

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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. Reglódi Dóra



**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ANATÓMIAI INTÉZET**

PÉCS, 2020

1. BEVEZETÉS

1.1. ISCHAEMIA-REPERFUSIÓS VESEKÁROSODÁS

Az ischaemia-reperfusió 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. Az ischaemia-reperfusio kiváltotta vesekárosodás pathofiziológiája rendkívül komplex, melyben egyaránt szerepet kapnak apoptoticus, inflammatoricus folyamatok, valamint az oxidatív stressz. A vese ischaemia-reperfusio egy inflammatoricus kaszkád elindulásához vezet, a gyulladás fő mediátorai chemokinek, melyek a proinflammatoricus citokineket, adhézis molekulákat, valamint a leukocyták aktivációját szabályozzák. Számos leukocytá-szubtípus aggregatiója kimutatható a peritubularis kapillárisokban, az interstitiumban és a tubulusokban. Az inflammatoricus folyamatok szabályozásában a BMP (bone morphogenetic protein)-család is szerepet játszik. A BMP-k a TGF- β (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 BMP-molekulák farmakológias dózisban történő adagolása képes állat modellben az acut és chronicus vesekárosodás mérséklésére, habár a mechanizmus még nem teljesen tisztázott. A mitogénaktivált proteinkinázok különböző stimulusok hatására –úgy mint ischaemia- aktivált jelátviteli útvonalak kulcsfontosságú enzimei. Ismert, hogy a p38MAPK (mitogen-activated protein kinase) aktivitásának gátlása a renalis ischaemia-reperfusió károsodás mérséklődéséhez vezet. 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 differentiációban, egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy az ERK aktivációja hozzájárul a károsodáshoz és az apoptoticus sejthalálhoz. Az Akt jelátviteli útvonal szerepet játszik a hypoxia-ischaemia elleni védelmi válaszban, bizonyított, hogy aktivációján keresztül az ischaemia-

reperfüsiós vesekárosodás enyhíthető. A komplementrendszer aktivációját is igazolták már ischaemia-reperfüsiós folyamatokban, mely számos biológiai aktív terméket (pl. C3a, C4a, C5a) eredményez, melyek proinflammatoricus hatással bírnak, valamint az adhézións molekulák aktivitását is upregulálják. A reaktív oxigénszabadgyökök ischaemia-reperfüsiós vesekárosodás pathogenezisében betöltött szerepe jól ismert. Az ischaemia-reperfüsió 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 peroxidatióján, valamint a proteinek és a DNS oxidatív károsodásán keresztül apoptosist indukál. Az antioxidáns enzimrendszer (szuperoxid-dizmutáz, kataláz, glutathion-peroxidáz) downregulatiója szintén szerepet kap az ischaemia-reperfüsiós károsodás pathomechanizmusában. Így ezen útvonal gátlása, valamint a szabadgyökök mennyiségének csökkentése az ischaemia-reperfüsió által előidézett eltérések mérséklésének egyik fontos alappilléret képezheti. Bizonyított, hogy az apoptosist a tubulussejtek pusztulása révén szignifikáns mértékben hozzájárul az ischaemia következtében kialakuló renalis dysfunctiohoz. A proximalis tubulus sejteji kifejezetten érzékenyek az acut ischaemiára, károsodásuk, elpusztulásuk, leválásuk (az inflammatio mellett) primeren felelős az ischaemia-reperfüsiós károsodás pathofiziológiájáért, a klinikai aspektusokért. A tubularis epithelium azonban nem csupán passzív elszenvedője a károsodásnak, hanem az ischaemia-reperfüsióra adott inflammatoricus válasz aktív résztvevője a vesében. A sérült tubularis epithelium proinflammatoricus citokineket és chemokineket bocsát ki, melyek elősegítik az immunsejtek toborzását.

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. 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 sejtjeiben, mely epithelsejtek apoptosisa/necrosisa révén tubularis károsodást okoz. Ismert továbbá, hogy a gentamicin számos membránkötött enzim és transzportrendszer, többek között a dipeptidil-peptidáz IV (DPPIV) aktivitását is befolyásolni képes.

