

**A PACAP ÉS A PACAP RECEPTOROK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA  
DIABETESES NEPHROPATHIA ÉS NEUROGÉN GYULLADÁS  
ÁLLATMODELLJÉBEN**

**DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**



**Dr. Bánki Eszter Márta**

Témavezetők: Dr. Reglődi Dóra, Dr. Tamás Andrea

Doktori Iskola vezetője: Dr. Lénárd László

Programvezető: Dr. Csernus Valér

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet

2014

## Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke</b> .....	4
<b>ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS</b> .....	7
Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP).....	7
A PACAP és receptorai a szervezetben.....	7
A PACAP élettani hatásai.....	8
<b>Célkitűzések összefoglalása</b> .....	10
<b>I. A PACAP-38 PROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA DIABETESSES NEPHROPATHIA ESETÉN</b> .....	11
<b>1. Bevezetés</b> .....	11
1.1. Diabetes mellitus .....	11
1.2. A PACAP szerepe a szénhidrátháztartás szabályozásában .....	12
1.3. A PACAP renalis hatásai.....	14
1.4. A diabeteses nephropathia .....	16
<b>2. Anyagok és módszerek</b> .....	20
2.1. Kísérleti állatok.....	20
2.2. A vesék fénymikroszkópos szövettani és morфомetriai analízise .....	21
2.3. A vesék elektronmikroszkópos vizsgálata.....	23
2.4. A PACAP-38 nephroprotektív hatásmechanizmusának vizsgálata.....	24
2.4.1. Gyulladásos citokinek és adhéziós molekulák vizsgálata patkány citokin array kit és Luminex Multiplex Immunoassay segítségével .....	24
2.4.2. Kvantitatív real-time („valós idejű”) polimeráz láncreakció (qRT-PCR) .....	25
2.4.3. Western blot.....	26
2.4.4. Biokémiai assay a malondialdehid (MDA), glutathion (GSH) és szuperoxid-dizmutáz (SOD) szintjének meghatározására .....	26
2.5. Felhasznált gyógyszerek és vegyszerek.....	27
2.6. Statisztikai analízis .....	27
<b>3. Eredmények</b> .....	28
3.1. A PACAP-38-kezelés hatása kontroll és diabeteses állatok vércukorszintjére, testtömegére és vesetömeg-testtömeg arányára .....	28
3.2. Szövettani eredmények.....	30
3.2.1. A PACAP-38-kezelés hatása a diabetes-indukált glomerularis elváltozásokra.....	30
3.2.2. A PACAP-38-kezelés hatása a diabetes-indukált tubularis elváltozásokra.....	31
3.2.3. A PACAP-38-kezelés hatása a diabetes-indukált vascularis hyalinosisra .....	33
3.3. A PACAP-38 hatása a diabeteses nephropathia elektronmikroszkópos elváltozásaira.....	33

3.4. A PACAP-38 nephroprotektív hatásának mechanizmusa .....	35
3.4.1. A PACAP-38-kezelés hatása a vizsgált citokinek, kemokinek és adhéziós molekulák expressziójára .....	35
3.4.2. A PACAP-38-kezelés hatása a kollagén IV. expressziójára .....	38
3.4.3. A PACAP-38-kezelés hatása a prosklerotikus és apoptotikus fehérjék szintjére .....	39
3.4.4. A PACAP-38 hatása a malondialdehid (MDA), a glutathion (GSH) és a szuperoxid-dizmutáz (SOD) szintjére .....	42
<b>4. Megbeszélés .....</b>	<b>43</b>
<b>II. A PAC1 ÉS VPAC1/2 RECEPTOROK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A PACAP NEUROGÉN GYULLADÁSRA KIFEJTETT GÁTLÓ HATÁSÁBAN .....</b>	
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>49</b>
1.1. A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) csatornák és szerepük a neurogén gyulladásban .....	49
1.2. A TRPA1 agonista mustárolaj.....	50
1.3. A PACAP szerepe a neurogén gyulladásban.....	51
1.4. Maxadilan .....	53
1.5. A VIP gyulladásban betöltött szerepe .....	54
<b>2. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>56</b>
2.1. Kísérleti állatok.....	56
2.2. Mustárolajjal és formalinnal kiváltott neurogén oedema vizsgálata egérfülön .....	56
2.3. Az Evans kék-kötött albumin extravazációjának meghatározása egérfülön .....	56
2.4. A bőr mikrocirkulációjának meghatározása lézer Doppler képalkotó módszerrel egérfülön .....	57
2.5. Az egérfülek myeloperoxidáz (MPO) aktivitásának meghatározása.....	58
2.7. Statisztikai analízis .....	58
2.8. Felhasznált kémiai anyagok.....	58
<b>3. Eredmények .....</b>	<b>60</b>
3.1. Maxadilan és VIP hatása a mustárolaj- és formalin-indukált neurogén oedemára.....	60
3.2. Maxadilan és VIP hatása az 5% mustárolajjal kiváltott plazma-extravazációra .....	62
3.3. Maxadilan és VIP hatása az 5% mustárolajjal kiváltott vazodilatációra .....	63
3.4. Maxadilan és VIP hatása a myeloperoxidáz aktivitásra .....	65
<b>4. Megbeszélés .....</b>	<b>67</b>
<b>Új eredmények összefoglalása .....</b>	<b>70</b>
<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>71</b>
<b>Publikációs lista .....</b>	<b>99</b>
<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>102</b>

## Rövidítések jegyzéke

AC: adenilát cikláz

ADP: adenzin-difoszfát

AESBF: 4-(2-aminoetil)-benzolszulfonil-fluorid

AGE: „advanced glycation end product”/ glikációs végtermék

AITC: allil-izotiocianát

ANKTM1: „Ankyrin-like with Transmembrane domains protein 1”

ANOVA: „Analysis of Variance”/ Variancia analízis

AP-1: aktivátor protein-1

ATP: adenzin-trifoszfát

Bcl-2: „B-cell lymphoma-2”/ B-sejt lymphoma-2

BSA: „bovine serum albumin”/ marha szérumalbumin

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CCL5: „chemokine (C-C motif) ligand 5”/ kemokin (C-C motívum) ligand 5

CD62L: „cluster of differentiation 62 ligand”

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

CGRP: „calcitonin gene-related peptide”/ kalcitonin gén-rokon peptid

CINC-1: „cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1”/ citokin-indukált neutrophil kemoattraktáns-1

CNTF: „ciliary neurotrophic factor”/ ciliáris neurotrófikus faktor

COPD: „chronic obstructive pulmonary disease”/ krónikus obstruktív tüdőbetegség

CTGF: „connective tissue growth factor”/ kötőszöveti növekedési faktor

CXCL: cisztein-X-cisztein ligand

DAG: diacil-glicerol

DNS: dezoxiribonukleinsav

DPP IV: dipeptidil-peptidáz IV

DTNB: 5,5-ditiobisz-2-nitrobenzoesav

ECM: extracelluláris mátrix

EMT: epithelialis-mesenchymalis transzformáció

eNOS: endothelialis nitrogén-monoxid szintáz

ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz

ESRD: „end stage renal disease”/ végstádiumú vesebetegség

fiz. só: fiziológiás sóoldat

GBM: glomerularis bazálmembrán

GLP-1: „glucagon-like peptide-1”/ glükagonszerű peptid-1

GLUT: glükóz transzporter

GSH: glutathion

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hidrogén-peroxid

HE: hematoxin-eozin

HTAB: hexadecil-trimetilammónium

IκB: „inhibitor of NFκB”/ NFκB-gátló

IL: interleukin

i.p.: intraperitoneális

i.v.: intravénás

LECAM-1: „leukocyte-endothelial cell adhesion molecule-1”/ leukocyta-endothelsejt adhéziós molekula-1

LIX: „lipopolysaccharide-induced cystein-X-cystein chemokine”/ lipopoliszacharid-indukált cisztein-X-cisztein kemokin

LPS: lipopoliszacharid

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

MCP: „monocyte chemoattractant protein”/monocyta kemoattraktáns protein

MDA: malondialdehyd

MIG: „monokine induced by interferon-gamma”/ gamma interferon-indukált monokin

MIP-3 $\alpha$ : „macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ ”/ makrofág gyulladásoos protein 3 $\alpha$

MO: mustárolaj

MPO: myeloperoxidáz

mRNS: „messenger” ribonukleinsav

NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADP: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NF $\kappa$ B: nukleáris faktor kappa B

NK: neurokinin

NO: nitrogén-monoxid

OD: optikai denzitás

p38MAPK: p38 mitogén-aktivált protein-kináz

PACAP: „pituitary adenylate cyclase activating polypeptide”/ hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid

PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor-1

PAS: „periodic acid-Schiff”/ perjódsav-Schiff

PBS: „phosphate buffered saline”/ foszfát-pufferelt sóoldat

PKC: protein kináz C

PLC: „phospholipase C”/ foszfolipáz C

PO: paraffinolaj

qRT-PCR: kvantitatív real time („valós idejű”) polimeráz lánreakció

RAAS: renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

RAGE: AGE receptor

RANTES: „regulated on activation normal T cell expressed and secreted”/ normál T-sejt által regulált, expresszált és szekretált citokin

RGB-színskála: „red-green-blue”/ piros-zöld-kék színskála

ROI: „region of interest”

ROS: reaktív oxigén szabadgyök

SOD: szuperoxid-dizmutáz

SDS: „sodium-dodecil-sulphate”/ nátrium-dodecil-szulfát

SEM: „standard error of mean”

sICAM: szolubilis intercelluláris adhéziós molekula

s.c.: szubkután

SP: „substance P”/ P-anyag

STZ: streptozotocin

TBA: tiobarbiturát perklórsavban

TCA: triklóracetát

TGF- $\beta$ 1: „transforming growth factor  $\beta$ 1”/ transzformáló növekedési faktor  $\beta$ 1

TIMP-1: „tissue inhibitor of metalloproteinase 1”/ szöveti metalloproteináz inhibitor 1

TMB: tetrametilbenzidin

TNF $\alpha$ : tumor nekrozis faktor  $\alpha$

Tris-HCl: trisz(hidroximetil)aminometán-hidroklorid

TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1

TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid receptor 1

VIP: vazoaktív intesztinális peptid

## ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

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

A PACAP egy mozaikszó, amely az angol „Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide” kezdőbetűiből származik. A hormont Arimura professzor és kutatócsoportja izolálta birka hypothalamusból a patkány hypophysis sejt kultúráján kifejtett adenilát cikláz-aktiváló hatása révén (Miyata et al., 1989). A hormon a vazoaktív intesztinális peptid (VIP)/szekretin/ glükagon peptidcsalád tagja (Arimura, 1998). Két formája ismert, a 27 és a 38 aminosav hosszúságú formák, melyek N-terminálisa megegyezik, de a PACAP-38 C-terminálisan további 11 aminosav található (Miyata et al., 1990). A PACAP-27 szerkezetiileg 68%-ban megegyezik a vazoaktív intesztinális peptiddel, azonban adenilát cikláz-aktiváló hatása 1.000-10.000-szer nagyobb a VIP hatásánál (Vaudry et al., 2009).

A PACAP humán génjének lókusza a 18p11 kromoszóma, amely 5 exont tartalmaz, melyről a 176 aminosav hosszúságú prepro-PACAP transzlálódik. A PACAP-38 a 27 aminosavas formához hasonlóan ebből a prekursorból képződik proteolitikus és amidációs lépéseket követően (Hosoya et al., 1992). A PACAP biológiailag aktív régiójának szekvenciája a filogenezis során nagymértékben konzervált szerkezetű maradt, ami arra utalhat, hogy a PACAP létfontosságú élettani funkciókért felelős (Vaudry et al., 2009). Felezési ideje a szisztémás keringésben mindössze néhány perc, lebontásáért a dipeptidil-peptidáz IV (DPP IV) enzim felelős (Zhu et al., 2003). Ennél rövidebb fragmensek is ismertek, melyek közül a leggyakrabban alkalmazott az 1992-ben felfedezett PACAP6-38, melyet kezdetben a PAC1 receptor szelektív kompetitív antagonistájaként írtak le (Robberecht et al., 1992). Azóta számos kísérletben igazolták, hogy a PACAP6-38 nem csak a PAC1, hanem a VPAC2 receptor jelátvitelét is gátolja, sőt érdekes módon a tracheában, chondrocytákon, valamint retinoblastoma és cytotrophoblast sejteken agonistaként viselkedik (Liu et al., 2000; Reglödi et al., 2008; Juhász et al., 2014; Wojcieszak és Zawilska, 2014).

### **A PACAP és receptorai a szervezetben**

A PACAP központi idegrendszeri expresszióját igazolták emlősök, madarak, halak és kétélűek esetében is. A legmagasabb PACAP-koncentrációt a hypothalamusban detektálták, ahol más agyterületekhez és szervrendszerekhez hasonlóan a PACAP-38 bizonyult dominánsnak a PACAP-27-tel szemben (Arimura et al., 1991; Yon et al., 1992; Ghatei et al., 1993; Peeters et al., 1998; Jakab et al., 2004). Ezenkívül a PACAP az agykéreg, a középgy, az agytörzs, a basalis ganglionok, az amygdala és a thalamus területén is expresszálódik (Hannibal, 2002).

A perifériás idegrendszerben a spinalis ganglionok kis érzőidegsejtjei, illetve a vegetatív pre- és postganglionaris neuronok is tartalmaznak PACAP-ot. Ezenfelül megtalálható a peptid az endokrin mirigyekben, így az endokrin pancreasban is, illetve a gastrointestinalis rendszer minden részén, a cardiovascularis és a légzőrendszerben, továbbá az urogenitalis traktus területén is a vesétől egészen az urethráig (Vaudry et al., 2009). Kutatócsoportunk korábban igazolta a PACAP-38 előfordulását patkány és humán vérplazmában, valamint anyatejben és számos más humán biológiai mintában is tömegspektrometriás módszerrel (Németh et al., 2006; Helyes et al., 2007; Brubel et al., 2011b). Radioimmunoassay módszerrel mért eredményeink alapján a PACAP átlagos koncentrációja az anyatejben 5-20-szor magasabb, mint az adott anyatejmintához tartozó vérplazmában (Börzsei et al., 2009).

Hatásait speciális G-proteinhez kötött receptorokon keresztül fejti ki. A receptor hét transzmembrán karból és egy intracellulárisan G-proteint kötő doménből áll. Saját specifikus receptora a PAC1 receptor, mely agonista kötődés hatására adenilát cikláz (AC), foszfolipáz C (PLC) és protein kináz C (PKC) által közvetített útvonalakat aktivál, de akár L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornákat is megnyithat. A PAC1 receptor nyolc splice-variánssal rendelkezik, melyek a 3. intracelluláris karon található „hip” és „hop” szekvenciák jelenléte vagy hiánya következtében különböző szekunder messengerek aktivációjához vezetnek (Dickson és Finlayson, 2009). A VPAC1 és VPAC2 receptorok ezzel szemben azonos affinitással kötik a PACAP-ot és a VIP-t, és ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) vagy ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) szint emelkedéshez vezetnek (Murthy et al., 1997; Shioda et al., 2003). Magas koncentrációban mutatható ki a PAC1 receptor az agyban, az adenohipophysisben, a gerincvelőben, a mellékvesevelőben, a vesében, a herében, a petefészekben és a hasnyálmirigyben. A VPAC1 receptor a központi idegrendszer mellett megtalálható a tüdőben, a májban, a lépben, a thymusban, a mellékvesevelőben és a gastrointestinalis traktusban, míg a VPAC2 receptor a pancreas  $\beta$ -sejtjein, a mellékvese corticalis részében és a gonadokban expresszálódik (Usdin et al., 1994; Filipsson et al., 1998; Joo et al., 2004; Vaudry et al., 2009).

### **A PACAP élettani hatásai**

Felfedezése óta bebizonyosodott, hogy a PACAP pleiotróp és multifunkcionális neuropeptid, neurotrófikus és neuroprotektív hatását széles körben tanulmányozzák (Vaudry et al., 2009). Endokrin hatásai is bizonyítottak, így amellet, hogy szabályozza az adeno- és adenohipophysis hormontermelését, stimulálja a pajzsmirigy tiroxin-, a mellékvese katekolamin-szintézisét, valamint a pancreas inzulin-termelését is (Chen et al., 1993; Isobe et



al., 2003; Okada et al., 2007; Winzell és Ahrén, 2007). Potens vazodilatátor, bronchodilatátor, illetve fontos szerepe van a pulmonalis vascularis tónus szabályozásában (Warren et al., 1991; Lindén et al., 1999; Otto et al., 2004). Emellett szerepet játszik számos élettani folyamat szabályozásában. Ismert anorexigén hatása, ugyanakkor a folyadékfelvételt fokozza, befolyásolja az alvást, a lokomotoros aktivitást, a magatartást, a termoregulációt és a nocicepciót, serkenti a memóriafolyamatokat (Gray et al., 2002; Matsuyama et al., 2003; Reglődi et al., 2003; Agarwal et al., 2005; Ahnaou et al., 2006; Sándor et al., 2009; Pirger et al., 2010; Borbély et al., 2013; Matsuda et al., 2013).

Számos szövetben és sejten kimutatták az endogén és az exogén PACAP általános citoprotektív hatását, melyet apoptotikus és inflammatorikus folyamatok gátlása révén ér el (Moody et al., 2011; Reglődi et al., 2012b).

A PACAP anti- és proinflammatorikus faktorok regulációja révén kiváltott immunmodulációs hatását számos vizsgálatban igazolták nem neurogén gyulladás esetén (Martinez et al., 1998; Delgado et al., 2000; Kato et al., 2004; Delgado és Ganea, 2001, Ganea és Delgado, 2002). Ez a mechanizmus jelentős mértékben hozzájárul a PACAP protektív hatásához számos betegség, így diabetes mellitus, septicus shock, stroke, sclerosis multiplex és colitis esetén is (Martinez et al., 2002; Delgado et al., 2003; Abad et al., 2006; Azuma et al., 2008; Dejda et al., 2011). A szintén részben gyulladássos patomechanizmusú diabeteses nephropathia esetén azonban még csak rövidtávú, két hétig fennálló diabetes esetén vizsgálták a PACAP protektív hatását (Li et al., 2008).

Hasonlóképp ismert a PACAP antiinflammatorikus hatása neurogén gyulladás esetén is, azonban a hatás háttérében álló pontos receptorális mechanizmus nem ismert (Helyes et al., 2006; Németh et al., 2007).

## **Célkitűzések összefoglalása**

1. Kísérleteink első részében célunk az exogén PACAP-38-kezelés hatásának vizsgálata volt 8 hetes diabeteses nephropathia patkánymodelljében. Ezt követően a PACAP-38 nephroprotektív hatásához vezető molekuláris mechanizmusokat, azaz a peptid gyulladást, apoptotikus és prosklerotikus folyamatokra, valamint oxidatív stresszre kifejtett hatását térképeztük fel.

2. Ph.D. munkám második részében a PACAP receptorainak, így a PAC1, a VPAC1 és 2 receptoroknak a PACAP neurogén gyulladást gátló hatásában betöltött szerepét vizsgáltuk. A kísérlet során a szelektív PAC1 receptor agonista maxadilan- és a VPAC1/2 agonista VIP-kezelés hatását tártuk fel a mustárolaj-indukált neurogén oedemára, plazmafehérje-extravazációra és vazodilatációra. A gyulladás késői, nem neurogén fázisára jellemző neutrophil granulocytá-infiltrációt a myeloperoxidáz enzim aktivitásának mérésével határoztuk meg.

# I. A PACAP-38 PROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA DIABETESES NEPHROPATHIA ESETÉN

## 1. Bevezetés

### 1.1. Diabetes mellitus

Világszerte összesen 347 millió ember szenved diabetesben, amely 2030-ban már várhatóan a 7. leggyakoribb halálok lesz (Danaei et al., 2011; Global status report, WHO, 2011). Az 1-es típusú diabetest a pancreas elégtelen inzulintermelése következtében hirtelen kialakuló tünetek jellemzik, így polyuria, polydipsia, nagymértékű súlyvesztés és fáradékonyság. Ezzel szemben 2-es típusú diabetes esetén a kiváltó ok az inzulin-rezisztencia, mely kezdetben hyperinzulinaemiával jár, és csak később, a  $\beta$ -sejtek kimerülése esetén alakul ki hypoinzulinaemia. A 2-es típusú diabetes, melynek hátterében a súlyfelesleg és a mozgásszegény életmód áll, jóval gyakoribb, a cukorbetegek 90%-a ebbe a csoportba tartozik (WHO/NCD/NCS/99.2, 1999).

Számos kísérletes lehetőség áll rendelkezésre a diabetes modellezésére, így létrehozható genetikai módosítással transzgenikus vagy génhányos állatok esetében, de előidézhető kémiai toxinokkal, diétával, esetleg műtéti úton is. Az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a streptozotocin injekcióval történő diabetes indukció. A streptozotocin (STZ) a *Streptomyces achromogenes* baktérium által szintetizált vegyület, melyet leggyakrabban 1-es típusú diabetes modellezésére alkalmaznak, azonban újszülött állatok egyszeri nagy dózisú STZ-kezelésével 2-es típusú diabetes is kiváltható. Egerek esetében többszöri kis dózisú, míg patkányoknál egyszeri STZ-kezelés 1-es típusú diabetes kialakulásához vezet. A streptozotocin a glükóz transzporter 2 (GLUT2) segítségével jut be a sejtekbe, azonban a többi glükóz transzporter nem ismeri fel, így szelektíven károsítja a GLUT2-t nagy mennyiségben expresszáló  $\beta$ -sejteket a pancreasban. Nitrózourea csoportot tartalmaz, amely a DNS alkilálását és poliADP-ribosilációt idéz elő. Az ennek hatására csökkenő adenosin-trifoszfát (ATP) és nikotinamid-adenin-dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) szint szuperoxid anionok mitokondriális felszabadulásához és xantin-oxidáz általi termeléséhez vezet. Emellett a streptozotocin-kezelés hatására toxikus mennyiségben termelődik NO, mely szintén DNS-károsodáshoz és az akonitáz enzim gátlásán keresztül további ATP-deplációhoz vezet. A streptozotocin intraperitoneális vagy intravénás injekcióját követően kezdetben hyperglycaemia és alacsony inzulinszint jellemző, majd ezt követően átmeneti, a  $\beta$ -sejtek pusztulása miatt kialakuló hyperinzulinaemia következményes hypoglycaemiával. Végül beáll a diabetesre jellemző hyperglycaemia alacsony inzulinszinttel (Szkudelski, 2001).

A diabetes hosszú évekig tartó fennállása micro- és macroangiopathias szövődmények kialakulásához vezet. A microangiopathia diabeteses neuro-, nephro- és retinopathia, míg a macroangiopathia stroke, acut myocardialis infarctus és perifériás érbetegség kialakulásához vezet (Brownlee, 2001). A szövődmények gyakoriságát illetően elmondható, hogy mire a 2-es típusú diabeteses betegek inzulinkezelése megkezdődik, már minden 10. esetben nephropathia fejlődik ki, sőt gyakran már a diagnózis felállításakor kimutatható a vesekárosodás. A cukorbetegség szövődményeiben 2011-ben világszerte 4,6 millió ember halt meg, ami azt jelenti, hogy minden 7. másodpercben egy ember emiatt veszítette életét (International Diabetes Federation, 2012).

## **1.2. A PACAP szerepe a szénhidrátháztartás szabályozásában**

A PACAP termelődését igazolták a pancreas exokrin részében, a hasnyálmirigyet ellátó erek körül és a Langerhans-szigetekben nemcsak rágcslók, hanem disznó és ember esetében is (Filipsson et al., 1997, 1998; Tornoe et al., 1997). Ismert, hogy az inzulintermelő  $\beta$ -sejtekből felszabadul a PACAP, valamint kimutatták a peptid jelenlétét az  $\alpha$ -sejtek szekrécións granulumaiban is, így megállapíthatjuk, hogy a peptid mind endokrin hormonként, mind pedig neurotranszmitterként funkcionál (Fridolf et al., 1992; Portela-Gomes et al., 2003). A PACAP 38 aminosav hosszúságú formája dominál a többi szervhez hasonlóan a hasnyálmirigyben is (Filipsson et al., 1997). A peptid kolokalizációt mutat a CGRP-vel a kapszaicin-szenzitív szenzoros, és a VIP-vel a paraszimpatikus idegvégződésekben, ami arra utal, hogy a PACAP szenzoros és paraszimpatikus neurotranszmitterként is fontos szerepet tölt be a pancreasban, de szimpatikus idegekben is kimutatták jelenlétét (Yada et al., 1994, 1997; Tornoe et al., 1997; Hannibal és Fahrenkrug, 2000). A VPAC1/2 és a PAC1 receptorok is expresszálódnak a pancreasban, azonban a VPAC1 receptorok csak a Langerhans-szigeteket körülvevő ereken mutathatók ki, így a PACAP endokrin funkciójának szempontjából a PAC1 és a VPAC2 receptoroknak van jelentősége (Jamen et al., 2002; Winzell és Ahrén, 2007). A VIP/ szekretin/ glükagon peptidcsalád tagjai, így a PACAP is, bizonyítottan hatással vannak az inzulin felszabadulására (Borboni et al., 1999). A PACAP 27 és 38 aminosavas formája is már  $10^{-14}$ - $10^{-13}$  M koncentrációban, glükóz-dependens módon serkenti az inzulin  $\beta$ -sejtekből való felszabadulását *in vitro*, így egyike a leghatásosabb inzulinotróp peptideknek (Yada et al., 1994). A PACAP ezen hatását humán vizsgálatban is igazolták (Filipsson et al., 1997; Ahrén és Filipsson, 2000).

A peptid receptorhoz való kötődése cAMP-szint emelkedéshez és kálium-beáramláshoz vezet. Ennek hatására a feszültségfüggő kalcium-csatornák megnyílnak, az intracelluláris kalcium

szintje megemelkedik, amely következményes inzulin-felszabaduláshoz vezet (Winzell és Ahrén, 2007). Szubpikomólos koncentrációban a VPAC2 és PAC1 receptorok egyformán hozzájárulnak a PACAP által kiváltott intracelluláris kalciumszint-emelkedéshez, míg nanomólos PACAP-koncentráció esetén a PAC1 receptornak jóval nagyobb szerepe van (Yamada et al., 2004). A PACAP glükóz-dependens módon emeli az  $\alpha$ -sejtek intracelluláris kalcium koncentrációját is, ezáltal serkenti a glükagon szekrécióját (Yada et al., 1994; Filipsson et al., 1998). A peptid vazodilatatív hatása elsősorban a hasnyálmirigy exokrin részében érvényesül, így a peptid hatására létrejött véráramlás-fokozódás valószínűleg nem járul hozzá az inzulinotróp hatáshoz (Carlsson et al., 1996).

Az előzőekben említett előnyös hatásai mellett a PACAP fokozza az adipocyták inzulin-érzékenységét is (Nakata et al., 1999; Yada et al., 2000a). Az endogén PACAP védi a  $\beta$ -sejteket a glüko- és lipotoxicitás ellen (Nakata et al., 2010). Ez valószínűleg a fokozott  $\beta$ -sejt-proliferációnak tudható be, mely a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) kaskád és az aktivátor protein-1 (AP-1) transzkripciós faktor aktivációján, valamint nukleáris protoonkogének (c-fos és c-jun) indukcióján keresztül jön létre (Schäfer et al., 1996). Annak ellenére, hogy a PACAP mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között bizonyítottan serkenti az inzulinszekréciót, egy humán vizsgálat szerint a peptid intravénás infúziójának hatására a vércukorszint nem változik. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a hormon egyidejűleg csökkenti az inzulinérzékenységet, melynek hátterében a megnövekedett glükagon-, illetve adrenalin-felszabadulás, a PACAP hatására történő fokozott táplálékfelvétel és a hepatikus glükózprodukciónak fokozódása állhat (Filipsson et al., 1997; Yi et al., 2010). Más kísérletek azonban bizonyították, hogy streptozotocin-indukált diabetes esetén alacsonyabb azon egerek vércukorszintje, amelyek  $\beta$ -sejtjei overexpresszálják a PACAP-ot, illetve hogy az intraperitoneális PACAP-kezelés hatékonyan csökkenti a patkányok vérglükóz-koncentrációját (Yada et al., 2000b; Yamamoto et al., 2003; Sakurai et al., 2011).

Károsodott glükóz-dependens inzulinszekréció figyelhető meg a PAC1 és VPAC2 receptorok jelátviteli zavara esetén, mely a kor előrehaladtával 2-es típusú diabetes kialakulását segíti elő (Jamen et al., 2000; Asnicar et al., 2002; Persson és Ahrén, 2002). A PAC1 receptor kiemelkedő szerepére utal, hogy a PAC1 receptor agonista maxadilan hosszútávú intraperitoneális adagolás esetén csökkenti a test zsírmennyiségét, a bazális vércukorszintet, valamint fokozza az inzulin szekrécióját, amely a glükóztolerancia és az inzulinérzékenység javulásához vezet (Yu et al., 2008). Klinikai gyakorlatban is bevált kezelés a DPP IV inhibitorok alkalmazása a 2-es típusú diabetes terápiájában, melyek az inkretinek és a

gastrointestinalis hormonok, így egyes felvetések szerint a PACAP szintjének emelésén keresztül is hatnak (Augustyns et al., 2005; Herman et al., 2006).

A PACAP biohasznosulásának javítása érdekében létrehozták a PACAP szájnyalakártyán keresztül felszívódó, mukoadhezív kitozán-tioglikolsavval konjugált, valamint inhalációs készítménnyel bejuttatható formáit, melyek ígéretes terápiás eszközök lehetnek a 2-es típusú diabetes kezelésében (Langoth et al., 2005, 2006; Doberer et al., 2007). Kifejlesztésre került egy stabil és biológiailag aktív PACAP-analóg, amely krónikus adagolás esetén a glikémiás kontroll javulásához vezet, így alkalmas lehet a 2-es típusú diabetes prevenciójára (Onoue et al., 2011). Továbbá jelenleg is kísérletek folynak VPAC2 agonisták, így például a BAY 55-9837 vagy a rekombináns DBAYL terápiás célból való felhasználásával. Előnyük, hogy fokozott glikogénolízis nélkül stimulálják az inzulinszekrúciót, mellyel a glükóz-tolerancia javulása érhető el (Tsutsumi et al., 2002; Clairmont et al., 2006; Winzell és Ahrén, 2007; Ma et al., 2012).

### **1.3. A PACAP renalis hatásai**

Tömegspektrometriás és radioimmunoassay módszerrel is igazolták a PACAP jelenlétét a vesében. A többi szervhez hasonlóan mind a cortexben, mind pedig a medullában a PACAP-38 dominál (Arimura et al., 1991; Brubel et al., 2011a). Továbbá kutatócsoportunk igazolta, hogy ischaemia/reperfúziós károsodás hatására a renalis PACAP-expresszió megváltozik (Szakály et al., 2010). Hasonlóképpen a specifikus PAC1 és a VIP-vel közös VPAC1/2 receptorok renalis expressziója is bizonyított. RT-PCR módszerrel kimutatták a PAC1 és VPAC1 receptorok expresszióját a tubulussejtekben, míg a VPAC2 receptorok jelenléte csak a veseerekhez volt köthető (Harmar et al., 2004). Jelentősebb PAC1 receptor immunpozitivitást detektáltak a vese corticalis részében, mint a medullában. Mind a pars convoluta, mind pedig a pars radiata lobuli corticalisban jelen van a PACAP specifikus receptora, sőt a tubulussejtek citoplazmájában vakuoláris formában is megtalálható (Brubel et al., 2011a; Reglődi et al., 2012a).

A PACAP-nak számos fiziológiás renalis hatása ismert. Vazodilatatív hatása a vesében is érvényesül, szisztémás PACAP-kezelés hatására patkányok és nyulak renalis véráramlása is fokozódik (Gardiner et al., 1994; Nilsson, 1994). Intraventrális PACAP-kezelés hatására a renalis szimpatikus aktivitás fokozódását tapasztalták (Tanida et al., 2010). Hautmann és kutatócsoportja bizonyította, hogy izolált patkány vesében és juxtaglomerularis sejteken *in vitro* körülmények között a PACAP a PAC1 receptor aktivációja által serkenti a reninszekrúciót. A PACAP-27 ebben a tekintetben hatékonyabbnak bizonyult a PACAP-38-

nál. A hatás koncentráció-dependens, és a vesében normális körülmények között mérhető PACAP-koncentráció esetén is megfigyelhető, ami arra enged következtetni, hogy ez a peptid fiziológiás hatása, azonban az *in vivo* reninszkrécióra kifejtett hatása ismeretlen (Hautmann et al., 2007).

A PACAP renoprotektív hatását számos *in vitro* és *in vivo* modellben igazolták, elsőként myeloma multiplexhez társuló vesekárosodás esetén. *In vitro* modellben a PAC1 és a VPAC1 receptorokon keresztül hatva csökkentette a tubulussejtek morfológiai károsodását, a sejtek nekrozisát, leválását és aggregációját. Ennek oka a proinflammatorikus citokinek PACAP-kezelés hatására bekövetkező downregulációja, valamint a p38MAPK és a p50 NF $\kappa$ B aktiváció csökkenése volt. Hasonló protektív hatást igazoltak *in vivo* patkánymodellben is, ugyanis az intravénás PACAP-infúzió a könnyűlánc-indukált TNF $\alpha$ -termelést szinte teljes mértékben meggátolta. Emellett a kappa- és lambda könnyűláncot szekretáló myelomasejtek növekedését is csökkentette, vagyis a tumorsejteken nem érvényesült a PACAP citoprotektív és antiapoptotikus hatása, amely biztató a PACAP esetleges terápiás felhasználása szempontjából (Arimura et al., 2006ab). Ezen renoprotektív hatást humán vizsgálatban is bizonyították, továbbá igazolták, hogy PACAP-infúzió hatására az alap élettani paraméterek, így a vér-gázok, a vércukor, a vérnyomás és a pulzus nem változnak jelentős mértékben (Li et al., 2007). Hasonlóképpen a PACAP-kezelés a cisplatin nephrotoxikus hatását is mérsékelte mind morfológiai, mind pedig funkcionális szempontból *in vivo* és *in vitro* modellben, továbbá gentamycin nephropathiával szemben is protektív hatású volt (Li et al., 2008, 2010a, 2011b). 100 pM PACAP szignifikánsan csökkentette a primer patkány vesesejtkultúra apoptózisának mértékét oxidatív stressz által kiváltott károsodás esetén (Horváth et al., 2011). Riera és munkacsoportja igazolta, hogy meleg ischaemia hatására kialakuló tubulointersticiális károsodás, proinflammatorikus citokin-termelés, gyulladásos sejtes infiltráció, valamint plazma kreatinin-emelkedés mérséklődik a PACAP-előkezelés, vagy a károsodást követő első 6 órában történő PACAP-kezelés hatására (Riera et al., 2001). Továbbá kutatócsoportunk bizonyította, hogy a PACAP-kezelés szignifikánsan javítja a patkányok túlélését, enyhíti a tubularis degeneráció mértékét, így megnyújtja az ischaemiás időt ischaemia/reperfúzió hatására kialakuló vesekárosodás esetén *in vivo* (Szakály et al., 2008; Reglődi, 2009). Hasonló védő hatást mutattak ki egerek esetében is (Li et al., 2010b; Khan et al., 2012). Ennek hátterében a peptid hatására fokozódó antioxidatív mechanizmusokat (szuperoxid-dizmutáz (SOD) és glutathion (GSH)) és a mitokondriális antiapoptotikus Bcl-2 molekula emelkedett szintjét igazolták. Továbbá citokin array kit segítségével bizonyították a PACAP antiinflammatorikus hatásának szerepét, mely révén

csökkentette az ischaemia/reperfúzió hatására upregulálódott fraktalkin, szolubilis intercelluláris adhézions molekula (sICAM)-1, normál T-sejt által regulált, expresszált és szekretált citokin (RANTES), szöveti metalloproteináz inhibitor (TIMP)-1 és MIP-3 $\alpha$  szintjét (Horváth et al., 2010). A legutóbbi vizsgálatok a PACAP renoprotektív hatását igazolták cyclosporin- és kontrasztanyag-indukált nephropathiával szemben (Khan et al., 2011, 2013).

