

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

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Bánki Eszter Márta

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet

Témavezetők: Dr. Reglődi Dóra, Dr. Tamás Andrea
Programvezető: Dr. Csernus Valér

2014

Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A hormont Arimura professzor és kutatócsoportja izolálta birka hypothalamusból a patkány hypophysis sejt kultúráján kifejtett adenilát cikláz-aktiváló hatása révén. A hormon a vazóaktív intesztinális peptid (VIP)/ szekretin/ glükagon peptidcsalád tagja, 27 és a 38 aminosav hosszúságú formái ismertek. Hatásait speciális G-proteinhez kötött receptorokon keresztül fejti ki. Specifikus receptora a PAC1 receptor, míg a VPAC1 és VPAC2 receptorok azonos affinitással kötik a PACAP-ot és a VIP-t.

A PACAP központi idegrendszeri expressziója mellett a perifériás idegrendszerben a spinális ganglionok kis érzőidegsejtjei, illetve a vegetatív pre- és posztganglionáris neuronok is tartalmaznak PACAP-ot. Ezenfelül megtalálható a peptid az endokrin mirigyekben, így az endokrin hasnyálmirigyben is, illetve a gasztrointesztinális, a kardiovaszkuláris és a légzőrendszerben, továbbá az urogenitális traktus területén is a vesétől egészen az urethráig.

A PACAP pleiotróp és multifunkcionális neuropeptid, neurotrófikus és neuroprotektív hatását széles körben tanulmányozzák. Endokrin hatásai is bizonyítottak, így például szabályozza a pancreas inzulintermelését is. Potens vazodilatátor és bronchodilatátor, és szerepet játszik számos élettani folyamat szabályozásában. Számos szövetben és sejten kimutatták az endogén és az exogén PACAP általános citoprotektív hatását, melyet apoptotikus és inflammatorikus folyamatok gátlása révén ér el.

A PACAP anti- és proinflammatorikus faktorok regulációja révén kiváltott immunmodulációs hatását számos vizsgálatban igazolták nem neurogén gyulladás esetén. Ez a mechanizmus jelentős mértékben hozzájárul a PACAP protektív hatásához számos betegség, így diabetes mellitus, septicus shock, stroke, sclerosis multiplex és colitis esetén is. A szintén részben gyulladásszerű patomechanizmusú diabeteses nephropathia esetén azonban még csak rövidtávú, két hétig fennálló diabetes esetén vizsgálták a PACAP protektív hatását.

Hasonlóképp ismert a PACAP antiinflammatorikus hatása neurogén gyulladás esetén is, azonban a hatás hátterében álló pontos receptorális mechanizmus nem ismert.

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

BEVEZETÉS

1. 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.

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 diabeteses betegek 30-40%-ában alakul csak ki vesekárosodás.

A betegség kialakulásához a metabolikus tényezők mellett hemodinamikai faktorok is hozzájárulnak, így például a renin-angiotenzin-aldoszteron (RAAS) rendszer aktiválódása. Ezen folyamatok következtében intraglomeruláris hipertenzió alakul ki, amely az alábbi molekuláris mechanizmusok beindulásához vezet:

- (1) Oxidatív stressz
- (2) A glikációs végtermékek (AGE) túlermelődése
- (3) Apoptózis
- (4) A prosklerotikus növekedési faktorok túlermelődése
- (5) A proinflammatorikus citokinek felszabadulása következtében kialakuló gyulladás

A diabeteses nephropathia szövettani elváltozásai

A diabeteses nephropathia nemzetközileg elfogadott patológiai klasszifikációját Tervaert és munkatársai írták le. Az I. stádiumba azon eltérések tartoznak, amelyek esetében csak elektronmikroszkópos elváltozás, a glomeruláris bazálmembrán (GBM) megvastagodása figyelhető meg. A II. stádium a mezangiális mátrix expanziójával jellemezhető, míg a III. stádium diagnosztikai kritériuma a legalább egy glomerulusban megjelenő nodularis sclerosis, azaz Kimmelstiel-Wilson lézió. A IV. stádiumba az előrehaladott, végstádiumú diabeteses glomerulosclerosis mutató elváltozások tartoznak.

Ezen felül az endothelsejtek károsodása, valamint a podocyták apoptózisa, leválása, lábnyúlványaik ellapulása és fúziója kiemelkedő fontosságú a diabeteses nephropathia kialakulása és progressziója szempontjából. A tubulusok is károsodnak, bazálmembránjuk megvastagodik, intersticiális fibrosis és tubuláris atrophia alakulhat ki. Szintén jellemző a renális arteriolák hyalinosisa.

2. A PACAP szerepe a szénhidrátháztartás szabályozásában

A PACAP termelődését igazolták a Langerhans-szigetekben, felszabadul az inzulintermelő β -sejtekből, valamint kimutatták a jelenlétét az α -sejtek szekréción granulumában is. Más szervekhez hasonlóan a hasnyálmirigyben is a PACAP 38 aminosav hosszúságú formája dominál. A PACAP endokrin funkciójának szempontjából a hasnyálmirigyben a PAC1 és a VPAC2 receptorok expressziójának van jelentősége. A peptid 27 és 38 aminosavas formája a leghatásosabb inzulinotróp peptid közé tartozik. A PACAP serkenti a β -sejtek proliferációját is. Az előzőekben említett előnyös hatásai mellett a PACAP fokozza az adipocyták inzulin-érzékenységét is, és védi a β -sejteket a glükó- és lipotoxicitás ellen. Mindezek ellenére azonban egy humán vizsgálat szerint a peptid intravénás infúziójának hatására a vércukorszint nem változik, melynek hátterében a megnövekedett glükagon-, illetve adrenalin-felszabadulás, a PACAP hatására történő fokozott táplálékfelvétel és a hepatikus glükózprodukción fokozódása állhat. Más vizsgálatok szerint azonban streptozotocin-indukált diabetes esetén alacsonyabb az egerek vércukorszintje, amelyek β -sejtjei overexpresszálják a PACAP-ot, illetve intraperitoneális PACAP-kezelés hatására csökken a patkányok vérglükóz-koncentrációja.

