

A HIPEC sejtek inváziós készségét a PACAP1-38 gátolta, viszont proliferációját elősegítette. A PACAP6-38 az invázióra semmilyen hatást nem gyakorolt, viszont a proliferációt szignifikáns mértékben fokozta (17.ábra).



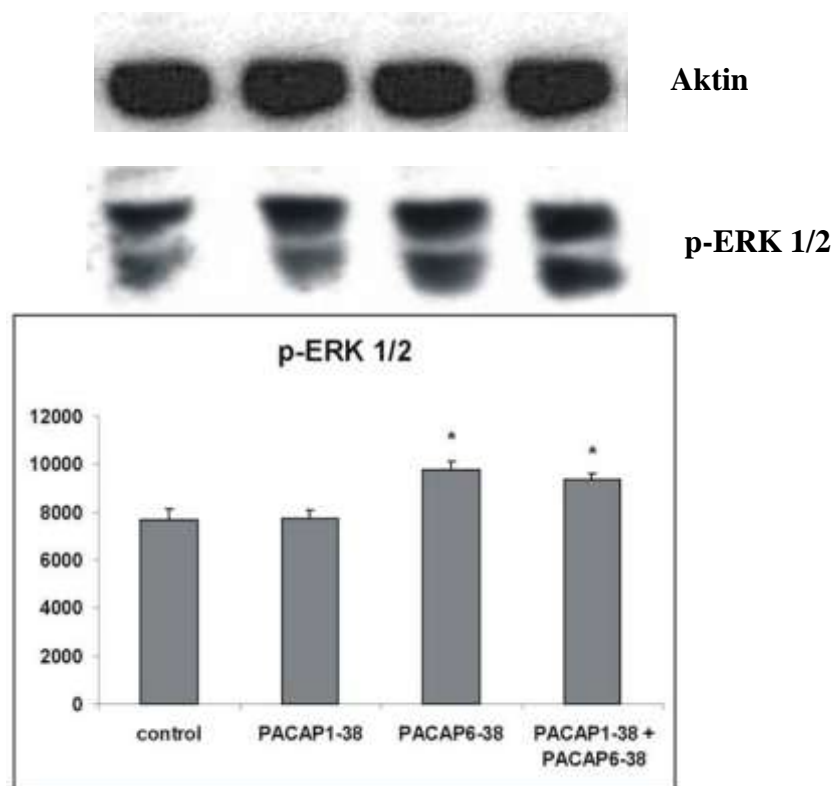
**17. ábra:** HIPEC sejtek inváziós készségének és proliferációjának aránya a kontroll sejtekhez viszonyítva PACAP1-38 és PACAP6-38 alkalmazását követően. \* $P < 0,5$  vs kontroll sejtek inváziós készsége, # $P < 0,5$  vs kontroll sejtek proliferációja, ### $P < 0,001$  vs kontroll sejtek proliferációja.

## *PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek jelátviteli útvonalaira*

### **A.) PACAP1-38 és PACAP6-38 hatása JAR sejtekre**

#### **ERK1/2**

Az ERK1/2 aktív, foszforilált formáját kimutattuk a kontroll sejteknél, expressziója azonban PACAP1-38 kezelést követően nem változott. Ezen jelátviteli útvonal aktivációja szignifikáns emelkedést mutatott PACAP6-38 alkalmazása esetén, hasonló emelkedés volt megfigyelhető PACAP1-38 és PACAP6-38 kombinált kezelése esetében (18.ábra).

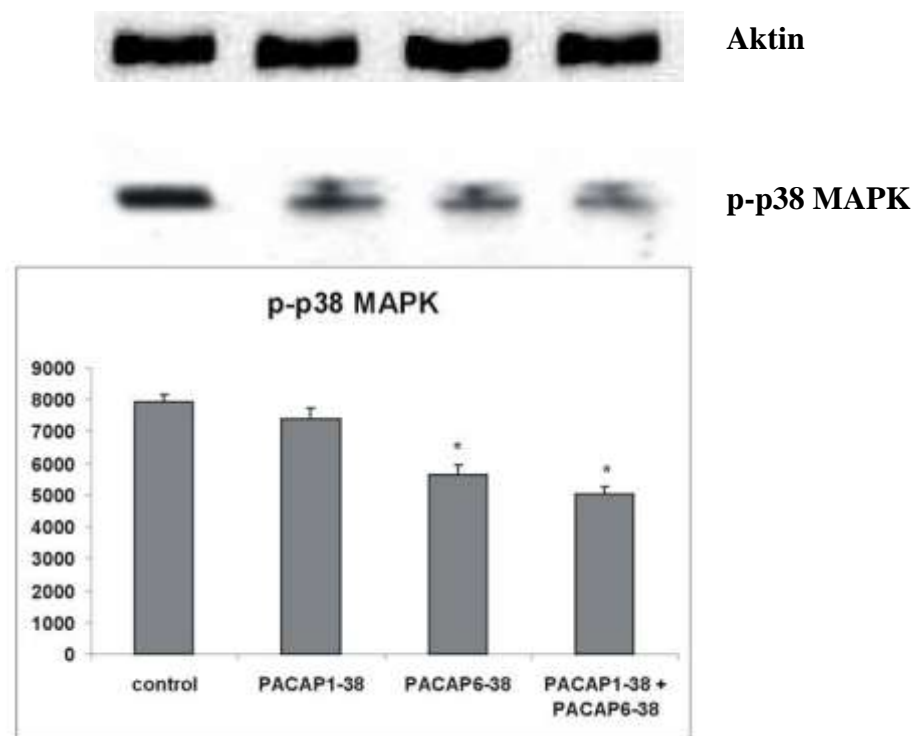


**18. ábra:** ERK1/2 által mediált jelátviteli útvonal aktivitása különböző kezeléseket követően.

\* $P < 0,05$  vs kontroll csoport

## p38 MAPK

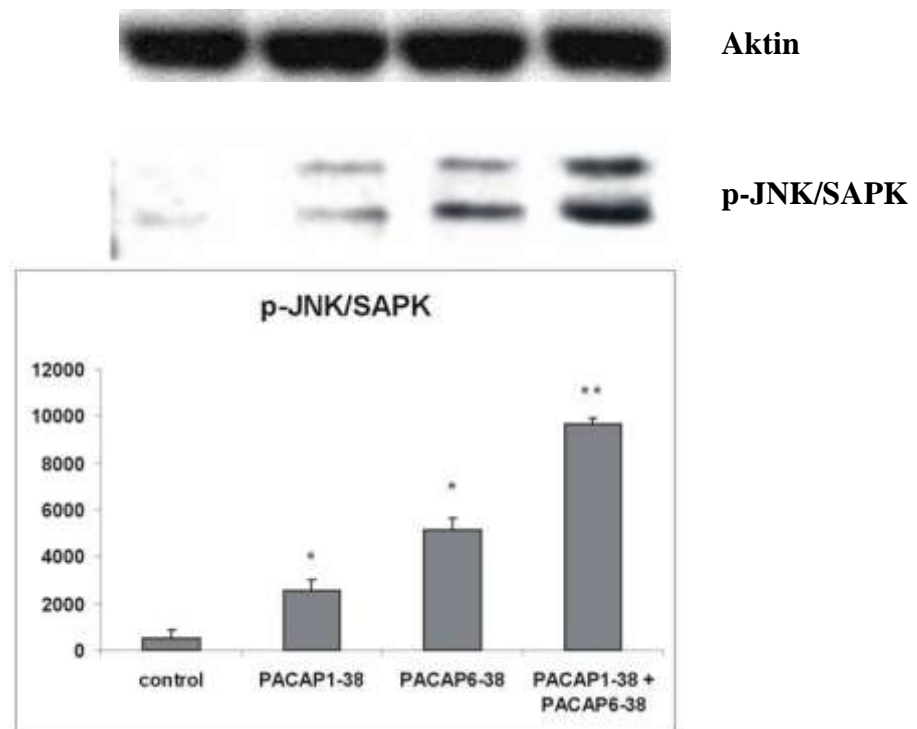
A p38 MAPK aktivációja esetében az ERK1/2-el ellentétes eredményeket kaptunk. A p38 MAPK foszforilációja kis mértékben csökkent PACAP1-38 hatására, majd szignifikáns csökkenést mutatott PACAP6-38 kezelés hatására. PACAP1-38 és PACAP6-38 együttes alkalmazás esetén ez a szignifikáns aktiváció csökkenés még nagyobb mértékben volt megfigyelhető (19. ábra).



**19. ábra:** A p38 MAPK által mediált jelátviteli útvonal aktivitása különböző kezeléseket követően. \* $P < 0,05$  vs kontroll csoport

## JNK/SAPK

A JNK/SAPK aktivációja csak kis mértékben volt kimutatható a kontroll sejtek esetében. Foszforilációja már szignifikáns mértékben emelkedett csak PACAP1-38 kezelés hatására is, még nagyobb emelkedést mutatott PACAP6-38 esetében. Kombinált alkalmazásuk esetében ez az aktiváció még jobban megemelkedett (20. ábra).