#### **1.4. A diabeteses nephropathia**

A végstádiumú vesebetegségek (ESRD) leggyakoribb oka a diabetes, mely az összes ESRD 25-55%-áért felelős. A diabetesben szenvedő betegek 25-40%-ában alakul ki diabeteses nephropathia 25 éves betegségfennállás alatt, vagyis jelenlegi becslések szerint 150 millió beteg szenved diabeteses nephropathiában, amely 2025-re várhatóan 300 millióra fog emelkedni (Tang et al., 2010; Wolf et al., 2013). A diabeteses nephropathia incidenciája az 1-es típusú diabetes esetén 15-20%, míg a 2-es típusú esetén gyakoribb, mintegy 30-40%, mely különbség háttérében többek között az áll, hogy a 2-es típusú diabetesesek esetében a diabetes diagnózisának időpontjában a betegek egy részében már kimutatható a microalbuminuria, valamint jóval gyakoribb a betegség progresszióját elősegítő komorbiditás, így egyéb vesebetegségek és a hypertonia. A betegség kialakulásának rizikófaktorai közé tartozik a hyperglycaemia, a dyslipidaemia, a hypertensio, az obesitas, valamint a dohányzás és a túlzott diétás proteinbevitel. Hasonlóképp növeli a betegség kialakulásának és progressziójának kockázatát a családi anamnézisben szereplő diabeteses nephropathia, hypertonia és cardiovascularis betegség. Továbbá jellemző, hogy férfiakban gyakrabban alakul ki micro- és macroalbuminuria, azonban a veseelégtelenség kockázata nőkben magasabb. A nem mellett a rassz is fontos rizikófaktor, a nephropathia incidenciája jóval magasabb a Pima indiánok és az afroamerikaiak, mint a kaukázusiak esetében (Friedman et al., 1993). A systolés vérnyomás értéke, a vizelet albumin- és a plazma kreatininszintje szintén fontos kockázati tényezők (Rosivall és Kiss, 2003; Kakuk, 2004; Karátson et al., 2009).

A diabeteses nephropathia terápiája jelenleg nem megoldott, a hypertonia, a hyperglycaemia és a hyperlipidaemia megfelelő kontrolljával csak a betegség progressziója lassítható.

##### *A diabeteses nephropathia kialakulásának molekuláris mechanizmusa*

A betegség kialakulása és progressziója multifaktoriális, a környezeti hatások mellett a genetikai faktoroknak is fontos szerepük van. Ezért a hyperglycaemia jelenléte ellenére csak a betegek 30-40%-ában alakul ki vesekárosodás (Klein et al., 1984). Azon páciensek esetében, akiknek testvére is diabeteses nephropathiában szenved, négyszeres a betegség kialakulásának



kockázata, illetve a korábban említetteknek megfelelően bizonyos etnikai csoportokban is gyakoribb a betegség előfordulása (Seaquist et al., 1989).

A neuronalis, retinalis, glomerularis és endothelialis sejtekben a glükózfelvétel inzulin-független, sőt extracelluláris hyperglycaemia esetén a GLUT1 overexpressziója figyelhető meg, melynek következtében a sejtekbe még nagyobb mennyiségű glükóz jut be (Heilig et al., 1997; Di Mario és Pugliese, 2001).

Hostetter professzor és munkatársai vetették fel elsőként, hogy a betegség kialakulásához a metabolikus tényezők mellett hemodinamikai faktorok is hozzájárulnak (Hostetter et al., 1982). Ennek lényege, hogy hyperglycaemia hatására a renin-angiotenzin-aldoszteron (RAAS) rendszer aktiválódik, és nagy mennyiségben szabadul fel angiotenzin II. Az angiotenzin II vazokonstriktív hatása erőteljesebben érvényesül az efferens arteriolán. Az autoreguláció zavarához hozzájárul a prosztanoidok, a NO, az atrialis natriuretikus peptid, az inzulin és a glukagon termelésének zavara is. Ezen folyamatok következtében intraglomerularis hypertensio alakul ki (Wolf és Ziyadeh, 2007; Gnudi, 2012). A nyomásemelkedés hatására a glomerularis sejtek vongálódnak, amely az alább ismertetendő molekuláris mechanizmusok beindulásához vezet. A betegség patogenezisének kulcsfaktorai a következők (Gnudi, 2012; Sun et al., 2013):

### **(1) Oxidatív stressz**

A glükóz-oxidáció és a mitokondriális reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelésének következtében fellépő oxidatív stressz a DNS károsításán keresztül apoptózist indukál, illetve fokozza a glomerularis mesangialis sejtekben a transzformáló növekedési faktor (TGF)- $\beta$ 1, a plazminogén aktivátor inhibitor (PAI)-1 és az extracelluláris mátrix (ECM) komponensek szintézisét (Ha et al., 2001; Giacco és Brownlee, 2010). A reaktív oxigén szabadgyökök aktiválják az NF $\kappa$ B-, p38MAPK- és Jun N-terminális kináz-mediált jelátviteli útvonalakat, melyek hatására a poli- és hexó-zamin-útvonalak beindulásával nagy mennyiségű glikációs végtermék (AGE) és diacil-glicerol (DAG) termelődik, valamint aktiválódik a protein kináz C (PKC)-útvonal (Gnudi, 2012). Az endothelialis nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) szintézise és aktivitása is csökken az oxidatív stressz következtében, továbbá a termelt NO-ból peroxinitrit képződik, amely szintén hozzájárul a hemodinamikai zavarok kialakulásához (Balakumar et al., 2009).

### **(2) A glikációs végtermékek (AGE) túltermelődése**

Az extracelluláris mátrix komponenseihez való AGE-kötődés a sejt-mátrix és mátrix-mátrix interakciók megváltozásához vezet, serkenti az ECM termelését, illetve gátolja azok mátrix

metalloproteinázok általi lebomlását. Az AGE kovalens keresztkötéseket hozhat létre az extravazálódott plazmaproteinekkal is, ami glomerulosclerosishoz vezet (Yamagishi és Matsui, 2010). Hyperglycaemia esetén az AGE receptor (RAGE) overexpresszióját is leírták számos sejten, így például podocytaikon, amely nagy mértékben hozzájárul a diabeteses podocytopathia kialakulásához (D'Agati et al., 2010).

### **(3) Apoptózis**

Az apoptózis egészséges vesében rendkívül ritka, azonban számos más vesebetegséghez hasonlóan, diabeteses nephropathiában szenvedő páciensek vesebiopsziás mintájában is kimutatták az apoptotikus folyamatok jelenlétét. A proximális és distális tubulussejtek, valamint endothelialis és mesangialis sejtek is pusztulnak a diabetes hatására fokozódó programozott sejthalál következtében (Woo, 1995; Kumar et al., 2004).

### **(4) A prosklerotikus növekedési faktorok túltermelése**

A hyperglycaemia az AGE, ROS és angiotenzin II fokozott felszabadításán és a PKC aktivációján keresztül serkenti a mesangialis sejtek TGF- $\beta$ 1 termelését, amely tovább fokozza a GLUT1 expresszióját, circulus vitiosust hozva létre (Koya et al., 1997; Wolf et al., 1997; Inoki et al., 1999). A TGF- $\beta$ 1 és a másik fontos prosklerotikus citokin, a CTGF (kötőszöveti növekedési faktor) az extracelluláris mátrix komponensek, így a kollagén (elsősorban IV. típusú), fibronectin, laminin és tenascin extrém mértékű felszaporodásához, a mesangialis sejtek hypertrophiájához, valamint podocyta és endothelsejtek apoptózisához vezet (Wolf et al., 2013). A TGF- $\beta$ 1 az epithelialis-mesenchymalis transzformáció (EMT) fő regulátora (Hills és Squires, 2010).

### **(5) A proinflammatorikus citokinek felszabadulása következtében kialakuló gyulladás**

A 1990-es évek eleje óta tulajdonítanak jelentőséget annak, hogy az NF $\kappa$ B aktivációjának hatására a renalis sejtekben serkentődik a kemokinek, proinflammatorikus és kemoattraktáns citokinek (IL, TNF  $\alpha$ , MCP-1, RANTES és sejtadhéziós molekulák (L-selectin és s-ICAM)) termelődése. A microalbuminuria tubularis sejteket károsító hatása révén tovább súlyosbodik a gyulladásos folyamat (Abbate et al., 2006). A felszabaduló citokinek és kemokinek hatására a mononukleáris sejtek renalis infiltrációja fokozódik (Hasegawa et al., 1991; Navarro-González et al., 2011).

### *A diabeteses nephropathia szövettani elváltozásai*

A diabeteses nephropathia nemzetközileg elfogadott patológiai klasszifikációját Tervaert és munkatársai írták le (Tervaert et al., 2010). Az 1-es és 2-es típusú diabetes által kiváltott nephropathia következtében kialakuló morfológiai elváltozások és tünetek megegyeznek.

Patológiai szempontból az I. stádiumba azon eltérések tartoznak, amelyek esetében csak elektronmikroszkópos elváltozás, a glomerularis bazálmembrán (GBM) megvastagodása figyelhető meg, de fénymikroszkóppal csak enyhe, nem specifikus eltérések detektálhatók. A GBM megvastagodásának hátterében az áll, hogy az extracelluláris mátrix fiziológiás komponensei, így a kollagén IV. és VI., a laminin és a fibronectin patológiás mértékben felhalmozódnak. Ezen elváltozások 1-es típusú diabetes esetén már normoalbuminuria esetén is jelen lehetnek. A II. stádium előrehaladottabb állapotot jelöl, mely akár már néhány évvel az 1-es típusú diabetes diagnózisát követően kialakulhat, és a mesangialis mátrix expansiójával, valamint a filtrációs barrier felszínének csökkenésével jellemezhető. A III. stádium diagnosztikai kritériuma a legalább egy glomerulusban megjelenő nodularis sclerosis, azaz Kimmelstiel-Wilson lézió, amely fokális, lobuláris, kerek vagy ovális struktúra acelluláris hyalinmaggal, a széli részén pedig elszórtan félhold alakú mesangialis sejtmagokkal. A IV. stádiumba az előrehaladott, végstádiumú diabeteses glomerulosclerosist mutató elváltozások tartoznak a globális glomerulosclerosis több, mint 50%-os előfordulásával (Tervaert et al., 2010).

A hyperglycaemia az intraglomerularis sejteket nagymértékben károsítja. Az endothelsejteket fedő glycocalyxréteg sérül, az endothelsejtek megduzzadnak, és ezzel párhuzamosan fokozódik a filtrációs barrier permeabilitása (Satchell és Tooke, 2008; Singh et al., 2011). A podocyta apoptózisa, leválása, lábnyúlványaik ellapulása és fúziója kiemelkedő fontosságú a diabeteses nephropathia kialakulása és progressziója szempontjából (Susztak et al., 2006). A glomerularis elváltozásokhoz számos más morfológiai eltérés társulhat, mint például a tubularis bazálmembrán megvastagodása, intersticiális fibrosis és tubularis atrophia (Najafian et al., 2003). A mononukleáris sejtek intersticiális infiltrációja és arteriosclerosis is gyakran megjelenik (Bohle et al., 1991). Diabeteses nephropathia esetén jellemző a renalis arteriolák hyalinosisa, mely azonban számos más betegség, így például hypertensio és cyclosporin-indukált nephropathia esetén is kialakulhat (Stout et al., 1994; Tervaert et al., 2010). A glomerularis hyperfiltratio következtében microalbuminuria (30-300 mg/nap) jelenik meg, mely fontos a diabeteses nephropathia diagnózisában (Viberti et al., 1982; Marateb et al., 2014).

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkben 250-300 grammos hím Wistar patkányokat (n=33) vizsgáltunk, melyeket standard laboratóriumi körülmények között, igény szerinti táplálék- és folyadékellátás mellett tartottunk 12 órás világos-sötét ciklusban. Az állatok elhelyezését, gondozását és a kísérletek kivitelezését az etikai szabályoknak és az egyetemi protokollnak megfelelően végeztük (BA02/2000-15024/2011, Pécsi Tudományegyetem). A kísérletben résztvevő állatokat 4 csoportra osztottuk: **1)** Kontroll (fiziológiás sóoldat i.v. és i.p., n=10); **2)** PACAP-38-kezelt kontroll (fiziológiás sóoldat i.v. és 20 µg PACAP-38 i.p. minden második napon a kísérlet 1. napjától kezdődően 8 héten át, n=6); **3)** Diabeteses (65 mg/kg streptozotocin i.v. és fiziológiás sóoldat i.p., n=7); **4)** PACAP-38-kezelt diabeteses (65 mg/kg streptozotocin i.v. és 20 µg PACAP-38 i.p. minden második napon a streptozotocin kezeléstől kezdődően 8 héten át, n=10) **(1.táblázat).**

<b>Csoportok</b> <b>Kezelés</b>	<b>Kontroll</b>	<b>PACAP-38- kezelt kontroll</b>	<b>Diabetes</b>	<b>PACAP-38- kezelt diabetes</b>
<b>Intravénás</b>	fiz. só	fiz. só	65 mg/kg streptozotocin	65 mg/kg streptozotocin
<b>Intraperitoneális</b>	fiz. só	20 µg PACAP-38	fiz. só	20 µg PACAP-38

*1. táblázat: A diabeteses nephropathia vizsgálata során alkalmazott kezelések és az így kialakuló csoportok*

A diabeteses csoportban az állatoknak 65 mg/testtömeg (kg) (átlagosan 20 mg/állat) streptozotocint adtunk 200 µl fiziológiás sóoldatban oldva intravénásan. A PACAP-38-at 100 µl fiziológiás sóoldatban oldva intraperitoneálisan injektáltuk.

A patkányok testtömegét és vércukorszintjét a kísérlet előtt, valamint a nyolc hetes kísérlet időtartama alatt hetente mértük. A vércukormérés a farokvénából vett vérből automata vércukormérő segítségével történt (Accu-Check Active, Roche, Magyarország).

Az állatokat 8 hét elteltével isoflurannal túlaltattuk, majd veséiket eltávolítottuk, és a vesék tömegét megmértük. A diabeteses vesekárosodás nemzetközileg elfogadott, számos közleményben alkalmazott mutatóját, a vesetömeg/testtömeg arányt szintén meghatároztuk (Paczek et al., 2001; Kim et al., 2013). A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz szükséges

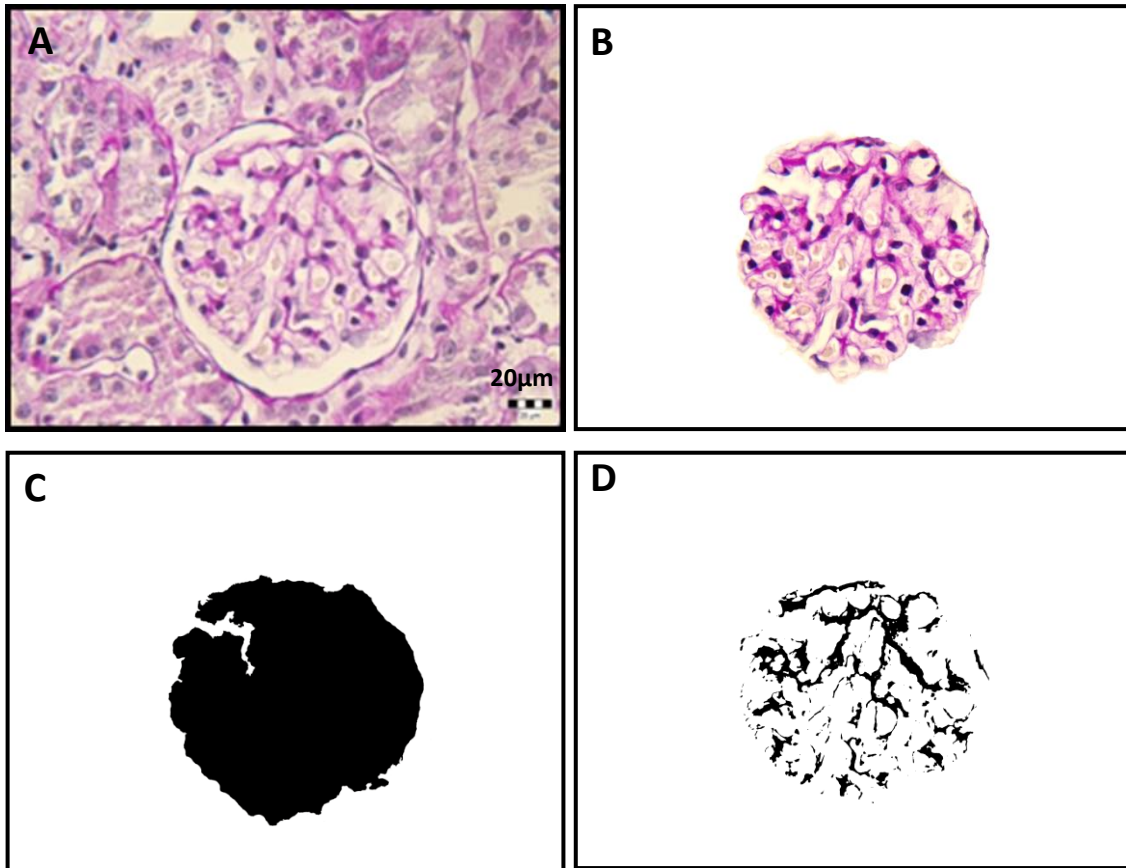
vesemintákat a vese felső pólusához közeli corticalis állományból vettük, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és további feldolgozásig -80°C-on tároltuk.

## **2.2. A vesék fénymikroszkópos szövettani és morfometriai analízise**

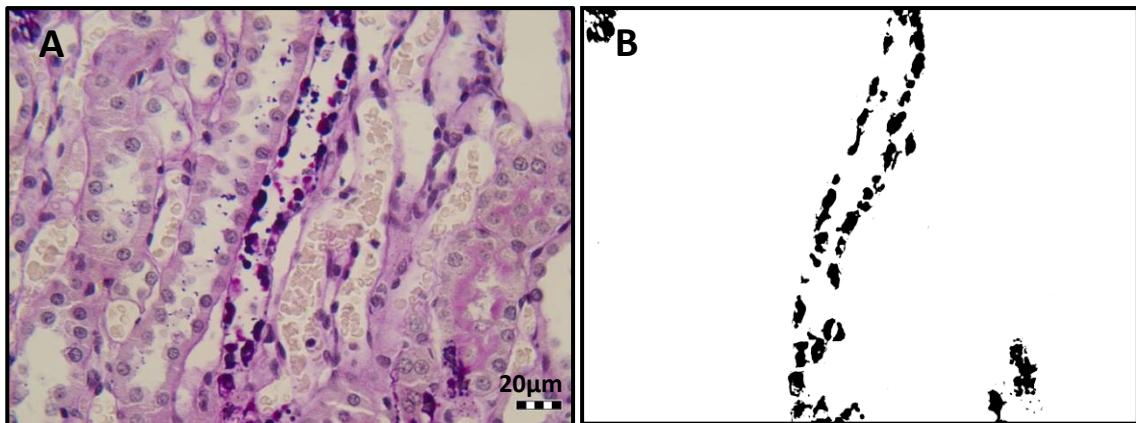
A veséket 4%-os pufferelt formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, és rotatoros mikrotommal (Leica 2135) 5 µm vékony sorozatmetszeteket készítettünk. A metszeteken hematoxilín-eozin (HE) festést és perjódsvav-Schiff (PAS) reakciót végeztünk. Továbbá abszolút alkoholban fixált vesemintákon PAS- és emésztett-PAS reakciót végeztünk a vesetubulus-granulumok glikogéntartalmának vizsgálatára. A metszetekről digitális kamerával (Olympus E-450 Digital SLR) 400x nagyítás mellett készítettünk felvételeket automata beállításban. Az összehasonlíthatóság érdekében minden esetben a vese felszínétől azonos távolságra elhelyezkedő strukturákat fényképeztük le, ezen szabály figyelembevételével azonban a képletek kiválasztása véletlenszerűen történt. Glomerulusok esetében a belső corticalis, míg a tubulusok esetében a mélyebb corticalis – corticomédulláris területeken elhelyezkedő képletekről készítettünk felvételt, utóbbi esetében olyan területet választva, ahol sem glomerulus, sem pedig nagyobb ér nem került a látótérbe. A glomerulusok vizsgálatakor a metszetek mindegyikén legalább 10 glomerulust vizsgáltunk meg (Tervaert et al., 2010). A tubularis elváltozások kvantifikálásának érdekében a tubularis glikogéngranulumok mennyiségét határoztuk meg.

A glomerulusok értékelése során először a glomerulusok manuális körüljelölését végeztük Adobe Photoshop CS6 programmal (**1.A-B ábra**), majd a glomerulus teljes területét feketévé, a kép többi részét pedig fehérré konvertáltuk (**1.C ábra**). Ezután ismét a kivágott színes glomerulusból kiindulva (**1.B ábra**) a program színekjelölő eszközének segítségével az intraglomerularis PAS-pozitivitást jelző püspöklila színt jelöltük ki, és ezen területeket konvertáltuk feketévé, míg a kép többi részét fehérré (**1.D ábra**). Így két fekete-fehér képet kaptunk, melyen a vizsgált terület (egyik képen a glomerulus, a másikon pedig az intraglomerularis PAS-pozitív terület) fekete, míg a kép többi része fehér színű volt. A tubulusok esetében az intratubularis PAS-pozitív glikogéngranulumokat konvertáltuk feketévé az előzőekben leírtakhoz hasonlóan, a kép többi részét pedig fehérre színeztük (**2. ábra**). A fekete-fehér képeken a feketére konvertált terület nagyságát Scion Image program segítségével határoztuk meg.

Végül az intraglomerularis PAS-pozitív terület nagyságát az ehhez tartozó glomerulus területének arányában fejeztük ki, míg az intratubularis PAS-pozitív areát a teljes látótérhez viszonyítottuk.



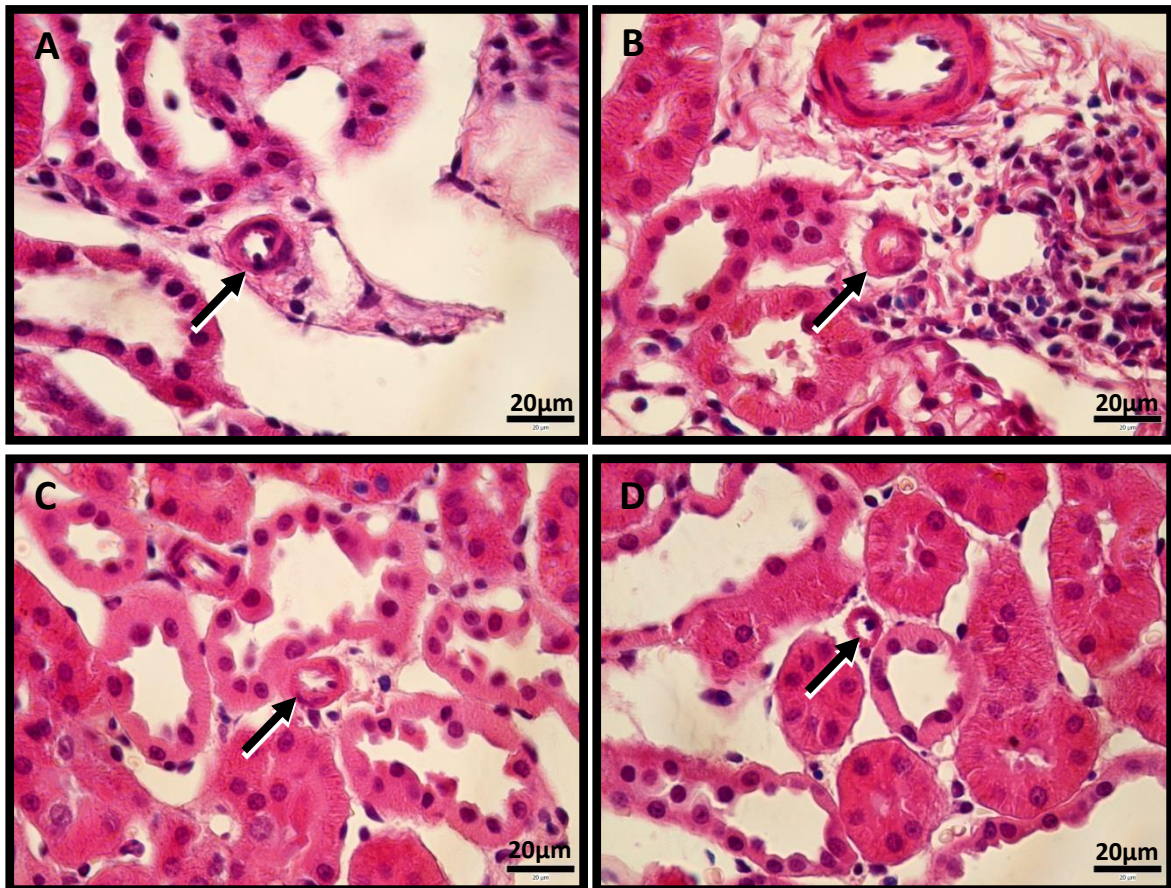
*1. ábra: Az intraglomerularis PAS-pozitív festődésű területek arányának meghatározása. Az eredeti felvételtől (A) Adobe Photoshop program segítségével kivágtuk a glomerulust (B), majd a glomerulus területét feketévé konvertáltuk (C). Ezt követően az eredeti színes glomerulusból kiindulva az intraglomerularis PAS-pozitív területet konvertáltuk feketévé (D). A: Perjódsvav-Schiff reakció. Lépték= 20µm.*



*2. ábra: A tubularis glikogéngranulumok mennyiségének meghatározása. Az eredeti tubulusokról készült felvételtől (A) a glikogéngranulumok színekjelölését követően azokat feketére konvertáltuk (B). A: Perjódsvav-Schiff reakció. Lépték= 20µm.*



Arteriolaris hyalinosis alatt az arteriolák falának károsodott, simaizomsejtmagot nem tartalmazó területeit értjük, melyet hematoxin-eozin (HE)-festett metszeteken értékeltünk a következő pontrendszer segítségével: „0” – hyalinosis nélküli ép arteriola, „1” – az arteriola fal kerületének negyedét, „2” – felét, „3” – háromnegyedét érintő hyalinosis, míg a „4” – az arteriola falának teljes kerületére kiterjedő elváltozás (3. ábra).



3. ábra: Reprezentatív felvételek az egyes vascularis score-okhoz tartozó elváltozásokról. „1” – az arteriolafal kerületének negyedét (A), „2” – felét (B), „3” – háromnegyedét érintő hyalinosis (C), „4” – az arteriola falának teljes kerületére kiterjedő elváltozás (D). Hematoxin-eozin festés. Lépték = 20 µm.

### 2.3. A vesék elektronmikroszkópos vizsgálata

A vese kéregállományából 5-5 darab, körülbelül 1 mm<sup>3</sup> nagyságú részt 5%-os glutáraldehidben 24 órán át +4°C-on fixáltuk. Utófixáláshoz a mintákat 1% ozmium-tetroxidban inkubáltuk 1 órán át +4°C-on. Felszálló alkoholsorban történő dehidrációt követően intermedierként propilénoxidot használtunk 2x15 percig, ezután 1:1 arányú propilénoxid-műgyantában rotatoros keverőben 1 órán át, majd szintén rotatoros keverőben infralámpás melegítés mellett 1 órán át műgyanta (Durcupan A+B+C+D) átítást

alkalmaztunk, majd a mintákat zselatin kapszulákba, Durcupan műgyanta keverékbe ágyasztuk. Ultramikrotómmal (LKB Type 4801) félvékony metszeteket készítettünk, és a metszeteket toluidinkékkel festettük meg. Ezen metszetekből a számunkra érdekes területeket kiválasztottuk, és ezekből ultravékony metszeteket készítettünk Leica Ultracut R ultramikrotóm segítségével, majd a metszeteket uranyl-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztoltuk. A metszeteket JEOL 1200 EX-II elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, és felvételeket készítettünk.

A bazálmembrán vizsgálata során 50.000-szeres nagyítással állatonként 10 elektronmikroszkópos felvételt készítettünk, és a negatív filmeket szkenneltük. A bazálmembrán vastagságának meghatározását az endothelsejtet és a podocyta-lábnyúlványok membránját összekötő merőleges szakasz hosszának mérésével végeztük Adobe Photoshop CS6 program segítségével. A mért értékeket nanométerben adtuk meg.

## **2.4. A PACAP-38 nephroprotektív hatásmechanizmusának vizsgálata**

### **2.4.1. Gyulladásos citokinek és adhézions molekulák vizsgálata patkány citokin array kit és Luminex Multiplex Immunoassay segítségével**

A diabeteses nephropathia patomechanizmusában fontos szerepet betöltő citokinek vizsgálatát a vesékből készült homogenizátumokon patkány citokin array kit segítségével szemikvantitatív módon végeztük (Mlynarski et al., 2005; Qi et al., 2007; Higurashi et al., 2009; Navarro-González et al., 2011). A vizsgált citokinek listáját az eredmények fejezetben található **2. táblázat** tartalmazza. A módszer a mintában lévő fehérjék és a nitrocellulóz membránon duplikátumban található befogó antitestek közötti specifikus kötődésen alapul. A vizsgálat során minden csoport – kontroll, PACAP-38-kezelt kontroll, diabeteses, PACAP-38-kezelt diabeteses – vesemintáit megvizsgáltuk. Az array használata a gyártó leírásának megfelelően történt. Az előkészített vesemintákat PBS-ben homogenizáltuk proteáz inhibitor koktél (4-(2-aminoetil)-benzolszulfonil-fluorid (AEBSF), aprotinin, bestatin, E-64, leupeptin, pepstatin A) hozzáadásával, majd 1% Triton X-100-at adtunk a mintákhoz, végül 15 µl biotinilált antitesttel 1 órán át inkubáltuk. A nitrocellulóz membránt blokkoló pufferrel mostuk 1 órán át. A blokkolást követően a biotinilált antitesttel inkubált homogenizátum 1,5 ml-ét a nitrocellulóz membránra pipettáztuk, és +2-8°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Ezután a membránokat 3x10 percig pufferben mostuk, majd tormagyökérxidázzal konjugált streptavidinnel fél órán át inkubáltuk. Háromszori mosást követően kemilumineszcens



detektáló reagenst adtunk a keverékhez, és a filmeket előhívtuk. A kiértékelés során az immunpozitivitás pixeldenzitását ImageJ 1.40 szoftver segítségével értékeltük.

Luminex Multiplex Immunoassay módszerrel az sICAM-1 és L-selectin szintjét határoztuk meg Flurokine MAP Rat Base Kit segítségével. A kísérletet a gyártó leírásának megfelelően végeztük. A méréseket megelőző optimalizálásokat követően a mintákat hígítatlanul, „vakon” mértük le. A vizsgálatot Luminex 100 eszközzel végeztük, a median fluoreszcens intenzitás meghatározása Luminex 100 IS szoftverrel történt. A mintákat 1% proteáz-inhibitor koktélt (AEBSF, aprotinin, bestatin, E-64, leupeptin, pepstatin A) tartalmazó RPMI-1640-ban homogenizáltuk. A méréshez a mintákat 20 mg/ml koncentrációban használtuk, és minden mérést kétszer végeztünk el. A minták, valamint a standard 50 µl-ét 96-lyukú lemezre pipettáztuk, melyek 50 µl antitesttel bevont gyöngyöt tartalmaztak. Biotinilált szekunder antitestet és streptavidin-PE-t adtunk a mintákhoz egymást követő mosási és inkubálási lépések közbeiktatásával. Az utolsó mosást követően 100 µl puffert adtunk minden wellhez. Inkubációt követően a lemezt Luminex 100 array reader segítségével leolvastuk. Az értékelés során a standard görbe felvétele 4 PL regressziós illesztés segítségével történt. Az adatok elemzését MasterPlex szoftverrel végeztük. Az eredményeket korábbi közleményekben található Luminex mérésekhez hasonlóan szövetsúlyra vonatkoztatva, pg/g mértékegységben fejeztük ki (Cook et al., 2014; Dimberg et al., 2014).

#### **2.4.2. Kvantitatív real-time („valós idejű”) polimeráz láncreakció (qRT-PCR)**

A mintákat TRIzol reagensben történő 30 perces oldódást követően mechanikusan homogenizáltuk, és RNáz-mentes kloroform hozzáadását követően lecentrifugáltuk (15 perc, 10.000g, +4°C). 1 órán át inkubáltuk a mintákat 500 µL RNáz-mentes izopropanollal -20°C-on, majd az RNáz-mentes vízben oldott totál RNS-t -20°C-on tároltuk. A reverz transzkriptáz reakcióhoz használt assay a következőket tartalmazta: 2 µg RNS, 0,112 µM oligo (dT), 0,5 mM dNTP, 200 U High Capacity RT 1× RT pufferben. A RT-PCR analízishez használt primerek a kollagén IV. esetében: Col4a1: 5' – TCG GCT ATT CCT TCG TGA TG – 3' és 5' – GGA TGG CGT GGG CTT CTT – 3' (GenBank azonosító: NM\_009931.2, 52°C, amplimer méret: 209 bp) és az aktin esetében: Actb: 5' – GCC AAC CGT GAA AAG ATG A – 3' és 5' – CAA GAA GGA AGG CTG GAA AA – 3' (GenBank azonosító: NM\_007393, amplimer méret: 462 bp). Az amplifikációk hőciklus-szabályozó készülékben (thermocyclerben) történtek (Labnet MultiGene™ 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet International, Edison, NJ, USA) 25 µL végső térfogatban, mely tartalmazott 1 µL „forward” és „reverz” primert [0,4 µM], 0,5 µL dNTP-t [200 µM] és 5 egység Promega GoTaq® DNS polimerázt

1× reakció pufferben. A ciklusok a következőképp történtek: 2 perc 95°C, majd 35 ciklus (denaturáció, 94°C, 1 perc; annellálás Col4a1 esetében +52°C, míg Actb esetén +53°C-on 1 percig; extenzió +72°C-on 90 másodpercig), majd +72°C-on 10 percig. A PCR termékek analízise etídium-bromidot tartalmazó 1,2%-os agaróz gélben történt. Belső kontrollként aktint használtunk. Az optikai denzitás mérését ImageJ 1.40 szoftver segítségével végeztük, és az értékeket aktinra normalizáltuk.

### **2.4.3. Western blot**

A vese corticalis részéből származó mintákat 100 µl 50 mM-os Tris-HCl-et (pH 7,0) tartalmazó jéghideg pufferben homogenizáltuk, majd a 2.4.1. fejezetben részletezett összetételű proteáz inhibitor keveréket adtunk hozzá. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist Protran nitrocellulóz membránra történő blottolás követte. A membránokat 5%-os zsírszegény tejporban blokkoltuk szobahőmérsékleten 2 órán át, majd a következő primer antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át +4°C-on: anti-tAkt, foszfospecifikus anti-Akt-1 Ser473, foszfospecifikus anti-ERK1/2 Thr202/Tyr204, foszfospecifikus anti-p38MAPK (1:500), anti-TGF-β1 (1:400), anti-kollagén IV. (1:400) és anti-aktin (1:10000). Ezután hatszor 5 percig mostuk a membránokat 0,2% Tween tartalmazó Tris-pufferelt sóoldatban (pH=7,5), majd kecske anti-nyúl (1:3000) vagy anti-egér (1:1500) tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk fél órán keresztül. Az antigén-antitest komplexek vizualizálása erősített kemilumineszcencia segítségével történt. A pixeldenzitást ImageJ 1.40 program segítségével mértük. A normalizációt a pAkt esetében tAkt-re, míg a többi fehérje esetében aktin-ra végeztük.

### **2.4.4. Biokémiai assay a malondialdehid (MDA), glutathion (GSH) és szuperoxid-dizmutáz (SOD) szintjének meghatározására**

A malondialdehid szintjének mérését Placer által leírt módon végeztük (Placer et al., 1966). A vesehomogenizátumokhoz telített tiobarbiturát 10% perklórsavban (TBA) –20% triklóracetát (TCA) reagenst adtunk, majd 20 perces 100°C-on történő inkubációt követően a mintákat jéghideg vízbe helyeztük, és 4000 rpm fordulatszámon 15 percig centrifugáltuk. Az MDA koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg 532 nm-en, és az értékeket µmol/g szövetre adtuk meg.

A glutathion szintjének meghatározását Sedlak és Lindsay által leírt módszerrel végeztük (Sedlak és Lindsay, 1968). A mintákhoz 10%-os triklórecetsavat adtunk, majd a

vesehomogenizátumokat 15 percig 4000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszó 2 ml-éhez 4 ml 0,4 M-os (pH 8,7) trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS) puffert adtunk, és az így kapott elegyet 100 µl 5,5-ditiobisz-2-nitrobenzoészav (DTNB) hozzáadását követően 412 nm-en fotometráltuk (Milton Roy Spectronic 6001). A renális GSH-koncentrációt standardgörbe alapján µmol/g-ban határoztuk meg.

