

# **DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS**

---

## **A PACAP PROTEKTÍV SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A VESÉBEN IN VITRO ÉS IN VIVO**

**DR. LÁSZLÓ ESZTER**

**TÉMAVEZETŐ:**

**PROF. DR. REGLÓDI DÓRA** egyetemi tanár

**DR. HORVÁTH GABRIELLA** egyetemi docens

**DOKTORI ISKOLA VEZETŐ** (Elméleti Orvostudományok): Prof. Dr. Szekeres Júlia

**PROGRAMVEZETŐ** (Neuroendokrinológia és neurohisztológia): Prof. Dr. Reglődi Dóra



**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
ANATÓMIAI INTÉZET**

**PÉCS  
2020**

## Tartalom

1. Bevezetés .....	7
1.1. Ischaemia-reperfüziós vesekárosodás .....	7
1.2. Gentamicin indukálta nephrotoxicitás.....	11
1.3. Vesekárosodás – nemi különbségek.....	11
1.4. PACAP .....	13
1.4.1. Általános ismertetés .....	13
1.4.2. A PACAP szerepe az urogenitalis rendszerben.....	14
1.4.3. PACAP-génhiányos egerek .....	16
1.4.4. PACAP és nemi különbségek .....	17
2. Célkitűzések .....	19
3. Az exogén PACAP hatásának vizsgálata hím és nőstény patkányok ischaemia-reperfüzio okozta vesekárosodása során.....	20
3.1. Anyagok és módszerek.....	20
3.1.1. Kísérleti állatok.....	20
3.1.2. Műtét .....	20
3.1.3. Morphometriai analízis.....	21
3.1.4. Citokinexpresszió tanulmányozása .....	22
3.1.5. Antioxidáns és oxidatívstressz-markerek vizsgálata.....	22
3.1.6. Jelátviteli útvonalak tanulmányozása.....	23
3.1.7. Statisztikai analízis.....	27
3.2. Eredmények .....	27
3.2.1. Morphometriai analízis.....	27
3.2.2. Citokinexpresszió tanulmányozása .....	31
3.2.3. Antioxidáns és oxidatívstressz-markerek vizsgálata.....	34
3.2.4. Jelátviteli útvonalak tanulmányozása (RT-PCR, Western blot és immunhisztokémiai eredmények) .....	35
3.3. Megbeszélés.....	42
4. Az endogén PACAP hatásának tanulmányozása ischaemia-reperfüziós vesekárosodás során PACAP-génhiányos egerekben .....	46
4.1. Anyagok és módszerek.....	46

4.1.1.	Kísérleti állatok.....	46
4.1.2.	Műtét .....	47
4.1.3.	Morphometriai analízis.....	47
4.1.4.	Western blot – jelátviteli útvonalak vizsgálata.....	48
4.1.5.	Citokinexpresszió tanulmányozása.....	49
4.1.6.	Antioxidáns markerek vizsgálata.....	50
4.1.7.	Statisztikai analízis.....	50
4.2.	Eredmények .....	51
4.2.1.	Morphometriai analízis .....	51
4.2.2.	Western blot – jelátviteli útvonalak vizsgálata .....	53
4.2.3.	Citokinexpresszió tanulmányozása.....	56
4.2.4.	Antioxidáns markerek vizsgálata.....	61
4.3.	Megbeszélés.....	64
5.	A PACAP szerepének vizsgálata gentamicin indukálta nephrotoxicitásban HK-2 sejtvonalon.....	68
5.1.	Anyagok és módszerek.....	68
5.1.1.	A vizsgált sejt kultúra.....	68
5.1.2.	MTT assay .....	68
5.1.3.	Vese biomarker array .....	69
5.1.4.	Statisztikai analízis.....	69
5.2.	Eredmények .....	70
5.2.1.	Sejttúlélés – MTT assay .....	70
5.2.2.	Vese biomarker array .....	71
5.3.	Megbeszélés.....	74
6.	Összefoglalás, új eredmények ismertetése, megbeszélés .....	76
7.	Irodalomjegyzék.....	79
8.	Saját közlemények.....	97
	Köszönetnyilvánítás .....	99

## FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AC	adenylyl cyclase
AKT/PKB	protein kinase B
ANOVA	analysis of variance
ATP	adenosine triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BLC	B lymphocyte chemoattractant
BMP	bone morphogenetic protein
BMPR	bone morphogenetic protein receptor
BSA	bovine serum albumin
C	complement
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
CNTF	ciliary neurotrophic factor
ColIV	collagen IV
Cyr	cysteine-rich protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
DPPIV	dipeptidyl peptidase IV
DTNB	5,5-dithiobis-2-nitrobenzoicacid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)-tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GSH	glutathione
HE	haematoxylin-eosin

HK	human kidney
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon
IL	interleukin
IP	interferon-gamma inducible protein
IR	ischaemia-reperfusio
IU	international unit
iv.	intravénás
KC	keratinocyte chemoattractant
LH	luteinizing hormone
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP	monocyte chemoattractant protein
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MDA	malondialdehyde
MIG	monokine induced by gamma interferon
MIP	macrophage inflammatory protein
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NKT	natural killer T (-cells)
NO	nitrogén-monoxid
OD	optical density
6-OHDA	6-hydroxydopamine
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAC1R	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor
PAS	periodic acid Schiff
PBS	phosphate-buffered saline
PBST	phosphate-buffered saline/Tween
PFA	paraformaldehyde
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C

PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PTSD	posttraumatic stress disorder
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
RUNX	runt-related transcription factor
SDF	stromal cell-derived factor
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sICAM	soluble intercellular adhesion molecule
SMAD	"small" worm phenotype, "mothers against decapentaplegic"
SOD	superoxide dismutase
SOX	Sry-box transcription factor
TBS	tris-buffered saline
TCA	trichloroacetic acid
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
TREM	triggering receptor expressed on myeloid cells
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIP	vasoactive intestinal peptide
VPAC	vasoactive intestinal peptide receptor
WNT	wingless-related integration site

# 1. BEVEZETÉS

---

## 1.1. ISCHAEMIA-REPERFUSIÓS VESEKÁROSODÁS

Az ischaemia-reperfusiós vesekárosodás komoly problémát jelent a klinikai gyakorlatban, az acut veseelégtelenség fontos kiváltója lehet, chronicus vesekárosodás kifejlődéséhez vezethet, vagy a már fennálló vesekárosodás végstádiumú veseelégtelenséggé történő progresszióját segítheti elő. Különböző pathológiás folyamatok vezethetnek ischaemia-reperfusiós vesekárosodáshoz, úgymint hypotensio, sepsis, shock, műtét során vagy azt követően fellépő hypoperfusio, vérzés, a veseereket érintő kórfolyamatok (Bonventre et Yang 2011, Dare et al. 2015). Elkerülhetetlen következménye továbbá a vesetranszplantációnak, kihatással van a rövid-és hosszútávú kimenetelre egyaránt, a graft késői beindulását, rejectiót vagy chronicus grafdysfunctiót eredményezhet (Salvadori et al. 2015).

Egy adott szerv/szövet vérellátásának megszűnése anyagcseréjének károsodásához, akár irreverzibilis elváltozások kialakulásához vezet. A véráramlás helyreállása pedig paradox módon tovább rontja a szerv/szövet állapotát. Tehát mind az ischaemia, mind a reperfusio során szenved el károsodást az adott struktúra. Az ischaemia-reperfusio kiváltotta vesekárosodás pathofiziológiája rendkívül komplex, melyben egyaránt szerepet kapnak apoptoticus, inflammatoricus folyamatok, valamint az oxidatív stressz. A neutrophilek aktivációja, reaktív oxigénszabadgyökök, valamint egyéb gyulladáshoz vezető mediátorok - úgymint adhéziónak és számos citokin- felszabadulása mind a folyamat részét képezik (Maryam et Mehdi 2015).

A vese ischaemia-reperfusio egy inflammatoricus kaszkád elindulásához vezet, a gyulladás fő mediátorai chemokinek (MCP-1, IL-8, RANTES), melyek proinflammatoricus citokineket (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ ), adhéziónak és számos citokin- felszabadulása mind a folyamat részét képezik (Maryam et Mehdi 2015). A vese ischaemia-reperfusio egy inflammatoricus kaszkád elindulásához vezet, a gyulladás fő mediátorai chemokinek (MCP-1, IL-8, RANTES), melyek proinflammatoricus citokineket (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ ), adhéziónak és számos citokin- felszabadulása mind a folyamat részét képezik (Maryam et Mehdi 2015). Az sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule) és a P-selectin adhéziónak molekula szerepet játszik a leukocyták toborzásában és a postischaemiás szövet neutrophilek által történő infiltrációjában, mely endothel-leukocyta interakciókhoz vezet, az endothelsejtek duzzadását és ezáltal a véráramlás csökkenését előidézve. Mivel a gyulladás, a leukocyták és adhéziónak fontos szerepet töltenek be az ischaemia-reperfusiós károsodás folyamatában, bármely ágens, mely képes az inflammatoricus folyamatokat mérsékelni, hasznos lehet az ischaemia-reperfusiós károsodás csökkentésében/kivédésében (Devarajan 2006,

Maryam et Mehdi 2015). Az inflammatoricus folyamatok szabályozásában a BMP (bone morphogenetic protein)-család is szerepet játszik. A BMP-k a TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta)-családhoz tartozó, filogenetikailag konzervált jelátviteli molekulák. Fontos szerepet töltenek be a vese normális fejlődésének szabályozásában, de a vese szerkezetének és funkciójának fenntartásában is szerephez jutnak. Több tanulmány is igazolta, hogy a BMP-molekulák farmakológias dózisban történő adagolása képes állat modellben az acut és chronicus vesekárosodás mérséklésére, habár a mechanizmus még nem teljesen tisztázott. Az exogén BMP alkalmazása ugyanakkor több mellékhatással is bír, hiszen a BMP-receptorok előfordulása a szervezetben szerteágazó. Tanulmányokban számos vesekárosodás kapcsán a BMP7 szintjének csökkenését tapasztalták, úgymint ischaemia-reperfusio során, kontrasztanyag indukálta nephropathiában, cyclosporin A indukálta nephrotoxicitásban, diabeteses nephropathiában, hypertensiv nephrosclerosisban és pyelonephritisben (Nakamura et Yanagita 2012). A BMP7 farmakológias dózisban történő alkalmazása az acut és chronicus vesekárosodás esetén egyaránt kedvező hatással bír, a vese különböző sejtjein számos hatást fejt ki: gátolja az inflammatoricus citokinek expresszióját, mérsékli a gyulladással járó sejtes infiltrációt, csökkenti a tubularis hámsejtek apoptosist, valamint a fibrosist (Nakamura et Yanagita 2012). Ismert, hogy a BMP2 downregulációja ischaemia-reperfusio során hozzájárulhat egy a sejtproliferáció és apoptózis közötti imbalance kialakulásához, ezáltal károsodás kialakulásához vezetve (Maryam et Mehdi 2015). A BMP2 lényegében egy fibrosis-antagonizáló citokinként működhet a vesében a TGF- $\beta$  downregulációja révén (Yang et al. 2009). A BMP4 a kollagén IV-szintézis szabályozásán keresztül befolyásolja a basalis membrán integritását (Parkin et al. 2011). A renalis tubulusokban a kollagén IV szükséges a BMP-jelátvitel normális aktiválásához (Bunt et al. 2010).

A mitogénaktivált proteinkinázok különböző stimulusok hatására -úgymint ischaemia-aktivált jelátviteli útvonalak kulcsfontosságú enzimeik. Számos folyamat résztvevői, beleértve a gyulladást, proliferációt, differenciációt és apoptosist. Ismert, hogy a p38MAPK (mitogen-activated protein kinase) aktivitásának gátlása a renalis ischaemia-reperfusió károsodás mérsékléséhez vezet (Wang et al. 2017, Yeda et al. 2017). A vese ischaemia-reperfusió károsodása során az ERK (extracellular signal-regulated kinase) jelátviteli útvonal is aktiválódik, az ERK megnövekedett foszforilációjához vezetve. Habár az ERK-útvonal bizonyítottan szerepet játszik a sejtnövekedésben és a differenciációban, egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy az ERK aktivációja hozzájárul a károsodáshoz és az apoptoticus sejthalálhoz (Alderliesten et al. 2007).



Az Akt/PKB (protein kinase B) jelátviteli útvonal számos sejtfunkciót – többek között a proliferációt és a sejttúlélést – befolyásol, továbbá szerepet játszik a hypoxia-ischemia elleni védelmi válaszban (Zhang et al. 2018). Bizonyított, hogy az Akt-útvonal aktivációján keresztül az ischaemia-reperfúziós vesekárosodás enyhíthető (Hosszu et al. 2017, Hu et al. 2018).

A komplementrendszer aktivációját is igazolták már ischaemia-reperfúziós folyamatokban, ami számos biológiailag aktív terméket (pl. C3a, C4a, C5a) eredményez, melyek proinflammatoricus hatással bírnak, valamint az adhézións molekulák aktivitását is upregulálják. A C5a egy erős chemoattractans, mely gyulladássos sejtek – neutrophilek, monocyták, T-sejtek – toborzását segíti el. A vese azon szervek egyike, ahol a C5a-receptor normális körülmények között expresszálódik a tubularis epithelialis sejteken, valamint az interstitialis macrophagokon. Ischaemia-reperfúzió hatására a C5a-receptor erős upregulációja figyelhető meg. A komplementrendszer szerepének felismerése új, az ischaemia-reperfúziós károsodást kedvezően befolyásoló stratégiák megszületéséhez vezetett, a specifikus C5a-receptorantagonista például protektívnek bizonyult renalis ischaemia-reperfúzió során (Devarajan 2006, Maryam et Mehdi 2015).

A reaktív oxigénszabadgyökök szerepe az ischaemia-reperfúziós vesekárosodás pathogenezisében jól ismert. A reperfúzió során a hypoxanthin xanthin-oxidáz által xanthinná történő konverziója hidrogén-peroxidot és szuperoxidot generál. Vas jelenlétében a hidrogén-peroxid a rendkívül reaktív hidroxilgyök képződéséhez vezet. Az ischaemia ugyanakkor a NO (nitrogén-monoxid)-szintázt is indukálja a tubulussejtekben, a keletkező NO a szuperoxiddal reagálva peroxinitrát-képződést idéz elő, ami a proteinek nitrozilációján keresztül sejt-károsodást indukál. Tehát az ischaemia-reperfúzió során a károsodott szövetből reaktív oxigénszabadgyökök nagy mennyisége szabadul fel, megváltozik a mitochondrialis oxidatív phosphorilatio, ATP (adenosine triphosphate) depletio alakul ki, az intracellularis calciumszint emelkedik, és aktiválódnak a membránphospholipid-proteázok. Mindez oxidatív stresszhez vezet, mely a membránlipidek peroxidációján, valamint a proteinek és a DNS oxidatív károsodásán keresztül apoptosist indukál. Az antioxidáns enzimrendszer (szuperoxid-dizmutáz, kataláz, glutathion-peroxidáz) downregulációja szintén szerepet kap az ischaemia-reperfúziós károsodás pathomechanizmusában. Így ezen útvonal gátlása, valamint a szabadgyökök mennyiségének csökkentése az ischaemia-reperfúzió által előidézett

eltérések mérséklésének egyik fontos alappilléret képezheti (Devarajan 2006, Maryam et Mehdi 2015).

Bizonyított, hogy az apoptózis a tubulussejtek pusztulása révén szignifikáns mértékben hozzájárul az ischaemia következtében kialakuló renalis dysfunctióhoz. A proximalis tubulussejtek kifejezetten érzékenyek az acut ischaemiára, károsodásuk, elpusztulásuk, leválásuk (az inflammatio mellett) primeren felelős az ischaemia-reperfüziós károsodás pathofiziológiájáért, a klinikai aspektusokért. A tubulussejtek elvesztése számos anyag (víz, ionok, makromolekulák) kontrollálatlan paracelluláris diffúziójához vezet. A leváló tubulussejtek más sejtörmelékkel együtt a tubuluslumenbe kerülve aggregálódhatnak, öntvényeket formázva, melyek a tubulusok obstructióját okozhatják. A peritubularis kapillárisok eltömeszelődhetnek az infiltráló leukocyták miatt, mely a lokális vérellátás romlásához, az ischaemia fokozódásához vezethet (Havasi et Borkan et 2011).

A humán ischaemiás acut vesekárosodás morfológiai jellegzetességei közé sorolható a proximalis tubulusok kefeszegélyének károsodása, eltűnése, a tubulussejtek foltos elvesztése, focalisan proximalis tubularis dilatatio kialakulása, valamint a distalis tubulusban öntvények megjelenése. A peritubularis kapillárisok vascularis congestiója is előforduló morfológiai eltérés. Az ischaemia kezdetben a tubulussejtek sublethalis károsodását idézi elő, mely a kefeszegély, valamint a sejt és citoskeleton polaritásának elvesztéséhez vezet. Ha a károsodás nem enyhül, a folyamat progrediál, a sejtek elpusztulnak, desquamálódnak, luminalis obstructio alakulhat ki, az inflammatoricus folyamatok fontos szerephez jutnak. Az apoptózis és gyulladás csökkentése ezen a szinten még terápiás lehetőség lehet (Devarajan 2006).

Számos leukocyta-szubsztípus aggregatiója kimutatható a peritubularis kapillárisokban, az interstitiumban és a tubulusokban. Elsőként a neutrophilek aktivációja következik be, melyet a macrophagok követnek, az MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) tubulussejtekben történő upregulációjára adott válaszként (Devarajan 2006). A tubularis epithelium azonban nem csupán passzív elszennvedője a károsodásnak, hanem az ischaemia-reperfüzióra adott inflammatoricus válasz aktív résztvevője a vesében. A sérült tubularis epithelium proinflammatoricus citokineket és chemokineket bocsát ki, melyek elősegítik az immunsejtek toborzását. A hámsejtek adhézíós molekulákat, toll-like receptorokat, T-sejt kostimulátor molekulákat expresszálnak, melyek az immunsejtek aktivációján keresztül a gyulladásos folyamat fokozódásához vezetnek. A neutrophilek, macrophagok és NKT (natural killer T)-sejtek a tubulushám direkt károsodását idézik elő (Bonventre et Yang 2011).

## **1.2. GENTAMICIN INDUKÁLTA NEPHROTOXICITÁS**

Az aminoglikozidok csoportjába tartozó gentamicint – mely a Gram- infekciók esetében széleskörben alkalmazott antibiotikum – a gyógyszer indukálta nephrotoxicitás egyik vezető okaként tartják számon, az acut vesebetegség mintegy 20%-áért tehető felelőssé. Mivel a gentamicin a mai napig gyakran használt, effektív antibiotikum, és a nephrotoxikus hatás kb. 10-20%-ban előfordul, fontos olyan módszerek feltérképezése, melyek segítségével a káros hatás mérsékelhető. Nincs egyértelmű módszer a gentamicinszint monitorozására, de a napi egyszeri adagolás tanulmányok szerint csökkenteni képes a nephrotoxicitás előfordulását (Chen et Kaye 2009, Lopez-Novoa et al. 2011, Randjelovic et al. 2017, Vicente-Vicente et al. 2017).

A gentamicin glomeruláris filtratio révén aktívan eliminálódik a vesében, majd kb. 3-5%-a reabsorbeálódik a proximalis tubulusban. A kialakult toxicitás – mely elsősorban inflammatoricus és oxidatív folyamatokon keresztül valósul meg – azon sejtekhez köthető, melyekben a gentamicin akkumulálódik, így a vesében elsősorban a proximalis tubulus sejteiben, mely epithelsejtek apoptosisa/necrosisa révén tubularis károsodást okoz. Az expozíciótól függően előfordulhat, hogy a sejtek csak funkcionálisan érintettek, azonban a sejtek pusztulásához vezető intoxicatio is létrejöhet. Az acut tubularis necrosis súlyossága a tubularis dysfunctiótól egészen a masszív tubularis degenerációig terjed (Lopez-Novoa et al. 2011, Randjelovic et al. 2017, Vicente-Vicente et al. 2017).

Ismert továbbá, hogy a gentamicin számos membránkött enzim és transzportrendszer aktivitását is befolyásolni képes. Bizonyítást nyert, hogy a gentamicin a dipeptidil-peptidáz IV (DPPIV) suppressióját idézi elő nyúl proximalis tubulussejteken (Blais et al. 1993).

## **1.3. VESEKÁROSODÁS – NEMI KÜLÖNBSÉGEK**

A klinikai gyakorlatban a különböző etiológiájú vesekárosodások progressziójában nemi különbségek lelhetők fel, általában kedvezőbb kimenetellel a nők esetében. Több tanulmányban is igazolódott mindez, többek között leírásra került, hogy az acut vesekárosodás a hospitalizált férfiak körében magasabb arányban fordul elő, mint a nőknél (Neugarten et al. 2018), a chronicus vesebetegség előfordulása ritkább a nők esetében, továbbá a végstádiumú veseelégtelenségé történő progresszió is lassabb (Lima-Posada et al. 2017, Mehier et al. 2017). Mindezen előny azonban a menopausával

eltűnni látszik (Carrero 2010, Mehier et al. 2017). Bizonyított, hogy a legtöbb élettani és pathofiziológiai folyamat a két nemben eltérő módon zajlik. A nők esetében tapasztalható kedvezőbb prognózis háttérében azonban különböző okokat feltételeznek.

Az állatkísérleteket többnyire hím állatokon végzik, így nőstényekkel kapcsolatban viszonylag kevés adat áll rendelkezésre a témában. Bizonyításra került, hogy ischaemiás károsodás kiváltotta acut veseelégtelenségben különbség áll fenn az állatok túlélésében, a vese érzékenysége a két nemben eltérő, a hím állatok veséje szenzitívebb az ischaemiára. Az észlelt nemi különbségért a tanulmányban elsősorban az androgén hormonokat tették felelőssé, mivel az ivaréretlen állapot, valamint az előzetes castratio csökkentette a károsodást. A nőstényeknek adagolt tesztoszteron azonban nem csökkentette érdemben a túlélést, ami arra engedett következtetni, hogy a háttérben nem a tesztoszteron, hanem más androgén hormon szerepe állhat. Ugyanakkor az ösztrogén is jelentőséggel bír. Ivarérett hím patkányoknál alkalmazott ösztradiolkezelés jótékony hatásúnak bizonyult, az ivaréretlen, valamint ovariectomizált nőstényeknél pedig a túlélés mérsékelt csökkenése volt megfigyelhető. A hím állatok túlélésére a castratio, valamint az ivaréretlen állapot kedvezőbb hatással bírt, mint az ösztrogénkezelés. Mindezek alapján a tanulmányban arra a következtetésre jutottak, hogy az androgén hormonok mennyiségének csökkenése a túlélés szempontjából még az ösztrogén nagyobb mennyiségénél is kedvezőbb hatású (Muller et al. 2002).

Egy másik tanulmányban igazolták, hogy az ischaemia-reperfusio hím patkányokban a tesztoszteronszint csökkenésével jár együtt, a tesztoszteroninfúzió (az ösztradiollá történő konverziótól függetlenül) képes a károsodás mérséklésére, a pontos mechanizmus azonban nem tisztázott. Ezen tanulmányban tehát elsősorban a csökkent tesztoszteronszinttel magyarázták a hímekben kialakuló súlyosabb elváltozásokat (Soljancic et al. 2013).

Egy további tanulmányban bizonyítást nyert, hogy a tesztoszteron jelenléte az ösztrogén hiányánál fontosabb szereppel bír a nemi különbségek kialakulásában renalis ischaemia-reperfusio során. Tesztoszteron adagolása növelte a nőstény patkányok érzékenységét, a castratio a károsodás csökkenéséhez vezetett, azonban az ovariectomia nem befolyásolta érdemben a kialakuló károsodás mértékét (Park et al. 2004).

Egy egereken végzett tanulmányban arra a következtetésre jutottak, hogy a hím nem ischaemia-reperfusiók vesekárosodásra nagyobb fogékonyságot jelent, egy felfokozott inflammatoricus válaszon keresztül. A kísérlet során a nőstények ellenállóbbak voltak ischaemia-reperfusio során. A hím állatok castratiója csökkentette az ischaemia-

reperfusio indukálta tubularis károsodást és a macrophag-infiltrációt castratió után nem esett társaikhoz képest. A tesztoszteron supplementációja azonban visszafordította ezt a jótékony hatást. Az ösztrogéndepletio a nőstény állatokban fokozott tubularis károsodáshoz és kifejezettebb macrophag-infiltrációhoz vezetett. Ovariectomizált nőstényeknél alkalmazott ösztrogénpótlás képes volt a károsodás mérséklésére (Kang et al. 2014)

A női kedvezőbb kimenetel háttérében tehát különböző okokat feltételeznek, egy azonban közös a témában született vizsgálatokban: valamennyi a nemi hormonok eltéréseivel, változásaival magyarázza a vesekárosodásban tapasztalt nemi különbségeket.

## **1.4. PACAP**

### **1.4.1. Általános ismertetés**

A PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) egy 1989-ben Arimura professzor és munkacsoportja által felfedezett neuropeptid, mely neuroprotektív és általános cytoprotektív hatásokkal rendelkezik. A secretin/glucagon/VIP (vasoactive intestinal peptide) peptidcsalád tagja, két biológiailag aktív formában van jelen a szervezetben: az emlős szervezetben közel 90%-ban előforduló 38 aminosavas PACAP38 és a 27 aminosavas PACAP27 formájában. A PACAP mindkét formáját az ADCYAP1 gén kódolja. A két forma N-terminálisa megegyezik, azonban a PACAP38 C-terminálisán 11 további aminosav található. A filogenezis során a PACAP biológiailag aktív régiójának szekvenciája rendkívüli mértékben konzervált maradt, mely bizonyíthatja, hogy ezen fehérje létfontosságú élettani funkciókért felelhet. Ismertek azonban (N-terminálisan) rövidebb fragmensek is, melyek közül a leggyakrabban alkalmazott a PACAP6-38, mely a PAC1- és VPAC2-receptor jelátvitelét gátolja (Vaudry et al. 2009). Meglepő módon azonban bizonyos sejteken (chondrocyta, retinoblastoma, cytotrophoblast) agonistaként viselkedik (Juhász et al. 2014, Liu et al. 2000, Reglodi et al. 2008, Wojcieszak et Zawilska 2014).

A PACAP lebontásáért a dipeptidil-peptidáz IV (DPP-IV) enzim felelős, felezési ideje a szisztémás keringésben mindösszesen néhány perc. A foszfolipidmembránokhoz történő kötődése azonban a peptid nagyfokú stabilitásához vezet, meggátolva ezzel további degradációját (Vaudry et al. 2009, Zhu et al. 2003).

A PACAP és G-protein-kötött receptorainak (PAC1 (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor), VPAC (vasoactive intestinal peptide receptor) 1 és 2) jelenlétét a központi idegrendszerben és a perifériás szervekben egyaránt kimutatták. A VPAC1 és VPAC2 a PACAP-ot és VIP-et egyforma erősséggel kötik, azonban a PAC1 2-3 nagyságrenddel nagyobb affinitást mutat a PACAP-hoz. A VPAC1 és 2 aktivációja a cAMP (cyclic adenosine monophosphate) vagy cGMP (cyclic guanosine monophosphate) szintjének emelkedéséhez vezet, míg a PAC1-receptor aktivációja AC (adenylyl cyclase), PLC (phospholipase C) és PKC (protein kinase C) által közvetített útvonalakat aktivál. A PACAP specifikus PAC1-receptorának 8 splice variánsa ismert, mely különböző secunder messengerek aktivációját idézheti elő (Vaudry et al. 2009).

A PACAP rendkívül széleskörű élettani hatással rendelkezik, szinte valamennyi szervrendszer működését befolyásolja (Toth et al. 2020a). Fontos szerepet tölt be az endocrin és exocrin mirigyek szabályozásában (Bardosi et al. 2016, Kanasaki et al. 2016, Sasaki et al. 2017), de jelentősége nem elhanyagolható a cardiovascularis és a gastrointestinalis rendszerben sem (Ivic et al. 2017, Parsons et May 2019, Vu et al. 2016). Leginkább neuroprotektív hatásairól ismert (Reglodi et al. 2011, 2017, 2018d), de igazolták retinoprotektív hatását is (Werling et al. 2017), valamint bizonyítást nyert általános sejtvédő hatása többek között oxidatív stressz és doxorubicin indukálta szívkárosodásban (Gasz et al. 2006, Mori et al. 2010), ischaemiás és gyulladással eredetű bélbetegségekben (Horvath et al. 2016, Heimesaat et al. 2017), endotoxin indukálta légúti gyulladásban (Elekes et al. 2011) és dermatitisben (Kemeny et al. 2010). Protektív hatása kapcsolatban van a növekedési faktorként betöltött funkciójával az idegrendszerben és a perifériás szervekben, bizonyított, hogy különböző szervek fejlődésében fontos szereppel bír (Farkas et al. 2017b, Fulop et al. 2019, Juhasz et al. 2015, Watanabe et al. 2016). A PACAP esetleges diagnosztikus/prognosztikus biomarkerként történő alkalmazásával kapcsolatban is született már tanulmány (Toth et al. 2020b).

### **1.4.2. A PACAP szerepe az urogenitalis rendszerben**

Több tanulmány is foglalkozott már a PACAP és receptorai előfordulásának, valamint a PACAP hatásának vizsgálatával az urogenitalis rendszerben. Munkacsoportunk immunhisztokémiai módszer alkalmazásával igazolta a PAC1-receptor jelenlétét a vesében, mely expressziója a corticalis tubularis epithelsejteken bizonyult a

legkifejezettebbnek (Brubel et al. 2011). Egy későbbi tanulmányban a VPAC1-receptor bizonyult dominánsnak a humán vesében, jelenléte a proximalis tubularis epithelsejteken és a glomerularis podocyteken volt kimutatható (Eneman et al. 2016). A PACAP38 jelenlétét patkány vesében tömegspektrometriás módszerrel mutattuk ki, a PACAP szintjének változása ischaemia-reperfusio során is igazolást nyert munkacsoportunk vizsgálataival (Brubel et al. 2011, Szakaly et al. 2010). PACAP38- és PACAP27-immunreaktivitás egyaránt kimutatásra került patkány ureter-, húgyhólyag- és urethrasejteken (Fahrenkrug et Hannibal 1998). A PACAP receptorainak (PAC1, VPAC1, VPAC2) jelenlétét is igazolták az alsó urogenitalis tractusban (Girard et al. 2010).

Bizonyított, hogy a PACAP hatást gyakorol a vizeletürítésre és az érző beidegzésre egyaránt (Arms és Vizzard 2011, Heppner et al. 2019, Ojala et al. 2019). Ismert, hogy a PACAP a PAC1-receptoron keresztül képes stimulálni a renin secretióját, a PACAP27 intravénás alkalmazása pedig vasodilatációhoz és a véráramlás fokozódásához vezet a vesében (Gardiner et al. 1994, Hautmann et al. 2007).

Különböző vesekárosodások kapcsán (*in vivo* és *in vitro* egyaránt) igazolták már a PACAP védő szerepét (Horvath et al. 2019, Reglodi et al. 2012a). A PACAP protektívnek bizonyult diabeteses nephropathiában (Banki et al. 2014), egy tanulmány (Sakamoto et al. 2015) a PACAP-ot diabeteses nephropathia esetén lehetséges terápiás lehetőségként is említi, a glomerularis podocyteken kifejtett antiinflammatoricus hatása révén. Kontrasztanyag indukálta nephropathia esetén is hatásosnak mutatkozott a PACAP *in vitro*, HK (human kidney)-2 sejteken és *in vivo*, eger vesén egyaránt (Khan et al. 2013). Patkány modellen *in vivo* a többször iv. (intravénásan) alkalmazott PACAP-injectio a TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha)-szint gentamicin által előidézett emelkedését mérsékelni tudta (Li et al. 2008b). Az immunmodulátor hatással bíró cyclosporin klinikai alkalmazásának nephrotoxikus hatása gyakran gátat szab. Több tanulmány (*in vitro* és *in vivo*) is bizonyította, hogy a PACAP a cyclosporin A által előidézett vesekárosodást csökkenteni képes (Khan et al. 2011). A PACAP renoprotektív hatása a kemoterápiás szerként széleskörben használt cisplatin indukálta vesekárosodás során is igazolást nyert *in vivo* és *in vitro* (Li et al. 2010a, 2011). Myeloma nephropathia kapcsán számos tanulmány bizonyította a PACAP protektív hatását (Arimura et al. 2006 a,b, Li et al. 2006, 2007, 2008 a,b). A PACAP humán kipróbálása is megtörtént egy myelomában szenvedő önkéntes betegen. A PACAP-infúziót követően az élettani és a vesefunkciós paraméterekben nem következett be változás, azonban a vizeletben ürített lambda

könnyűlánc mennyiségének csökkenése volt megfigyelhető a PACAP hatására (Li et al. 2007).

A PACAP ischaemia-reperfúziós vesekárosodásban betöltött szerepével kapcsolatban néhány tanulmány már született (Laszlo et al. 2014), többek között munkacsoportunk hím patkányokban különböző időtartamú ischaemia esetén igazolta a protektív hatást, azonban nőstényekkel kapcsolatban nem állt rendelkezésre irodalmi adat. Egyszeri iv. PACAP-kezelés hatására csökkent mortalitást, valamint kisebb mértékű szövettani károsodást tapasztaltunk a hím patkányokban (Szakaly et al. 2008). A Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) szintjének ischaemia-reperfúzió hatására bekövetkező csökkenését is mérsékelni tudta a PACAP (Horvath et al. 2010b). *In vitro* is igazolódtott a PACAP védő hatása. Patkányok veséjéből készített sejtkultúrán hidrogén-peroxiddal kiváltott oxidatív stressz esetén csökkent sejttúlélés volt megfigyelhető, melyet a PACAP-kezelés képes volt javítani (Horvath et al. 2011). Egér ischaemia-reperfúziós vesekárosodásban is bizonyították a PACAP protektív hatását, az intraperitonealis PACAP-kezelés hatására mérséklődött a szövettani károsodás (Li et al. 2010b). A tanulmány az ischaemia-reperfúziós károsodásban szerepet játszó toll-like receptorok jelentőségére is rávilágított.

### **1.4.3. PACAP-génhiányos egerek**

A PACAP-génhiányos egerekben (homozigóta: PACAP  $-/-$  és heterozigóta: PACAP  $+/-$ ) az endogén PACAP hiánya/csökkent szintje különböző *in vivo/in vitro* behatásokkal szemben fokozott érzékenységhez vezet az idegrendszerben és a perifériás szervekben egyaránt, azonban néhány különbség alapesetben is megfigyelhető PACAP  $+/+$  (vad) társaikhoz képest. A PACAP-génhiányos egerek fertilitási rátája alacsonyabb, továbbá magasabb mortalitási ráta is megfigyelhető esetükben (Lajko et al. 2018, Reglodi et al. 2012b, 2018a, Shintani et al. 2002).