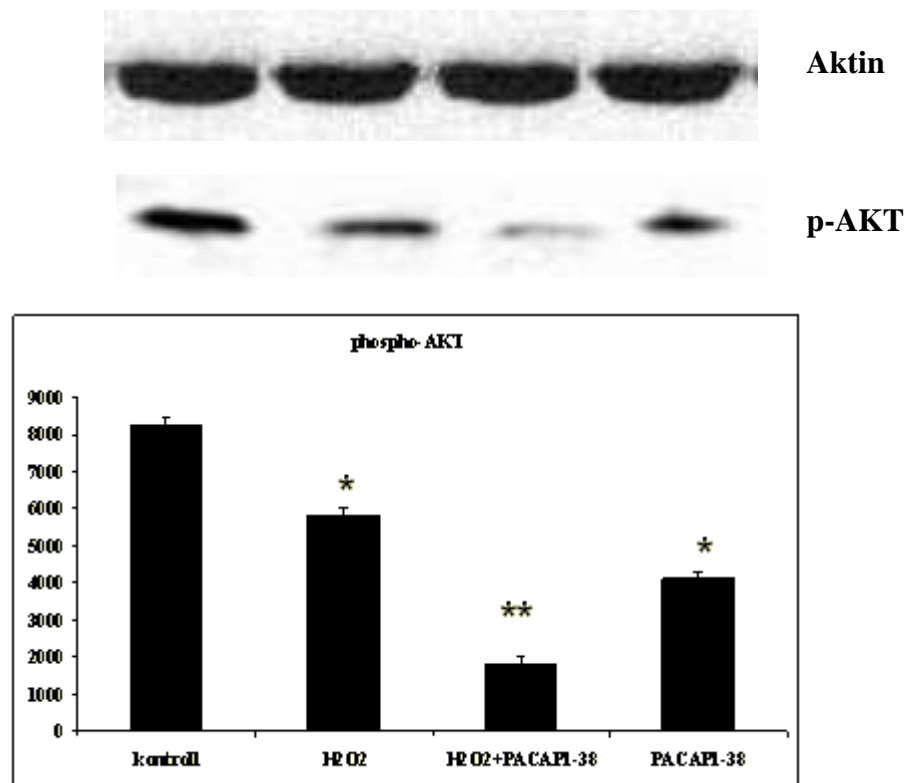
**20. ábra:** A pJNK/SAPK által mediált jelátviteli útvonal aktivitása különböző kezeléseket követően. \* $P < 0,05$  vs kontroll csoport, \*\* $P < 0,01$  vs kontroll csoport



## B.) PACAP1-38 hatása JAR sejtekre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés esetében

### Akt

Az Akt aktív formáját kimutattuk a kontroll sejteknél, expressziója azonban PACAP1-38 kezelést követően jelentős mértékben csökkent. Hasonló hatást figyelhettünk meg azoknál a sejteknél, melyek csak oxidatív stressznek voltak kitéve. Abban az esetben, amikor a sejteket PACAP1-38 előkezelést követően H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezeltük, ezen protektív jelátviteli útvonal aktivációja még szignifikánsabb mértékben lecsökkent (21. ábra).

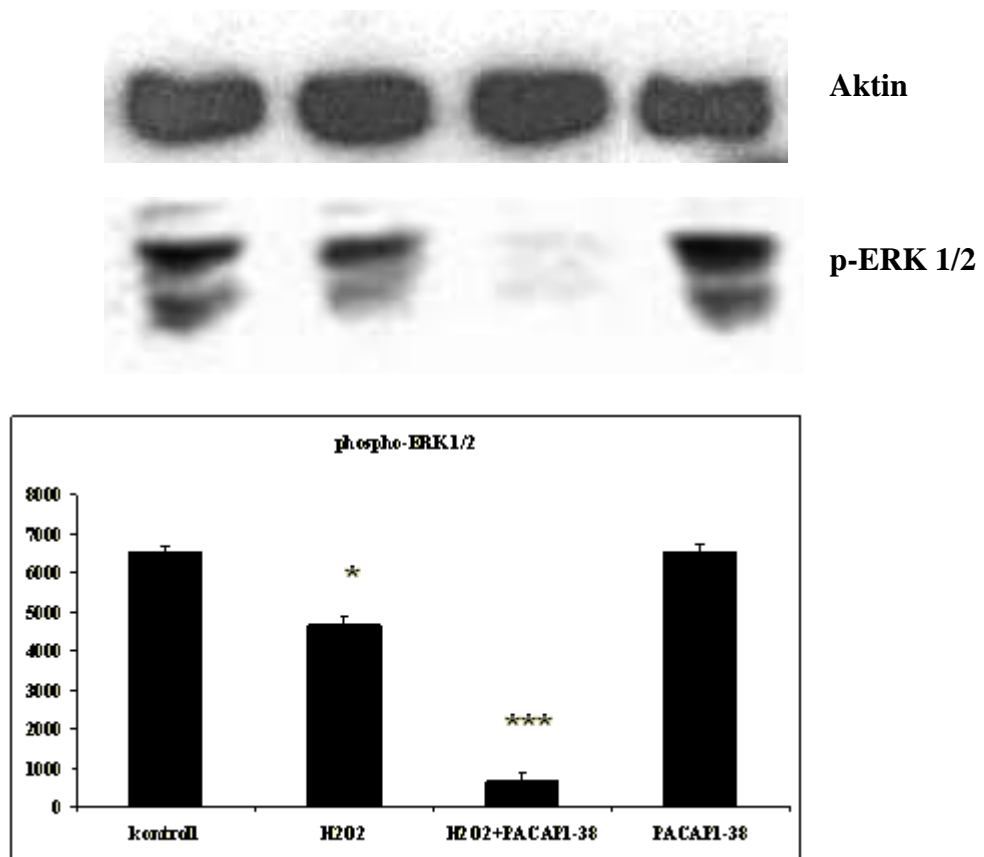


**21. ábra:** Az Akt által mediált jelátviteli útvonal aktivitása különböző kezeléseket követően.

\* $P < 0,05$  vs kontroll csoport \*\* $P < 0,01$  vs kontroll csoport

## ERK1/2

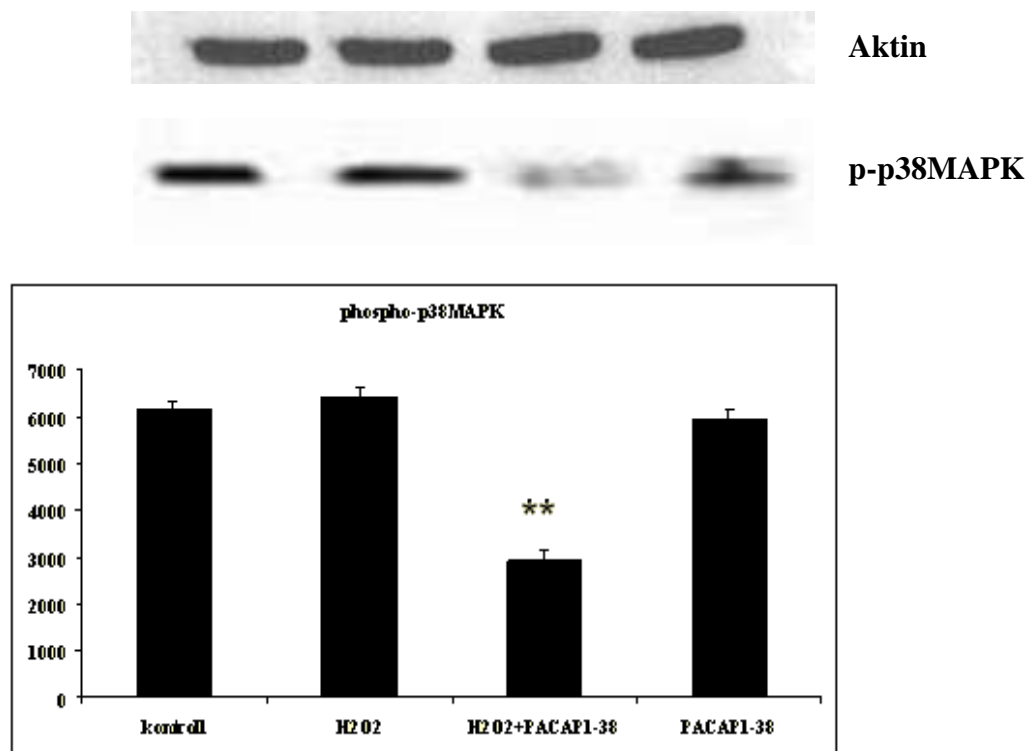
Kísérletünk során nem volt kimutatható aktivitásváltozás annál a sejtcsoportnál, mely csak PACAP38 kezelésben részesült a kontroll sejtekhez viszonyítva. A ERK1/2 foszforilációja szignifikánsan lecsökkent azoknál a sejteknél, melyek csak oxidatív stresszben részesültek, illetve további szignifikáns csökkenést mutat abban az esetben, amikor a sejtek mindkét hatásnak ki voltak téve (22. ábra).



**22. ábra:** Az ERK1/2 által mediált jelátviteli útvonal aktivitása különböző kezeléseket követően. \* $P < 0,05$  vs kontroll csoport \*\*\* $P < 0,001$  vs kontroll csoport