A szuperoxid-dizmutáz meghatározása során a vesehomogenizátumokat 20 percig 16.000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk, majd a felülúszóból Misra és Firdovich által (Misra és Firdovich, 1972) leírt módszerrel mértük a SOD koncentrációját. A SOD gátolja az adrenalin-adrenokrom átalakulást, melynek abszorpciós maximuma 480 nm-en van. A kapott értékeket IU/g szövettömegre adtuk meg.

## **2.5. Felhasznált gyógyszerek és vegyszerek**

A streptozotocin, az anti-aktin antitest és a proteáz inhibitor koktél gyártója a Sigma (Magyarország), az isoflurant az Abbott gyártotta (Forane, Egyesült Királyság). A patkány citokin array kitért és a Flurokine MAP Rat Base Kit-et az R&D Systems-től (Biomedica Hungaria, Magyarország), a RPMI-1640-et és a RT-PCR reakcióhoz szükséges anyagokat a Life Technologies-től (Magyarország) vásároltuk. A protran nitrocellulóz membrán gyártója a Whatman GmbH (Németország). Az anti-tAkt, foszfospecifikus anti-Akt-1 Ser473, foszfospecifikus anti-ERK1/2 Thr202/Tyr204 és foszfospecifikus anti-p38MAPK antitestet a Cell Signaling Technology (Amerikai Egyesült Államok), az anti-TGF-β1-et az Abcam (Egyesült Királyság), az anti-kollagén IV.-et, valamint a kemilumineszcenciához szükséges anyagokat a Millipore és az Amersham Biosciences (Magyarország) gyártotta. A kecske anti-nyúl és anti-egér tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitestet a Bio-Rad Laboratories-től (Amerikai Egyesült Államok), a DTNB-t a SERVA-tól vásároltuk (Németország). A PACAP-38-hoz a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetével történő kollaboráció keretében jutottunk hozzá (Prof. Dr. Tóth Gábor).

## **2.6. Statisztikai analízis**

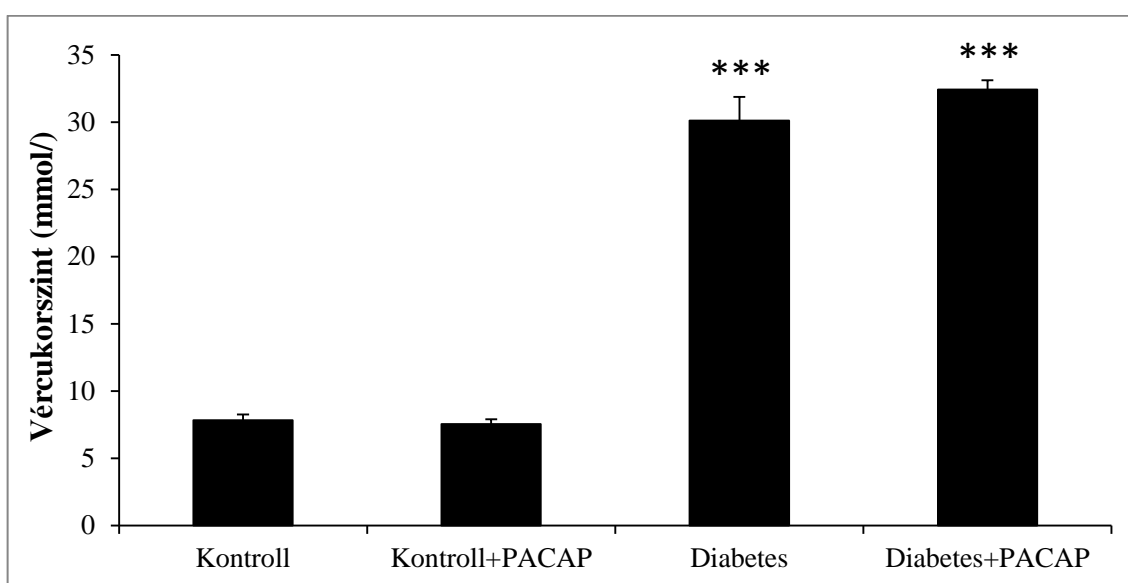
A kapott eredmények statisztikai értékelése Microsoft Office Excel és GraphPad szoftver segítségével történt. Az egyes csoportok közötti szignifikáns eltérések kimutatására kétutas variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni-korrekcióval.

A kapott eredményt akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, amennyiben p érték kisebb volt, mint 0,05.

### 3. Eredmények

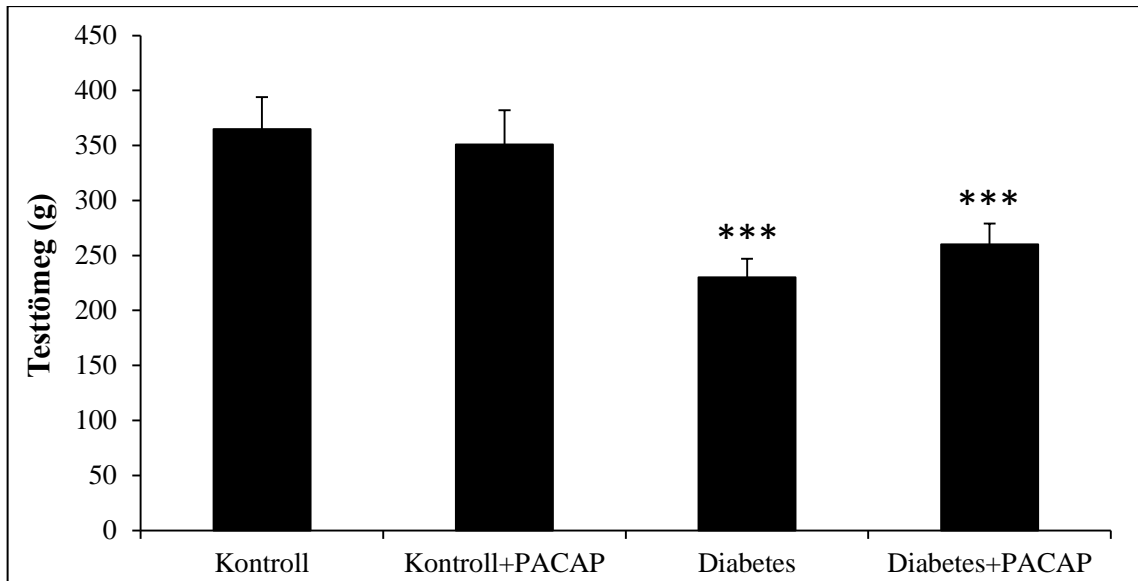
#### 3.1. A PACAP-38-kezelés hatása kontroll és diabeteses állatok vércukorszintjére, testtömegére és vesetömeg-testtömeg arányára

A patkányok normális éhomi vércukorszintje az emberével körülbelül megegyező, 2,9-5,6 mmol/l közötti érték, az általunk mért eseti glükózsztint a kísérlet megkezdése előtt 5,6-7,8 mmol/l között változott. Az egyszeri streptozotocin injekció szignifikáns vércukorszint-emelkedéshez vezetett mind a diabeteses, mind pedig az egyidejűleg PACAP-38 injekcióval kezelt diabeteses állatok esetén. A 8 hetes PACAP-38-kezelés nem eredményezett változást sem a kontroll, sem pedig a diabeteses állatok vércukorszintjében (**4. ábra**).



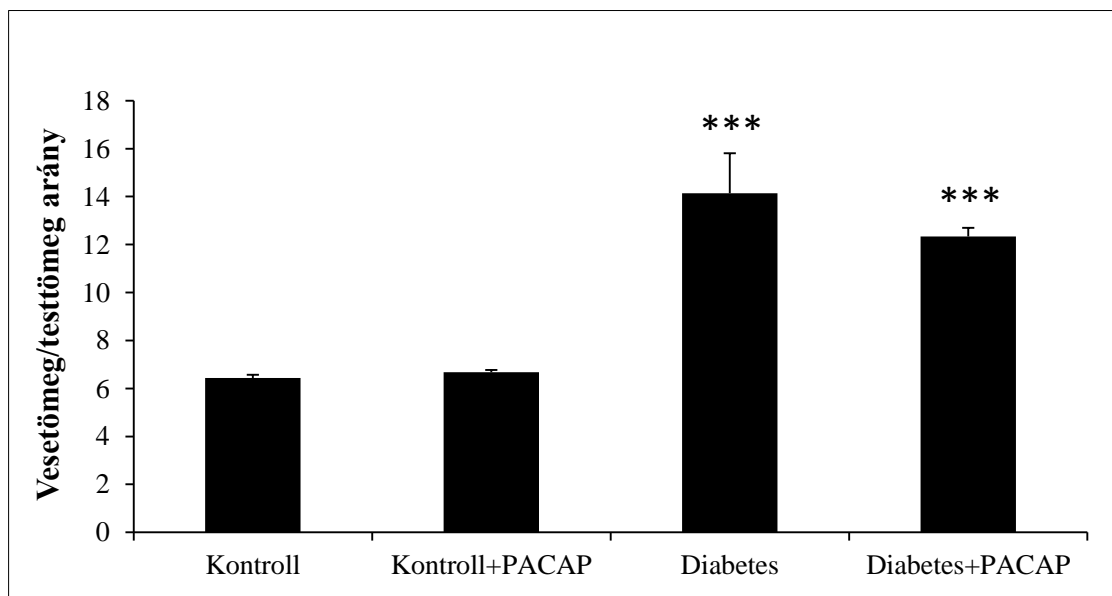
4. ábra: Kontroll, PACAP-38-kezelt kontroll, diabeteses, valamint PACAP-38-kezelt diabeteses állatok vércukorszintje a 8. héten. Kéttutas ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=6-10$ /csoport; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. kontroll és kontroll+PACAP.

A PACAP-38-kezelés nem eredményezett szignifikáns változást a kontroll patkányok testtömegében, azonban a kísérlet 8. hetének végére a diabeteses állatok testtömege szignifikánsan csökkent. A PACAP-38-kezelt állatok súlycsökkenése enyhébb volt ugyan, de a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak (**5. ábra**).



5. ábra: Kontroll, PACAP-38-kezelt kontroll, diabeteses, valamint PACAP-38-kezelt diabeteses állatok vesetömege a 8. héten. Kétutas ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=6-10$ /csoport; \*\*\*  $p<0,001$  vs. kontroll és kontroll+PACAP.

Hasonlóképpen nem volt szignifikáns különbség a kontroll, valamint a PACAP-38-kezelt állatok vesetömeg-testtömeg arányában sem. A diabeteses állatokban az arány szignifikáns emelkedését tapasztaltuk más kutatócsoportokhoz hasonlóan (Chen et al., 2001). A PACAP-38-kezelés nem csökkentette a diabetes hatására megnövekedett vesetömeg-testtömeg arányt szignifikáns mértékben (6. ábra).

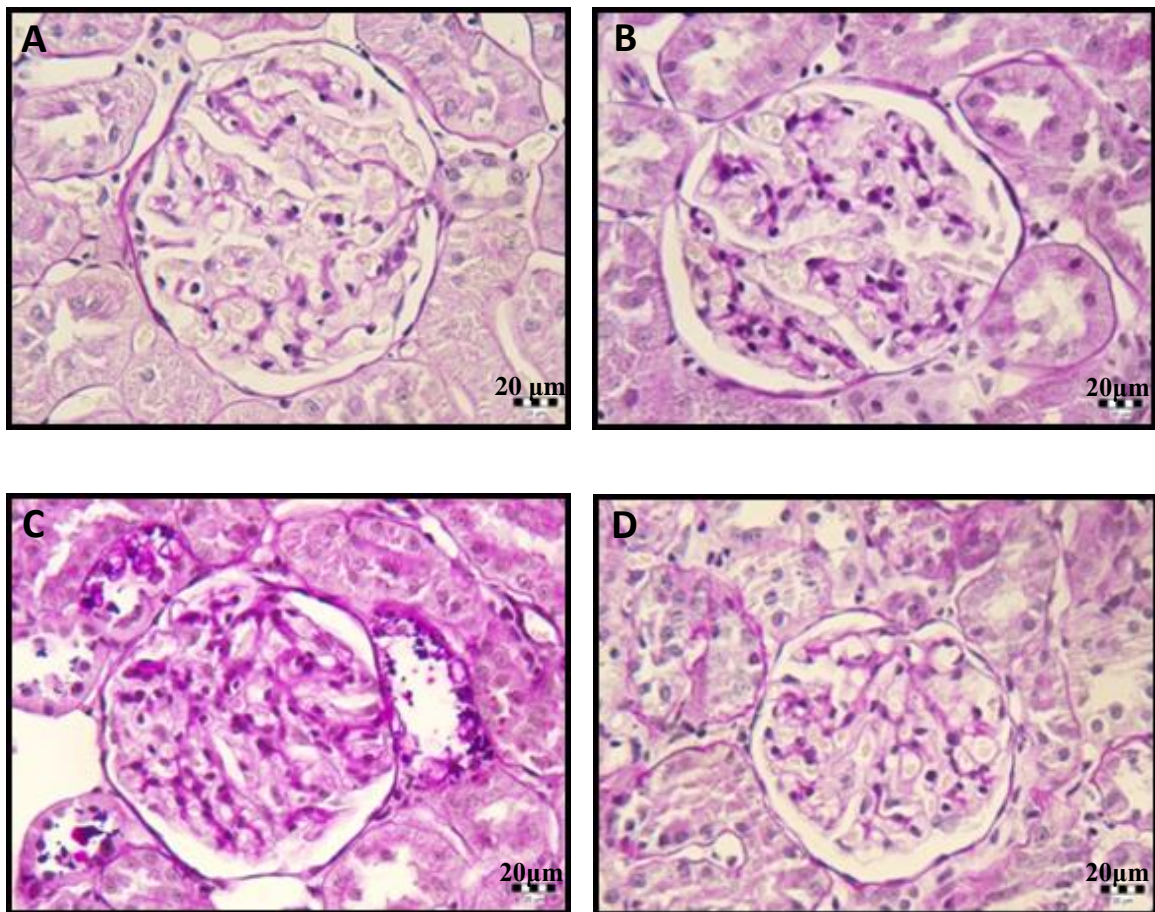


6. ábra: Kontroll, PACAP-38-kezelt kontroll, diabeteses, valamint PACAP-38-kezelt diabeteses állatok vesetömeg-testtömeg aránya a 8. héten. Kétutas ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=6-10$ /csoport; \*\*\*  $p<0,001$  vs. kontroll és kontroll+PACAP.

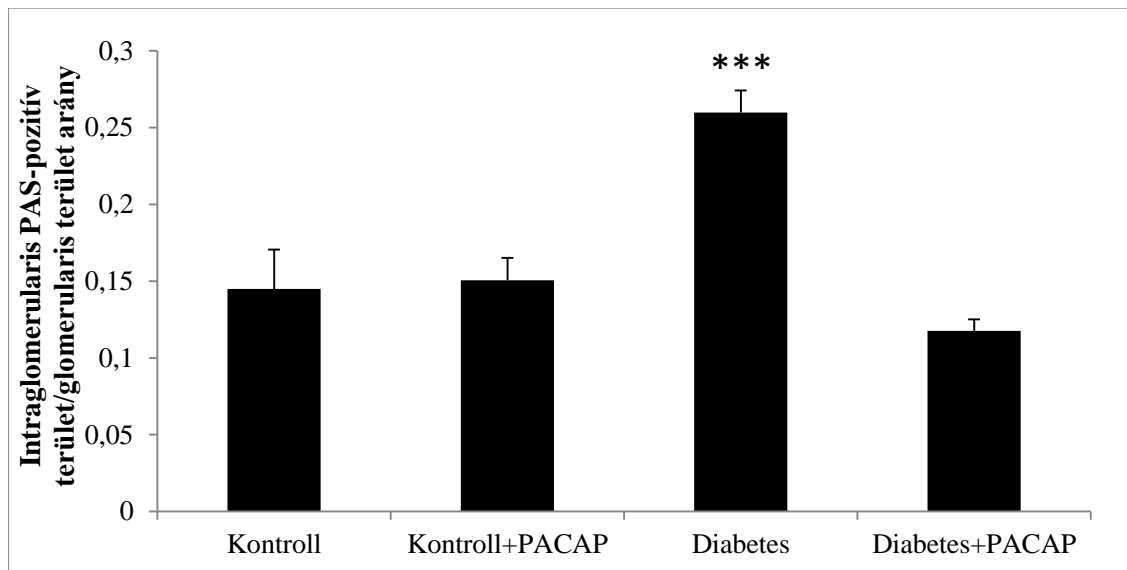
### 3.2. Szövettani eredmények

#### 3.2.1. A PACAP-38-kezelés hatása a diabetes-indukált glomerularis elváltozásokra

A kontroll állatok veséinek szövettani vizsgálata során ép glomerularis szerkezetet figyeltünk meg (7.A ábra), amelyben a nyolc hetes PACAP-38-kezelés nem eredményezett változást (7.B ábra). A diabeteses állatok veséi a diabeteses glomerulopathia jellegzetes elváltozásait mutatták mesangialis mátrix expanszióval és a glomerularis bazálmembrán megvastagodásával. Ezen eltérések együttes következménye az intraglomerularis PAS-pozitív terület felszaporodása, mely a glomerulopathia kvantifikálására alkalmas mutató (7.C ábra). PACAP-38 hatására szignifikánsan kisebb mértékű glomerularis károsodást figyeltünk meg, az intraglomerularis PAS-pozitív terület nagysága a kontroll minták értékével egyezett meg (7.D ábra) (8. ábra).



7. ábra: Reprezentatív felvételek kontroll (A), PACAP-38-kezelt kontroll (B), diabeteses (C) és PACAP-38-kezelt diabeteses (D) állatok glomerulusairól. Perjódsav-Schiff reakció, 400x nagyítás. Lépték = 20 µm.



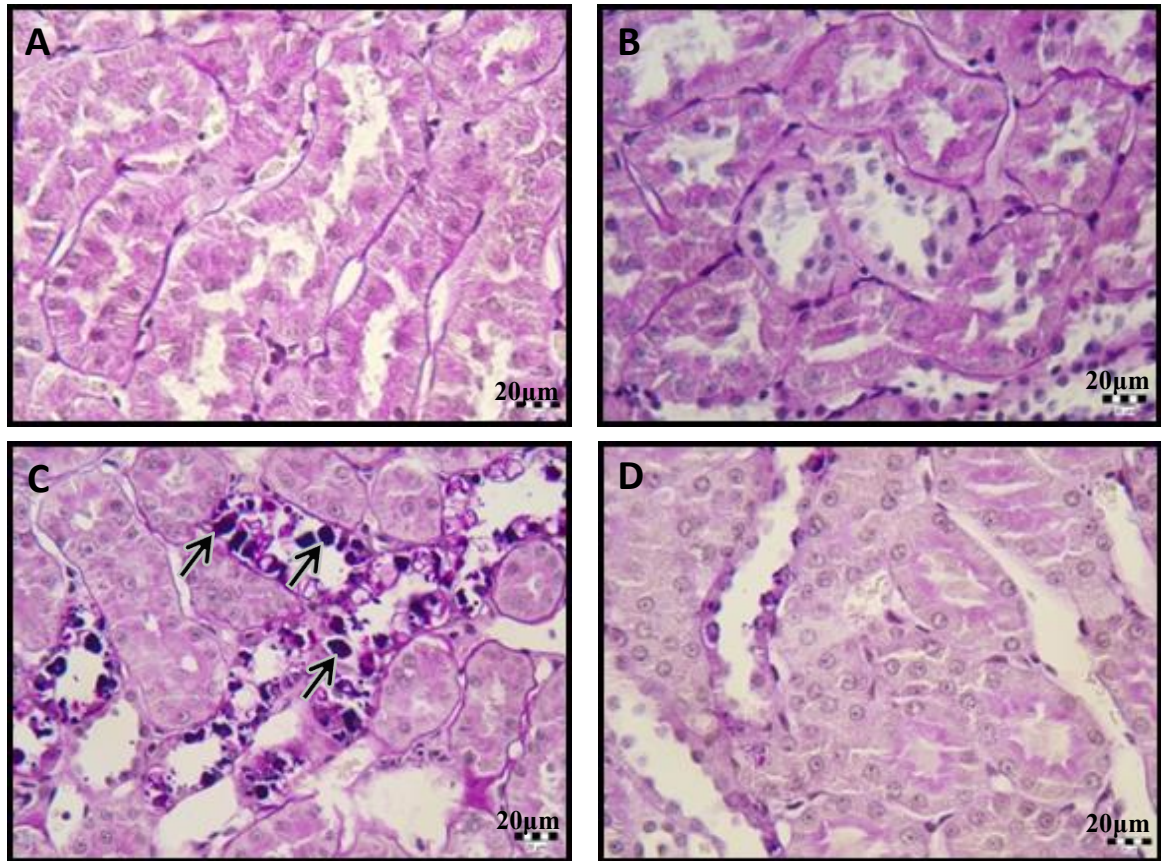
8. ábra: Az intraglomerularis PAS-pozitív terület és a teljes glomerularis terület aránya kontroll, PACAP-38-kezelt kontroll, diabeteses és PACAP-38-kezelt diabeteses csoportokban. Kétutas ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=5$ /csoport; \*\*\*  $p<0,001$  vs. kontroll, kontroll+PACAP és diabetes+PACAP.

### 3.2.2. A PACAP-38-kezelés hatása a diabetes-indukált tubularis elváltozásokra

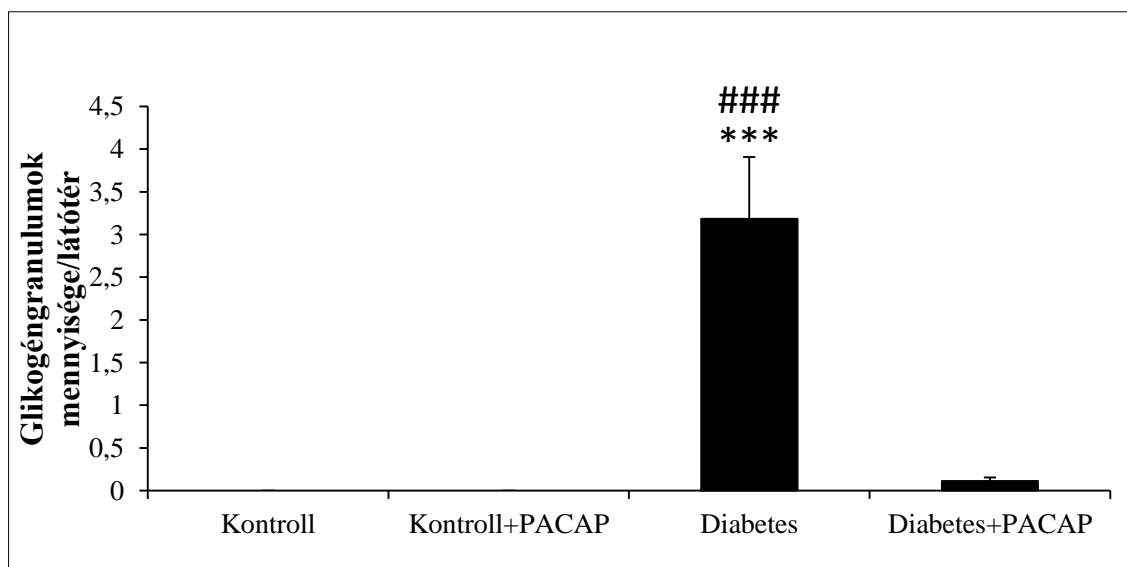
A diabeteses állatok vesemintáiban a tubularis hámsejtekben PAS-pozitív granulációt észleltünk. Ezen granulumok analizálására végzett emésztett-PAS reakció a tubularis granulumok glikogéntartalmát igazolta.

A diabeteses tubulopathiára jellemző elváltozás az úgynevezett Armani-Ebstein jelenség, vagyis a tubularis glikogéngranulomok felszaporodása (Zhou et al., 2013). Ezen PAS-pozitív glikogéndepozitumok a kontroll, valamint a PACAP-38-kezelt kontroll állatok veséjéből teljes mértékben hiányoztak (**9.A, B ábra**). Ezzel szemben a kezeletlen diabeteses csoport veséiben kifejezett volt az Armani-Ebstein jelenség, ezen mintákban nagy mennyiségű tubularis glikogéngranulom felhalmozódását figyeltük meg (**9.C ábra**). A PACAP-38-kezelés szignifikánsan csökkentette a glikogéngranulomok kialakulásának mértékét a diabeteses állatok vesetubulusaiban (**9.D ábra**) (**10. ábra**).





9. ábra: Reprezentatív felvételek kontroll (A), PACAP-38-kezelt kontroll (B), diabeteses (C) és PACAP-38-kezelt diabeteses (D) állatok tubulusairól. Az Armanni-Ebstein jelenség (nyilak) nagy mennyiségben van jelen a kezeletlen diabeteses állatok tubulussejtjeiben (C), azonban a PACAP-38-kezelt diabeteses vesékben (D) jelentősen kisebb mennyiségben jelenik meg, míg a kontroll (A), valamint PACAP-38-kezelt kontroll (B) vesékből teljes mértékben hiányzik. Perjódsvav-Schiff reakció, 400x nagyítás. Lépték = 20 µm.

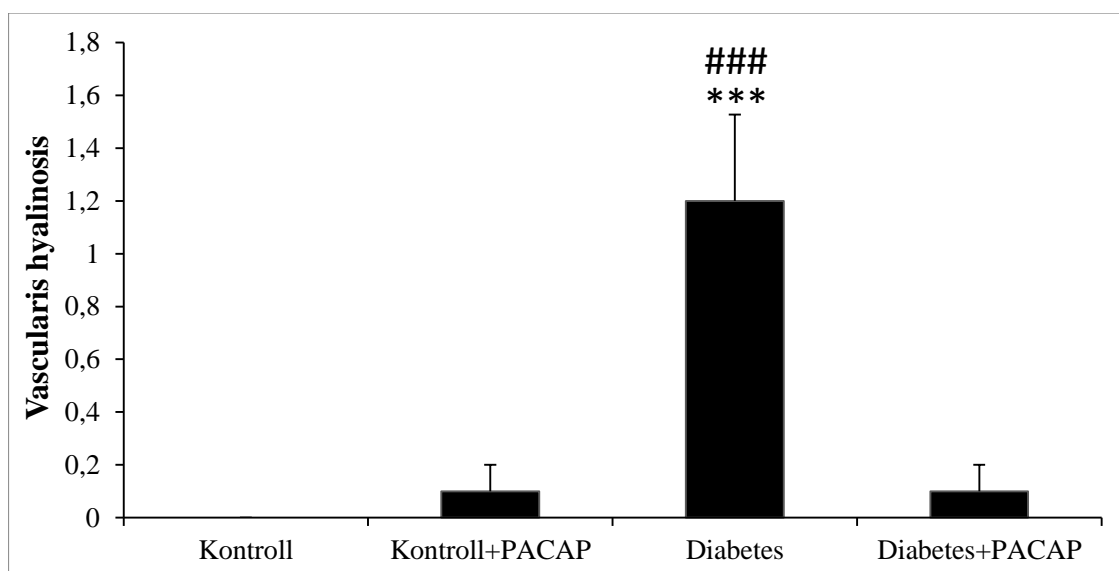


10. ábra: Glikogéngranulomok mennyisége látóterenként kontroll, PACAP-38-kezelt kontroll, diabeteses és PACAP-38-kezelt diabeteses csoportokban. Kétutas ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=5$ /csoport; \*\*\*  $p<0,001$  vs. kontroll és kontroll+PACAP; ###  $p<0,001$  vs. diabetes+PACAP.



### 3.2.3. A PACAP-38-kezelés hatása a diabetes-indukált vascularis hyalinosisra

A vascularis hyalinosis jellegzetes, de nem patogénikus manifesztációja a diabeteses microangiopathiának, mely a kezeletlen, valamint PACAP-38-kezelt kontroll állatok veséjében minimális mennyiségben volt jelen. Ezzel szemben a kezeletlen diabeteses vesékben szignifikánsan magasabb fokú arteriolaris hyalinosis alakult ki, melynek megjelenése PACAP-38-kezeléssel teljes mértékben megelőzhető volt (**11. ábra**).

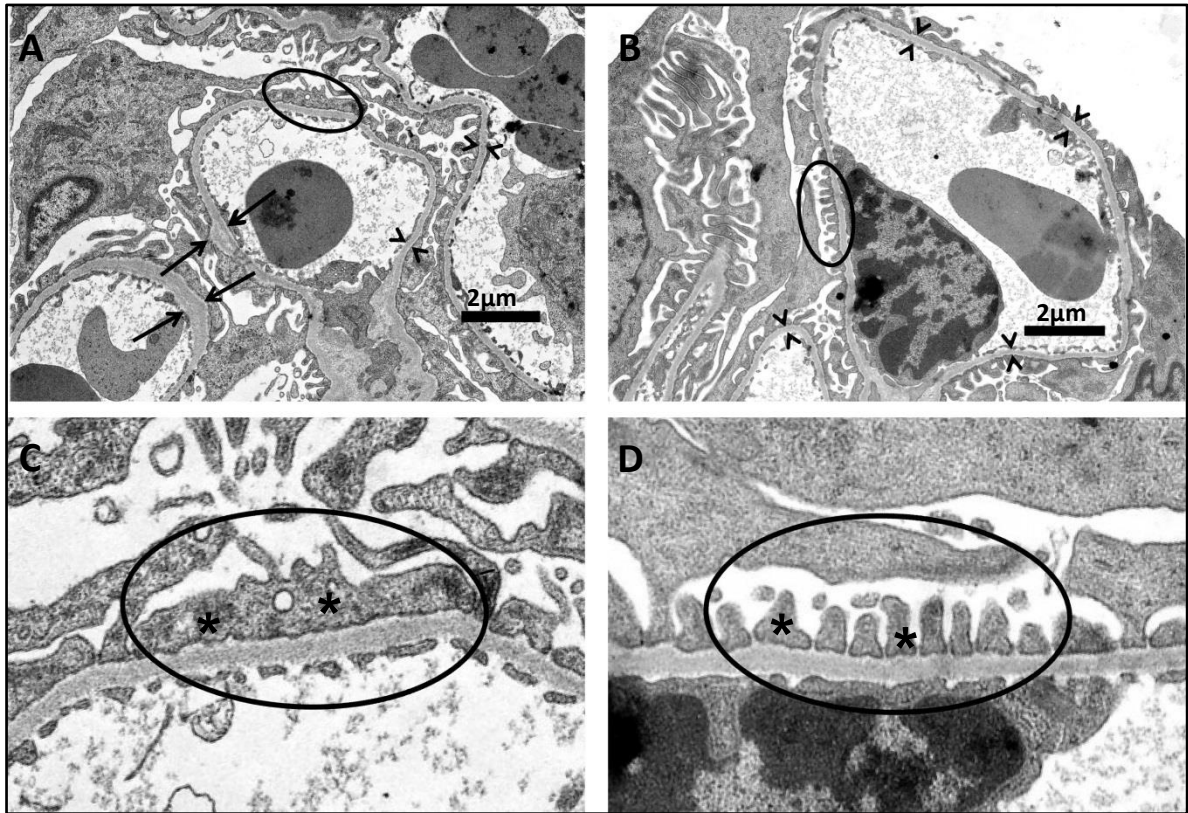


11. ábra: Vascularis hyalinosis kontroll, PACAP-38-kezelt kontroll, diabeteses és PACAP-38-kezelt diabeteses csoportokban. Kétutas ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=5/\text{csoport}$ ;  $***p<0,001$  vs. kontroll és kontroll+PACAP;  $###p<0,001$  vs. diabetes+PACAP.

### 3.3. A PACAP-38 hatása a diabeteses nephropathia elektronmikroszkópos elváltozásaira

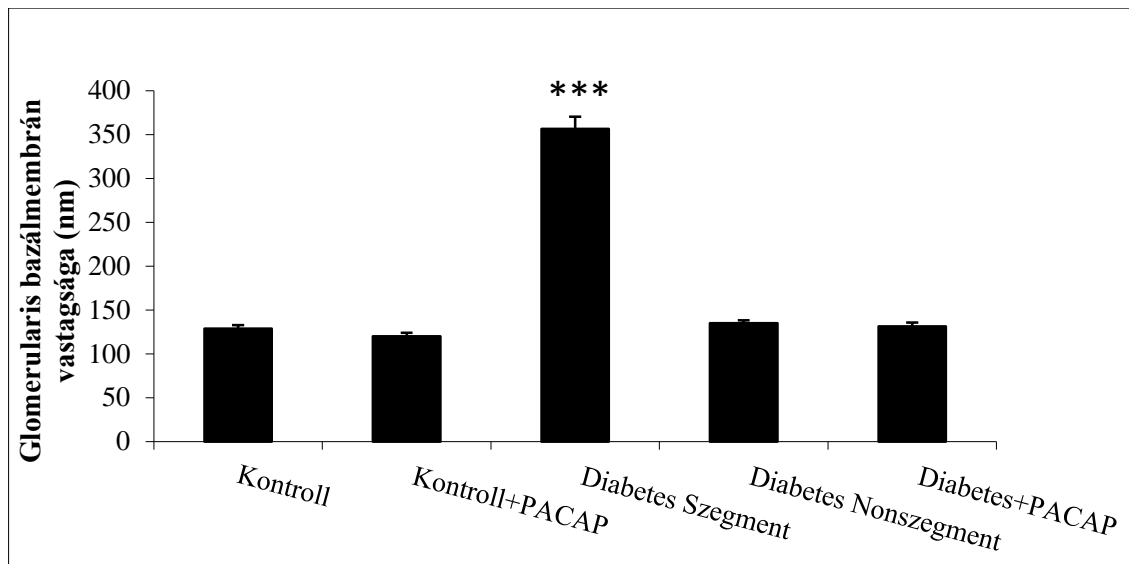
A kezeletlen diabeteses állatok glomerulusaiban a bazálmembrán szakaszosan megvastagodott. Ezeken a területeken a GBM szignifikánsan vastagabb volt, mint a kontroll, PACAP-38-kezelt kontroll vagy PACAP-38-kezelt diabeteses állatok esetében. Ezzel szemben a diabeteses állatok glomerularis bazálmembránjának meg nem vastagodott területei nem mutattak szignifikáns eltérést a kontroll értékektől (**12.A ábra**). A PACAP-38-kezelés meggátolta a diabeteses állatokban a szegmentális GBM megvastagodás kialakulását, a GBM vastagsága esetükben a kezeletlen, valamint PACAP-38-kezelt kontroll állatokban mért értékekkel egyezett meg (**12.B ábra**) (**13. ábra**). A diabeteses vesékben a podocyta súlyos károsodását észleltük a lábnyúlványok jelentős mértékű kiszélesedésével, ellapulásával, valamint fúziójával (**12.C ábra**). A PACAP-38-kezelt diabeteses állatok veséiben a

podocyták nem mutattak morfológiai eltérést, az elektronmikroszkópos felvételeken intakt podocyta lábnyúlványok voltak láthatóak (12.D ábra).



**12. ábra: Diabetesek (A; C) és PACAP-38-kezelt diabetesek (B; D) állatok veséiről készült reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek.** A diabetesek vesékben a glomerularis bazálmembrán szegmentális megvastagodása figyelhető meg (páros nyilak), míg a GBM többi része változatlan vastagságú (páros nyílhegyek). A podocyta lábnyúlványainak fúziója szintén jelentős mértékű a diabetesek mintákban (C; bekarikázott terület). A PACAP-38-kezelés hatékonyan megakadályozta a GBM szegmentális megvastagodását (B). Lépték = 2 μm.

Az „A” kép felnagyított részén látható a podocyta lábnyúlványainak diabetes hatására kialakuló súlyos károsodása (C; a lábnyúlványok fúziója csillaggal jelölve). A „B” kép felnagyított része a podocyta lábnyúlványainak PACAP-38-kezelés hatására intakt állapotban maradt lábnyúlványait ábrázolja (D; a lábnyúlványok csillaggal jelölve).