Hőmérsékleti érzékenység, anyagcsere-változások, megnövekedett inzulinérzékenység, légzőszervi abnormalitások, húgyhólyag-dysfunctio jellemzi őket (Gray et al. 2001, Hamelink et al. 2002, May et Vizzard 2010, Tanaka et al. 2004, Tomimoto et al. 2008, Wilson et Cummings 2008). A korai öregedés jelensége is megfigyelhető a génhiányos egerek esetében (Reglodi et al. 2018b), a szisztémás senilis amyloidosis megjelenése gyorsított (Reglodi et al. 2018c). Depressziószerű viselkedést mutatnak, különböző stressz-szituációkra abnormális válasszal reagálnak, továbbá hyperaktivitás is jellemzi őket (Farkas et al. 2017a, Hashimoto et al. 2001, 2011, Reglodi et al. 2012b). A fejlődés



során is szereppel bír az endogén PACAP, a génhíányos egerek fogaiban talált eltérések jól bizonyítják a PACAP fogfejlődésben betöltött szerepét (Fulop et al. 2019, Sandor et al. 2016). A PACAP-génhíányos egerekben a femur nagyobb fragilitása a PACAP csontfejlődésben játszott szerepére világított rá (Jozsa et al. 2018).

Bizonyítást nyert, hogy különböző ischaemia-reperfüziós sérülésre is fokozott szenzitivitással reagálnak a PACAP-génhíányos egerek. Cerebralis ischaemia esetén a homo- és heterozigóta génhíányos egerekben egyaránt nagyobb volt az infarctusos terület kiterjedése, valamint súlyosabb volt a neurológiai deficit. A károsodás súlyossága exogén PACAP alkalmazásával csökkenthetőnek bizonyult (Ohtaki et al. 2006). A bilateralis carotiscclusio következtében kialakuló retinalis ischaemia esetén a génhíányos egerekben szignifikánsan rosszabbnak mutatkozott a szövettani kimenetel, az exogén PACAP viszont képes volt a károsodás mérséklésére (Szabadfi et al. 2012). Vékonybél-ischaemia kapcsán is súlyosabb eltérések figyelhetők meg a génhíányos egerekben (Ferencz et al. 2010 a,b). Az endogén PACAP képes az oxidatív stressz és hypoxia hatására létrejövő renalis károsodás mérséklésére, melyet jól bizonyít, hogy hiányában *in vitro* a sejtek túlélése csökken, melyre az exogén PACAP alkalmazása jótékony hatással bír (Horvath et al. 2010 a,c).

Colitis modellben (Azuma et al. 2008, Nemetz et al. 2008), doxorubicin indukálta cardiomyopathiában (Mori et al. 2010), endotoxin kiváltotta légúti gyulladásos modellben (Elekes et al. 2011), valamint allergiás kontakt dermatitisben (Kemeny et al. 2010) egyaránt érzékenyebben reagálnak a PACAP-génhíányos egerek, továbbá megnövekedett érzékenységgel bírnak glükó- és lipotoxicitás esetén (Nakata et al. 2010, Sakurai et al. 2011). Ismert továbbá, hogy a PACAP-génhíányos egerekben szignifikánsan magasabb a reaktív oxigénmetabolitok mennyisége, ugyanakkor az antioxidáns hatás a plazmában alacsonyabb (Ohtaki et al. 2010). Ezen tény is alátámasztja, hogy az endogén PACAP hiányában fokozódik a szövetek/szervek érzékenysége különböző káros behatásokkal szemben.

#### **1.4.4. PACAP és nemi különbségek**

A PACAP hatásával kapcsolatban nemi különbségeket illetően viszonylag kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Parkinson-kór állatkísérletes modelljében alkalmazott PACAP-kezelés hatására igazolást nyertek nemi különbségek (Reglodi et al 2006 a,b). A kasztrált hím patkányokban a 6-OHDA által előidézett sejtpusztulást a PACAP - a

kasztráláson át nem esett állatokhoz képest - számottevően nem befolyásolta (Reglodi et al 2006a). Ugyanezen kísérletes Parkinson-kór modellben a nőstény patkányokban a PACAP nem befolyásolta a dopaminergsejt-veszteséget, azonban ovariectomizált állatokban képes volt a sejtpusztulást mérsékelni (Reglodi et al 2006b). Továbbá a PACAP LH (luteinizing hormone)-release-re kifejtett hatásában is igazoltak különbségeket hím és nőstény patkányok között (Szabo et al. 2004). Rövidtávú étel- és vízmegvonást követően az agyban a PACAP szintjének emelkedése tekintetében találtak nemi különbségeket (Kiss et al. 2007). Koplalást követően a PAC1-receptor hypothalamicus mRNS-expressziójában is bizonyítást nyertek eltérések (Iwasa et al. 2016). A hímek és nőstények stresszre adott eltérő válaszára a PACAP-expressziót illetően talált nemi különbségek részben magyarázattal szolgálhatnak (Mosca et al. 2015). A stresszválasszal kapcsolatban bizonyították a PACAP-rendszer ösztrogénfüggő szabályozását, mely a PTSD (posttraumatic stress disorder) tünettanát, diagnózisát illetően nemi különbségek magyarázatául szolgálhat (Ressler et al. 2011). A PACAP-PAC1R útvonalban fellépő, ösztrogén modulálta zavar a PTSD hátterében fennálló abnormalis félelmi reakciók kialakulásában szerepet játszik (Ramikie et Ressler 2016). A stressz szintje és a keringő nemi hormonok a két nemben eltérő módon regulálják a PACAP-rendszert, mely a humán pszichiátriai betegségekben jelen levő diszkrepanciákra részben magyarázattal szolgálhat (King et al. 2017). A PAC1R-jelátvitel nemspecifikus szerepét igazolták a fenyegetéssel társult jelek tanulásában (Kirry et al. 2018).

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

---

Számos tényező vezethet vesekárosodás kialakulásához, melyek közül igen gyakori, és komoly klinikai problémát jelent az ischaemia-reperfusio által kiváltott, valamint a széleskörben használt gentamicin antibiotikum által előidézett vesekárosodás.

PhD-munkám során így a cél e két vesekárosodás tanulmányozása, és esetleges terápiás lehetőségként a széleskörben bizonyított cytoprotektív hatással bíró, az emberi szervezetben is megtalálható, antiapoptoticus, antiinflammatoricus, valamint az antioxidáns rendszert kedvezően befolyásoló funkcióval rendelkező PACAP vizsgálata volt.

- Az ischaemia-reperfusió vesekárosodás tanulmányozása *in vivo* hím és nőstény patkányokban, továbbá az exogén PACAP szerepének vizsgálata mindkét nemben, az esetleges protektív hatás, valamint a nemi különbségek feltérképezése céljából.
- PACAP-génhiányos egerek (PACAP  $-/-$  és PACAP  $+/-$ ) felhasználásával a szervezetben jelen levő, endogén PACAP funkciójának tanulmányozása ischaemia-reperfusió vesekárosodás modellben *in vivo*.
- Gentamicin indukálta nephrotoxicitásban a PACAP szerepének vizsgálata HK-2 sejtvonalon *in vitro*.

### **3. AZ EXOGÉN PACAP HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA HÍM ÉS NŐSTÉNY PATKÁNYOK ISCHAEMIA- REPERFUSIO OKOZTA VESEKÁROSODÁSA SORÁN**

---

#### **3.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

##### **3.1.1. Kísérleti állatok**

Felnőtt hím és nőstény Wistar patkányok (n=112, 250–300 g) szolgáltak kísérletünkben alanyként, állatházi tartásuk 12 órás sötét/világos ciklusban történt, szabad hozzáférést engedve a vízhez és táplálékhoz.

Összesen 12 kísérleti csoportot állítottunk fel:

- kontroll (kezeletlen) hím patkányok (100 µl fiz. só iv.) -  
24 óra/48 óra/14 nap reperfusio
- kontroll (kezeletlen) nőstény patkányok (100 µl fiz. só iv.) -  
24 óra/48 óra/14 nap reperfusio
- PACAP-kezelt hím patkányok (100 µg PACAP/300 ttg 100 µl fiz. sóban oldva iv.) - 24 óra/48 óra/14 nap reperfusio
- PACAP-kezelt nőstény patkányok (100 µg PACAP/300 ttg 100 µl fiz. sóban oldva iv.) - 24 óra/48 óra/14 nap reperfusio

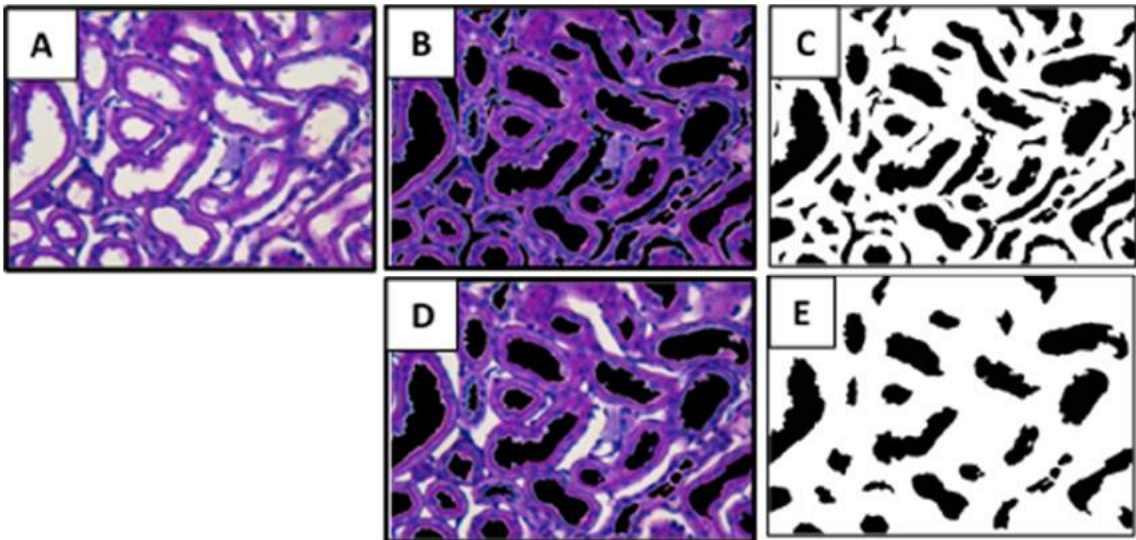
A kísérlet a BA02/2000-24/2011 számú engedély előírásainak betartásával történt. A nőstény patkányok esetében az ösztroz ciklus fázisának meghatározása céljából hüvelyi kenetezést végeztünk, hogy a műtetre minden állat esetében ugyanazon periódusban (ösztroz fázisban) kerüljön sor.

##### **3.1.2. Műtét**

A kísérleti állatokat a műtét előtt intraperitonealis ketamin-xylazin anaesthesiában részesítettük, majd a patkányok fele intravénásan (jugularis véna) PACAP-ot kapott. Total median laparotomiát követően a bal vesét 60 percre kirekesztettük a keringésből. A műtét teljes időtartama alatt az állatok hőmérsékletét egy melegítő lap segítségével konstansan tartottuk. A kirekesztés felengedését követően zártuk a hasfalat, majd 24 óra/48 óra/14 nap elteltével az állatok terminálásra kerültek, veséjüket további feldolgozás céljából eltávolítottuk.

### 3.1.3. Morphometriai analízis

A patkányokat anaesthesiát követően PBS (phosphate-buffered saline)-, majd 4%-os PFA (paraformaldehyde)-oldattal perfundáltuk, a veséket eltávolítottuk, és 4%-os PFA-oldatban utófixálást végeztünk. A veséket paraffinba ágyasztuk, és rutin szövettani eljárással 5 µm vastagságú PAS/H (periodic acid Schiff/haematoxylin) és HE (haematoxylin-eosin) festett metszeteket készítettünk, melyeket digitális Nikon FXA fotomikroszkóppal elemeztük, a képeket digitális kamerával (Spot RT color kamera) rögzítettük. A kiértékelés során Adobe Photoshop version 10.0 és Scion Image 1.47 programot használtunk. Minden metszeten 10 – gyakorlatilag csak tubulusokat tartalmazó – látóteret vizsgáltunk. A tubularis lumen területarányát határoztuk meg, mely alapján a tubularis epithelium károsodására következtethetünk. A tubularis lument és a peritubularis kapillárisokat manuálisan jelöltük, fekete színbe konvertáltuk, míg a megmaradó – tubularis epitheliumnak megfelelő – területet fehérbe (1. ábra). Méréseink során a tubularis lumen területarányát fejeztük ki a teljes tubulusterülethez képest. A teljes tubulusterületet megkaphatjuk, ha a látótér teljes területéből kivonjuk a peritubularis kapillárisok területét (1. ábra).



1. ábra Morphometriai analízis - a tubularis lumen területarány-mérésének menete.

A: PAS/H festett szövettani metszet fotója. B és C: a fekete szín a tubularis lument és a peritubularis kapillárisokat jelöli, C: a tubularis epithelium fehér. D és E: a fekete szín a tubularis lument reprezentálja, E: a tubularis epithelium és a peritubularis kapillárisok fehér színnel jelöltek.

$Tubularis\ lumen\ területaránya = E / (összterület - C + E)$ , ahol az összterület: a teljes látótérnek megfelelő terület.

### **3.1.4. Citokinexpresszió tanulmányozása**

24 órával az ischaemia-reperfúziót követően a hím és nőstény patkányok eltávolított veséiből citokin array-t végeztünk (Proteome Profiler Rat Cytokine Array Kit, Panel A, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Az array a nitrocellulóz membránra kötött antitestek és a mintában levő fehérjék közti kötésen alapul. Az array-t a gyártó utasításai szerint végeztük. A veséket proteázgátlókat tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk. Triton X-100-at adtunk hozzá, 1%-os végső koncentrációt elérve. A mintákat -80°C-on lefagyasztottuk, és az újbóli felolvadást követően 5 percig centrifugáltuk (10000 rpm). A minták fehérjetartalmának meghatározását követően a citokinek/chemokinek elleni antitesteket kötött formában tartalmazó nitrocellulóz membránokat blokkoló pufferben 1 órán keresztül inkubáltuk. A pufferben oldott homogenizált mintákhoz 15 µl biotinilált antitestet pipettáztunk, majd szobahőmérsékleten 1 órát inkubáltuk. A nitrocellulóz membránok blokkolását követően a biotinilált antitest-homogenizált minta keveréket a membránokra helyeztük, és 4°C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a membránokat pufferben 3x10 percig mostuk. A mosás után pufferben oldott tormaperoxidáz-konjugált streptavidint adtunk minden membránhoz, fél órán át inkubáltuk, majd háromszori mosást követően chemilumineszcens detektáló reagenst (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) alkalmaztunk, és a filmeket előhívtuk. A kiértékelés során az immunpozitivitás pixeldenzitását ImageJ 1.40 szoftver segítségével határoztuk meg.

### **3.1.5. Antioxidáns és oxidatívstressz-markerek vizsgálata**

24 órával az ischaemia-reperfúziót követően a hím és nőstény patkányok eltávolított veséiből antioxidáns és oxidatívstressz-markerek meghatározását végeztük.

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

A glutathion (GSH) szintjének meghatározását a Sedlak és Lindsay által leírtak szerint végeztük (Sedlak et Lindsay 1968). A mintákhoz 10%-os triklórecetsavat adtunk, majd a vesehomogenizátumokat 15 percig 4000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszó 2 ml-éhez

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

A szuperoxid-dizmutáz (SOD) meghatározása során a vesehomogenizátumokat 20 percig 16000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk, majd a felülúszóból a Misra és Firdovich által (Misra et Firdovich 1972) leírt módszerrel mértük a SOD aktivitását. A SOD gátolja az adrenalin-adrenochrom átalakulást, melynek absorptiós maximuma 480 nm-en van. A kapott értékeket IU (international unit)/g szövettömegre adtuk meg.

### **3.1.6. Jelátviteli útvonalak tanulmányozása**

24 és 48 órával az ischaemia-reperfúziót követően a hím és nőstény patkányok eltávolított veséiből a jelátviteli útvonalak tanulmányozása céljából RT-PCR (real-time polymerase chain reaction), Western blot és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk.

#### **3.1.6.1. RT-PCR**

A jelátviteli elemek RNS-expressziós profiljának vizsgálatához első lépésként az összegyűjtött sejtekből RNS-t izoláltunk. TRIzol reagensben (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) való feloldás után 20 %-os RNáz-mentes kloroformot adtunk a mintákhoz, amelyet centrifugálás követett 4°C-on, 10000 g-n, 15 percig. Az ekkor megjelenő felső vizes fázist 500 µl RNáz-mentes izopropanolra rétegeztük rá, majd 1 óráig -20°C-on tároltuk, amelyet ismételt centrifugálás követett. Az így nyert totál RNS-t RNáz-mentes vízben oldottuk fel, és a felhasználásig -20°C-on tároltuk. A mintáink tisztaságát az RNS koncentrációjának mérésével ellenőriztük Nanodrop készülék (Nanodrop1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) segítségével, és azonos koncentrációt állítottunk be. Az RNS cDNS-sé írásához 2 µg/20 µl RNS-t, 0,112 µM oligo(dT)-t, 0,5 mM dNTP-t (deoxyribonucleotide triphosphate), 200 egység High Capacity RT-t (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) és 1x RT-puffert tartalmazó premixet használtunk. Az így kapott cDNS-t polimeráz-lánreakció elvén programozható termosztát (Labnet MultiGene™ 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet International, Edison, NJ, USA) segítségével ciklikusan felsokszoroztuk. A mastermixet 1 µl sense és antisense primerből (0,4 µM), 0,5 µl dNTP (200 µM), 5 egység ProMega GoTaq® DNS-polimerázból és 1x reakciópufferből állítottuk össze, majd 1 µl minta hozzáadása után 11 µl végtérfogattal dolgoztunk. (2. ábra)

A PCR-termékek futtatását 1,2%-os ethidium-bromidot tartalmazó agarózgélén végeztük. Az eredményeinket géldokumentációs (FluorChem™ E system, Proteinsimple, California, USA) rendszerrel elemeztük és dokumentáltuk, a kiértékelést pedig az ImageJ 1.40 programmal végeztük. Az eredményeinket optikai denzitás (OD) formájában kaptuk meg, és a kezeletlen minták eredményeivel hasonlítottuk össze. Belső kontrollként aktint használtunk.

2. ábra Nukleotidszekvenciák, amplifikációs helyek, GenBank azonosítási számok (ID), amplimerméretek és a PCR reakció körülményei minden egyes primerpár esetén.

<i>Gén</i>	<i>Primer</i>	<i>Nukleotidszekvencia (5'→3')</i>	<i>GenBank ID</i>	<i>Annealing hőmérséklet</i>	<i>Amplimer méret (bp)</i>
<b>BMP2 (Bmp2)</b>	sense	AAG CCA GGT GTC TCC AAG (697–714)	<b>NM_017178.1</b>	53°C	209
	antisense	AAG TCC ACA TAC AAA GGG TG (886–905)			
<b>BMP4 (Bmp4)</b>	sense	TAG TCC CAA GCA TCA CCC (876–893)	<b>NM_012827.2</b>	53°C	294
	antisense	TCG TAC TCG TCC AGA TAC AAC (1149–1169)			
<b>BMPRI (Bmpr1a)</b>	sense	CCA TTG CTT TGC CAT TAT (240–257)	<b>NM_009758.4</b>	47°C	487
	antisense	TTT ACC AAC CTG CCG AAC (709–726)			
<b>Kollagén IV. típus (Col4a1)</b>	sense	TCG GCT ATT CCT TCG TGA TG (4963–4982)	<b>NM_007735.2</b>	56°C	209
	antisense	GGA TGG CGT GGG CTT CTT (5154–5171)			
<b>Aktin (Actb)</b>	sense	GCC AAC CGT GAA AAG ATG A (419–437)	<b>NM_007393.5</b>	54°C	462
	antisense	CAA GAA GGA AGG CTG GAA AA (861–880)			
<b>PKA (Prkaca)</b>	sense	GCA AAG GCT ACA ACA AGG C (847–865)	<b>NM_008854</b>	53°C	280
	antisense	ATG GCA ATC CAG TCA ATC G (1109–1126)			
<b>Smad1 (Smad1)</b>	sense	AGC ACC TAC CCT CAC TCC C (935–953)	<b>NM_013130.2</b>	56°C	306
	antisense	GAA ACC ATC CAC CAA CAC G (1222–1240)			



### **3.1.6.2. Western blot**

Proteázgátlókat (aprotinin (10 ug/ml), 5 mM benzamidin, leupeptin (10 ug/ml), tripszininhibitor (10 ug/ml), 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 5 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 1 mM EGTA (ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)-tetraacetic acid), 8 mM Na-fluorid, 1 mM Na-orthovanadát) is tartalmazó homogenizáló RIPA (radioimmunoprecipitation assay) pufferben (150 mM NaCl, 1,0% NP40, 0,5% nátrium-deoxykolát, 50 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), pH 8,0) vettük fel a mintákat. Az előkészített szövetmintát  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a felhasználásig. A kísérlet kezdetén 30 másodperces szonikálással teljes sejtlizátumot készítettünk. A feltárást követően a mintákat Laemmli elektroforézis mintapuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 10% SDS, 100 mM  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,01% brómfenolkék) hozzáadásával és 10 percig történő forralással készítettük elő. Fehérjemeghatározás segítségével a mintákat azonos koncentrációra állítottuk be. A fehérjéket 7,5%-os SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) használatával 120 V feszültség mellett választottuk el egymástól izoelektromos pontjuk és moláris tömegük alapján. Ezt követően nitrocellulóz membránra transzferáltuk az elválasztott fehérjéket Turbo blot (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) segítségével 7 perc 300 mA áramerősséggel. Az aspecifikus kötőhelyeket 5%-os tejjel (5 g tejjel, 100 ml PBS) blokkoltuk  $3 \times 10$  percig történő ráztatás közben. Ezt PBST-vel (phosphate-buffered saline/Tween) történő lemosás követte. A PKA (protein kinase A), P-PKA (phospho-protein kinase A), BMPR1 (bone morphogenetic protein receptor 1), BMP2 (bone morphogenetic protein 2), BMP4 (bone morphogenetic protein 4), Smad1 ("small" worm phenotype, "mothers against decapentaplegic"), ColIV (collagen IV) fehérjéket vizsgáltuk. A primer antitesteket (3. ábra) egy éjszakára  $4^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk a membránokon. Másnap újabb PBST-vel történő lemosás következett  $3 \times 10$  percig, majd az anti-nyúl tormaperoxidáz-konjugált (1:1500) és anti-egér tormaperoxidáz-konjugált (1:1500) sekunder antitestek (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) bekötődésének biztosítására 2 óráig szobahőmérsékleten hagytuk a membránokat. Az előhíváshoz chemilumineszcens folyadékot (Advansta Inc., Menlo Park, CA, USA) használtunk, a jeleket a FluorChem E (Fluorchem E, ProteinSimple, CA, USA) géldokumentációs rendszerrel rögzítettük. A hím állatok mintáiból származó jelek ezzel a módszerrel nem voltak vizualizálhatók, így SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA)-ot alkalmaztunk a gyártó leírásának megfelelően. A megjelenő jelek OD értékét az

ImageJ 1.40 programmal értékeltük, belső kontrollként pedig aktint használtunk. A kapott eredményeket a kezeletlen minták eredményeivel hasonlítottuk össze.

### **3.1.6.3. Immunhisztokémia**

A szöveteket Saint-Marie oldatban (99% etanol, 1% vízmentes ecetsav) történő fixálás és 70%-os etil-alkoholos, majd 3×10 percig tartó PBST-s mosást követően beágyaztuk és lemetszettük (5 µm-es metszetek). Egyenként 100 µl PBST-ben oldott 1%-os BSA (bovine serum albumin)-val blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket nedves kamrában, 30 percre 37°C-ra helyezve őket. 3×10 perces mosás után tettük rá a primer antitestet (anti-BMP4, anti-BMPR1, anti-Smad1 és anti-ColIV) (3. ábra), majd egy éjszakára 4°C-on hagytuk. Ezen ellenanyagokat Alexa 555-tel jelölt anti-nyúl/Alexa 488-cal jelölt anti-egér (1:1000) (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) antitestek hozzáadásával tettük láthatóvá. Magfestőt (DAPI-4',6-diamidino-2-phenylindole) tartalmazó Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, Anglia) fedőanyaggal fedtük le mintáinkat. Negatív kontrollként primer antitestet nem tartalmazó összeállításban ismételtük meg a kísérletünket a secunder antitest fals bekötődésének kizárása céljából. A különböző felvételek készítése során ugyanazokat az expozíciós időket használtuk, hogy a felvételek összehasonlíthatóak legyenek. A BMPR1 és ColIV vizsgálata során Nikon Eclipse E800 mikroszkópot használtunk Olympus DP72 kamerával (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). A Smad1 és BMP4 subcelluláris lokalizációjának megjelenítéséhez Olympus FV1000S konfokális mikroszkópot (Olympus Corporation, Tokyo, Japán) alkalmaztunk.

3. ábra A kísérletekben használt antitestek listája

<i>Antitest</i>	<i>Gazdaállat</i>	<i>Hígítás</i>	<i>Forgalmazó</i>
<b>Anti-Col IV.</b>	egér, monoklonális	1:500	Abcam, Cambridge, UK
<b>Anti-PKA</b>	nyúl, poliklonális	1:800	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
<b>Anti-P-PKA</b>	nyúl, poliklonális	1:600	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
<b>Anti-BMP2</b>	egér, monoklonális	1:500	Abcam, Cambridge, UK
<b>Anti-BMP4</b>	nyúl, poliklonális	1:600	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
<b>Anti-BMPR1</b>	egér, monoklonális	1:600	Abcam, Cambridge, UK
<b>Anti-Smad1</b>	nyúl, poliklonális	1:600	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
<b>Anti-Aktin</b>	egér, monoklonális	1:10000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

### **3.1.7. Statisztikai analízis**

A kapott eredmények statisztikai értékelése SPSS 15.0 szoftver segítségével történt. A szövettani értékelés, a citokinexpresszió, valamint az antioxidáns és oxidatívstressz-markerek vizsgálata során kapott eredmények kiértékeléséhez varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni/Tamhane's post-hoc teszttel kiegészítve, a normális eloszlást Kolmogorov-Smirnov- és Shapiro-Wilk-teszt segítségével, a homogenitást Levene-próbával vizsgáltuk. A Western blot és a RT-PCR vizsgálat eredményei kétmintás t-próbával kerültek kiértékelésre. A  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## **3.2. EREDMÉNYEK**

### **3.2.1. Morphometriai analízis**

Ischaemia-reperfusio hatására elsősorban a proximalis tubulusokban a tubularis epithelium károsodása figyelhető meg, a hámsejtek veszítenek magasságukból, mely által a tubularis lumen részben látszólagos tágulata jön létre. Ezen eltérés a kontroll, PACAP-kezelésben nem részesült csoportokban kifejezettebbnek bizonyult a PACAP-kezelt csoportokhoz képest (4. és 5. ábra)

A hím kontroll patkányokban már 24 órás reperfúziót követően súlyos szövettani károsodás volt megfigyelhető, a tubularis epithelium ellapult, a tubuluslumen tágult, a 48 órás és 14 napos csoportok esetén nem tapasztaltunk érdemi rosszabbodást a 24 órás csoporthoz képest, az idő előrehaladtával számottevő progresszió nem volt észlelhető (4. és 5. ábra).

A nőstény kontroll patkányok szövettani eredményei 24 óra elteltével szignifikánsan jobbnak bizonyultak a hímekéhez képest, ugyan megfigyelhető volt súlyosbodás a szövettani eltérések tekintetében az idő elteltével (48 óra és 14 nap esetén szignifikánsan rosszabb szövettani eredmény a 24 órához képest), de csak 14 nap után volt tapasztalható a hím patkányokban már 24 órás reperfúziót követően kialakuló komolyabb szövettani károsodás (4. és 5. ábra).

A PACAP-kezelt csoportokban mindkét nem esetében szignifikánsan enyhébb eltéréseket találtunk a kontrollhoz képest, a PACAP-kezelés mindhárom

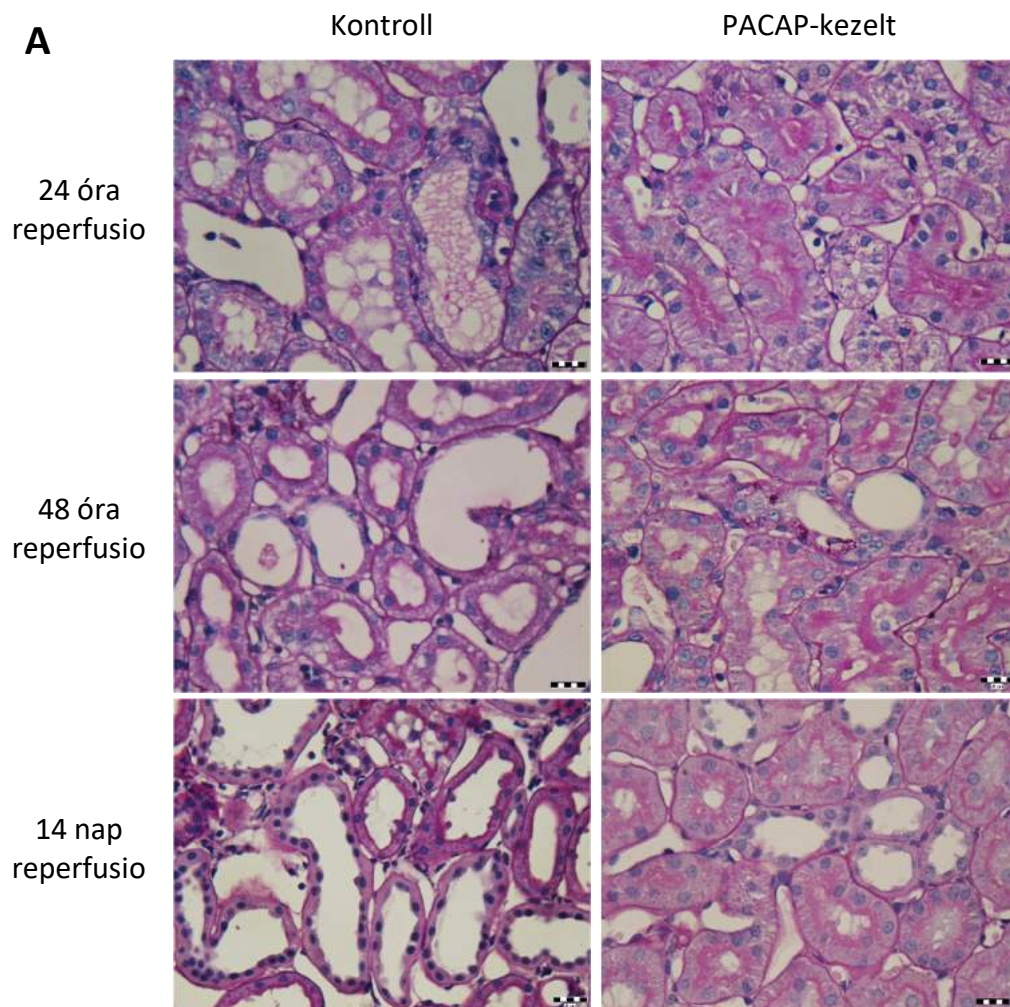
időintervallumban képes volt jelentősen mérsékelni a szövettani eltérések súlyosságát (4. és 5. ábra).

A hím patkányokban a PACAP-kezelés szignifikáns mértékben csökkentette a szövettani károsodást mindhárom csoport (24 óra/48 óra/14 nap reperfusio) esetében. Az idő múltával – a 24 órás csoporthoz képest szignifikáns mértékű – progresszió volt megfigyelhető (4. és 5. ábra).

A PACAP-kezelésben részesült nőstény patkányok eredményei a 48 órás és a 14 napos csoportban szignifikánsan jobbnak bizonyultak a kezeletlen nőstényekhez, valamint a PACAP-kezelt hímekhez képest is. Az idő előrehaladtával nem tapasztaltunk változást a tubularis károsodás súlyosságában, a PACAP-kezelt hímekkel és a kontroll nőstény patkányokkal ellentétben nem volt megfigyelhető a szövettani károsodás progressziója (4. és 5. ábra).

