

**A PACAP ANTI-APOPTOTIKUS HATÁSA OXIDATÍV STRESSZ  
INDUKÁLTA SZÍVIZOMSEJT, ENDOTHELSEJT  
KÁROSODÁSBAN ÉS GLUTAMÁT INDUKÁLTA RETINÁLIS  
DEGENERÁCIÓBAN.**

**PhD értekezés tézisei**

**Rácz Boglárka**

**Klinikai doktori iskola vezető: Prof. Dr. Nagy Judit**

**Programvezető: Prof. Dr. Róth Erzsébet**

**Témavezetők: Prof. Dr. Róth Erzsébet, Dr. Reglódi Dóra**

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Oktató és  
Kutató Intézet**

**Pécs**

**2007**

## I. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedek fontos kutatási területévé vált az apoptózis mechanizmusának tanulmányozása. A természetes sejthalál eme folyamatát egy görög hasonlaltal jellemezték, mint "ahogyan a levelek hullanak le a fáról". Az apoptózis fontos szerepet játszik a soksejtű élőlények fejlődésében és öregedésében, de ezeken kívül számos élettani működés szabályozásában is részt vesz. A soksejtű szervezeteknek szükségük van arra, hogy megszabaduljanak az életműködésük szempontjából feleslegben lévő, valamint az életfolyamatokat akadályozó vagy az azokra veszélyes sejtektől.

Az emberi szervezetben megközelítőleg 50-70 billió sejt pusztul el naponta, ám a szervezet igyekszik a sejtek osztódása és az elhalt sejtek száma közti egyensúlyt fenntartani. Az egyensúly azonban felborulhat, ami súlyos következményekhez vezethet. Abban az esetben, ha a sejtek gyorsabban szaporodnak, mint ahogy elpusztulnak a kóros sejtburjánzás, daganat és autoimmun betegség kialakulását eredményezheti. Amennyiben a sejtek lassabban osztódnak, mint ahogyan pusztulnak, súlyos sejtvesztéssel járó betegségek, mint például neurodegeneratív kórképek alakulhatnak ki.

Az apoptózis során számos jelátviteli út aktiválódhat, melyek közül munkám során a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) család tagjait [extracelluláris szignál-regulálta kináz (ERK), p38MAPK (p38), c-Jun N-terminál kináz (JNK)], valamint a cAMP-reszponzív elemkötő proteint (CREB); a Bcl-2-t; a foszfo-Bad-et; az apoptózis indukáló faktort (AIF); a citokróm c-t és a kaszpáz-3 jelátvitelét vizsgáltam.

Ezen jelátviteli utak vizsgálata segítséget nyújt abban, hogy jobban megismerhessük a fent említett betegségek etiológiáját és pathomechanizmusát, amelyek pontos ismerete elengedhetetlen az újabb terápiás lehetőségek kidolgozásához. Kutatócsoportunk célja a hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) vizsgálata, mely neurotrofikus és neuroprotektív hatása már számos kísérletben bizonyítást nyert. Értekezésem a PACAP antiapoptotikus hatásának molekuláris biológiai hátterét foglalja össze oxidatív stressz indukálta szívizomsejt, endothelsejt valamint glutamát indukálta retinális sejtkárosodások esetén.

## II. HYPOPHYSIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP)

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet 1989-ben izolálták birka hypothalamusból a hypophysisben kifejtett adenilát-cikláz aktiváló hatása segítségével. A szervezetben két, biológiailag aktív formában fordul elő, a 38 aminosavból álló PACAP1-38, amely a szervezetben található PACAP mennyiségnek mintegy 90%-át teszi ki, valamint a 27 aminosavból álló PACAP1-27. A PACAP tagja a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinalis polipeptid (VIP) peptidcsaládnak. Szerkezete 67%-ban megegyezik a VIP struktúrájával, de adenilát-cikláz aktiváló hatása 1000-10000-szer nagyobb a VIP hatásánál.

A peptid szekvenciája azonos birkában, patkányban és emberben. A 38 aminosavból álló primer molekula megtalálható az alacsonyabb rendű gerinces és előgerinchúros állatokban is, ahol a struktúra csak 1-4 aminosavban térnek el az emberben található PACAP-tól. Ez azt bizonyítja, hogy a filogenetikai fejlődés során szinte változatlanul konzerválódott molekula alapvető élettani funkcióval rendelkezik.

A PACAP hatását a szervezetben specifikus receptorok közvetítik. A receptorok hét transzmembrán kart és egy intracellulárisan G-proteint kötő domént tartalmaz, mely a VIP receptor családba tartozik. A nyolc altípussal rendelkező PAC1 receptorok két-három nagyságrenddel nagyobb affinitást mutatnak a PACAP-hoz, mint a VIP-hez, míg a VPAC1 és VPAC2 receptorok a PACAP-ot és a VIP-t egyforma erősséggel kötik. A PAC1 a Gs-proteinen keresztül GTP-dependens adenilát-ciklázot aktivál, ezen keresztül növeli az intracelluláris cAMP-szintet, ami a protein kináz A (PKA) aktiválásával képes beindítani a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) útvonalat.

Megjelenését és funkcióját tekintve, az ún. „brain-gut peptidek” közé sorolható, ami azt jelenti, hogy megtalálhatók a központi és perifériás idegrendszer mellett más szövetekben is, többek között az endokrin mirigyekben és gastrointestinalis tractus teljes hosszában.

A PACAP felfedezése óta széleskörben vizsgálják a centrális és perifériás idegrendszerre kifejtett hatásait, és számos kísérletben bebizonyították már neurotrofikus és neuroprotektív képességét. *In vitro*, stimulálja a neuronok növekedését, elősegíti túlélésüket, antiapoptotikus hatással rendelkezik, védi a neuronokat a különböző neurotoxikus hatásokkal szemben, segíti a neuronok differenciálódását és proliferációját a fejlődés közben, és segíti más trofikus faktorok expresszióját és hatását.