## p38 MAPK

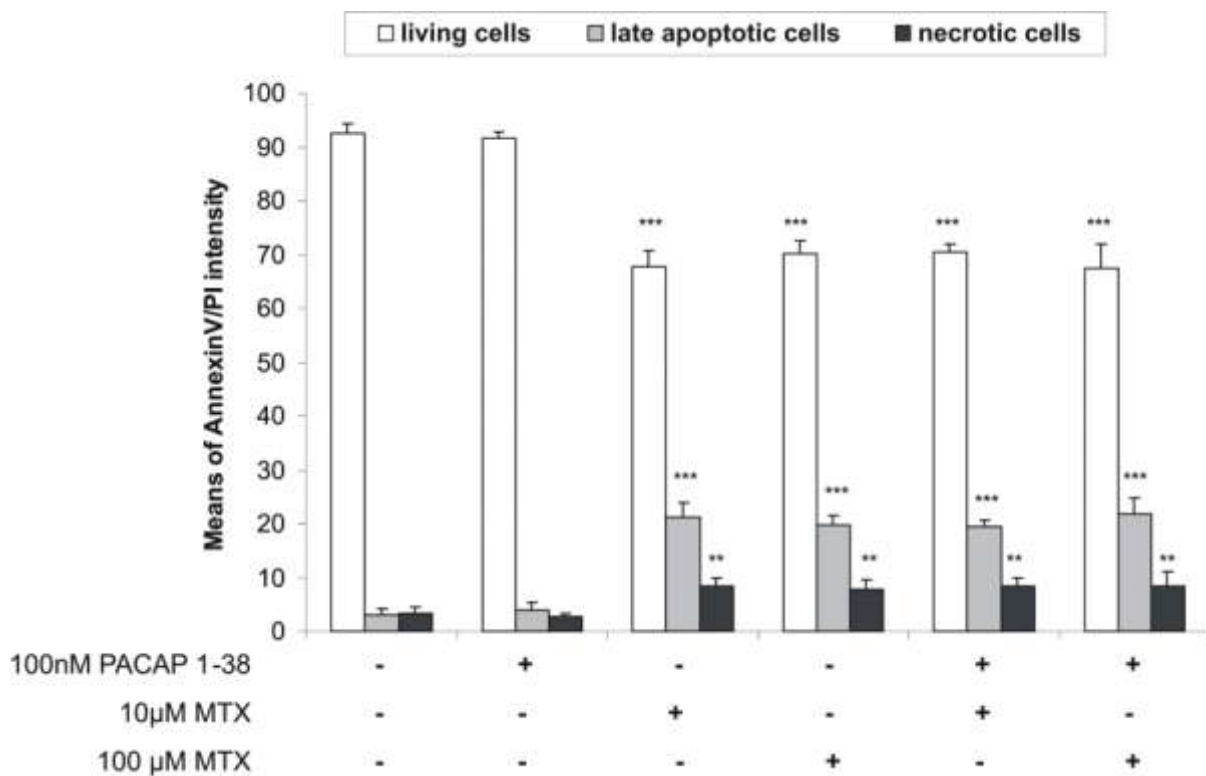
A p38 MAPK foszforilációja nem változott abban az esetben, amikor a sejtek csak PACAP kezelésben részesültek, illetve akkor sem, mikor a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> által kifejtett oxidatív stresszben szenvedtek. A PACAP és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> egyidejű alkalmazása esetén viszont ezen protektív jelátviteli útvonal aktivációja szignifikáns csökkenést mutat (23. ábra).



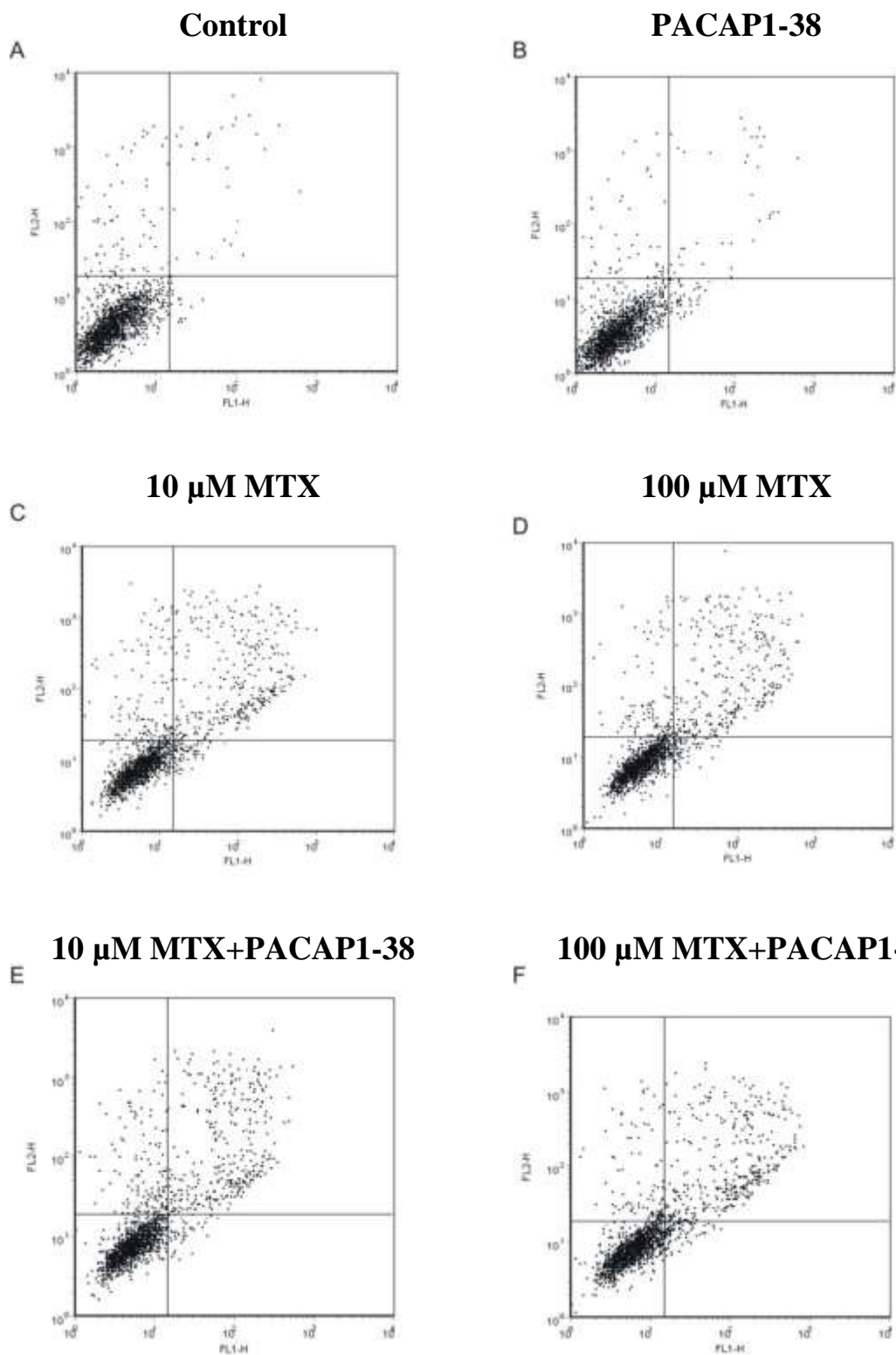
23. ábra: A p38 MAPK által mediált jelátviteli útvonal aktivitása különböző kezeléseket követően. \*\* $P < 0,01$  vs kontroll csoport

**Apoptózis és nekrozis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel JAR sejteknél**

A flow citométerrel kapott eredményeink azt mutatják, hogy a MTX-kezelt csoportban az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent mind 10  $\mu$ M, mind pedig 100  $\mu$ M alkalmazott koncentráció esetén. A PACAP1-38-kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz képest, ezen kívül sem védő sem toxikus hatást nem fejtett ki egyik MTX koncentrációval szemben sem (24., 25. ábra).



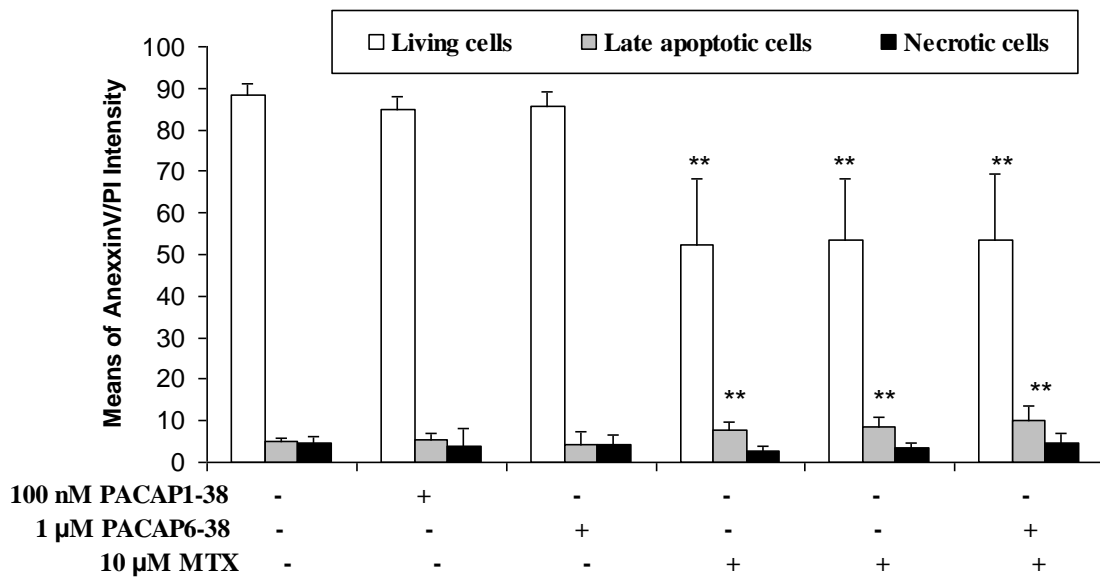
**24. ábra:** A JAR sejtek túlélésének flow citométerrel kapott eredményeinek számszerű ábrázolása átlag $\pm$ SEM. \*\* $P < 0,01$  vs kontroll sejtek túlélési aránya, \*\*\* $P < 0,001$  vs kontroll sejtek túlélési aránya



**25. ábra:** PACAP hatása a citosztatikumnak kitett JAR sejtek túlélésére különböző kezelések esetén. Flow citometriai analízis az élő, nekrotikus, korai és késői apoptotikus JAR sejtek elkülönítésére. Bal alsó kvadráns: egészséges sejtek, jobb alsó kvadráns: korai apoptotikus sejtek, jobb felső kvadráns: késői apoptotikus sejtek, bal felső kvadráns: nekrotikus sejtek.

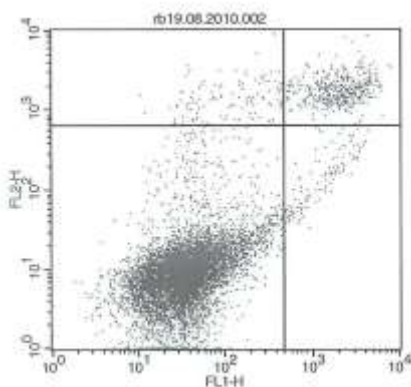
**Apoptózis és nekrozis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel HIPEC sejteknél**

A flow citométerrel kapott eredményeink ebben az esetben is azt mutatják, hogy a MTX-al (10 µM) kezelt csoportban az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent. A PACAP1-38 illetve a PACAP6-38 kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz viszonyítva, ezen kívül ebben az esetben sem mutattak sem védő, sem toxikus hatást a MTX kezeléssel szemben (26., 27. ábra).