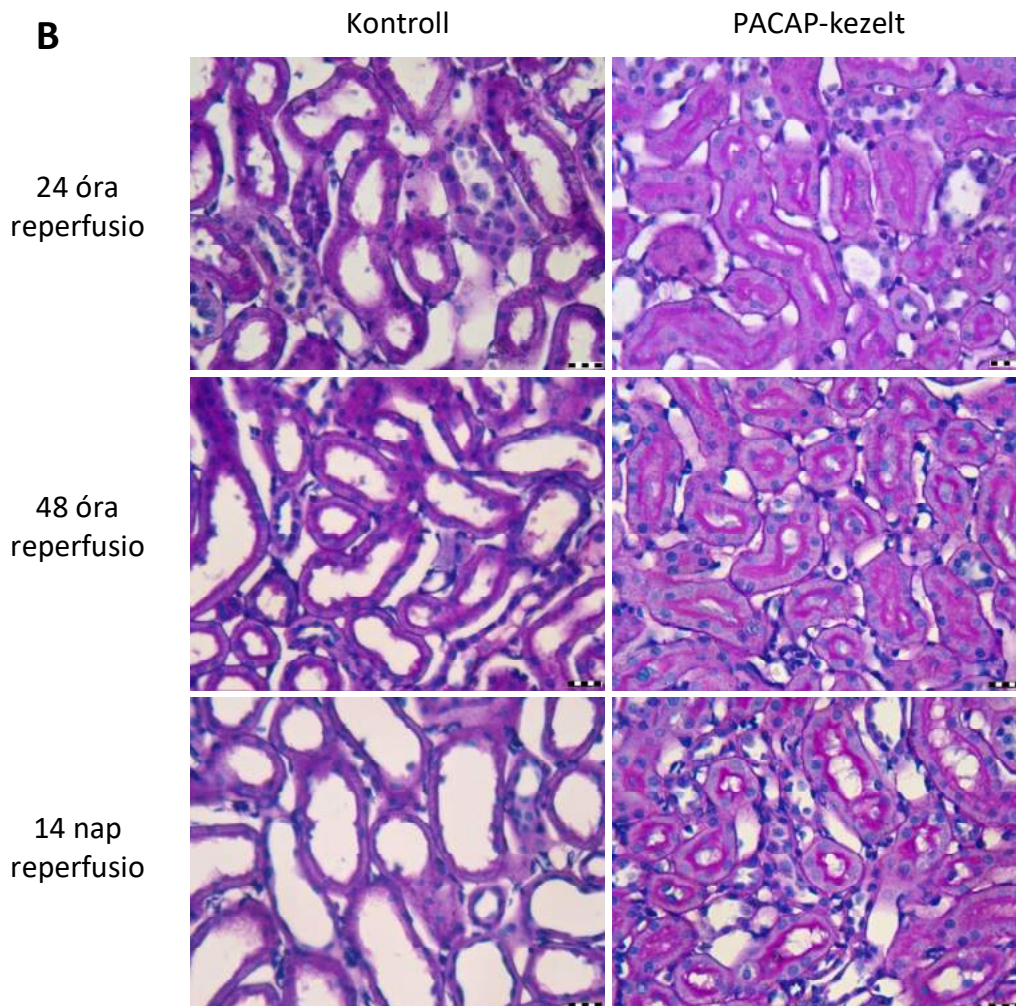
#### HÍM állatok

**A**



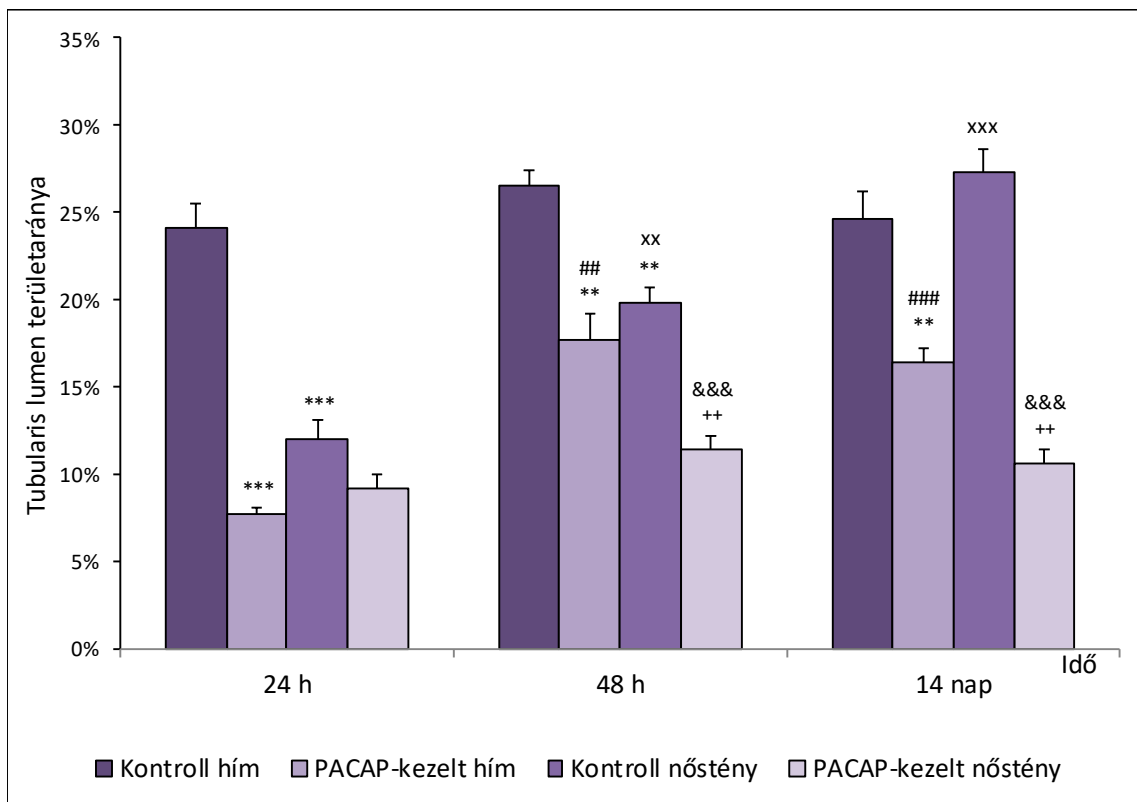
*Hím állatok veséjéből készült szövettani metszetek reprezentatív fotói*

## NŐSTÉNY állatok



*Nőstény állatok veséjéből készült szövettani metszetek reprezentatív fotói*

*4. ábra Reprezentatív fotók kontroll, valamint PACAP-kezelt hím (A) és nőstény (B) patkányok veséjéből készült PAS/H festett metszetekről az ischaemia-reperfuziót követően 24 óra/48 óra/14 nap elteltével. Aránymérték: 20µm.*



5. ábra A szövettani értékelés eredménye – a tubularis lumen területaránya kontroll, valamint PACAP-kezelt hím és nőstény patkányok veséjében. Az adatok átlag  $\pm$  SEM formában kerültek megadásra.

\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. időazonos kontroll hím,

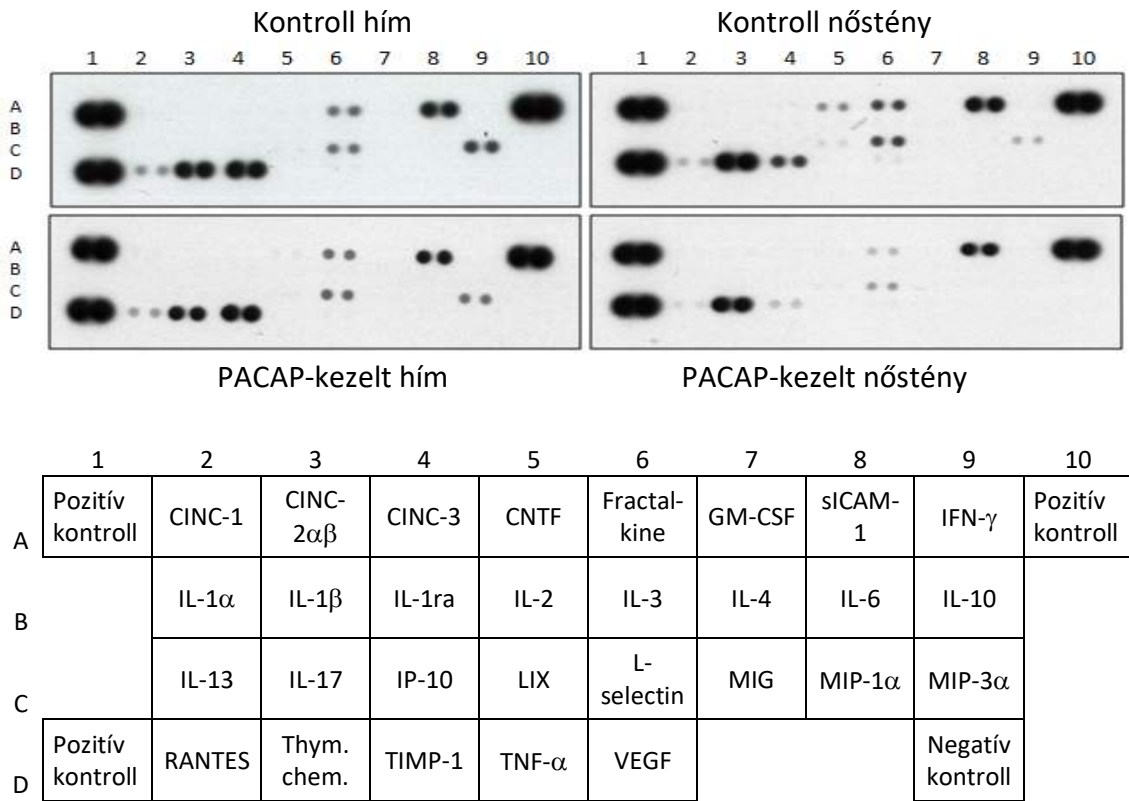
<sup>xx</sup> $p < 0,01$ , <sup>xxx</sup> $p < 0,001$  vs. 24 órás kontroll nőstény,

&&& $p < 0,001$  vs. időazonos kontroll nőstény,

## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  vs. 24 órás PACAP-kezelt hím,

<sup>++</sup> $p < 0,01$  vs. időazonos PACAP-kezelt hím

### 3.2.2. Citokinexpresszió tanulmányozása



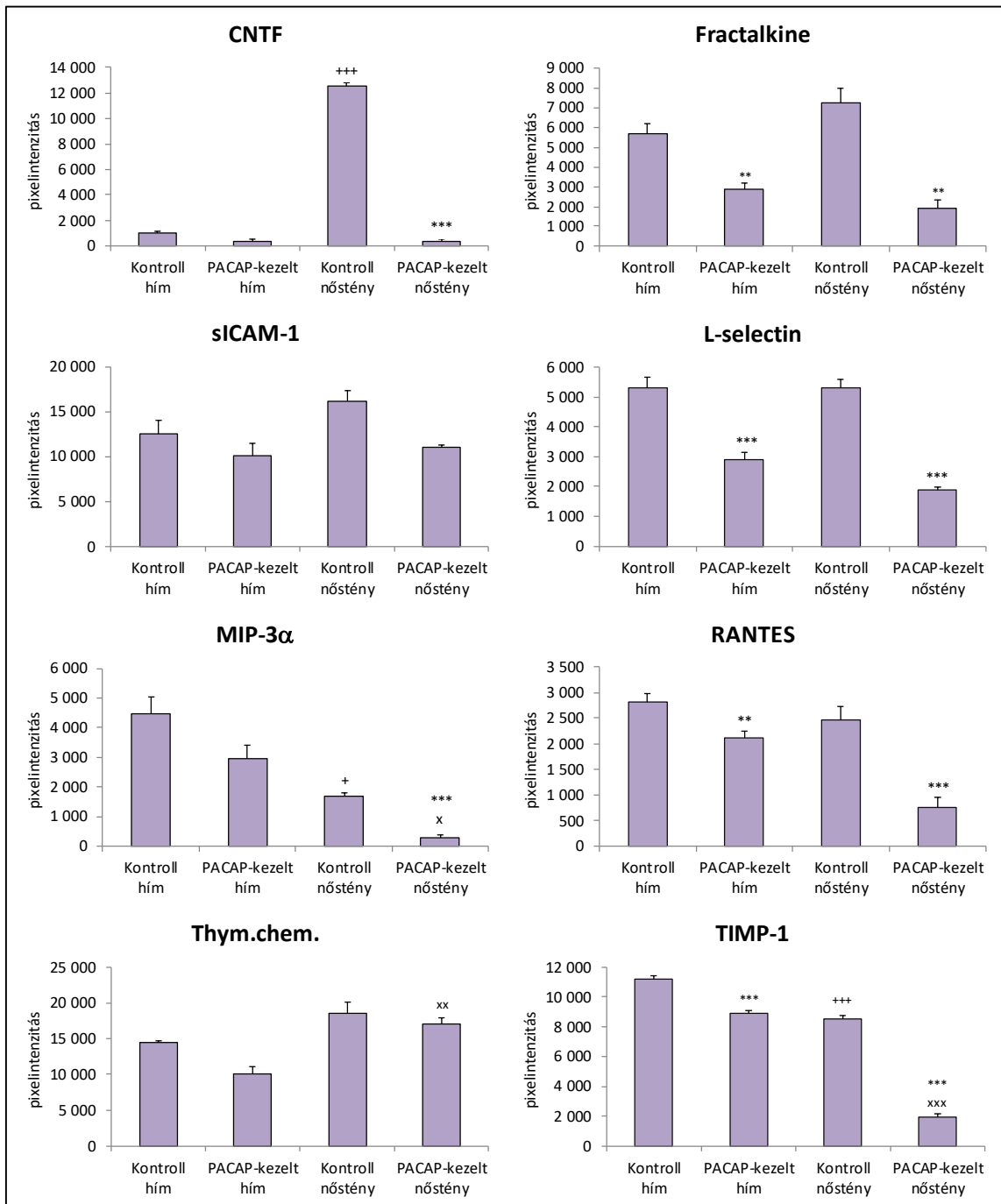
6. ábra Reprezentatív citokin array a kontroll, valamint PACAP-kezelt hím és nőstény patkányok veséje citokinexpressziós mintázatának demonstrálására ischaemia-reperfusiót követően 24 órával.

A membránokon a citokinek duplikátumban láthatók.

A vizsgált citokinek/chemokinek: CINC-1 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1), CINC-2 $\alpha\beta$  (cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2 $\alpha\beta$ ), CINC-3 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant 3), CNTF (ciliary neurotrophic factor), fractalkine, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1), IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ), IL-1 $\alpha$  (interleukin 1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ ), IL-1ra (interleukin-1 receptor antagonist), IL-2 (interleukin 2), IL-3 (interleukin 3), IL-4 (interleukin 4), IL-6 (interleukin 6), IL-10 (interleukin 10), IL-13 (interleukin 13), IL-17 (interleukin 17), IP-10 (interferon gamma-induced protein 10), LIX (lipopolysaccharide-induced CXC chemokine), L-selectin, MIG (monokine induced by gamma interferon), MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ), MIP-3 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$ ), RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), thymus chemokine, TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), VEGF (vascular endothelial growth factor).

Ischaemia-reperfüsiót követően a fractalkine, az L-selectin, a RANTES és az sICAM-1 expressziójában nem mutatkozott szignifikáns különbség a nemek között, PACAP-kezelés hatására a fractalkine, az L-selectin és a RANTES esetében mindkét nemből szignifikáns mértékű csökkenés volt megfigyelhető, mely a nőstények esetében azonban kifejezettebbnek bizonyult (6-7. ábra). A csökkenés mértéke az sICAM-1 tekintetében hasonló volt mindkét nemből, a csökkenés nem érte el a szignifikáns mértéket (6-7. ábra). Jelentős nemi különbséget tapasztaltunk a TIMP-1 és a MIP-3 $\alpha$  kapcsán, a hím patkányokban szignifikánsan magasabb expressziós szinttel, mind a kontroll, mind a PACAP-kezelt csoportban (6-7. ábra). PACAP-kezelés hatására mindkét nemből az expresszió csökkenése volt észlelhető, mely a nőstényekben a TIMP-1 és MIP-3 $\alpha$ , a hímekekben a TIMP-1 esetében szignifikánsnak bizonyult (6-7. ábra). A thymus chemokin kifejezettebb expresszióját találtuk a nőstény patkányokban a hímekekhez képest, mely a PACAP-kezelt nőstények esetében szignifikánsan magasabbnak mutatkozott, PACAP-kezelés hatására pedig mindkét nemből csökkenést tapasztaltunk (6-7. ábra). A CNTF jelenléte érdemben csak a kontroll nőstények veséjében volt kimutatható, a hímekekhez képest szignifikánsan magasabb értéket kaptunk. A PACAP-kezelést követően expressziója pedig már a nőstények esetében is elhanyagolható mértékűnek bizonyult, a kontroll nőstényekkel összevetve szignifikáns mértékű csökkenés volt megfigyelhető (6-7. ábra).

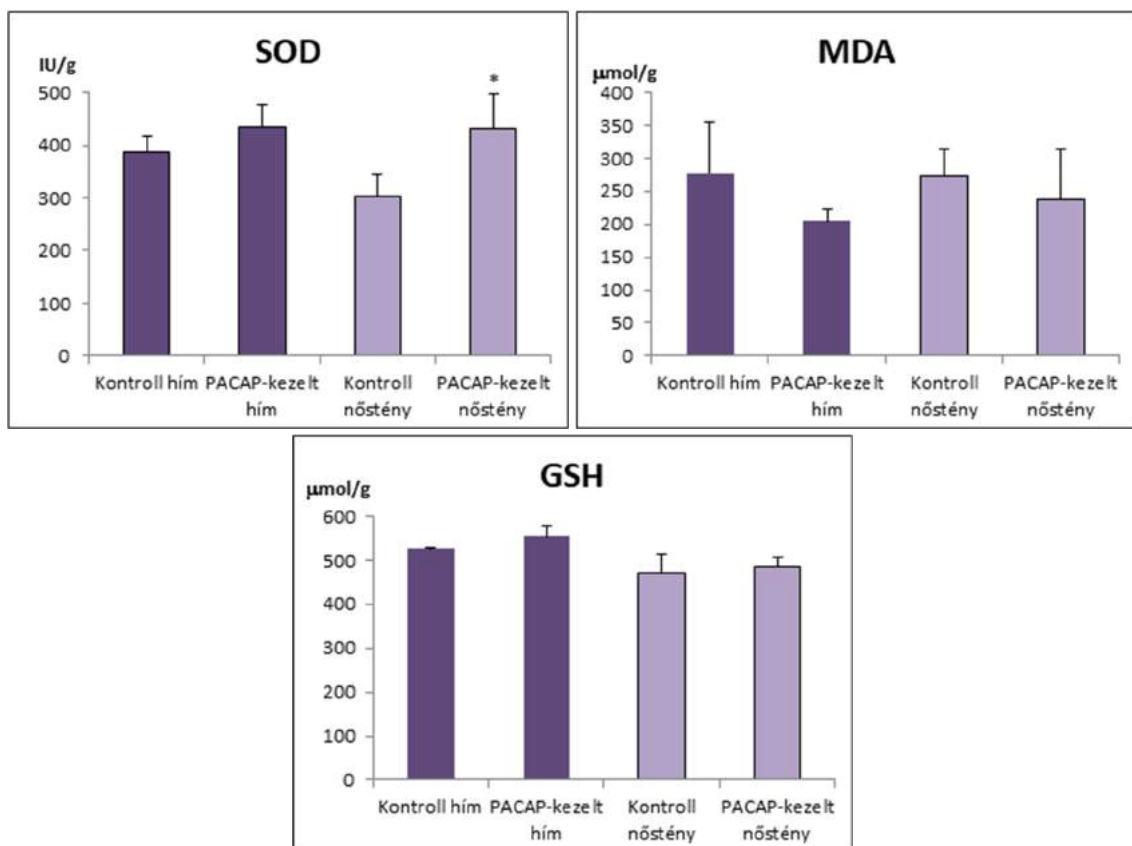




7. ábra A citokin array kvantifikálása. A normalizált adatok átlag pixelintenzitás  $\pm$  SEM formában kerültek megadásra. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. saját kontroll,  $x p < 0,05$ ,  $xx p < 0,01$ ,  $xxx p < 0,001$  vs. PACAP-kezelt hím,  $+ p < 0,05$ ,  $+++ p < 0,001$  vs. kontroll hím

### 3.2.3. Antioxidáns és oxidatívstressz-markerek vizsgálata

A SOD aktivitása mindkét nemben magasabbnak mutatkozott PACAP-kezelés hatására, a kontrollhoz viszonyítva a különbség azonban csak a nőstényekben bizonyult szignifikánsnak (8. ábra). Az MDA szintje a PACAP-kezelésben részesült hím és nőstény patkányokban egyaránt enyhén alacsonyabb volt, a kontrollokhoz viszonyítva azonban nem találtunk szignifikáns különbséget (8. ábra). A GSH tekintetében a csoportok között nem igazolódott számottevő különbség (8. ábra).



8. ábra A SOD, MDA és GSH expressziója kontroll, valamint PACAP-kezelt hím és nőstény patkányokban ischaemia-reperfuziót követően 24 órával.  
\* $p < 0,05$  vs. kontroll nőstény

### **3.2.4. Jelátviteli útvonalak tanulmányozása (RT-PCR, Western blot és immunhisztokémiai eredmények)**

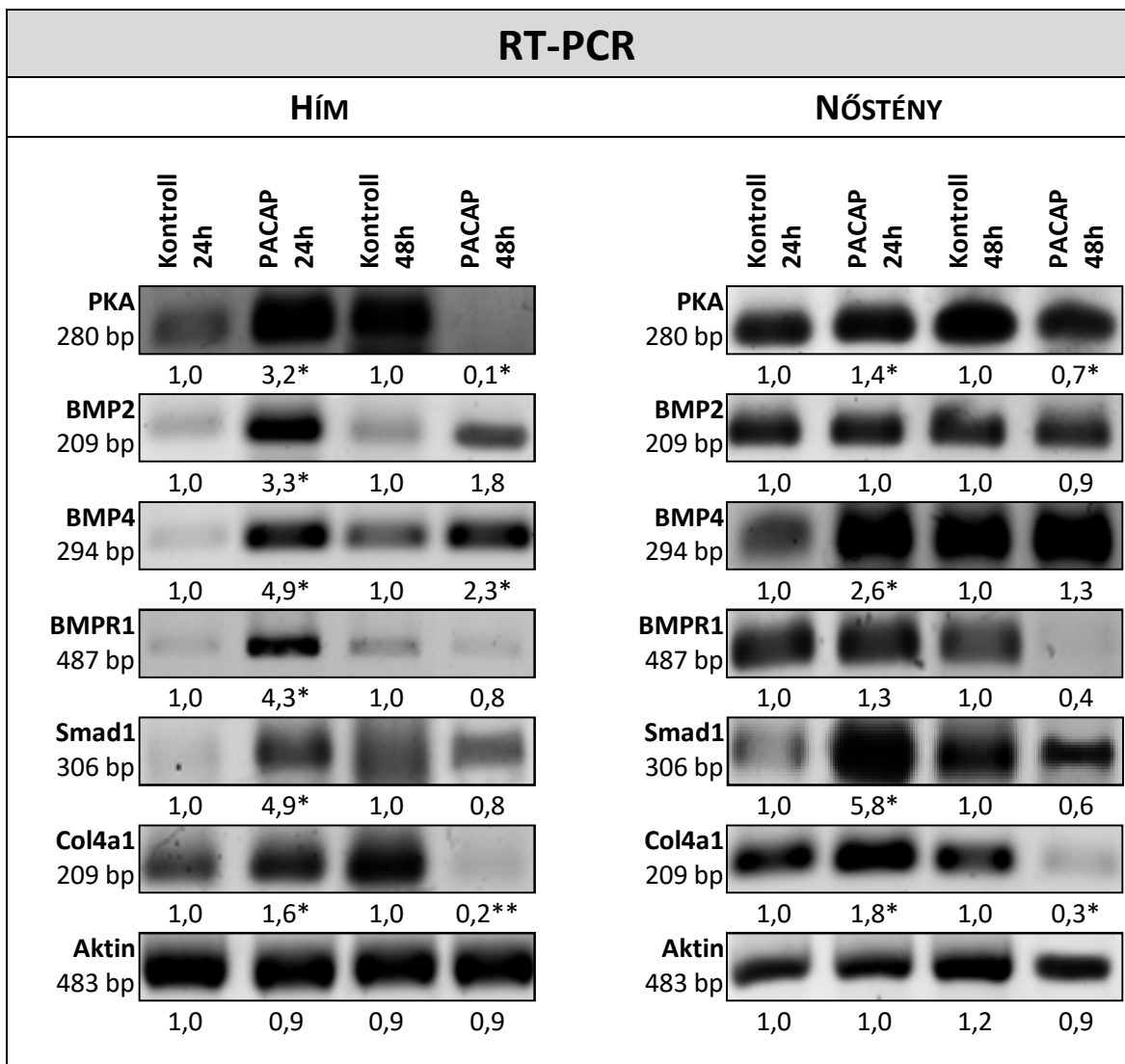
A PACAP receptorához való kötődése aktiválja a PKA-t, melynek mind mRNS-, mind fehérjeszintű emelkedése megfigyelhető volt a PACAP-kezelt állatokban az ischaemia-reperfúziót követően 24 órával (9-10. ábra). A PKA aktivációja (phosphorilációja) a 24 órás csoportban mindkét nem esetén szignifikánsan emelkedett PACAP-kezelés hatására (10. ábra). 48 órával az ischaemia-reperfúziót követően a PKA mRNS-expressziója a PACAP-kezelt csoportokban szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott a kontrollokhöz képest (9. ábra).

24 óra elteltével a BMP2 mRNS szignifikánsan emelkedett a hímekben PACAP-kezelés hatására, míg a nőstények esetében nem volt változás, a BMP2 fehérjeexpresszió pedig egyik nemből sem változott (9-10. ábra). Ezzel szemben a BMP4 mRNS- és fehérjeexpresszió szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető mind a hímek, mind a nőstények esetében (9-10. ábra). A BMP4-immunpozitivitás a PACAP-kezelt csoportokban erősebbnek bizonyult, elsősorban a corticalis tubulusokban koncentrálódva (11. ábra). A PACAP hatására a BMP mRNS-expresszió megváltozott a 48 órás csoportokban, a BMP2 és BMP4 emelkedett a hímekben, azonban a nőstényekben nem találtunk szignifikáns eltérést (9. ábra). A BMP2 és BMP4 fehérjeexpresszió csak a nőstényekben mutatott emelkedést, a PACAP-kezelt hímekben nem volt számottevő eltérés 48 órával az ischaemia-reperfúzió után (10. ábra).

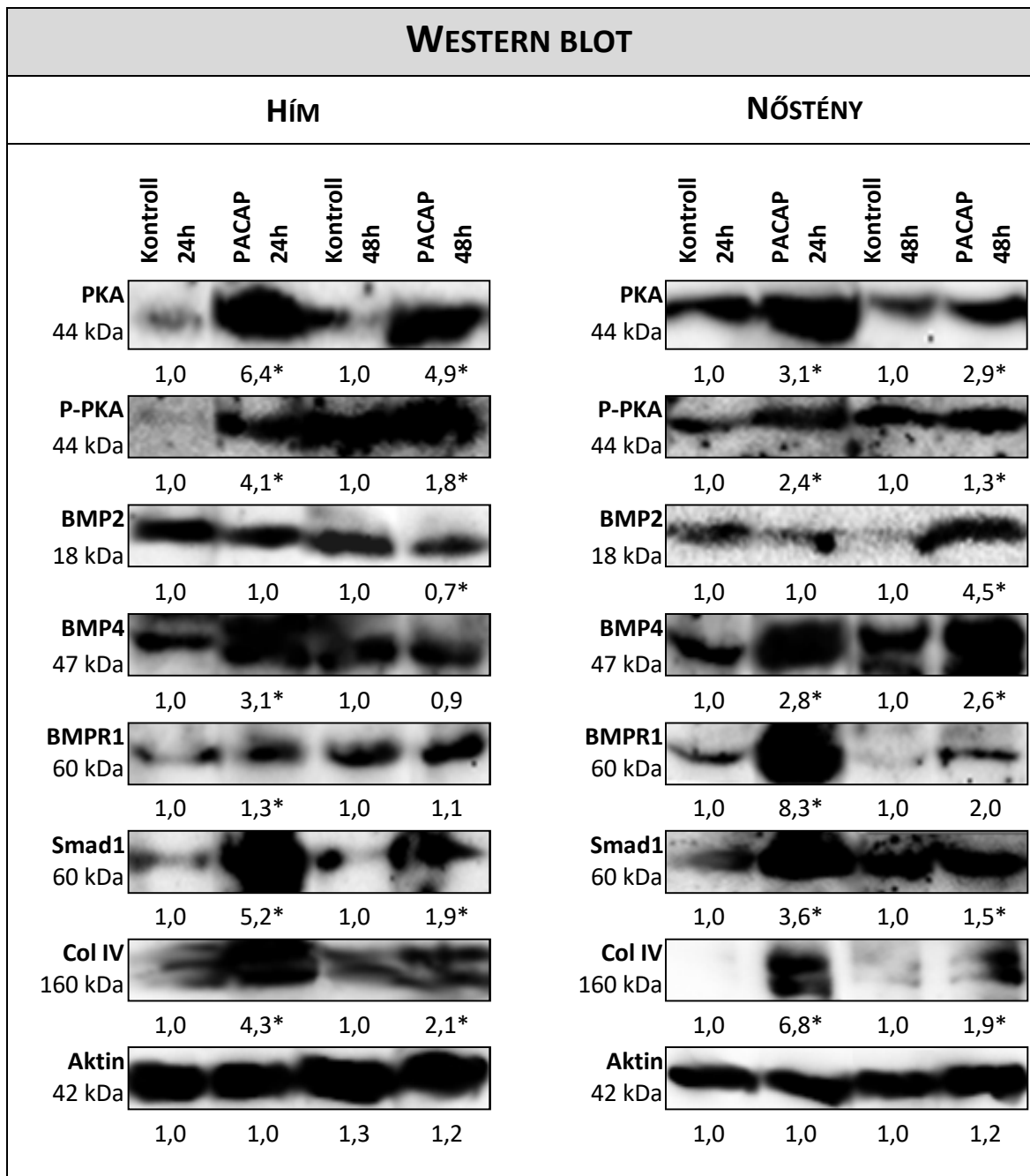
A BMPR1 mindkét nemből kimutatható volt, a PACAP hatására az mRNS- és a proteinexpresszió egyaránt emelkedett a hím és nőstény patkányokban a 24 órás csoportban (9-10. ábra). A corticalis tubulusokban a BMPR1 erősebb jelet adott PACAP-kezelés után (11. ábra). Érdekes módon, 48 órával az ischaemia-reperfúziót követően a BMPR1 mRNS-expresszió mindkét nemből csökkenést mutatott PACAP-kezelés esetén, azonban a proteinszint állandó maradt (9-10. ábra).

A BMPR1 egy targetjének, a Smad1-nek az mRNS-expressziója szignifikánsan magasabb volt a PACAP-kezelt csoportokban 24 órával az ischaemia-reperfúzió után (9. ábra). A Smad1 protein szintje szintén emelkedett a PACAP-kezelt hím és nőstény patkányokban a 24 órás csoportban (10. ábra). Továbbá a tubulusok immunpozitivitása jelentősen fokozódott a PACAP-kezelt csoportokban (11. ábra). A Smad1 mRNS-expressziója viszont csökkent PACAP-kezelés esetén a 48 órás csoportban, de meglepően a fehérjeexpresszió még emelkedett szintet mutatott (9-10. ábra).

Ezen jelátviteli útvonal egy target génje a kollagén IV, mely mRNS-expresszióját szintén fokozta a PACAP 24 órával az ischaemia-reperfusio után a hím és nőstény patkányokban egyaránt (9. ábra). Továbbá a proteinexpresszió tekintetében is kifejezett emelkedés volt észlelhető mindkét nemben (10. ábra). A tubulusok és a Malpighi-testek körül kollagén IV-immunpozitív vonal volt megfigyelhető a PACAP-kezelt csoportokban (11. ábra). A PACAP-kezelés azonban csökkent kollagén IV mRNS-expressziót eredményezett 48 órával az ischaemia-reperfúsiót követően, bár a fehérjeexpresszió még magasabbnak mutatkozott a kontrollhoz képest a hímekben és nőstényekben egyaránt (9-10. ábra).