*In vivo*, PACAP védi a hippocampus CA1 sejtjeit globális ischaemiában és a cholierg neuronokat a fornix átmetszése után. A PACAP patkányban csökkenti a károsodott agyterület nagyságát, és javítja a neurológiai jeleket fokális cerebrális ischaemiát követően. Nemrégiben bebizonyították, hogy a PACAP neuroprotektív egér modellben létrehozott tranziens fokális ischaemiában, és más neuronális károsodások esetén, mint például gerincvelő és nervus facialis sérülése esetén patkány modellben és nervus opticus axotómiát követően is. A különböző neuropatológiás elváltozásokat követő PACAP upregulációból arra következtethetünk, hogy fontos szerepe lehet a posttraumás regenerációs folyamatokban. Munkacsoportunk mutatta ki a PACAP neuroprotektív hatását Parkinson-kór modellben, Huntington-chorea modellben valamint glutamát indukálta retinális degenerációban.

### III. CÉLKITŰZÉS

A PACAP neuroprotektív hatásának molekuláris háttere még nem pontosan ismert, ezért munkám során célul tűztem ki a PACAP hatásmechanizmusának feltérképezését oxidatív stressz indukálta szívizomsejt és endothelsejt károsodásban *in vitro*, valamint glutamát indukálta retinális degenerációban *in vivo*.

1. Az jól ismert, hogy mind a PACAP, mind a PACAP receptorok jelen vannak a szívizomban, azonban szívizomkárosodás esetén kifejtett esetleges protektív hatását még nem vizsgálták. Ezért első kísérletemben a PACAP lehetséges hatásmechanizmusát vizsgáltam oxidatív stressz indukálta szívizomsejt károsodásban.

2. A vazoaktív intestinalis peptid (VIP), mely nagyfokú homológiát mutat a PACAP-pal, protektív hatással bír humán cornea endothelsejtekben. Azonban a PACAP endothelsejtekre kifejtett protektív hatásával kapcsolatban nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat. Ezért kísérletem második szakaszában az oxidatív stressz indukálta endothelsejt károsodásban vizsgáltam a PACAP hatását.

3. Munkacsoportunk korábban kimutatta a PACAP neuroprotektív hatását glutamát indukálta retina degenerációban, *in vivo*, azonban pontos hatásmechanizmusát

még nem ismerjük, ezért kísérleteim harmadik szakaszában ennek feltérképezése volt a célom.

#### **IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

##### **A PACAP hatásának vizsgálata oxidatív stressz indukálta szívizomsejt és endothelsejt károsodásban, *in vivo* tanulmányok**

###### **Sejtkultúrák**

A primér szívizomsejt-kultúrát újszülött patkányok szívéből nyertem, kollagenázos emésztést követően. A sejteket DMEM/F12 médiumban tenyésztettem.

Az EOMA CRL-2586 egér hemangioendotheliomából nyert sejtvonal (ATCC). Az EOMA sejtek tenyésztése az ATCC ajánlások figyelembevételével történt.

###### **Sejt életképességének vizsgálata**

A szívizom és az endothelsejtek életképességének vizsgálatához kolorimetrikus MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) tesztet használtam. A sejteket egy 96-lyukú tenyésztő edényben tartottam. A sejteket hat különböző csoportra osztottam: 1.) kontroll csoport; 2.) 20nM PACAP-pal kezelt csoport; 3.) 250nM PACAP receptor antagonistával kezelt csoport (PACAP6-38); 4.) 1/0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt csoport; 5.) 1/0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal és 20nM PACAP-pal kezelt csoport; 6.) 1/0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal és 20nM PACAP-pal, valamint 250nM PACAP6-38-cal kezelt csoport. A kezelést követően a médiumokat lecseréltem egy 0,5%-os MTT tartalmú médiumra, melyben 3 óráig tartottuk a sejteket. Ezt követően egy SIRIO ELISA leolvasóval 570 nm hullámhosszon megmértem a képződött kék formazán festék mennyiségét, amely arányos volt az élő sejtek számával. Minden kísérletet 3-szor ismételttem.

###### **Élő/halott teszt**

Az EOMA sejtek életképességét további élő/halott teszt segítségével határoztam meg. A sejteket megfelelő pufferben inkubáltam 45 percen keresztül. A puffer calcein-AM-t (5 µl/10ml PBS) és ethidium homodimer-1-t (20 µl/10ml PBS) tartalmazott. Az ethidium homodimer-1 egy nagy affinitású, piros fluoreszcens nukleinsav festék, amely csak a halott sejtek sérült membránján képes átjutni, és a magban dúsul. A calcein-AM egy membrán fluoreszcens festék, amely az élő sejtek észteráz aktivitása következtében a

membránon áthatolni nem képes zöld-fluoreszcens terméké alakul, ezáltal az épp membránnal rendelkező sejtek citoplazmájában dúsul.

### **Annexin V és propidium jodid festés**

Az apoptózis számos morfológiai változással jellemezhető, melyek közül legkorábban a plazmamembrán változás észlelhető. Az apoptotikus sejtek membránjában a foszfolipid-foszfátidilszerin a belső felszínről a külső felszínre transzlokálódik. Az Annexin-V igen magas affinitást mutat a foszfolipid-foszfátidilszerinhez. A FITC-cel jelzett Annexin-V felhasználható az apoptotikus sejtek flow citometriás kimutatására. Az Annexin-V-t vitális propidium jodid festéssel együtt kombináltam és így az Annexin-V pozitív apoptotikus sejtek elkülöníthetővé váltak a propidium jodid negatív nekrotikus sejtektől. A mintákat BD FACS Calibur flow citométer segítségével vizsgáltam.