3. A PACAP renális hatásai

Tömegspektrometriás és radioimmunoassay módszerrel is igazolták a PACAP jelenlétét a vesében, mind a cortexben, mind pedig a medullában a PACAP-38 dominál. A PAC1 és VPAC1 receptorok expresszálódnak a tubulussejteken, míg a VPAC2 receptorok csak a veseereken. Vazodilatatív hatása a vesében is érvényesül, azonban *in vitro* körülmények között a PAC1 receptor aktivációja serkenti a reninszekréción. A PACAP renoprotektív hatását számos *in vitro* és *in vivo* modellben igazolták, így myeloma multiplexhez társuló, ciszplatin- és gentamicin-indukált, valamint ischaemia/reperfúzió hatására kialakuló vesekárosodás esetén.

CÉLKITŰZÉS

PhD munkám első részében az exogén PACAP-38-kezelés hatását vizsgáltuk 8 hetes diabeteses nephropathia patkánymodelljében. Ezt követően a PACAP-38 nephroprotektív hatásához vezető molekuláris mechanizmusokat, azaz a peptid gyulladásos, apoptotikus és proszklerotikus folyamatokra, valamint oxidatív stresszre kifejtett hatását térképeztük fel.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Kísérleteinket 250-300 grammos hím Wistar patkányokon (n=33) végeztük, melyeket 12 órás világos-sötét ciklusban igény szerinti táplálék- és folyadékellátás mellett tartottunk. 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 állatok 4 csoportja az alkalmazott kezelések szerint a következő volt:

- 1) kontroll (fiziológiás sóoldat intravénásan (i.v.) és intraperitoneálisan (i.p.), n=10)
- 2) PACAP-38-kezelt kontroll (fiziológiás sóoldat i.v., 20 µg PACAP-38 i.p. minden második nap, 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, n=10).

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

A patkányok testtömegét és vércukorszintjét a kísérlet előtt, valamint a 8 hetes kísérlet időtartama alatt hetente mértük. A vércukormérés a farokvénából vett vérből automata vércukormérő segítségével történt.

Az állatokat 8 hét elteltével izofluránnal túlaltattuk, majd veséiket eltávolítottuk, és a vesék tömegét meghatároztuk.

2. A vesék fénymikroszkópos szövettani és morfológiai analízise

A vesékből 4%-os puffertelt formalinnal történő fixálást követően rotatoros mikrotommal 5 µm vékony sorozatmetszeteket készítettünk. A metszeteken hematoxilín-eozin (HE) festést és perjódsav-Schiff (PAS) reakciót, valamint PAS-és emésztett-PAS reakciót végeztünk, és digitális felvételeket készítettünk. A tubulopathia kvantifikálásának érdekében a tubuláris glikogéngranulomok mennyiségét, míg a glomerulopathia esetében az intraglomeruláris PAS-pozitív terület kiterjedtségét határoztuk meg. A vizsgálni kívánt terület kijelölése Adobe Photoshop CS6 programmal, a kijelölt terület nagyságának meghatározása Scion Image program segítségével történt. Az arteriolaris hyalinosis mértékét hematoxilín-eozin (HE)-festett metszeteken értékeltük 0-4-ig terjedő pontrendszer segítségével.

3. A vesék elektronmikroszkópos vizsgálata

A vese kéregállományának 5-5 darab 1 mm³ nagyságú részét 5%-os glutaraldehidben 24 órán át +4°C-n fixáltuk, majd utófixáláshoz a mintákat 1% ozmium-tetroxidban inkubáltuk 1 órán át +4°C-n. Dehidrációt követően

intermedierként propilén-oxidot használtunk 2x15 percig, és 1 órán át 1:1 arányú propilén-oxid-műgyantában, majd infralámpás melegítés mellett 1 órán át műgyantában (Durcupan A+B+C+D) inkubáltuk a mintákat, melyeket végül zselatin kapszulákba, Durcupan műgyanta keverékbe ágyaztuk.

Ultramikrotómmal (LKB Type 4801) félvékony metszeteket készítettünk, és a metszeteket toluidinkékkel megfestettük. Ezen metszetekből a számunkra érdekes területeket kiválasztottuk, és ezekből ultravékony metszeteket készítettünk (Leica Ultracut R), melyeket uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztoltunk. Elektronmikroszkópos vizsgálataink során a bazálmembrán vastagságát, valamint a podocyta morfológiáját vizsgáltuk JEOL 1200 EX-II elektronmikroszkóppal. A bazálmembrán vastagságának meghatározása során 50.000-szeres nagyítással készült felvételeken az endothelsejtet és a podocyta-lábnyúlványok membránját összekötő merőleges szakasz hosszát mértük nanométerben Adobe Photoshop CS6 program segítségével.