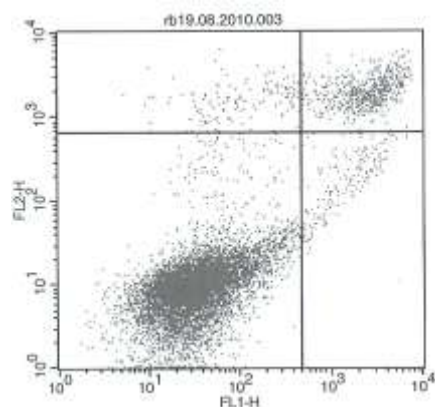


**26. ábra:** A HIPEC sejtek túlélésének flow citométerrel kapott eredményeinek számszerű ábrázolása átlag±SEM. \*\*P<0,01 vs kontroll sejtek túlélési aránya

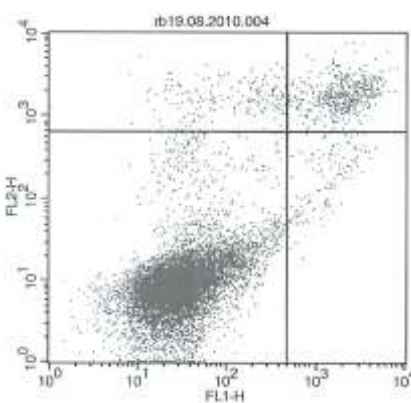
**Control**



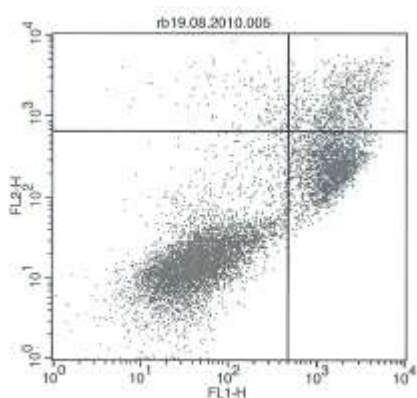
**PACAP1-38**



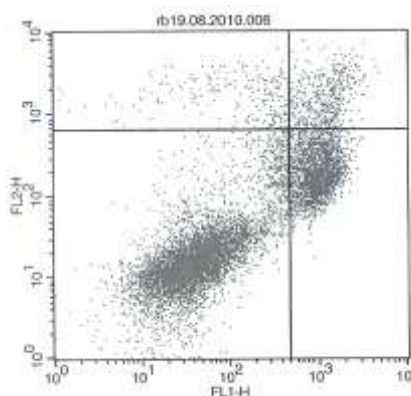
**PACAP6-38**



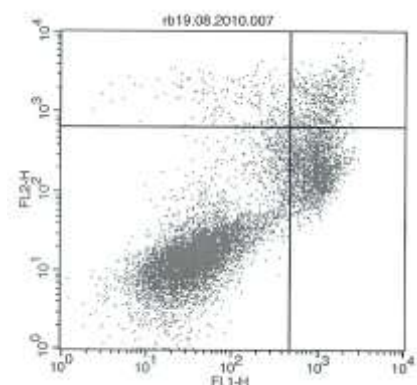
**MTX**



**MTX+PACAP1-38**



**MTX+PACAP6-38**



**27. ábra:** PACAP hatása a citosztatikumnak kitétt HIPEC sejtek túlélésére különböző kezelések esetén. Flow citometriai analízis az élő, nekrotikus, korai és késői apoptotikus HIPEC sejtek elkülönítésére. Bal alsó kvadráns: egészséges sejtek, jobb alsó kvadráns: korai apoptotikus sejtek, jobb felső kvadráns: késői apoptotikus sejtek, bal felső kvadráns: nekrotikus sejtek.

## ***Megbeszélés***

### **A PACAP előfordulása a placentában**

Kísérleteink során mind a PACAP38-at, mind a PACAP27-et kimutattuk a humán érett placenta minden részében, a PACAP38 magasabb, a PACAP27 alacsonyabb koncentrációban fordult elő. A két peptid között mért koncentrációkülönbség mértéke megegyezik korábbi placentán végzett vizsgálatok eredményeivel (Steenstrup és mtsai, 1996). A PACAP placentában mért koncentrációtartománya közel azonos az agyban mért koncentrációtartománnyal, ahol a legmagasabb a peptid szintje az egész szervezetben (Németh et al., 2006, 2007; Kiss et al., 2007, Józsa et al., 2006). Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP szintje emelkedik a terhesség előrehaladtával, mind az anyai, mind a magzati oldalon. Ez jól korrelál korábbi kísérleti eredményekkel, melyek szerint a PACAP mRNS és a PAC1 receptor mRNS szintje emelkedik a terminushoz közeledve (Koh et al., 2005), illetve a méhnyakban és a gerincvelőben található PACAP szintje a terhesség előrehaladtával változást mutat (Spencer et al., 2001). Kimutattuk továbbá, hogy a placentában a 38 aminosavas forma a domináns, ami összhangban van azzal, hogy a humán szövetekben a PACAP38 sokkal magasabb koncentrációban van jelen a PACAP27-hez viszonyítva (Vaudry et al., 2000; Koh et al., 2005; Németh et al., 2007; Hannibal et al., 1998). A PACAP magas koncentrációjából arra következtethetünk, hogy a peptid fontos szerepet tölthet be a placentában. Ezt a feltételezést támasztja alá PACAP knockout egerek csökkent fertilitása és implantációs képessége (Isaac és Sherwood, 2008), továbbá, hogy a PACAP fontos szerepet tölt be az uteroplacentáris egység működésének szabályozásában, mivel relaxációt okoz a bolyhok ereiben és az intramyometriális erekben (Steenstrup et al., 1996).

### **A PACAP előfordulása a reprodukív rendszer egyéb részeiben**

Vizsgálataink alapján kimutattuk, hogy a PACAP38 megtalálható az általunk vizsgált összes humán tüszőfolyadékban. A tüszőfolyadék médiumként szolgál a fejlődő petesejt számára, illetve fontos szerepet tölt be a germinális sejtek morfológiai és funkcionális fejlődésében. A PACAP kimutatható fejlődési stádiumtól függően a nagy érett tüszők



granulosa sejtjeiben peteérés előtt. Kisebb mennyiségben azonban éretlen antrális és preantrális tüszőkben is expresszálódik (Gras et al., 1996; 2005; Park et al., 2001). Ezen kívül kimutatták a PACAP receptort is a fejlődő tüszőkben (Barberi et al., 2007; Park et al., 2000; Vaccari et al., 2006). A sárgatestben mind a PACAP-ot, mind a PAC1 receptort kimutatták (Kotani et al., 1997). Valószínű, hogy a peptid szerepet játszik a primordiális csírasejtek proliferációjában (Pesce et al., 1996), az éretlen tüszők ciklikus kiválasztódásában és a fejlődés elindításában (Gras et al., 2005), a petesejtek meiotikus fejlődésében (Apa et al., 1997a) és a petefészek hormon- illetve enzim termelésében (Apa et al., 1997b; 2002; Sayasith et al., 2007). Eredményünk, hogy a PACAP kimutatható az általunk vizsgált összes tüszőfolyadékából, alátámasztja a feltételezést, hogy a PACAP fontos biológiai szerepet tölt be a tenyésztő folyadékként funkcionáló tüszőfolyadékban a fejlődő petesejtek számára. Ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Humán magzatvízben, hüvelyváladékban, orrváladékban, nyálban és csarnokvízben nem tudtuk kimutatni a PACAP-ot tömegspektrométer segítségével. Ennek oka lehet a PACAP teljes hiánya ezen mintákban, vagy a peptid szintje annyira alacsony, hogy nem éri el a detektálási limitet. A peptid hiánya ebben az esetben nem feltétlenül zárja ki azt a lehetőséget, hogy a PACAP megtalálható kóros elváltozások esetében, mivel az általunk vizsgált minták olyan önkéntes nőtől vagy egészséges önkéntesektől származtak, akik anamnézisében nem volt ismert betegség. A gyors lebomlás kizárható, mivel a mintákhoz megfelelő mennyiségű peptidáz-gátlót adtunk. Ezen kívül előfordulhat, hogy a peptid egy módosult formában van jelen az általunk vizsgált mintákban, melynek kiderítése még további vizsgálatokat igényel. Mindemellett eredményeink ismeretében arra következtethetünk, hogy fiziológiai körülmények között a PACAP nem mutatható ki humán magzatvízből, hüvelyváladékából, orrváladékából, nyálból és csarnokvízből.

## **PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek túlélésére és jelátviteli útvonalaira**

### *PACAP1-38 és PACAP6-38 hatásai choriocarcinoma sejtek túlélésére*

Vizsgálatainkban a PACAP kezelés számos hatását leírtuk JAR sejtek túlélését és jelátviteli útvonalait illetően. Arra az eredményre jutottunk, hogy egy órás PACAP1-38 vagy PACAP6-38 előkezelés nem változtatta meg szignifikánsan a trophoblast sejtek túlélési arányát, viszont azoknál a sejteknél, melyek oxidatív stressznek és hypoxiának is ki voltak

téve, a PACAP1-38 előkezelés szignifikánsan csökkentette a túlélést. Ebből arra következtethetünk, hogy a PACAP38 potenciózza ezen toxikus hatásokat. Ezt nem figyelhetjük meg azoknál a csoportoknál, amelyek LPS, etanol vagy MTX kezelést kaptak.

#### *PACAP1-38 és PACAP6-38 hatása JAR sejtekre*

Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP1-38 kezelés önmagában nem változtatta meg az ERK1/2 és a p38MAPK foszforilációját. Az ERK1/2 esetében a PACAP6-38 szignifikánsan emelte ezen jelátviteli útvonal aktivációját, ugyanezt a hatást figyelhetjük meg kombinált alkalmazásukat követően. A p38MAPK esetében pont ellenkező hatást figyelhettünk meg, a PACAP6-38 és a PACAP1-38 való együttes alkalmazása estén ezen jelátviteli útvonal foszforilációja szignifikáns mértékben lecsökkent. A JNK/SAPK jelátviteli útvonal esetében a PACAP1-38 kezelés szignifikáns aktivációemelkedést hozott létre, amely ugyan fokozódott PACAP6-38 kezelést követően is, de sokkal szignifikánsabb foszforilálódás volt megfigyelhető kombinált alkalmazásuk esetén.