Az eredményeket Cellquest software segítségével analizáltam. A kvadráns dot plot segítségével meghatározható az élő, a nekrotikus (propidium jodid pozitív) a korai apoptotikus (Annexin-V pozitív), valamint a késői apoptotikus (Annexin-V és propidium jodid pozitív) sejtek százalékos aránya.

### **A MAP kinázok, foszfo-Bcl-2, foszfo-Bad és aktív kaszpáz-3 mérése áramlási flow citometriás módszerrel**

A kezelést követően, a sejteket primer 1:1000 (ERK1/2), 1:50 (p38 MAPK), 1:50 (JNK1/2), 1:10 (caspase-3), 1:50 (Bcl-2) és 1:100 (Bad) antitesttel, majd FITC konjugált szekunder anti-egér, vagy anti-nyúl IgG antitesttel (1:50) jelöltem, majd ezt követően áramlási citométerrel mértem. Az eredményeket Cellquest software segítségével analizáltam.

### **PACAP hatásának vizsgálata glutamát indukálta retinális degenerációban, *in vivo* vizsgálatok**

#### **Állatok előkészítése**

Az *in vivo* retina degenerációs modellhez újszülött Wistar patkányokat használtam. Az állatok elhelyezése, gondozása és felhasználása a Pécsi Tudományegyetem ellenőrzött protokollja (No: BA02/2000-31/2001) szerint az intézeti ajánlások figyelembevételével történt.

## **Állatok kezelése**

Az újszülött patkányokat hat csoportra osztottam és a postnatalis 1, 3 és 5. napon a következő kezelésekben részesültek:

1. kontoll csoport unilaterális, intravitreális fiziológiás sóoldat
2. csoport unilaterális, intravitreális 100pmol PACAP
3. csoport unilaterális, intravitreális 1nM PACAP6-38
4. csoport 4mg/ttg szubkután MSG, valamint unilaterális, intravitreális 100pmol PACAP
5. csoport 4mg/ttg szubkután MSG, valamint unilaterális, intravitreális 100pmol PACAP és 1nM PACAP6-38.

A postnatalis 1., 3. és 5. napon a kezeléseket mintavétel követte a 12. valamint 24. órában. A mintákat Western blot analízissel vizsgáltam.

## **Western blot analízis**

A sejteket jéghideg Tris pufferben (50mM, pH: 8.0) homogenizáltam, amely 0.5mM sodium-metavanadátot, 1mM EDTA-t és proteázgátlót (1:1000) tartalmazott.

Az azonos mennyiségű fehérjéket 12%-os poliakrilamid gélben futattam. A blottolást követően, a nitrocellulóz membránt 3%-os zsírmentes tejben a következő antitesteket tartalmazó oldatban egy éjszakán át 4°C-on inkubáltam: foszfo-Bad (Ser 136) (1:1000), foszfo-SAPK/JNK (1:2000), foszfo-ERK (1:2000), foszfo-CREB (1:1000), JNK1/2 (1:1000), kaszpáz 3 (1:1000), Bad (Ser 136) (1:1000), aktív kaszpáz-3 (1:1000), citokróm c (1:1000) és AIF (1:1000). A második antitest peroxidáz-konjugált anti-nyúl, valamint anti-egér IgG volt, a vizualizálást ECL Western blot meghatározó rendszer chemiluminescent substrate használatával végeztem el. Az előhívott filmeket NIH's Image J szoftver segítségével értékeltem. Minden kísérletet legalább három alkalommal végeztem el.

## **Statisztika**

*In vitro* eredményeinket átlag  $\pm$  S.E.M. formában adtam meg és ANOVA teszttel hasonlítottam össze, melyet Neuman-Keul's *post hoc* analízis követett.

Az *in vivo* eredményeinket átlag  $\pm$  S.D. formában adtam meg. A csoportok közti különbözőségeket ANOVA teszttel hasonlítottam össze, melyet variancia analízis és

Student's  $t$  teszt követett. A  $P < 0.05$  eredmények esetén az eltérést szignifikánsnak tekintettem.

## V. A PACAP VÉDŐ HATÁSA, OXIDATÍV STRESSZ INDUKÁLTA SZÍVIZOMSEJT KÁROSODÁSBAN

### Eredmények

1. A sejtek életképességének vizsgálata során MTT teszttel kimutattam, hogy a  $H_2O_2$  kezelés szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét a kontroll csoporthoz viszonyítva ( $58.2 \pm 11.0\%$ ). A PACAP és PACAP6-38 kezelések önmagukban nem okoztak eltérést a kontroll csoporthoz képest. Azonban, amikor a  $H_2O_2$  kezelésben részesített sejteket együtt inkubáltam PACAP-pal, akkor a sejtek életképessége szignifikánsan növekedett a  $H_2O_2$ -kezelt csoporthoz viszonyítva ( $85.8 \pm 15.8\%$ ). Amennyiben a  $H_2O_2$  kezeléskor együtt inkubáltam a sejteket PACAP-pal és PACAP6-38-cal, abban az esetben a PACAP receptor antagonistája képes volt elnyomni a PACAP protektív hatását ( $56.1 \pm 11.9\%$ ).