1.3. VESEKÁROSODÁS – NEMI KÜLÖNBΣÉGEK

A klinikai gyakorlatban a különböző etiológiájú vesekárosodások progressziójában nemi különbségek lelhetők fel, általában kedvezőbb kimenetellel a nők esetében. Az állatkísérleteket többnyire hím állatokon végzik, így nőstényekkel kapcsolatban viszonylag kevés adat áll rendelkezésre a témában. Az állatkísérletek során tapasztalt női kedvezőbb kimenetel háttérében 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 filogenezis során a PACAP biológiailag aktív régiójának szekvenciája rendkívüli mértékben konzervált maradt, mely bizonyíthatja, hogy ezen fehérje létfontosságú élettani funkciókért felelhet. A PACAP lebontásáért a DPPIV enzim felelős, felezési ideje a szisztémás keringésben mindösszesen néhány perc. A fosfolipidmembránokhoz történő kötődése azonban a peptid nagyfokú stabilitásához vezet, meggátolva ezzel további degradációját. 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. A PACAP rendkívül széleskörű élettani hatással rendelkezik, szinte valamennyi szervrendszer működését befolyásolja. Fontos szerepet tölt be az endocrin és exocrin mirigyek szabályozásában, de jelentősége nem elhanyagolható a cardiovascularis és a gastrointestinalis rendszerben sem. Leginkább neuroprotektív hatásairól ismert, de számos esetben igazolták általános cytoprotektív hatását is. Protektív hatása kapcsolatban van a növekedési faktorként betöltött funkciójával az idegrendszerben és a perifériás szervekben, bizonyított, hogy különböző szervek fejlődésében fontos szereppel bír.

1.4.2. A PACAP szerepe az urogenitalis rendszerben

Munkacsoportunk a korábbiakban igazolta a PAC1-receptor jelenlétét a vesében, mely expressziója a corticalis tubularis epithelsejteken bizonyult a legkifejezettebbnek. Egy későbbi tanulmányban a VPAC1-receptor bizonyult dominánsnak a humán vesében, jelenléte a proximalis tubularis epithelsejteken és a glomerularis podocytaikon volt kimutatható. A PACAP38 jelenlétét kimutattuk patkány vesében, a PACAP szintjének változása ischaemia-reperfusio során is igazolást nyert munkacsoportunk vizsgálatai által. PACAP38- és PACAP27-immunreaktivitás egyaránt kimutatásra került patkány ureter-, húgyhólyag- és urethrasejteken, a PACAP receptorainak (PAC1, VPAC1, VPAC2) jelenlétét is igazolták az alsó urogenitalis tractusban. Bizonyított, hogy a PACAP hatást gyakorol a vizeletürítésre és az érző beidegzésre egyaránt. 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. Különböző vesekárosodások kapcsán (*in vivo* és *in vitro* egyaránt) igazolták már a PACAP védő szerepét. A PACAP protektívnek bizonyult diabeteses

nephropathiában, cyclosporin, cisplatin, valamint kontrasztanyag indukálta vesekárosodásban, myeloma nephropathiában, továbbá *in vitro* patkányok veséjéből készített sejtkultúrán az oxidatív stressz esetén tapasztalt csökkent sejttúlélést is képes volt javítani a PACAP-kezelés.

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 érzékenységhoz 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. Hőmérsékleti érzékenység, anyagcsere-változások, megnövekedett inzulinérzékenység, légzőszervi abnormalitások, húgyhólyag-dysfunctio jellemzi őket. A korai öregedés jelensége is megfigyelhető a génhiányos egerek esetében, a szisztémás senilis amyloidosis megjelenése gyorsított. Depressziószerű viselkedést mutatnak, különböző stressz-szituációkra abnormalis válasszal reagálnak, továbbá hyperaktivitás is jellemzi őket. A fejlődés során is szereppel bír az endogén PACAP, a génhiányos egerek fogaiban talált eltérések jól bizonyítják a PACAP fogfejlődésben betöltött szerepét. Bizonyítást nyert, hogy különböző ischaemia-reperfüziós sérülésre (cerebralis, retinalis, intestinalis) is fokozott szenzitivitással reagálnak a PACAP-génhiányos egerek. Az endogén PACAP képes az oxidatív stressz és hypoxia hatására létrejövő renalis károsodás mérséklésére is. Ismert továbbá, hogy a PACAP-génhiányos egerekben szignifikánsan magasabb a reaktív oxigénmetabolitok mennyisége, ugyanakkor az antioxidáns hatás a plazmában alacsonyabb. 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 például igazolást nyertek nemi különbségek, a kasztrált hím patkányokban a 6-OHDA (6-hydroxydopamine) által előidézett