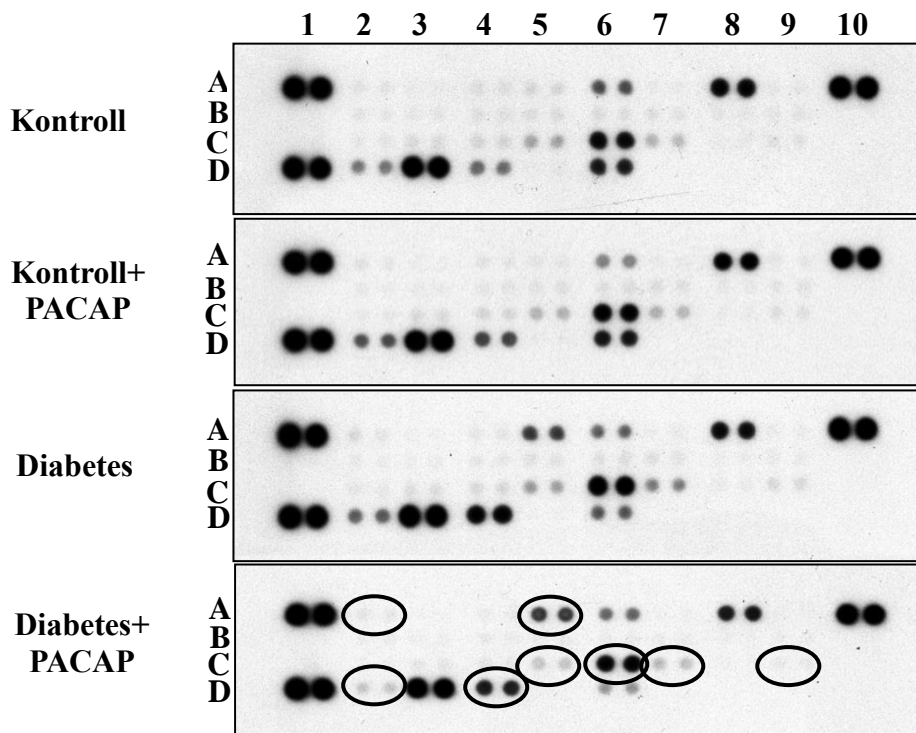


13. ábra: A GBM vastagsága kontroll, PACAP-38-kezelt kontroll, diabeteses és PACAP-38-kezelt diabeteses csoportokban. A diabeteses csoport bazálmembránjának szegmentálisan megvastagodott (Diabetes Szegment), és meg nem vastagodott (Diabetes Nonszegment) részein mért értékeket külön oszlop mutatja. Kétutas ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=4$ /csoport; \*\*\*  $p<0,001$  vs. többi csoport.

### 3.4. A PACAP-38 nephroprotektív hatásának mechanizmusa

#### 3.4.1. A PACAP-38-kezelés hatása a vizsgált citokinek, kemokinek és adhéziós molekulák expressziójára

Kontroll állatokban a PACAP-38-kezelés nem változtatta a legtöbb citokin expresszióját, de néhány citokin szintjében emelkedést tapasztaltunk, így a TIMP-1, a gamma interferon-indukált monokin (MIG/CXCL9), a MIP-3 $\alpha$ , a RANTES és az L-selectin adhéziós molekula (CD62L/LECAM-1) esetén, míg a kezelés csökkentette a lipopoliszacharid-indukált CXC kemokin (LIX/CXCL5) és a ciliáris neurotrófikus faktor (CNTF) szintjét. A diabetes jelentősen fokozta a gyulladásos citokinek többségének expresszióját, így emelkedett a citokin-indukált neutrophil kemoattraktáns-1 (CINC-1), a TIMP-1, a LIX, a MIG, a MIP-3 $\alpha$ , a RANTES és a CNTF, valamint az adhéziós molekulák közül az L-selectin és az sICAM szintje. A másnaponta alkalmazott PACAP-38-kezelés nagymértékben csökkentette ezen citokinek és kemokinek expresszióját, melyek közül néhány a kontroll vesékben mért szintre tért vissza. Néhány citokin, így a fraktalin, a thymus kemokin és az interleukinek szintjében sem a diabetes, sem pedig a PACAP-38-kezelés nem eredményezett változást (14-16. ábra, 2. táblázat).

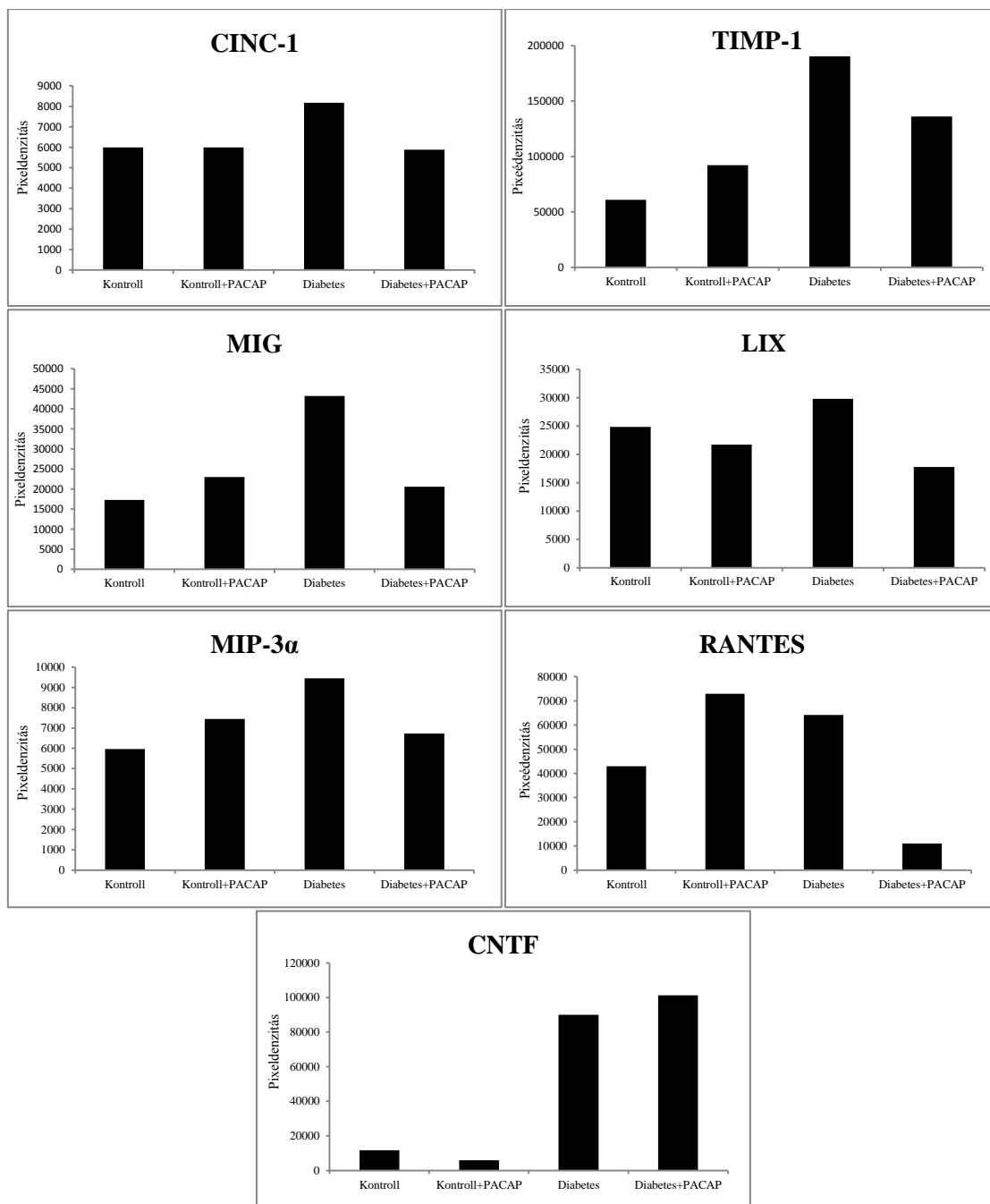


14. ábra: Patkány citokin array kit. A PACAP-38 és a diabetes hatása a gyulladásoos citokinek expressziójára. Az ábrán bekarikázva láthatók azon citokinek, amelyek expressziójában jelentős változást tapasztaltunk.

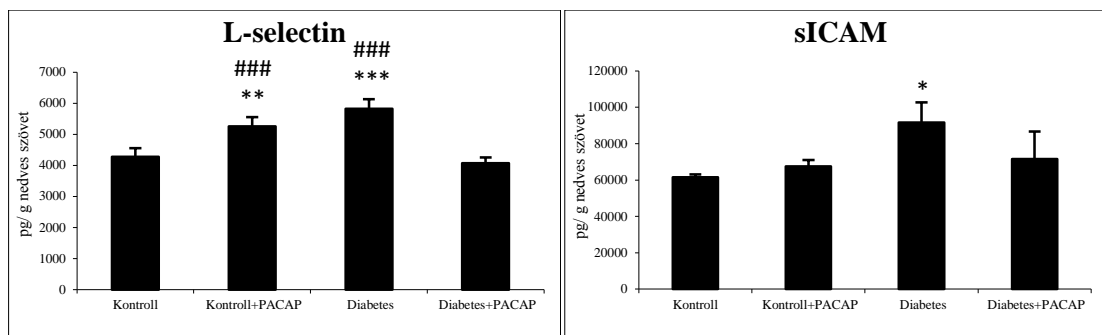
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Pozitív kontroll	CINC-1↓	CINC-2 $\alpha/\beta$	CINC-3	CNTF↑	Fractalkine	GM-CSF	sICAM-1↓	IFN- $\gamma$	Pozitív kontroll
B		IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-10	
C		IL-13	IL-17	IP-10	LIX↓	L-Selectin↓	MIG↓	MIP-1 $\alpha$	MIP-3 $\alpha$ ↓	
D	Pozitív kontroll	RANTES↓	Thymus Chem.	TIMP-1 ↓	TNF- $\alpha$	VEGF			Negatív kontroll	

2. táblázat: A citokin array kittel vizsgált citokinek a membránon való elhelyezkedés sorrendjében.

A nyilak a PACAP-38 hatására bekövetkező expressziós változások irányát mutatják.



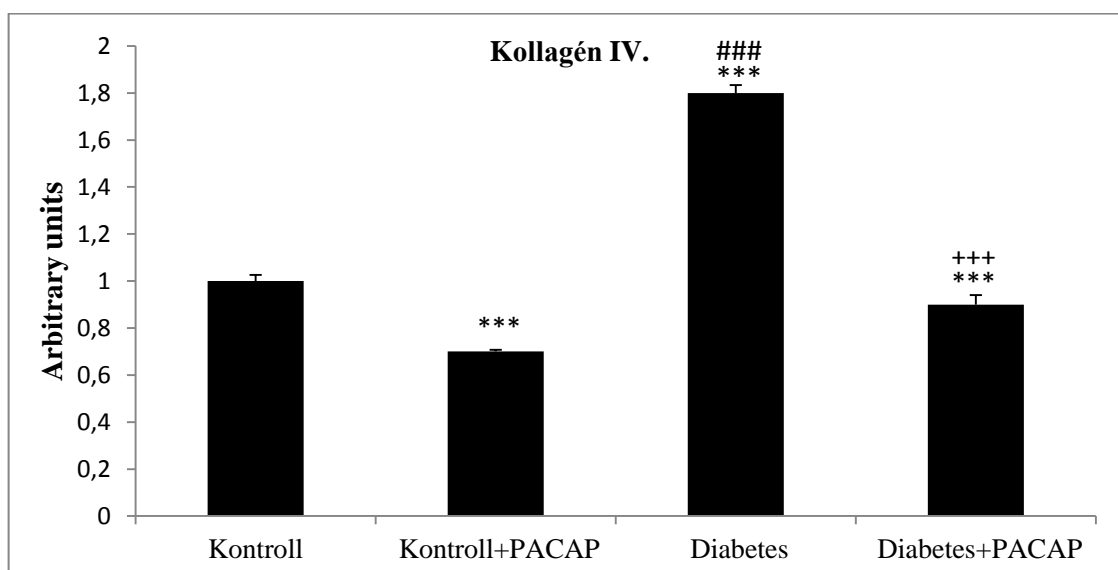
**15. ábra:** A gyulladássos citokinek és kemokinek expressziós mintázatának változása diabetes és PACAP-38-kezelés hatására a szemi kvantitatív citokin array vizsgálat eredményei alapján.  $n=4$ /csoport.



**16. ábra:** Az *L-selectin* és az *sICAM* expressziós mintázatának változása PACAP-38-kezelés hatására a *Luminex Multiplex Immunoassay* eredményei alapján. Kétutas ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=4$ /csoport; \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,001$  vs. kontroll, ### $p<0,001$  vs. diabetes+PACAP.

### 3.4.2. A PACAP-38-kezelés hatása a kollagén IV. expressziójára

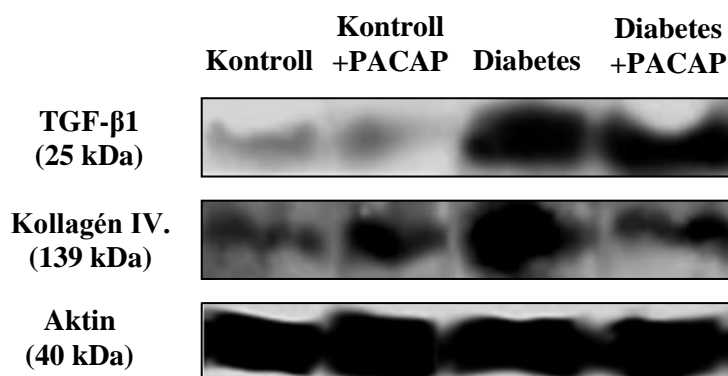
A diabetes a bazálmembrán felépítésében fontos szerepet játszó IV-es típusú kollagén expresszióját szignifikáns mértékben fokozta. A 8 hetes PACAP-38-kezelés hatékonyan gátolta a kollagén IV. upregulációját (17. ábra).



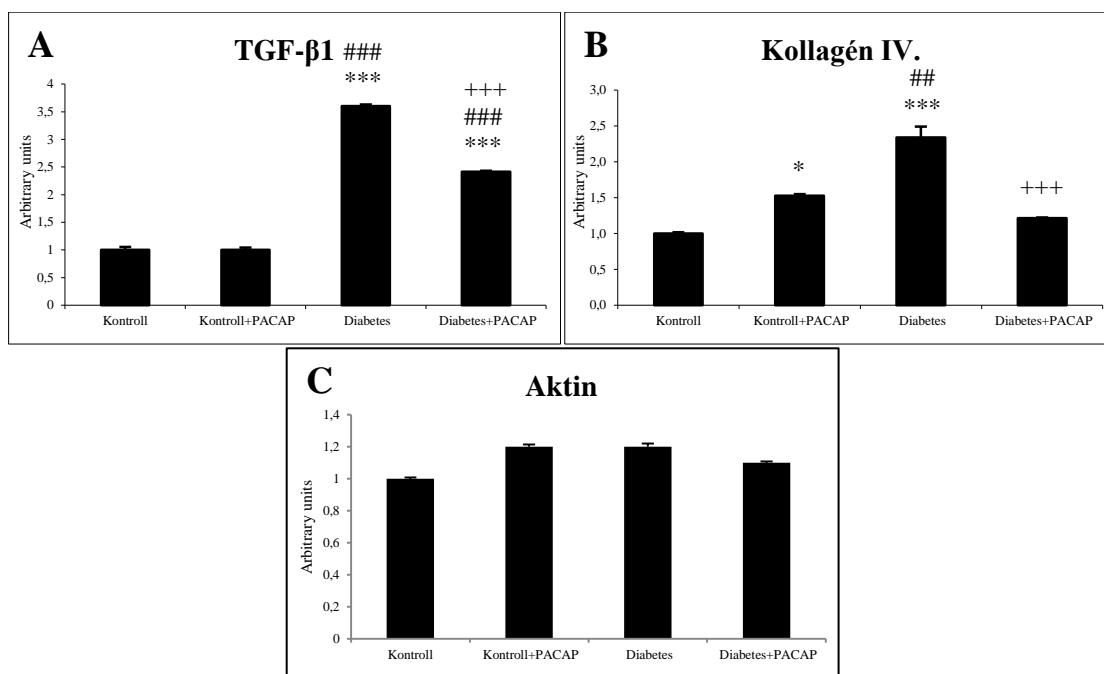
**17. ábra.** A IV-es típusú kollagén mRNS expressziós mintázata kontroll, PACAP-38-kezelt kontroll, diabeteses és PACAP-38-kezelt diabeteses csoportokban. Kétutas ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=4$ /csoport; \*\*\* $p<0,001$  vs. kontroll; ### $p<0,001$  vs. kontroll+PACAP; +++ $p<0,001$  vs. diabetes.

### 3.4.3. A PACAP-38-kezelés hatása a prosklerotikus és apoptotikus fehérjék szintjére

Western blottal vizsgáltuk a IV-es típusú kollagén és TGF- $\beta$ 1 fehérjeszintű expresszióját, melyek a diabeteses nephropathia patogenezisében fontos szerepet játszó fibrotikus folyamatok kulcsfaktorai. A diabetes jelentősen fokozta mind a IV-es típusú kollagén, mind pedig a TGF- $\beta$ 1 renalis expresszióját. PACAP-38-kezelés szignifikánsan csökkentette ezen faktorok szintjét (18., 19. ábra).

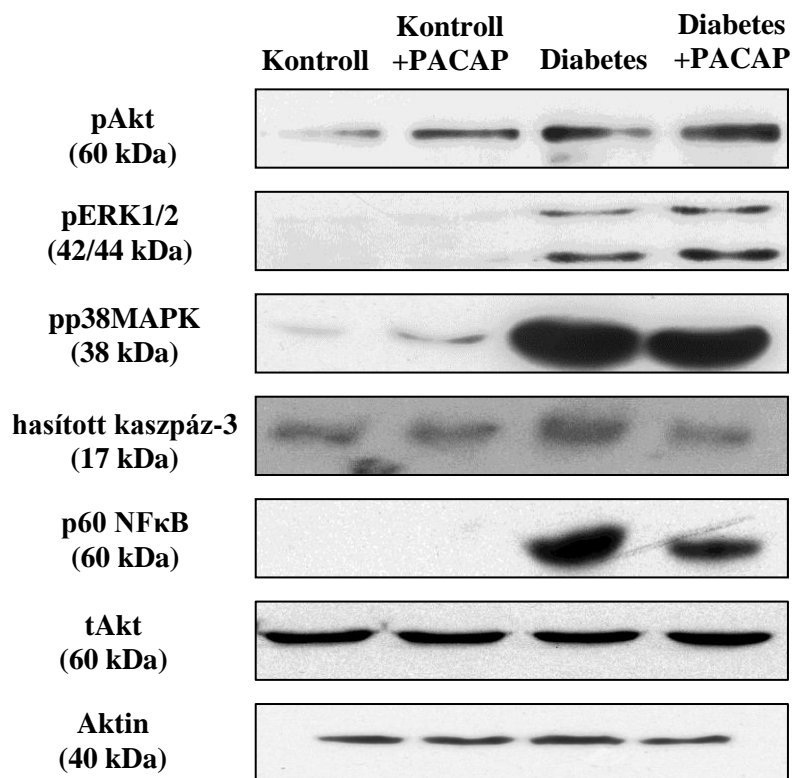


18. ábra: Reprezentatív Western blot ábrák a PACAP-38 és a diabetes prosklerotikus faktorokra kifejtett hatásáról.



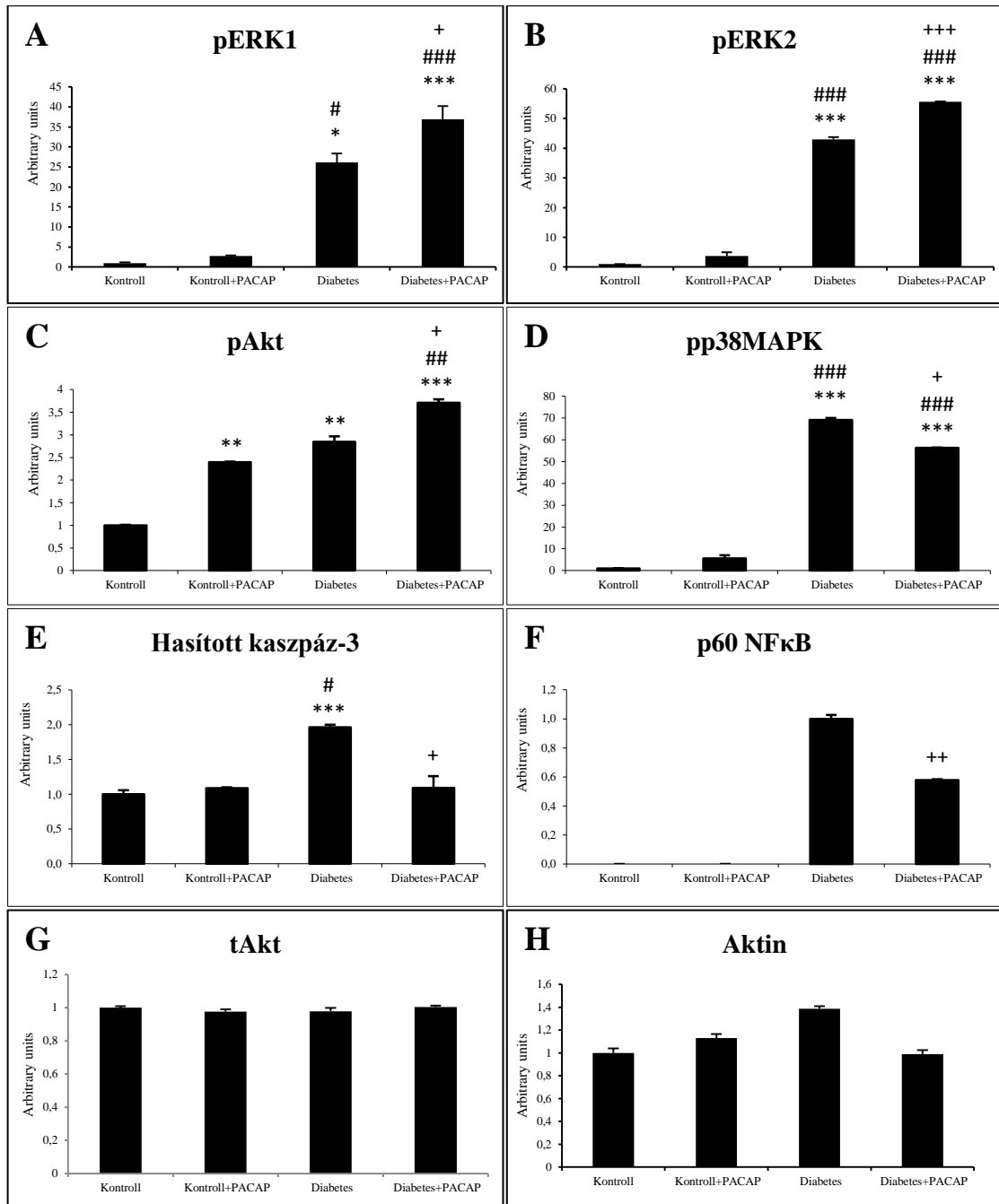
19. ábra: A PACAP-38-kezelés és a diabetes hatása a IV-es típusú kollagén és a TGF- $\beta$ 1 fehérjék szintjére. Belső kontrollként aktint használtunk (C). Kétutas ANOVA és módosított Bonferroni teszt; n=4/csoport; \*\*\* p<0,001 vs. kontroll; ### p<0,001 vs. kontroll+PACAP; +++ p<0,001 vs. diabetes.

A pro- és antiapoptotikus faktorok mennyiségét is mértük Western blottal. A PACAP-38-kezelés fokozta az antiapoptotikus Akt foszforilációját kontroll állatok esetében. A diabeteses nephropathia a vesesejtek jelentős apoptózisával, és ezáltal nagymértékben emelkedett renális pp38MAPK szinttel járt, de az antiapoptotikus Akt és ERK1/2 is aktiválódott a diabeteses állatok veséjében. A PACAP-38-kezelt diabeteses állatokban az antiapoptotikus fehérjék, így az Akt és az ERK1/2 jelentősen – a kezeletlen diabeteses állatokhoz viszonyítva szignifikánsan nagyobb mértékben – aktiválódtak. Ezenfelül a PACAP-38-kezelés gátolta a p38MAPK foszforilációját és csökkentette a diabetes hatására megemelkedett hasított kaszpáz-3 szintet. Az NFκB egy transzkripció faktor, melynek mind a citokintermelés, mind pedig a sejttúlélés regulációjában fontos szerepe van. A diabetes hatására upregulálódott az NFκB p60 alegysége, mely a PACAP-38-kezelt diabeteses állatokban szignifikánsan alacsonyabb aktivációt mutatott (20., 21. ábra).



20. ábra: Reprezentatív Western blot képek a PACAP-38 és a diabetes pro- és antiapoptotikus faktorokra kifejtett hatásáról.

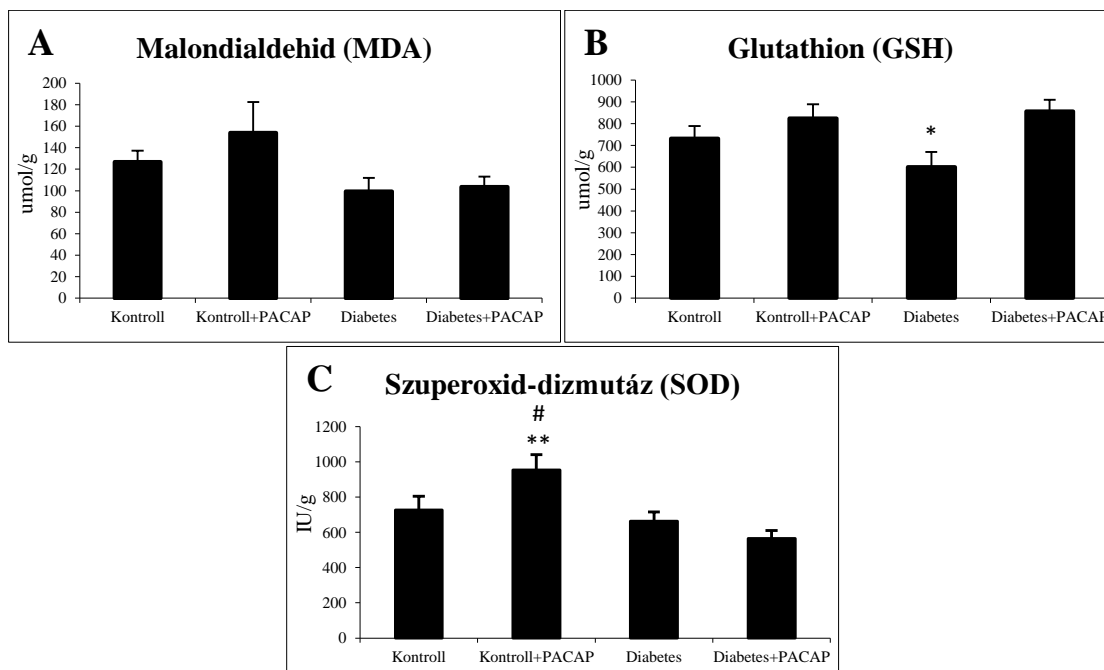




**21. ábra:** A PACAP-38-kezelés és a diabetes hatása a pERK1 (A), pERK2 (B), pAkt (C), pp38MAPK (D), hasított kaszpáz-3 (E) és p60 NFκB (F) fehérjék mennyiségére. A tAkt (G) és az aktin (H) expressziója. Kéttas ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=4$ /csoport; \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$  vs. kontroll; #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,01$ ; ###  $p<0,001$  vs. kontroll+PACAP; +  $p<0,05$ ; ++  $p<0,01$ ; +++  $p<0,001$  vs. diabetes.

### 3.4.4. A PACAP-38 hatása a malondialdehid (MDA), a glutathion (GSH) és a szuperoxid-dizmutáz (SOD) szintjére

Az oxidatív stresszmarkerek meghatározására végzett biokémiai assay segítségével szignifikánsan magasabb glutathion szintet mértünk a PACAP-38-kezelt diabeteses állatokban, mint kezeletlen diabeteses társaik esetében. A PACAP-38-kezelés emelte a SOD szintjét is kontroll állatokban, azonban diabetes esetén szignifikáns változást nem tapasztaltunk sem a SOD, sem pedig az MDA expressziójában (22. ábra).



22. ábra: A PACAP-38-kezelés és a diabetes hatása a malondialdehid (A), a glutathion (B) és a szuperoxid-dizmutáz (C) renalis expressziójára. Kéttutas ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=6-10/\text{csoport}$ ; \*  $p<0,05$  vs. diabetes+PACAP; #  $p<0,05$  vs. kontroll.

#### 4. Megbeszélés

Kísérleteink első részében igazoltuk az *in vivo* PACAP-38-kezelés védő hatását 8 hetes diabeteses nephropathia szövettani elváltozásaival szemben. Ezzel tovább növeltük azon vesebetegségek számát, amelyek esetén a PACAP protektív hatása bizonyított, így a PACAP-kezelés csökkenti az oxidatív stressz, a gentamycin, a myeloma multiplex, a cyclosporin A és az ischaemia által kiváltott vesekárosodást (Arimura et al., 2006ab; Li et al., 2008; Szakály et al., 2008; Horváth et al., 2011; Khan et al., 2011). Jelen eredményeink összhangban vannak a Li és munkatársai által leírtakkal, mely szerint a PACAP védő hatását 2 hétig fennálló diabetes által kiváltott nephropathiában (Li et al., 2008). Ezen protektív hatást mi lényegesen hosszabb, 8 hetes diabetes-fennállás esetén igazoltuk, valamint részben feltártuk a védő hatáshoz vezető molekuláris mechanizmusokat. Továbbá elsőként alkalmaztunk 8 hetes PACAP-kezelést, és bizonyítottuk ezen hosszútávú kezelés hatékonyságát.

Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP csökkenti a diabeteses nephropathia jellegzetes patológiai elváltozásait a vér glükózsintjének befolyásolása nélkül. Korábbi kísérletekhez hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy patkányokban egyszeri streptozotocin injekció hyperglycaemiát okoz, mely diabeteses glomerulopathiához vezet az intraglomerularis PAS-pozitív terület szignifikáns mértékű felszaporodásával (Matavelli és Siragy, 2013). A megnövekedett intraglomerularis PAS-pozitív terület a diabeteses glomerulopathia patognómikus elváltozásainak, így a mesangialis expanzióknak és a glomerularis bazálmembrán megvastagodásának együttes következménye (Tervaert et al., 2010). A hyperglycaemia a TGF- $\beta$ 1 overexpresszióján keresztül az extracelluláris mátrixban egyébként fiziológiásan is jelenlévő komponensek, így a kollagén IV., a laminin és a fibronectin patológiás mértékű akkumulációjához vezet (Falk et al., 1983). A diabeteses vesebetegség progressziójában hasonlóan fontos szerepe van a tubulointersticiális elváltozásoknak (Taft et al., 1994). Kísérletünkben a tubularis elváltozás mértékét a tubularis glikogéngranulomok, az úgynevezett Armanni-Ebstein jelenség mennyisége alapján kvantifikáltuk (Kock és Vestergaard, 1994; Zhou et al., 2013). Tekintettel arra, hogy a tubulusok a térben különböző lefutást mutatnak, az egy látótéren belül megjelenő kereszt-, hossz-, és ferde metszetekben található glikogéngranulomok reprezentálják az Armanni-Ebstein jelenség mértékét. A renalis arteriolák hyalinosis a diabeteses nephropathiára jellemző patológiai elváltozás (Stout et al., 1994; Tervaert et al., 2010). Szövettani vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a PACAP-38-kezelés szignifikáns mértékben csökkenti a diabetes hatására kialakuló glomerularis, tubularis és vascularis elváltozásokat.

Kísérleteink második részében a védő hatásért felelős molekuláris mechanizmusokat tártuk fel, így igazoltuk a PACAP antiinflammatorikus, antiapoptotikus, antifibrotikus és antioxidatív hatásának szerepét a nephroprotektív hatás hátterében. A kísérleteinkben résztvevő diabeteses állatok vércukorszintjét a PACAP-kezelés nem befolyásolta, habár egyes közlemények beszámolnak a PACAP vércukorszint-csökkentő hatásáról (Yada et al., 2000b). A gyulladás, ahogy az a bevezetésben már említésre került, a diabeteses nephropathia egyik fő patogenetikai faktora (Navarro-González et al., 2011). A legtöbb vesesejt, így az endothelialis, mesangialis sejtek, podocyták és egyéb epithelialis sejtek hyperglycaemia hatására aktiválódnak, és proinflammatorikus citokineket, kemokineket és adhéziós molekulákat termelnek. Ezen kemoattraktáns molekulák aztán számos immunsejt, így monocyták, neutrophil granulocyták és lymphocyták renalis infiltrációját indukálják, mely tubulointersticiális fibrosishoz, tubularis atrophíához és vascularis károsodáshoz vezet (Zandi-Nejad et al., 2004; Abbate et al., 2006). A PACAP citokin-expressziót befolyásoló hatását számos kísérleti modellben bizonyították, valamint kutatócsoportunk is igazolta ezen hatást intestinalis és renalis ischaemia/reperfúziós károsodás, valamint retina ischaemia esetén (Horváth et al., 2011; Nedvig et al., 2012; Szabó et al., 2012). Jelen kísérletben a PACAP hatékonyan csökkentette a diabetes hatására megemelkedő és a betegség patogenezisében fontos szereppel bíró CINC-1, TIMP-1, LIX, MIG, MIP-3 $\alpha$ , RANTES, L-selectin és s-ICAM termelődését.

A CINC-1 a fő neutrophil kemoattraktánsok egyike, mely oxidatív stressz hatására aktiválódik, és diabeteses nephropathiában is fontos szerepe van (Mizutani et al., 2000; Cugini et al., 2005). Szintén emelkedik a TIMP-1, a LIX, a MIG és az s-ICAM szintje a diabeteses nephropathiában szenvedő betegek szérumában és vizeletében (Kanauchi et al., 1996; Catania et al., 2007; Bruno et al., 2008; Higurashi et al., 2009). Hasonlóképpen, hyperglycaemia hatására a MIP-3 $\alpha$  is upregulálódik mind mRNS, mind pedig fehérjeszinten *in vitro* és *in vivo* (Qi et al., 2007). A PACAP károsító tényező hatására bekövetkező citokin-upregulációval szembeni gátló hatása általános jelenségnek tűnik, ugyanis ezt munkacsoportunk korábban kimutatta a bélben és a retinában is (Nedvig et al., 2012; Szabó et al., 2012). Kísérletünkben a PACAP érdekes módon kontroll állatokban emelte, míg diabeteses állatok esetében csökkentette a RANTES és az L-selectin expresszióját. Ezen károsodástól és sejttípustól függő kettős hatást leírták már más kutatócsoportok is (Springer, 1994; Brenneman et al., 2002; Delgado et al., 2002; Sanchez et al., 2009). Azonban azt tapasztaltuk, hogy más citokinekkal szemben a PACAP serkentette a CNTF renalis expresszióját, mely szintén a protektív mechanizmushoz járulhat hozzá (Rezende et al., 2012).

A PACAP-kezelés szintén csökkentette a diabetes hatására fokozódott renalis NF $\kappa$ B-szintet. Számos korábbi vizsgálat bizonyította, hogy a PACAP, hasonlóan a szerkezetileg rokon VIP-hez, megakadályozza az NF $\kappa$ B transzlokációját a sejtmagba az I $\kappa$ B foszforilációjának gátlásán keresztül *in vivo* és *in vitro* körülmények között is (Leceta et al., 2000; Delgado et Ganea, 2001; Delgado et al., 2002; Ganea és Delgado, 2003). A diabeteses nephropathia terápiájában széles körben alkalmazott antioxidánsok és a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer gátlói is részben az NF $\kappa$ B hatásának befolyásolásán keresztül fejtik ki hatásukat (Liu et al., 2009). Diabeteses nephropathia esetén az NF $\kappa$ B aktivációja bekövetkezhet a mesangialis sejtek, a TGF- $\beta$ 1, a TNF $\alpha$  és az interleukinek által, de stimulálhatja a reaktív oxigénszármazékok fokozott termelése vagy a RAAS aktivációja is (Iwamoto et al., 2005; Gnudi, 2012). Az NF $\kappa$ B fontos szerepet játszik számos betegség, így a nephritis, a proteinuria és a tubulointersticiális elváltozások patomechanizmusában, és hasonlóképpen kulcsszerepe van a diabeteses vesebetegség kialakulásában is (Sakurai et al., 1996; Iwamoto et al., 2005). Számos, a sejtproliferációban és gyulladásban fontos fehérje transzkripcióját aktiválja, melyek hozzájárulnak a diabeteses nephropathia progressziójához (Navarro-González et al., 2011). Az NF $\kappa$ B aktivációjának következménye a tubularis károsodás, valamint a proinflammatorikus citokinek, kemokinek és adhézions molekulák túlzott mértékű termelődése (Mezzano et al., 2004; Chen et al., 2008). Ezenfelül a ROS-indukált apoptotikus folyamatok jelátvitelében is fontos szerepet tulajdonítanak az NF $\kappa$ B-nek (Aoki et al., 2011).