9. ábra RT-PCR eredmények - PKA, BMP2, BMP4, BMPR1, Smad1, Col4a1 mRNS-expresszió kontroll, valamint PACAP-kezelt hím és nőstény patkányok veséjében 24, valamint 48 órával az ischaemia-reperfúsiót követően. A bandek alatti számok az integrált denzitásokat mutatják. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. kontroll

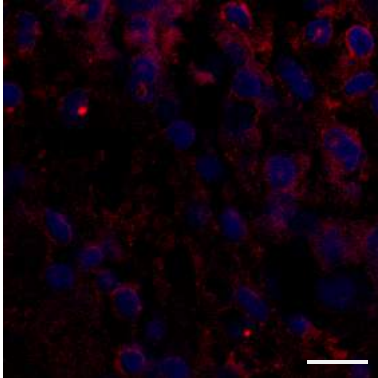


10. ábra Western blot eredmények - PKA, P-PKA, BMP2, BMP4, BMPR1, Smad1, ColIV fehérjeexpresszió kontroll, valamint PACAP-kezelt hím és nőstény patkányok veséjében 24, valamint 48 órával az ischaemia-reperfuziót követően. A bandekek alatti számok az integrált denzitásokat mutatják. \* $p < 0,05$  vs. kontroll

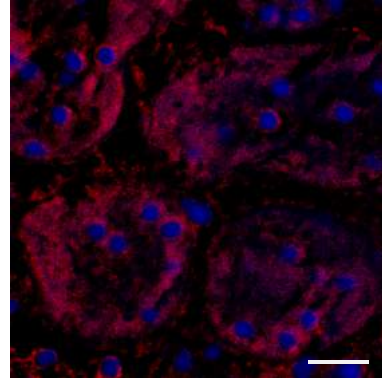
## Immunhisztokémiai eredmények - BMP4

### HÍM

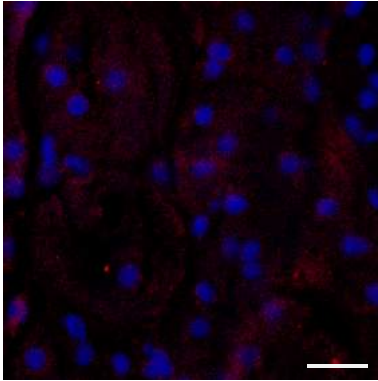
Kontroll 24h



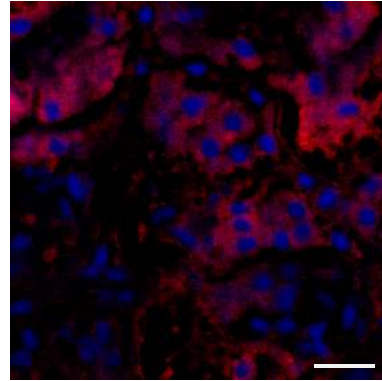
PACAP 24h



Kontroll 48h

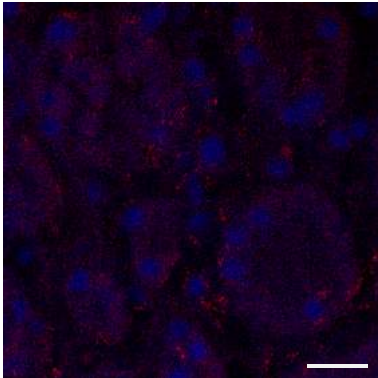


PACAP 48h

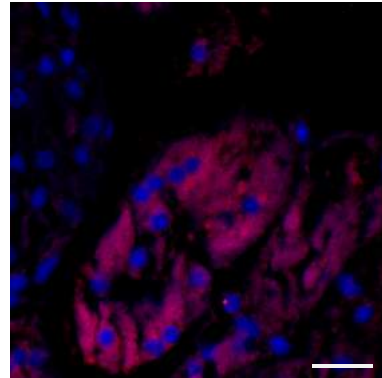


### NŐSTÉNY

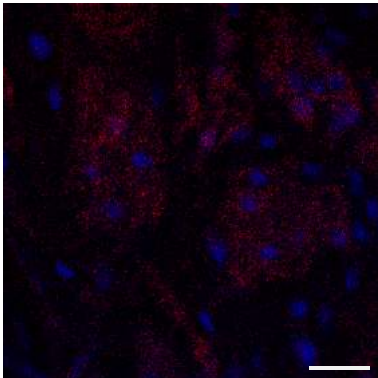
Kontroll 24h



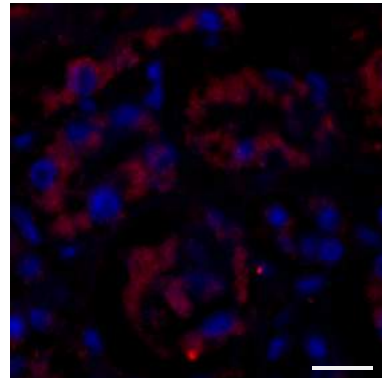
PACAP 24h



Kontroll 48h



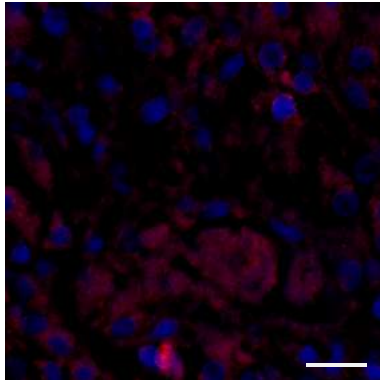
PACAP 48h



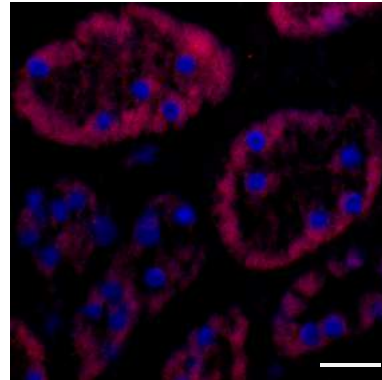
## Immunhisztokémiai eredmények - BMPR1

### HÍM

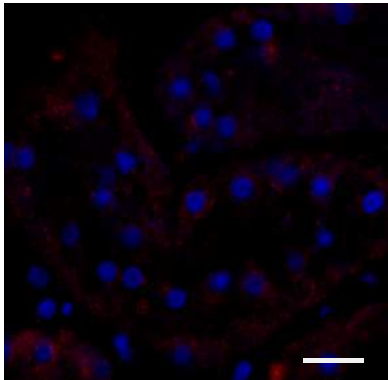
Kontroll 24h



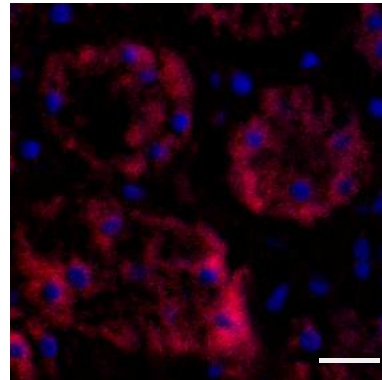
PACAP 24h



Kontroll 48h

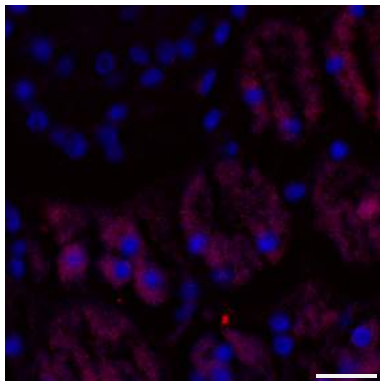


PACAP 48h

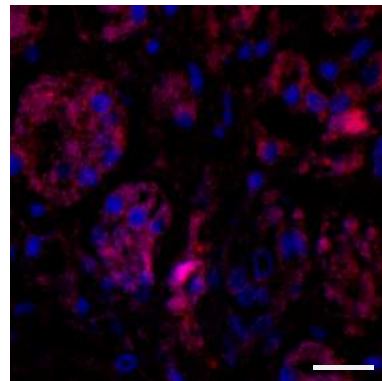


### NŐSTÉNY

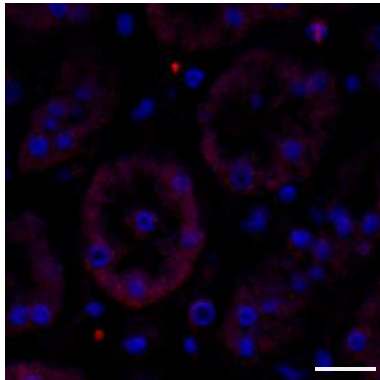
Kontroll 24h



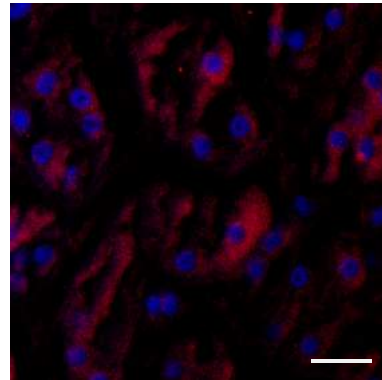
PACAP 24h



Kontroll 48h



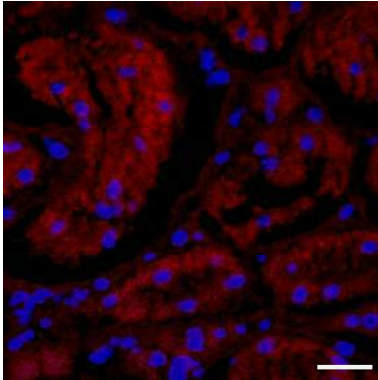
PACAP 48h



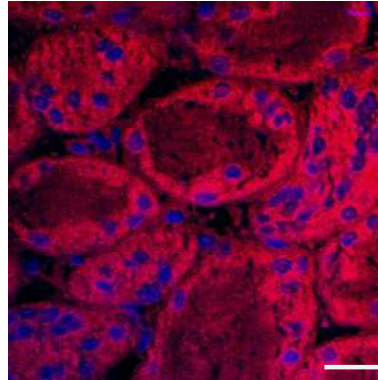
## Immunhisztokémiai eredmények - Smad1

### HÍM

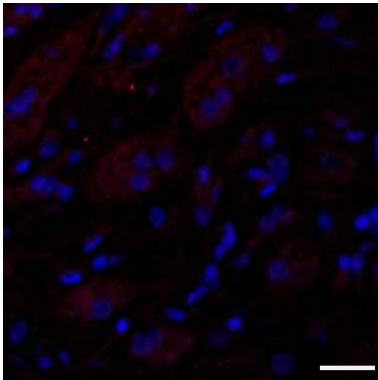
Kontroll 24h



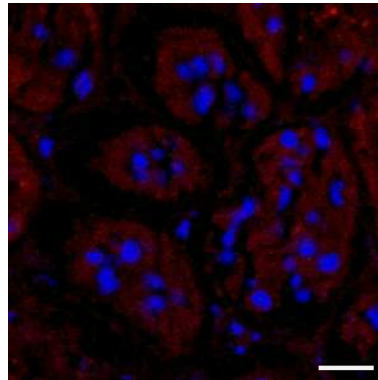
PACAP 24h



Kontroll 48h

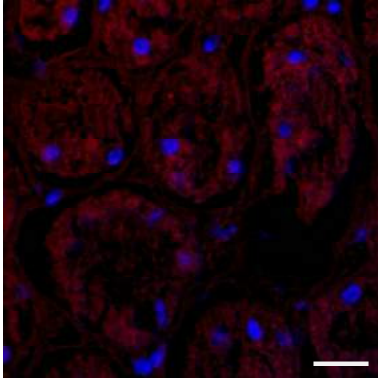


PACAP 48h

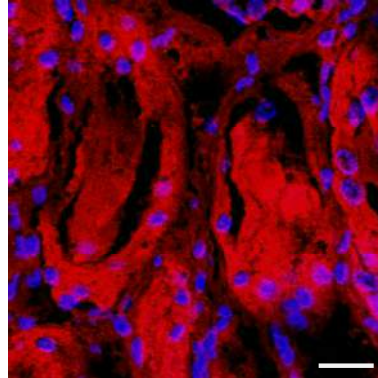


### NŐSTÉNY

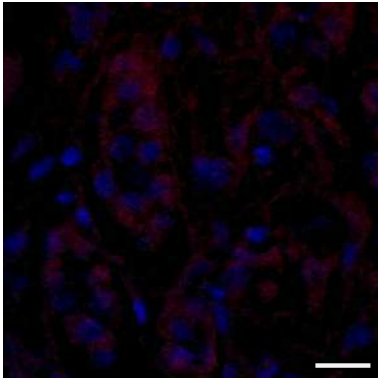
Kontroll 24h



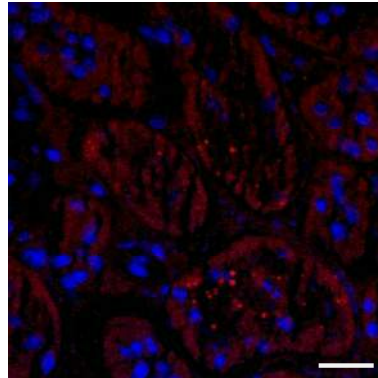
PACAP 24h



Kontroll 48h

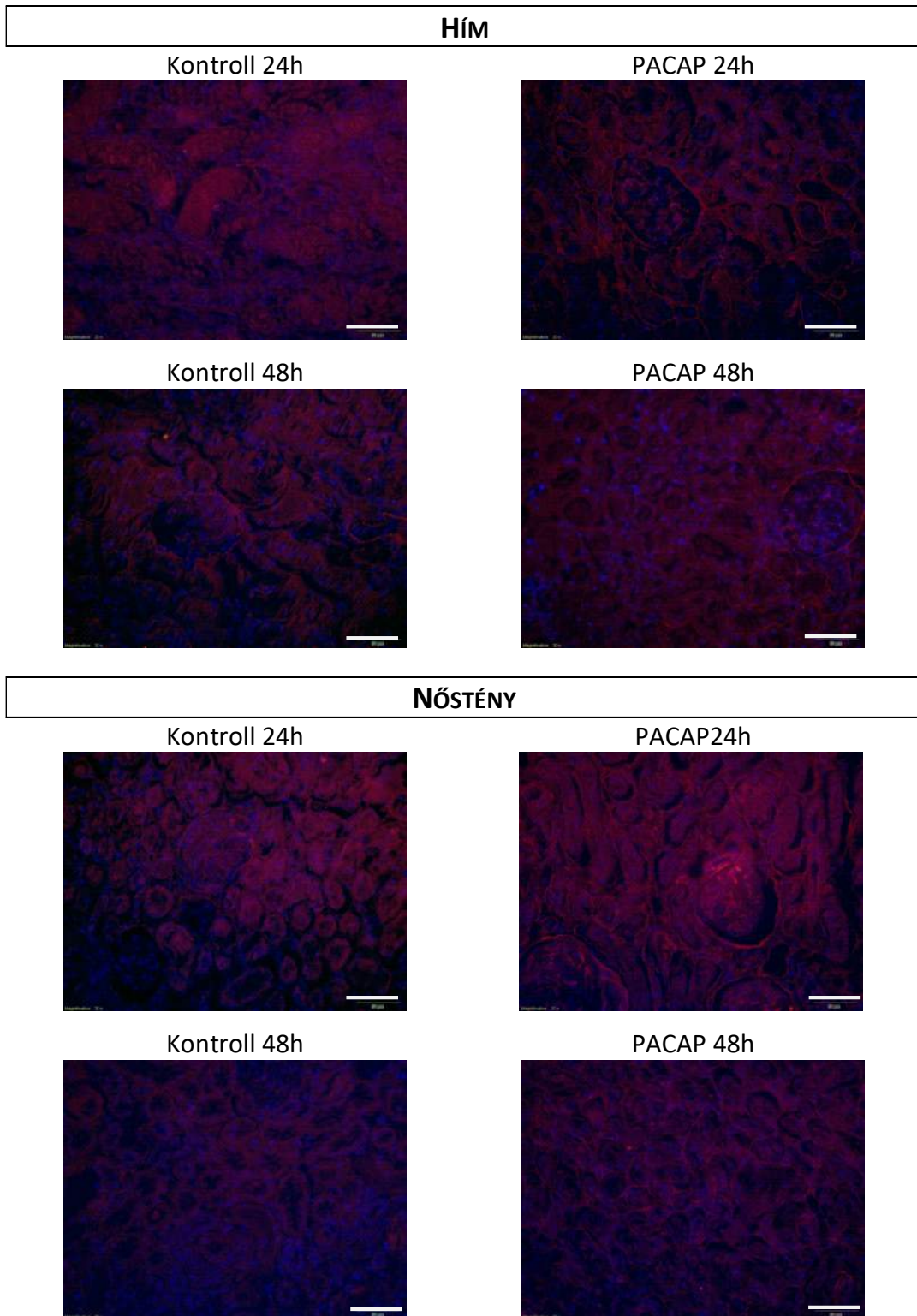


PACAP 48h





## Immunhisztokémiai eredmények - Kollagén IV



11. ábra Immunhisztokémiai eredmények - BMP4, BMPRI, Smad1, kollagén IV-immunpozitivitás kontroll, valamint PACAP-kezelt hím és nőstény patkányok veséjében 24, valamint 48 órával az ischaemia-reperfuziót követően. Aránymérték: 50 $\mu$ m.

### 3.3. MEGBESZÉLÉS

A morphometriai analízis során igazolást nyert, hogy a kontroll nőstény patkányokban ischaemia-reperfusio hatására jelentősen enyhébb szövettani eltérések alakulnak ki, a 14 napos csoport kivételével eredményeik szignifikánsan jobbnak bizonyultak a hímekéhez képest. Ezen megfigyelés összhangban áll azon irodalmi adatokkal, mely szerint a vesebetegségek súlyosabb megjelenésűek, gyorsabban progrediálnak és hamarabb vezetnek végstádiumú veseelégtelenséghez férfiakban (Kher et al. 2005, Neugarten et al 2018). A PACAP-kezelés képes volt szignifikáns mértékben csökkenteni a szövettani eltérések súlyosságát mindkét nem esetében. A PACAP protektív hatása különböző vesekárosodások kapcsán már igazolásra került, úgymint diabeteses és myeloma nephropathiában, cyclosporin, cisplatin és kontrasztanyag indukálta nephrotoxicitásban (Horvath et al. 2019, Khan et Batuman 2016, Reglodi et al. 2012a), azonban ezen vizsgálatokban mind hím egyedek szolgáltak alanyként. Munkacsoportunk elsőként bizonyította, hogy a PACAP nőstényekben is védő hatással bír ischaemia-reperfusio okozta vesekárosodásban. A PACAP-kezelt nőstény patkányokban a tubularis károsodás enyhébbnek bizonyult a hímekéhez képest. A PACAP protektív hatását illetően nemi különbségek leírásra kerültek már Parkinson-kórban (Reglodi et al. 2006 a,b).

Vizsgálataink a citokinexpressziós mintázat meghatározására is kiterjedtek, hiszen a PACAP védő hatásának hátterében ismerten részben immunmodulátor, antiinflammatoricus funkciója áll (Vaudry et al. 2009). Tanulmányunkban PACAP-kezelés hatására számos citokin (fractalkine, sICAM-1, L-selectin, RANTES, CNTF, MIP-3 $\alpha$ , thymus chemokine, TIMP-1) expressziójának csökkenése volt megfigyelhető, mely eredmény összhangban van a diabeteses nephropathia modelljében PACAP-kezelés esetén tapasztaltakkal (Banki et al. 2013). Ismert továbbá, hogy retinalis hypoperfusio esetén a PACAP alkalmazása szintén számos citokin (CNTF, fractalkine, sICAM-1, L-selectin, MIP-3 $\alpha$ , RANTES, TIMP-1) expressziójának csökkenését idézte elő (Szabo et al. 2012). A fractalkine, L-selectin, MIP-3 $\alpha$ , RANTES, TIMP-1 és CNTF tekintetében a PACAP-kezelés hatására kísérletünkben a nőstényekben jelentősebb csökkenés volt észlelhető, mint a hímek esetében. Vizsgálatunk során a CNTF-expresszióban nemi különbséget tapasztaltunk, döntően nőstények esetében volt kimutatható ezen citokin. A CNTF-et vesekárosodás kapcsán a protektív rendszer részeként tartják számon, növekedési faktorként ischaemia-reperfúziót követően a vesetubulusok repair folyamataiban szerepet játszik (Yang et al. 2001). A PACAP azonban kísérletünkben nem

növelte a CNTF-expressziót, mely alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP ischaemia-reperfúziós vesekárosodásban betöltött védő hatása egyéb módon fejeződik ki. Jelentős nemi különbségek voltak megfigyelhetők továbbá a TIMP-1 és MIP-3 $\alpha$ -expresszióban, magasabb szinttel a hímekben. Egerekben máj ischaemia-reperfúzió esetén a vizsgált citokinek többségének esetében is hasonló megfigyeléseket tettek (Crockett et al. 2006).

A vese ischaemia-reperfúziós károsodásának kialakulásában az oxidatív stressz nagy jelentőséggel bír (Maryam et Mehdi 2015), ezért munkánk során antioxidáns és oxidatívstressz-markerek meghatározását is célul tűztük ki. A lipidperoxidáció melléktermékeként számon tartott MDA és az antioxidáns glutathion szintjében nem találtunk érdemi különbséget a vizsgált csoportjaink között, míg az antioxidáns hatással bíró SOD aktivitása magasabbnak bizonyult a PACAP-kezelt csoportokban ischaemia-reperfúziót követően, mely megfigyelés összhangban van korábbi vizsgálati eredményekkel intestinalis ischaemiában (Ferencz et al. 2009, Horvath et al. 2016). A PACAP-kezelt és kontroll csoportok közötti különbség csupán a nőstények esetében mutatkozott szignifikánsnak, felvetve a PACAP védő hatását illetően nemi különbségek fennállását.

A PAC1-receptor aktivációja több kapcsolódási ponttal is bír a WNT (wingless-related integration site)/ $\beta$ -catenin- és BMP-jelátvitellel (Chen et al. 2012, Juhasz et al. 2015, Yu et al. 2014), melyen keresztül különböző celluláris funkciók (proliferatio, differentiatio, mátrixproductio) szabályozására képes (Katagiri et Watabe 2016). A PACAP bekötődését követően aktiválja az adenil-cikláz enzimet, mely az intracelluláris cAMP-szint emelkedéséhez vezet (Vaudry 2009). Ezt követően a PKA aktiválódhat, mely foszforilációja aktívabb formája kialakulását eredményezi (Solari et al. 2014), valamint számos transzkripciós faktor aktivációját serkenti. Kísérletünkben bizonyítottuk, hogy a PACAP elősegíti a PKA foszforilációját, kivédve/csökkentve az ischaemia káros hatásait. Hasonló – PACAP hatására bekövetkező – PKA-expresszióemelkedés megfigyelhető volt chondroblast sejt kultúrán is (Juhasz et al. 2014). A PKA hatása alatt számos transzkripciós faktor áll, úgymint a CREB (Vaudry et al. 2009), Sox9 (Sry-box transcription factor 9) és Runx2 (Runt-related transcription factor 2) (Juhasz et al. 2014, 2015), melyek aktivációja az ischaemia-reperfúzió káros hatásait kompenzálhatja, valamint egyéb jelátviteli útvonalakat is aktiválhat, melyek egyelőre ismeretlen folyamatokat indukálhatnak.

A gyulladásszerű folyamat résztvevői lehetnek a BMP-útvonal tagjai – mint a BMP2 – (Nguyen et al. 2017), mely vizsgálatunk fontos részét képezte. Korábban munkacsoportunk igazolta, hogy a PACAP a BMP-expressziót növeli osteoblastokban és chondroblastokban, ahol a BMP-jelátvitel az extracelluláris mátrix productióját indukálja (Juhász et al. 2014, 2015). A BMP-k a vese fejlődésére is hatással bírnak, a BMP4 és BMP7 meghatározza a nephron differentiatióját (Katagiri et Watabe 2016). A BMP receptorához (BMPRI) történő kötődését követően a Smad1 nuclearis translocációját idézi elő, mely a basalis membrán részét képező IV-es típusú kollagén termelését indukálhatja, befolyásolhatja. Korábbi tanulmányban igazolták, hogy a BMP4 a IV-es típusú kollagén expressziójának befolyásolásán keresztül hatással van a membrana basalis integritására (Parkin et al. 2011). A vesetubulusokban a IV-es típusú kollagén szükséges a BMP-útvonal normális aktiválásához (Bunt et al. 2010). Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a PACAP képes a diabeteses nephropathia súlyosságát mérsékelni (Banki et al. 2014), valamint megváltoztatja a kollagén IV expresszióját. Oxalát indukálta vesekárosodásban a BMP7-overexpresszió a káros hatásokat a TGF $\beta$ -útvonalon keresztül mérsékelte (Convento et al. 2017), egy másik tanulmányban pedig a BMP6 hiányának következtében a tubulointerstitialis károsodás és fibrosis súlyosabb megjelenését tapasztalták (Dendooven et al. 2011).

Jelen kísérletünkben igazolást nyert, hogy a PACAP a BMP-expresszióra nem- és időfüggő módon hatással bír. A BMP2 a hímekben változatlanul bizonyult, míg a PACAP növelte a fehérje expresszióját nőstényekben 48 óra elteltével. A BMP4 fehérjeexpresszió mindkét nemből emelkedett volt PACAP-kezelés esetén 24 órát követően, azonban 48 óra elteltével csupán a nőstényekben találtunk emelkedést. A reproduktív rendszer tekintetében néhány BMP expresszióját és funkcióját illetően már ismertek nemi eltérések (Lochab et al. 2017). A jelen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a BMP2 nem bír jelentős szereppel a renalis ischaemia-reperfusio során a PACAP-indukált folyamatokban. A BMP4 mindkét nemből emelkedést mutatott, de a növekedés mértéke és az időfüggőség tekintetében nemi eltéréseket találtunk. A BMP4 direkt kapcsolatban lehet a kollagén IV-szintézissel (Parkin et al. 2011), melyen keresztül a tubulusrendszer basalis membránjának megvastagodásához vezethet. Diabeteses nephropathiában a Smad1 és a IV-es típusú kollagén (mely az extracelluláris mátrix fő alkotóeleme) magasabb expresszióját írták le, mely tubulointerstitialis fibrosis kialakulásához vezethet. Bizonyított, hogy a Smad1 a kollagén IV-expressziót módosítani képes, nephropathiát indukálva. A Smad1 blokkolása a diabeteses nephropathia

kialakulásában preventív szereppel bírhat (Abe et al. 2004, Korish et al. 2015). Kísérletünkben igazoltuk a BMP4-BMPRI-Smad1 expressziójának nemfüggő emelkedését, mely megnövekedett kollagén IV-expresszióhoz vezet. Ezen eredmény a PACAP által finoman szabályozott jelátviteli kaszkád meglétét valószínűsíti, mely rendszerben az ischaemia-reperfüziós vesekárosodás során zavar keletkezik. A PACAP alkalmazása kettős hatással bírhat, a gyulladási hatásokat közvetlenül csökkentheti, a BMP-út vonal egyensúlyát pedig a membrán basalis megvastagodásának irányában eltolja.

Következtetésként elmondható, hogy a PACAP mindkét nemben képes az ischaemia-reperfüziós vesekárosodás mérséklésére, a nőstényekben következményesen enyhébb eltérések jelenlétével. Hogy a nemek közötti különbségek háttérben hormonális eltérések állnak (Kang et al. 2014, Muller et al. 2002, Park et al. 2004, Soljancic et al. 2013, Talebi et al. 2016), vagy további faktorok játszanak szerepet a PACAP nemi különbségeket mutató hatásában, még további vizsgálatokat igényel.

## **4. AZ ENDOGÉN PACAP HATÁSÁNAK TANULMÁNYOZÁSA ISCHAEMIA-REPERFUSIÓS VESEKÁROSODÁS SORÁN PACAP-GÉNHIÁNYOS EGEREKBEN**

---

Munkacsoportunkkal korábban tanulmányoztuk PACAP  $+/+$  és PACAP  $-/-$  egerek ischaemia-reperfusiós vesekárosodását. Akkor a szövettani elváltozások megfigyelésére koncentráltunk. Kutatási munkám során ezen vizsgálatokat kiegészítettem a SOD-aktivitás és a citokinexpresszió tanulmányozásával, majd valamennyi vizsgálatot elvégeztem a PACAP  $+/-$  csoportnál is, kiegészítve egyéb antioxidáns marker és a jelátviteli útvonal megfigyelésével.

Minden esetben a PACAP  $-/-$  (homozigóta) és a PACAP  $+/-$  (heterozigóta) csoport eredményeit a PACAP  $+/+$  (vad) csoport eredményeivel hasonlítottam össze.

### **4.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **4.1.1. Kísérleti állatok**

A kísérlet során CD1 egértörzset, felnőtt hím egereket használtunk, a vizsgálati csoportok: kontroll (sham operált) PACAP  $+/+$  (n=9) és PACAP  $+/-$  (n=9), valamint 60, illetve 45 perces ischaemiát és reperfusiót elszenvedett PACAP  $+/+$  (n=9, ill. 6) és PACAP  $+/-$  (n=9, ill. 6). Továbbá a citokinexpressziós vizsgálatok és a SOD-aktivitás tanulmányozása során a korábbi szövettani vizsgálat kiegészítéseként a csoportok: kontroll PACAP  $+/+$  (n=5) és PACAP  $-/-$  (n=5), valamint 60 perces ischaemiát és reperfusiót elszenvedett PACAP  $+/+$  (n=5) és PACAP  $-/-$  (n=5). Az egerek állatházi tartása 12 órás sötét/világos ciklusban történt, szabad hozzáférést engedve a vízhez és táplálékhoz, a 'University of Pecs; BA02/2000-15024/2011' protokoll betartásával történt.

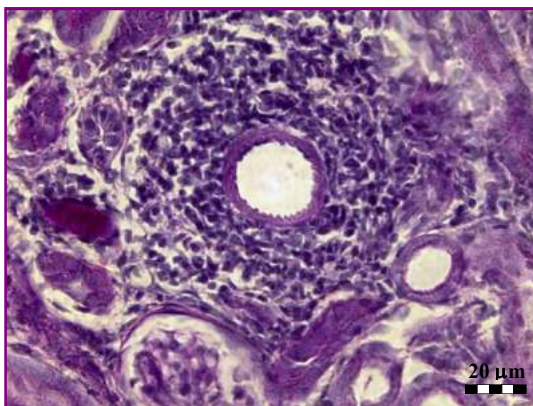
### 4.1.2. Műtét

Az egerek műtete előtt intraperitonealis ketamin-xylazin anaesthesiát alkalmaztunk, a műtét során az állatok hőmérsékletet egy melegítő lap segítségével konstansan tartottuk. Total median laparotomiát követően a bal vesét 45/60 percre kirekesztettük a keringésből. A kirekesztési idő elteltével a leszorítást felengedtük, az állatok hasfalát zártuk, majd 24 óra/14 nap túlélést követően az egereket termináltuk.

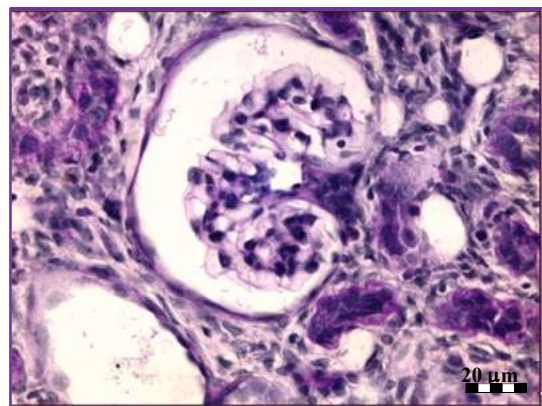
### 4.1.3. Morphometriai analízis

A PACAP  $+/+$  és PACAP  $+/-$  egereket 14 nappal az ischaemia-reperfusiót követően ketamin-xylazin anaesthesiában fizioológiás sóoldattal, majd 4% paraformaldehid- és 15% pikrinsavtartalmú oldattal perfundáltuk, a veséket eltávolítottuk, majd az előbb említett fixáló oldatban történő további fixálást követően rutin szövettani eljárással 10  $\mu\text{m}$ -es HE és PAS/H festett metszeteket készítettünk.

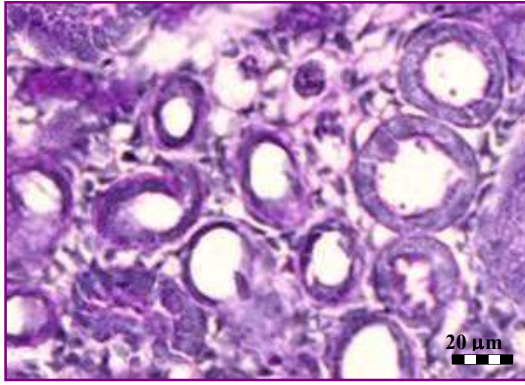
A szövettani értékelés a korábban munkacsoportunk által kidolgozott, PACAP  $-/-$  és PACAP  $+/+$  egereken végzett kísérletünkben alkalmazott módszer (Szakaly et al. 2011) szerint történt. Az alábbi paraméterek értékelése zajlott egy hármas (0-2) súlyossági fokozatú skálán (0-nincs, 1-enyhe-közepes, 2-súlyos): tubularis dilatatio, glycocalyx károsodása a tubulusokban, thyreoidisatio (cylinderek megjelenése a tubulusokban), lymphocyta-infiltratio, macrophag-infiltratio és a Bowman-tok dilatatiója (12. ábra).



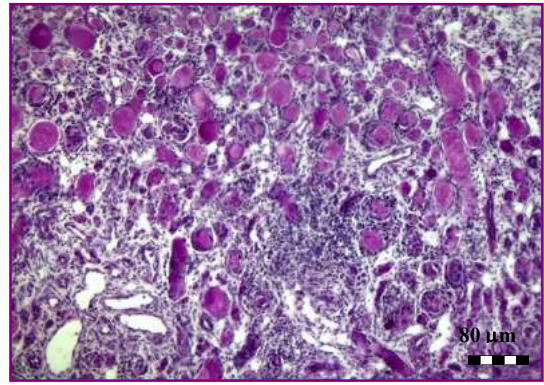
Lymphocyta-infiltratio



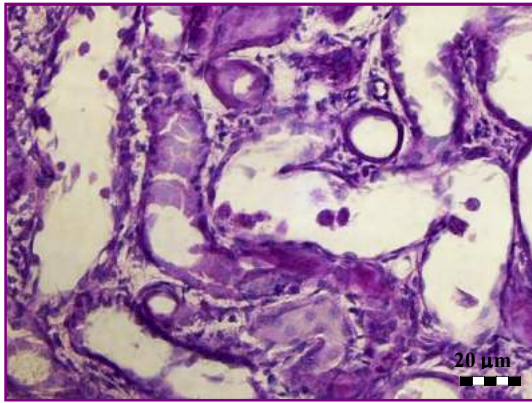
Bowman-tok dilatatiója



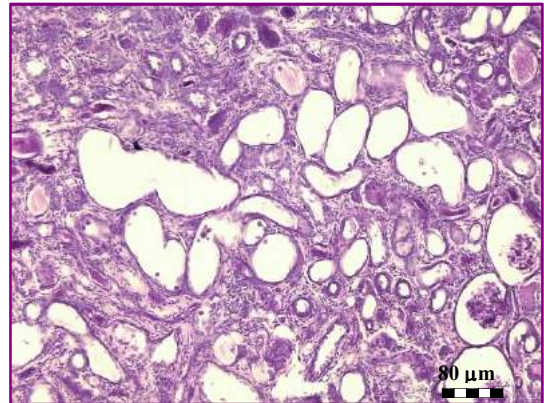
Glycocalyx károsodása



Thyreoidisatio



Macrophag-infiltratio, tubularis dilatatio,  
glycocalyx károsodása



Bowman-tok dilatatiója, tubularis  
dilatatio

12. ábra A vizsgált elváltozások szövettani megjelenése

#### 4.1.4. Western blot – jelátviteli útvonalak vizsgálata

A 60 perces ischaemiát és 24 óra reperfuziót elszenvedett, valamint a kontrollként szolgáló sham operált PACAP ++ és PACAP +/- egerek veséjéből származó mintákat 100  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl puffert (pH 7,0), 10  $\mu$ g/ml Gordoxt, 10  $\mu$ g/ml leupeptint, 1 mM PMSF-et, 5mM benzamidint és 10  $\mu$ g/ml tripszinhidrot tartalmazó homogenizáló pufferben vettük fel. Az előkészített szövetmintát  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a felhasználásig. A kísérlet kezdetén 30 másodperces szonikálással teljes sejtlizátumot készítettünk. A feltárást követően a mintákat Laemmli elektroforézis mintapuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 10% SDS, 100 mM  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,01% brómfenolkék) hozzáadásával és 10 percig történő forralással készítettük elő. Fehérjemeghatározás segítségével a mintákat azonos koncentrációra állítottuk be. A 7,5% SDS-PAGE gélben történő szeparálást követően a mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Ezt követően PBST-ben oldott 5% sovány tejpor felhasználásával blokkoltuk, majd egy éjszakán keresztül



4°C-on inkubáltuk a membránokat a következő primer antitestekkel: anti-tAkt, anti-pAkt, anti-tERK1/2, anti-pERK1/2, anti-p38MAPK, anti-pp38MAPK (1:500; Cell Signaling Technology, USA), valamint anti-aktin (1:10000; Sigma, Hungary). 40 perces PBST-ben történő mosást követően másodlagos antitestként tormaperoxidáz-konjugált anti-egér és anti-nyúl IgG-t alkalmaztunk (1:1500, 1:3000 hígítás, Bio-Rad Laboratories, USA). Az antigén-antitest komplexek vizualizálása erősített chemilumineszcencia (EMD Millipore, Billerica, Mass., USA) segítségével történt. Belső kontrollként aktint használtunk. Az optikai denzitás mérését ImageJ 1.40 szoftver segítségével végeztük, és az értékeket aktinra normalizáltuk.