#### *PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek túlélésére methotrexate kezelés hatására*

Vizsgálatainkban arra az eredményre jutottunk, hogy a PACAP1-38 vagy a PACAP6-38 kezelés önmagában nem változtatott a vizsgált sejtvonal túlélésén, MTX egyedüli alkalmazása esetén a túlélés körülbelül a felére csökkent le. A citosztatikum és PACAP1-38 vagy PACAP6-38 kombinált alkalmazása esetén ugyanezt a hatást kaptuk, tehát a peptid és az antagonistája sem mutatott védő vagy toxikus hatást.

#### *PACAP hatásai choriocarcinoma sejtek jelátviteli útvonalaira toxikus körülmények között*

Eredményeink azt mutatják, hogy önmagában a PACAP38 kezelés nem változtat az ERK1/2 és a p38 MAPK foszforilációján, de csökkenti az Akt aktivációját. A PACAP-al és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal történő együttes kezelést követően csökken a fenti jelátviteli útvonalak foszforilációja. Az Akt esetében a PACAP38 önmagában is csökkentette az aktivációt, így az együttes kezelést követően kialakuló csökkenés additív hatásnak minősül. Az ERK1/2 és a

p38 MAPK esetében a PACAP38 önmagában nem csökkentette az aktivációt, így az együttes kezelés következtében kialakuló csökkenés ezekben az esetekben potencírozó hatásnak tudható be.

### **PACAP hatásai extravillosus cytotrophoblast (HIPEC) sejtekre**

Az immortalizált extravillosus cytotrophoblast sejtek esetében, azonos körülmények között ugyanúgy viselkedett a PACAP1-38 és a PACAP6-38, mint a tumoros choriocarcinoma sejtek esetében. A HIPEC sejtek túlélésén sem változtatott a PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés önmagában, viszont a MTX szignifikánsan csökkentette a túlélést. A MTX ezen toxikus hatását ennél a sejtvonalnál sem tudta a PACAP1-38 kivédeni, vagy a PACAP6-38 erősíteni. A HIPEC sejtek invázióját és proliferációját ezidáig PPAR $\gamma$  hozzáadásával vizsgálták. A PACAP1-38-al és PACAP6-38-al ellentétben a PPAR $\gamma$  nem fokozta a proliferációt, viszont a PPAR $\gamma$  és a PACAP1-38 csökkentette az inváziós készséget, ebből arra következtethetünk, hogy ezen anyagok modulálják a cytotrophoblastok invázióját a placentában (Pavan et al., 2003). Továbbra is érdekes kérdés marad azonban, hogy a PACAP6-38 a cytotrophoblastok esetében nem antagonistá hatású. Ezen eredmények tisztázására PCR kísérleteket végzünk egy esetleges új receptor feltérképezésére a placentában.

### **A PACAP általános sejtvédő hatásától eltérő hatásai egyes sejtekben**

A PACAP-ot legtöbb esetben cytoprotektív hatása alapján jegyzik az irodalomban, ezt a tulajdonságát először neuronális sejtvonalon mutatták ki, ahol protektív hatást fejtett ki többféle toxikus stresszorzal szemben. A PACAP38 többek között védő hatást fejt ki glutamát, etanol, ceramid, 6-hidroxidopamin, HIV burokfehérje, rotenon és hypoxia okozta károsodással szemben (Brenneman et al., 2002; Morio et al., 1996; Rábl et al., 2002; Takei et al., 1998; Vaudry et al., 2002b, 2003; Wang et al., 2005). A PACAP védő hatását cerebelláris szemcsesejtek esetében is kimutatták oxidatív stresszel szemben (Vaudry et al., 2002a, 2005). Hasonló mértékű protektív hatást mutatott ki munkacsoportunk oxidatív stresszel szemben az endotél sejtek vagy szívizomsejtek esetében is (Gasz et al., 2006; Rácz et al., 2007). Jelen eredményeink ezzel teljesen ellentétben azt mutatják, hogy a PACAP nem segíti a trophoblast

sejtek túlélését. A PACAP kezelés önmagában nem változtatott a túlélési arányon, de fokozta az oxidatív stressz és *in vitro* hypoxia által okozott toxikus hatást. Ennek a potencírozó hatásnak az oka még ismeretlen.

Az irodalmi adatok azonban nem minden sejt esetében mutatnak sejttúlélést elősegítő hatást. Egyes esetekben a PACAP38 pont ellentétes hatást fejt ki, mégpedig gátolja a sejtek túlélését, mint pl. myeloma és humán leukémia sejtekben (Hayez et al., 2004; Li et al., 2006). Továbbá kimutatták, hogy a PACAP KO egerekben gyakrabban fejlődik ki colorectalis tumor (Nemetz et al., 2008). Kardiális fibrocitákban a PACAP gátolja a proliferációt és a fehérjeszintézist (Sano et al., 2002). Más esetekben pedig azt találták, hogy a PACAP, ellentétben a VIP-vel, nem befolyásolja a sejtek túlélését, mint pl. myentericus neuronkultúrában (Sandgren et al., 2003). Ennek hátterében az állhat, hogy a PACAP receptorok közül az adott sejtekben más splice variáns expresszálódik. További tényező lehet az az ismert tény, hogy különböző sejtípusokban egy ligand pleiotrop biológiai választ idézhet elő a szövet/sejtspecifikus szignáltranszdukciós útvonalak miatt (Szeberényi, 1999). Különösen tumorsejtekben fordulhat elő, hogy a PACAP-nak egy másik receptortípusa jelenik meg, mely eltérő hatást közvetít, vagy a tumorsejtekben eltérő jelátviteli utak aktiválódnak. Pancreas tumorsejtekben azt találták, hogy a PACAP sem a cAMP szintet, sem a sejtproliferációt nem befolyásolja (Rékási et al., 2001). Ezt eddig a fejlődő idegrendszerben mutatták ki: a fejlődés során is egy adott időpontban a PACAP receptormintázata megváltozik, és a hatása a proliferációt serkentő hatásról átváltozik gátló hatássá (Meyer, 2006; Nicot és DiCicco-Bloom, 2001). A PACAP kezelés ideje is befolyásolhatja a sejttúlélésre kifejtett hatását, mint ahogy azt prostata tumorsejtekben kimutatták: rövid idejű PACAP kezelés a sejtek proliferációját fokozta, míg hosszan tartó kezelés ellenkezőleg, a sejtek proliferációját gátolta, és neuroendokrin differenciációját fokozta (Farini et al., 2003). Saját eredményeink is alátámasztják azon megfigyeléseket, miszerint a PACAP-nak általános citoprotektív hatásai mellett lehetnek épp ellenkező, sejttúlélést gátló hatásai. Eredményeink szerint choriocarcinoma sejtekben a PACAP potencírozta az oxidatív stressz és az *in vitro* hypoxia sejtpusztító hatását. Ezen, a PACAP általános hatásaitól eltérő hatások lehetnek trophoblast specifikusak, vagy csak a tumoros trophoblast sejtekre jellemzőek. Ennek a kérdésnek a tisztázására kezdtünk kísérleteket immortalizált cytotrophoblastokkal illetve primer cytotrophoblast sejtvonallal. Ennek érdekében részt vettem egy külföldi kollaborációban (Laboratoire d'Endocrinologie, Maternité, Hôpital de l'Université de Genève, Genève, Svájc), ahol placentából izoláltuk a primer cytotrophoblast sejteket.

### *PACAP által aktivált jelátviteli útvonalak*

A PACAP-al kapcsolatban kimutatták már, hogy többféle jelátviteli útvonalat aktivál (Li et al., 2005; Ravi et al., 2006). Számos eredmény született arról, hogy a PACAP sejttúlélést elősegítő hatását több, a MAPK családba tartozó jelátviteli útvonal segítségével fejtí ki (Vaudry et al., 2000; Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004; Shioda et al., 2006). A PACAP stimulálja az általában antiapoptotikus hatással rendelkező ERK1/2 és gátolja a nagyrészt proapoptotikus JNK1/2 illetve p38 MAPK útvonalak aktivitását (Aubert et al., 2006; Dohi et al., 2002; Falluel-Morel et al., 2007; Shioda et al., 1998; Vaudry et al., 2003). Továbbá, a PACAP ellensúlyozza az ischemia-, oxidatív stressz-, vagy glutamát-indukálta változásokat ezekenél a szignáltranszdukciós molekuláknál (Dohi et al., 2002; Shioda et al., 1998; Rácz et al., 2007). Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a PACAP ettől eltérő hatással bír a trophoblast sejtekre. Bár a PACAP kezelés önmagában nem befolyásolta az ERK1/2 foszforilációját, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatására csökkent ezen jelátviteli útvonalak aktivitása, együttes kezelést követően pedig a csökkenés szignifikáns mértékű volt. A p38 MAPK esetében megfigyelt változások összefüggésben vannak korábbi eredményekkel, ahol a PACAP szintén csökkentette az oxidatív stressz által előidézett aktivációt.

Kísérletünkben PACAP előkezelést követő oxidatív stressz és hypoxia hatására csökkent túlélési arányt találtunk. Western-blot analízisünk során a PACAP sokféle hatását mutattuk ki. Egyértelmű volt, hogy egyes védő útvonalak (ERK1/2, Akt) aktivitása csökken, de a PACAP egyes proapoptotikus útvonalakat is visszaszorított. A p38 MAPK útvonal esetében, ami körülményektől függően lehet pro- illetve antiapoptotikus hatású is, hasonló aktivitáscsökkenést figyelhettünk meg mint a protektív faktorok esetében. Azt találtuk, hogy a PACAP potencírozó és additív hatással rendelkezik az általunk vizsgált jelátviteli útvonalak esetében, ha a sejtek oxidatív stressznek is ki voltak téve, amit a PACAP sejthalált elősegítő hatása is alátámaszt. Eredményeink értelmezéséhez a trophoblast sejtek további vizsgálata szükséges, melyek megmagyarázhatják az előbb említett mechanizmust és a lehetséges fiziológiás, illetve patofiziológiás folyamatokat, melyek felelőssé tehetőek a PACAP mediálta jelátviteli útvonalakért.