A jelen kísérletben – számos korábbi vizsgálathoz hasonlóan – azt tapasztaltuk, hogy a PACAP fokozta az antiapoptotikus faktorok, így az Akt és az ERK1/2, míg csökkentette a proapoptotikus p38MAPK foszforilációját. Az antiapoptotikus faktorok diabeteses vesékben tapasztalt enyhe aktivációja a protektív hatású kompenzatorikus folyamatok beindulásának lehetett a következménye. A PACAP antiapoptotikus hatása a kaszpáz-3 hasításának gátlásában is megmutatkozott. A kaszpáz-3 kiemelt szerepet játszik a receptor-mediált, mitokondrium-dependens és endoplazmás retikulum stressz-indukált apoptózisban, melyek a hyperglycaemia hatására bekövetkező podocyta-pusztulás fő mechanizmusát jelentik (Susztak et al., 2006; Tunçdemir és Oztürk, 2011; Gui et al., 2012).

A myelomás vesebetegségben kialakuló tubulointersticiális károsodás patomechanizmusához hasonlóan, diabeteses nephropathia esetén is fokozódik számos citokin termelődése, így például a proszklerotikus TGF- $\beta$ 1-é, melyet a mesangialis sejtek és a proximális tubulus sejteji szekretálnak nagy mennyiségben (Gilbert et al., 1998). A TGF- $\beta$ 1 a hyperglycaemia-okozta elváltozások egyik legfontosabb mediátora a vesében, mely az extracelluláris mátrix túltermelődését váltja ki (Di Paolo et al., 1996; Hills és Squires, 2010). A fibronektin, a

kollagén IV. és a laminin felszaporodása a fehérjék túltermelésének, illetve a mesangialis mátrixban, a glomerularis és tubularis bazálmembránban, valamint az interstíciumban történő csökkent lebomlásának együttes következménye, mely súlyos morfológiai és funkcionális elváltozásokat okoz a vesében (Mauer et al., 1984; Steffes et al., 1989). Eredményeinkhez hasonlóan mások is leírták a PACAP-kezelés hatására bekövetkező csökkent TGF- $\beta$ 1 expressziót más sejtek, így például stimulált makrofágok esetében (Sun et al., 2000). A PACAP szövettanilag igazolt nephroprotektív hatásának hátterében a TGF- $\beta$ 1 és a kollagén IV. szintjének a kezelés hatására bekövetkező csökkenése áll. A PACAP renalis TGF- $\beta$ 1 szintet csökkentő hatását korábban Li és munkatársai is igazolták (Li et al., 2008). A klinikai gyakorlatban már régóta alkalmazott antioxidánsok és ACE-gátlók szintén hatásosan csökkentik a TGF- $\beta$ 1, a fibronectin és a kollagén IV. szintjét (Ha et al., 1999; Shin et al., 2000; Kelly et al., 2001). Az anti-TGF- $\beta$ 1 terápia eredményei szintén ígéretesek, így bármely szer, amely képes a TGF- $\beta$ 1 downregulációjára, alkalmas lehet a diabeteses nephropathia kezelésére (Sharma et al., 1996; Ziyadeh et al., 2000).

Az oxidatív stressz szerepe a diabetes és a diabeteses komplikációk kialakulásában jól ismert (Usuki et al., 2011). A streptozotocin is a nitrogén-monoxid (NO) és a szuperoxid anion ( $O_2^-$ ) túltermelésének stimulációján keresztül fejti ki diabetogén hatását (Nukatsuka et al., 1988; Kaneto et al., 1995). A mitokondriális szabadgyökök indukálják a poli-ol-, PKC-, hexózamin- és AGE-mediált jelátviteli utakat, mely szintén hozzájárul a diabeteses nephropathia progressziójához. A glutathion létfontosságú szerepe abban rejlik, hogy a metabolikus folyamatok során vagy külvilágból érkező stimulusok hatására termelődő elektrofil anyagokat neutralizálja. Azon folyamatok, amelyek magas szabadgyök-termeléssel járnak, inaktíválják a mitokondriális GSH-transzportereket, így csökkentik az oxidatív védelmet. Ezen folyamatok hátterében, legalább részben, a mitokondriális fehérjék non-enzimatis glikációja áll (Lash, 2006). Ezenkívül a NADPH-oxidáz enzim fokozott aktivitása is hozzájárul a nagymértékben lecsökkent NADPH szinthez, mely tovább csökkenti a glutathion aktív formába történő visszaalakulását.

Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a renalis sejtek oxidatív károsodásához nem csak a fokozott oxidatív stressz, de az ez ellen védő folyamatok gátlása is hozzájárul (Stanton, 2011; Gnudi, 2012). A GSH koncentrációjában és oxidációs állapotában diabetes hatására bekövetkező változások többek között a mitokondriális DNS károsodását és az apoptotikus útvonalak beindulását idézik elő (Marchetti et al., 1997; Davis et al., 2001). Kísérletünkben a PACAP normalizálta a diabetes hatására lecsökkent GSH szintet, mely a PACAP antioxidáns szerepét bizonyítja. Hasonlóan ezen eredményekhez, a PACAP antioxidáns hatását már

igazolták oxidatív stressz-indukált vese- és májsejtkárosodás esetén, intestinalis hideg prezerváció és meleg ischaemiás károsodás esetén is (Ferencz et al., 2010a,b; Horváth et al., 2011). Más közlemények a szuperoxid-dizmutáz (SOD) szintjének diabetes hatására bekövetkező csökkenéséről és a malondialdehid (MDA) emelkedéséről számoltak be, azonban esetünkben a diabetes nem eredményezett változást ezen faktorok renalis expressziójában (Collier et al., 1992; Kakkar et al., 1997).

Ezen eredményeink alapján a PACAP ígéretes terápiás lehetőségnek tűnik a diabeteses nephropathia kezelésében. A PACAP esetleges klinikai alkalmazása előtt azonban még számos problémát meg kell vizsgálnunk. Jelen kísérletben krónikus intraperitoneális PACAP-38-kezelés hatására nem tapasztaltunk számottevő mellékhatást. Humán vizsgálatban is igazolták, hogy a peptid szisztémás infúziója a rövid időre kialakuló kipirulástól („flushtól”) eltekintve nem okoz jelentős változást az alapvető fizikális paraméterekben (Li et al., 2007). A lehetséges mellékhatások mellett a PACAP-kezeléssel kapcsolatban felmerülő másik probléma a gyenge biohasznosulás, hiszen a peptid féléletideje a szisztémás keringésben mindössze 2-10 perc a DPP IV általi enzimatis hasítás következtében (Banks et al., 1993; Bourgault et al., 2008; Vaudry et al., 2009). A kísérletben ennek ellenére azt tapasztaltuk, hogy a másnaponta történő kezelés szignifikáns protektív hatást váltott ki, melynek hátterében feltehetőleg az áll, hogy bár a szisztémás keringésben a PACAP féléletideje nagyon rövid, a receptorokhoz való kötődést követően beindított jelátviteli utak aktivációja jelentősen elhúzódó hatástartamot eredményez. Napjainkban is számos, a PACAP-kezelés egyszerű és megbízható módjának kifejlesztésére irányuló kísérlet folyik (Langoth et al., 2005, 2006; Onoue et al., 2011).

A DPP IV enzim inhibitorai széles körben elterjedtek a diabetes terápiájában, előnyös hatásukat elsősorban a glükagonszerű peptid-1 (GLP-1) szintjének emelésén keresztül fejtik ki. Egy nemrégiben megjelent közlemény felveti annak a lehetőségét, hogy a DPP IV enzim inhibitorai egyéb, eddig nem ismert mechanizmusok aktiválásán, így például az enzimgátlás hatására bekövetkező PACAP-szint emelkedésén keresztül is kifejtik protektív hatásukat, azonban ennek bizonyítása még további kutatások tárgyát képezi (Darsalia et al., 2013).

Összegezve, jelen kísérlettel elsőként bizonyítottuk az *in vivo* PACAP-38-kezelés protektív hatását a diabetes hatására kialakuló glomerulopathiával, tubulopathiával és vasculopathiával szemben 8 hetes diabeteses nephropathia patkánymodelljében. Továbbá feltártuk a PACAP védő hatásának hátterében álló antiinflammatorikus, antifibrotikus, antioxidatív és antiapoptotikus mechanizmusokat. Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy a PACAP szignifikánsan fokozza a  $\beta$ -sejtek proliferációját, serkenti az inzulinszekréciót, valamint védő

hatású diabeteses retinopathia és korai nephropathia esetén (Shintani et al., 2003; Yamamoto et al., 2003; Sakuma et al., 2009; Szabadfi et al., 2012). Mindezek alapján a PACAP számos ponton gátolja a diabeteses komplikációk kialakulását és progresszióját, következésképpen ígéretes lehetőséget jelent a diabetes mellitus komplex terápiájában.



## **II. A PAC1 ÉS VPAC1/2 RECEPTOROK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A PACAP NEUROGÉN GYULLADÁSRA KIFEJTETT GÁTLÓ HATÁSÁBAN**

### **1. Bevezetés**

#### **1.1. A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) csatornák és szerepük a neurogén gyulladásban**

A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1), vagy korábbi nevén ANKTM1 („Ankyrin-like with transmembrane domains protein” 1), a TRP ioncsatorna receptorcsalád TRPA alcsaládjának emlősökben előforduló egyetlen tagja. A TRP családba tartozó másik széles körben vizsgált receptor az erős paprikában lévő kapszaicinre szenzitív Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid Receptor 1 (TRPV1).

A TRPA1 nem-szelektív ioncsatorna, melynek fájdalom, valamint gyulladási folyamatok kiváltásában van szerepe, továbbá felmerült a receptorok szerepe mechanikus és hidegérzetek szignáltranszdukciójában is (Story et al., 2003; Jordt et al., 2004; Bautista et al., 2006; Karashima et al., 2009). A TRPA1 receptorok a spinális és trigeminalis ganglionban, valamint a ganglion nodosumban elhelyezkedő nociceptív primer afferens neuronok centrális, valamint perifériás végződéseiben expresszálódnak, ahol felveszik, és amplifikálják a nociceptív stimulust (Story et al., 2003; Kobayashi et al., 2005; Nagata et al., 2005). A szomatoszenzoros neuronok felelősek azért, hogy képesek vagyunk számos endogén és exogén stimulust, így nyomást, hőmérsékletet, valamint irritánsokat érzékelni. A TRPA1 és a kapszaicin-szenzitív TRPV1 ioncsatornák koexpressziót mutatnak, és kapszaicinnal deszenzibilizálhatók (Kobayashi et al., 2005; Nagata et al., 2005). Szintén ismert, hogy a TRPV1 receptort blokkoló, kationcsatorna-gátló ruténiumvörös a TRPA1 receptorok aktivációját is gátolja. A TRPA1 receptor a fájdalom kiváltásában betöltött szerepe mellett az akut fájdalom krónikussá válását is befolyásolja (Koivisto et al., 2014). A TRPA1 receptornak számos természetes és szintetikus stimulánsa ismert, így például a mustárolaj (más néven allil-izotiocianát, AITC) és formaldehid, továbbá a fokhagymában található tioszulfínát, az  $\alpha,\beta$ -telítetlen aldehidek, a nikotin, a könnygáz irritáló komponensei, a klór és a reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) (Hinman et al., 2006). Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a TRPA1 receptorok legfontosabb szerepe a környezeti irritánsokkal szembeni érzékenység, és ennek a funkciónak megfelelően a bőrt, a légutakat és a gastrointestinalis rendszert beidegző szenzoros idegvégződéseken expresszálódnak (Jiang et al., 2011).

A neurogén gyulladás számos betegség patogenezisében játszik kiemelkedő szerepet, így rosacea, allergiás kontakt dermatitis, atópiás dermatitis, migrén, allergiás rhinitis, sarcoidosis,

rheumatoid arthritis, psoriasis, asthma és krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) esetén (Anichini et al., 1997; O'Connor et al., 2004; Raychaudhuri és Raychaudhuri, 2004; Bánvölgyi et al., 2005; Geppetti et al., 2005; Pisi et al., 2009; Aubdool és Brain, 2011; Teresiak-Mikołajczak et al., 2013). A neurogén gyulladás a rendelkezésünkre álló nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerekkel nem csökkenthető, így jelenleg ezen betegségek esetében nincs lehetőség a háttérben álló fő patogenetikai faktor eliminációjára (Jancsó-Gábor és Szolcsányi, 1970; Helyes et al., 2003).

A TRPA1 és TRPV1 ioncsatornákat expresszáló szenzoros idegvégzódések hármas funkcióval rendelkeznek; egyrészt afferens funkcióval, mely a fájdalom orthodrom, centrális irányba történő továbbítását jelenti, melynek eredménye a nocicepció és annak szubjektív érzete, a fájdalom. A lokális efferens funkció a szenzoros idegvégzódésekből történő gyulladáskeltő neuropeptidek, így CGRP és tachykininek: P-anyag (SP) és neurokininek (NK) felszabadulását jelenti (Szolcsányi, 1984, 1996). A felszabaduló CGRP arteriolaris vazodilatációt, míg a tachykininek az NK1 receptorhoz kötődve leukocyt-akkumulációt és a posztkapilláris venulákon keresztüli plazma-extravazációt váltanak ki, melyet lokális gyulladással hiperszenzitivitás kísér, ezt nevezzük akut neurogén gyulladással (Lembeck és Holzer, 1979; Szolcsányi, 1988; Louis et al., 1989). A harmadik pedig a szisztémás efferens funkció, amely a szisztémás gyulladásgátló funkcióval rendelkező peptidek – PACAP, szomatosztatin és galanin – primer szenzoros idegvégzódésekből történő felszabadulását jelenti (Skofitsch és Jacobowitz, 1985; Szolcsányi et al., 1998ab; Helyes et al., 2004, 2007; Németh et al., 2006).

## **1.2. A TRPA1 agonista mustárolaj**

A mustárolaj, vagy kémiai nevén allil-izotiocianát, egy természetes növényi eredetű irritáns, amely kémiai prekursorából, a mustármagban lévő sinigrinből enzimatis hasítással képződik. A mustárolaj a szenzoros idegvégzódéseken expresszálódó TRPA1 receptorokat specifikusan aktiválja a csatorna intracelluláris C-doménjén lévő ciszteinek kovalens módosításán keresztül (Bautista et al., 2006; Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007). Kapszaicin-deszenzitiváció hatására a mustárolaj-kezelés tipikus tünetei elmaradnak, ami azt bizonyítja, hogy a mustárolaj is a kapszaicin-szenzitív szenzoros afferens neuronokon hat, melyek tehát koexpresszálják a TRPA1 és TRPV1 receptorokat (Simons et al., 2003). A TRPA1 receptor aktivációja ugyan nem kalcium-dependens, de kalcium hatására fokozódik a szignáltranszdukció (Jordt et al., 2004). A mustárolaj – a receptor más agonistáihoz hasonlóan – a receptor pórusának tágulását váltja ki, ezzel permeábilissá téve a csatornát nagyobb

molekulák számára (Chen et al., 2009). A lokális mustárolaj-kezelés direkt a szenzoros idegvégződéseken hatva vagy axonreflexen keresztül nátrium és kalcium ionok beáramlásához vezet, mely a polimodális nociceptorok depolarizációját idézi elő. Ezáltal a korábban ismertetett módon akut neurogén gyulladást vált ki, melyet erythema, oedema, fájdalom, valamint mechanikus és termális hyperalgesia kísér (Wei et al., 2010). A mustárolaj 5-20% alatti koncentrációban a kapszaicin-szenzitív primer szenzoros idegvégzések TRPA1 ioncsatornáit izgatja szelektíven, a hízósejtek közreműködése nélkül (Inoue et al., 1997; Jordt et al., 2004). Ezen tünetek megegyeznek a TRPV receptorhoz kötődő kapszaicin által kiváltott tünetekkel, azonban mustárolajjal deszenzitizáció nem váltható ki, tehát ismételt kezelésekre van lehetőség (Jancsó et al., 1967; Inoue et al., 1997).

A mustárolaj által kiváltott gyulladás késői, celluláris fázisa nem jár neuropeptid-felszabadulással, tehát nem neurogén jellegű. Egérfülon a mustárolaj-kezelést követő 6. órában alakul ki, és mértéke a neutrophil granulocyták infiltrációjával arányos myeloperoxidáz-aktivitással kvantifikálható (Bánvölgyi et al., 2004).

### **1.3. A PACAP szerepe a neurogén gyulladásban**

A PACAP expresszálódik a trigeminalis, valamint a hátsó gyöki ganglion kis és közepes méretű neuronjaiban, illetve a gerincvelő hátsó szarvának felszíni rétegeiben is számos PACAP-immunpozitív rostot detektáltak. Mindezek alapján a PACAP neurogén gyulladásban és nocicepcióban betöltött szerepét már az 1990-es években feltételezték (Moller et al., 1993; Mulder et al., 1994, 1999; Dun et al., 1996). Zhang és munkatársai igazolták a PACAP jelenlétét a kapszaicin-szenzitív szenzoros neuronokban is (Zhang et al., 1996). A PACAP koexpressziót mutat más neuropeptidekkel, így a zsigereket beidegző idegplexusokban, ganglion trigeminaleban és cardiacumban, illetve emberi gerincvelőben CGRP-vel és SP-vel, továbbá CGRP-vel a ganglion nodosumban és a fogban is (Mulder et al., 1995; Schoenfeld et al., 2000; Hou et al., 2003; Ichikawa és Sugimoto, 2003).

A PACAP specifikus receptora, a PAC1 receptor elsősorban simaizomsejteken, idegsejteken, endothelsejteken és peritoneális makrofágokon expresszálódik. A VPAC1 receptor konstitutívan kifejeződik a gerincvelő hátsó szarvában, a T-lymphocytákon, makrofágokon, monocytákon, hízósejteken és dendritikus sejteken, míg a VPAC2 receptor expressziója csak indukálható ezeken a sejteken (Delgado et al., 1996; 1999; Ganea 1996; Vaudry et al., 2009; Delgado és Ganea, 2013).

Korábbi kísérletekben bizonyították a PACAP protektív hatását számos olyan betegséggel szemben, amelynek patogenezisében fontos szerepet tölt be a neurogén gyulladás, így asthma,

rheumatoid arthritis, allergiás kontakt dermatitis, valamint Crohn betegség esetén (Abad et al., 2001; Kemény et al., 2010; Lauenstein et al., 2011; Heimesaat et al., 2012). A PACAP csökkenti az asthma patomechanizmusában fontos légúti hiperreaktivitást és gyulladást a simaizom-kontrakció és plazma-extravazáció gátlásán keresztül (Shigyo et al., 1998).

Szintén igazolták, hogy kapszaicin és elektromos tér általi stimuláció hatására fokozódik a PACAP-38 felszabadulása a gyomor plexus myentericusából és a szem, valamint a trachea szenzoros idegvégződéseiből *in vitro*, valamint patkány gerincvelőből *in vivo* (Wang et al., 1995, 1997; Wallengren, 1997; Zhang et al., 1997; Tornoe et al., 2001; Németh et al., 2006). Intravénásan alkalmazott TRPV1 agonista resiniferatoxin hatására a kapszaicin-szenzitív idegvégződésekben a keringésbe kerülő PACAP a vérplazma PACAP-szerű immunreaktivitásában mérhető emelkedést okoz, azonban az idegvégződések lokális ingerlése esetén ez a hatás elmarad (Helyes et al., 2007). A peptid antiinflammatorikus hatása *in vivo* is megfigyelhető, 10 µg/kg PACAP-38 i.p. szignifikánsan csökkenti, 1000 µg/kg-os dózisban pedig teljes mértékben kivédi az 1% mustárolaj, a kapszaicin és a resiniferatoxin által indukált plazma-extravazációt és neurogén oedemát egerek és patkányok esetében is (Németh et al., 2006; Helyes et al., 2007).

A szisztémás antiinflammatorikus hatás hátterében az állhat, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekben felszabaduló PACAP-38 lokális antiinflammatorikus hatást fejt ki, és koncentráció-dependens módon gátolja a CGRP és a SP elektromos vagy kémiai stimulusra történő felszabadulását. Ezzel a 70-90%-os maximális gátlással a szenzoros idegvégződéseken ható másik két ligandnál, a nociceptinnél és a szomatosztatinnál hatékonyabbnak bizonyult a PACAP-38 (Helyes et al., 1997, 2001). Ezzel szemben a PACAP a bazális, vagyis nem stimulált neuropeptid-felszabadulást nem befolyásolja (Németh et al., 2006). Továbbá ismert a PAC1 receptor expressziója és protektív hatása az endothelsejteken, tehát valószínű, hogy a PACAP direkt endothelialis hatása is hozzájárul a plazmafehérje-extravazáció és a neurogén oedema csökkentéséhez (Rácz et al., 2007; Reglődi, 2009; Castorina et al., 2010).

Mindezek ellenére PACAP génihiányos egerekben a mustárolaj-indukált neurogén vazodilatáció csak az első 10 percben figyelhető meg, majd megszűnik, ami arra utal, hogy az endogén PACAP-nak szerepe lehet a neurogén vazodilatáció hosszútávú fenntartásában (Botz et al., 2013). Intradermális PACAP-38-kezelés a hízósejtek degranulációjához, és a következményes hisztamin-felszabaduláson keresztül plazma-extravazációhoz és neurogén gyulladáshoz, valamint rövid időtartamú fájdalomhoz vezet (Cardell et al., 1997; Schytz et al., 2010). A hatást valószínűleg VPAC receptorok közvetítik, mert a VIP ezen hatása

kifejezettebb. A szisztémás és intradermális PACAP-kezelés hatására kialakuló ellentétes válasz hátterében feltehetően az állhat, hogy szisztémás PACAP-kezelés esetében az elért dermális PACAP-koncentráció ennél jóval alacsonyabb (Schytz et al., 2010).

#### **1.4. Maxadilan**

A 61 aminosavból álló maxadilant 1991-ben izolálták a *Lutzomyia longipalpis*, avagy hétköznapi nevén homoki légy nyálmirigyéből rendkívül jelentős vazodilatátor hatása alapján, mely a CGRP vazodilatátor hatásának 500-szorosa, és melyről nevét is kapta (Lerner et al., 1991; Lerner és Shoemaker, 1992; Grevelink et al., 1995). 1992-ben a maxadilant kódoló gént is klónozták és szekvenálták (Lerner és Shoemaker, 1992). Később igazolták, hogy a maxadilan a PAC1 receptor specifikus agonistája, habár a PACAP-pal semmiféle strukturális hasonlóságot nem mutat (Moro és Lerner, 1997). A homoki légy a leishmaniasis vektora, hematofág rovar, ezért nyála vazoaktív anyagokat, például maxadilant tartalmaz, melynek hatására az erek dilatálnak, valamint a hemokoaguláció gátlódik, így a rovar megfelelő mennyiségű táplálékhoz jut. A maxadilan értágító hatása endothelium-independens, az intracelluláris cAMP simaizomsejtekben bekövetkező emelkedéséhez köthető (Grevelink et al., 1995; Lerner et al., 2007). Humán vizsgálatban lézer Doppler módszerrel igazolták, hogy a maxadilan hatására kialakult bőr vazodilatáció 48 órán át fennmarad a peptid receptor iránti erős affinitása következtében (Grevelink et al., 1995). Emellett számos vizsgálat igazolta, hogy a maxadilan jelentős gyulladásgátló hatással rendelkezik (Bozza et al., 1998; Lauenstein et al., 2011). A maxadilan a PAC1 receptoron keresztül cAMP-t szabadít fel, melynek következtében csökken a makrofágok TNF $\alpha$ -termelése, nő a lipopoliszacharid (LPS) hatására felszabaduló IL-10 mennyisége *in vitro* és *in vivo*, valamint fokozódik az IL-6 felszabadulása mind stimulálatlan, mind pedig LPS-sel stimulált makrofágokból, melyek együttes következménye a letális endotoxaemia elleni védő hatás (Bozza et al., 1998; Soares et al., 1998). Szintén ezen immunmoduláló hatása szükséges a leishmania patogenetikus hatásának eléréséhez is, melyet mind rágcsálók, mind pedig ember esetében igazoltak (Titus et al., 2006). Maxadilan jelenlétében ugyanis a permisszív hatású Th2 típusú immunválasz jön létre, mely a makrofágok funkciójának gátlásával jár. Ezzel szemben az endémiás területeken maxadilannal szembeni immunogenitás esetén létrejövő Th1 válasz véd a betegség kialakulásával szemben (Rogers és Titus, 2003). Valószínűleg ennek elkerülése érdekében alakult ki a maxadilan fehérjeszerkezetének nagymértékű polimorfizmusa (Milleron et al., 2004). Ezek alapján arra következtetnek, hogy a maxadilannal szembeni vakcináció alkalmas

lehet a világ hat legsúlyosabb vektor által közvetített betegsége közé tartozó leishmaniasis elleni hatékony immunvédelemre (Qureshi et al., 1996; Titus et al., 2006; Brodie et al., 2007).

### **1.5. A VIP gyulladásban betöltött szerepe**

A 28 aminosav hosszúságú neuropeptidet 1970-ben izolálták vékonybélből, majd nemsokára a központi és a perifériás idegrendszerben is kimutatták a jelenlétét (Said és Mutt, 1970; Said és Rosenberg, 1976). Számos szervben, így a szívben, a gastrointestinalis, a respiratorikus és az urogenitalis traktusban is felszabadul, csakúgy, mint a thymusban, a lépben, a nyirokcsomókban és a csontvelőben is. Szintén koexpresszálódik a hozzá szerkezetileg nagymértékben hasonló PACAP-pal a paraszimpatikus és hátsó gyöki ganglionokban, a ganglion oticum és sphenopalatinum perikaryonjaiban, illetve néhány ganglion nodosumban található neuronban is (Mulder et al., 1995; Fahrenkrug és Hannibal, 2004). A VIP-szerű immunreaktivitást a patkányok primer szenzoros neuronjaiban is kimutatták (Ju et al., 1987). A VIP immunregulációs hatását elsősorban a VPAC1 receptorok közvetítik adenilát-cikláz aktivációján keresztül (Chorny et al., 2006; Gonzalez-Rey és Delgado, 2007). A VIP jelátvitelének károsodása hozzájárul számos autoimmun betegség, így a rheumatoid arthritis vagy a sclerosis multiplex kialakulásához (Sun et al., 2006; Delgado et al., 2008). Az endogén VIP antiinflammatorikus hatásának fontosságára utal, hogy VIP génhiányos egerek hajlamosabbak számos gyulladással járó betegség, így septicus shock, asthma bronchiale és pulmonalis hypertensio kialakulására (Hamidi et al., 2006; Szema et al., 2006). Virális fertőzések esetén jelentősen jobb túlélést és erősebb antivirális immunitást mutattak a VIP génhiányos egerek, mint vad társaik, melynek hátterében a VIP hiányában fokozódó veleszületett és szerzett immunitás állhat (Li et al., 2011a). Antiinflammatorikus hatását a proinflammatorikus kemokinek és citokinek felszabadulásának gátlásán, az antiinflammatorikus IL-10 növelésén és az oxidatív stressz lokális és szisztémás csökkentésén keresztül éri el (Ganea és Delgado, 2002; Delgado és Ganea, 2013).

A VIP neurogén gyulladásban betöltött szerepét is számos vizsgálat igazolja (Pincelli et al., 1992; Said, 1998; Järvikallio et al., 2003). A neonatális periódusban kapszaicinnal kezelt patkányok hátsó gyöki ganglionjában szignifikánsan csökkent a VIP-t expresszáló neuronok száma (Noguchi et al., 1993). A neurokinin A valószínűleg részben VIP felszabadításán keresztül serkenti a gyulladással járó bélbetegség neurogén komponensét (Tien et al., 1991). A VIP gátolja a glutamát- és oxidatív stressz indukált pulmonalis oedemát, a kapszaicin hatására kialakuló bronchokonstriktiót és légúti gyulladást (Said, 1998). Patkánymodellben igazolták, hogy ugyan önmagában nem okoz plazma-extravazációt, azonban tovább növeli a SP által

kiváltott érpermeabilitás-fokozódást, valamint serkenti a lokális vérátáramlást (Khalil et al., 1988). Valószínűleg az akut sérülés vagy axotómia hatására kialakuló VIP upreguláció is a gyulladáshoz vezető reakció csökkentését szolgálja (Mohny et al., 1994).

## **2. Anyagok és módszerek**

### **2.1. Kísérleti állatok**

Kísérleteinkben 3 hónapos nőtény CD1 egereket vizsgáltunk, melyeket standard laboratóriumi körülmények között, igény szerinti táplálék- és folyadékellátás mellett tartottunk 12 órás világos-sötét ciklusban 24-25°C-on. Az állatok elhelyezését, gondozását és a kísérletek kivitelezését az etikai szabályoknak és az egyetemi protokollnak megfelelően végeztük (BA02/2000-15024/2011, Pécsi Tudományegyetem).

Az egereket 3 csoportra osztottuk:

- 1) I.p. maxadilan-kezelt (100 µg/kg; n=48)
- 2) I.p. VIP-kezelt (100 µg/kg; n=52)
- 3) I.p. fiziológias sóoldattal kezelt (10 µl/kg; n=52).

Az intraperitoneális kezeléseket legalább 15 perccel a kísérletet megelőzően végeztük. Az alkalmazott PAC1R és VPAC1/2R agonisták dózisát egy korábbi kísérlet alapján határoztuk meg, melyben a PACAP 100 µg/kg dózisban hatékonyan csökkentette a neurogén gyulladást (Németh et al., 2006). A kísérletek során minden esetben a kémiai anyagok friss oldatát használtuk.

### **2.2. Mustárolajjal és formalinnal kiváltott neurogén oedema vizsgálata egérfülön**

Az állatok fülének vastagságát ketamin (100 mg/kg) – xylazin (5 mg/kg) altatásban 0,1 µm pontosságú mikrométer (Moore és Wright, Sheffield, Egyesült Királyság) segítségével mértük meg. A későbbiek során ezt tekintettük kontroll értéknek. A kontroll mérést követően az egerek fülének mindkét oldalát 10-10 µl 1 vagy 5%-os, paraffinolajban oldott mustárolajjal vagy 5%-os, desztillált vízben oldott formalinnal kezeltük, melyet 1 órával később megismételtünk. Az egerek fülének vastagságát az első mustárolaj/ formalin-kezeléstől számított 30 perccel, 1 órával, majd ezt követően a 6 órás kísérlet végéig minden órában mértük. Az eredmények meghatározásakor a fülvastagság kontrollhoz viszonyított %-os növekedését számítottuk ki, és az adatokat átlag ± SEM-ben adtuk meg.

### **2.3. Az Evans kék-kötött albumin extravazációjának meghatározása egérfülön**

Az egerek fiziológias sóoldat-, maxadilan- és VIP-kezelése a korábban leírtaknak megfelelően történt. Az egereket uretánnal (1,2 g/kg) elaltattuk, és testhőmérsékletüket melegítőpad



segítségével állandó 38°C-on tartottuk. Az Evans kéket (25 mg/kg) legalább 10 perccel a mérés megkezdése előtt injektáltuk, ezzel biztosítva a festék keringésben történő egyenletes eloszlását és albuminhoz való kötődését. Az Evans kék egy tetraszódium-diazo só, amely nagy affinitással köt a plazma albuminhoz, ezért az extravazális, éren kívüli Evans kék mennyisége arányos az érfalon átlépő plazma albuminéval. Az egérfül dorsalis felszínének 20 µl 5%-os mustárolajjal, vagy kontroll állatok esetében paraffinolajjal történő kezelése előtt 3 kontroll felvételt készítettünk az egerek füléről Nikon intravitális mikroszkóp segítségével (1x objektívvel és 2x optikai zoom-mal), majd a mustárolaj/ paraffinolaj-kezelést követően 30 másodpercenként készítettünk felvételt a 30 perces kísérlet során. Az extravazálisan megjelenő kék szín intenzitásának fokozódása arányos a vérpályából kilépő albumin növekvő mennyiségével. Az intenzitások meghatározása Image-Pro Plus 7.0.0.591 (Media Cybernetics Inc., MD, USA) szoftverrel történt. A mustárolaj-kezelés okozta csillogást az „RGB” (piros-zöld-kék) színskála piros komponensének 182-es küszöbértékre állításával zártuk ki. Az intenzitásokat a kontroll értékhez viszonyítottuk, és az adatokat átlag% ± SEM-ben adtuk meg.

#### **2.4. A bőr mikrocirkulációjának meghatározása lézer Doppler képalkotó módszerrel egérfülön**

Az egerek fiziológiás sóoldat-, maxadilan- és VIP-kezelése a korábban leírtaknak megfelelően történt. Az állatokat elaltattuk /ketamin (100 mg/kg) és xylazin (5 mg/kg), s.c./, és a testhőmérsékletüket melegítőpad segítségével állandó 38°C-on tartottuk. A bőr mikrocirkulációjának meghatározását lézer Doppler képalkotó módszerrel végeztük (Periscan PIM-II, Perimed, Svédország). A vizsgált terület 30x64 képpont volt, mely a két fül és a fej egyidejű szkennelését tette lehetővé. A kísérlet kezdetén 3 kontroll képet készítettünk, majd 20 µl 5% mustárolajjal kezeltük az egerek jobb, míg 20 µl paraffinolajjal az egerek bal fülének dorsalis felszínét, és ezután a 30 perces kísérlet alatt 2 perces intervallumonként szkenneltük az állatok füleit. A Doppler-effektus lényege, hogy az elmozduló vörösvértestekről a lézerfény megváltozott frekvenciával verődik vissza, mely frekvenciaeltolódás arányos a vörösvértestek sebességével. Az ezen elv alapján kapott véráramlási értékekhez szinkód rendelhető. Így a fekete, valamint sötétkék szín az alacsony perfúziójú területeket jelöli, míg a zöld, sárga és piros színek az egyre fokozódó véráramlású területeket mutatják. A szkennelt területen a két fül területét kijelöltük („region of interest”, ROI), és az ezeken mért áramlási értékeket a kontroll képek átlagaihoz viszonyítottuk. Ezután az 5%-os mustárolajjal stimulált jobb fülön mért értékekből kivontuk a vivőanyaggal kezelt bal fülön

kapott értékeket annak érdekében, hogy méréseinket az állatok szisztémás keringésében bekövetkező változások ne befolyásolják.

### **2.5. Az egérfülek myeloperoxidáz (MPO) aktivitásának meghatározása**

Hat órával az 5%-os mustárolaj első topikális alkalmazását követően az egerek füleit eltávolítottuk, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és további feldolgozásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A füleket kiolvasztást követően 2 ml 20 mM-os, 7,2-7,4 pH-jú kálium-foszfát pufferben homogenizáltuk. Ezután a homogenizátumot 10 percig  $4^{\circ}\text{C}$ -on 10.000g gyorsulással centrifugáltuk. Az üledéket 4 ml 50 mM-os, 0,5% hexadecil-trimetilammóniumot (HTAB) tartalmazó kálium-foszfát pufferben (pH=6,0) vortexeltük, majd újra lecentrifugáltuk. A minták MPO aktivitását a második centrifugálást követően nyert felülúszóból határoztuk meg 96-lyukú lemezen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ) hozzáadásával, amely a myeloperoxidáz enzim szubsztrátja. A minták optikai denzitását (OD) öt perc különbséggel kétszer mértük meg Labsystems microplate reader segítségével 620 nm-en, és az értékek meghatározásához a humán MPO standard esetében mért értékek alapján rajzolt kalibrációs görbét használtuk. Az időegység alatti optikai denzitás-változából ( $\Delta\text{OD}/\text{eltelt idő}$ ) a reakció sebességére, ebből pedig a mintában lévő myeloperoxidáz enzim aktivitására kövekeztethetünk. A minták MPO aktivitása a neutrophil granulocyták infiltrációjának kvantifikálására alkalmas mutató. Az adatokat U/g nedves szövetre adtuk meg.

### **2.7. Statisztikai analízis**

Az eredmények statisztikai értékelése GraphPad szoftverrel, ismételt mérések vagy kétutas variancia-analízis (ANOVA) és Bonferroni módosított t-teszt segítségével történt.

A kapott eredményt akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, amennyiben p értéke kisebb volt, mint 0,05.