4. A PACAP-38 nephroprotektív hatásmechanizmusának vizsgálata

A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz szükséges vesemintákat a vese felső pólusához közeli kéregállományból vettük, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd további feldolgozásig -80°C -on tároltuk.

4.1. Gyulladásos citokinek és adhéziós molekulák vizsgálata patkány citokin array kit és Luminex Multiplex Immunoassay segítségével

A citokinek renális expresszióját a vesehomogenizátumokon végzett patkány citokin array kit (R&D Systems) segítségével szemikvantitatív módon határoztuk meg. Az array a következő citokinek vizsgálatára terjedt ki: citokin-indukált neutrofil kemoattraktáns (CINC) -1, $-2\alpha/\beta$, -3, ciliáris neurotrófikus faktor (CNTF), fraktalkin, granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF), szolubilis intercelluláris adhéziós molekula (sICAM)-1, interferon(IFN) γ , interleukin(IL)- 1α , -1β , $-1ra$, -2, -3, -4, -6, -10, -13, -17, IFN γ -indukált protein(IP)-10, lipopoliszacharid-indukált cisztein-X-cisztein kemokin (LIX), L-szelektin, IFN γ -indukált monokin (MIG), makrofág gyulladásos protein(MIP)- 1α , -3α , normál T-sejt által regulált, expresszált és szekretált citokin (RANTES), thymus kemokin, szöveti metalloproteináz inhibitor(TIMP)-1, tumor nekrozis faktor(TNF) α és vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF). Az előkészített vesemintákat PBS-ben homogenizáltuk proteáz inhibitor koktéll hozzáadásával, majd 1% Triton X-100-at adtunk a mintákhoz, és 15 μl biotinilált antitesttel 1 órán át inkubáltuk. A nitrocellulóz membrán blokkolását követően a biotinilált antitesttel inkubált homogenizátum 1,5 ml-ét a membránra pipettáztuk, majd egy éjszakai inkubációt követően tormagyökér peroxidázzal konjugált streptavidinnel inkubáltuk a membránt, végül a filmet kemilumineszcens módon előhívtuk. A kiértékelés során az immunpozitivitás pixeldenzitását ImageJ 1.40 szoftver segítségével mértük.

Luminex Multiplex Immunoassay módszerrel az sICAM-1 és L-szelektin szintjét határoztuk meg Fluorokine MAP Rat Base Kit segítségével. A vizsgálatot Luminex

100 eszközzel végeztük, a median fluoreszcens intenzitás meghatározása Luminex 100 IS szoftverrel történt. A mintákat 1% proteáz-inhibitor koktélt tartalmazó RPMI-1640-ban homogenizáltuk. A minták (20 mg/ml), valamint a standard 50 µl-ét 96-lyukú lemezre pipettáztuk, melyek 50 µl antitesttel bevont gyöngyöt tartalmaztak. Biotinilált szekunder antitestet és streptavidin-PE-t, majd az utolsó mosást követően 100 µl puffert adtunk minden wellhez. Inkubációt követően a lemezt Luminex 100 array reader segítségével leolvastuk. Az adatok elemzését MasterPlex szoftverrel végeztük. Az eredményeket pg/g nedves szövet mértékegységben fejeztük ki.

4.2. Kvantitatív real-time („valós idejű”) polimeráz lánreakció (qRT-PCR)

A kollagén IV expressziójának meghatározása a *Col4a1A* primer segítségével történt, belső kontrollként aktint (*Actb*) használtunk. 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 optikai denzitás mérését ImageJ 1.40 szoftver segítségével végeztük, és az értékeket aktinra normalizáltuk.

4.3. Western blot

A vese kéregállományából származó mintákat 100 µl 50 mM-os Tris-HCl-et tartalmazó jéghideg pufferben homogenizáltuk, és proteáz inhibitor keveréket adtunk hozzá. Az SDS–poliakrilamid gélelektroforézist követően a mintákat Protran nitrocellulóz membránra blottoltuk. Blokkolás után a membránokat 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, anti-kollagén IV (1:400) és anti-aktin (1:10000). Ezután kecske anti-nyúl (1:3000) vagy anti-egér (1:1500) tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltunk fél órán keresztül. Az antigén-antitest komplexek vizualizálása erősített kemilumineszcencia segítségével történt. A pixeldenzitást ImageJ 1.40 program segítségével mértük.

4.4. Biokémiai assay a malondialdehid (MDA), glutation (GSH) és szuperoxid-dizmutáz (SOD) szintjének meghatározására

A malondialdehid szintjének mérése során a vesehomogenizátumokhoz telített tiobarbiturát 10% perklorásvanban (TBA) –20% triklóracetát reagenst adtunk, majd 20 perces 100°C-on történő inkubációt követően a mintákat jéghideg vízbe helyeztük, és lecentrifugáltuk. Az MDA koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg 532 nm-en, és az értékeket µmol/g szövetre adtuk meg.

A glutation szintjének meghatározásához a mintákhoz 10%-os triklórecetsavat adtunk, majd centrifugálást követően 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-nitrobenzoésav (DTNB) hozzáadását követően 412 nm-en fotométráltuk. A renális GSH-koncentrációt standardgörbe alapján µmol/g-ban határoztuk meg.