#### **4.1.5. Citokinexpresszió tanulmányozása**

A PACAP +/+ és PACAP +/-, valamint PACAP -/- egerek veséit 24 órával a 60 perces kirekesztést követően citokin array (Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, Panel A, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) elvégzése céljából eltávolítottuk, kontrollként sham operált PACAP +/+, PACAP +/- és PACAP -/- egerek szolgáltak. Az array elvégzése a gyártó utasítása szerint történt. A veséket proteázgátlókat tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk, majd Triton X-100-at adtunk hozzá, 1 %-os végső koncentrációt elérve. A mintákat -80°C-on lefagyasztottuk, és az újbóli felolvadást követően 5 percig centrifugáltuk (10000 rpm). A minták fehérjetartalmának meghatározását követően a citokinek/chemokinek elleni antitesteket kötött formában tartalmazó nitrocellulóz membránokat blokkoló pufferben 1 órán keresztül inkubáltuk. A pufferben oldott homogenizált mintákhoz 15 µl 'detection antibody cocktail'-t pipettáztunk, majd szobahőmérsékleten 1 órát inkubáltuk. A nitrocellulóz membránok blokkolását követően a biotinilált antitest-homogenizált minta keveréket a membránokra helyeztük, és 4°C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a membránokat pufferben 3x10 percig mostuk. A mosás után pufferben oldott tormaperoxidáz-konjugált streptavidint adtunk minden membránhoz, fél órán át inkubáltuk, majd chemilumineszcens detektáló reagenst alkalmaztunk, és a filmeket előhívtuk (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). A kiértékelés során az immunpozitivitás pixeldenzitását ImageJ 1.40 szoftver segítségével határoztuk meg.

#### **4.1.6. Antioxidáns markerek vizsgálata**

A vizsgálatokhoz 60 perces ischaemiát és 24 órás reperfuziót elszenvedett PACAP +/+ és PACAP +/-, valamint PACAP -/- egereket használtunk, kontrollként sham operált állatok szolgáltak.

A SOD-mérés a vesehomogenizátumokból SOD assay kit (Superoxide Dismutase Assay Kit (Calbiochem-Novabiochem Corp., Darmstadt, Germany)) felhasználásával, a gyártó utasítása szerint történt. A kit egyik reagensének autooxidációját gyorsítja a SOD-enzim. A reakció végterméke egy 525 nm-es absorptiós maximummal rendelkező chromophor. A glutathion szintjének meghatározását a Sedlak és Lindsay által leírtak szerint végeztük (Sedlak és Lindsay, 1968). A mintákhoz 10%-os triklórecetsavat adtunk, majd a vesehomogenizátumokat 15 percig 4000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszó 2 ml-éhez 4 ml 0,4 M-os (pH 8,7) trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS) puffert adtunk, és az így kapott elegyet 100  $\mu$ l 5,5-ditiobisz-2-nitrobenzoésav (DTNB) hozzáadását követően 412 nm-en fotometráltuk (Milton Roy Spectronic 6001). A renalis GSH-koncentrációt standard görbe alapján  $\mu$ mol/g-ban határoztuk meg.

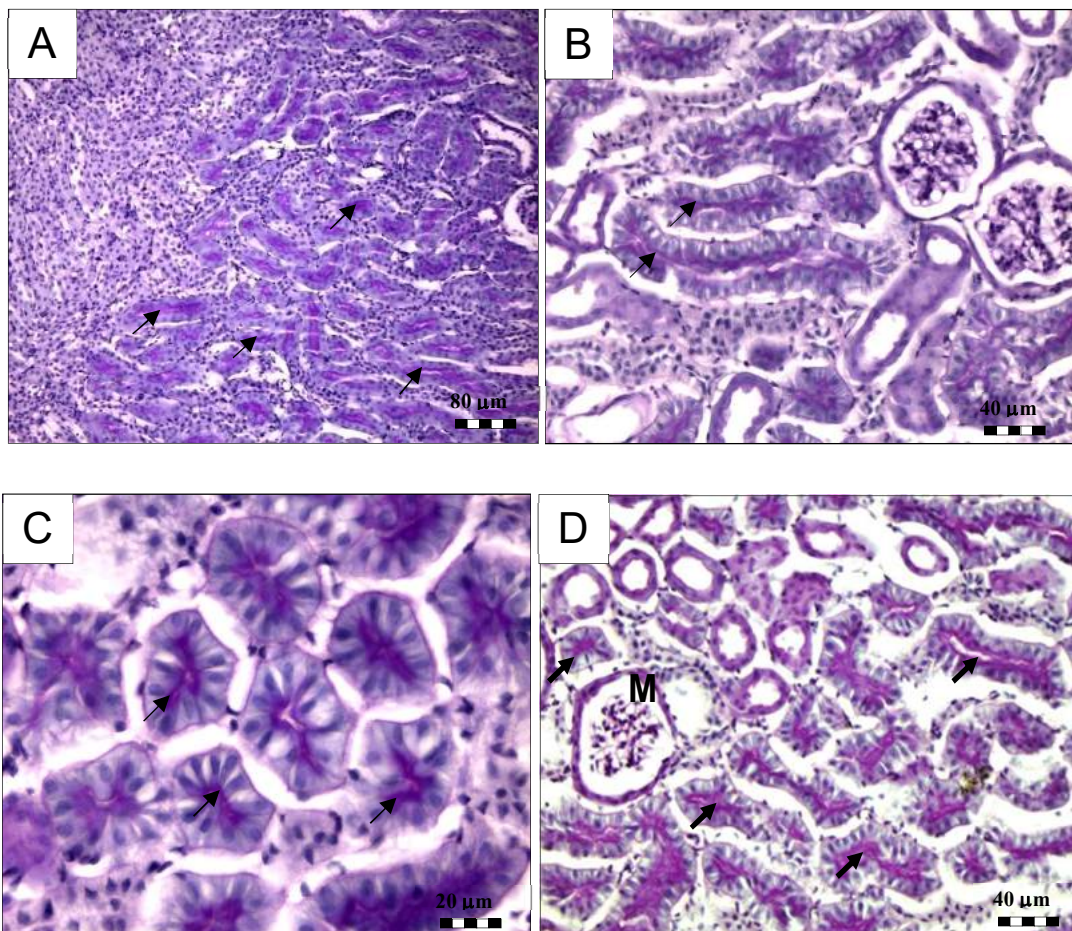
#### **4.1.7. Statisztikai analízis**

A kapott eredmények statisztikai értékelése SPSS 15.0 szoftver segítségével történt. A szövettani értékelésnél, a jelátviteli útvonalak, a citokinexpresszió, valamint az antioxidáns markerek vizsgálata során kapott eredmények kiértékeléséhez varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni/Tamhane's post-hoc teszttel kiegészítve, a normális eloszlást Kolmogorov-Smirnov- és Shapiro-Wilk-teszt segítségével, a homogenitást Levene-próbával vizsgáltuk. A  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 4.2. EREDMÉNYEK

### 4.2.1. Morphometriai analízis a PACAP +/+ és PACAP +/- egerekben

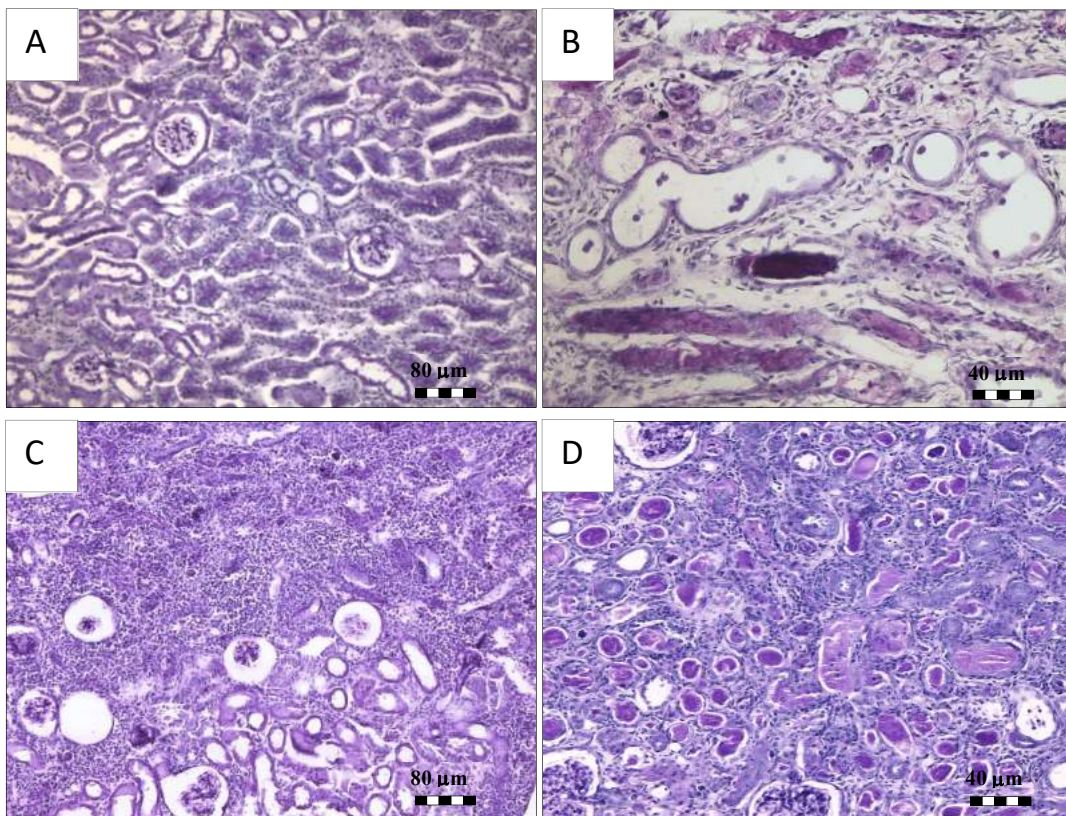
A kontroll PACAP +/+, PACAP +/- és PACAP -/- egerek veséinek szövettani analízise során nem találtunk eltérést a vese szerkezetében, normális szövettani kép volt megfigyelhető, a szövettani értékelés során kapott pontszám minden vizsgált paraméter esetében 0 volt (13. ábra).



13. ábra Reprezentatív fotók kontroll PACAP +/+ (A,C) és gényiányos (B, D) egerek veséjéből készült PAS/H festett metszetekről. Normál szövettani szerkezet. A: Corticomedullaris határ, B: Cortex, C: Tubulusátmetszetek nagyobb nagyítással, D: Cortex. Nyilak: PAS+ glycocalyx a tubularis epithelium felszínén, M: Malpighi-test

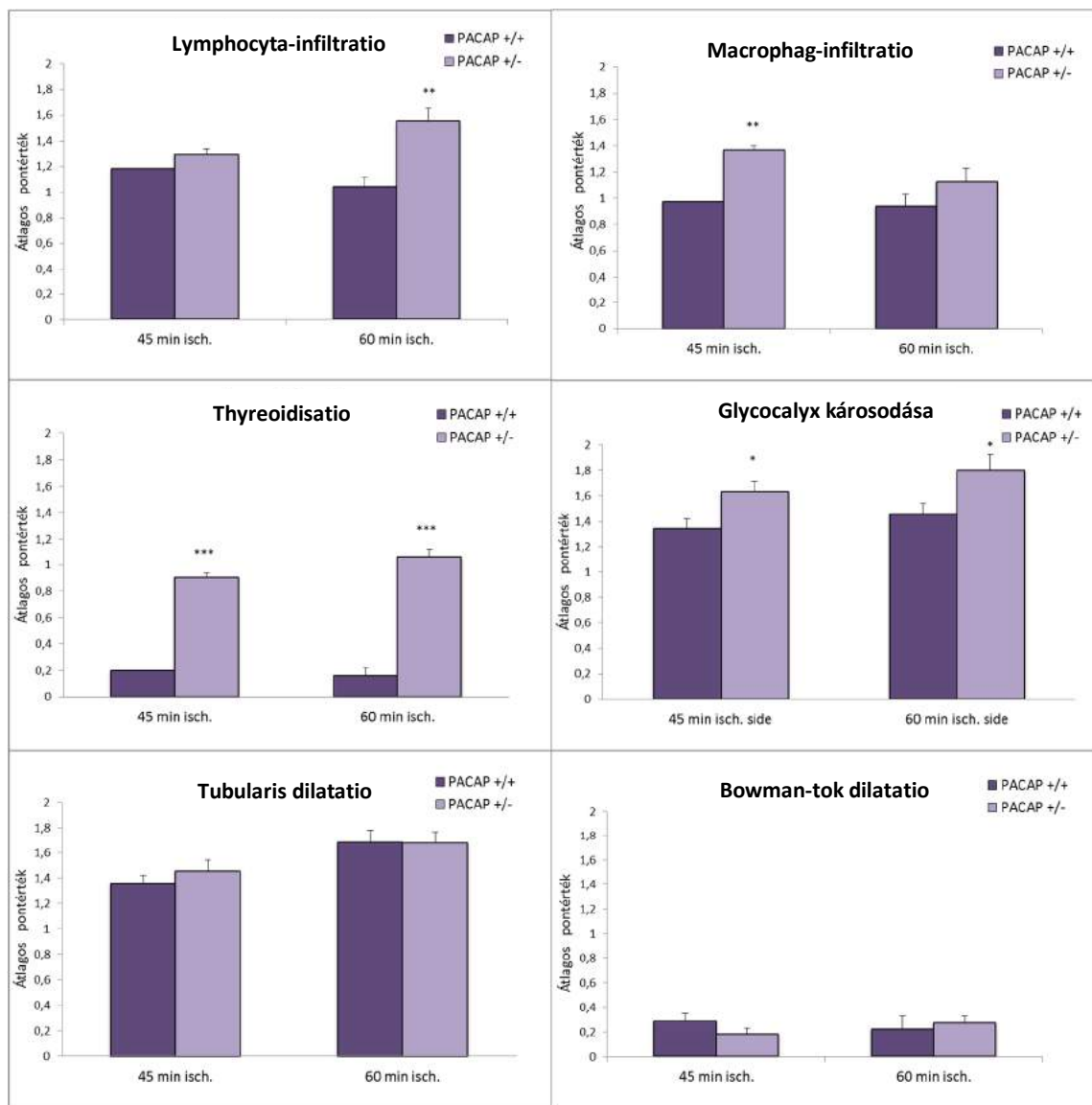
Ischaemia-reperfúziót követően azonban különbséget tapasztaltunk a PACAP +/+ és PACAP +/- egerek eredményei között. A lymphocyta- és macrophag-infiltratio szignifikánsan súlyosabbnak bizonyult a PACAP +/- állatokban (60, illetve 45 perces

ischaemia során) (14. és 15. ábra). A thyreoidisatio (cylinderek megjelenése a tubulusokban) kifejezettebb volt a PACAP +/- egerekben 45 és 60 perces ischaemiát követően egyaránt, a PACAP ++ csoportban ezen eltérés csupán igen enyhe formában volt jelen, a különbség szignifikánsnak mutatkozott (14. és 15. ábra). A glycocalyx károsodása a PACAP +/- egerekben mindkét alkalmazott ischaemiás időtartam esetén szignifikánsan súlyosabb volt (14. és 15. ábra). A tubularis dilatatio és a Bowman-tok tágulata tekintetében a PACAP ++ és PACAP +/- egerek eredménye között nem tapasztaltunk számottevő különbséget (14. és 15. ábra).



14. ábra Reprezentatív szövettani fotók PACAP ++ és PACAP +/- egerek veséjéből készült PAS/H festett metszetekről.

**A:** Kontroll PACAP ++ egér normál szerkezetű veséje. A PAS+ glycocalyx szépen kirajzolódik a tubulusokban. **B:** Tágult tubulusok a PACAP ++ egér veséjében 60 perces ischaemiát és reperfuziót követően. A PAS+ glycocalyx már nem azonosítható az ellapult tubularis epithelium sejtjeinek apikális felszínén. Néhány mononuclearis sejt is megfigyelhető a tubuluslumenben. **C:** Súlyos lymphocyta-infiltratio látható a PACAP +/- egér veséjének cortexében 60 perces ischaemiát és reperfuziót követően. A Bowman-tok tágulata is szembetűnő. **D:** PACAP +/- egér veséjének cortexe 45 perces ischaemia és reperfusio elteltével. A tubulusok PAS+ cylinderekkel kitöltöttek (thyreoidisatio).



15. ábra A szövettani értékelés számszerűsített eredménye (PACAP +/+ és PACAP +/- egerek veséjéből 45/60 perces ischaemiát és 14 napos reperfuziót követően). Az eredmények átlag  $\pm$  SEM formában kerültek megadásra.

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. PACAP +/+

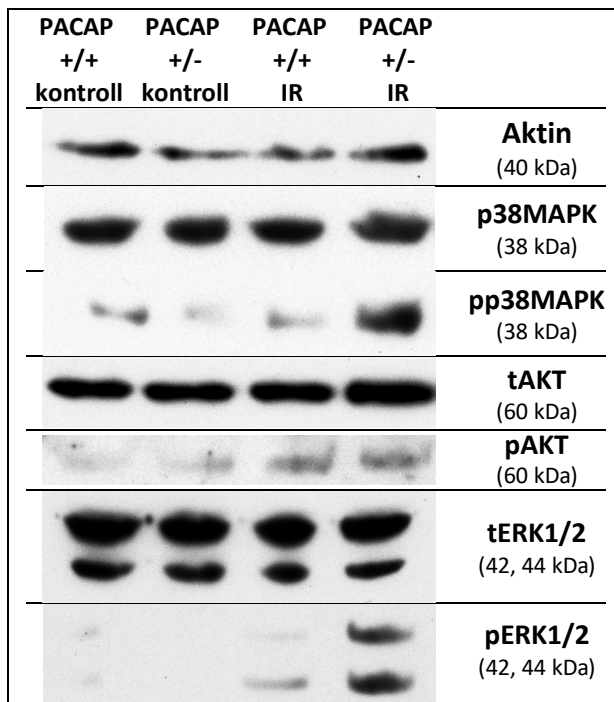
#### 4.2.2. Western blot vizsgálat eredménye a PACAP +/+ és PACAP +/- egerekben

A tAkt expressziója tekintetében a vizsgált csoportok (kontroll PACAP +/+ és PACAP +/-, valamint 60 perces ischaemiát és 24 óra reperfuziót elszenvedett PACAP +/+ és PACAP +/- egerek) között nem találtunk szignifikáns különbséget. A pAkt expressziója ischaemia-reperfuzio hatására mind a PACAP +/+, mind a

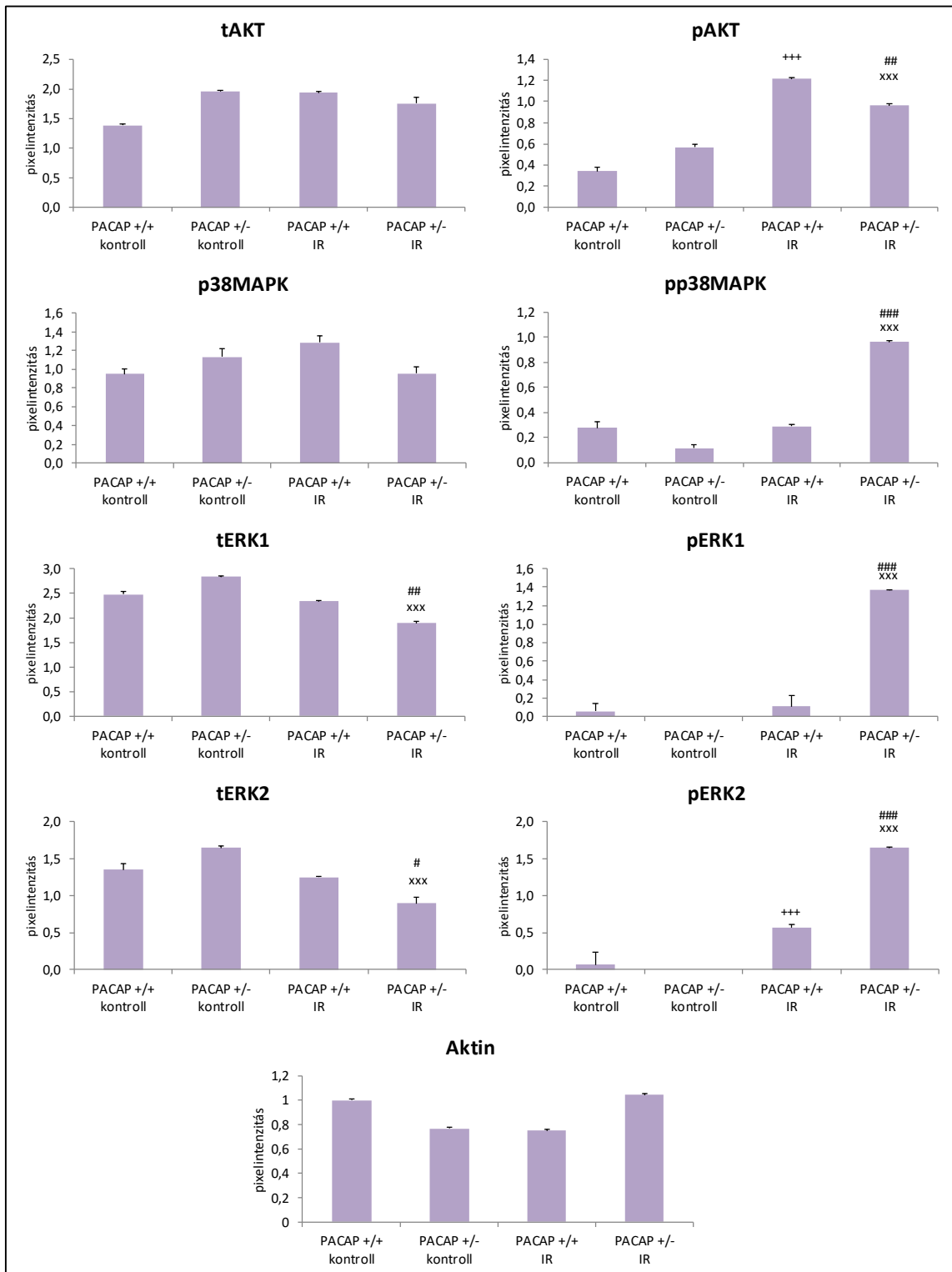
PACAP +/- egerek esetében szignifikáns emelkedést mutatott, a PACAP +/+ egerekben ischaemia-reperfúziót követően mért érték szignifikánsan magasabb volt, mint PACAP +/- társaikban (16. és 17. ábra).

A p38MAPK expressziójában nem mutatkozott szignifikáns különbség a vizsgálati csoportok (kontroll PACAP +/+ és PACAP +/-, valamint 60 perces ischaemiát és 24 óra reperfúziót elszenvedett PACAP +/+ és PACAP +/- egerek) között, azonban a p38MAPK foszforilált formájának expressziója szignifikáns emelkedést mutatott az ischaemia-reperfúzió hatására a PACAP +/- egerekben. Ischaemia-reperfúziót követően továbbá a p38MAPK foszforilált formájának expressziója szignifikánsan magasabb volt a PACAP +/- csoportban a PACAP +/+ csoporthoz képest (16. és 17. ábra).

A tERK1,2 expressziója mindkét vizsgált kontroll csoportban (kontroll PACAP +/+ és PACAP +/-) hasonlóan mutatkozott, ischaemia-reperfúzió hatására a PACAP +/- csoportban szignifikáns mértékű csökkenés volt megfigyelhető. Ischaemia-reperfúziót követően a PACAP +/- csoportban szignifikánsan alacsonyabb értéket kaptunk a PACAP +/+ csoporthoz képest. A pERK1,2 a kontroll csoportokban alig volt detektálható, a csoportok közt nem találtunk érdemi különbséget. Ischaemia-reperfúziót követően a PACAP +/+ és PACAP +/- egerekben egyaránt az expresszió szignifikáns mértékű növekedése volt megfigyelhető, a PACAP +/- csoportban szignifikánsan magasabb értéket mértünk a PACAP +/+ csoporthoz képest (16. és 17. ábra).



16. ábra Western blot eredmények – a p38MAPK és pp38MAPK, tERK 1,2 és pERK 1,2, valamint tAkt és pAkt expressziója a kontroll, valamint a 60 perces ischaemiát és 24 órás reperfúziót elszenvedett PACAP +/+ és PACAP +/- egerek veséjében.



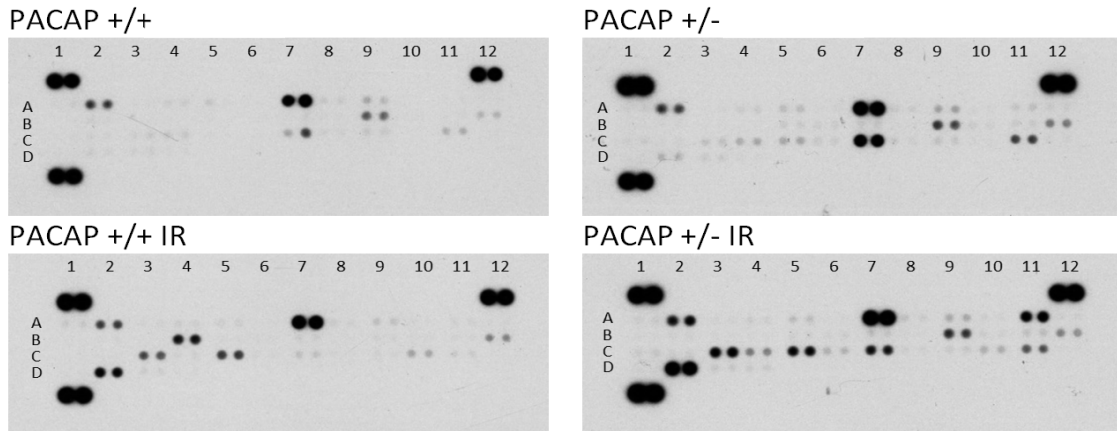
17. ábra A Western blot során szemikvantitávan mért denzitáserőtekek statisztikai analízise. A mért denzitáserőtekek az aktinnál mért értékre lettek normalizálva. Az eredmények átlag  $\pm$  SEM formában kerültek megadásra.

+++  $p < 0,001$  vs. PACAP +/+ kontroll, xxx  $p < 0,001$  vs. PACAP +/- kontroll,

#  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  vs. PACAP +/+ I/R

## 4.2.3. Citokinexpresszió tanulmányozása

### 4.2.3.1. PACAP +/+ és PACAP +/- egerek eredményei



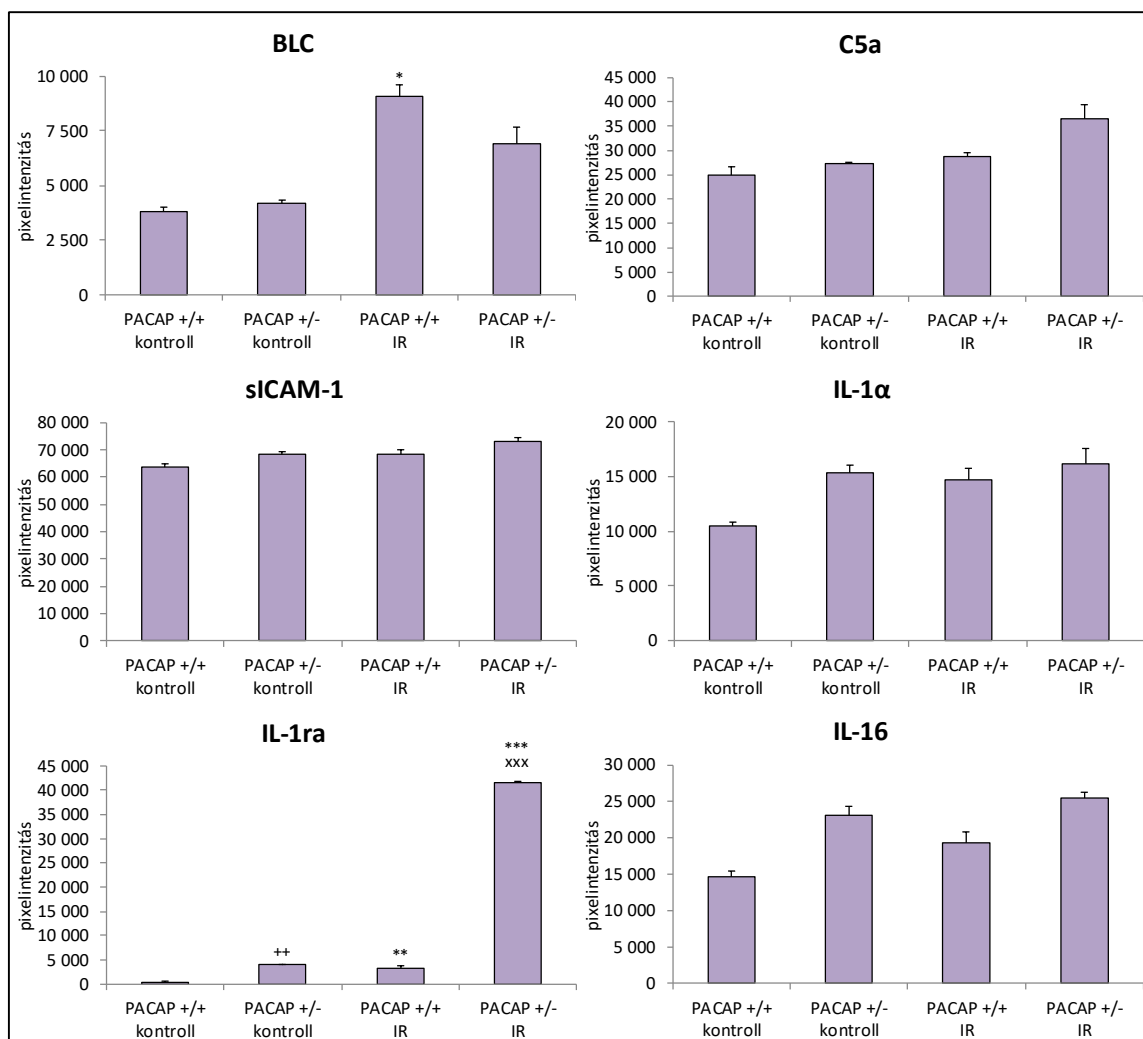
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ctr												ctr
A	BLC	C5a	G-CSF	GM-CSF	I-309	Eotaxin	sICAM-1	IFN- $\gamma$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-1ra	IL-2
B	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-13	IL-12	IL-16	IL-17	IL-23	IL-27
C	IP-10	I-TAC	KC	M-CSF	MCP-1	MCP-5	MIG	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$	MIP-2	RANTES	SDF-1
D	TARC	TIMP-1	TNF- $\alpha$	TREM-1								
ctr												

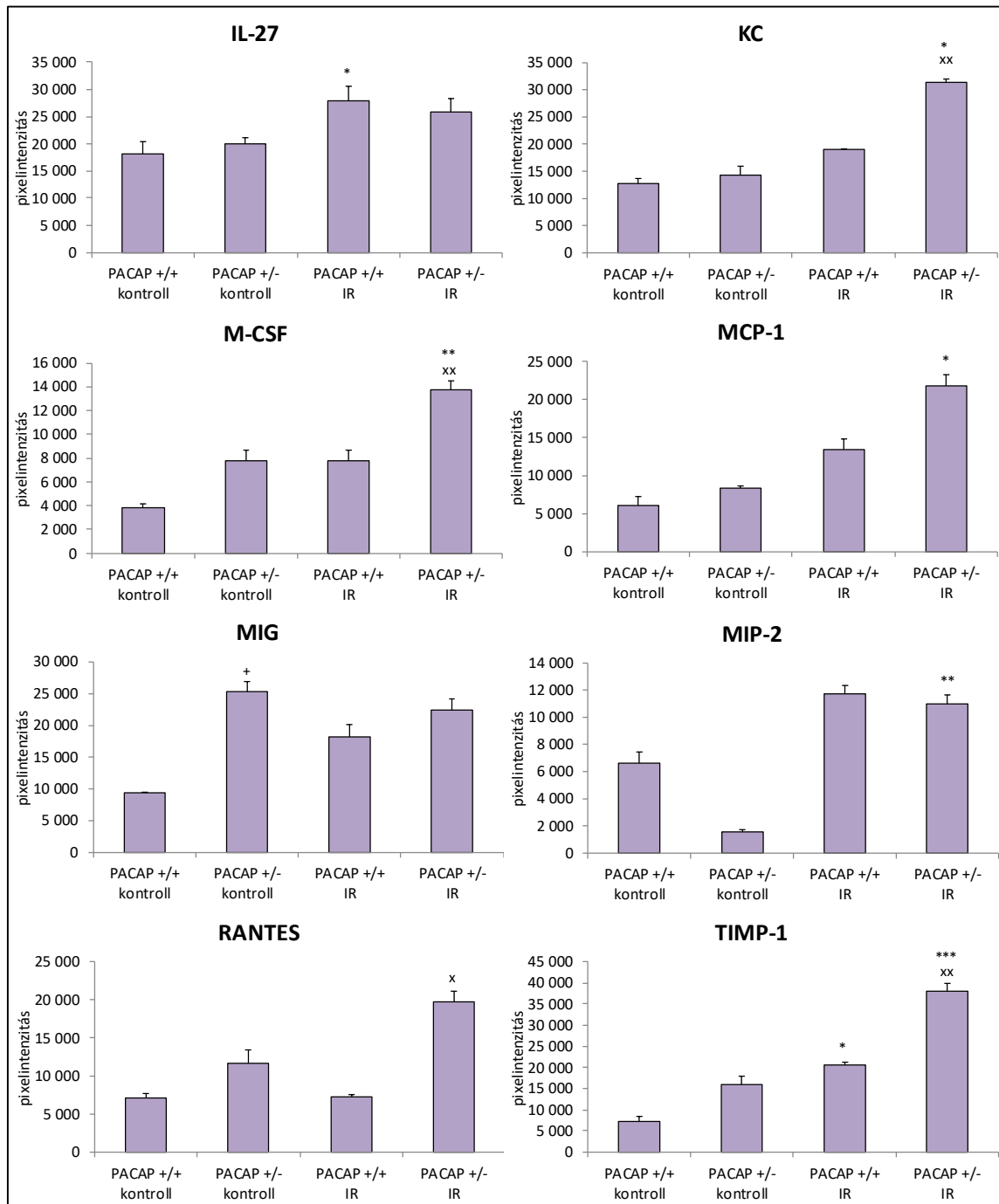
18. ábra Reprezentatív citokin array kontroll PACAP +/+ és kontroll PACAP +/-, valamint 60 perces ischaemiát és 24 órás reperfuziót elszenvedett PACAP +/+ és PACAP +/- egerek veséjéből. A membránokon a citokinek duplikátumban láthatók.

A vizsgált citokinek/chemokinek: BLC (B lymphocyte chemoattractant), C5a (complement 5a), G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), I-309, eotaxin, sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1), IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13, IL-12, IL-16, IL-17, IL-23, IL-27, IP-10 (interferon-gamma inducible protein-10), I-TAC (interferon-inducible T cell alpha chemoattractant), KC (keratinocyte-derived chemokine), M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), MCP-5 (monocyte chemoattractant protein-5), MIG (monokine induced by gamma interferon), MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ ), MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2), RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted), SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), TARC (thymus and activation-regulated chemokine), TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells-1).