### **2.8. Felhasznált kémiai anyagok**

Az Evans kék, a humán MPO standard és a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -3,3',5,5'-tetrametilbenzidin gyártója a Sigma (St Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok), a maxadilant a Bachemtől vásároltuk (Svájc). A ketamint a Richter Gedeon Nyrt. (Magyarország), a xylazint az Eurovet Animal Health BV (Hollandia), az uretánt pedig a Spektrum 3D (Magyarország) gyártotta. A paraffinolajat és a formalint (Formaldehydum solutum 37%; Ph.Hg. VII.) a Pécsi Tudományegyetem Egyetemi Gyógyszertárából szereztük be. A VIP-hez a Szegedi

Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetével történő kollaboráció keretében jutottunk hozzá (Prof. Dr. Tóth Gábor).

### 3. Eredmények

#### 3.1. Maxadilan és VIP hatása a mustárolaj- és formalin-indukált neurogén oedemára

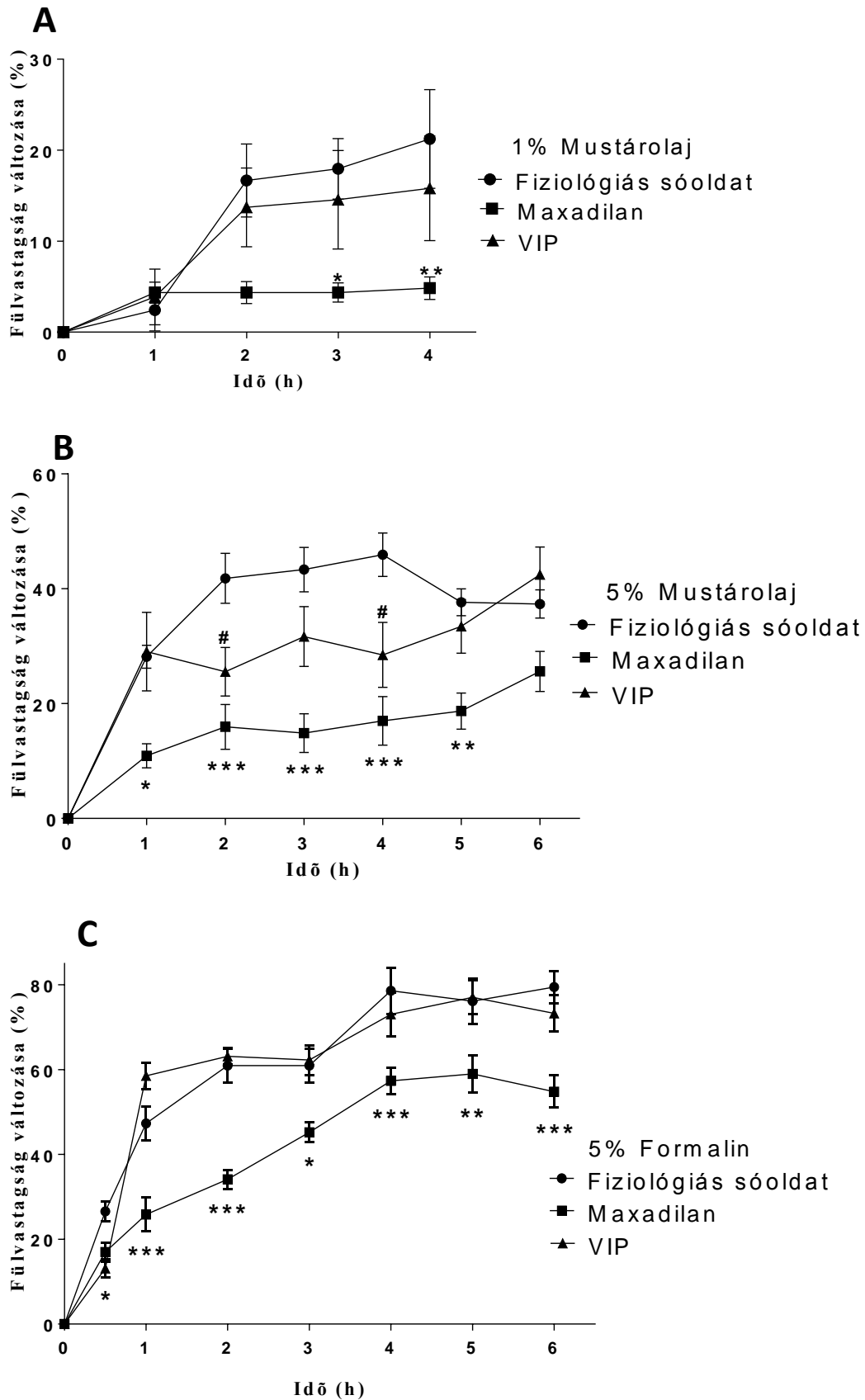
A mustárolaj (MO) és a formalin a TRPA1 receptorok aktivációján keresztül stimulálják a kapszaicin-szenzitív szenzoros idegvégződéseket. Ennek hatására a primer afferens neuronból számos neuropeptid felszabadul, melyek fokozott érpermeabilitáshoz és vazodilatációhoz, ezáltal neurogén oedemához vezetnek. A fülek maximális megvastagodása 1%-os mustárolaj-kezelés esetén ~20%, míg 5%-os mustárolaj esetében ~45% és 5% formalin hatására ~80% volt (**23.A, B, C ábra**).

1%-os mustárolaj topikális alkalmazásának hatására kialakuló neurogén oedema a kezelést követően 4 órával érte el a maximumát, ekkor 21,2%-os fülvastagodást tapasztaltunk a kontroll, fiziológias sóoldattal kezelt állatokban. A mustárolaj-indukált oedema szignifikánsan kisebb mértékű volt a maxadilan-kezelt állatokban, maximum 4,8%-os fülvastagságnövekedést mértünk a mustárolajjal történő kezelést követő harmadik és negyedik órában, vagyis a mustárolaj-indukált neurogén oedema szinte teljes mértékben hiányzott a PAC1 receptor agonistával kezelt állatokban. A VIP ugyan enyhén mérsékelte az oedema kialakulásának mértékét, de szignifikáns változást nem eredményezett (**23.A ábra**).

Az 5%-os mustárolaj-kezelés hatására fokozódott a neurogén oedema mértéke, a maximális fülduzzadás ebben az esetben 45,9%-os volt a fiziológias sóoldattal kezelt csoportban. Ehhez képest 100 µg/kg maxadilan-kezelés hatására a kísérlet első 5 órájában szignifikánsan kisebb mértékű, maximum 25,6%-os volt a fülvastagodás mértéke. A VIP-kezelés szintén mérsékelte a neurogén oedema kialakulását, szignifikáns gátlást a kísérlet második és negyedik órájában érve el. Az 1%-os mustárolaj esetében kapott eredményekhez hasonlóan a maxadilan neurogén gyulladást gátló hatása kifejezettebb volt, mint a VIP-é (**23.B ábra**).

Az 5%-os formalin által kiváltott neurogén oedema során nem találtunk különbséget a VIP-vel és a fiziológias sóoldattal kezelt állatok között, a maximális fülduzzadás mértéke 77% volt a VIP-vel, míg 79,4% a csak vivőanyaggal kezelt csoportban. A maxadilan a formalin-indukált neurogén gyulladást a kísérlet teljes időtartama alatt szignifikáns mértékben gátolta (**23.C ábra**).

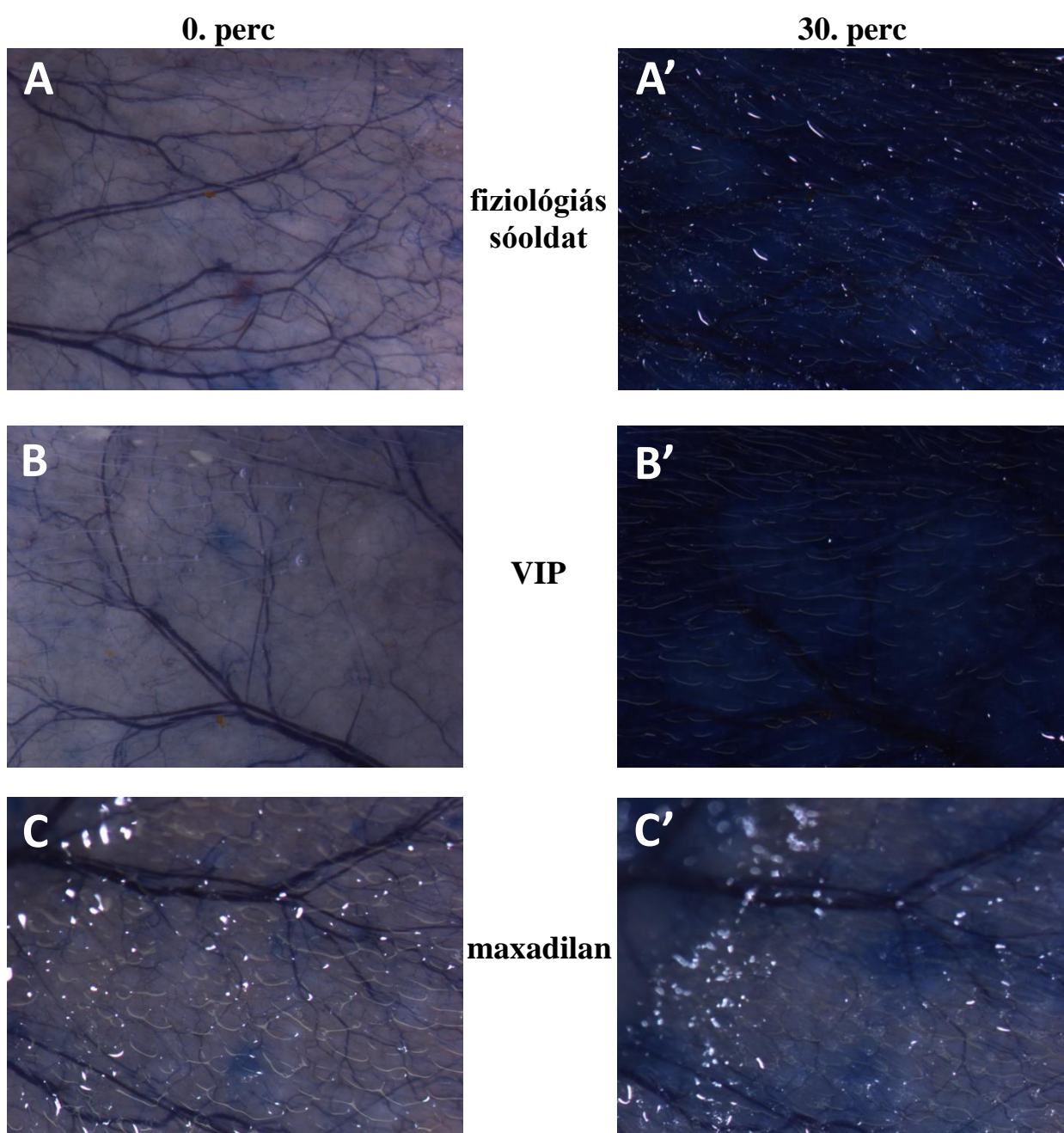
Ezen eredmények alapján az 5%-os mustárolaj-kezelés bizonyult a legmegfelelőbbnek a maxadilan és a VIP neurogén gyulladásra kifejtett hatásának vizsgálatára. Következésképpen minden további kísérletben az 5%-os mustárolajjal történő indukciót alkalmaztuk.

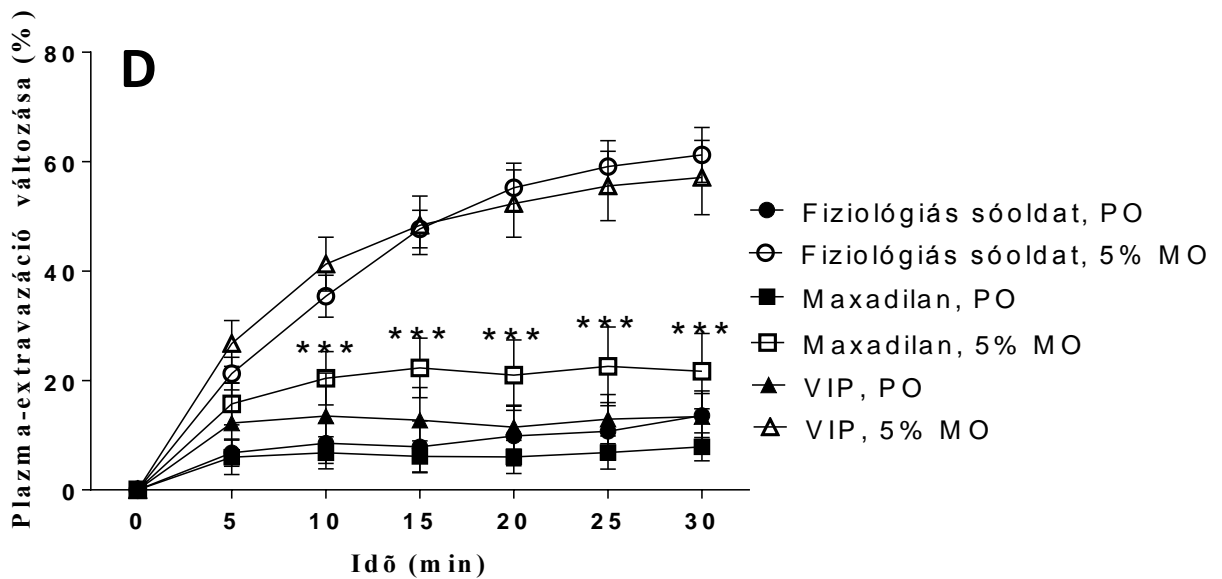


23. ábra: Maxadilan és VIP hatása az 1%-os mustárolajjal (A), 5%-os mustárolajjal (B) és 5%-os formalinnal (C) kiváltott neurogén oedémára egérfülön. Ismételt méréses ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n = 6-12$ /csoport; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  maxadilan vs. fiziológias sóoldat; # $p < 0,05$  VIP vs. fiziológias sóoldat.

### 3.2. Maxadilan és VIP hatása az 5% mustárolajjal kiváltott plazma-extravazációra

Az 5% mustárolaj (MO) a kontroll, vivőanyaggal kezelt állatokban szignifikánsan, 48,3%-kal fokozta a posztkapilláris venulák albumin-áteresztőképességét a paraffinolajjal (PO) kezelt fülekhez viszonyítva, amelyet az Evans kék festék ezzel arányos extravazációja mutatott (24.A', D ábra). A szisztémás VIP-kezelés nem befolyásolta a plazmafehérjék kiáramlását a kísérlet 30 perces időtartama alatt, a maximális változás mustárolaj hatására 43,7% volt a VIP-kezelt állatokban (24.B', D ábra). A maxadilan szignifikáns mértékben gátolta az albumin kiáramlását, a plazma-extravazáció maximális fokozódása 15,8% volt a paraffinolajjal kezelt fülekhez viszonyítva (24.C',D ábra).





24. ábra: Reprezentatív, intravitális mikroszkóppal készült felvételek az 5%-os mustárolajjal kezelt egérfülekről fiziológiás sóoldattal (A, A'), VIP-vel (B, B') és maxadilannal (C, C') kezelt egerek esetében a mustárolajjal való kezelés időpontjában (A, B, C) és 30 perccel később (A', B', C'). A kék szín intenzitásának erősödése a plazma albuminhoz kötött Evans kék érfalon történő fokozódó extravazációjára utal.

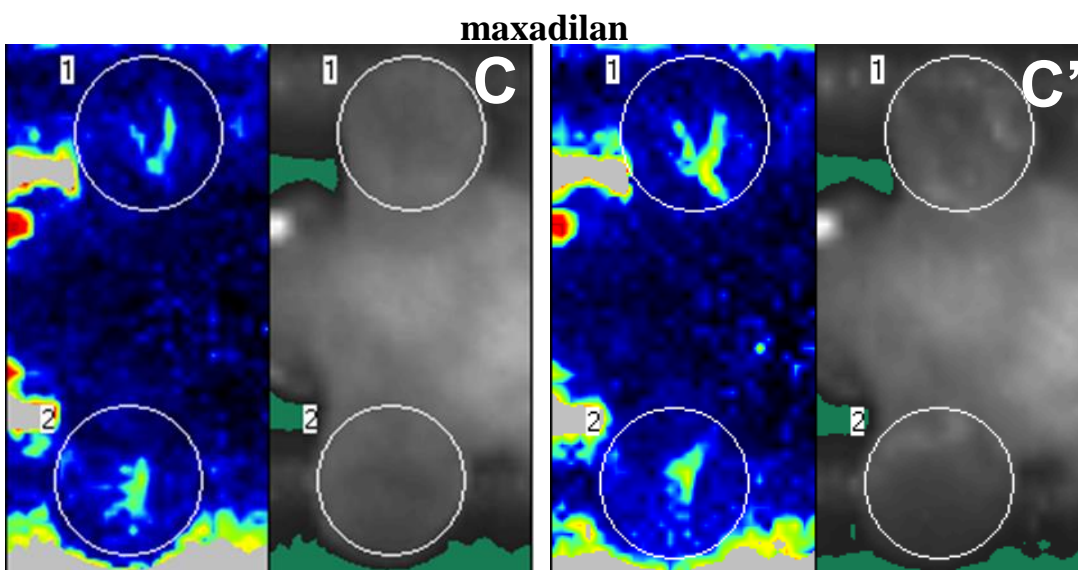
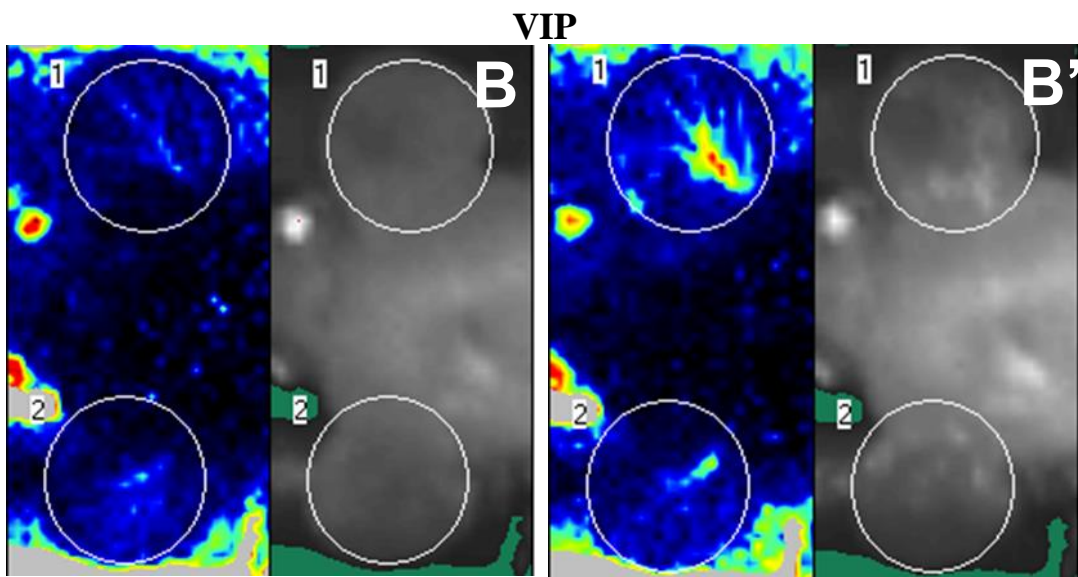
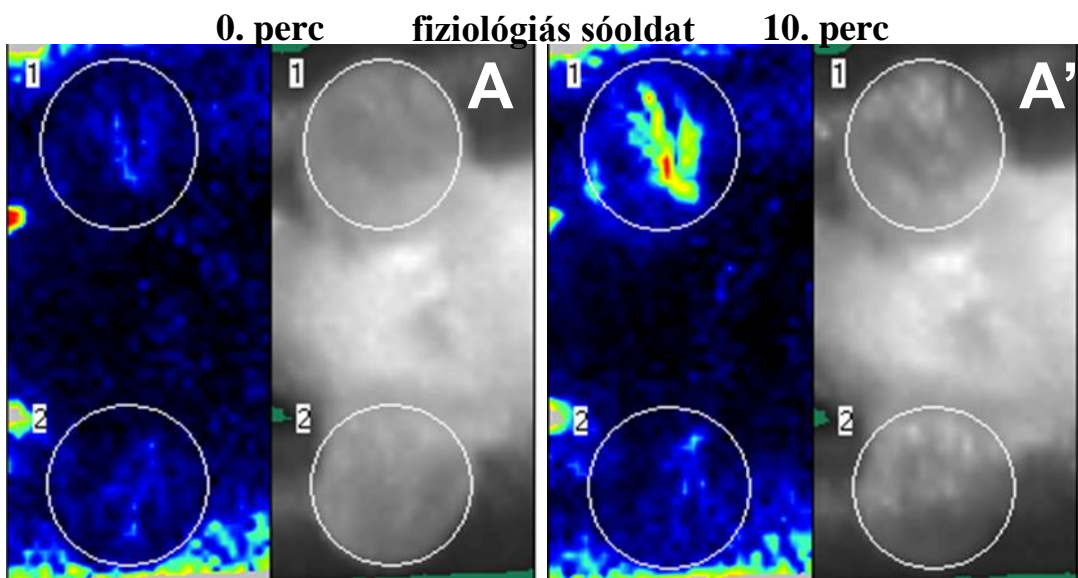
Maxadilan és VIP hatása az 5%-os mustárolaj(MO)-kezelés hatására létrejövő plazma-extravazációra (D). Ismételt mérés ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=4-5$ /csoport; \*\*\*  $p<0,001$  maxadilan, 5% mustárolaj (MO) vs. fiziológiás sóoldat, 5% MO és VIP, 5% MO.

### 3.3. Maxadilan és VIP hatása az 5% mustárolajjal kiváltott vazodilatációra

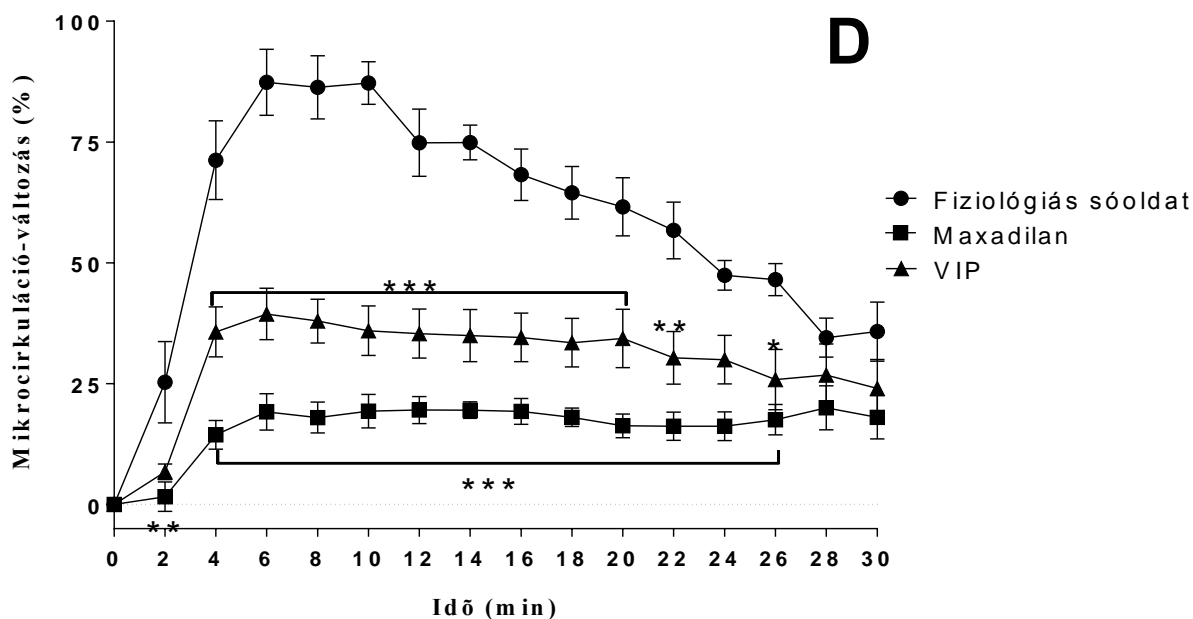
A maxadilan által kiváltott véráramlás-fokozódást a paraffinnal kezelt fülekben megjelenő zöld és sárga szín mutatja, míg a VIP nem befolyásolta a bazális perfúziót (25.B, C ábra).

A neurogén gyulladásához kapcsolódó perfúzió-fokozódás a fiziológiás sóoldattal kezelt csoportban az 5% mustárolaj-kezelés utáni 6-10. percben érte el 87,2%-os maximumát (25.A', D ábra). Mind a szisztémás VIP, mind pedig a maxadilan szignifikáns mértékben gátolta a mustárolaj-indukált vazodilatációt. A VIP-kezelés hatására a bőr maximális perfúzió-fokozódása 39,4%, míg a maxadilan esetében 19,5%-os volt, vagyis a PAC1 receptoron keresztüli jelátvitel hatékonyabban gátolja a neurogén vazodilatációt, szignifikáns különbséget a kísérlet 4-8. percében mutatva. Tehát érdekes módon a maxadilan jelen kísérletben is tapasztalt vazodilatátor hatása ellenére szignifikánsan csökkentette a neurogén gyulladás hatására kialakuló perfúzió-fokozódást (25. ábra).





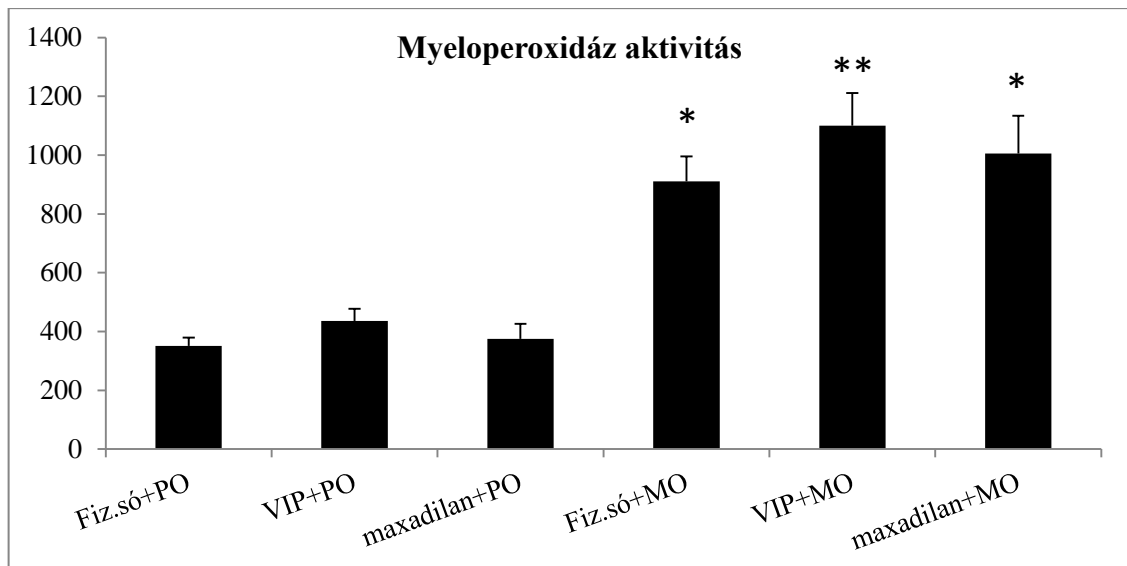




25. ábra: Reprezentatív lézer Doppler felvételek az 5% mustárolajjal (jobb fül, a felső kör által jelzett terület) vagy paraffinnal (bal fül, az alsó kör által jelzett terület) történő topikális kezelés előtt (A, B, C) és 10 perccel utána (A', B', C'). A fekete-fehér képek a szkennelt területet, vagyis az egerek fejét és fülét ábrázolják, a színes képek pedig a perfúzió mértékét mutatják: a fekete és a sötétkék az alacsony, míg a világoskék, zöld és sárga az egyre fokozódó, végül a piros a legmagasabb áramlású területeket jelzi. Fiziológias sóoldattal (A), VIP-vel (B) és maxadilannal (C) kezelt állatok füléről készült kontroll felvételek. A kísérlet 10. percében készült lézer Doppler felvételek fiziológias sóoldattal (A'), VIP-vel (B') és maxadilannal (C') kezelt állatok füléről. Maxadilán és VIP hatása 5% mustárolajjal kiváltott neurogén vazodilatációra egérfülön (D). Ismételt méréses ANOVA és módosított Bonferroni teszt;  $n=7$ /csoport;  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ;  $***p<0,001$  vs. fiziológias sóoldat.

### 3.4. Maxadilán és VIP hatása a myeloperoxidáz aktivitásra

A myeloperoxidáz aktivitás a gyulladás celluláris komponensének, tehát a neutrophil granulocyták akkumulációjának kvantifikálására alkalmas mutató. A mustárolajjal kezelt fülekben a stimulációt követő 6. órában szignifikánsan magasabb volt a myeloperoxidáz aktivitás a megfelelő paraffinolajjal kezelt fülekhez viszonyítva, de sem a maxadilán, sem a VIP nem befolyásolta a myeloperoxidáz aktivitást szignifikáns mértékben. Tehát a VPAC1/2 és a PAC1 receptorok stimulációja nem befolyásolja a neutrophilek akkumulációját sem stimulálatlan, sem pedig mustárolajjal stimulált szövetben (26. ábra).



26. ábra: Myeloperoxidáz aktivitás a fziológias sóoldattal, VIP-vel és maxadilánnal kezelt állatok fülében 6 órával az 5%-os mustárolajjal történő stimulációt követően. Az oszlopok az átlag  $\pm$  SEM értékeit ábrázolják; kétutas ANOVA, Bonferroni módosított t-teszt;  $n = 8-12$ /csoport;  $*p < 0,05$  fiz.só+MO vs. fiz.só+PO, maxadilán+MO vs. maxadilán+PO;  $**p < 0,01$  VIP+MO vs. VIP+PO.

#### 4. Megbeszélés

Kísérleteinkkel elsőként bizonyítottuk, hogy a szelektív PAC1 receptor agonista maxadilan gátolja az akut neurogén gyulladást egérmodellben. Ennek hátterében mind az artériás vazodilatáció, mind pedig a vénák és kapillárisok permeabilitás-fokozódásának gátlása áll, melyet a lézer Doppler módszerrel tapasztalt csökkent szöveti perfúzió, illetve a mikrométerrel és intravitális mikroszkópiával mért szignifikánsan kisebb plazma-extravazáció bizonyított. A VPAC1/2 receptor agonista VIP neurogén gyulladást gátló hatása enyhébb volt, szignifikáns oedema-csökkenést csak az 5%-os mustárolaj alkalmazását követő 2. és 4. órában ért el. A szisztémás VIP-kezelés szignifikáns mértékben nem gátolta az 1%-os mustárolajjal, valamint 5%-os formalinnal kiváltott oedemát. Az oedemaképződés elsősorban a plazmaproteinek extravazációjával arányos, melyet a VIP nem befolyásolt. A mustárolajjal kiváltott gyulladás késői, celluláris fázisa, mely a mustárolaj-indukciót követően 6 órával alakul ki, nem neurogén, a kapszaicin-szenzitív szenzoros idegvégződéseknek nincs szerepük a kialakulásában (Bánvölgyi et al., 2004). Korábban igazolták, hogy a PACAP-38-kezelés csak a gyulladás neurogén fázisát gátolja, míg a leukocyták infiltrációjára nincs hatással (Németh et al., 2006). Ehhez hasonlóan a maxadilan- és a VIP-kezelés sem befolyásolta az egerek fülének myeloperoxidáz aktivitását, vagyis jelen kísérletben sem találtunk változást a neutrophil granulocyták akkumulációjának mértékében sem a PAC1, sem pedig a VPAC1/2 receptorok aktivációja esetén.

Az akut neurogén gyulladás számos betegség, így az asthma, migrén valamint allergiás kontakt dermatitis patomechanizmusában is fontos szerepet tölt be. A napjainkban ismert TRPA1 receptor antagonisták nem specifikusak, így klinikai felhasználásuk korlátozott. Jelen kísérletünkkel felvetettük a PAC1 receptor aktiváció terápiai felhasználásának lehetőségét a betegségek neurogén gyulladással kapcsolatos komponensének enyhítésére.

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a PACAP hisztamin felszabadításán keresztül serkenti a plazmaalbumin-extravazációt patkányok bőrében és humán ornyálkahártyában, azonban nem volt hatással az ózon-indukált vascularis permeabilitás-fokozódásra tengerimalacok respiratorikus traktusában (Cardell et al., 1997; Aizawa et al., 1999; Kinhult et al., 2003). A PACAP-hoz hasonlóan a maxadilan és a VIP intradermális injekciója is bizonyítottan serkenti a plazma-extravazációt intakt szövetekben, bizonyítva, hogy mustárolaj-stimuláció hiányában mind a PAC1, mind pedig a VPAC1/2 receptorok aktivációja fokozott vascularis permeabilitást idéz elő (Khalil et al., 1988; Inoue et al., 1993; Svensjö et al., 2009, 2012). Egy másik kísérletben a VIP szintetikus analógja, a Ro-24-99-81 fokozta, míg a VIP nem

befolyásolta a SP-vel és a kapszaicinnal kiváltott fokozott érpermeabilitást (Gao et al., 1995). A VPAC1/2 receptorok jelentőségére utal, hogy a VIP neurogén gyulladást és hízósejt-degranulációt kiváltó hatása kifejezettebb, mint a PACAP-é (Schytz et al., 2010). A PACAP ellentétes hatásáról is beszámoltak egyes közlemények, melynek során igazolták, hogy a PACAP gátolja az elektromos vagus-stimuláció által kiváltott plazma-kiáramlást, illetve a légutakban SP által indukált érpermeabilitás-fokozódást (Shigyo et al., 1998). Hasonlóképpen a PACAP koncentráció-dependens módon gátolja az akut neurogén gyulladást, és 100 µg/kg dózisban szignifikáns mértékben csökkenti a mustárolajjal kiváltott neurogén oedemát és plazmafehérje-kiáramlást. Továbbá a PACAP lokális immunmodulátor hatása révén gátolja a CGRP, SP és szomatosztatin felszabadulását a trachea szenzoros idegvégződéseiből *in vitro* (Németh et al., 2006). Szintén igazolták, hogy a szenzoros idegvégződéseken található TRPV receptorok resiniferatoxinnal történő szisztémás stimulációja a vérplazma PACAP-koncentrációjának szignifikáns emelkedéséhez vezet, míg az idegvégzések elektromos árammal történő lokális ingerlése esetén a patkányok vérplazma PACAP-szintje változatlan marad. A PACAP antiinflammatorikus hatása karrageninnel kiváltott kevert-típusú gyulladás esetén is bizonyított (Helyes et al., 2007). Azonban tudomásunk szerint máig sem ismertek a PACAP neurogén gyulladást gátló hatásának háttérében álló receptorális mechanizmusok.

A VIP antiinflammatorikus hatását számos közlemény igazolta, de neurogén gyulladásban betöltött szerepe ezidáig ismeretlen volt. A VIP és a PACAP gyulladásgátló hatásait elsősorban a VPAC1 receptor közvetíti kísérletes arthritis és Crohn betegség esetén, míg a PAC1 receptor felelős a peptidek septicus endotoxaemiával szembeni védő hatásáért (Delgado et al., 2000, Delgado és Ganea, 2001; Abad et al., 2003; Martinez et al., 2006).

A VPAC1 és VPAC2 receptorok fontos szerepet töltenek be a nyomással kiváltott vazodilatációban, melynek háttérében a kapszaicin-szenzitív idegrostok aktivációja és CGRP-felszabadulás áll (Fizanne et al., 2004). Korábbi vizsgálatok bizonyították a VIP szerepét olyan betegségek esetében, amelyek patomechanizmusában a neurogén gyulladás kiemelkedő szerepet játszik, és más neuropeptidekhez hasonlóan a VIP-kezelés is hatásosnak bizonyult egerek kollagénnel kiváltott arthritise esetén (Niissalo et al., 2002). Szintén ismert a VIP upregulációja neurogén gyulladás esetén patkányok retinájában (Bronzetti et al., 2007). Akut asztmás rohamban szenvedő betegek plazma VIP-szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz viszonyítva, és a csökkenés mértéke arányos volt a terápiára adott válasszal. Ez alapján arra következtethetünk, hogy a VIP bronchodilatátor és vazodilatátor hatása nélkülözhetetlen a respiratorikus rendszer normális funkciójához (Said, 1982; Cardell et al., 1994). Humán vizsgálatban is igazolták, hogy a VPAC2 receptorok aktivációja gátló hatású

asthma bronchiale esetén (Lindén et al., 2003). Továbbá allergiás betegek könnyvázlatában emelkedett VIP-szintet mértek conjunctivalis allergén-provokációt követően (Sacchetti et al., 2011). Hasonlóképp emelkedett volt az atópiás dermatitisben szenvedő betegek bőrelváltozásaiban mért VIP-koncentráció is, és a mért VIP-szint egyenes arányban állt a pruritus fennállásának mértékével (Giannetti et al., 1992; Teresiak-Mikołajczak et al., 2013). A VIP nonadrenerg-noncholinerg relaxációban betöltött szerepe szintén ismert (Lei et al., 1993; Van Geldre és Lefebvre, 2004). A jelen kísérlet eredményei azonban arra utalnak, hogy a VPAC1 és 2 receptorok szerepe a PACAP neurogén gyulladásra kifejtett gátló hatásában csak az artériás vazodilatáció mérséklésére korlátozódik.