A renális szuperoxid-dizmutáz meghatározása során a vesehomogenizátumokat centrifugáltuk, majd a felülúszóból 480 nm-en mértük a SOD által gátolt adrenalin-adrenokróim átalakulást, melyből kiszámítható a SOD koncentrációja. A kapott értékeket IU/g szövettömegre adtuk meg.

5. 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 értéke kisebb volt, mint 0,05.

EREDMÉNYEK

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

A kísérlet megkezdése előtt a patkányokban mért eseti glükózsint 5,6-7,8 mmol/l között volt. 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.

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 diabeteses állatok súlycsökkenése enyhébb volt ugyan, de a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

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. A PACAP-38-kezelés szignifikáns mértékben nem csökkentette a diabetes hatására megnövekedett vesetömeg-testtömeg arányt.

2. Szövetteni eredmények

2.1. A PACAP-38-kezelés hatása a diabetes-indukált glomeruláris elváltozásokra

A kontroll állatok veséinek szövettani vizsgálata során ép glomeruláris szerkezetet figyeltünk meg, amelyben a 8 hetes PACAP-38-kezelés nem eredményezett változást. A diabeteses állatok veséi a diabeteses glomerulopathia jellegzetes elváltozásait mutatták mezangiális mátrix expanzióval és a glomeruláris bazálmembrán megvastagodásával. Ezen eltérések együttes következménye az intraglomeruláris PAS-pozitív terület felszaporodása, mely a glomerulopathia kvantifikálására alkalmas mutató. PACAP-38 hatására szignifikánsan kisebb mértékű glomeruláris károsodást figyeltünk meg, az intraglomeruláris PAS-pozitív terület nagysága a kontroll minták értékével egyezett meg.

2.2. A PACAP-38-kezelés hatása a diabetes-indukált tubuláris elváltozásokra

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

A diabeteses tubulopathiára jellemző elváltozás az úgynevezett Armani-Ebstein jelenség, vagyis a tubuláris glikogéngranulumok felszaporodása. Ezen PAS-pozitív glikogéndepozitumok a kontroll, valamint a PACAP-38-kezelt kontroll állatok veséjéből teljes mértékben hiányoztak. Ezzel szemben a kezeletlen diabeteses csoport veséiben kifejezett volt az Armani-Ebstein jelenség, ezen mintákban nagy mennyiségű tubuláris glikogéngranulum felhalmozódását figyeltük meg. A PACAP-38-kezelés szignifikánsan csökkentette a glikogéngranulumok kialakulásának mértékét a diabeteses állatok vesetubulusaiban.

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

A vascularis hyalinosis jellegzetes, de nem patognómikus 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.

3. A PACAP-38 hatása a diabeteses nephropathia elektronmikroszkópos elváltozásaira

Az elektronmikroszkópos felvételek tanúsága szerint a kezeletlen diabeteses állatok glomerulusaiban a glomeruláris bazálmembrán (GBM) szakaszosan megvastagodott. Ezekon 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 glomeruláris bazálmembránjának meg nem vastagodott területei nem mutattak szignifikáns eltérést a kontroll értékektől. 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.

A diabeteses vesékben a podocyták súlyos károsodását észleltük a lábnyúlványok jelentős mértékű kiszélesedésével, ellapulásával, valamint fúziójával. A PACAP-38-kezelt diabeteses állatok veséiben a podocyták nem mutattak morfológiai eltérést, az elektronmikroszkópos felvételeken intakt podocyt lábnyúlványok voltak láthatóak.

4. A PACAP-38 nephroprotektív hatásának mechanizmusa

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 MIG, a MIP-3 α , a RANTES és az L-szelektin adhéziós molekula esetén, míg a kezelés csökkentette a LIX és a CNTF szintjét. A diabetes jelentősen fokozta a gyulladásos citokinek többségének expresszióját, így emelkedett a CINC-1, a TIMP-1, a LIX, a MIG, a MIP-3 α , a RANTES és a CNTF, valamint az adhéziós molekulák közül az L-szelektin 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.

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.

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

A diabetes jelentősen fokozta a diabeteses nephropathia patogenezisében fontos szerepet játszó fibrotikus markerek, így a IV-es típusú kollagén és a TGF- β 1 renális expresszióját. PACAP-38-kezelés szignifikánsan csökkentette ezen faktorok szintjét.

A PACAP-38-kezelés fokozta az antiapoptotikus Akt foszforilációját kontroll állatok esetében. A diabeteses nephropathia a vesesejtek jelentős apoptózisával, és ezáltal a renális p38MAPK foszforilált formájának jelentős emelkedésével 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. A diabetes hatására upregulálódott az

NFκB transzkripció faktor p60 alegysége, melynek mind a citokintermelés, mind pedig a sejttúlélés regulációjában fontos szerepe van. PACAP-38-kezelés hatására a p60NFκB szignifikánsan alacsonyabb aktivációt mutatott.

4.4. A PACAP-38 hatása a malondialdehid (MDA), a glutation (GSH) és a szuperoxid-dizmutáz (SOD) szintjére

Az oxidatív stresszmarkerek meghatározására végzett biokémiai assay segítségével szignifikánsan magasabb glutation 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.

MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink első részében igazoltuk az *in vivo* PACAP-38-kezelés védő hatását 8 hetes diabeteses nephropathia szövettani elváltozásaival szemben, továbbá elsőként alkalmaztunk 8 hetes PACAP-kezelést, és bizonyítottuk ezen hosszútávú kezelés hatékonyságát.