2. Az áramlási flow citométerrel kapott eredményeimben, a kontroll csoportban az élő sejtek százalékos aránya  $90.5 \pm 1.3\%$  volt, míg a korai apoptotikus sejtek  $5.4 \pm 1.6\%$ -ban fordultak elő. A  $H_2O_2$ -kezelt csoportban az apoptotikus sejtek száma nőtt ( $21.6 \pm 3.8\%$ ), míg az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent ( $76.7 \pm 3.6\%$ ). PACAP és PACAP6-38 kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz képest. A  $H_2O_2$  kezeléssel egyidőben történt PACAP kezelés szignifikánsan emelte az élő sejtek ( $91.1 \pm 0.9\%$ ) és csökkentette az apoptotikus sejtek számát ( $6.7 \pm 1.7\%$ ). A PACAP védő hatását a PACAP6-38 megakadályozta (élő sejtek:  $81.8 \pm 1.2\%$ , apoptotikus sejtek:  $14.1 \pm 1.8\%$ ).

3. A lehetséges pro- és antiapoptotikus jelátviteli útvonalakat, aktív kaszpáz-3, foszfo-Bcl-2 és foszfo-Bad antitestekkel vizsgáltam, melyhez szintén áramlási flow citométert használtam. A PACAP és PACAP6-38 kezelés önmagában nem idézett elő változást a kérdéses jelátviteli útvonalakban. A  $H_2O_2$  kezelés hatására az aktív kaszpáz-3 szintje szignifikánsan megemelkedett, míg a Bcl-2 és a Bad fehérjék foszforilációs szintje lecsökkent. A PACAP képes volt az aktív kaszpáz értékét a kontroll csoporthoz hasonló szintre visszaszorítani, míg a Bcl-2 és a Bad foszforilációs szintjét a kontroll



értékhez hasonló szintre emelni. A PACAP receptor antagonistá minden esetben képes volt elnyomni a PACAP védő hatását, és a vizsgált fehérjék szintje, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelt csoporthoz hasonló értékeket mutatott.

## **VI. A PACAP VÉDŐ HATÁSA AZ OXIDATÍV STRESSZ INDUKÁLTA ENDOTHELSEJT KÁROSODÁSBAN**

### **Eredmények**

1. A sejtek életképességének vizsgálata során MTT teszttel kimutattam, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően szignifikánsan lecsökkent az életképes sejtek száma a kontroll csoporthoz képest (51.8±12.3%). Önmagában a PACAP és PACAP6-38 kezelés nem okozott változást a sejtek életképességében. Abban a csoportban, ahol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal egyidőben PACAP kezelést is alkalmaztam, szignifikánsan növekedett az életképes sejtek száma (84.5±13.6%). A PACAP6-38 kezelésben is részesült csoportban a PACAP antagonistá képes volt elnyomni a PACAP védő hatását.

2. A PACAP protektív hatását egy további kvalitatív élő/halott teszttel is bizonyítottam. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatására a halott sejtek száma növekedett, amit a PACAP képes volt kivédeni. A PACAP receptor antagonistá segítségével a PACAP protektív hatása blokkolható volt.

3. Az áramlási flow citométerrel kapott eredményeimben, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelt csoportban az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent, míg a késői apoptotikus sejtek száma nőtt (24.9±4.2%), a kontroll értékekhez viszonyítva. A PACAP és PACAP6-38 kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz képest. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezeléssel egyidőben történt PACAP kezelés szignifikánsan emelte az élő sejtek (70.6±1.2%) és csökkentette az apoptotikus sejtek számát (7.4±2.2%). A PACAP védő hatását a PACAP6-38 képes volt megakadályozni.

4. Áramlási flow citométerrel a MAP kinázok foszforilációs szintjét is vizsgáltam oxidatív stresszel szemben. Az EOMA sejteket H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tartalmú médiumban 10, 30 és 60 percig inkubáltam. A MAP kinázok -ERK1/2, p38MAPK, JNK1/2-aktivációja a 30. percben érte el csúcspontját. Az ERK foszforilációs szintje lecsökkent, míg a p38MAPK és a JNK szintje megemelkedett oxidatív stressz hatására. Sem a

PACAP, sem a PACAP6-38 önmagában nem okozott szignifikáns eltérést a vizsgált fehérjék aktivációjában. Azonban H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés mellett a PACAP szignifikánsan emelte az ERK és csökkentette a p38MAPK valamint a JNK foszforilációs szintjét. A PACAP receptor antagonistá csökkentette a PACAP hatását a vizsgált fehérjék esetében.

## **VII. A PACAP NEUROPROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA GLUTAMÁT INDUKÁLTA RETINÁLIS DEGENERÁCIÓBAN**

### **Eredmények**

Ebben a kísérletben elsőként az ERK1/2 és a CREB foszforilációs szintjének változását vizsgáltam. Mindkét fehérje foszforilációs szintje szignifikánsan megemelkedett PACAP kezelés hatására az első és második kezelés 12. órájában, azonban a harmadik kezelést követően nem volt további emelkedés egyik fehérje aktivációs szintjében sem. Ebből arra következtettem, hogy a PACAP már az első két kezelést követően eléri hosszantartó protektív hatását. Ezt hisztológiai vizsgálatok is alátámasztották, melyből kiderült, hogy már egyszeres PACAP kezelés is elegendő a protektív hatás eléréséhez és az ezt követő kezeléseket további változást nem idéztek elő, ezért a későbbiekben elhagytam a harmadik kezelést.

Az MSG kezelés megemelte a foszfo-JNK szintjét, amelyet a PACAP kezelés szignifikánsan csökkentett az első kezelés 24. órájában. A PACAP6-38, valamennyi esetben gátolta a PACAP hatását.

A Bad foszforilációs szintjében, mely egyben ennek a fehérjének az inaktivációját is jelenti a PACAP kezelés önmagában nem játszott szerepet. Az MSG kezelést követően a Bad foszforilációja szignifikánsan csökkent és ezt a csökkenést a PACAP képes volt gátolni. A PACAP6-38 kezelés hatására a PACAP protektív hatása elmarad és a foszfo-Bad szintje az MSG-kezelt retinához hasonló értékeket mutatott.