Számos közlemény foglalkozik a maxadilan nem neurogén gyulladásban és vazodilatációban betöltött szerepével, amelyek nélkülözhetetlenek a *Leishmania* transzmissziójához (Brodie et al., 2007). Azonban ezidáig nem vizsgálták a peptid neurogén gyulladásra kifejtett hatását. Lauenstein és munkatársai igazolták a pulmonalis PAC1 receptorok overexpresszióját gyulladás esetén, valamint szintén ismert, hogy a PAC1 receptorok overexpressziója jelentősen csökkenti az eosinophil granulocyták számát, amely a PAC1 receptorok légúti gyulladással szembeni jelentős gyulladáscsökkentő szerepére utal (Lauenstein et al., 2011). Eredményeink azt mutatják, hogy a maxadilan – a paraffinolajjal kezelt kontroll füleken is megfigyelhető erőteljes értágító hatása ellenére – gyulladás esetén gátolja a neuropeptid-közvetített perfúzió-fokozódást.

A PAC1 receptor ismert szignalizációs útvonalai mind cAMP és kalcium felszabadulásához vezetnek, amely nem magyarázhatja a szenzoros idegvégződéseken tapasztalt gátló hatást. Igazolták azt is, hogy a PACAP6-38, amely ismert PAC1/VPAC2 receptor antagonistája, a szenzoros idegvégződéseken agonistaként viselkedik (Reglődi et al., 2008). Mindezek alapján feltételezhető egy ezidáig nem azonosított PAC1 receptorral rokon új receptor vagy splice variáns jelenléte a kapszaicin-szenzitív szenzoros idegvégződéseken.

Eredményeinket összegezve, a maxadilan szignifikánsan csökkentette a neurogén gyulladáshoz kapcsolódó oedemát, fokozott vascularis permeabilitást, valamint perfúzió-fokozódást, míg a VIP antiinflammatorikus hatása a neurogén vazodilatáció mérséklésére korlátozódott. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a PACAP neurogén gyulladásra kifejtett gátló hatását elsősorban a PAC1 receptor közvetíti.

## Új eredmények összefoglalása

Ph.D. munkám első részében a PACAP diabeteses nephropathiában kifejtett hatását vizsgáltam szövettani és molekuláris biológiai vizsgálatok segítségével. Kísérletes munkám második részében pedig a PACAP receptorainak szerepét vizsgáltam a PACAP neurogén gyulladásra kifejtett antiinflammatorikus hatásában.

1. Az intraperitoneális PACAP-38-kezelés szignifikánsan mérsékelte a nyolc hetes diabetes hatására kialakuló glomerulopathia, tubulopathia és vasculopathia mértékét. Elektronmikroszkópos vizsgálataink is bizonyították a PACAP védő hatását a diabetes-indukált bazálmembrán-megvastagodással és podocyta-károsodással szemben. PCR és Western blot vizsgálattal azonosítottuk a védő hatás háttérében álló antifibrotikus és antiapoptotikus hatást; utóbbit bizonyítja, hogy a kezelés hatására csökkent a proapoptotikus, valamint emelkedett az antiapoptotikus fehérjék foszforilációja. A nephroprotektív hatáshoz hozzájárul a PACAP antiinflammatorikus, illetve antioxidatív hatása is, melyet a kezelés hatására bekövetkező csökkent proinflammatorikus citokin-expresszió, valamint emelkedett glutathion szint mutat. Kísérleteinkkel a PACAP-kezelés újabb előnyös aspektusát tártuk fel, amely alapján ígéretes lehet a diabetes komplex terápiájában.

2. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a szelektív PAC1 receptor agonista maxadilan csökkenti a mustárolaj-indukált neurogén oedemát, plazma-extravazációt és vazodilatációt. Ezzel szemben a VPAC1/2 receptor agonista VIP elsősorban a neurogén véráramlás-fokozódást csökkentette, míg a posztkapilláris venulák permeabilitására nem volt hatással. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a PACAP neurogén gyulladást csökkentő hatása elsősorban a PAC1 receptorok aktivációjához köthető. Eredményeink hozzájárulhatnak a neurogén gyulladáson alapuló betegségek célzott kezeléséhez.

## Irodalomjegyzék

1. **Abad C**, Gomariz RP, Waschek JA. (2006) Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Curr Top Med Chem.* 6:151-163.
2. **Abad C**, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, et al. (2003) Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 124:961-971.
3. **Abad C**, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP, Delgado M. (2001) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits collagen-induced arthritis: an experimental immunomodulatory therapy. *J Immunol.* 167:3182-3189.
4. **Abbate M**, Zoja C, Remuzzi G. (2006) How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol.* 17:2974-2984.
5. **Agarwal A**, Halvorson LM, Legradi G. (2005) 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. *Brain Res Mol Brain Res.* 138:45-57.
6. **Ahnaou A**, Yon L, Arluison M, Vaudry H, Hannibal J, Hamon M, et al. (2006) Immunocytochemical distribution of VIP and PACAP in the rat brain stem: implications for REM sleep physiology. *Ann N Y Acad Sci.* 1070:135-142.
7. **Ahrén B**, Filipsson K. (2000) The effects of PACAP on insulin secretion and glucose disposal are altered by adrenalectomy in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 921:251-258.
8. **Aizawa H**, Shigyo M, Matsumoto K, Inoue H, Koto H, Hara N. (1999) PACAP reverses airway hyperresponsiveness induced by ozone exposure in guinea pigs. *Respiration.* 66:538-542.
9. **Anichini M**, Cesaretti S, Lepori M, Maddali Bongi S, Maresca M, Zoppi M. (1997) Substance P in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rev Rhum Engl Ed.* 64:18-21.
10. **Aoki M**, Nata T, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Yamamoto K, et al. (2011) Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF-kappaB: antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. *Hypertension.* 38:48-55.
11. **Arimura A**. (1998) Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol.* 48:301-331.
12. **Arimura A**, Li M, Batuman V. (2006a) Potential protective action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP38) on in vitro and in vivo models of myeloma kidney injury. *Blood.* 107:661-668.

13. **Arimura** A, Li M, Batuman V. (2006b) Treatment of renal failure associated with multiple myeloma and other diseases by PACAP-38. *Ann NY Acad Sci.* 1070:1-4.
14. **Arimura** A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Coy DH, Kitada C. (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology.* 129:2787–2789.
15. **Asnicar** MA, Köster A, Heiman ML, Tinsley F, Smith DP, Galbreath E, et al. (2002) Vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 2 deficiency in mice results in growth retardation and increased basal metabolic rate. *Endocrinology.* 143:3994-4006.
16. **Aubdool** AA, Brain SD. (2011) Neurovascular aspects of skin neurogenic inflammation. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 15:33-39.
17. **Augustyns** K, Van der Veken P, Senten K, Haemers A. (2005) The therapeutic potential of inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) and related proline-specific dipeptidyl aminopeptidases. *Curr Med Chem.* 12:971-998.
18. **Azuma** YT, Hagi K, Shintani N, Kuwamura M, Nakajima H, Hashimoto H, et al. (2008) PACAP provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis. *J Cell Physiol.* 216:111-119.
19. **Balakumar** P, Chakkarwar VA, Krishan P, Singh M. (2009) Vascular endothelial dysfunction: a tug of war in diabetic nephropathy? *Biomed Pharmacother.* 63:171-179.
20. **Banks** WA, Kastin AJ, Komaki G, Arimura A. (1993) Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-38 across the blood–brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 267:690-696.
21. **Bánvölgyi** Á, Pálinkás L, Berki T, Clark N, Grant AD, Helyes Z, et al. (2005) Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. *J Neuroimmunol.* 169:86-96.
22. **Bánvölgyi** Á, Pozsgai G, Brain SD, Helyes ZS, Szolcsányi J, Ghosh M, et al. (2004) Mustard oil induces a transient receptor potential vanilloid 1 receptor-independent neurogenic inflammation and a non-neurogenic cellular inflammatory component in mice. *Neuroscience.* 125:449-459.
23. **Bautista** DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, et al. (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell.* 124:1269-1282.



- 24. Bohle A, Wehrmann M, Bogenschutz O, Batz C, Muller CA, Muller GA.** (1991) The pathogenesis of chronic renal failure in diabetic nephropathy. Investigation of 488 cases of diabetic glomerulosclerosis. *Pathol Res Pract.* 187:251-259.
- 25. Borbély E, Scheich B, Helyes Z.** (2013) Neuropeptides in learning and memory. *Neuropeptides.* 47:439-450.
- 26. Borboni P, Porzio O, Pierucci D, Cicconi S, Magnaterra R, Federici M, et al.** (1999) Molecular and functional characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38)/vasoactive intestinal polypeptide receptors in pancreatic beta-cells and effects of PACAP-38 on components of the insulin secretory system. *Endocrinology.* 140:5530-5537.
- 27. Börzsei R, Márk L, Tamás A, Bagoly T, Bay C, Csanaky K, et al.** (2009) Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur J Endocrinol.* 160:561-565.
- 28. Botz B, Imreh A, Sándor K, Elekes K, Szolcsányi J, Reglődi D, et al.** (2013) Role of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide and Tac1 gene derived tachykinins in sensory, motor and vascular functions under normal and neuropathic conditions. *Peptides.* 43:105-112.
- 29. Bourgault S, Vaudry D, Botia B, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H, et al.** (2008) Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides.* 29:919-932.
- 30. Bozza M, Soares MB, Bozza PT, Satoskar AR, Diacovo TG, Brombacher F, et al.** (1998) The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *Eur J Immunol.* 28:3120-3127.
- 31. Brenneman DE, Hauser JM, Spong C, Phillips TM.** (2002) Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. *Neuropeptides.* 36:271-280.
- 32. Brodie TM, Smith MC, Morris RV, Titus RG.** (2007) Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun.* 75:2359-2365.
- 33. Bronzetti E, Artico M, Kovacs I, Felici LM, Magliulo G, Vignone D, et al.** (2007) Expression of neurotransmitters and neurotrophins in neurogenic inflammation of the rat retina. *Eur J Histochem.* 51:251-260.

- 34. Brownlee M.** (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414:813-820.
- 35. Brubel R, Horváth G, Reglődi D, Lubics A, Tamás A, Kiss P, et al.** (2011a) Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. *Transplant Proc*. 43:1297-1299.
- 36. Brubel R, Reglődi D, Jámbor E, Koppán M, Várnagy A, Bíró Z, et al.** (2011b) Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 46:189-194.
- 37. Bruno CM, Valenti M, Bertino G, Ardiri A, Bruno F, Cunsolo M, et al.** (2008) Plasma ICAM-1 and VCAM-1 levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Minerva Med*. 99:1-5.
- 38. Cardell LO, Stjärne P, Wagstaff SJ, Agustí C, Nadel JA.** (1997) PACAP-induced plasma extravasation in rat skin. *Regul Pept*. 71:67-71.
- 39. Cardell LO, Uddman R, Edvinsson L.** (1994) Low plasma concentrations of VIP and elevated levels of other neuropeptides during exacerbations of asthma. *Eur Respir J*. 7:2169-2173.
- 40. Carlsson PO, Ostenson CG, Efendic S, Langel U, Jansson L.** (1996) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) redistributes the blood within the pancreas of anesthetized rats. *Regul Pept*. 63:123-128.
- 41. Castorina A, Giunta S, Mazzone V, Cardile V, D'Agata V.** (2010) Effects of PACAP and VIP on hyperglycemia-induced proliferation in murine microvascular endothelial cells. *Peptides*. 31:2276-2283.
- 42. Catania JM, Chen G, Parrish AR.** (2007) Role of metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol*. 292:905-911.
- 43. Chen J, Kim D, Bianchi BR, Cavanaugh EJ, Faltynek CR, Kym PR, et al.** (2009) Pore dilation occurs in TRPA1 but not in TRPM8 channels. *Mol Pain*. 5:3.
- 44. Chen L, Zhang J, Zhang Y, Wang Y, Wang B.** (2008) Improvement of inflammatory responses associated with NF-kappa B pathway in kidneys from diabetic rats. *Inflamm Res*. 57:199-204.
- 45. Chen S, Hong SW, Iglesias-de la Cruz MC, Isono M, Casaretto A, Ziyadeh FN.** (2001) The key role of the transforming growth factor-beta system in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Ren Fail*. 23:471-481.

- 46. Chen W, Inui T, Hachiya T, Ochi Y, Nakajima Y, Kajita Y. (1993)** Stimulatory action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on thyroid gland. *Biochem Biophys Res Commun.* 194:923-929.
- 47. Chorny A, Gonzalez-Rey E, Varela N, Robledo G, Delgado M. (2006)** Signaling mechanisms of vasoactive intestinal peptide in inflammatory conditions. *Regul Pept.* 137:67-74.
- 48. Clairmont KB, Buckholz TM, Pellegrino CM, Buxton JM, Barucci N, Bell A, et al. (2006)** Engineering of a VPAC2 receptor peptide agonist to impart dipeptidyl peptidase IV stability and enhance in vivo glucose disposal. *J Med Chem.* 49:7545-7548.
- 49. Collier A, Rumley A, Rumley AG, Paterson JR, Leach JP, Lowe GD, et al. (1992)** Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes.* 41:909-913.
- 50. Cook KW, Letley DP, Ingram RJ, Staples E, Skjoldmose H, Atherton JC, et al. (2014)** CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. *Gut.* doi:10.1136/gutjnl-2013-306253.
- 51. Cugini D, Azzollini N, Gagliardini E, Cassis P, Bertini R, Colotta F, et al. (2005)** Inhibition of the chemokine receptor CXCR2 prevents kidney graft function deterioration due to ischemia/reperfusion. *Kidney Int.* 67:1753-1761.
- 52. D'Agati V, Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. (2010)** RAGE, glomerulosclerosis and proteinuria: roles in podocytes and endothelial cells. *Trends Endocrinol Metab.* 21:50-56.
- 53. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. (2011)** National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet.* 378:31-40.
- 54. Darsalia V, Ortsäter H, Olverling A, Darlöf E, Wolbert P, Nyström T, et al. (2013)** The DPP-4 inhibitor linagliptin counteracts stroke in the normal and diabetic mouse brain: a comparison with glimepiride. *Diabetes.* 62:1289-1296.
- 55. Davis W Jr, Ronai Z, Tew KD. (2001)** Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 296:1-6.
- 56. Dejda A, Seaborn T, Bourgault S, Touzani O, Fournier A, Vaudry H, et al. (2011)** PACAP and a novel stable analog protect rat brain from ischemia: Insight into the mechanisms of action. *Peptides.* 32:1207-1216.
- 57. Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Leceta J, Ganea D, et al. (2003)** PACAP in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 992:141-157.

- 58. Delgado M, Ganea D. (2001)** Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by VIP and PACAP in vitro and in vivo. *Arch Physiol Biochem.* 109:377-382.
- 59. Delgado M, Ganea D. (2013)** Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids.* 45:25-39.
- 60. Delgado M, Garrido E, de la Fuente M, Gomariz RP. (1996)** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) stimulates rat peritoneal macrophage functions. *Peptides.* 17:1097-1105.
- 61. Delgado M, Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Leceta J. (2000)** Anti-inflammatory properties of the type 1 and type 2 vasoactive intestinal peptide receptors: role in lethal endotoxic shock. *Eur J Immunol.* 30:3236-3246.
- 62. Delgado M, Jonakait GM, Ganea D. (2002)** Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia.* 39:148-161.
- 63. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. (1999)** VIP and PACAP inhibit IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. Subsequent effect on IFN $\gamma$  synthesis by T cells. *J Neuroimmunol.* 96:167-181.
- 64. Delgado M, Robledo G, Rueda B, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, et al. (2008)** Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells. *Arthritis Rheum.* 58:1010-1019.
- 65. Di Mario U, Pugliese G. (2001)** 15th Golgi lecture: from hyperglycaemia to the dysregulation of vascular remodelling in diabetes. *Diabetologia.* 44:674-692.
- 66. Di Paolo S, Gesualdo L, Ranieri E, Grandaliano G, Schena FP. (1996)** High glucose concentration induces the overexpression of transforming growth factor-beta through the activation of a platelet-derived growth factor loop in human mesangial cells. *Am J Pathol.* 149:2095-2106.
- 67. Dickson L, Finlayson K. (2009)** VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther.* 121:294-316.
- 68. Dimberg J, Skarstedt M, Löfgren S, Zar N, Matussek A. (2014)** Protein expression and gene polymorphism of CXCL10 in patients with colorectal cancer. *Biomed Rep.* 2:340-343.
- 69. Doberer D, Gschwandtner M, Mosgoeller W, Bieglmayer C, Heinzl H, Petkov V. (2007)** Pulmonary and systemic effects of inhaled PACAP38 in healthy male subjects. *Eur J Clin Invest.* 37:665-672.

- 70. Dun EC, Huang RL, Dun SL, Dun NJ.** (1996) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-immunoreactivity in human spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Res.* 721:233-237.
- 71. Fahrenkrug J, Hannibal J.** (2004) Neurotransmitters co-existing with VIP or PACAP. *Peptides.* 25:393-401.
- 72. Falk RJ, Scheinman JI, Mauer SM, Michael AF.** (1983) Polyantigenic expansion of basement membrane constituents in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2:34-39.
- 73. Ferencz A, Kiss P, Wéber G, Helyes Z, Shintani N, Baba A, et al.** (2010a) Comparison of intestinal warm ischemic injury in PACAP knockout and wild-type mice. *J Mol Neurosci.* 42:435-442.
- 74. Ferencz A, Wéber G, Helyes Z, Hashimoto H, Baba A, Reglődi D.** (2010b) Presence of endogenous PACAP-38 ameliorated intestinal cold preservation tissue injury. *J Mol Neurosci.* 42:428-434.
- 75. Filipsson K, Sundler F, Hannibal J, Ahrén B.** (1998) PACAP and PACAP receptors in insulin producing tissues: localization and effects. *Regul Pept.* 74:167-175.
- 76. Filipsson K, Tornøe K, Holst J, Ahrén B.** (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates insulin and glucagon secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:3093-3098.
- 77. Fizan L, Sigaudou-Roussel D, Saumet JL, Fromy B.** (2004) Evidence for the involvement of VPAC1 and VPAC2 receptors in pressure-induced vasodilatation in rodents. *J Physiol.* 554:519-528.
- 78. Fridolf T, Sundler F, Ahrén B.** (1992) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): occurrence in rodent pancreas and effects on insulin and glucagon secretion in the mouse. *Cell Tissue Res.* 269:275-279.
- 79. Friedman BI, Spray BJ, Tuttle AB, Buckalew VM Jr.** (1993) The familial risk of end-stage renal disease in African Americans. *Am J Kidney Dis.* 21:387-393.
- 80. Ganea D.** (1996) Regulatory effects of vasoactive intestinal peptide on cytokine production in central and peripheral lymphoid organs. *Adv Neuroimmunol.* 6:61-74.
- 81. Ganea D, Delgado M.** (2003) The neuropeptides VIP/PACAP and T cells: inhibitors or activators? *Curr Pharm Des.* 9:997-1004.
- 82. Ganea D, Delgado M.** (2002) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13:229-237.

- 83. Gao XP**, Jaffe HA, Olopade CO, Rubinstein I. (1995) Stable VIP analogue Ro-24-9981 potentiates substance P-induced plasma exudation in hamster cheek pouch. *J Appl Physiol.* 79:968-974.
- 84. Gardiner SM**, Rakhit T, Kemp PA, March JE, Bennett T. (1994) Regional haemodynamic responses to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in conscious rats. *Br J Pharmacol.* 111:589-597.
- 85. Geppetti P**, Capone JG, Trevisani M, Nicoletti P, Zagli G, Tola MR. (2005) CGRP and migraine: neurogenic inflammation revisited. *J Headache Pain.* 6:61-70.
- 86. Ghatei MA**, Takahashi K, Suzuki Y, Gardiner J, Jones PM, Bloom SR. (1993) Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J Endocrinol.* 136:159-166.
- 87. Giacco F**, Brownlee M. (2010) Oxidative stress and diabetic complications, *Circ Res.* 107:1058-1070.
- 88. Giannetti A**, Fantini F, Cimitan A, Pincelli C. (1992) Vasoactive intestinal polypeptide and substance P in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 176:90-92.
- 89. Gilbert RE**, Cox A, Wu LL, Allen TJ, Hulthen UL, Jerums G, et al. (1998) Expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition. *Diabetes.* 47:414-422.
- 90. Global status report** on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.
- 91. Gnudi L.** (2012) Cellular and molecular mechanisms of diabetic glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant.* 27:2642-2649.
- 92. Gonzalez-Rey E**, Delgado M. (2007) Anti-inflammatory neuropeptide receptors: new therapeutic targets for immune disorders? *Trends Pharmacol Sci.* 28:482-491.
- 93. Gray SL**, Yamaguchi N, Vencová P, Sherwood NM. (2002) Temperature-sensitive phenotype in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology.* 143:3946-3954.
- 94. Grevelink SA**, Osborne J, Loscalzo J, Lerner EA. (1995) Vasorelaxant and second messenger effects of maxadilan. *J Pharmacol Exp Ther.* 272:33-37.
- 95. Gui D**, Guo Y, Wang F, Liu W, Chen J, Chen Y, et al. (2012) Astragaloside IV, a novel antioxidant, prevents glucose-induced podocyte apoptosis in vitro and in vivo. *PLoS One.* 7:e39824.

- 96. Ha H, Lee HB.** (2001) Oxidative stress in diabetic nephropathy: basic and clinical information. *Curr Diab Rep.* 1:282-287.
- 97. Ha H, Yu MR, Kim KH.** (1999) Melatonin and taurine reduce early glomerulopathy in diabetic rats. *Free Radic Biol Med.* 26:944-950.
- 98. Hamidi SA, Szema AM, Lyubsky S, Dickman KG, Degene A, Mathew SM, et al.** (2006) Clues to VIP function from knockout mice. *Ann N Y Acad Sci.* 1070:5-9.
- 99. Hannibal J, Fahrenkrug J.** (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in intrinsic and extrinsic nerves of the rat pancreas. *Cell Tissue Res.* 299:59-70.
- 100. Hannibal J.** (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 453:389-417.
- 101. Harmar AJ, Sheward WJ, Morrison CF, Waser B, Gugger M, Reubi JC.** (2004) Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology.* 145:1203-1210.
- 102. Hasegawa G, Nakano K, Sawada M, Uno K, Shibayama Y, Ienaga K, et al.** (1991) Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 40:1007-1112.
- 103. Hautmann M, Friis UG, Desch M, Todorov V, Castrop H, Segerer F, et al.** (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors. *J Am Soc Nephrol.* 18:1150-1156.
- 104. Heilig CW, Liu Y, England RL, Freytag SO, Gilbert JD, Heilig KO, et al.** (1997) D-glucose stimulates mesangial cell GLUT1 expression and basal and IGF-I sensitive glucose uptake in rat mesangial cells: Implications for diabetic nephropathy. *Diabetes.* 46:1030-1039.
- 105. Helyes Z, Németh J, Pintér E, Szolcsányi J.** (1997) Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br J Pharmacol.* 121:613-615.
- 106. Helyes Z, Pintér E, Németh J, Kéri G, Thán M, Oroszi G, et al.** (2001) Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat. *Br J Pharmacol.* 134:1571-1579.
- 107. Helyes Z, Pintér E, Németh J, Szolcsányi J.** (2003) Pharmacological Targets for the Inhibition of Neurogenic Inflammation. *Current Medicinal Chemistry - Anti- Inflammatory & Anti-Allergy Agents.* 2:191-218.

- 108. Helyes Z, Pozsgai G, Börzsei R, Németh J, Bagoly T, Márk L, et al. (2007)** Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat. *Peptides*. 28:1847-1855.
- 109. Helyes Zs, Szabó Á, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi Á, et al. (2004)** Anti-inflammatory and analgesic effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model of the rat. *Arth Rheum*. 50:1677-1685.
- 110. Heimesaat MM, Dunay RI, Fischer A, Grundmann U, Alutis M, Brauner P, et al. (2012)** PACAP treatment ameliorates acute small intestinal inflammation in mice. *J Mol Neurosci*. 48(Suppl1):S144-S145.
- 111. Herman GA, Bergman A, Yi B, Kipnes M, Sitagliptin Study 012 Group. (2006)** Tolerability and pharmacokinetics of metformin and the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin when co-administered in patients with type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin*. 22:1939-1947.
- 112. Higurashi M, Ohya Y, Joh K, Muraguchi M, Nishimura M, Terawaki H, et al. (2009)** Increased urinary levels of CXCL5, CXCL8 and CXCL9 in patients with Type 2 diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications*. 23:178-184.
- 113. Hills CE, Squires PE. (2010)** TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 31:68-74.
- 114. Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D. (2006)** TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:19564-19568.
- 115. Horváth G, Brubel R, Kovács K, Reglődi D, Opper B, Ferencz A, et al. (2011)** Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. *J Mol Neurosci*. 43:67-75.
- 116. Horváth G, Rácz B, Reglődi D, Kovács K, Kiss P, Gallyas F Jr, et al. (2010)** Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci*. 42:411-418.
- 117. Hosoya M, Kimura C, Ogi K, Ohkubo S, Miyamoto Y, Kugoh H, et al. (1992)** Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim Biophys Acta*. 1129:199-206.
- 118. Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. (1982)** The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies. *Am J Med*. 72:375-380.
- 119. Hou M, Uddman R, Tajti J, Edvinsson L. (2003)** Nociceptin immunoreactivity and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Brain Res*. 964:179-186.



- 120. Ichikawa H, Sugimoto T.** (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-immunoreactive nerve fibers in rat and human tooth pulps. *Brain Res.* 980:288-292.
- 121. Inoki K, Haneda M, Maeda S, Koya D, Kikkawa R.** (1999) TGF- $\beta$ 1 stimulates glucose uptake by enhancing GLUT1 expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 55:1704-1712.
- 122. Inoue H, Asaka T, Nagata N, Koshihara Y.** (1997) Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur J Pharmacol.* 333:231-240.
- 123. Inoue H, Nagata N, Koshihara Y.** (1993) Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear oedema. *Br J Pharmacol.* 110:1614-1620.
- 124. International Diabetes Federation.** (2012) IDF Diabetes Atlas. 5th ed. International Diabetes Federation.
- 125. Isobe K, Tatsuno I, Yashiro T, Nanmoku T, Takekoshi K, Kawakami Y, et al.** (2003) Expression of mRNA for PACAP and its receptors in intra- and extra-adrenal human pheochromocytomas and their relationship to catecholamine synthesis. *Regul Pept.* 110:213-217.
- 126. Iwamoto M, Mizuiri S, Arita M, Hemmi H.** (2005) Nuclear factor- $\kappa$ B activation in diabetic rat kidney: evidence for involvement of P-selectin in diabetic nephropathy. *Tohoku J Exp Med.* 206:163-171.
- 127. Jakab B, Reglódi D, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, et al.** (2004) Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Methods.* 61:189-198.
- 128. Jamen F, Persson K, Bertrand G, Rodriguez-Henche N, Puech R, Bockaert J, et al.** (2000) PAC1 receptor-deficient mice display impaired insulinotropic response to glucose and reduced glucose tolerance. *J Clin Invest.* 105:1307-1315.
- 129. Jamen F, Puech R, Bockaert J, Brabet P, Bertrand G.** (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors mediating insulin secretion in rodent pancreatic islets are coupled to adenylate cyclase but not to PLC. *Endocrinology.* 143:1253-1259.
- 130. Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J.** (1967) Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol.* 31:138-151.
- 131. Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J.** (1970) Action of rare earth metal complexes on neurogenic as well as on bradykinin-induced inflammation. *J Pharm Pharmacol.* 22:366-371.
- 132. Järvikallio A, Harvima IT, Naukkarinen A.** (2003) Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. *Arch Dermatol Res.* 295:2-7.

- 133. Jiang LH, Gamper N, Beech DJ.** (2011) Properties and therapeutic potential of transient receptor potential channels with putative roles in adversity: focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1. *Curr Drug Targets.* 12:724-736.
- 134. Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, et al.** (2004) Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol.* 476:388-413.
- 135. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, et al.** (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature.* 427:260-265.
- 136. Ju G, Hökfelt T, Brodin E, Fahrenkrug J, Fischer JA, Frey P, et al.** (1987) Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res.* 247:417-431.
- 137. Juhász T, Matta C, Katona É, Somogyi C, Takács R, Gergely P, et al.** (2014) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) signalling exerts chondrogenesis promoting and protecting effects: Implication of calcineurin as a downstream target. *PLoS One.* 9:e91541.
- 138. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J.** (1997) Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. *Life Sci.* 60:667-679.
- 139. Kakuk Gy.** (2004) Klinikai nephrologia. Medicina
- 140. Kanauchi M, Nishioka H, Nakashima Y, Hashimoto T, Dohi K.** (1996) Role of tissue inhibitors of metalloproteinase in diabetic nephropathy. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 38:124-128.
- 141. Kaneto H, Fujii J, Seo HG, Suzuki K, Matsuoka T, Nakamura M, et al.** (1995) Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 44:733-738.
- 142. Karátson A, Csiky B, Ladányi E.** (2009) A dialízis kezelés alapjai. Fresenius Medical Care Budapest és a „Vesebetegek ellátásának Fejlesztéséért” alapítvány.
- 143. Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, et al.** (2009) TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:1273-1278.
- 144. Kato H, Ito A, Kawanokuchi J, Jin S, Mizuno T, Ojika K, et al.** (2004) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing the functions of antigen presenting cells. *Mult Scler.* 10:651-659.

- 145. Kelly DJ, Gilbert RE, Cox AJ, Soulis T, Jerums G, Cooper ME.** (2001) Aminoguanidine ameliorates overexpression of pro-sclerotic growth factors and collagen deposition in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 12:2098-2107.
- 146. Kemény A, Reglödi D, Cseharovszky R, Hashimoto H, Baba A, Szolcsányi J, et al.** (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficiency enhances oxazolone-induced allergic contact dermatitis in mice. *J Mol Neurosci.* 42:443-449.
- 147. Khalil Z, Andrews PV, Helme RD.** (1988) VIP modulates substance P-induced plasma extravasation in vivo. *Eur J Pharmacol.* 151:281-287.
- 148. Khan AM, Li M, Abdalnour-Nakhoul S, Maderdrut JL, Simon EE, Batuman V.** (2012) Delayed administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 ameliorates renal ischemia/reperfusion injury in mice by modulating Toll-like receptors. *Peptides.* 38:395-403.
- 149. Khan AM, Li M, Brant E, Maderdrut JL, Majid DS, Simon EE, et al.** (2011) Renoprotection with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in cyclosporine A-induced nephrotoxicity. *J Investig Med.* 59:793-802.
- 150. Khan AM, Maderdrut JL, Li M, Toliver HL, Coy DH, Simon EE, et al.** (2013) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents contrast-induced nephropathy in a novel mouse model. *Physiol Rep.* 1:e00163.
- 151. Kim JE, Lee MH, Nam DH, Song HK, Kang YS, Lee JE, et al.** (2013) Celastrol, an NF- $\kappa$ B inhibitor, improves insulin resistance and attenuates renal injury in db/db mice. *PLoS One.* 8:e62068.
- 152. Kihl J, Adner M, Uddman R, Cardell LO.** (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, effects in the human nose. *Clin Exp Allergy.* 33:942-949.
- 153. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL.** (1984) The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IV. Diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 91:1464-1474.
- 154. Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, et al.** (2005) Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol.* 493:596-606.
- 155. Kock KF, Vestergaard V.** (1994) Armani-Ebstein lesions of the kidney: diagnostic of death in diabetic coma? *Forensic Sci Int.* 67:169-174.
- 156. Koivisto A, Chapman H, Jalava N, Korjamo T, Saarnilehto M, Lindstedt K, et al.** (2014) TRPA1: A Transducer and Amplifier of Pain and Inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 114:50-55.

- 157. Koya D**, Jirousek MR, Lin Y-W, Ishii H, Kuboki K, King GL. (1997) Characterization of protein kinase C-isoform activation on the gene expression of transforming growth factor- $\beta$ , extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest.* 100:115-126.
- 158. Kumar D**, Robertson S, Burns KD. (2004) Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Mol Cell Biochem.* 259:67-70.
- 159. Langoth N**, Kahlbacher H, Schöffmann G, Schmerold I, Schuh M, Franz S, et al. (2006) Thiolated chitosans: design and in vivo evaluation of a mucoadhesive buccal peptide drug delivery system. *Pharm Res.* 23:573-579.
- 160. Langoth N**, Kalbe J, Bernkop-Schnürch A. (2005) Development of a mucoadhesive and permeation enhancing buccal delivery system for PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide). *Int J Pharm.* 296:103-111.
- 161. Lash LH.** (2006) Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact.* 163:54-67.
- 162. Lauenstein HD**, Quarcoo D, Plappert L, Schleh C, Nassimi M, Pilzner C, et al. (2011) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 1 mediates anti-inflammatory effects in allergic airway inflammation in mice. *Clin Exp Allergy.* 41:592-601.
- 163. Leceta J**, Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Ganea D, Delgado M. (2000) Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Ann N Y Acad Sci.* 921:92-102.
- 164. Lei YH**, Barnes PJ, Rogers DF. (1993) Regulation of NANC neural bronchoconstriction in vivo in the guinea-pig: involvement of nitric oxide, vasoactive intestinal peptide and soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol.* 108:228-235.
- 165. Lembeck F**, Holzer P. (1979) Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 310:175-183.
- 166. Lerner EA**, Iuga AO, Reddy VB. (2007) Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. *Peptides.* 28:1651-1654.
- 167. Lerner EA**, Ribeiro JM, Nelson RJ, Lerner MR. (1991) Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem.* 266:11234-11236.
- 168. Lerner EA**, Shoemaker CB. (1992) Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. *J Biol Chem.* 267:1062-1066.

- 169. Li JM**, Southerland L, Hossain MS, Giver CR, Wang Y, Darlak K, et al. (2011a) Absence of vasoactive intestinal peptide expression in hematopoietic cells enhances Th1 polarization and antiviral immunity in mice. *J Immunol.* 187:1057-1065.
- 170. Li M**, Balamuthusamy S, Khan AM, Maderdrut JL, Simon EE, Batuman V. (2011b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents cisplatin-induced renal failure. *J Mol Neurosci.* 43:58-66.
- 171. Li M**, Balamuthusamy S, Khan AM, Maderdrut JL, Simon EE, Batuman V. (2010a) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury. *Peptides.* 31:592-602.
- 172. Li M**, Cortez S, Nakamachi T, Batuman V, Arimura A. (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent inhibitor of the growth of light chain-secreting human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 66:8796-8803.
- 173. Li M**, Maderdrut JL, Lertora JJ, Arimura A, Batuman V. (2008) Renoprotection by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in multiple myeloma and other kidney diseases. *Regul Pept.* 145:24-32.
- 174. Li M**, Maderdrut JL, Lertora JJ, Batuman V. (2007) Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: a case study. *Peptides.* 28:1891-1895.
- 175. Li M**, Khan AM, Maderdrut JL, Simon EE, Batuman V. (2010b) The effect of PACAP38 on MyD88-mediated signal transduction in ischemia-/hypoxia-induced acute kidney injury. *Am J Nephrol.* 32:522-532.
- 176. Lindén A**, Cardell LO, Yoshihara S, Nadel JA. (1999) Bronchodilation by pituitary adenylate cyclase-activating peptide and related peptides. *Eur Respir J.* 14:443-451.
- 177. Lindén A**, Hansson L, Andersson A, Palmqvist M, Arvidsson P, Löfdahl CG, et al. (2003) Bronchodilation by an inhaled VPAC(2) receptor agonist in patients with stable asthma. *Thorax.* 58:217-221.
- 178. Liu DM**, Cuevas J, Adams DJ. (2000) VIP and PACAP potentiation of nicotinic ACh-evoked currents in rat parasympathetic neurons is mediated by G-protein activation. *Eur J Neurosci.* 12:2243-2251.
- 179. Liu XP**, Pang YJ, Zhu WW, Zhao TT, Zheng M, Wang YB, et al. (2009) Benazepril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, alleviates renal injury in spontaneously hypertensive rats by inhibiting advanced glycation end-product-mediated pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 36:287-296.