Szövettani vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a PACAP-38-kezelés szignifikáns mértékben csökkenti a diabeteses nephropathia jellegzetes glomeruláris, tubuláris és vaszkuláris elváltozásait a vér glükózsztintjének befolyásolása nélkül.

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 gyulladás, ahogy az a bevezetésben már említésre került, a diabeteses nephropathia egyik fő patogenetikai faktora amely tubulointersticiális fibrosishoz, tubuláris atrophíához és vaszkuláris károsodáshoz vezet. A PACAP citokin-expressziót befolyásoló immunmoduláló hatását a jelen kísérlethez hasonlóan már számos korábbi kísérleti modellben bizonyították.

A PACAP-kezelés szintén csökkentette a diabetes hatására fokozódott renális NFκB-szintet, melynek kulcsszerepe van a diabeteses vesebetegség kialakulásában. Számos korábbi vizsgálat bizonyította, hogy a PACAP, hasonlóan a szerkezetileg rokon VIP-hez, megakadályozza az NFκB transzlokációját a sejtmagba az IκB foszforilációjának gátlásán keresztül *in vivo* és *in vitro* körülmények között is. Az NFκB aktivációjának következménye a tubuláris károsodás, valamint a proinflammatorikus citokinek, kemokinek és adhéziós molekulák túlzott mértékű termelődése. Emellett a reaktív oxigénszarmazékok által indukált apoptotikus folyamatok jelátvitelében is fontos szerepet tulajdonítanak az NFκB-nek. A PACAP az NFκB aktiváció csökkentése által gátló hatást fejtett ki ezen folyamatokra.

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, és gátolta a kaspáz-3

aktivációját. A kaszpáz-3 kiemelt szerepet játszik a podocyták hiperglikémia hatására bekövetkező apoptózisában.

A TGF- β 1 a fibronectin, a kollagén IV. és a laminin túltermelődését, illetve csökkent lebomlását váltja ki a mezangiális mátrixban, a glomeruláris és tubuláris bazálmembránban, valamint az interstíciumban, mely súlyos morfológiai és funkcionális elváltozásokat okoz a vesében. A PACAP szövettanilag igazolt nephroprotektív hatásának hátterében a TGF- β 1 és a kollagén IV. szintjének a kezelés hatására bekövetkező csökkenése áll.

Az oxidatív stressz szerepe a diabetes és a diabeteses komplikációk kialakulásában jól ismert. A renális sejtek oxidatív károsodásához a mitokondriális szabadgyökök túltermelődése mellett a glutation aktív formájának csökkenése következtében károsodott antioxidatív védelem is hozzájárul. Kísérletünkben a PACAP normalizálta a diabetes hatására lecsökkent GSH szintet, mely a PACAP antioxidáns szerepét bizonyítja.

Ezen eredményeink alapján a PACAP ígéretes terápiás lehetőségnek tűnik a diabeteses nephropathia kezelésében. A PACAP esetleges klinikai alkalmazása előtt azonban még számos problémát mérlegelnünk kell, így az esetleges mellékhatásokat, valamint a peptid gyenge biohasznosulását. Jelen kísérletben patkányok esetében krónikus intraperitoneális PACAP-38-kezelés hatására nem tapasztaltunk számottevő mellékhatást. Egy korábbi humán vizsgálat szintén igazolta, hogy a peptid szisztémás infúziója nem okoz jelentős mellékhatást. A másik probléma a gyenge biohasznosulás, hiszen a peptid féléletideje a szisztémás keringésben mindössze 2-10 perc a dipeptidil peptidáz IV (DPP IV) általi enzimatis hasítás következtében. Ezért napjainkban is számos, a PACAP-kezelés egyszerű és megbízható módjának kifejlesztésére irányuló kísérlet folyik. A kísérletben a peptid rövid felezési ideje ellenére azt tapasztaltuk, hogy a másnaponta történő intraperitoneális kezelés szignifikáns protektív hatást váltott ki. Ennek 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. Klinikai gyakorlatban is bevált kezelés a DPP IV inhibitorok alkalmazása a 2-es típusú diabetes terápiájában, melyek elsősorban a glukagonszerű peptid-1 (GLP-1) szintjének emelésén, valamint egyes újabb tanulmányok szerint a PACAP szintjének növelésén keresztül is hatnak.

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. Ismerve a PACAP β -sejtek proliferációját és inzulinszekréciót serkentő, valamint diabeteses retinopathiával szembeni védő hatását elmondható, hogy 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

BEVEZETÉS

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

A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) a TRP ioncsatorna receptorcsaládba tartozó nem-szelektív ioncsatorna, melynek fájdalom, valamint gyulladáshoz vezető folyamatok kiváltásában van szerepe. A TRPA1 receptorok a spinális és trigeminális ganglionban, valamint a ganglion nodosumban elhelyezkedő nociceptív primer afferens neuronok centrális, valamint perifériás végződéseiben expresszálódnak, ahol felveszik és amplifikálják a nociceptív stimulust. A receptor legfontosabb szerepe a környezeti irritánsokkal szembeni érzékenység, és ennek megfelelően a bőrt, a légutakat és a gasztrointesztinális rendszert beidegző szenzoros idegvégződéseken expresszálódnak. Számos természetes és szintetikus stimulánsuk ismert, így például a mustárolaj vagy kémiai nevén allil-izotiocianát. A mustárolaj a szenzoros idegvégződéseken expresszáló TRPA1 receptorokat specifikusan aktiválva akut neurogén gyulladást vált ki, melyet erythema, oedema, fájdalom, valamint mechanikus és termális hiperalgéria kísér.