A kontroll PACAP  $+/+$  és PACAP  $+/-$  egerek citokinexpressziós mintázatát tekintve nem találtunk lényegi különbséget (18-19. ábra). Ischaemia-reperfusio hatására azonban számos citokin expressziójának növekedése volt megfigyelhető, a PACAP  $+/+$  és PACAP  $+/-$  csoport között különbségeket eredményezve (18-19. ábra). A PACAP  $+/-$  egerekben az IL-1ra, KC, M-CSF, RANTES és TIMP-1 szignifikánsan magasabb expresszióját találtuk a PACAP  $+/+$  egerekhez képest ischaemia-reperfúsiót követően (18-19. ábra). Az ischaemia-reperfusio hatására bekövetkező expressziónövekedés a PACAP  $+/+$  egerekben a BLC, IL-1ra, IL-27, valamint a TIMP-1 esetében bizonyult szignifikánsnak (18-19. ábra). A PACAP  $+/-$  egerekben ezen expressziónövekedés az IL-1ra, KC, M-CSF, MCP-1, MIP-2 és TIMP-1 tekintetében érte el a szignifikáns mértéket (18-19. ábra). A C5a, sICAM-1, IL-1 $\alpha$  és IL-16 tekintetében a vizsgált csoportok között (kontroll PACAP  $+/+$  és PACAP  $+/-$ , valamint ischaemia-reperfúsió után PACAP  $+/+$  és PACAP  $+/-$  csoport) nem mutatkozott számottevő különbség (18-19. ábra).





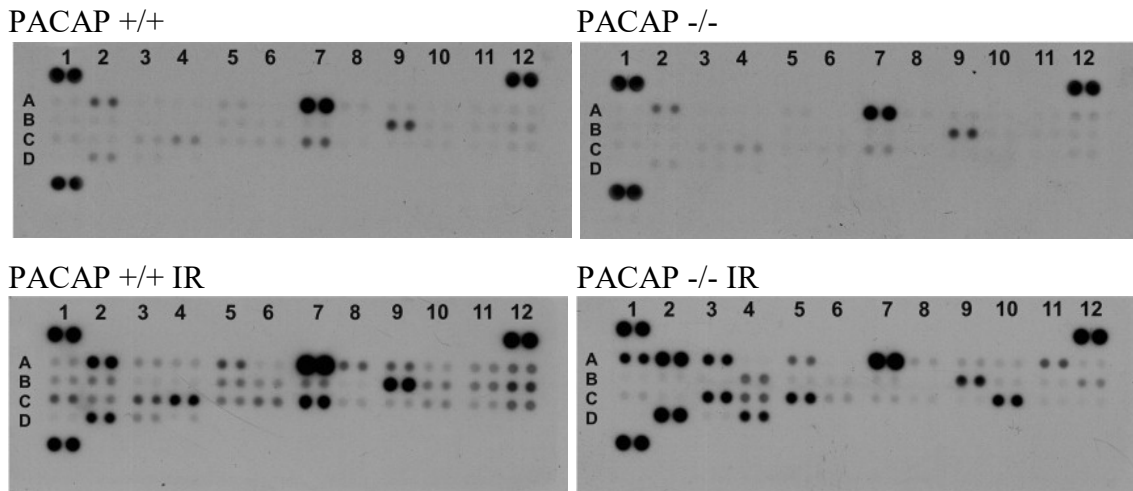
19. ábra A citokin array kvantifikálása.

A normalizált adatok átlag pixelintenzitás  $\pm$  SEM formában kerültek megadásra.

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. saját kontroll, <sup>x</sup> $p < 0,05$ , <sup>xx</sup> $p < 0,01$ , <sup>xxx</sup> $p < 0,001$  vs.

PACAP +/+ IR, <sup>+</sup> $p < 0,05$ , <sup>++</sup> $p < 0,01$  vs. PACAP +/+ kontroll

#### 4.2.3.2. PACAP +/+ és PACAP -/- egerek eredményei

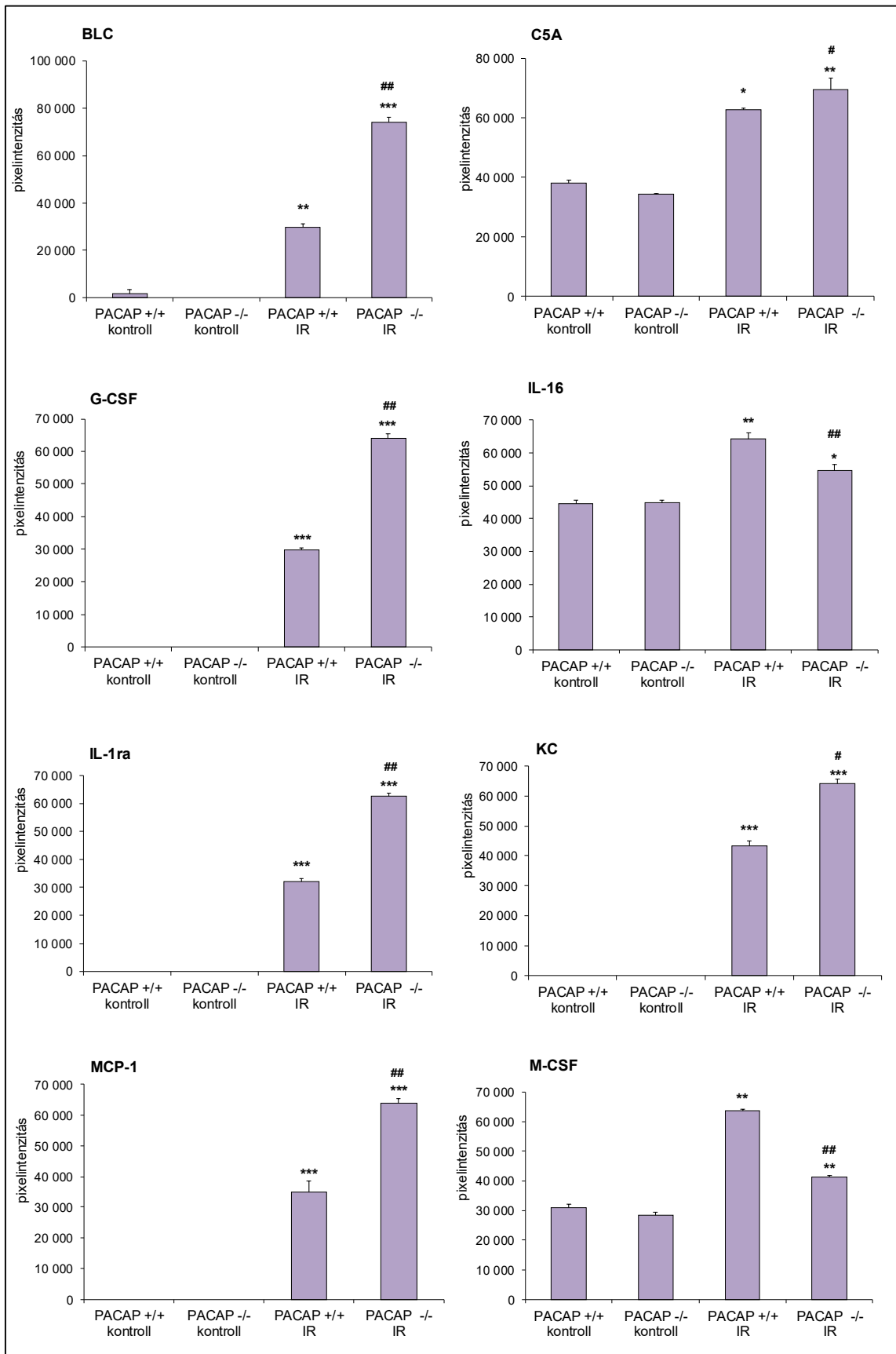


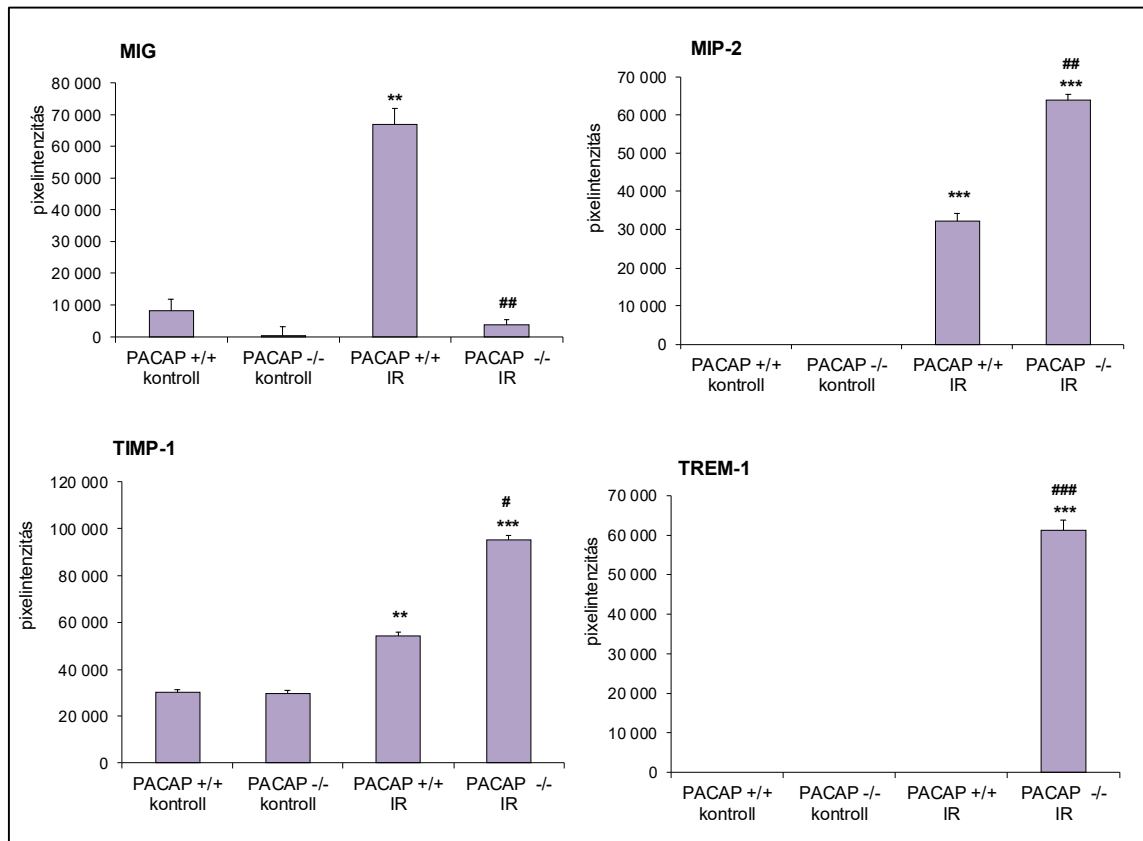
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ctr												ctr
A	BLC	C5a	G-CSF	GM-CSF	I-309	Eotaxin	sICAM-1	IFN- $\gamma$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-1ra	IL-2
B	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-13	IL-12	IL-16	IL-17	IL-23	IL-27
C	IP-10	I-TAC	KC	M-CSF	MCP-1	MCP-5	MIG	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$	MIP-2	RANTES	SDF-1
D	TARC	TIMP-1	TNF- $\alpha$	TREM-1								
ctr												

20. ábra Reprezentatív citokin array kontroll PACAP +/+ és kontroll PACAP -/-, valamint 60 perces ischaemiát és 24 órás reperfúziót elszenvedett PACAP +/+ és PACAP -/- egerek veséjéből. A membránokon a citokinek duplikátumban láthatók.

A vizsgált citokinek/chemokinek megegyeznek a 18. ábrán szereplőkkel.

A kontroll PACAP +/+ és PACAP -/- egerek eredményei között a citokinexpresszió tekintetében nem találtunk lényegi különbséget (20-21. ábra). Ischaemia-reperfúzió hatására azonban mind a PACAP +/+, mind a PACAP -/- csoportban változás mutatkozott a kontroll állatok eredményéhez képest, számos citokin/chemokin expressziója fokozottabbnak bizonyult (20-21. ábra). A PACAP +/+ és PACAP -/- egerekben egyaránt szignifikáns mértékű expressziónövekedés volt megfigyelhető a BLC, C5a, G-CSF, IL-16, IL-1ra, KC, MCP-1, M-CSF, MIP-2 és a TIMP-1 esetében (20-21. ábra). Ischaemia-reperfúziót követően a BLC, C5a, G-CSF, IL-1ra, KC, MCP-1, MIP-2, TIMP-1 és TREM expressziója a PACAP -/- egerekben szignifikánsan nagyobbak mutatkozott, mint PACAP +/+ társaikban (20-21. ábra). Az IL-16, M-CSF és MIG azonban a PACAP +/+ csoportban mutatott szignifikánsan magasabb expressziót ischaemia-reperfúziót követően (20-21. ábra).





21. ábra A citokin array kvantifikálása.

A normalizált adatok átlag pixelintenzitás  $\pm$  SEM formában kerültek megadásra.

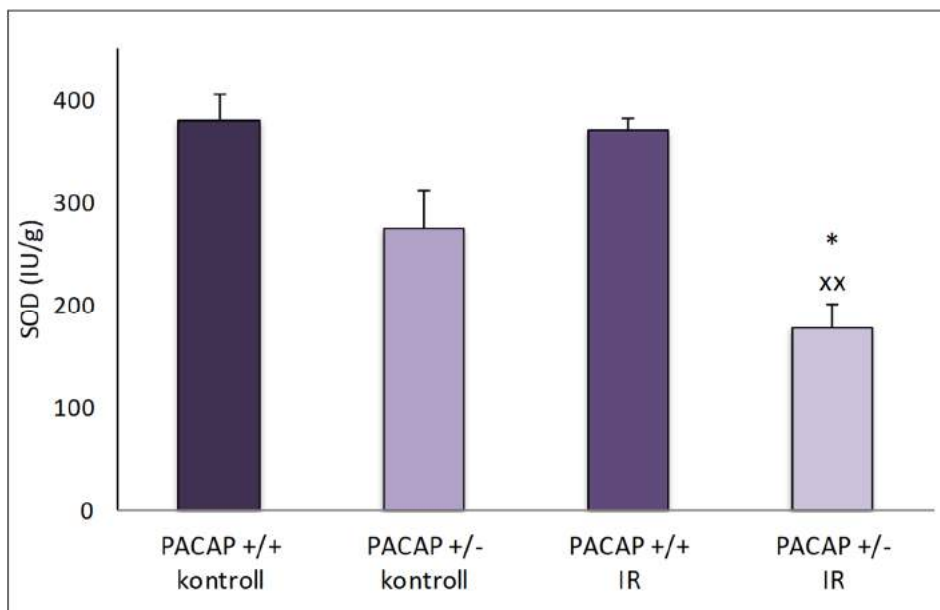
\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. saját kontroll, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  vs. PACAP +/+ IR

## 4.2.4. Antioxidáns markerek vizsgálata

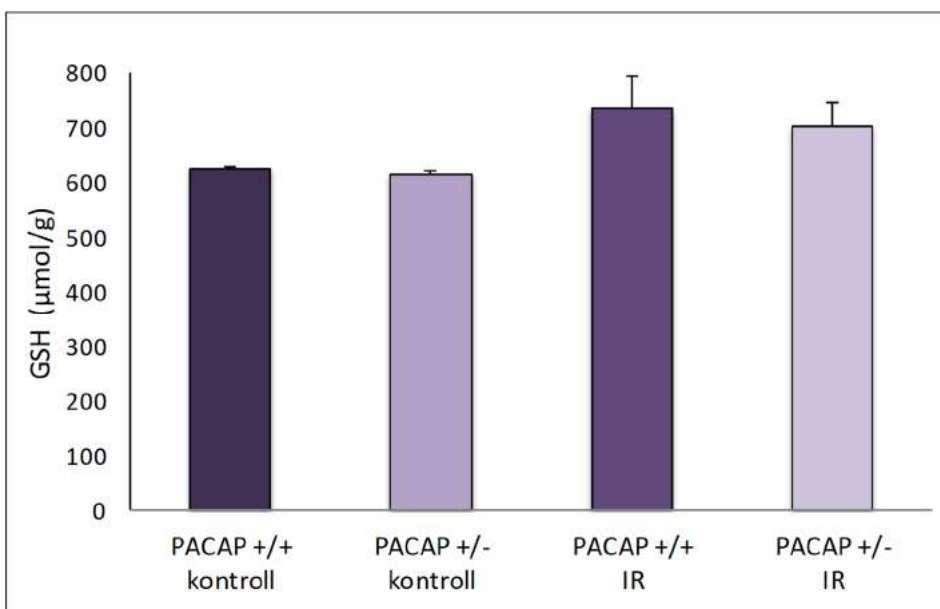
### 4.2.4.1. PACAP +/+ és PACAP +/- egerek eredményei

A kontroll PACAP +/+ és PACAP +/- egerek veséjében mért SOD-aktivitás között nem mutatkozott szignifikáns különbség (22. ábra). A SOD aktivitása azonban 60 perc ischaemiát és 24 óra reperfuziót követően szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a PACAP +/- csoportban a PACAP +/+ csoporthoz képest, a kontrollhoz viszonyítva a PACAP +/- egerek esetében szignifikáns mértékű csökkenés volt megfigyelhető (22. ábra).

A GSH-expresszió tekintetében a vizsgált csoportok (kontroll PACAP +/+ és PACAP +/-, valamint 60 perces ischaemiát és 24 óra reperfuziót elszenvedett PACAP +/+ és PACAP +/- egerek) között számottevő különbséget nem találtunk (23. ábra).



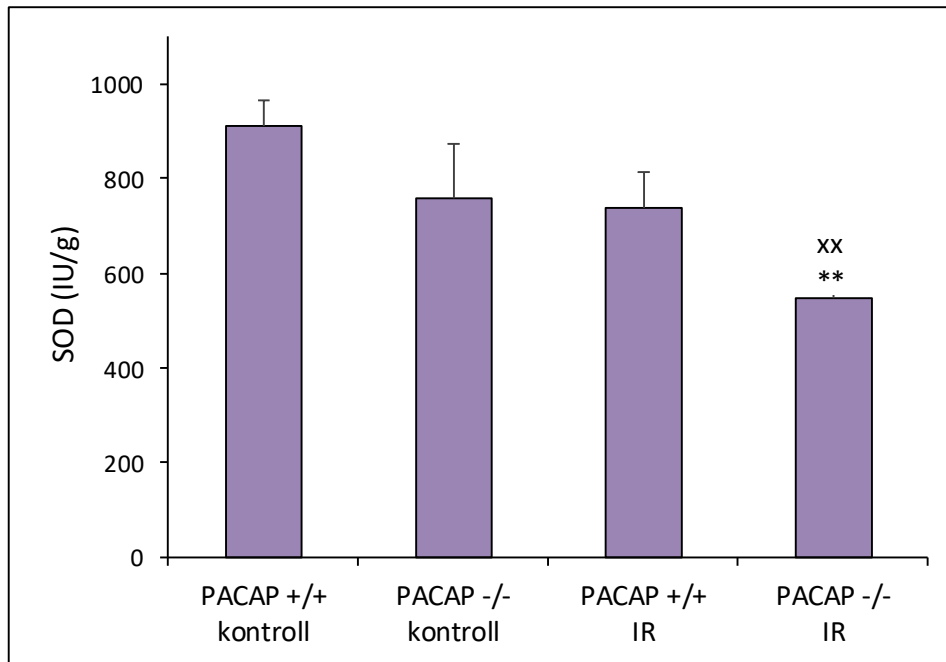
22. ábra SOD-aktivitás a kontroll, valamint a 60 perces ischaemiát és 24 órás reperfuziót elszenvedett PACAP +/+ és PACAP +/- egerekben. Az eredmények nemzetközi egység per grammban, átlag  $\pm$  SEM formában kerültek megadásra. \* $p < 0,05$  vs. PACAP +/- kontroll,  $^{xx}p < 0,01$  vs. PACAP +/+ IR



23. ábra GSH-expresszió a kontroll, valamint a 60 perces ischaemiát és 24 órás reperfuziót elszenvedett PACAP +/+ és PACAP +/- egerekben. Az eredmények µmol/g-ban, átlag  $\pm$  SEM formában kerültek megadásra.

#### 4.2.4.2. PACAP +/+ és PACAP -/- egerek eredményei

A kontroll PACAP +/+ és PACAP -/- egerek veséjében a SOD-aktivitás tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget (24. ábra). Ischaemia-reperfusio hatására a PACAP -/- egerek veséjében a SOD-aktivitás szignifikáns mértékű csökkenése volt megfigyelhető a kontrollhoz viszonyítva, az ischaemia-reperfúsiót követően mért érték PACAP +/+ társaikéhoz képest szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult (24. ábra).



24. ábra SOD-aktivitás a kontroll, valamint a 60 perces ischaemiát és 24 órás reperfúziót elszenvedett PACAP +/+ és PACAP -/- egerekben. Az eredmények nemzetközi egység per grammban, átlag  $\pm$  SEM formában kerültek megadásra. \*\* $p < 0,01$  vs. PACAP -/- kontroll, <sup>xx</sup> $p < 0,01$  vs. PACAP +/+ IR

### 4.3. MEGBESZÉLÉS

Munkacsoportunk korábbi vizsgálata során igazolást nyert, hogy a PACAP -/- egerek fokozott érzékenységet mutatnak renalis ischaemia-reperfusio esetén PACAP +/+ társaikhoz képest. A kontroll PACAP +/+ és PACAP -/- állatok között a vese szövettani szerkezetét illetően nem igazolódott érdemi különbség, mindkét csoportban normális szövettani kép volt megfigyelhető (Szakaly et al. 2011). Ez jelen vizsgálatunk során is hasonlóan alakult, a kontroll PACAP +/+ és PACAP +/- egerek eredményei között nem találtunk eltérést. Ischaemia-reperfusio hatására azonban megmutatkoztak a vizsgálati csoportok közötti különbségek. Hasonló megfigyeléseket tettek retinalis ischaemia kapcsán is (Szabadfi et al. 2012). A kontroll PACAP +/+ és PACAP -/- egerek retinájának szövettani analízise során nem találtak különbséget a csoportok között, gyakorlatilag normál szövettani kép volt megfigyelhető. Az ischaemia hatására bekövetkező retinalis degeneratio azonban súlyosabbnak bizonyult a PACAP -/- egerekben. Munkacsoportunk korábban igazolta, hogy a PACAP -/- egerek súlyosabb szövettani károsodást szenvednek el renalis ischaemia-reperfusio során, mint PACAP +/+ társaik (Szakaly et al. 2011). Mindez a PACAP +/- egerekben is megfigyelhető volt, a vizsgált paraméterek többségének esetében szignifikáns különbséget okozva a PACAP +/+ csoporthoz képest. Számottevő volt a csoportok közötti eltérés a thyreoidisatio, a lymphocyta- és macrophag-infiltratio, valamint a glycocalyx károsodása tekintetében.

Továbbá számos proinflammatoricus citokin expressziója is kifejezettebbnek bizonyult ischaemia-reperfusiót követően a PACAP +/- és PACAP -/- egerekben egyaránt. A C5a magasabb expressziója a génhiányos egerekben fontos szerephez juthat a súlyosabb károsodás kialakulásában, hiszen bizonyított, hogy a C5a-receptorantagonista alkalmazása képes a különféle chemokinek upregulációját gátolni, valamint jelentősen csökkenteni a neutrophil infiltratio mértékét a vesében ischaemia-reperfusio során (de Vries et al. 2003). Ismert továbbá, hogy a KC – mely szintén kifejezettebb expressziót mutatott a PACAP +/- és PACAP -/- állatokban – is kulcsszerepet tölt be a neutrophil infiltratio létrejöttében a vesében ischaemia-reperfusiót követően (Miura et al. 2001). A génhiányos egerekben a magasabb MCP-1-szint is a károsodás jelzője lehet, ismert, hogy a vese ischaemia-reperfusio pathogenesisében fontos szerepet játszik a macrophagokra kifejtett aktiváció révén (Furuichi et al. 2003). A génhiányos egerekben tapasztalt magasabb TIMP-1-expresszió is utalhat a károsodás súlyosságára, a nephrotoxikus cyclosporinkezelés alkalmazása esetén is a TIMP-1-expresszió



fokozódása észlelhető (Jin et al. 2008). A RANTES magasabb expressziója is jellemző elváltozás renalis ischaemia során, a renoprotektív hatást mutató ágensek képesek expressziójának csökkentésére (Fischereder 2007, Jones et Shoskes 2000). Kísérletünkben a PACAP  $+/+$  egerekben a RANTES alacsonyabb expressziója volt megfigyelhető a PACAP  $+/-$  társaikhoz képest. Az sICAM-1 – mely a leukocyták migrációját befolyásolja – expressziója tekintetében nem igazolódott a PACAP  $+/+$  és a génihiányos egerek között érdemi különbség. Az sICAM-1 az acut vesekárosodás pathomechanizmusában fontos szerepet játszik. Monoklonális ICAM-1-antitest alkalmazása protektívnek igazolódott renalis ischaemia esetén, valamint az ICAM-1-deficiens egerek is védettebbnek bizonyultak a vese ischaemiás károsodása során (Akca et al. 2009). A BLC-expresszió a PACAP  $-/-$  egerek esetén szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a PACAP  $+/+$  egerekhez képest, a PACAP  $+/-$  és PACAP  $+/+$  egerek között azonban nem találtunk számottevő különbséget. Ismert, hogy ezen chemoattraktáns faktor szintjének emelkedése elősegíti a B-sejtek vándorlását, a B-sejtes infiltratio pedig gátló hatást fejt ki az ischaemia-reperfüsiót követő repair folyamatokra (Jang et al. 2010). A MIP-2 kulcsszerepet tölt be a neutrophil infiltratio létrejöttében ischaemia-reperfusio okozta vesekárosodásban (Miura et al. 2001), expressziója kifejezettebbnek igazolódott a PACAP  $-/-$  egerekben PACAP  $+/+$  társaikhoz képest. A PACAP  $+/-$  és PACAP  $+/+$  csoport értékei között azonban nem találtunk szignifikáns különbséget. A TREM expressziója a PACAP  $-/-$  egerekben szignifikánsan magasabbnak mutatkozott, mint a PACAP  $+/+$  állatokban. Egy tanulmányban azonban arra a következtetésre jutottak, hogy a TREM nem játszik jelentős szerepet kísérletes renalis ischaemiában, továbbá vesetranszplantáció során sem (Tammara et al. 2016). Az IL-16 inaktivációja bizonyítottan védő szereppel bír ischaemia-reperfüsiós vesekárosodásban (Wang et al. 2008). Jelen vizsgálatban az IL-16-expresszió a PACAP  $-/-$  egerekben alacsonyabbnak mutatkozott PACAP  $+/+$  társaikhoz képest, a PACAP  $+/-$  és PACAP  $+/+$  egerekben mért érték között nem igazolódott szignifikáns különbség. Az IL-1 $\alpha$  és IL-27 tekintetében nem volt érdemi különbség megfigyelhető a PACAP  $+/+$  és génihiányos egerek között, az IL-1ra expressziója viszont mind a PACAP  $-/-$ , mind a PACAP  $+/-$  csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a PACAP  $+/+$  állatokban. Az IL-1 renalis ischaemia-reperfusio során feltehetőleg káros hatású (Haq et al. 1998), az IL-1ra alkalmazása képes volt az ischaemia-reperfüsiós károsodás mérséklésére (Rusai et al. 2008). Az M-CSF fontos szerepet tölt be az acut vesekárosodást követő repair folyamatokban, upregulálódik a tubularis epitheliumban (Perry et al. 2015). A G-CSF is

elősegíti a renalis tubularis epithelium regenerációját (Bi et al. 2015). Érdekes, hogy az M-CSF expressziója a PACAP +/-, a G-CSF expressziója a PACAP -/- egerekben bizonyult kifejezettebbnek PACAP +/+ társaikhoz képest.

A SOD-enzim aktivitásának szignifikáns mértékű csökkenése figyelhető meg ischaemia-reperfusio hatására a homo- és heterozigóta génhíányos egerekben egyaránt, az ischaemia-reperfúziót követően a génhíányos egerekben mért érték szignifikánsan alacsonyabb, mint PACAP +/+ társaikban. Mindez a génhíányos egerekben a csökkent antioxidáns kapacitás jelzője lehet. Hasonló eltérések kerültek leírásra intestinalis ischaemia kapcsán is (Ferencz et al. 2010 a,b).

Ismert, hogy a p38MAPK aktivitásának gátlása az ischaemia-reperfúziós károsodás mérsékléséhez vezet (Wang et al. 2017, Yeda et al. 2017). Kísérletünkben a PACAP +/- egerek esetében a pp38MAPK-expresszió a PACAP +/+ állatokban mért értékkel összehasonlítva szignifikánsan magasabbnak mutatkozott. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy az ERK aktivációja hozzájárul a károsodáshoz és az apoptoticus sejthalálhoz (Alderliesten et al. 2007). Vizsgálatunkban a PACAP +/- állatokban tapasztaltunk magasabb pERK-expressziót. A pAkt expressziója a PACAP +/+ egerekben bizonyult magasabbnak, mely mértéke a PACAP +/- csoporthoz képest szignifikánsnak mutatkozott. Számos tanulmányban számolnak be arról, hogy az Akt-útvonala aktivációján keresztül az ischaemia-reperfúziós vesekárosodás enyhíthető (Hosszu et al. 2017, Hu et al. 2018, Wei et al. 2019).

A vizsgálatunk során tapasztaltak összhangban vannak számos tanulmánnyal, ahol bizonyításra került, hogy a PACAP-génhíányos egerek érzékenyebben reagálnak különböző káros behatásokra, súlyosabb eltérések kialakulásához vezetve (Reglodi et al. 2012b). Jelen kísérletünk során igazolást nyert, hogy a PACAP az endogén védekezési rendszer részének fontos tagja, részleges/teljes hiányában a szervezetet érő káros stimulusok komolyabb következményekhez vezetnek.

Korábbi tanulmányokban leírták már, hogy a csökkent PACAP-szinttel rendelkező heterozigóta PACAP-génhíányos egerek változatos eredményeket mutathatnak, a vizsgált szervtől és a kísérleti körülményektől függően, mely jelen vizsgálat során is észlelhető volt néhány esetben. A létrejövő károsodás mértéke lehet a vad és homozigóta PACAP-génhíányos egerekben tapasztaltak között, de ez nem következetesen van így, előfordul, hogy a károsodás inkább a homozigóta vagy a vad egerekben megfigyelthez közelít (Farkas et al. 2017b).

Az endogén PACAP protektív szerepe egyéb szerveket érintő ischaemia-reperfúziós károsodás kapcsán is ismert. A PACAP -/- egerekben súlyosabb károsodás alakult ki intestinalis ischaemia-reperfúzió esetén (Ferencz et al. 2010 a,b), retinalis ischaemia kapcsán is igazolták a komolyabb elváltozások jelenlétét a génhiányos egerekben (Szabadfi et al. 2012). A retinalis ischaemia kapcsán a génhiányos egerekben kialakult súlyosabb eltérések exogén PACAP alkalmazásával részben kompenzálhatók voltak (Szabadfi et al. 2012). Az arteria cerebri media occlusiója által kiváltott stroke modellben mind a PACAP +/-, mind a PACAP -/- egerekben bizonyították a súlyosabb károsodást, az elhalt terület nagyobbak igazolódtak (Ohtaki et al. 2006). Exogén PACAP alkalmazása azonban a károsodás mérséklődéséhez vezetett a génhiányos egerekben (Ohtaki et al. 2006).

Tanulmányunk során az is megerősítést nyert, hogy az endogén védekezési rendszer részét képező, a szervezetben jelen levő PACAP protektív szerepének hátterében a fehérje antiapoptoticus, antiinflammatoricus hatása, valamint az antioxidáns rendszerre kifejtett kedvező hatása állhat.

## **5. A PACAP SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA GENTAMICIN INDUKÁLTA NEPHROTOXICITÁSBAN HK-2 SEJTVONALON**

---

### **5.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **5.1.1. A vizsgált sejt kultúra**

HK-2 humán vese proximalis tubulus epithelialis sejt vonalat (ATCC) DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)/F-12, 10% FBS (fetal bovine serum)-sel és 1% penicillin–streptomycinnel (Biosera, USA) suplementált médiumban tenyésztettük. A sejtek passzálása tripszinezést követően (Trypsin/EDTA; Biosera, USA), 10% FBS-tartalmú DMEM/F-12 médiumban történő hígítással történt. A kísérletek a médiumban, a 95% páratartalmú, 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú, 37°C-os közegben történő 24 órás inkubációt követően zajlottak.

#### **5.1.2. MTT assay**

A PACAP sejtproliferációra és a túlélésre kifejtett hatását 96 lyukú microplate-en (10 000 sejt/well) vizsgáltuk.

A vizsgált csoportok:

- kontroll (kezelés nélkül)
- 10 nM PACAP-kezelés
- 100 nM PACAP-kezelés
- 1 μM PACAP-kezelés

A PACAP gentamicintoxicitásban kifejtett hatásának vizsgálatához az alábbi csoportokat hoztuk létre:

- kontroll (kezelés nélkül)
- 24 órás 100 nM PACAP-kezelés
- 24 órás 2 μg/ml gentamicinexpozíció
- 24 órás 2 μg/ml gentamicinexpozíció és szimultán 100 nM PACAP-kezelés

A sejtek életképességének vizsgálatához kolorimetrikus MTT assay-t (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, St. Louis, MO,

USA) használtunk. A teszt során az élő sejtek mitochondriumi az eredetileg sárga MTT-t kék formázán festékké alakítják, mely absorptióját vizsgálva tudunk az élő sejtek mennyiségére következtetni. Az inkubációs periódus letelte után a sejteket kétszer PBS-sel (Sigma, St. Louis, MO, USA) mostuk, majd 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT-t tartalmazó PBS-ben inkubáltuk 3 órán keresztül, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú légkörben. A 3 óra elteltével a folyadékot óvatosan leszívtuk, majd a kék festékpaticumokat wellenként 200 µl dimetil-szulfidban újra feloldottuk. Ezt követően az abszorbanciát ELISA leolvasó (Dialab Kft., Hungary) segítségével 570 nm hullámhosszon megmértük, amely arányos volt az élő sejtek számával.

### **5.1.3. Vese biomarker array**

Proteome Profiler Human Kidney Biomarker Array (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)-t végeztünk a PACAP renalis proteinek expressziójára kifejtett hatásának megítélésére. A sejteket 6 lyukú plate-re helyeztük, majd 24 órás kezelésben részesültek.