Az AIF kiáramlása a mitokondriumból a citoszólba, kaszpáz független jelátviteli úton megy végbe. Érdekes, hogy amennyiben csak PACAP kezelésben részesítettük a sejteket, kevesebb AIF transzlókálódott a citoszólba, mint a kontroll csoportban. A MSG kezelést követően megemelkedett az AIF citoszólban mért mennyisége, azonban a PACAP kezeléssel ez a mennyiség a kontrollhoz közeli értéket mutatott. PACAP6-38-cal a PACAP nem volt képes kifejteni védő hatását.

A citokróm c kiáramlása a mitokondriumból, a kaszpáz függő apoptózis egyik korai eseménye. Amennyiben csak PACAP kezelésben részesültek a sejtek, a citokróm c mitokondriumban mért szintje kevesebb volt, míg a csak PACAP6-38-cal kezelt csoportban mért szint magasabb volt, mint a kontroll csoportban. Az MSG kezelés szignifikánsan megemelte a kiáramlott citokróm c mennyiségét, a PACAP kezelés hatására a citoszólban mért citokróm szintje szignifikánsan csökkent. Ebben az esetben is a PACAP6-38 elnyomta a PACAP hatását.

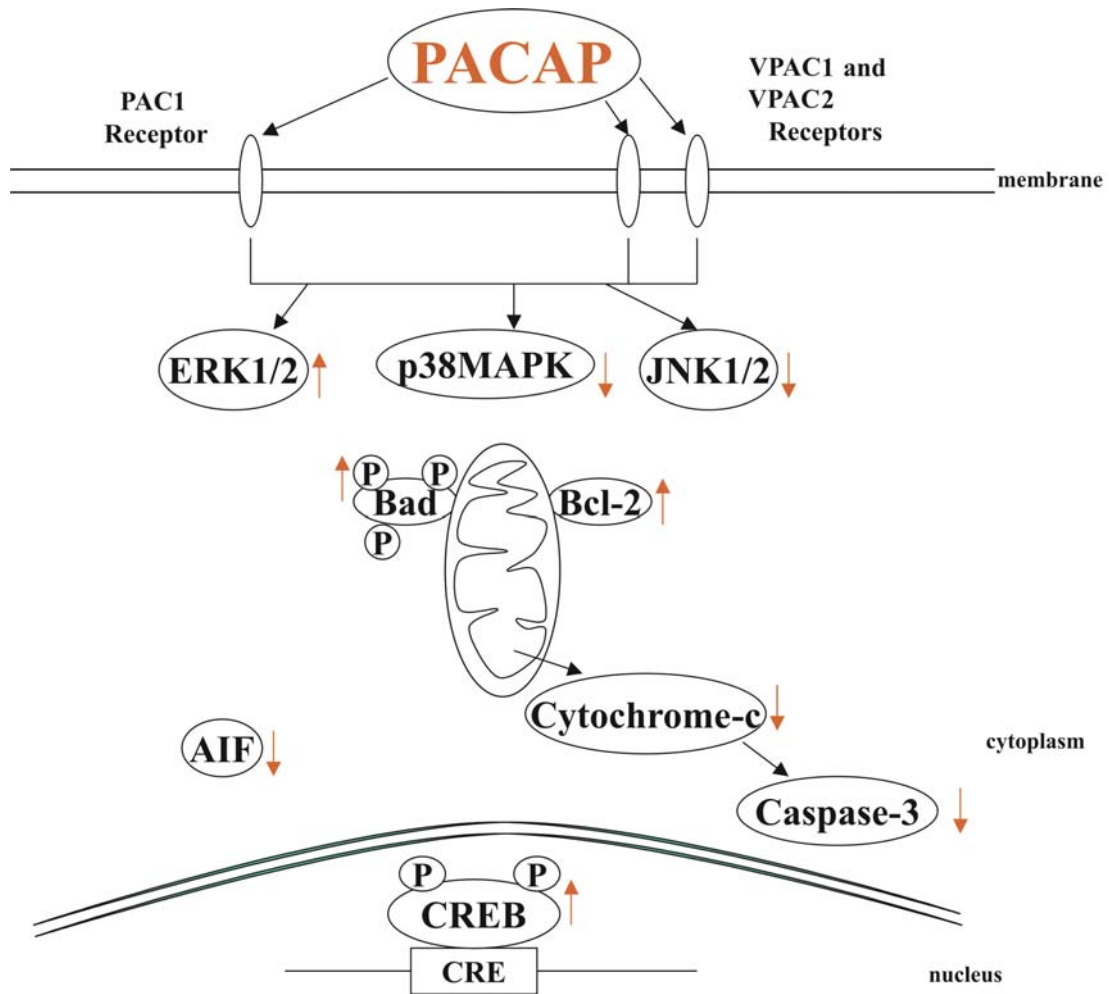
Az aktív kaszpáz 3 szintje a kaszpáz aktiváció egyik legjobb indikátora. A PACAP kezelés önmagában nem okozott változást a szintjében. Az MSG kezelés szignifikánsan megemelte a kaszpáz 3 szintjét az első kezelést követően. A PACAP kezelés képes volt meggátolni az MSG indukálta kaszpáz 3 aktivációt, amit pedig a PACAP6-38 kezelés blokkolt.

## VIII. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette az oxidatív stressz indukálta apoptózist a szívmusclesejtekben. Csökkentette a kaszpáz 3 aktivációt és emelte a Bcl-2 és a foszfo-Bad szintjét. Kimutattam, hogy a PACAP már jólismert antiapoptotikus hatása nem csak neuronális sejtvonalakban, hanem szívmusclesejtekben is megfigyelhető (Fig.1).