A TRPA1 és TRPV1 ioncsatornákat expresszáló szenzoros idegvégzések hármas funkcióval rendelkeznek; afferens funkcióval, mely a fájdalom ortodróma, centrális irányba történő továbbítását jelenti, ezen folyamat eredménye a nocicepció és a fájdalom. A lokális efferens funkció a szenzoros idegvégzésekéből történő gyulladáskeltő neuropeptidek, így calcitonin gén-rokon peptid (CGRP) és tachikininok: P-anyag (SP) és neurokininok (NK) felszabadulását jelenti. A felszabaduló CGRP arterioláris vazodilatációt, míg a tachikininok leukocyták-akkumulációt és plazma-extravazációt váltanak ki, melyet lokális gyulladáshoz vezető hiperszenzitivitás kísér, ezt nevezzük akut neurogén gyulladásnak. A harmadik pedig a szisztémás efferens funkció, amely a szisztémás gyulladásgátló funkcióval rendelkező peptidok, így többek között a PACAP felszabadulását jelenti.

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. A rendelkezésünkre álló nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerekkel a neurogén gyulladás nem csökkenthető, így jelenleg ezen betegségek esetében nincs lehetőség a háttérben álló fő patogenetikai faktor eliminációjára.

2. A PACAP szerepe a neurogén gyulladásban

A PACAP expresszálódik a trigeminális, valamint a hátsó gyöki ganglion kis és közepes méretű neuronjaiban, a kapszaicin-szenzitív szenzoros neuronokban, illetve a gerincvelő hátsó szarvának felszíni rétegeiben. 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. 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*. Szisztémás TRPV1 agonista resiniferatoxin hatására a kapszaicin-szenzitív idegvégződések közül PACAP a vérplazma PACAP-szerű immunreaktivitásában mérhető emelkedést okoz, míg az idegvégződések lokális ingerlése esetén ez a hatás elmarad. A peptid antiinflammatorikus hatása *in vivo* is megfigyelhető, i.p. PACAP-38 szignifikánsan csökkenti az 1% mustárolaj, a kapszaicin és a resiniferatoxin által indukált plazma-extravazációt és neurogén oedemát. Ennek hátterében az állhat, hogy a felszabaduló PACAP-38 lokális antiinflammatorikus hatást fejt ki, és koncentráció-dependens módon gátolja a CGRP és a SP felszabadulását.

3. A maxadilan és a VIP gyulladásban betöltött szerepe

A 61 aminosavból álló maxadilan a PAC1 receptor specifikus agonistája. Kiemelkedő vazodilatátor hatása mellett számos vizsgálat igazolta, hogy a maxadilan jelentős gyulladásgátló hatással rendelkezik, azonban neurogén gyulladásra kifejtett hatása ezidáig ismeretlen volt.

A 28 aminosav hosszúságú VIP koexpresszálódik a hozzá szerkezetileg nagymértékben hasonló PACAP-pal a paraszimpatikus és hátsó gyöki ganglionokban, a ganglion oticum, sphenopalatinum és nodosum perikaryonjaiban. A VIP immunregulációs hatását elsősorban a VPAC1 receptorok közvetítik adenilat-cikláz aktivációján keresztül. VIP génhányos egerek hajlamosabbak számos gyulladásoos betegség, így septicus shock, asthma bronchiale és pulmonalis hypertensio kialakulására. A VIP neurogén gyulladásban betöltött szerepét is számos vizsgálat igazolta. A neuropeptid gátolja a glutamát- és oxidatív stressz indukált pulmonális oedemát, a kapszaicin hatására kialakuló bronchokonstriktiót és légúti gyulladást. A PACAP-hoz hasonlóan a maxadilan és a VIP intradermális injekciója bizonyítottan serkenti a plazma-extravazációt nem gyulladásoos szövetekben, bizonyítva, hogy mustárolaj-stimuláció hiányában mind a PAC1, mind pedig a VPAC1/2 receptorok aktivációja fokozott vaszkuláris permeabilitást idéz elő.

CÉLKITŰZÉS

Ph.D. munkám második részében a PACAP receptorainak, így a PAC1, a VPAC1 és 2 receptoroknak a PACAP neurogén gyulladást gátló hatásában betöltött szerepét vizsgáltam. 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 mieloperoxidáz enzim aktivitásának mérésével határoztuk meg.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkben 3 hónapos nőstény CD1 egereket vizsgáltunk. A kísérleteket az etikai szabályoknak és az egyetemi protokollnak megfelelően végeztük (BA02/2000-15024/2011, Pécsi Tudományegyetem). A vizsgált csoportok a következők voltak:

- 1) I.p. maxadilán-kezelt (100 µg/kg; n=48)
- 2) I.p. VIP-kezelt (100 µg/kg; n=52)
- 3) I.p. fiziológiás sóoldattal kezelt (10 ml/kg; n=52).

Az intraperitoneális kezeléseket legalább 15 perccel a kísérletet megelőzően végeztük. Az állatok testhőmérsékletét a kísérlet időtartama alatt melegítőpad segítségével állandó 38°C-on tartottuk.