Kísérleteink további, általánostól eltérő eredménye, hogy a PACAP6-38 agonistaként viselkedett. A PACAP1-38 degradációja során N-terminális rövidebb peptidok keletkeznek,

melyek már nem biológiailag aktívak (Bourgault et al., 2008). Az N-terminális vég szükséges a biológiai aktivitáshoz, de a receptorkötéshez nem, és az így keletkezett peptidek antagonistaként viselkednek a legtöbb esetben (Bourgault et al., 2008). Ezen rövidebb fragmensek közül a leghatásosabb antagonist a PACAP6-38. Azonban, mint saját eredményeink mutatják, ez nem minden sejt esetében igaz, mint pl. az általunk vizsgált trophoblast sejtek esetében, ahol azt találtuk, hogy a PACAP6-38 teljesen hasonló módon aktiválja a jelátviteli utakat, mint a PACAP1-38. Ezen utóbbi közleményben számoltunk be arról is, hogy a PACAP6-38 a tracheában a felszabaduló gyulladáscsökkentő neuropeptidekre is a PACAP1-38-al agonista módon hat, és nem antagonistaként. Ezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét, hogy ezekben a sejtekben/szövetekben a PACAP receptornak egy eddig ismeretlen splice variánsa található, melyen keresztül a PACAP6-38 ugyanolyan jelátviteli útvonalakat aktivál, mint a PACAP1-38. Ennek tisztázására további kísérletekre van szükség.

### *Új eredmények összefoglalása:*

- Kimuttuk a PACAP38-at és PACAP27-et humán, érett placentából és 9 hetes abortumokból, ezen kívül, hogy a PACAP szintje emelkedik a terhesség előrehaladtával
- Kimutattuk a PACAP38-at humán tüszőfolyadékban.
- PACAP1-38 előkezelés szignifikánsan csökkentette a túlélést azon JAR sejteknél melyek oxidatív stressznek vagy hipoxiának ki voltak téve.
- Az ERK1/2 és JNK/SAPK jelátviteli útvonalak esetében a PACAP1-38 és PACAP6-38 kombinált kezelés növelte ezen útvonalak aktivációját, de csökkentette a p38MAPK foszforilációját.
- Sem a PACAP1-38, sem a PACAP6-38, sem kombinált alkalmazásuk nem fejtett ki antiapoptotikus hatást JAR sejteknél MTX kezelés következtében.
- A PACAP1-38-al és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal történő együttes kezelést követően csökken a JAR sejtekben az ERK1/2 és a p38MAPK foszforilációja.
- A HIPEC sejtek túlélésén sem változtatott a PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés sem, illetve a MTX toxikus hatását sem volt képes kivédeni.
- PACAP1-38 a HIPEC sejtek inváziós készségét gátolta, proliferációját elősegítette. A PACAP6-38 a proliferációt szignifikáns mértékben fokozta

### ***Irodalomjegyzék:***

Abad C, Gomariz RP, Waschek JA. Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Curr Top Med Chem* 2006; 6: 151-163.

Adamik A, Telegdy G. Involvement of different receptors in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induced open field activity in rats. *Neuropeptides* 2004; 38: 16-20.

Agarwal A, Halvorson LM, Légrádi 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. *Mol Brain Res* 2005; 138: 45-57.

Ando E, Nokihara K, and Naruse S. Development of pituitary adenylate cyclase activating polypeptides (PACAPs) specific radioimmunoassay systems and distribution of PACAP-like immunoreactivity in guinea pig tissues. *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1994; 1:45–50

Apa R, Lanzone A, Mastrandrea M et al. Control of human luteal steroidogenesis: role of growth hormone-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, and pituitary adenylate cyclase activating peptide. *Fertil Steril* 1997b; 68: 1097-1102.

Apa R, Lanzone A, Mastrandrea M et al. Effect of pituitary adenylate cyclase activating peptide on meiotic maturation in follicle-enclosed, cumulus-enclosed, and denuded rat oocytes. *Biol Reprod* 1997a; 57: 1074-1079.

Apa R, Lanzone A, Miceli F, Vaccari S, Macchione E, Stefanini M, Canipari R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide modulates plasminogen activator expression in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 2002; 66: 830-835.

Apostolakis EM, Lanz R, O'Malley BW. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of steroid-induced reproductive behavior in female rodents. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 173-183.

Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, and Kitada C Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 1991; 129: 2787–2789.

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

Aubert N, Falluel-Morel A, Vaudry D, Xifro X, Rodriguez-Alvarez J, Fisch C, de Jouffrey S, Lebigot JF, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. PACAP and C2-ceramide generate AP-1 complexes through a MAP-kinase-dependent pathway: involvement of c-Fos in PACAP-induced Bcl-2 expression. *J Neurochem* 2006; 99: 1237-1250.

Barberi M, Muciaccia B, Morelli MB, Stefanini M, Cecconi S, Canipari R. Expression, localization and functional activity of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, vasoactive intestinal polypeptide and their receptors in mouse ovary. *Reproduction* 2007; 134: 281-292.



Barthó L, Lázár Z, Lénárd L, Benkó R, Tóth G, Penke B, Szolcsányi J, Maggi CA. Evidence for the involvement of ATP, but not of VIP/PACAP or nitric oxide, in the excitatory effect of capsaicin in the small intestine. *Eur J Pharmacol* 2000; 392: 183-188.

Bourgault S, Vaudry D, Botia B, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H, Fournier A. Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 2008; 29: 919-932.

Börzsei R, Márk L, Tamás A, Bagoly T, Bay C, Csanaky K, Bánki E, Kiss P, Váczy A, Horváth G, Németh J, Szauer E, Helyes Z, Reglődi D. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur J Endocrinol* 2009; 160: 561-565.

Braas KM, May V, Zwara P, Nausch B, Kliment J, Dunleavy JD, Nelson MT, Vizzard MA. Role for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in cystitis-induced plasticity of micturition reflexes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: 951-962.

Brenneman DE, Hauser JM, Spong C, Phillips TM. Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. *Neuropeptides* 2002; 36: 271-280.

Counis R, Laverrière JN, Garrel-Lazayres G, Cohen-Tannoudji J, Larivière S, Bleux C, Magre S. What is the role of PACAP in gonadotrope function? *Peptides* 2007; 28: 1797-1804.

Csaba Zs, Csernus V, Gerendai I. Local effect of PACAP and VIP on testicular function in immature and adult rats. *Peptides* 1997; 18: 1561-1567.

Csernus V, Józsa R, Reglődi D. The effect of PACAP on rhythmic melatonin release of avian pineals. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 135: 62-69.

D'Agata V, Cavallaro S. Functional and molecular expression of PACAP/VIP receptors in the rat retina. *Mol Brain Res* 1998; 54:161-164.

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. *J Pain* 2008; 9: 449-456.

DiCicco-Bloom E, Lu N, Pintar JE, Zhang J. The PACAP ligand/receptor system regulates cerebral cortical neurogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1998; 865: 274-289.

Dohi K, Mizushima H, Nakajo S, Ohtaki H, Matsunaga S, Aruga T, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regul Pept* 2002; 109: 83-88.

El-Gehani F, Tena-Sempere M, Huhtaniemi I. Evidence that pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent regulator of fetal rat testicular steroidogenesis. *Biol Reprod* 2000; 63: 1482-1489.

Fahrenkrug J, Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide immunoreactivity in capsaicin-sensitive nerve fibres supplying the rat urinary tract. *Neuroscience* 1998; 83:1261-1272.

Falluel-Morel A, Chafai M, Vaudry D, Basille M, Cazillis M, Aubert N, Louiset E, de Jouffrey S, Le Bigot JF, Fournier A, Gressens P, Rostène W, Vaudry H, Gonzalez BJ. The neuropeptide pituitary adenylate cyclase activating polypeptide exerts anti-apoptotic and differentiating effects during neurogenesis: focus on cerebellar granule neurones and embryonic stem cells. *J Neuroendocrinol* 2007; 19: 321-327.

Faluhelyi N, Reglődi D, Lengvári I, Csernus V. Development of the circadian melatonin rhythm and the effect of PACAP on melatonin release in the embryonic chicken pineal gland. An in vitro study. *Regul Pep* 2004;123: 23-28.

Farini D, Puglianiello A, Mammi C, Siracusa G, Moretti C. Dual effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on prostate tumor LNCaP cells: short- and long-term exposure affect proliferation and neuroendocrine differentiation. *Endocrinology* 2003; 144: 1631-1643.

Farnham MM, Li Q, Goodchild AK, Pilowsky PM. PACAP is expressed in sympathoexcitatory bulbospinal C1 neurons of the brain stem and increases sympathetic nerve activity in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: R1304-1311.

Foda HD, Sharaf HH, Absood A, Said SI. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides* 1995; 16: 1057-1061.

Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 229-237.

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

Gras S, Host E, Fahrenkrug J. Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the cyclic recruitment of immature follicles in the rat ovary. *Regul Pept* 2005; 128: 69-74.

Gras, S., Hannibal, J., Georg, B., Fahrenkrug, J. Transient periovulatory expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide in rat ovarian cells. *Endocrinology* 1996; 137: 4779-4785.

Gutierrez-Canas I, Rodriguez-Henche N, Bolanos O, Carmena MJ, Prieto JC, Juarranz MG. VIP and PACAP are autocrine factors that protect the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 from apoptosis induced by serum withdrawal. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 1050-1058.