2. A PACAP antiapoptotikus hatását az endothelsejtekben is kimutattam, mivel növelte az endothelsejtek életképességét oxidatív stresszel szemben, amely hatását a MAP kináz útvonalakon keresztül érte el (Fig.1).

3. A MSG indukálta retinális degeneráció csökkentette az antiapoptotikus fehérjét, valamint növelte a proapoptotikus fehérék szintjét. A lokális PACAP kezelés képes volt elnyomni az MSG kezelés degeneratív hatásait: a PACAP növelte az antiapoptotikus foszfo-ERK, foszfo-CREB, foszfo-Bad szintjét, és csökkentette a proapoptotikus jelátviteli molekulák, a JNK, AIF, citokróm c és kaszpáz 3 aktivációs szintjét a retinában (Fig.1).



*Fig.1. Sematikus ábra a PACAP jelátviteli útvonaláról. A PACAP hatása a vizsgált jelátviteli utakon keresztül a szívizomsejtekben, endothelsejtekben és a retinában. A nyilak a vizsgált fehérjék csökkent, vagy növekedett szintjét mutatják.*

## **IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Ezúton szeretném megköszönni a Sebészeti Oktató és Kutató Intézet, az Anatómia Intézet, a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet valamennyi dolgozójának a kedvességét és segítőkészségét.

Külön szeretnék köszönetet mondani a programvezetőmnek, Dr. Róth Erzsébet professzorasszonynak és Dr. Borsiczky Balázsnak, valamint Dr. Gasz Balázsnak, hogy támogatták és segítették tudományos munkámat.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzultánsomnak, Dr. Reglődi Dórának, hogy támogatta a tudományos tevékenységemet.

További köszönetet szeretnék mondani Ifj. Dr. Gallyas Ferencnek a munkánk során nyújtott segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban ezúton mondok köszönetet a családomnak, akik mindvégig segítettek és támogattak, ami nélkül ez a munka nem születhetett volna meg.

## X. ELŐADÁSOK ÉS PUBLIKÁCIÓK

### A dolgozathoz kapcsolódó publikációk

1. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Gallyas F Jr, Róth E, Reglődi. Involvement of ERK and CREB signalling pathways in the protective effect of PACAP on monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2006. 1070: 507-511. IF: 1,93.
2. **Rácz B**, Gallyas F Jr, Kiss P, Tóth G, Hegyi O, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Róth E, Tamás A, Lengvári I, Lubics A, Reglődi D. The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involves inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul. Pept.* 2006. 137: 20-26. IF: 2,442.
3. **Rácz B**, Reglődi D, Kiss P, Babai N, Atlasz T, Gábrriel R, Lubics A, Gallyas F Jr, Gasz B, Tóth G, Róth E, Hegyi O, Lengvári I, Tamás A. In vivo neuroprotection by PACAP in excitotoxic retinal injury: review of effects on retinal morphology and apoptotic signal transduction. *Int. J. Neuroprot. Neuroregen.* 2006. 2: 80-85.
4. **Rácz B**, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Kiss P, Róth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2007. 153:115-123 . IF: 2,487.
5. Tamás A, Gábrriel R, **Rácz B**, Dénes V, Kiss P, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutemate. *Neurosci. Lett.* 2004. 372: 110-113. IF: 2,019.
6. Gasz B, **Rácz B**, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 2006. 27: 87-94. IF: 2,701.
7. Gasz B, **Rácz B**, Róth E, Borsiczky B, Tamás A, Boronkai Á, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2005. 1070: 293-297. IF: 1,93.
8. Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Hauser D, Horváth Zs, **Rácz B**, Gábrriel R, Babai N, Tóth G, Reglődi D. Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2006. 1070: 365-370. IF: 1,93.

## Egyéb publikációk

1. **Rácz B**, Reglódi D, Fodor B, Gasz B, Lubics A, Gallyas F Jr, , Róth E, Borsiczky B. Hyperosmotic stress-induced apoptotic signaling pathways in chondrocytes. *BONE* 2007. 40: 1536-1543. IF: 3,829.
2. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Szántó Z, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Róth E, Reglódi, D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul. Pept.* 2007; (in press). IF: 2,442
3. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Róth E, Tóth G, Hegyi O, Verzár Z, Fabricsek C, Reglódi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the PKA-Bad-14-3-3 signaling pathways in glutamate-induced retinal injury in neonatal rats. *Neurotox. Res.* 2007; (in press). IF: 2
4. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Benkő L, Jancsó G, Kürthy M, Róth E. Intestinal ischemic preconditioning in rats and NF-kappaB activation. *Microsurgery* 2006. 26: 54-57. IF: 0,711
5. Gasz B , Lénard L, **Rácz B** , Benkő L, Borsiczky B, Cserepes B, Gál J, Jancsó G, Lantos J, Ghosh S, Szabados S, Papp L, Alotti N, Róth E. Effect of cardiopulmonary bypass on cytokine network and myocardial cytokine production. *Clin. Cardiol.* 2006. 29: 311-315. IF: 0,989.
6. Borsiczky B, Fodor B, **Rácz B**, Gasz B, Sára J, Róth E. Rapid leukocyte activation following intraarticular bleeding. *J. Ortop. Res.* 2006. 24: 684-689. IF: 2,784.
7. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Kalmár-Nagy K, Horváth ÖP, Róth E. Threshold level of NF-kB activation in small bowel ischemic preconditioning procedure. *Transplant. Proceed.* 2006. 38: 1800-1802. IF: 0,962.
8. Ferencz A, **Rácz B**, Cserepes B, Róth E. A korai és késői ischémiás prekondicionálás hatása az oxidatív stresszre vékonybél autotranszplantációs modellben. *Magy Seb* 2005; 58: 245-249.
9. Cserepes B, Jancsó G, Gasz B, **Rácz B**, Ferencz A, Benkő L, Borsiczky B, Kürty M, Ferencz S, Lantos J, Gál J, Arató E, Miseta A, Wéber Gy, Róth E. Cardioprotective action of urocortin in early pre- and postconditioning. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2007. 1095: 228-239. IF: 1,93.