A vizsgálati csoportok:

- kontroll (kezelés nélkül)
- 24 órás 100 nM PACAP-kezelés
- 24 órás 2 µg/ml gentamicinexpozíció
- 24 órás 2 µg/ml gentamicinexpozíció és szimultán 100 nM PACAP-kezelés

Az inkubációt és a szupernatáns gyűjtést követően a vizsgálat a gyártó leírása szerint történt, a kit az összes szükséges összetevőt tartalmazza. Röviden, a membránok egy órás blokkolása, és a 'detection antibody cocktail' mintákhoz történő hozzáadása után (újabb egy óra szobahőmérsékleten), a membránokat egy éjszakán át 2–8°C-on a minta-antitest keverékkel inkubáltuk. Mosást követően, tormaperoxidáz-konjugált streptavidint adtunk a membránokhoz 30 percre, majd az előhíváshoz chemilumineszcens reagenst alkalmaztunk. Az array-t az ImageJ 1.40 software segítségével analizáltuk.

### **5.1.4. Statisztikai analízis**

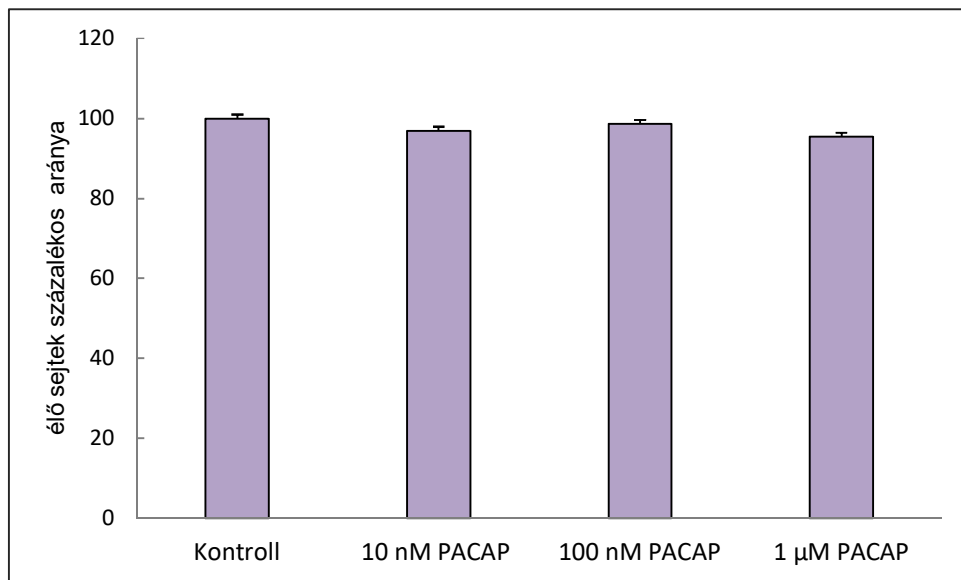
Minden kísérlet minimum háromszor ismétlésre került. A statisztikai analízist kétutas varianciaanalízissel végeztük, a  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 5.2. EREDMÉNYEK

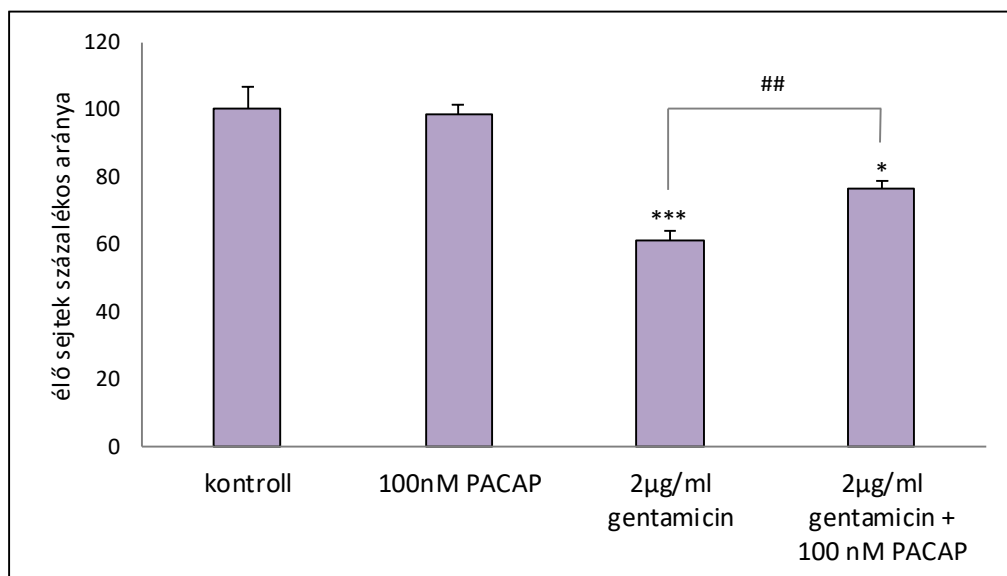
### 5.2.1. Sejttúlélés – MTT assay

A PACAP egyik alkalmazott koncentrációja (10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M) sem volt képes szignifikáns változást előidézni a sejtproliferációban (25. ábra).

A 2  $\mu$ g/ml gentamicinexpozíció a sejttúlélés szignifikáns mértékű csökkenéséhez vezetett (26. ábra). Az alkalmazott PACAP-kezelés képes volt a gentamicin toxikus hatásának mérséklésére, a sejttúlélés jelentős (szignifikáns) javulásához vezetett, míg a PACAP önmagában (toxikus ágens hiányában) a kontrollhoz képest nem idézett elő javulást a sejttúlélésben (26. ábra).



25. ábra MTT assay eredménye – a HK-2 sejtek túlélése különböző koncentrációjú PACAP-kezelés esetén. Az adatok az élő sejtek százalékos arányában  $\pm$  SEM kerültek megadásra.



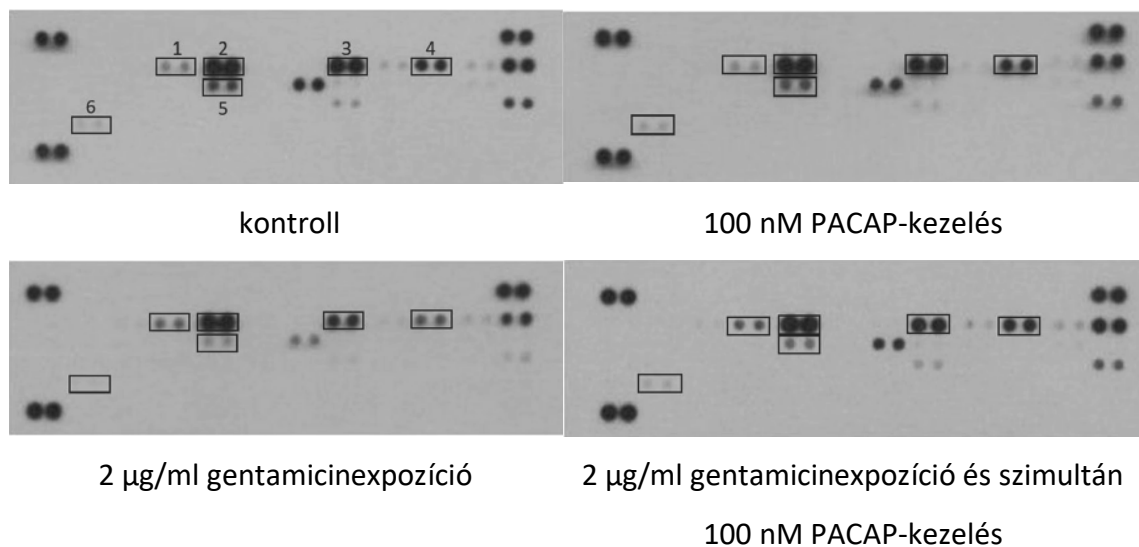
26. ábra MTT assay eredménye – a 2 µg/ml gentamicinexpozíciónak kitett HK-2 sejtek túlélése, valamint az alkalmazott PACAP-kezelés hatása a sejt túlélésre. Az adatok az élő sejtek százalékos arányában ± SEM kerültek megadásra. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. kontroll, ## $p < 0,01$  vs. gentamicinkezelt csoport

### 5.2.2. Vese biomarker array

A PACAP önmagában szignifikánsan csökkentette az annexin V- és a Cyr 61 (cysteine-rich protein 61)-expressziót, továbbá a PACAP-kezelés a DPPIV és VEGF expressziójának szignifikáns mértékű növekedéséhez vezetett (27. és 28. ábra).

A gentamicin a következő peptidek expressziójának szignifikáns mértékű csökkenését idézte elő: Cyr 61, DPPIV, interleukin-6, VEGF (27. és 28. ábra).

A DPPIV és VEGF esetében a PACAP képes volt a gentamicin indukálta expressziócsökkenés szignifikáns mérséklésére (27. és 28. ábra).



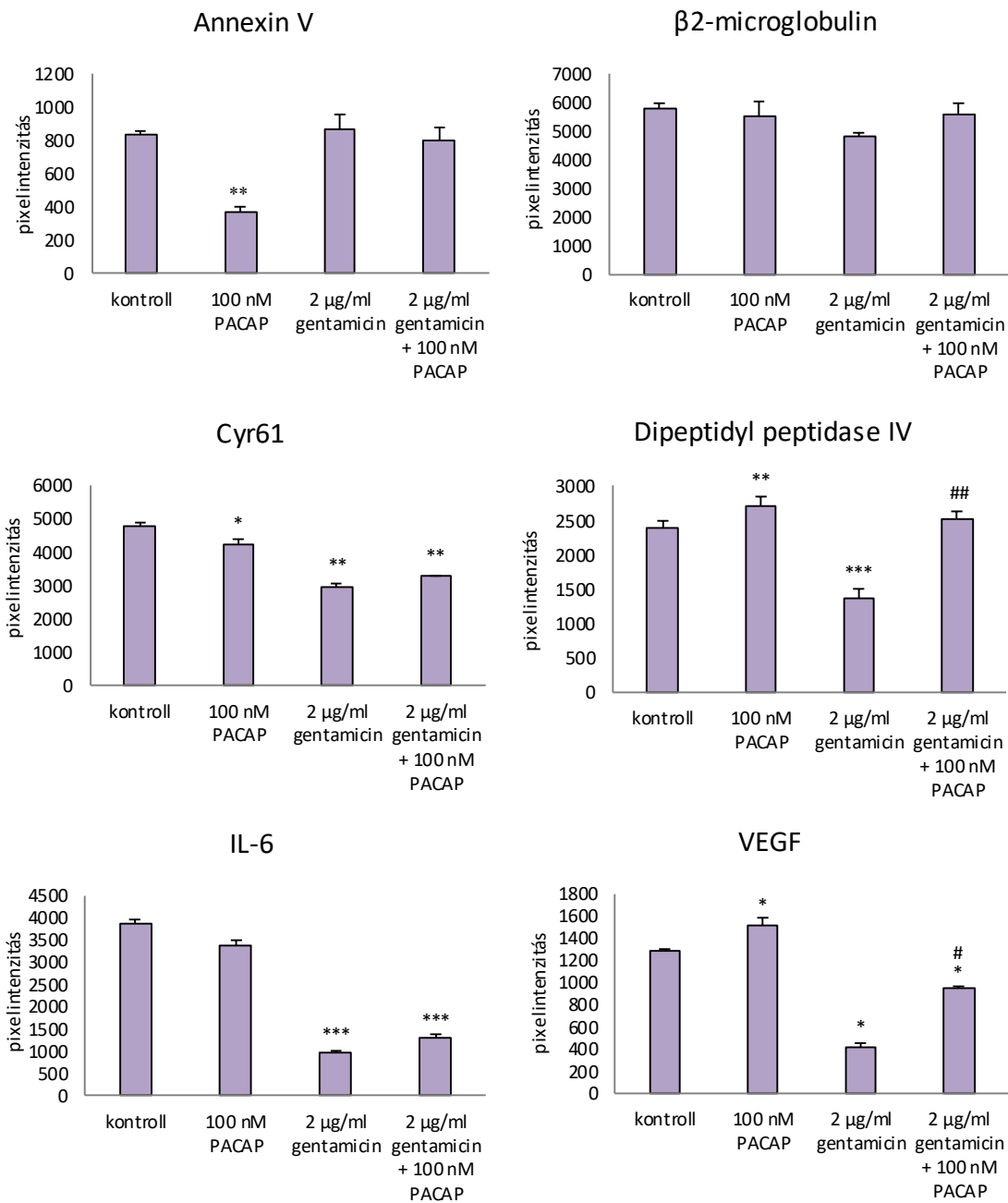
27. ábra Reprezentatív vese biomarker array.

Számottevő változás volt megfigyelhető a következők esetében:

- (1) - *annexin V*.
- (2) - *β2-microglobulin*
- (3) - *Cyr 61*
- (4) - *DPPIV*
- (5) - *interleukin-6*
- (6) - *VEGF-A*

Nem volt érdemi eltérés a továbbiak esetében (a bal felső sarokból indulva, számozás nélkül): *adiponectin*, *ANPEP* (*alanyl aminopeptidase*), *angiotensinogen*, *clusterin*, *CXCL6* (*chemokine ligand 6*), *cystatin C*, *EGF* (*epidermal growth factor*), *EGF-R* (*epidermal growth factor receptor*), *FABP1* (*fatty acid-binding protein 1*), *fetuin A*, *GROα* (*growth-regulated oncogene α*), *IL-1ra* (*interleukin-1 receptor antagonist*), *IL-10* (*interleukin-10*), *TIM-1* (*T-cell immunoglobulin mucin-1*), *lipocalin-2*, *MCP-1* (*monocyte chemoattractant protein 1*), *MMP-9* (*matrix metalloproteinase 9*), *neprilysin*, *PSA* (*prostate specific antigen*), *RAGE* (*receptor for advanced glycation end-products*), *RBP4* (*retinol binding protein 4*), *renin*, *resistin*, *SCF* (*stem cell factor*), *serpin A3*, *TNFα* (*tumor necrosis factor alpha*), *TNF-R1* (*TNF-receptor1*), *TFF3* (*trefoil factor 3*), *thrombospondin-1*, *TWEAK* (*TNF-like weak inducer of apoptosis*), *uPA* (*urokinase-type plasminogen activator*), *VCAM-1* (*vascular cell adhesion molecule-1*).





28. ábra A vese biomarker array kvantifikálása.

A normalizált adatok átlag pixelintenzitás  $\pm$  SEM formában kerültek megadásra.

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. kontroll,

# $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  vs. gentamicinkezelt csoport

### 5.3. MEGBESZÉLÉS

Az aminoglikozid-toxicitás a klinikailag egyik legfontosabb vesét érintő gyógyszer-toxicitás, mely elsősorban a proximális tubulusok károsodását idézi elő (Lopez-Novoa et al. 2011). Humán vese proximális tubulus – HK-2 – sejteken végzett vizsgálataink során bizonyítást nyert a PACAP védő szerepe gentamicin indukálta toxicitás során.

Egy korábbi tanulmányban igazolták, hogy a PACAP képes patkányokban a gentamicin hatására emelkedett TNF- $\alpha$ -szint csökkentésére (Li et al. 2008b). Ismert továbbá, hogy az exogén PACAP védő hatása a vesében oxidatív stressz esetén (Horvath et al. 2011), cisplatin- (Li et al. 2010a) és cyclosporin A-toxicitásban (Khan et al. 2011). *In vivo* kísérletek bizonyították a renoprotektív hatást ischaemia-reperfusio során (Li et al. 2010b) és adriamycinexpozícióban is (Eneman et al. 2017).

Kutatásunk nemcsak a PACAP sejtülésre kifejtett hatásának vizsgálatára irányult, kiterjedt számos, a vesefunkcióhoz kapcsolt faktorra gyakorolt hatás tanulmányozására is. Vizsgálatunkban a PACAP a DPPIV-szint gentamicin által kiváltott változása ellen hatott – a gentamicin hatására a DPPIV szintjének *in vitro* csökkenését tapasztaltuk, melyet a PACAP-kezelés mérsékelni tudott. Ez alapján felvetődik, hogy a PACAP hatással bír a DPPIV-expresszióra. Megfigyeléseink a gentamicin DPPIV-suppressziót okozó hatásáról összhangban vannak az irodalomban található adatokkal (Blais et al. 1993). A DPPIV két formában található meg: solubilis formája a keringő PACAP degradációjában *in vivo* fontos szerepet játszik (Zhu et al. 2003), másik formája membránkötött, melyet már számos epithelialis sejt típusban kimutattak, azonban a fő előfordulása a vesecortex proximális tubulus kefeszegélyéhez köthető (Kenny et al. 1976), mely alapján a renalis fehérjetranszport-rendszer részének tekinthető (Tiruppathi et al. 1990). Egy tanulmányban (Girardi et al. 2001) a DPPIV és a Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> transzporter egy isoformája között kapcsolatot találtak, mely a DPPIV proximális tubularis epithelium fiziológiás funkciójában betöltött szerepét jelzi. Kísérletünkben a PACAP-kezelés képes volt a gentamicin által előidézett DPPIV-csökkenés mérséklésére, jelezve a PACAP hozzájárulását a proximális tubularis epithelium fehérjetranszport-rendszerének védelméhez.

Tanulmányunkban a PACAP a VEGF-expressziót szignifikáns mértékben emelte, valamint a gentamicin által előidézett csökkenését mérsékelte. Az alternatív splicing eredményeként a VEGF számos isoformája ismert. A VEGF-A az egyik legnagyobb

mennyiségben jelen levő isoforma (Neufeld et al. 1999), melyet mi is vizsgáltunk. A VEGF hatással bír az endothelsejt-proliferációra és -differentiációra, befolyásolja a vascularis permeabilitást és az érátmérőt (Neufeld et al. 1999). Ismert a jelenléte a vesében, ahol a különleges eloszlása a glomerularis permeabilitásban betöltött szabályozó szerepét valószínűsíti. A VEGF-rendszer hibás működését vesebetegségek széles spektrumában írták le, mely a klinikai jelentőségét hangsúlyozza (Schrijvers et al. 2004). Vizsgálatunk során az *in vitro* gentamicintoxicitás következtében csökkent VEGF-expresszió volt megfigyelhető a human proximalis tubulussejtekben, mely csökkenést a PACAP-kezelés mérsékelni tudta. A PACAP ezen hatása összhangban van korábbi tanulmányokban leírásra került eredményekkel, ahol a PACAP-ot az angiogenesis szabályozójaként említik (Ribatti et al. 2007), emeli a VEGF mRNS-expressziót humán tüdő- és prostatatumor-sejtekben (Collado et al. 2004, Moody et al. 2002).

A mechanizmus, melyen keresztül a PACAP a HK-2 sejteken a gentamicintoxicitás ellen hat, feltehetőleg a PAC1-receptor aktivációjához kötött. A PACAP G-protein-kötött receptorokon (PAC1, VPAC1 és VPAC2) keresztül hat, melyek közül a PAC1 a PACAP specifikus receptora. Korábbi tanulmányban (Li et al. 2010a) igazolták a PAC1- és a VPAC1-receptor jelenlétét a HK-2 sejteken, melyek közül a PAC1-receptor lehet felelős a PACAP gentamicintoxicitásban kifejtett protektív hatásáért.

Vizsgálatunk során összefoglalva tehát bizonyítást nyert az exogén PACAP gentamicin indukálta károsodás esetén a proximalis tubulussejteken kifejtett védő hatása: serkenti a sejttúlélést, valamint mérsékli a gentamicin által indukált DPPIV- és VEGF-expressziócsökkenést. A megfigyelések alapján a gentamicin indukálta nephrotoxicitás esetén a PACAP lehetséges terápiás lehetőségként szolgálhat a jövőben.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE, MEGBESZÉLÉS

---

- ✓ Az exogén PACAP protektív szerepének igazolása ischaemia-reperfúziós vesekárosodás során hím patkányok mellett nőstény patkányokban is.

Bizonyítást nyert, hogy a PACAP mindkét nemben mérsékli renalis ischaemia-reperfúzióban a szövettani károsodás súlyosságát, csökkenti az inflammatoricus citokinek expresszióját, valamint növeli az antioxidáns hatású SOD aktivitását. A PACAP hatásának háttérében álló jelátviteli útvonalak vizsgálata során pedig a BMP4-BMPRI-Smad1-kollagénIV tengely jelentőségére derült fény.

A tanulmány a renalis ischaemia-reperfúzió során fennálló, valamint a PACAP-kezelés hatásában is megfigyelhető nemi különbségekre is rávilágított, a nőstények esetében kisebb mértékű károsodás igazolódott.

- ✓ Az endogén PACAP védő szerepének bizonyítása –PACAP-génhiányos egerek segítségével– renalis ischaemia-reperfúzió esetén.

Igazoltuk, hogy a szervezetben jelen levő PACAP képes az ischaemia-reperfúzió során kialakuló szövettani károsodások mérséklésére, az inflammatoricus citokinek expressziójának csökkentésére, valamint az antioxidáns rendszer pozitív befolyásolására. Továbbá a jelátviteli útvonalak vizsgálata során a PACAP-génhiányos egerekben tapasztalt súlyosabb károsodás háttérében magasabb pp38MAPK, pERK1,2, valamint alacsonyabb pAkt aktivitásra derült fény.

- ✓ A PACAP protektív funkciójának igazolása a vesében a széleskörben használt, nephrotoxikus hatású gentamicin antibiotikum alkalmazása során.

Bizonyítást nyert, hogy a PACAP képes a proximalis tubulussejtek túlélését javítani a toxikus hatású gentamicinkezelés esetén, valamint kedvező hatással bír a renalis proteinek expressziójára.

Összefoglalva elmondható, hogy az elvégzett vizsgálatok további bizonyítékokkal támasztották alá mind az endogén, mind az exogén PACAP renoprotektív szerepét, a klinikai gyakorlatban jelentőséggel bíró ischaemia-reperfúziós, valamint gentamicin indukálta károsodásban is igazolást nyert a szervezetben is jelen levő fehérje védő hatása, mely a jövőben akár potenciális terápiás jelentőséggel is bírhat.

A PhD-munkám során vizsgált ischaemia-reperfúziós és a gentamicin által indukált vesekárosodás komoly jelentőséggel bíró problémát jelentenek a klinikai gyakorlatban. A Gram- infekciók kezelésére használt gentamicin alkalmazása az általa indukált oxidatív stressz mediálta apoptózis következtében kialakuló nephrotoxikus hatása miatt korlátokba ütközik (Cao et al. 2019). Mindez indokolja a toxikus hatást mérsékelni/kivédeni képes lehetőségek feltérképezésének szükségességét. Ismert, hogy a gentamicin vesére kifejtett toxikus hatása elsősorban a proximális tubulus sejtjein keresztül valósul meg, hiszen ez a reabsorptio és aktív transzport elsődleges helye, mely a gentamicin magasabb koncentrációjához vezet a tubularis epitheliumban (Dursun et al. 2018).

Kísérletünkben *in vitro* HK-2 vese proximális tubulussejteken igazoltuk, hogy a PACAP a gentamicin által kiváltott csökkent sejttúlélést mérsékelni képes, szignifikánsan jobb eredményhez vezetve. A PACAP DPPIV- és VEGF-expressziót befolyásoló hatására is fény derült. A gentamicin káros hatásának hátterében fontos szerephez juthatnak az oxigénszabadgyökök és az oxidatív stressz. A gentamicin alkalmazását követően megnövekedett MDA-szintet, továbbá a fő enzimatis antioxidánsok szintjének csökkenését találták a vesében (Cao et al. 2019, Dursun et al. 2018). Ugyanakkor a gentamicin által indukált nephrotoxicitás okaként a vesesejtek apoptózisát/necrosisát is fontos tényezőként említik (Cao et al. 2019, Dursun et al. 2018). A káros hatás hátterében a proinflammatoricus citokinek expressziójának serkentése is szerephez juthat (Cao et al. 2019, Dursun et al. 2018). Mindez magyarázatul szolgálhat, hogy az ismert antiapoptoticus, antiinflammatoricus és az endogén antioxidáns rendszerre is kedvező hatással bíró PACAP miért javíthatja a proximális tubulus sejtjeinek túlélését gentamicinkezelés esetén.

Az ischaemia-reperfúziós vesekárosodás a klinikumban számos esetben létrejöhet, komoly, rövid- és hosszútávú következményekhez vezetve, kihatással a vesefunkcióra és a vese élettartamára (Bonventre et Yang 2011, Dare et al. 2015). Ismert, hogy az ischaemia primeren a tubularis epithelium struktúráját és funkcióját befolyásolja, azonban az interstitialis gyulladás és a microvasculopathia is fontos szerephez jutnak a károsodás kialakulásában (Patschan et al. 2012). Az ischaemia-reperfúzió az endothelsejtek duzzadását, a glycocalyx károsodását idézi elő, megfigyelhető továbbá az adhézións molekulák upregulációja. A tubularis epithelium károsodása proinflammatoricus citokinek és chemokinek fokozott expresszióját eredményezi, ami az immunsejtek

toborzásához vezet. Az epithelsejtek adhéziós molekulákat és toll-like receptorokat is expresszálnak, az immunválasz fokozódását előidézve. A neutrophilek, a macrophagok, az NKT-sejtek a tubularis epithelium direkt károsodását eredményezik (Bonventre et Yang 2011). A reaktív oxigénszabadgyökök ischaemia-reperfusiós vesekárosodásban betöltött szerepe is megkérdőjelezhetetlen, az oxidatív stressz a membránlipidek, a proteinek, valamint a DNS oxidatív károsodásán keresztül apoptosist indukál (Devarajan 2006).

Vizsgálatainkban igazolást nyert, hogy mind a szervezetben jelen levő endogén, mind az exogén PACAP képes az ischaemia-reperfusio károsító hatását mérsékelni a vesében. Homo- és heterozigóta génhányos egerekben egyaránt súlyosabb károsodás volt észlelhető renalis ischaemia esetén, melyet szövettani, citokinexpressziós és az antioxidáns rendszer megfigyelésére kiterjedő vizsgálataink is megerősítettek. Mindez összhangban van az endogén PACAP különböző károsodások kapcsán leírt védő szerepével (Reglodi et al. 2012b), mely szerint a PACAP-génhányos egerekben súlyosabb eltérések alakulnak ki különféle káros behatásokra. Bizonyítottuk továbbá, hogy a PACAP-kezelés hím és nőstény patkányokban egyaránt protektív hatással bír ischaemia-reperfusio kiváltotta vesekárosodás esetén, a nőstények esetében – a kezelt és kezeletlen csoportokban egyaránt – kedvezőbb kimenetel volt megfigyelhető. A kialakult szövettani eltérések enyhébbek voltak a PACAP-kezelt csoportokban, a védő hatást a citokinexpressziós, valamint az oxidatív stressz és antioxidáns rendszer tanulmányozására kiterjedt vizsgálataink is alátámasztották. A jelátviteli útvonalak tanulmányozása során a BMP4-BMPRI-Smad1-kollagén IV tengely jelentőségére világítottunk rá, melynek nemfüggő változása igazolódott. A vizsgálat során a nemek közt tapasztalt különbség háttérében álló tényezők még nem teljesen tisztázottak, ezzel kapcsolatban felmerül a nemi hormonok szerepe, valamint a PACAP hímeekben és nőstényekben kifejtett hatásának különbözősége (Reglodi et al. 2006 a,b). Ennek pontos megítélése céljából azonban további vizsgálatok szükségesek a jövőben. A vese ischaemia-reperfusiós károsodásával kapcsolatos vizsgálatainkban tapasztaltak valójában nem meglepőek, hiszen az ischaemia-reperfusiós károsodás pathomechanizmusában az apoptosis, az inflammatoricus és oxidatív folyamatok jutnak kiemelt szerephez, az általunk tanulmányozott peptid, a PACAP, pedig éppen antiapoptoticus, antiinflammatoricus és az antioxidáns rendszert is kedvezően befolyásoló hatásairól ismert (Vaudry et al. 2009).

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

---

Abe H, Matsubara T, Iehara N, Nagai K, Takahashi T, Arai H, Kita T, Doi T. Type IV collagen is transcriptionally regulated by Smad1 under advanced glycation end product (AGE) stimulation. *J Biol Chem.* 2004; 279:14201–14206.

Alderliesten M, de Graauw M, Oldenampsen J, Qin Y, Pont C, van Buren L, van de Water B. Extracellular signal-regulated kinase activation during renal ischemia/reperfusion mediates focal adhesion dissolution and renal injury. *Am J Pathol.* 2007; 171:452-62.

Ali Akcay, Quocan Nguyen and Charles L. Edelstein. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm.* 2009; 2009:137072.

Arimura A, Li M, Batuman V. Potential protective action of pituitary adenylylating polypeptide (PACAP38) on in vitro and in vivo models of myeloma kidney injury. *Blood.* 2006a; 107:661–668.

Arimura A, Li M, Batuman V. Treatment of renal failure associated with multiple myeloma and other diseases by PACAP-38. *Ann. NY Acad. Sci.* 2006b; 1070:1–4.

Arms L, Vizzard MA. Neuropeptides in lower urinary tract function. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2011; 202:395–423.

Azuma YT, Hagi K, Shintani N, Kuwamura M, Nakajima H, Hashimoto H, Baba A, Takeuchi T. PACAP provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis. *J Cell Physiol.* 2008; 216:111–119.

Banki E, Degrell P, Kiss P, Kovacs K, Kemeny A, Csanaky K, Duh A, Nagy D, Toth G, Tamas A, Reglodi D. Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides.* 2013; 42:125-130.

Banki E, Kovacs K, Nagy D, Juhasz T, Degrell P, Csanaky K, Kiss P, Jancso G, Toth G, Tamas A, Reglodi D. Molecular mechanisms underlying the nephroprotective effects of PACAP in diabetes. *J Mol Neurosci.* 2014; 54:300–309.

Bardosi S, Bardosi A, Nagy Z, Reglodi D. Expression of PACAP and PAC1 receptor in normal human thyroid gland and in thyroid papillary carcinoma. *J Mol Neurosci.* 2016; 60:171–178.

- Bi L, Hou R, Yang D, Zhao D, Li S, Zhao J, Zhang HE. Effect of bone marrow stem cell mobilisation on the expression levels of cellular growth factors in a rat model of acute tubular necrosis. *Exp Ther Med*. 2015; 10:618-624.
- Blais A, Morvan-Baleynaud J, Friedlander G, Le Grimellec C. Primary culture of rabbit proximal tubules as a cellular model to study nephrotoxicity of xenobiotics. *Kidney Int*. 1993; 44:13-8.
- Bonventre Joseph V. and Yang Li. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011; 121:4210–4221.
- Brubel R, Horvath G, Reglodi D, Lubics A, Tamas A, Kiss P, Laszlo E, Nemeth J, Mark L, Szakaly P. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. *Transplant Proc*. 2011; 43:1297-9.
- Bunt S, Hooley C, Hu N, Scahill C, Weavers H, Skaer H. Hemocyte-secreted type IV collagen enhances BMP signaling to guide renal tubule morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell*. 2010; 19:296-306.
- Cao L, Zhi D, Han J, Kumar Sah S, Xie Y. Combinational effect of curcumin and metformin against gentamicin-induced nephrotoxicity: Involvement of antioxidative, antiinflammatory and antiapoptotic pathway. *J Food Biochem*. 2019; 43:e12836.
- Carrero JJ. Gender differences in chronic kidney disease: underpinnings and therapeutic implications. *Kidney Blood Press Res*. 2010; 33:383-92.
- Chen G, Deng C, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*. 2012; 8:272–288.
- Chen LF, Kaye D. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins and aminoglycosides. *Inf Dis Clin North Am*. 2009; 23:1053–1075.
- Collado B, Gutierrez-Canas I, Rodríguez-Henche N, Prieto JC, Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide increases vascular endothelial growth factor expression and neuroendocrine differentiation in human prostate cancer LNCaP cells. *Regul Pept*. 2004; 119:69–75.
- Convento MB, Pessoa EA, Cruz E, da Glória MA, Schor N, Borges FT. Calcium oxalate crystals and oxalate induce an epithelial-to-mesenchymal transition in the proximal tubular epithelial cells: contribution to oxalate kidney injury. *Sci Rep*. 2017; 7:45740.



Crockett ET, Spielman W, Dowlatshahi S, He J. Sex differences in inflammatory cytokine production in hepatic ischemia-reperfusion. *J Inflamm (Lond)*. 2006; 3:16.

Dare AJ, Bolton EA, Pettigrew GJ, Bradley JA, Saeb-Parsy K, Murphy MP. Protection against renal ischemia-reperfusion injury in vivo by the mitochondria targeted antioxidant MitoQ. *Redox Biol*. 2015; 5:163-168.

Dendooven A, van Oostrom O, van der Giezen DM, Leeuwis JW, Snijckers C, Joles JA, Robertson EJ, Verhaar MC, Nguyen TQ, Goldschmeding R. Loss of endogenous bone morphogenetic protein-6 aggravates renal fibrosis. *Am J Pathol*. 2011; 178: 1069–1079.

Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17:1503-20.

de Vries B, Köhl J, Leclercq WK, Wolfs TG, van Bijnen AA, Heeringa P, Buurman WA. Complement factor C5a mediates renal ischemia-reperfusion injury independent from neutrophils. *J Immunol* 2003; 170:3883–3889.

Dursun M, Sahin S, Besiroglu H, Otunctemur A, Ozbek E, Cakir SS, Cekmen M, Somay A. Protective effect of nebivolol on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Bratisl Lek Listy*. 2018; 119:718-725.

Elekes K, Sandor K, Moricz A, Kereskai L, Kemeny A, Szoke E, Perkecz A, Reglodi D, Hashimoto H, Pinter E, Szolcsanyi J, Zs H. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide plays an antiinflammatory role in endotoxin-induced airway inflammation: in vivo study with gene-deleted mice. *Peptides*. 2011; 32:1439–1446.

Eneman B, van den Heuvel L, Freson K, Van Geet C, Willemsen B, Dijkman H, Levtchenko E. Distribution and function of PACAP and its receptors in the healthy and nephrotic kidney. *Nephron*. 2016; 132:301-11.

Eneman B, Elmonem MA, van den Heuvel LP, Khodaparast L, Khodaparast L, van Geet C, Freson K, Levtchenko E. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in zebrafish models of nephrotic syndrome. *PLoS ONE*. 2017; 12:e0182100.