Hallmann A, Klimek J, Masaoka M, Kamiński M, Kedzior J, Majczak A, Niemczyk E, Woźniak M, Trzonkowski P, Wakabayashi T. Partial characterization of human

choriocarcinoma cell line JAR cells in regard to oxidative stress. *Acta Biochim Pol* 2004; 51: 1023-1038.

Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU, Mikkelsen JD. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* 1997; 17: 2637-2644.

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 Tissue Res* 1998; 291: 65-79.

Hannibal J, Fahrenkrug J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in intrinsic and extrinsic nerves of the rat pancreas. *Cell Tissue Res* 2000; 299: 59-70.

Hannibal J, Mikkelsen JD, Clausen H, Holst JJ, Wulff BS, Fahrenkrug J. Gene expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the rat hypothalamus. *Regul Pept* 1995a; 55: 133-148.

Hannibal J, Mikkelsen JD, Fahrenkrug J, and Larsen PJ (1995b) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide gene expression in corticotropin-releasing factor-containing parvocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus is induced by colchicine, but not by adrenalectomy, acute osmotic, ether, or restraint stress. *Endocrinology* 1995b; 136: 4116-4124

Hannibal J. Neurotransmitters in the retinohypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 2002; 309: 73-88.

Hardwick JC, Tompkins JD, Locknar SA, Merriam LA, Young BA, Parsons RL. Calcium influx through channels other than voltage-dependent calcium channels is critical to the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-induced increase in excitability in guinea pig cardiac neurons. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 317-321.

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. *J Comp Neurol* 1996; 371: 567-577.

Hayez N, Harfi I, Lema-Kisoka R, Svoboda M, Corazza F, Sariban E. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) modulate several biochemical pathways in human leukemic myeloid cells. *J Neuroimmunol* 2004; 149: 167-181.

Helyes Zs, Pozsgai G, Börzsei R, Németh J, Bagoly T, Márk L, Pintér E, Tóth G, Elekes K, Szolcsányi J, Reglődi D. Inhibitory effect of PACAP38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammation in the rat. *Peptides* 2007; 28: 1847-1855.

Isaac ER, Sherwood NM. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 280: 13-19.

Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 1992; 8: 811-819.

Isobe K, Tatsuno I, Yashiro T, Nanmoku T, Takekoshi K, Kawakami Y, Nakai T. Expression of mRNA for PACAP and its receptors in intra- and extra-adrenal human pheochromocytomas and their relationship to catecholamine synthesis. *Regul Pept* 2003; 110: 213-217.

Jakab B, Reglodi D, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Oroszi G, Szilvássy Z, Szolcsányi J, Németh J. Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Meth* 2004; 61: 189-198.

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. *J Comp Neurol* 2004; 476: 388-413.

Józsa R, Németh J, Tamás A, Hollósy T, Lubics A, Jakab B, Oláh A, Lengvári I, Arimura A, Reglődi D. Short-term fasting differentially alters PACAP and VIP levels in the brains of rats and chickens. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 354-358.

Kimura S, Ohshige Y, Lin L, Okumura T, Yanaihara C, Yanaihara N, Shiotani Y. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the hypothalamus-pituitary system in rats: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Neuroendocrinol* 1994; 6: 503-507.

Kiss P, Reglődi D, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Józsa R, Somogyvári-Vigh A, Szilvássy Z, Németh J. Changes of PACAP levels in the brain show gender differences following short-term water and food deprivation. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 152: 225-230.

Kivipelto L, Absood A, Arimura A, Sundler F, Håkanson R, and Panula P. The distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity is distinct from helodermin- and helospectin-like immunoreactivities in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 1992; 5: 85-94.

Koh PO, Kwak SD, Kim HJ, Roh G, Kim JH, Kang SS, Choi WS, Cho GJ. Expression patterns of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor mRNAs in the rat placenta. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 27-31.

Koh PO, Won CK, Noh HS, Cho GJ, Choi WS. Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type. *J Vet Sci* 2005; 6: 1-5.

Kotani E, Usuki S, Kubo T. Rat corpus luteum expresses both PACAP and PACAP type IA receptor mRNAs. *Peptides* 1997; 18: 1453-1455.

Köves K, Arimura A, Görös TG, and Somogyvári-Vigh A Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 1991; 54: 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, Vigh S, Somogyvári-Vigh A, Miller J. Immunohistochemical localization of PACAP in the ovine digestive system. *Peptides* 1993; 14: 449-455.

Köves K, Görcs TJ, Kausz M, and Arimura A. Present status of knowledge about the distribution and colocalization of PACAP in the forebrain. *Acta Biol Hung* 1994; 45: 297-321.

Köves K, Kántor O, Scammell JG, Arimura A. PACAP colocalizes with luteinizing and follicle-stimulating hormone immunoreactivities in the anterior lobe of the pituitary gland. *Peptides* 1998; 19: 1069-1072.

Köves K, Vincze E A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerkezete, előfordulása és szerepe az élettani működésben. *Orvosi Hetilap* 2001; 142: 491-496.

Lázár Z, Shahbazian A, Benkó R, Tóth G, Penke B, Barthó L, Holzer P. PACAP-(6-38) inhibits the effects of vasoactive intestinal polypeptide, but not PACAP, on the small intestinal circular muscle. *Eur J Pharmacol* 2001; 431: 259-264.

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. *Regul Pept* 2002; 109: 115-125.

Légrádi G, Das M, Giunta B, Hirani K, Mitchell EA, Diamond DM. Microinfusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide into the central nucleus of amygdala of the rat produces a shift from an active to passive mode of coping in the shock-probe fear/defensive burying test. *Neural Plast* 2007; 2007: 79102.

Lenti L, Domoki F, Kis D, Hegyi O, Toth GK, Busija DW, Bari F. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces pial arteriolar vasodilation through cyclooxygenase-dependent and independent mechanisms in newborn pigs. *Brain Res* 2007; 1165: 81-88.

Li M, David C, Kikuta T, Somogyvári-Vigh A, Arimura A. Signaling cascades involved in neuroprotection by subpicomolar pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 38. *J Mol Neurosci* 2005; 27: 91-106.

Li M, Cortez S, Nakamachi T, Batuman V, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent inhibitor of the growth of light chain secreting human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2006; 66: 8796-8803.

Li M, Funahashi H, Mbikay M, Shioda S, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-mediated intracrine signaling in the testicular germ cells. *Endocrine* 2004; 23: 59-75.

Luts L, Sundler F. Peptide-containing fibers in the parathyroid glands of different species. *Regul Pept* 1994; 50: 147-158.

Masuo Y, Noguchi J, Morita S, Matsumoto Y. Effects of intracerebroventricular administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on the motor activity and reserpine-induced hypothermia in murines. *Brain Res* 1995; 700: 219-226.

Masuo Y, Ohtaki T, Masuda Y, Tsuda M, Fujino M. Binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): Comparison with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) binding site localization in rat brain sections. *Brain Res* 1992; 575:113–123.

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.

Meyer DK. The effects of PACAP on neural cell proliferation. *Regul Pept* 2006; 137: 50-57

Mikkelsen JD, Hannibal J, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Olcese J, McArdle C. Pituitary adenylate cyclase activating peptide-38 (PACAP-38), PACAP-27, and PACAP related peptide (PRP) in the rat median eminence and pituitary. *J Neuroendocrinol* 1995; 7: 47-55.

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. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 567-574.

Miyata A, Jiang L, Dahl RR, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 643-648.

Moller K, Zhang YZ, Håkanson R, Luts A, Sjölund B, Uddman R, Sundler F. Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience* 1993; 57: 725-732.

Morio H, Tatsuno I, Tanaka T, Uchida D, Hirai A, Tamura Y, Saito Y. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is a neurotrophic factor for cultured rat cortical neurons. *Ann NY Acad Sci* 1996; 805: 476-481.

Murck H, Steiger A, Frieboes RM, Antonijevic IA. Pituitary adenylate cyclase activating peptide affects homeostatic sleep regulation in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E853-857.

Nagy AD, Csernus VJ. The role of PACAP in the control of circadian expression of clock genes in the chicken pineal gland. *Peptides* 2007; 28: 1767-1774.

Németh J, Jakab B, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Kiss P, Oberitter Zs, Horváth B, Szilvássy Z, Reglődi D. PACAP-27 radioimmunoassay: Description and application of a novel method *J Radioanal Nucl Ch* 2007; 273: 327-332.

Németh J, Tamás A, Józsa R, Horváth JE, Jakab B, Lengvári I, Arimura A, Lubics A, Reglődi D. Changes in PACAP levels in the central nervous system after ovariectomy and castration. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 468-473.

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. *Int J Cancer* 2008; 122: 1803-1809.

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. *J Mol Neurosci* 2005; 26: 85-98.

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

Otto C, Kovalchuk Y, Wolfer DP, Gass P, Martin M, Zuschratter W, Grone HJ, Kellendonk C, Tronche F, Maldonado R, Lipp HP, Konnerth A, Schutz G. Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J Neurosci* 2001; 21: 5520-5527

Papp Zoltán: A szülészet-nőgyógyászat tankönyve, Semmelweis Kiadó, 2007

Park HJ, Lee J, Park JH, Kwon HB, Arimura A, Chun SY Stage-specific expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor messenger ribonucleic acid during ovarian follicle development in the rat. *Endocrinology* 2000; 141: 702-709.

Park JY, Park JH, Park HJ et al. Stage-dependent regulation of ovarian pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA levels by GnRH in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 2001; 142: 3828-3835.

Pataki I, Adamik A, Glover V, Toth G, Telegdy Gy. The effects of isatin (indole-2, 3-dione) on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced hyperthermia in rats. *BMC Neurosci* 2002; 3: 2.

Pavan L, Tarrade A, Hermouet A, Delouis C, Titeux M, Vidaud M, Théron P, Evain-Brion D, Fournier T. Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPAR $\gamma$  in cell invasion process. *Carcinogenesis* 2003; 8: 1325-1336

Pesce M, Canipari R, Ferri GL, Siracusa G, De Felici M. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylate cyclase and promotes proliferation of mouse primordial germ cells. *Development* 1996; 122: 215-221.