10. Jancsó G, Cserepes B, Gasz B, Benkő L, Borsiczky B, Ferencz A, Kürty M, **Rácz B**, Lantos J, Gál J, Arató E, Sinay L, Wéber Gy, Róth E. Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2007. 1095: 251-261. IF: 1,93.
11. Kiss P, Hauser D, Tamás A, Lubics A, **Rácz B**, Horváth Z, Farkas J, Zimmermann F, Stepien A, Lengvari I, Reglődi D. Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox. Res.* 2007; (in press). IF: 2

### **Absztraktok**

1. **Rácz B**, Gasz B, Fodor B, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Osmotic stress induced signal transduction pathways in chondrocytes during acute haemarthrosis- an in vitro study. *Eur. Surg. Res.* 2005; 37: 61.
2. **Rácz B**, Gasz B, Tamás A, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Activation of signal transduction pathways in chondrocytes during hyperosmotic conditions. *J. of FEBS.* 2005. X: 312.
3. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Regul. Pept.* 2005. 130: 174.
4. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Regul. Pept.* 2005. 130: 187.
5. **Rácz B**, Gasz B, Cserepes B, Ferencz A, Fodor B, Dávid Sz, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Ozmotikus stressz indukálta jelátviteli útvonalak vizsgálata chondrocytákon. *Magy. Seb.* 2005. 58: 270.
6. **Rácz B**, Tamás A, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábel R, Reglődi D. PACAP attenuates the monosodium-glutamate-induced retinal degeneration in the rat. *Clin. Neurosci/Idegy. Szml.* 2005. 58(S1): 78.
7. **Rácz B**, Reglődi D, Benkő L, Ferencz A, Cserepes B, Róth E, Borsiczky B. The effects of adenylate cyclase activating polypeptide and the possible signalling pathways involved in chondrocytes during hyperosmotic conditions. *Eur. Surg. Res.* 2006. 38: 60.

8. **Rácz B**, D Reglődi, B Fodor, Gasz B, L Benkő, A Ferencz, A Tamás, F Jr. Gallyas, Róth E, Borsiczky B. PACAP increases chondrocyte survival through acting on apoptosis signalling pathways.  
J. of FEBS. 2006. 273:123.
9. Reglődi D, Tamás A, **Rácz B**, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábiel R. Pituitary adenylylate cyclase activating polypeptide protects against monosodium-glutamate toxicity in the rat retina.  
Regul. Pept. 2004. 122: 36.
10. Gasz B, Jancsó G, Lantos J, **Rácz B**, Lénárd L, Szabados S, Papp L, Róth E. Oxidative stress and PARP activation in patients undergone coronary surgery.  
Shock. 2005. 23: 52.
11. Gasz B, **Rácz B**, Lénárd L, Cserepes B, Jancsó G, Szabados S, Lantos J, Sümegi B, Alotti N, Papp L, Róth E. POLY (ADP-RIBOSE) Polymerase enzim aktivációjának összehasonlítása extrakorporális keringéssel, illetve off-pump technikával végzett koszorúsérműtétek állatkísérletes modelljében.  
Cardiol. Hun. 2005. 35: A 40.
12. Gasz B, **Rácz B**, Lénárd L, Cserepes B, Jancsó G, Szabados S, Sümegi B, Alotti N, Papp L, Róth E. Off-pump technikával végzett koszorúsérműtétek csökkentik a poly (ADP-ribose) polymerase enzim aktivációját.  
Magy. Seb. 2005. 58: 283.
13. Borsiczky B, **Rácz B**, Fodor B, Gasz B, Dávid Sz, Benkő L, Róth E. Intraarticularis citokin túlermelődés akut haemarthrosban.  
Magy. Seb. 2005. 58: 258.
14. Ferencz A, **Rácz B**, Benkő L, Róth E. Rövid ciklusú ischémiás prekoncionálás hatása az NF-kB aktivációra bélsejtekben.  
Magy. Seb. 2005. 58: 282.
15. Cserepes B, Jancsó G, Gasz B, **Rácz B**, Balatonyi B, Gaszner B, Róth E. Az urocortin a szívizomzat iszkémiás prekoncionálásában.  
Magy. Seb. 2005. 58: 281.
16. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Benkő L, Róth E. Effects of brief ischemic preconditioning protocol to NF-kB activation in bowel cells.  
Eur. Surg. Res. 2005. 37: 104.
17. Cserepes B, Jancsó G, Gasz B, Ferencz A, **Rácz B**, Gaszner B, Lantos J, Róth E. Urocortin expression after ischaemic preconditioning in cardiac cells.  
J. Mol. Cell Cardiol. 2005. 38: 1014.
18. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Cserepes B, Tamás A, Reglődi D, Róth E. Effects of pituitary adenylylate cyclase activating polypeptide on the ischemia/reperfusion injury in rat small bowel.  
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 140.