2. Mustárolajjal és formalinnal kiváltott neurogén oedema vizsgálata egérfülön

Az állatok fülének vastagságát ketamin (100 mg/kg) – xylazin (5 mg/kg) altatásban mikrométer segítségével mértük meg. 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.

3. Az Evans kék-kötött albumin extravazációjának meghatározása egérfülön

Az egereket uretánnal (1,2 g/kg) elaltattuk, az Evans kéket (25 mg/kg) legalább 10 perccel a mérés megkezdése előtt injektáltuk. Az egérfül dorzális 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 intenzitások meghatározása Image-Pro Plus 7.0.0.591 szoftverrel történt. Az intenzitásokat a kontroll értékhez viszonyítottuk, és az adatokat átlag% ± SEM-ben adtuk meg.

4. A bőr mikrocirkulációjának meghatározása lézer Doppler módszerrel egérfülön

A bőr mikrocirkulációjának meghatározását lézer Doppler képalkotó módszerrel végeztük (Periscan PIM-II, Perimed, Svédország) ketamin – xylazin altatásban. 3

kontroll kép készítését követően 20 µl 5% mustárolajjal kezeltük az egerek jobb, míg 20 µl paraffinolajjal az egerek bal fülének dorzális felszínét, majd 2 perces intervallumonként szkenneltük az állatok füleit. A szkennelt területen a két fül területét kijelöltük („region of interest”, ROI), és az ezeken mért áramlási értékeket a kontroll képek átlagaihoz viszonyítottuk, majd 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.

5. Az egérfülek mieloperoxidáz (MPO) aktivitásának meghatározása

Hat órával az 5%-os mustárolaj első topikális alkalmazását követően az egerek füleit eltávolítottuk, és -80°C-ra fagyasztottuk. A füleket kálium-foszfát pufferben homogenizáltuk. Centrifugálást követően az üledéket 0,5% hexadecil-trimetilammóniumot (HTAB) tartalmazó kálium-foszfát pufferben vortexeltük. A minták MPO aktivitását ismételt centrifugálást követően a felülülőből határoztuk meg a mieloperoxidáz enzim szubsztrátjának, H₂O₂-3,3',5,5'-tetrametilbenzidinnek (TMB/H₂O₂) a hozzáadásával. A minták optikai denzitását (OD) öt perc különbséggel kétszer mértük meg Labsystems microplate reader segítségével 620 nm-en, és az értékeket a humán MPO standardhoz viszonyítottuk. Az időegység alatti optikai denzitás-változásból ($\Delta OD/eltelt\ idő$) a mintában lévő mieloperoxidáz enzim aktivitására következtettünk. Az adatokat U/g nedves szövetre adtuk meg.

6. Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai értékelése GraphPad szoftverrel, ismételt méréses 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.

EREDMÉNYEK

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

A fülek maximális megvastagodása 1%-os mustárolaj-kezelés esetén ~20%, míg 5%-os mustárolaj esetében ~45% és 5% formalin hatására ~80% volt.

1%-os mustárolaj topikális alkalmazásának következtében 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 MO-indukált neurogén oedema szinte teljes mértékben hiányzott a PAC1 receptor agonistával kezelt állatokban, maximum 4,8%-os fülvastagság-növekedést mértünk a mustárolajjal történő kezelést követő harmadik és negyedik órában. A VIP szignifikáns oedemacsökkenést nem eredményezett.

Az 5%-os mustárolaj-kezelés hatására fokozódott a neurogén oedema mértéke, a maximális fülduzzadás 45,9%-os volt a kontroll csoportban. 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 a kísérlet teljes időtartama alatt, mint a VIP-é.

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 vivőanyaggal kezelt csoportban. A maxadilan a formalin-indukált neurogén gyulladást a kísérlet teljes időtartama alatt szignifikáns mértékben gátolta.

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

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

Az 5% mustárolaj a kontroll, vivőanyaggal kezelt állatokban szignifikánsan, 48,3%-kal fokozta a posztkapilláris venulák albumin-áteresztőképességét a paraffinolajjal kezelt fülekhez viszonyítva. 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. A maxadilan szignifikáns mértékben gátolta az albumin kiáramlását, a plazma-extravazáció maximális fokozódása 15,8% volt.

3. Maxadilan és VIP hatása az 5% mustárolajjal kiváltott vazodilatációra

A maxadilan a paraffinnal kezelt fülekben véráramlás-fokozódást váltott ki, míg a VIP nem befolyásolta a bazális perfúziót.

A neurogén gyulladáshoz kapcsolódó perfúzió-fokozódás a fiziológias sóoldattal kezelt csoportban az 5% mustárolaj-kezelés utáni 6-10. percben érte el 87,2%-os maximumát. 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.

4. Maxadilan és VIP hatása a mieloperoxidáz aktivitásra

A mustárolajjal kezelt fülekben a stimulációt követő 6. órában szignifikánsan magasabb volt a mieloperoxidáz aktivitás a megfelelő paraffinolajjal kezelt fülekhez viszonyítva, melyet sem a maxadilan, sem a VIP nem befolyásolt szignifikáns mértékben. Tehát a VPAC1/2 és a PAC1 receptorok stimulációja nem

befolyásolja a neutrophilek akkumulációját sem stimulálatlan, sem pedig mustárolajjal stimulált szövetben.

MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteinkkel elsőként bizonyítottuk, hogy a szelektív PAC1 receptor agonista maxadilan gátolja az akut neurogén gyulladást. Ennek háttérében 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-kezelés esetén ért el. Az oedemaképződés elsősorban a plazmaproteinek extravazációjával arányos, melyet szintén nem befolyásolt a VIP-kezelés. A mustárolajjal kiváltott gyulladás késői, celluláris fázisa, mely a mustárolaj-indukciót követően 6 órával alakul ki, nem neurogén, a kapszaicin-szenzitív szenzoros idegvégződéseknél nincs szerepük a kialakulásában. Korábban igazolták, hogy a PACAP-38-kezelés csak a gyulladás neurogén fázisát gátolja, míg a leukocyták infiltrációját jelző mieloperoxidáz aktivitás fokozódására nincs hatással. Jelen kísérletben sem találtunk különbséget a celluláris infiltráció mértékében sem a PAC1R, sem pedig a VPAC1/2R aktivációja esetén.

A PACAP koncentráció-dependens módon gátolja az akut neurogén gyulladást, a neuropeptid 100 µg/kg dózisban szignifikáns mértékben csökkenti a mustárolajjal kiváltott neurogén gyulladást. Továbbá lokális immunmodulátor hatása révén gátolja a CGRP, SP és szomatosztatin felszabadulást a trachea szenzoros idegvégződéseiből *in vitro*, ezáltal pedig a neurogén oedemat és plazmafehérje-kirámlást. Azonban jelen eredményeinkkel elsőként igazoltuk a PACAP neurogén gyulladást gátló hatásáért felelős receptorális mechanizmusokat.

Korábbi kísérletekkel igazolták, hogy VIP és a PACAP gyulladásgátló hatásait kísérletes arthritis és Crohn betegség esetén elsősorban a VPAC1 receptor közvetíti, míg a PAC1 receptor felelős a septicus endotoxaemiával szembeni védő hatásáért. A VPAC1 és VPAC2 receptorok fontos szerepet töltenek be a nyomással kiváltott vazodilatációban, melynek háttérében a kapszaicin-szenzitív idegrostok aktivációja és CGRP-felszabadulás áll. Szintén VPAC1/2 receptorok jelentőségére utal, hogy a VIP neurogén gyulladást és hízósejt-degranulációt kiváltó hatása kifejezettebb, mint a PACAP-é. Humán vizsgálatban is igazolták, hogy a VPAC2 receptorok aktivációja gátló hatású asthma bronchiale esetén. Mindezek ellenére azonban a jelen kísérlet eredményei 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, azonban ezidáig nem vizsgálták a peptid neurogén gyulladásra

kifejtett hatását. 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. Ismert, hogy a PAC1/VPAC2 receptor antagonistája PACAP6-38, a szenzoros idegvégződéseken agonistaként viselkedik. 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 gyulladásához kapcsolódó oedemát, fokozott vaszkuláris permeabilitást, valamint perfúzió-fokozódást, míg a VIP antiinflammatorikus hatása a neurogén vazodilatáció mérséklésére korlátozódott. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a PACAP mustárolaj-indukált neurogén gyulladásra kifejtett gátló hatását elsősorban a PAC1 receptor közvetíti. Jelen eredményeink felvetik a PAC1 receptor szelektív agonisták felhasználási lehetőségét a neurogén gyulladásos állapotok kezelésében.

A DOLGOZATBAN BEMUTATOTT 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 8 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 hátterében 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 glutation 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 maxadilán 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.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Reglódi Dóranak és Dr. Tamás Andreának, akik TDK-s koromtól kezdve irányították és támogatták kutatási munkámat, és akiknek kitartása és szakmai tudása mindig példaként állt előttem.

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 segítségével. 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 segítőkétségét, 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.

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:2,614)

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:2,757)

Bánki E, Hajna Z, Kemény Á, Botz B, Nagy P, Bölcskei K, Tóth G, Reglődi D, Helyes Z. (2014) The selective PAC1 receptor agonist maxadilan inhibits neurogenic vasodilation and edema formation in the mouse skin. *Neuropharmacology*. 85:538-547. (IF: 4,819)

Egyéb publikációk

Bánki E, Pákai E, Gaszner B, Zsiborás C, Czett A, Bhuddi PR, Hashimoto H, Tóth G, Tamás A, Reglődi D, Garami A. (2014) Characterization of the Thermoregulatory Response to Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in Rodents. *J Mol Neurosci*. DOI: 10.1007/s12031-014-0361-0 (IF:2,757)

Bánki E, Sosnowska D, Tucsek Z, Gautam T, Tóth P, Tarantini S, Tamás A, Helyes Z, Reglődi D, Sonntag WE, Csiszár A, Ungvári ZI. (2014) Age-related decline of autocrine pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. [Közlésre elfogadva] (IF:4,984)

Csiszár A, Gautam T, Sosnowska D, Tarantini S, **Bánki E**, Tucsek Z, Tóth P, Losonczy G, Koller Á, Reglődi D, Giles CB, Wren J, Sonntag WE, Ungvári ZI. (2014) Caloric restriction confers antioxidative, proangiogenic and antiinflammatory effects preserving a youthful phenotype in cerebrovascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 307:H292-306. (IF:4,012)

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:0,747)

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)

Témához kapcsolódó publikációk impakt faktora: **10,19**

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: **37,164**