- 180. Louis SM, Jamieson A, Russell NJ, Dockray GJ. (1989)** The role of substance P and calcitonin gene related peptide in neurogenic plasma extravasation and vasodilatation in the rat. *Neuroscience*. 32:581-586.
- 181. Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, et al. (2007)** Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*. 445:541-545.
- 182. Ma Y, Luo T, Xu W, Ye Z, Hong A. (2012)** A new recombinant pituitary adenylate cyclase-activating peptide-derived peptide efficiently promotes glucose uptake and glucose-dependent insulin secretion. *Acta Biochim Biophys Sin*. 44:948-956.
- 183. Marateb HR, Mansourian M, Faghihimani E, Amini M, Farina D. (2014)** A hybrid intelligent system for diagnosing microalbuminuria in type 2 diabetes patients without having to measure urinary albumin. *Comput Biol Med*. 45:34-42.
- 184. Marchetti P, Decaudin D, Macho A, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA, et al. (1997)** Redox regulation of apoptosis: Impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *Eur J Immunol*. 27:289-296.
- 185. Martinez C, Abad C, Delgado M, Arranz A, Juarranz MG, Rodriguez-Henche N, et al. (2002)** Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:1053-1058.
- 186. Martinez C, Arranz A, Juarranz Y, Abad C, García-Gómez M, Rosignoli F, et al. (2006)** PAC1 receptor: emerging target for septic shock therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 1070:405-410.
- 187. Martinez C, Delgado M, Pozo D, Leceta J, Calvo JR, Ganea D, et al. (1998)** Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*. 63:591-601.
- 188. Matavelli LC, Siragy HM. (2013)** Reduction of aldosterone production improves renal oxidative stress and fibrosis in diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 61:17-22.
- 189. Matsuda K, Azuma M, Maruyama K, Shioda S. (2013)** Neuroendocrine control of feeding behavior and psychomotor activity by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in vertebrates. *Obes Res Clin Pract*. 7:1-7.
- 190. Matsuyama S, Matsumoto A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A. (2003)** Impaired long-term potentiation in vivo in the dentate gyrus of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) or PACAP type 1 receptor-mutant mice. *Neuroreport*. 14:2095-2098.
- 191. Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC. (1984)** Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest*. 74:1143-1155.

- 192. Mezzano S**, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, et al. (2004) NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 19:2505-2512.
- 193. Milleron RS**, Mutebi JP, Valle S, Montoya A, Yin H, Soong L, et al. (2004) Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 70:286-293.
- 194. Misra HP**, Firdovich I. (1972) The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 247:3170-3175.
- 195. Miyata A**, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, et al. (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 164:567-574.
- 196. Miyata A**, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, et al. (1990) 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*. 170:643-648.
- 197. Mizutani A**, Okajima K, Uchiba M, Noguchi T. (2000) Activated protein C reduces ischaemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood*. 95:3781-3787.
- 198. Mlynarski WM**, Placha GP, Wolkow PP, Bochenski JP, Warram JH, Krolewski AS. (2005) Risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with functional polymorphisms in RANTES receptor gene (CCR5): a sex-specific effect. *Diabetes*. 54:3331-3335.
- 199. Mohny RP**, Siegel RE, Zigmond RE. (1994) Galanin and vasoactive intestinal peptide messenger RNAs increase following axotomy of adult sympathetic neurons. *J Neurobiol*. 25:108-118.
- 200. Moller K**, Zhang YZ, Håkanson R, Luts A, Sjolund B, Uddman R, et al. (1993) Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience*. 57:725-732.
- 201. Moody TW**, Ito T, Osefo N, Jensen RT. (2011) VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 18:61-67.
- 202. Moro O**, Lerner EA. (1997) Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem*. 272:966-970.

- 203. Mulder H, Jongsma H, Zhang Y, Gebre-Medhin S, Sundler F, Danielsen N. (1999)** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and islet amyloid polypeptide in primary sensory neurons: functional implications from plasticity in expression on nerve injury and inflammation. *Mol Neurobiol.* 19:229-253.
- 204. Mulder H, Uddman R, Moller K, Elsås T, Ekblad E, Alumets J, et al. (1995)** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is expressed in autonomic neurons. *Regul Pept.* 59:121-128.
- 205. Mulder H, Uddman R, Moller K, Zhang YZ, Ekblad E, Alumets J, et al. (1994)** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide expression in sensory neurons. *Neuroscience.* 63:307-312.
- 206. Murthy KS, Jin JG, Grider JR, Makhlouf GM. (1997)** Characterization of PACAP receptors and signaling pathways in rabbit gastric muscle cells. *Am J Physiol.* 272:1391-1399.
- 207. Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J. (2005)** Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci.* 25:4052-4061.
- 208. Najafian B, Kim Y, Crosson JT, Mauer M. (2003)** Atubular glomeruli and glomerulotubular junction abnormalities in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 14:908-917.
- 209. Nakata M, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Yada T. (2010)** Intra-islet PACAP protects pancreatic  $\beta$ -cells against glucotoxicity and lipotoxicity. *J Mol Neurosci.* 42:404-410.
- 210. Nakata M, Shioda S, Oka Y, Maruyama I, Yada T. (1999)** Insulinotropin PACAP potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3 L1 cells. *Peptides.* 20:943-948.
- 211. Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, García-Pérez J. (2011)** Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 7:327-340.
- 212. Nedvig K, Wéber Gy, Németh J, Kovács K, Reglódi D, Kemény Á, et al. (2012)** Intestinal autotransplantation using PACAP-38-containing preservation solution. *J Mol Neurosci.* 48:788-794.
- 213. Németh J, Reglódi D, Pozsgai G, Szabó A, Elekes K, Pintér E, et al. (2006)** Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience.* 143:223-230.
- 214. Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Törnwall J, Konttinen YT. (2002)** Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 966:384-399.
- 215. Nilsson SF. (1994)** PACAP-27 and PACAP-38: vascular effects in the eye and some other tissues in the rabbit. *Eur J Pharmacol.* 253:17-25.



- 216. Noguchi K**, De León M, Nahin RL, Senba E, Ruda MA. (1993) Quantification of axotomy-induced alteration of neuropeptide mRNAs in dorsal root ganglion neurons with special reference to neuropeptide Y mRNA and the effects of neonatal capsaicin treatment. *J Neurosci Res.* 35:54-66.
- 217. Nukatsuka M**, Sakurai H, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. (1988) Enhancement by streptozotocin of O<sub>2</sub>- radical generation by the xanthine oxidase system of pancreatic beta-cells. *FEBS Lett.* 239:295-298.
- 218. O'Connor TM**, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. (2004) The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol.* 201:167-180.
- 219. Okada R**, Yamamoto K, Ito Y, Mochida H, Tonon MC, Fournier A, et al. (2007) VIP and PACAP stimulate TSH release from the bullfrog pituitary. *Peptides.* 28:1784-1789.
- 220. Onoue S**, Hanato J, Kuriyama K, Mizumoto T, Yamada S. (2011) Development of PACAP38 analogue with improved stability: physicochemical and in vitro/in vivo pharmacological characterization. *J Mol Neurosci.* 43:85-93.
- 221. Otto C**, Hein L, Brede M, Jahns R, Engelhardt S, Gröne HJ, et al. (2004) Pulmonary hypertension and right heart failure in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *Circulation.* 110:3245-3251.
- 222. Paczek L**, Gaciong Z, Bartłomiejczyk I, Sebekova K, Birkenmeier G, Heidland A. (2001) Protease administration decreases enhanced transforming growth factor-beta 1 content in isolated glomeruli of diabetic rats. *Drugs Exp Clin Res.* 27:141-149.
- 223. Peeters K**, Berghman LR, Vandesande F. (1998) Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the chicken forebrain. *Ann N Y Acad Sci.* 839:417-419.
- 224. Persson K**, Åhrén B. (2002) The neuropeptide PACAP contributes to the glucagon response to insulin-induced hypoglycaemia in mice. *Acta Physiol Scand.* 175:25-28.
- 225. Pincelli C**, Fantini F, Romualdi P, Sevignani C, Lesa G, Benassi L, et al. (1992) Substance P is diminished and vasoactive intestinal peptide is augmented in psoriatic lesions and these peptides exert disparate effects on the proliferation of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 98:421-427.
- 226. Pirger Z**, László Z, Kemenes I, Tóth G, Reglődi D, Kemenes G. (2010) A homolog of the vertebrate pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is both necessary and instructive for the rapid formation of associative memory in an invertebrate. *J Neurosci.* 30:13766-13773.

- 227. Pisi G, Olivieri D, Chetta A.** (2009) The airway neurogenic inflammation: clinical and pharmacological implications. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 8:176-181.
- 228. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC.** (1966) Estimation of product of lipid peroxidation (malondialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem.* 16:359-364.
- 229. Portela-Gomes GM, Lukinius A, Ljungberg O, Efendic S, Ahrén B, Abdel-Halim SM.** (2003) PACAP is expressed in secretory granules of insulin and glucagon cells in human and rodent pancreas. Evidence for generation of cAMP compartments uncoupled from hormone release in diabetic islets. *Regul Pept.* 113:31-39.
- 230. Qi W, Chen X, Zhang Y, Holian J, Mreich E, Gilbert RE, et al.** (2007) High glucose induces macrophage inflammatory protein-3 alpha in renal proximal tubule cells via a transforming growth factor-beta 1 dependent mechanism. *Nephrol Dial Transplant.* 22:3147-3153.
- 231. Qureshi AA, Asahina A, Ohnuma M, Tajima M, Granstein RD, Lerner EA.** (1996) Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am J Trop Med Hyg.* 54:665-671.
- 232. Rácz B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamás A, Józsa R, et al.** (2007) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol.* 153:115-123.
- 233. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK.** (2004) Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. *Prog Brain Res.* 146:433-437.
- 234. Reglódi D.** (2009) A PACAP neuroprotektív és átlános citoprotektív hatásainak vizsgálata in vitro és in vivo modellben. MTA Doktori Értekezés.
- 235. Reglódi D, Börzsei R, Bagoly T, Boronkai A, Rácz B, Tamás A, et al.** (2008) Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J Mol Neurosci.* 36:270-278.
- 236. Reglódi D, Kiss P, Horváth G, Lubics A, László E, Tamás A, et al.** (2012a) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the urinary system, with special emphasis on its protective effects in the kidney. *Neuropeptides.* 46:61-70.
- 237. Reglódi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gábrriel R, Horváth G, et al.** (2012b) PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci.* 48:482-492.
- 238. Reglódi D, Kiss P, Tamás A, Lengvári I.** (2003) The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. *Behav Brain Res.* 140:131-139.

- 239. Rezende** LF, Santos GJ, Carneiro EM, Bodscher AC. (2012) Ciliary Neurotrophic Factor protects mice against Streptozotocin-induced Type I Diabetes through SOCS3: The role of STAT1/STAT3 ratio in  $\beta$ -cell death. *J Biol Chem.* 287:41628-41639.
- 240. Riera** M, Torras J, Cruzado JM, Lloberas N, Liron J, Herrero I, et al. (2001) The enhancement of endogenous cAMP with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat kidney against ischemia through the modulation of inflammatory response. *Transplantation.* 72:1217-1223.
- 241. Robberecht** P, Gourlet P, De Neef P, Woussen-Colle MC, Vandermeers-Piret MC, Vandermeers A, et al. (1992) Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. *Eur J Biochem.* 207:239-246.
- 242. Rogers** KA, Titus RG. (2003) Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol.* 25:127-134.
- 243. Rosivall** L, Kiss I. (2003) Nephrologia: Elmélet és klinikum, dialysis, transplantió. Medintel Kiadó.
- 244. Sacchetti** M, Micera A, Lambiase A, Speranza S, Mantelli F, Petrachi G, et al. (2011) Tear levels of neuropeptides increase after specific allergen challenge in allergic conjunctivitis. *Mol Vis.* 17:47-52.
- 245. Said** SI. (1998) Antiinflammatory actions of VIP in the lungs and airways. Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Peptides. *CRC Press.* 345-361.
- 246. Said** SI. (1982) Vasoactive peptides in the lung, with special reference to vasoactive intestinal peptide. *Exp Lung Res.* 3:343-348.
- 247. Said** SI, Mutt V. (1970) Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science.* 169:1217-1218.
- 248. Said** SI, Rosenberg RN. (1976) Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. *Science.* 192:907-908.
- 249. Sakuma** Y, Ricordi C, Miki A, Yamamoto T, Mita A, Barker S, et al. (2009) Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in islet transplantation. *Transplant Proc.* 41:343-345.
- 250. Sakurai** H, Hisada Y, Ueno M, Sugiura M, Kawashima K, Sugita T. (1996) Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B in experimental glomerulonephritis in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1316:132-138.

- 251. Sakurai Y, Shintani N, Hayata A, Hashimoto H, Baba A.** (2011) Trophic effects of PACAP on pancreatic islets: a mini-review. *J Mol Neurosci.* 43:3-7.
- 252. Sanchez A, Tripathy D, Grammas P.** (2009) RANTES release contributes to the protective action of PACAP38 against sodium nitroprusside in cortical neurons. *Neuropeptides.* 43:315-320.
- 253. Sándor K, Bölcskei K, McDougall JJ, Schuelert N, Reglódi D, Elekes K, et al.** (2009) Divergent peripheral effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38 on nociception in rats and mice. *Pain.* 141:143-150.
- 254. Satchell SC, Tooke JE.** (2008) What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia.* 51:714-725.
- 255. Schäfer H, Zheng J, Gundlach F, Günther R, Siegel EG, Fölsch UR, et al.** (1996) Pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide stimulates proto-oncogene expression and activates the AP-1 (c-Fos/c-Jun) transcription factor in AR4-2J pancreatic carcinoma cells. *Eur J Biochem.* 242:467-476.
- 256. Schytz HW, Holst H, Arendt-Nielsen L, Olesen J, Ashina M.** (2010) Cutaneous nociception and neurogenic inflammation evoked by PACAP38 and VIP. *J Headache Pain.* 11:309-316.
- 257. Schoenfeld LK, Souder JA, Hardwick JC.** (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide innervation of the mudpuppy cardiac ganglion. *Brain Res.* 882:180-190.
- 258. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J.** (1989) Familial clustering of diabetic nephropathy. *N Engl J Med.* 320:1161-1165.
- 259. Sedlak J, Lindsay R.** (1968) Estimation of total protein-bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25:192-205.
- 260. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN.** (1996) Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes.* 45:522-530.
- 261. Shigyo M, Aizawa H, Inoue H, Matsumoto K, Takata S, Hara N.** (1998) Pituitary adenylate cyclase activating peptide regulates neurally mediated airway responses. *Eur Respir J.* 12:64-70.
- 262. Shin GT, Kim SJ, Ma KA, Kim HS, Kim D.** (2000) ACE inhibitors attenuate expression of renal transforming growth factor-beta1 in humans. *Am J Kidney Dis.* 36:894-902.
- 263. Shintani N, Tomimoto S, Hashimoto H, Kawaguchi C, Baba A.** (2003) Functional roles of the neuropeptide PACAP in brain and pancreas. *Life Sci.* 74:337-343.

- 264. Shioda S**, Zhou CJ, Ohtaki H, Yada T. (2003) PACAP receptor signaling. *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*. 95-124.
- 265. Simons CT**, Carstens MI, Carstens E. (2003) Oral irritation by mustard oil: self-desensitization and cross-desensitization with capsaicin. *Chem Senses*. 28:459-465.
- 266. Singh A**, Fridén V, Dasgupta I, Foster RR, Welsh GI, Tooke JE, et al. (2011) High glucose causes dysfunction of the human glomerular endothelial glycocalyx. *Am J Physiol Renal Physiol*. 300:40-48.
- 267. Skofitsch G**, Jacobowitz DM. (1985) Galanin-like immunoreactivity in capsaicin sensitive sensory neurons and ganglia. *Brain Res Bull*. 15:191-195.
- 268. Soares MB**, Titus RG, Shoemaker CB, David JR, Bozza M. (1998) The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol*. 160:1811-1816.
- 269. Springer TA**. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*. 76:301-314.
- 270. Stanton RC**. (2011) Oxidative stress and diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep*. 11:330-336.
- 271. Steffes MW**, Osterby R, Chavers B, Mauer SM. (1989) Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. *Diabetes*. 38:1077-1081.
- 272. Story GM**, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, et al. (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 112:819-829.
- 273. Stout LC**, Kumar S, Whorton EB. (1994) Insudative lesions-their pathogenesis and association with glomerular obsolescence in diabetes: a dynamic hypothesis based on single views of advancing human diabetic nephropathy. *Hum Pathol*. 25:1213-1227.
- 274. Sun W**, Hong J, Zang YC, Liu X, Zhang JZ. (2006) Altered expression of vasoactive intestinal peptide receptors in T lymphocytes and aberrant Th1 immunity in multiple sclerosis. *Int Immunol*. 18:1691-1700.
- 275. Sun W**, Tadmori I, Yang L, Delgado M, Ganea D. (2000) Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits TGF-beta1 production in murine macrophages. *J Neuroimmunol*. 107:88-99.
- 276. Sun YM**, Su Y, Li J, Wang LF. (2013) Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 433:359-361.

- 277. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP.** (2006) Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 55:225-233.
- 278. Svensjö E, Saraiva EM, Bozza MT, Oliveira SM, Lerner EA, Scharfstein J.** (2009) Salivary gland homogenates of *Lutzomyia longipalpis* and its vasodilatory peptide maxadilan cause plasma leakage via PAC1 receptor activation. *J Vasc Res*. 46:435-446.
- 279. Svensjö E, Saraiva EM, Amendola RS, Barja-Fidalgo C, Bozza MT, Lerner EA, et al.** (2012) Maxadilan, the *Lutzomyia longipalpis* vasodilator, drives plasma leakage via PAC1-CXCR1/2-pathway. *Microvasc Res*. 83:185-193.
- 280. Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglődi D, Szabó A, Kovács K, et al.** (2012) Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell Tissue Res*. 348:37-46.
- 281. Szabó A, Dányádi B, Bognár E, Szabadfi K, Fábrián E, Kiss P, et al.** (2012) Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neurosci Lett*. 523:93-98.
- 282. Szakály P, Horváth G, Kiss P, László E, Farkas J, Fürjes G, et al.** (2010) Changes in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide following renal ischemia-reperfusion in rats. *Transplant Proc*. 42:2283-2286.
- 283. Szakály P, Kiss P, Lubics A, Magyarlaki T, Tamás A, Rác B, et al.** (2008) Effects of PACAP on survival and renal morphology in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci*. 36:89-96.
- 284. Szema AM, Hamidi SA, Lyubsky S, Dickman KG, Mathew S, Abdel-Razek T, et al.** (2006) Mice lacking the VIP gene show airway hyperresponsiveness and airway inflammation, partially reversible by VIP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 291:880-886.
- 285. Szkudelski T.** (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 50:537-546.
- 286. Szolcsányi J, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J, Pintér E.** (1998a) Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br J Pharmacol*. 123:936-942.
- 287. Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Oroszi G, Németh J.** (1998b) Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol*. 125:916-922.
- 288. Szolcsányi J.** (1984) Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation* (szerk.: Chahl LA, Szolcsányi J, Lembeck F), pp. 27-53, Akadémiai Kiadó, Budapest.

- 289. Szolcsányi J.** (1988) Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents Actions*. 23:4-11.
- 290. Szolcsányi J.** (1996) Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog Brain Res*. 113:343-359.
- 291. Taft JL, Nolan CJ, Yeung SP, Hewitson TD, Martin FI.** (1994) Clinical and histological correlations of decline in renal function in diabetic patients with proteinuria. *Diabetes*. 43:1046-1051.
- 292. Tang SC.** (2010) Diabetic nephropathy: a global and growing threat. *Hong Kong Med J*. 16:244-245.
- 293. Tanida M, Shintani N, Morita Y, Tsukiyama N, Hatanaka M, Hashimoto H, et al.** (2010) Regulation of autonomic nerve activities by central pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Regul Pept*. 161:73-80.
- 294. Teresiak-Mikolajczak E, Czarnecka-Operacz M, Jenerowicz D, Silny W.** (2013) Neurogenic markers of the inflammatory process in atopic dermatitis: relation to the severity and pruritus. *Postepy Dermatol Alergol*. 30:286-292.
- 295. Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, et al.** (2010) Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 21:556-563.
- 296. Tien XY, Wallace LJ, Kachur JF, Won-Kim S, Gaginella TS.** (1991) Neurokinin A increases short-circuit current across rat colonic mucosa: a role for vasoactive intestinal polypeptide. *J Physiol*. 437:341-350.
- 297. Titus RG, Bishop JV, Mejia JS.** (2006) The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol*. 28:131-141.
- 298. Tornoe K, Hannibal J, Fahrenkrug J, Holst JJ.** (1997) PACAP-(1-38) as neurotransmitter in pig pancreas: receptor activation revealed by the antagonist PACAP-(6-38). *Am J Physiol*. 273:436-446.
- 299. Tornoe K, Hannibal J, Georg B, Schmidt PT, Hilsted L, Fahrenkrug J, et al.** (2001) PACAP 1-38 as neurotransmitter in the porcine antrum. *Regulatory Peptides*. 101:109-121.
- 300. Tsutsumi M, Claus TH, Liang Y, Li Y, Yang L, Zhu J, et al.** (2002) A potent and highly selective VPAC2 agonist enhances glucose-induced insulin release and glucose disposal: a potential therapy for type 2 diabetes. *Diabetes*. 51:1453-1460.

- 301. Tunçdemir M, Oztürk M.** (2011) The effects of angiotensin-II receptor blockers on podocyte damage and glomerular apoptosis in a rat model of experimental streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Acta Histochem.* 113:826-832.
- 302. Usdin TB, Bonner TI, Mezey E.** (1994) Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology.* 135:2662-2680.
- 303. Usuki S, Tsai YY, Morikawa K, Nonaka S, Okuhara Y, Kise M, et al.** (2011) IGF-1 induction by acylated steryl  $\beta$ -glucosides found in a pre-germinated brown rice diet reduces oxidative stress in streptozotocin-induced diabetes. *PLoS One.* 6:28693.
- 304. Van Geldre LA, Lefebvre RA.** (2004) Interaction of NO and VIP in gastrointestinal smooth muscle relaxation. *Curr Pharm Des.* 10:2483-2497.
- 305. Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, et al.** (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev.* 61:283-357.
- 306. Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H.** (1982) Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet.* 1:1430-1432.
- 307. Wallengren J.** (1997) Vasoactive peptides in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2:49-55.
- 308. Wang ZY, Alm P, Håkanson R.** (1995) Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rabbit eye. *Neuroscience.* 69:297-308.
- 309. Wang ZY, Waldeck K, Grundemar L, Håkanson R.** (1997) Ocular inflammation induced by electroconvulsive treatment: contribution of nitric oxide and neuropeptides mobilized from C-fibres. *Br J Pharmacol.* 120:1491-1496.
- 310. Warren JB, Donnelly LE, Cullen S, Robertson BE, Ghatgei MA, Bloom SR, et al.** (1991) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a novel, long-lasting, endothelium-independent vasorelaxant. *Eur J Pharmacol.* 197:131-134.
- 311. Wei H, Chapman H, Saarnilehto M, Kuokkanen K, Koivisto A, Pertovaara A.** (2010) Roles of cutaneous versus spinal TRPA1 channels in mechanical hypersensitivity in the diabetic or mustard oil-treated non-diabetic rat. *Neuropharmacology.* 58:578-584.
- 312. WHO/NCD/NCS/99.2.** (1999) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, *World Health Organization.*



- 313. Winzell MS, Ahrén B.** (2007) Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides*. 28:1805-1813.
- 314. Wojcieszak J, Zawilska JB.** (2014) PACAP38 and PACAP6-38 Exert Cytotoxic Activity Against Human Retinoblastoma Y79 Cells. *J Mol Neurosci*. [In press]
- 315. Wolf G.** (2013) Diabetes and kidney disease. Wiley-Blackwell.
- 316. Wolf G, Ziyadeh FN.** (1997) The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: Emphasis on nonhemodynamic mechanisms. *Am J Kidney Dis*. 29:153-163.
- 317. Wolf G, Ziyadeh FN.** (2007) Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol*. 106:26-31.
- 318. Woo D.** (1995) Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Engl J Med*. 333:18-25.
- 319. Yada T, Nakata M, Shioda S.** (2000a) Insulinotropin PACAP potentiates insulin action. Stimulation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 921:473-477.
- 320. Yada T, Sakurada M, Filipsson K, Kikuchi M, Ahrén B.** (2000b) Intraperitoneal PACAP administration decreases blood glucose in GK rats, and in normal and high fat diet mice. *Ann N Y Acad Sci*. 921:259-263.
- 321. Yada T, Sakurada M, Ihida K, Nakata M, Murata F, Arimura A, et al.** (1994) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is an extraordinarily potent intra-pancreatic regulator of insulin secretion from islet beta-cells. *J Biol Chem*. 269:1290-1293.
- 322. Yada T, Sakurada M, Ishihara H, Nakata M, Shioda S, Yaekura K, et al.** (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is an islet substance serving as an intra-islet amplifier of glucose-induced insulin secretion in rats. *J Physiol*. 505:319-328.
- 323. Yamada H, Watanabe M, Yada T.** (2004) Cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses to sub-picomolar and nanomolar PACAP in pancreatic beta-cells are mediated by VPAC2 and PAC1 receptors. *Regul Pept*. 123:147-153.
- 324. Yamagishi S, Matsui T.** (2010) Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid. Med. Cell Longev*. 3:101-108.
- 325. Yamamoto K, Hashimoto H, Tomimoto S, Shintani N, Miyazaki J, Tashiro F, et al.** (2003) Overexpression of PACAP in transgenic mouse pancreatic beta-cells enhances insulin secretion and ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. 52:1155-1162.
- 326. Yi CX, Sun N, Ackermans MT, Alkemade A, Foppen E, Shi J, et al.** (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates glucose production via the hepatic sympathetic innervation in rats. *Diabetes*. 59:1591-1600.

- 327. Yon L**, Feuilleley M, Chartrel N, Arimura A, Conlon JM, Fournier A, et al. (1992) Immunohistochemical distribution and biological activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*. *J Comp Neurol.* 324:485-489.
- 328. Yu R**, Yi T, Xie S, Hong A. (2008) Long-term administration of maxadilan improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice. *Peptides.* 29:1347-1353.
- 329. Zandi-Nejad K**, Eddy AA, Glasscock RJ, Brenner BM. (2004) Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease? *Kidney Int Suppl.* 92:76-89.
- 330. Zhang Y**, Malmberg AB, Yaksh TL, Sjölund B, Sundler F, Håkanson R. (1997) Capsaicin-evoked release of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) from rat spinal cord in vivo. *Regul Pept.* 69:83-87.
- 331. Zhang YZ**, Hannibal J, Zhao Q, Moller K, Danielsen N, Fahrenkrug J, et al. (1996) Pituitary adenylate cyclase activating peptide expression in the rat dorsal root ganglia: up-regulation after peripheral nerve injury. *Neuroscience.* 74:1099-1110.
- 332. Zhou C**, Yool AJ, Nolan J, Byard RW. (2013) Armani-Ebstein Lesions: A Need for Clarification. *J Forensic Sci.* 1:94-98.
- 333. Zhu L**, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE, et al. (2003) The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *J Biol Chem.* 278:22418-22423.
- 334. Ziyadeh FN**, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, et al. (2000) Long term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression and glomerular mesangial matrix expression by treatment with monoclonal anti-TGF-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:8015-8020.

## **Publikációs lista**

### **Az értekezés alapjául szolgáló publikációk**

**Bánki E**, Degrell P, Kiss P, Kovács K, Kemény Á, Csanaky K, Düh A, Nagy D, Tóth G, Tamás A, Reglődi D. (2013) Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides*. 42:125-130. (IF:2,522)

**Bánki E**, Kovács K, Nagy D, Juhász T, Degrell P, Csanaky K, Kiss P, Jancsó G, Tóth G, Tamás A, Reglődi D. (2014) Molecular mechanisms underlying the nephroprotective effects of PACAP in diabetes. *J Mol Neurosci*. DOI: 10.1007/s12031-014-0249-z [Közlésre elfogadva] (IF:2,891)

**Bánki E**, Hajna Zs, Kemény Á, Nagy P, Bölcskei K, Tóth G, Reglődi D, Helyes Zs. PAC1 receptor mediates the inhibitory action of PACAP on the vascular changes of neurogenic inflammation. [Közlésre elküldve]

### **Egyéb publikációk**

Csanaky K, Reglődi D, **Bánki E**, Tarcai I, Márk L, Helyes Z, Ertl T, Gyarmati J, Horváth K, Sántik L, Tamás A. (2013) Examination of PACAP38-like immunoreactivity in different milk and infant formula samples. *Acta Physiol Hung*. 100:28-36. (IF:0,882)

Szántó Z, Sárszegi Z, Reglődi D, Németh J, Szabadfi K, Kiss P, Varga A, **Bánki E**, Csanaky K, Gaszner B, Pintér O, Szalai Z, Tamás A. (2012) PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J Mol Neurosci*. 48:667-673. (IF:2,891)

Csanaky K, **Bánki E**, Szabadfi K, Reglődi D, Tarcai I, Czeglédi L, Helyes Z, Ertl T, Gyarmati J, Szántó Z, Zapf I, Sipos E, Shioda S, Tamás A. (2012) Changes in PACAP immunoreactivity in human milk and presence of PAC1 receptor in mammary gland during lactation. *J Mol Neurosci*. 48:631-637. (IF:2,891)

Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglődi D, Szabó A, Kovács K, Szalontai B, Sétáló G Jr, **Bánki E**, Csanaky K, Tamás A, Gábrriel R. (2012) Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell Tissue Res*. 348:37-46. (IF:3,677)

Reglődi D, Gyarmati J, Ertl T, Börzsei R, Bódis J, Tamás A, Kiss P, Csanaky K, **Bánki E**, Bay C, Németh J, Helyes Z. (2010) Alterations of pituitary adenylate cyclase-activating

polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *J Endocrinol Invest.* 33:443-445. (IF:1,476)

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. (2009) Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur J Endocrinol.* 160:561-565. (IF:3,539)

Tudományos közlemények összesített impakt faktora: **20,769**

### **Idézhető előadáskivonatok**

**Bánki E**, Düh A, Nagy D, Csanaky K, Kovács K, Kiss P, Tamás A, Degrell P, Hashimoto H, Reglődi D. (2013) Examination of the role of endogenous PACAP in diabetic nephropathy. *J Mol Neurosci.* 51(Suppl1):208-209.

**Bánki E**, Kovács K, Nagy D, Kiss P, Berta G, Degrell P, Szabadfi K, Atlasz T, Juhász T, Tóth G, Tamás A, Düh A, Csanaky K, Reglődi D. (2013) Molecular mechanisms underlying the nephroprotective effects of PACAP in diabetes. *J Mol Neurosci.* 51(Suppl1):188.

**Bánki E**, Pákai E, Balogh R, Tamás A, Reglődi D, Hashimoto H, Tóth G, Garami A. (2013) Dual role of PACAP in the regulation of body temperature. *J Mol Neurosci.* 51(Suppl1):216-217.

**Bánki E**, Sosnowska D, Gautam T, Tarantini S, Csiszár A, Tóth G, Tamás A, Reglődi D, Ungvári Z. (2013) PACAP exerts pro-angiogenic effects: possible role of decreased PACAP expression in impaired endothelial angiogenic capacity in aging. *J Mol Neurosci.* 51(Suppl1):225.

Nagy D, **Bánki E**, Csanaky K, Düh A, Kovács K, Kemény Á, Kiss P, Tamás A, Degrell P, Szakály P, Jancsó G, Tóth G, Reglődi D. (2013) Examination of the protective effects of PACAP in rat diabetic nephropathy. *J Mol Neurosci.* 51(Suppl1):188-189.

Sághy É, Szőke É, **Bánki E**, Reglődi D, Tóth G, Couvineau A, Helyes Zs. (2013) Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide and its analogues activate the specific pac1 and vpac1/vpac2 receptors on the cell bodies of primary sensory neurons and transfected cell lines. *J Mol Neurosci.* 51(Suppl 1):204-205.

Tamás A, Helyes Zs, Börzsei R, Márk L, Bagoly T, Bay Cs, Gyarmati J, Ertl T, Bódis J, Csanaky K, **Bánki E**, Kiss P, Váczy A, Horváth G, Németh J, Szauer E, Reglődi D. (2010) PACAP-38 in human plasma and milk under physiological and pathological conditions: introductory measurements for possible future clinical diagnostic application. *J Mol Neurosci.* 42:293-294.

Szabadfi K, Atlasz T, **Bánki E**, Csanaky K, Kiss P, Reglődi D, Gonezi P, Szabó A, Mester L, Sétáló Gy, Jakab F, Gábrriel R. (2010) Effects of PACAP in streptozotocin-induced rat model of diabetic retinopathy. *J Mol Neurosci.* 42:305.

Szabadfi K, **Bánki E**, Csanaky K, Kiss P, Reglődi D, Griecs M, Szabó A, Kovács K, Sétáló Gy, Juhász B, Varga B, Berkics B, Gábrriel R, Atlasz T. (2010) Ameliorative potential of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in streptozotocin-induced type I diabetic retinopathy in rats. *Neuropeptides* 44:544.

Reglődi D, Kiss P, Szabadfi K, Rácz B, Horváth G, Farkas J, **Bánki E**, Csanaky K, Gaal V, Lubics A, Tamás A, Gábrriel R, Atlasz T. (2010) Review of the retinoprotective effects of PACAP. *J Mol Neurosci.* 42:282-283.

Kiss P, Csanaky K, **Bánki E**, Tamás A, Börzsei R, Márk L, Bagoly T, Bay C, Váczy A, Horváth G, Németh J, Czeglédi L, Szauer E, Helyes Z, Reglődi D. (2010) Presence of PACAP-38 in mammalian plasma and milk: From guinea pig to humans. *Acta Physiol Hung.* 97:115.

## **Köszönetnyilvánítás**

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Reglódi Dórának, aki TDK-s koromtól kezdve irányította és támogatta kutatási munkámat, és akinek kitartása és szakmai tudása mindig példaképp állt előttem, valamint Dr. Tamás Andreának, aki hasonlóképpen segítette és támogatta kutatómunkámat kezdettől fogva.

Köszönet illeti Dr. Csernus Valér professzor urat, az Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola programvezetőjét.

Hálás vagyok Dr. Degrell Péternek, hogy precizitásával és szakmai tudásával példát mutatott, és bevezetett a vesepatológia világába. Köszönöm Dr. Helyes Zsuzsannának, hogy a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben dolgozhattam, és hogy fáradhatatlanságával, kitartásával és szakmai hozzáértésével példát mutatott nekem.

Köszönöm Dr. Kiss Péternek, hogy kezdettől fogva segítette állatkísérletes munkáimat. Dr. Kovács Krisztinának és Dr. Juhász Tamásnak köszönöm a molekuláris biológiai vizsgálatokban nyújtott segítségüket.

Külön köszönöm Dr. Csanaky Katalin szakmai segítségét, és hogy támogatásával, tanácsaival nagymértékben hozzájárult kutatásaim eredményességéhez.

Köszönet illeti dr. Hajna Zsófiát a lézer Doppler, Bagoly Terézt a radioimmunoassay mérésekben, illetve dr. Nagy Pétert az intravitális mikroszkóp használatában nyújtott segítségéért. Köszönöm Dr. Kemény Ágnesnek a Luminex Multiplex Immunoassay mérés, valamint a neurogén gyulladás vizsgálata során nyújtott segítségét. Hasonlóképpen köszönöm Dr. Jancsó Gábornak és Fajtik Csillának az oxidatív stresszmarkerek meghatározásában való segítségüket. Hálásan köszönöm Önböli Gyuláné, Dóri segítőkészségét, lelkesítő hozzáállását és támogatását. Szintén köszönettel tartozom Bolboaca Alinának kiváló szövettani munkájáért.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani az Anatómiai, illetve Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi dolgozójának a kísérleteim során nyújtott segítségért.