19. Benkő L, Danis J, Ferencz A, **Rácz B**, Cserepes B, Lőrinczy D, Róth E. Differential scanning calorimetric examination of the esophagus after 2 different stent implantations. Early results with a new stent, designed for the management of acute esophagus variceal bleeding.  
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 143-144.
20. Reglődi D, Tamás A, Kiss P, Lubics A, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr., Tóth G, Róth E, **Rácz B**. PACAP attenuates excitotoxic retinal injury by influencing apoptotic pathways in neonatal rats.  
J. of FEBS. 2006. 273:123.
21. Gasz B, Jancsó G, Bertók Sz, **Rácz B**, Alotti N, Róth E. Expression of CD97 and adhesion molecules on circulating leukocytes in patients undergoing coronary artery bypass surgery.  
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 149.
22. Cserepes B, Jancsó G, **Rácz B**, Gasz B, Ferencz A, Benkő L, Róth E. Cardioprotective effect of urocortin in the process of postconditioning.  
Eur. Surg. Res. 2006. 38: 151-152.
23. Cserepes B, Jancsó G, **Rácz B**, Gasz B, Ferencz A, Benkő L, Borsiczky B, Füredi R, Ferencz S, Kürthy M, Gaszner B, Lantos J, Róth E. Cell protective role of urocortin in myocardial pre- and postconditioning.  
J. Mol. Cell Cardiol. 2006. 40: 959-960.
24. Róth E, Cserepes B, Gasz B, **Rácz B**, Lantos J, Kürthy M, Gaszner B, Jancsó G. Ischaemic and pharmacological preconditioning induces heme oxygenase-1 expression in cultured myocardium.  
J. Mol. Cell Cardiol. 2006. 40: 959.
25. Ferencz A, **Rácz B**, Gasz B, Kalmár-Nagy K, Tamás A, Reglődi D, Róth E. Intracellular signalling and histological examination of PACAP treatment on small bowel.  
J. of FEBS. 2006. 273: 123.
26. Reglődi D, Tamás A, Kiss P, Lubics A, Gasz B, Borsiczky B, Jr. Gallyas F, Tóth G, Róth E, **Rácz B**. PACAP attenuates excitotoxic retinal injury by influencing apoptotic pathways in neonatal rats.  
J. of FEBS. 2006. 273: 123.

## Előadások

1. **Rácz B**, Reglődi D, Tamás A, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábrriel R. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Protect Against Monosodium Glutamate Toxicity In The Rat Retina. (poszter)  
A Magyar Idegtudományi Társaság XI. Kongresszusa (MITT), Pécs, 2005. január 26-29.
2. **Rácz B**, Gasz B, Fodor B, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Osmotic stress induced signal transduction pathways in chondrocytes during acute haemarthrosis- an in vitro study. (előadás)  
XXXX. Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Konya, Törökország, 2005. május 25-28.
3. **Rácz B**, Reglődi D, Tamás A, Dénes V, Kiss P, Lengvári I, Gábrriel R. PACAP védő hatásának vizsgálata monosodium glutamate kezelés következtében kialakuló retinális károsodásban. (poszter)  
A Magyar Anatómus Társaság XIII. Kongresszusa (MAT), Pécs, 2005. június 17-18.
4. **Rácz B**, Gasz B, Tamás A, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Activation of signal transduction pathways in chondrocytes under hyperosmotic conditions. (poszter)  
30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Magyarország, 2005. július 2-7.
5. **Rácz B**, Gasz B, Cserepes B, Ferencz A, Fodor B, Dávid Sz, Reglődi D, Róth E, Borsiczky B. Ozmotikus stressz indukálta jelátviteli útvonalak vizsgálata chondrocytákon. (előadás)  
Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebészeti Szekció XX. Jubileumi Kongresszusa, 2005. szeptember 8-10, Hajdúszoboszló.
6. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. (poszter)  
7th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Rouen, Franciaország, 2005. szeptember 11-14.

7. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Gallyas F Jr, Sümegi B, Róth E, Reglődi D. Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. (előadás)  
Signaling Mechanisms of VIP, PACAP and Related Peptides: Contribution of Genomics, Proteomics and Bioinformatics, Mont-Saint-Aignan, Franciaország, 2005. szeptember 15.
  
8. **Rácz B**, Tamás A, Kiss P, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr., Tóth G, Róth E, Reglődi D. Signaling pathways involved in the protective effects of PACAP in MSG-induced retinal degeneration. (poszter)  
International IBRO Workshop, Budapest, Magyarország 2006. január 26-28.
  
9. **Rácz B**, Reglődi D, Benkő L, Ferencz A, Cserepes B, Róth E, Borsiczky B. The effects of adenylate cyclase activating polypeptide and the possible signalling pathways involved in chondrocytes during hyperosmotic conditions. (előadás)  
41st Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Rostock, Németország, 2006. május 17-20.
  
10. **Rácz B**, Reglődi D, Fodor B, Gasz B, Benkő L, Ferencz A, Tamás A, Jr. Gallyas F, Róth E, Borsiczky B. PACAP increases chondrocyte survival through acting on apoptosis signalling pathways. (poszter)  
31th FEBS Congress, Istanbul, Törökország, 2006. június 24-29.
  
11. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr., Tamás A, Lubics A, Kiss P, Róth E, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, D Reglődi. Effects of PACAP in oxidative stress-induced damage in endothelial cells. (poszter)  
23rd Conference of European Comparative Endocrinologist, Manchester, Anglia, 2006. augusztus 29-szeptember 2.
  
12. **Rácz B**, Gallyas F Jr., Gasz B, Tamás A, Lubics A, Kiss P, Róth E, Tóth G, Lengvári I, Hegyi O, Wittmann I, Reglődi D. A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása az endothel sejtek túlélésében. (poszter)  
XI. MITT Konferencia, Szeged, 2007. január 24-27.
  
13. **Rácz B**, Gasz B, Gallyas F Jr., Kiss P, A Tamás, Józsa R, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Róth E, Reglődi D. Common antiapoptotic mechanism in the neuro- and cardioprotective effects of PACAP. (poszter)  
III. Neurotoxicity Society Meeting, Pucon, Chile, 2007. március 23-29.

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 61,893

Összes publikációk impakt faktora: 35,4016

Témához kapcsolódó publikációk impakt faktora: 15,439

Összes idézettség: 26

Összes idegen idézettség: 10