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

- Farkas J, Kovacs LA, Gaspar L, Nafz A, Gaszner T, Ujvari B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglodi D, Gaszner B. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience*. 2017a; 354:11-29.
- Farkas J, Sandor B, Tamas A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, Fulop BD, Juhasz T, Manavalan S, Reglodi D. Early neurobehavioral development of mice lacking endogenous PACAP. *J Mol Neurosci*. 2017b; 61:468–478.
- Ferencz A, Racz B, Tamas A, Nedvig K, Nemeth J, Kalmar-Nagy K, Horvath OP, Weber Gy, Roth E, Reglodi D. Changes and effect of PACAP-38 on intestinal ischemia-reperfusion and autotransplantation. *Transplant Proc*. 2009; 41: 57-9.
- Ferencz A, Kiss P, Weber Gy, Helyes Z, Shintani N, Baba A, Reglodi D. Comparison of intestinal warm ischemic injury in PACAP knockout and wild-type mice. *J Mol Neurosci*. 2010a; 42:435–442.
- Ferencz A, Weber Gy, Helyes Z, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D. Presence of endogenous PACAP-38 ameliorated intestinal cold preservation tissue injury. *J Mol Neurosci*. 2010b; 42:428–434.
- Fischereder M. Chemokines and chemokine receptors in renal transplantation from bench to bedside. *Acta Physiol Hung*. 2007; 94:67-81.
- Fulop BD, Sandor B, Szentleky E, Karanyicz E, Reglodi D, Gaszner B, Zakany R, Hashimoto H, Juhasz T, Tamas A. Altered notch signaling in developing molar teeth of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *J Mol Neurosci*. 2019; 68:377-388.
- Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Wang H, Matsushima K, Takeya M, Kuziel WA, Mukaida N, Yokoyama H. CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14:2503–2515.
- Gardiner SM, Rakhit T, Kemp PA, March JE, Bennett T. Regional haemodynamic responses to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in conscious rats. *Br. J. Pharmacol*. 1994; 111:589–597.

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

Girard BM, Malley SE, Braas KM, May V, Vizzard MA. PACAP/VIP and receptor characterization in micturition pathways in mice with overexpression of NGF in urothelium. *J Mol Neurosci*. 2010; 42:378-89.

Girardi AC, Degray BC, Nagy T, Biemesderfer D, Aronson PS. Association of Na(+)-H(+) exchanger isoform NHE3 and dipeptidyl peptidase IV in the renal proximal tubule. *J Biol Chem*. 2001; 276:46671–46677.

Gray SL, Cummings KJ, Jirik FR, Sherwood NM. Targeted disruption of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene results in early postnatal death associated with dysfunction of lipid and carbohydrate metabolism. *Mol Endocrinol*. 2001; 15:1739–1747.

Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, Eiden LE. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2002; 99:461–466.

Haq M, Norman J, Saba S R, Ramirez G, Rabb H. Role of IL-1 in renal ischemic reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 1998; 9:614-9.

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

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

Hautmann M, Friis UG, Desch M, Todorov V, Castrop H, Segerer F, Otto C, Schutz G, Schweda F. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2007; 18:1150–1156.

Havasi A and Steven C. Borkan. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney Int.* 2011; 80:29–40.

Heimesaat MM, Reifemberger G, Vicena V, Illes A, Horvath G, Tamas A, Fulop BD, Bereswill S, Reglodi D. Intestinal microbiota changes in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) - Bifidobacteria make the difference. *Eur J Microbiol Immunol.* 2017; 7:187–199.

Heppner TJ, Hennig GW, Nelson MT, May V, Vizzard MA. PACAP38-mediated bladder afferent nerve activity hyperexcitability and Ca<sup>2+</sup> activity in urothelial cells from mice. *J Mol Neurosci.* 2019; 68:348-356.

Horvath G, Racz B, Szakaly P, Kiss P, Laszlo E, Hau L, Tamas A, Helyes Z, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D. Mice deficient in neuropeptide PACAP demonstrate increased sensitivity to in vitro kidney hypoxia. *Transplant Proc.* 2010a; 42:2293-5.

Horvath G, Racz B, Reglodi D, Kovacs K, Kiss P, Gallyas F Jr, Bogнар Z, Szabo A, Magyarlaki T, Laszlo E, Lubics A, Tamas A, Toth G, Szakaly P. Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci.* 2010b; 42:411-8.

Horvath G, Mark L, Brubel R, Szakaly P, Racz B, Kiss P, Tamas A, Helyes Z, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Furjes G, Nemeth J, Reglodi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide display increased sensitivity to renal oxidative stress in vitro. *Neurosci Lett.* 2010c; 469:70-4.

Horvath G, Brubel R, Kovacs K, Reglodi D, Opper B, Ferencz A, Szakaly P, Laszlo E, Hau L, Kiss P, Tamas A, Racz B. Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. *J Mol Neurosci.* 2011; 43:67–75.

Horvath G, Illes A, Heimesaat MM, Bardosi A, Bardosi S, Tamas A, Fulop BD, Opper B, Nemeth J, Ferencz A, Reglodi D (2016) Protective intestinal effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. In: Reglodi D, Tamas A (eds) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide - PACAP*. Springer, Switzerland, pp 271–289

Horvath G, Opper B, Reglodi D. The neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is protective in inflammation and oxidative stress-induced damage in the kidney. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:4944.

Hosszu A, Antal Z, Lenart L, Hodrea J, Koszegi S, Balogh DB, Banki NF, Wagner L, Denes A, Hamar P, Degrell P, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A.  $\sigma$ 1-receptor agonism protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 2017; 28:152-165.

Hu C, Li L, Ding P, Li L, Ge X, Zheng L, Wang X, Wang J, Zhang W, Wang N, Gu H, Zhong F, Xu M, Rong R, Zhu T, Hu W. Complement inhibitor CRIg/FH ameliorates renal ischemia reperfusion injury via activation of PI3K/AKT signaling. *J Immunol.* 2018; 201:3717-3730.

Ivic I, Fulop BD, Juhasz T, Reglodi D, Toth G, Hashimoto H, Tamas A, Koller A. Backup mechanism maintains PACAP/VIP-induced arterial relaxations in PACAP-deficient mice. *J Vasc Res.* 2017; 54:180–192.

Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Yiliyasi M, Kato T, Kuwahara A, Irahara M. Developmental changes in the hypothalamic mRNA expression levels of PACAP and its receptor PAC1 and their sensitivity to fasting in male and female rats. *Int J Dev Neurosci.* 2016; 52:33-7.

Jang HR, Gandolfo MT, Ko GJ, Satpute SR, Racusen L, Rabb H. B cells limit repair after ischemic acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21:654-665.

Jin KB, Choi HJ, Kim HT. Cytokine array after cyclosporine treatment in rats. *Transplant Proc.* 2008; 40:2682-2684.

Jones EA, Shoskes DA. The effect of mycophenolate mofetil and polyphenolic bioflavonoids on renal ischemia reperfusion injury and repair. *J Urol.* 2000; 163:999-1004.

Jozsa G, Szegezcki V, Palfi A, Kiss T, Helyes Z, Fulop B, Cserhati C, Daroczi L, Tamas A, Zakany R, Reglodi D, Juhasz T. Signalling alterations in bones of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene deficient mice. *Int J Mol Sci.* 2018; 19:2538.

Juhasz T, Matta C, Katona E, Somogyi C, Takacs R, Gergely P, Csernoch L, Panyi G, Toth G, Reglodi D, Tamas A, Zakany R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) signalling exerts chondrogenesis promoting and protecting effects: Implication of calcineurin as a downstream target. *PLoS One.* 2014; 9:e91541.

- Juhász T, Helgadottir SL, Tamas A, Reglodi D, Zakany R. PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides*. 2015; 66:51–57.
- Kanasaki H, Oride A, Hara T, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Kyo S. Interactions between two different G protein-coupled receptors in reproductive hormone-producing cells: the role of PACAP and its receptor PAC1R. *Int J Mol Sci*. 2016; 17:1635.
- Kang KP, Lee JE, Lee AS, Jung YJ, Kim D, Lee S, Hwang HP, Kim W, Park SK. Effect of gender differences on the regulation of renal ischemia-reperfusion-induced inflammation in mice. *Mol Med Rep*. 2014; 9:2061-8.
- Katagiri T, Watabe T (2016) Bone morphogenetic proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a021899.
- Kemeny A, Reglodi D, Cseharovszky R, Hashimoto H, Baba A, Szolcsanyi J, Pinter E, Helyes Z. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficiency enhances oxazolone-induced allergic contact dermatitis in mice. *J Mol Neurosci*. 2010; 42:443–449.
- Kenny AJ, Booth AG, George SG, Ingram J, Kershaw D, Wood EJ, Young AR. Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase. *Biochem J*. 1976; 157:169–182.
- Khan AM, Li M, Brant E, Maderdrut JL, Majid DS, Simon EE, Batuman V. Renoprotection with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in cyclosporine A-induced nephrotoxicity. *J Investig Med*. 2011; 59:793–802.
- Khan AM, Maderdrut JL, Li M, Toliver HL, Coy DH, Simon EE, Batuman V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents contrast-induced nephropathy in a novel mouse model. *Physiol Rep*. 2013; 1:e00163.
- Khan MA, Batuman V (2016) Renoprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 (PACAP38). In: Reglodi D, Tamas A (eds) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide - PACAP*. Springer, Switzerland, pp 289–313
- Kher A, Meldrum KK, Wang M, Tsai BM, Pitcher JM, Meldrum DR. Cellular and molecular mechanisms of sex differences in renal ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2005; 67:594–603.

- King SB, Toufexis DJ, Hammack SE. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), stress, and sex hormones. *Stress*. 2017; 20:465-475.
- Kirry AJ, Herbst MR, Poirier SE, Maskeri MM, Rothwell AC, Twining RC, Gilmartin MR. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) signaling in the prefrontal cortex modulates cued fear learning, but not spatial working memory, in female rats. *Neuropharmacology*. 2018; 133:145-154.
- Kiss P, Reglodi D, Tamas A, Lubics A, Lengvari I, Jozsa R, Somogyvari-Vigh A, Szilvassy Z, Nemeth J. Changes of PACAP levels in the brain show gender differences following short-term water and food deprivation. *Gen Comp Endocrinol*. 2007; 152:225-30.
- Korish AA, Abdel Gader AG, Korashy HM, Al-Drees AM, Alhaider AA, Arafah MM. Camel milk attenuates the biochemical and morphological features of diabetic nephropathy: inhibition of Smad1 and collagen type IV synthesis. *Chem Biol Interact*. 2015; 229:100–108.
- Lajko A, Meggyes M, Fulop BD, Gede N, Reglodi D, Szereday L. Comparative analysis of decidual and peripheral immune cells and immune-checkpoint molecules during pregnancy in wild-type and PACAP-deficient mice. *Am J Reprod Immunol*. 2018; 9:e13035.
- Laszlo E, Kiss P, Horvath G, Szakaly P, Tamas A, Reglodi D. The effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in renal ischemia/reperfusion. *Acta Biol Hung*. 2014; 65:369-78.
- Li M, Cortez S, Nakamachi T, Batuman V, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent inhibitor of the growth of light chain-secreting human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 2006; 66:8796–8803.
- Li M, Maderdrut JL, Lertora J, Batuman V. Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: a case study. *Peptides*. 2007; 28:1891–1895.
- Li M, Hering-Smith KS, Simon EE, Batuman V. Myeloma light chains induce epithelial–mesenchymal transition in human renal proximal tubule epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2008a; 23:860–870.

- Li M, Maderdrut JL, Lertora J, Arimura A, Batuman V. Renoprotection by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in multiple myeloma and other kidney diseases. *Regul. Pept.* 2008b; 145:24–32.
- Li M, Balamuthusamy S, Khan AM, Maderdrut JL, Simon EE, Batuman V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury. *Peptides.* 2010a; 31:592–602.
- Li M, Khan AM, Maderdrut JL, Simon EE, Batuman V. The effect of PACAP38 on MyD88-mediated signal transduction in ischemia-/hypoxia-induced acute kidney injury. *Am. J. Nephrol.* 2010b; 32:522–532.
- Li M, Balamuthusamy S, Khan AM, Maderdrut JL, Simon EE, Batuman V. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide prevents cisplatin-induced renal failure. *J. Mol. Neurosci.* 2011; 43:58–66.
- Lima-Posada I, Portas-Cortés C, Pérez-Villalva R, Fontana F, Rodríguez-Romo R, Prieto R, Sánchez-Navarro A, Rodríguez-González GL, Gamba G, Zambrano E, Bobadilla NA. Gender differences in the acute kidney injury to chronic kidney disease transition. *Sci Rep.* 2017; 7:12270.
- Liu DM, Cuevas J, Adams DJ. VIP and PACAP potentiation of nicotinic ACh evoked currents in rat parasympathetic neurons is mediated by G-protein activation. *Eur J Neurosci.* 2000; 12:2243-2251.
- Lochab AK, Extavour CG. Bone morphogenetic protein (BMP) signaling in animal reproductive system development and function. *Dev Biol.* 2017; 427:258–269.
- Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int.* 2011; 79:33-45.
- Maryam Malek and Mehdi Nematbakhsh. Renal ischemia/reperfusion injury: from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev.* 2015; 4:20–27.
- May V, Vizzard MA. Bladder dysfunction and altered somatic sensitivity in PACAP-/- mice. *J. Urol.* 2010; 183:772–779.
- Mehier P, Burnier M, Pruijm M. Gender differences in chronic kidney diseases: myth or reality? *Revue Medicale Suisse.* 2017; 13:473-476.



- Misra HP, Firdovich I. The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247:3170-3175.
- Miura M, Fu X, Zhang QW, Remick DG, Fairchild RL. Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2001; 159: 2137–2145.
- Moody TW, Leyton J, Casibang M, Pisegna J, Jensen RT. PACAP-27 tyrosine phosphorylates mitogen activated protein kinase and increases VEGF mRNAs in human lung cancer cells. *Regul Pept.* 2002; 109:135–140.
- Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A, Endo K, Iso Y, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S. Cardioprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Circ J.* 2010; 74:1183–1190.
- Mosca EV, Rousseau JP, Gulemetova R, Kinkead R, Wilson RJ. The effects of sex and neonatal stress on pituitary adenylate cyclase-activating peptide expression. *Exp Physiol.* 2015; 100:203-15.
- Muller V, Losonczy G, Heemann U, Vannay A, Fekete A, Reusz G, Tulassay T, Szabo AJ. Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. *Kidney Int.* 2002; 62:1364-71.
- Nakamura J, Yanagita M. Bmp modulators in kidney disease. *Discov Med.* 2012; 13:57-63.
- Nakata M, Shintani N, Hashimoto H, Baba A. Intra-islet PACAP protects pancreatic betacells against glucotoxicity and lipotoxicity. *J Mol Neurosci.* 2010; 42:404–410.
- Nemetz N, Abad C, Lawson G, Nobuta H, Chhith S, Duong L, Tse G, Braun J, Waschek JA. Induction of colitis and rapid development of colorectal tumors in mice deficient in the neuropeptide PACAP. *Int J Cancer.* 2008; 122:1803–1809.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999; 13:9–22.
- Neugarten J, Golestaneh L, Kolhe NV. Sex differences in acute kidney injury requiring dialysis. *BMC Nephrol.* 2018; 19:131.

Nguyen V, Meyers CA, Yan N, Agarwal S, Levi B, James AW. BMP-2-induced bone formation and neural inflammation. *J Orthop.* 2017; 14:252–256.

Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103:7488–7493.

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

Ojala J, Tooke K, Hsiang H, Girard BM, May V, Vizzard MA. PACAP/PAC1 expression and function in micturition pathways. *J Mol Neurosci.* 2019; 68:357-367.

Park KM, Kim JI, Ahn Y, Bonventre AJ, Bonventre JV. Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. *J Biol Chem.* 2004; 279:52282-92.

Parkin JD, San Antonio JD, Pedchenko V, Hudson B, Jensen ST, Savige J. Mapping structural landmarks, ligand binding sites, and missense mutations to the collagen IV heterotrimers predicts major functional domains, novel interactions, and variation in phenotypes in inherited diseases affecting basement membranes. *Hum Mutat.* 2011; 32:127-43.

Parsons RL, May V. PACAP-induced PAC1 receptor internalization and recruitment of endosomal signaling regulate cardiac neuron excitability. *J Mol Neurosci.* 2019; 68:340-347.

Patschan D, Patschan S, Müller GA. Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. *J Transplant.* 2012; 2012:764154.

Perry HM, Okusa MD. Driving change: kidney proximal tubule CSF-1 polarizes macrophages. *Kidney Int.* 2015; 88:1219-1221.

Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malondialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem.* 1966; 16:359-364.

- Ramikie TS, Ressler KJ. Stress-related disorders, pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP)ergic system, and sex differences. *Dialogues Clin Neurosci*. 2016; 18:403-413.
- Randjelovic P, Veljkovic S, Stojiljkovic N, Sokolovic D, Ilic I. Gentamicin nephrotoxicity in animals: Current knowledge and future perspectives. *EXCLI J*. 2017; 16:388-399.
- Reglodi D, Tamas A, Lengvari I, Toth G, Szalontay L, Lubics A. Comparative study of the effects of PACAP in young, aging, and castrated males in a rat model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2006a; 1070:518-24.
- Reglodi D, Lubics A, Kiss P, Lengvari I, Gaszner B, Toth G, Hegyi O, Tamas A. Effect of PACAP in 6-OHDA-induced injury of the substantia nigra in intact young and ovariectomized female rats. *Neuropeptides*. 2006b; 40:265-74.
- Reglodi D, Borzsei R, Bagoly T, Boronkai A, Racz B, Tamas A, Kiss P, Horvath G, Brubel R, Nemeth J, Toth G, Helyes Z. Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J Mol Neurosci*. 2008; 36:270-278.
- Reglodi D, Kiss P, Lubics A, Tamas A. Review of the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des*. 2011; 17:962–972
- Reglodi D, Kiss P, Horvath G, Lubics A, Laszlo E, Tamas A, Racz B, Szakaly P. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the urinary system, with special emphasis on its protective effects in the kidney. *Neuropeptides*. 2012a; 46:61–70.
- Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, Laszlo E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamas A. PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci*. 2012b; 48:482–492.
- Reglodi D, Renaud J, Tamas A, Tizabi Y, Socias B, Del-Bel E, Raisman-Vozari R. Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Prog Neurobiol*. 2017; 155:120–148.

Reglodi D, Cseh S, Somoskoi B, Fulop BD, Szentleleky E, Szegezcki V, Kovacs A, Varga A, Kiss P, Hashimoto H, Tamas A, Bardosi A, Manavalan S, Bako E, Zakany R, Juhasz T. Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient mice. *Reproduction*. 2018a; 155:129-139.

Reglodi D, Atlasz T, Szabo E, Jungling A, Tamas A, Juhasz T, Fulop BD, Bardosi A. PACAP deficiency as a model of aging. *Geroscience*. 2018b; 40:437-452.

Reglodi D, Jungling A, Longuespée R, Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann M, Juhasz T, Bardosi S, Tamas A, Fulop BD, Kovacs K, Nagy Z, Sparks J, Miseta A, Mazzucchelli G, Hashimoto H, Bardosi A. Accelerated pre-senile systemic amyloidosis in PACAP knockout mice - a protective role of PACAP in age-related degenerative processes. *Journal of Pathology*. 2018c; 245:478-490.

Reglodi D, Tamas A, Jungling A, Vaczy A, Rivnyak A, Fulop BD, Szabo E, Lubics A, Atlasz T. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide against neurotoxic agents. *Neurotoxicology*. 2018d; 66:185-194.

Ressler KJ., Mercer KB., Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, Norrholm SD., Kilaru V, Smith AK, Myers AJ., Ramirez M, Engel A, Hammack SE., Toufexis D, Braas KM., Binder EB. & May V. Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature*. 2011; 470:492–497.

Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG. Nonclassic endogenous novel regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 2007; 59:185– 205.

Rusai K, Huang H, Sayed N, Strobl M, Roos M, Schmaderer C, Heemann U, Lutz J. Administration of interleukin-1 receptor antagonist ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *Transpl Int*. 2008; 21:572-80.

Sakamoto K, Kuno K, Takemoto M, He P, Ishikawa T, Onishi S, Ishibashi R, Okabe E, Shoji M, Hattori A, Yamaga M, Kobayashi K, Kawamura H, Tokuyama H, Maezawa Y, Yokote K. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects glomerular podocytes from inflammatory injuries. *J Diabetes Res*. 2015:727152.

Sakurai Y, Shintani N, Hayata A, Hashimoto H, Baba A. Trophic effects of PACAP on pancreatic islets: a mini-review. *J Mol Neurosci*. 2011; 43:3–7.

- Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant.* 2015; 5:52-67.
- Sandor B, Fintor K, Reglodi D, Fulop BD, Helyes Z, Szanto I, Nagy P, Hashimoto H, Tamas A. Structural and morphometric comparison of lower incisors in PACAP-deficient and wild-type mice. *J Mol Neurosci.* 2016; 59:300-308.
- Sasaki S, Watanabe J, Ohtaki H, Matsumoto M, Murai N, Nakamachi T, Hannibal J, Fahrenkrug J, Hashimoto H, Watanabe H, Sueki H, Honda K, Miyazaki A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion. *Br J Dermatol* 2017; 176:413–422.
- Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int.* 2004; 65:2003–2017.
- Sedlak J, Lindsay R. Estimation of total protein-bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25:192-205.
- Shintani N, Mori W, Hashimoto H, Imai M, Tanaka K, Tomimoto S, Hirose M, Kawaguchi C, Baba A. Defects in reproductive functions in PACAP-deficient female mice. *Regul Pept.* 2002;109:45-48.
- Solari CA, Tudisca V, Pugliesi M, Nadra AD, Moreno S, Portela P. Regulation of PKA activity by an autophosphorylation mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 2014; 462:567-79.
- Soljancic A, Ruiz AL, Chandrashekar K, Maranon R, Liu R, Reckelhoff JF, Juncos LA. Protective role of testosterone in ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013; 304:R951-8.
- Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Danyadi B, Tamas A, Helyes Z, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Toth G, Gabriel R, Reglodi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotox. Res.* 2012; 21:41–48.
- Szabo A, Danyadi B, Bogнар E, Szabadfi K, Fabian E, Kiss P, Mester L, Manavalan S, Atlasz T, Gabriel R, Toth G, Tamas A, Reglodi D, Kovacs K. Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neurosci Lett.* 2012; 523:93–98.

- Szabo E, Nemeskeri A, Arimura A, Koves K. Effect of PACAP on LH release studied by cell immunoblot assay depends on the gender, on the time of day and in female rats on the day of the estrous cycle. *Regul Pept.* 2004; 123:139-45.
- Szakaly P, Kiss P, Lubics A, Magyarlaki T, Tamas A, Racz B, Lengvari I, Toth G, Reglodi D. Effects of PACAP on survival and renal morphology in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci.* 2008; 36:89-96.
- Szakaly P, Horvath G, Kiss P, Laszlo E, Farkas J, Furjes G, Nemeth J, Reglodi D. Changes in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide following renal ischemia-reperfusion in rats. *Transplant Proc.* 2010; 42:2283-6.
- Talebi N, Nematbakhsh M, Monajemi R, Mazaheri S, Talebi A, Vafapour M. The protective effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid on kidney injury induced by renal ischemia-reperfusion in ovariectomized estradiol-treated rats. *Int J Prev Med.* 2016; 7:6.
- Tamaro A, Kers J, Emal D, Stroo I, Teske GJD, Butter LM, Claessen N, Damman J, Derive M, Navis GJ, Florquin S, Leemans JC, Dessing MC. Effect of TREM-1 blockade and single nucleotide variants in experimental renal injury and kidney transplantation. *Sci Rep.* 2016; 6:38275.
- Tanaka K, Hashimoto H, Shintani N, Yamamoto A, Baba A. Reduced hypothermic and hypnotic responses to ethanol in PACAP-deficient mice. *Regul Pept.* 2004; 123:95–98.
- Tiruppathi C, Miyamoto Y, Ganapathy V, Roesel RA, Whitford GM, Leibach FH. Hydrolysis and transport of prolinecontaining peptides in renal brush-border membrane vesicles from dipeptidyl peptidase IV-positive and dipeptidyl peptidase IV-negative rat strains. *J Biol Chem.* 1990; 265:1476–1483.
- Tomimoto S, Ojika T, Shintani N, Hashimoto H, Hamagami K, Ikeda K, Nakata M, Yada T, Sakurai Y, Shimada T, Morita Y, Ishida C, Baba A. Markedly reduced white adipose tissue and increased insulin sensitivity in Adcyap1-deficient mice. *J Pharmacol Sci.* 2008; 107:41–48.
- Toth D, Szabo E, Tamas A, Juhasz T, Horvath G, Fabian E, Opper B, Szabo D, Maugeri G, D'Amico AG, D'Agata V, Vicena V, Reglodi D. Protective effects of PACAP in peripheral organs. *Front Endocrinol.* 2020a; 11:377.

- Toth D, Tamas A, Reglodi D. The neuroprotective and biomarker potential of PACAP in human traumatic brain injury. *Int J Mol Sci.* 2020b; 21:827.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev.* 2009; 61:283-357.
- Vicente-Vicente L, Casanova AG, Hernández-Sánchez MT, Pescador M, López-Hernández FJ, Morales AI. A systematic meta-analysis on the efficacy of pre-clinically tested nephroprotectants at preventing aminoglycoside nephrotoxicity. *Toxicology.* 2017; 377:14-24.
- Vu JP, Benhammou JN, Goyal D, Luong L, Oh S, Germano P, Pisegna JR (2016) PACAP regulation of gastrointestinal function and obesity. In: Reglodi D, Tamas A (eds) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide – PACAP. Springer, Switzerland, pp 261–270
- Wang S, Diao H, Guan Q, Cruikshank WW, Delovitch TL, Jevnikar AM, Du C. Decreased renal ischemia-reperfusion injury by IL-16 inactivation. *Kidney Int.* 2008; 73: 318-326.
- Wang C, Hao Z, Zhou J, Zhang L, Sun Y, Liang C. Rutaecarpine alleviates renal ischemia reperfusion injury in rats by suppressing the JNK/p38MAPK signaling pathway and interfering with the oxidative stress response. *Mol Med Rep.* 2017; 16:922-928.
- Watanabe J, Seki T, Shioda S (2016) PACAP and neural development. In: Reglodi D, Tamas A (eds) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide - PACAP. Springer, Switzerland, pp 65–83
- Wei Q, Zhao J, Zhou X, Yu L, Liu Z, Chang Y. Propofol can suppress renal ischemia-reperfusion injury through the activation of PI3K/AKT/mTOR signal pathway. *Gene.* 2019; 708:14-20.
- Werling D, Banks WA, Salameh TS, Kvarik T, Kovacs LA, Vaczy A, Szabo E, Mayer F, Varga R, Tamas A, Toth G, Biro Z, Atlasz T, Reglodi D. Passage through the ocular barriers and beneficial effects in retinal ischemia of topical application of PACAP1-38 in rodents. *Int J Mol Sci.* 2017; 18:675.

- Wilson RJ, Cummings KJ. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is vital for neonatal survival and the neuronal control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008; 164:168–178.
- Wojcieszak J, Zawilska JB. PACAP38 and PACAP6-38 exert cytotoxic activity against human retinoblastoma Y79 cells. *J Mol Neurosci.* 2014; 54:463-8.
- Yang CW, Lim SW, Han KW, Ahn HJ, Park JH, Kim YH, Kirsh M, Cha JH, Park JH, Kim YS, Kim J, Bang BK. Upregulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha in rat kidney with ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12:749–757.
- Yang YL, Liu YS, Chuang LY, Guh JY, Lee TC, Liao TN, Hung MY, Chiang TA. Bone morphogenetic protein-2 antagonizes renal interstitial fibrosis by promoting catabolism of type I transforming growth factor-beta receptors. *Endocrinology.* 2009; 150:727-40.
- Yeda X, Shaoqing L, Yayi H, Bo Z, Huaxin W, Hong C, Zhongyuan X. Dexmedetomidine protects against renal ischemia and reperfusion injury by inhibiting the P38MAPK/TXNIP signaling activation in streptozotocin induced diabetic rats. *Acta Cir Bras.* 2017; 32:429-439.
- Yu R, Cui Z, Li M, Yang Y, Zhong J. Dimer-dependent intrinsic/basal activity of the class B G protein-coupled receptor PAC1 promotes cellular anti-apoptotic activity through Wnt/ $\beta$ -catenin pathways that are associated with dimer endocytosis. *PLoS One.* 2014; 9:e113913.
- Zhang Z, Yao L, Yang J, Wang Z, Du G. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia. *Mol Med Rep.* 2018; 18:3547-3554.
- Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE, et al. The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *J Biol Chem.* 2003; 278:22418-22423.



## 8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

---

### A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

*Laszlo E*, Juhasz T, Varga A, Czibere B, Kovacs K, Degrell P, Horvath G, Jancso G, Szakaly P, Tamas A, Reglodi D. Protective effect of PACAP on ischemia/reperfusion-induced kidney injury of male and female rats: gender differences. *J Mol Neurosci*. 2019; 68:408-419. (IF: 2,678, Q1: Medicine)

*Laszlo E*, Varga A, Kovacs K, Jancso G, Kiss P, Tamas A, Szakaly P, Fulop B, Reglodi D. Ischemia/reperfusion-induced kidney injury in heterozygous PACAP-deficient mice. *Transplant Proc*. 2015; 47:2210-5. (IF: 0,867)

Horvath G, Reglodi D, Czetany P, Illes A, Reman Gy, Fekete A, Toth G, *Laszlo E*, Opper B. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human proximal tubule cells against gentamicin toxicity. *Int J Pept Res Ther* 2019; 25:254-267. (IF: 1,5)

Szakaly P, *Laszlo E*, Kovacs K, Racz B, Horvath G, Ferencz A, Lubics A, Kiss P, Tamas A, Brubel R, Opper B, Baba A, Hashimoto H, Farkas J, Matkovits A, Magyarlaki T, Helyes Z, Reglodi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides*. 2011; 45:113-21. (IF: 1,553)

Reglodi D, Kiss P, Horvath G, Lubics A, *Laszlo E*, Tamas A, Racz B, Szakaly P. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the urinary system, with special emphasis on its protective effects in the kidney (review). *Neuropeptides*. 2012; 46:61-70. (IF: 2,067)

*Laszlo E*, Kiss P, Horvath G, Szakaly P, Tamas A, Reglodi D. The effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in renal ischemia/reperfusion (review). *Acta Biol Hung*. 2014; 65:369-78. (IF: 0,589)

*A dolgozat alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora:*

*review nélkül: 6,598*

*review-val: 9,254*

## **Egyéb közlemények**

Brubel R, Horvath G, Reglodi D, Lubics A, Tamas A, Kiss P, **Laszlo E**, Nemeth J, Mark L, Szakaly P. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. *Transplant Proc.* 2011; 43:1297-9. (IF: 1,005)

Ferencz A, Nedvig K, **Laszlo E**, Magyarlaki T, Lorinczy D. DSC examination of kidney tissue following warm ischemia and reperfusion injury. *Thermochimica Acta* 2011; 497:41-5 (IF: 1,805)

Horvath G, Racz B, Szakaly P, Kiss P, **Laszlo E**, Hau L, Tamas A, Helyes Z, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D. Mice deficient in neuropeptide PACAP demonstrate increased sensitivity to in vitro kidney hypoxia. *Transplant Proc.* 2010; 42:2293-5. (IF: 0,993)

Horvath G, Racz B, Reglodi D, Kovacs K, Kiss P, Gallyas F Jr, Bogнар Z, Szabo A, Magyarlaki T, **Laszlo E**, Lubics A, Tamas A, Toth G, Szakaly P. Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci.* 2010; 42:411-8. (IF: 2,922)

Horvath G, Brubel R, Kovacs K, Reglodi D, Opper B, Ferencz A, Szakaly P, **Laszlo E**, Hau L, Kiss P, Tamas A, Racz B. Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. *J Mol Neurosci.* 2011; 43:67-75. (IF: 2,504)

Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, **Laszlo E**, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamas A. PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci.* 2012; 48:482-92. (IF: 2,891)

Szakaly P, Horvath G, Kiss P, **Laszlo E**, Farkas J, Furjes G, Nemeth J, Reglodi D. Changes in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide following renal ischemia-reperfusion in rats. *Transplant Proc.* 2010; 42:2283-6. (IF: 0,993)

***Tudományos közlemények összesített impakt faktora: 22,367***

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

---

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Prof. Dr. Reglődi Dórának**, aki tudományos diákkörös hallgató koromtól kezdve irányította és támogatta kutatási munkámat, és akinek szakmai tudása mindig példaként állt előttem, valamint **Dr. Horváth Gabriellának**, aki szintén segítette és támogatta kutatómunkámat.

Köszönöm a műtétek kidolgozásában és elvégzésében nyújtott segítséget **Dr. Szakály Péternek** és **Dr. Varga Ádámnak**.

Hálás vagyok **Dr. Magyarlaki Tamásnak** (†) és **Dr. Degrell Péternek**, hogy szakmai odaadásukkal példát mutattak, bevezettek a vesepathológia rejtelmeibe, tevékenyen részt vettek a szövettani értékelés kidolgozásában.

Köszönettel tartozom **Dr. Juhász Tamásnak** és **Dr. Kovács Krisztinának** a molekuláris biológiai vizsgálatokban nyújtott segítségért, a precíz és pontos munkáért, iránymutatásért.

Hasonlóképpen köszönöm **Dr. Jancsó Gábornak** és **Fajtik Csillának** az antioxidáns és oxidatívstressz-markerek meghatározásában való segítséget.

Köszönöm továbbá **Bolboacea Alina** és **Kiss Anikó** szövettani metszetek elkészítésében, valamint **Mercz Tünde** in vitro kísérletekben nyújtott megbízható segítő munkáját.

Ezúton szeretném megköszönni **Dr. Kiss Péternek**, hogy a kezdetektől fogva támogatta állatkísérletes munkáimat. Bármikor fordulhattam hozzá kérdéssel, tudására, tapasztalatára mindig számíthattam.

## TÁMOGATÓK

---

TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 ‘Nemzeti Kiválóság Program’, MTA-TKI 14016, EFOP-3.6.2-16-2017-00008 “A neuroinflammáció vizsgálata a neurodegeneratív folyamatokban: a molekulától a betegágyig”/Idegtudományi Centrum, PTE AOK Kutatási Alap KA, 2017-1.2.1-NKP-2017-00002, NAP2, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS”, EFOP-3.6.1.-16-2016-00004 - „Átfogó fejlesztések a Pécsi Tudományegyetemen az intelligens szakosodás megvalósítása érdekében”, FIKPII, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009.