Piggins HD, Stamp JA, Burns J, Rusak B, Semba K. Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) immunoreactivity in the hypothalamus and extended amygdala of the rat. *J Comp Neurol* 1996; 376: 278-294.

Rábl K, Reglődi D, Bánvölgyi T, Somogyvári-Vigh A, Lengvári I, Gábrriel R, Arimura A. PACAP inhibits anoxia-induced changes in physiological responses in horizontal cells in the turtle retina. *Regul Pept* 2002; 109: 71-74.

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, Reglődi D.

Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153: 115-123.

Ravni A, Bourgault S, Lebon A, Chan P, Galas L, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B, Eiden LE, Vaudry D. The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *J Neurochem* 2006; 98: 321-329.

Reichenstein M, Rehavi M, Pinhasov A. Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the mechanism of antidepressant action. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 330-338.

Rékási Z, Czömpöly T. Accumulation of rat pineal serotonin N-acetyltransferase mRNA induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in vitro. *J Mol Endocrinol* 2002; 28: 19-31.

Rékási Z, Varga JL, Schally AV, Plonowski A, Halmos G, Csernus B, Armatis P, Groot K. Antiproliferative actions of growth hormone-releasing hormone antagonists on MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells involve cAMP independent pathways. *Peptides* 2001; 22: 879-886.

Roberto M, Brunelli M. PACAP-38 enhances excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal CA1 region. *Learn Mem* 2000; 7: 303-311.

Robins JC, Heizer A, Hardiman A, Hubert M, Handwerker S. Oxygen tension directs the differentiation pathway of human cytotrophoblast cells. *Placenta* 2007; 28:1141-1146.

Sandgren K, Lin Z, Ekblad E. Differential effects of VIP and PACAP on survival of cultured adult rat myenteric neurons. *Regul Pept* 2003; 111: 211-217.

Sano H, Miyata A, Horio T, Nishikimi T, Matsuo H, Kangawa K. The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cultured rat cardiocytes as a cardioprotective factor. *Regul Pept* 2002; 109: 107-113.

Sayasith K, Brown KA, Sirois J. Gonadotropin-dependent regulation of bovine pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on ovarian follicles prior to ovulation. *Reproduction* 2007; 133: 441-453.

Seki T, Shioda S, Izumi S, Arimura A, Koide R. Electron microscopic observation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-containing neurons in the rat retina. *Peptides* 2000; 21: 109-113.

Sheward WJ, Lutz EM and Harmar AJ. The distribution of vasoactive intestinal peptide 2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization. *Neuroscience* 1995; 67: 409-418.

Shioda S, Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Watanabe J, Nakajo S, Arata S, Kitamura S, Okuda H, Takenoya F, Kitamura Y. Pleiotropic functions of PACAP in the CNS. Neuroprotection and neurodevelopment. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 550-560.



Shioda S, Ozawa H, Dohi K, Mizushima H, Matsumoto K, Nakajo S, Takaki A, Zhou CJ, Nakai Y, Arimura A. PACAP protects hippocampal neurons against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway. *Ann NY Acad Sci* 1998; 865: 111-117.

Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: A potential neuroprotective peptide. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2861-2889. Review.

Spencer F, Chi L, Zhu M. Temporal relationships among uterine pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, decidual prolactin-related protein and progesterone receptor mRNAs expression during decidualization and gestation in rats. *Comp Biochem Physiol* 2001; 129C: 25-34.

Steenstrup BR, Alm P, Hannibal J, Jørgensen JC, Palle C, Junge J, Christensen HB, Ottesen B, Fahrenkrug J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: occurrence and relaxant effect in female genital tract. *Am J Physiol* 1995; 269: E108-117.

Steenstrup BR, Jørgensen JC, Alm P, Hannibal J, Junge J, Fahrenkrug J, Ottesen B. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): occurrence and vasodilatory effect in the human uteroplacental unit. *Regul Pept* 1996; 61: 197-204.

Suk K, Park JH, Lee WH. Neuropeptide PACAP inhibits hypoxic activation of brain microglia: a protective mechanism against microglial neurotoxicity in ischemia. *Brain Res* 2004; 1026: 151-156.

Sundler F, Ekblad E, Hannibal J, Moller K, Zhang YZ, Mulder H, Elsas T, Grunditz T, Danielsen N, Fahrenkrug J, Uddman R. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in sensory and autonomic ganglia: localization and regulation. *Ann NY Acad Sci* 1996; 805: 410-428.

Szeberényi J. Molekuláris sejtbológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 1999.

Takei N, Skoglosa Y, Lindholm D. Neurotrophic and neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 1998; 54: 698-706.

Tornøe K, Hannibal J, Georg B, Schmidt PT, Hilsted L, Fahrenkrug J, Holst JJ. PACAP 1-38 as neurotransmitter in the porcine antrum. *Regul Pept* 2001; 101: 109-121.

Usdin TB, Bonner TI, Mezey E. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 1994; 135: 2662-2680.

Usuki S, Kotani E. Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on progesterin biosynthesis in cultured luteal cells from the ovary. *Gynec Endocrinol* 2001; 15: 184-191.

Vaccari S, Latini S, Barberi M, Teti A, Stefanini M, Canipari R. Characterization and expression of different pituitary adenylate cyclase activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat ovarian follicles. *J Endocrinol* 2006; 191: 287-299.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 2003; 72: 303-316.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz A, Fournier A, Chow K C B, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacol Rev* 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. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 269-324.

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.

Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, et al. PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur J Neurosci* 2002a; 15: 1451-1560.

Vaudry D, Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002b; 99: 6398-6403.

Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000; 243: 167-190. Review.

Vígh S, Arimura A, Gottschall PE, Kitada C, Somogyvári-Vígh A, Childs GV. Cytochemical characterization of anterior pituitary target cells for the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), using biotinylated ligands. *Peptides* 1993; 14: 59-65.

Wang G, Qi C, Fan GH, Zhou HY, Chen SD. PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS Lett* 2005; 579: 4005-4011.

Winzell MS, Ahren B. Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides* 2007; 28: 1805-1813.

Xu F, Tse FW, Tse A. Stimulatory actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in rat carotid glomus cells. *Adv Exp Med Biol* 2008; 605: 69-74.

Zia F, Fagarasan M, Bitar K, Coy DH, Pisegna JR, Wank SA, Moody TW. Pituitary adenylate cyclase activating peptide receptors regulate the growth of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 1995; 55: 4886-4891.

### **A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:**

**Brubel R**, Reglődi D, Jámbor É, Koppán M, Várnagy Á, Bíró Zs, Kiss P, Gaál V, Matkovits A, Farkas J, Lubics A, Bódis J, Bay Cs, Veszprémi B, Tamás A, Németh J, Márk L. Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *J Mass Spectr* 2011;46: 189-94 (IF: 3.411)

**Brubel R**, Boronkai Á, Reglődi D, Rácz B, Németh J, Kiss P, Lubics A, Tóth G, Horváth G, Varga T, Szőgyi D, Fónagy E, Farkas J, Barakonyi A, Bellyei Sz, Szereday L, Koppán M, Tamás A. Changes in the expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. *J Mol Neurosci* 2010;42: 450-458. (IF: 2.72)

Boronkai Á, **Brubel R**, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, Lubics A, Szigeti A, Bellyei Sz, Tóth G, Lakatos A, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on the survival and signal transduction pathways in human choriocarcinoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1163: 353-357 (IF: 2.67)

Reglődi D, Börzsei R, Bagoly T, Boronkai Á, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, **Brubel R**, Németh J, Tóth G, Helyes Zs. Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J Mol Neurosci* 2008;36: 270-278. (IF: 2.061)

### **Egyéb közlemények:**

**Brubel R**, Horváth G, Reglődi D, Lubics A, Tamás A, Kiss P, László E, Németh J, Márk L, Szakály P. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. *Transplant Proc* 2011 közlésre elfogadva (IF: 0,994)

Szakály P, László E, Kovács K, Rácz 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 Zs, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides*. 2011;45:113-21 (IF: 2.036)

Czeglédi L, Tamás A, Börzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horváth G, **Brubel R**, Németh J, Szalontai B, Szabadfi K, Jávora A, Reglődi D, Helyes Zs. Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;172:115-9 (IF: 2.732)

Horváth G, Márk L, **Brubel R**, Szakály P, Rácz B, Kiss P, Tamás A, Helyes Zs, 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. *Neurosci Lett* 2010;469: 70-74 (IF: 1.925)

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. *J Mol Neurosci* 2010;48(2):148-52. (IF: 2.72)

Horváth G, Reglódi D, Opper B, *Brubel R*, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Csernus V, Matkovits A, Rácz B. Effects of PACAP on the oxidative stress-induced cell death in chicken pinealocytes is influenced by the phase of the circadian clock. *Neurosci Lett* 2010;484:148-152 (IF:1.925)

Tudományos közlemények összesített impakt faktora: **23,194**

## ***Köszönetnyilvánítás***

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Reglódi Dórának, Dr. Lubics Andreának és Dr. Tamás Andreának, akik támogatták és irányították tudományos tevékenységemet. Szeretném megköszönni intézetvezetőnknek, Dr. Csernus Valérnak, hogy támogatta tudományos munkámat.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Kiss Péternek a dolgozat szerkesztésében és ábraanyagának elkészítésében nyújtott segítségével. Ezen kívül szeretnék köszönetet mondani Dr. Horváth Gabriellának és az Anatómiai Intézet összes dolgozójának.

Köszönet illeti Dr. Rác Boglárkát, Dr. Márk Lászlót, Dr. Boronkai Árpádot és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet munkatársait is a molekuláris biológiai és tömegspektrometriai kísérletek elsajátítása során nyújtott segítségével.

Ezen kívül szeretnék köszönetet mondani Dr. Koppán Miklósnak, Dr. Várnagy Ákosnak és Dr. Varga Tamásnak a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról, illetve Szereday Lászlónak és Barakonyi Alíznek az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetből a kísérletekhez szükséges minták gyűjtéséhez nyújtott segítségével.