sejtpusztulást a PACAP - a kasztráláson át nem esett állatokhoz képest - számottevően nem befolyásolta, ugyanezen kísérletes Parkinson-kór modellben a nőstény patkányokban a PACAP nem befolyásolta a dopaminergsejt-veszteséget, azonban ovariectomizált állatokban képes volt a sejtpusztulást mérsékelni.

2. CÉLKITŰZÉSEK

PhD-munkám során a cél a klinikai jelentőséggel bíró ischaemia-reperfúziós, valamint a gentamicin indukálta 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-reperfúziós vesekárosodás tanulmányozása *in vivo* hím és nőstény patkányokban, továbbá az exogén PACAP szerepének vizsgálata mindkét nemből, 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-reperfúziós vesekárosodás modellben *in vivo*.
- Gentamicin indukálta nephrotoxicitásban a PACAP szerepének vizsgálata HK (human kidney)-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) szolgálták kísérletünkben alanyként.

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 nőstény patkányok esetében az ösztrusz ciklus fázisának meghatározása céljából hüvelyi kenetezést végeztünk, hogy a műtetre minden állat esetében ugyanazon periódusban (ösztrusz fázisban) kerüljön sor.

3.1.2. Műtét

A kísérleti állatokat a műtét előtt intraperitonealis ketamin-xylozin anaesthesiában részécsítettük, majd a patkányok fele intravénásan (jugularis véna) PACAP-ot kapott. Total median laparotomiát követően a bal vesét 60 percre kirekesztettük a keringésből. 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 5µm 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 a teljes tubulusterülethez képest, mely alapján a tubularis epithelium károsodására következtethetünk.

3.1.4. Cítokinexpresszió tanulmányozása

24 órával az ischaemia-reperfüziót követően a hím és nőstény patkányok eltávolított veséiből citokin array-t (Proteome Profiler Rat Cytokine Array Kit, R&D Systems) végeztünk. Az array a nitrocellulóz membránra kötött antitestek és a mintában levő fehérjék közti kötésen alapul. Az array-t a minták előkészítését és fehérjemeghatározást követően a gyártó utasításai szerint végeztük. Chemilumineszcens detektálást alkalmaztunk, 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-reperfüziót 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. A vesehomogenizátumokhoz telített tiobarbiturát 10% perklórsavban (TBA)–20% triklóracetát (TCA) reagenst adtunk, centrifugálást követően az MDA koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg 532 nm-en, az értékeket $\mu\text{mol/g}$ szövetre adtuk meg. A glutathion (GSH) szintjének meghatározását a Sedlak és Lindsay által leírtak szerint végeztük. A mintákhoz 10%-os triklórecetsavat adtunk, a vesehomogenizátumokat centrifugáltuk, a felülúszóhoz 0,4 M-os trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS) puffert adtunk, és az így kapott elegyet 5,5-ditiobisz-2-nitrobenzoesav (DTNB) hozzáadását követően 412 nm-en fotometráltuk. A renalis GSH-koncentrációt standard görbe alapján $\mu\text{mol/g}$ -ban határoztuk meg. A szuperoxid-dizmutáz (SOD) meghatározása során a vesehomogenizátumok centrifugálását követően a felülúszóból a Misra és Firdovich által leírt módszerrel mértük a SOD aktivitását. A SOD gátolja az adrenalin-

adrenochrom átalakulást, melynek absorptió maximuma 480 nm-en van. A kapott értékeket IU (international unit)/g szövettömegre adtuk meg.

3.1.6. Jelátviteli útvonalak tanulmányozása

A vizsgálatokat 24 és 48 órával az ischaemia-reperfuziót követően hím és nőstény patkányok eltávolított veséiből végeztük.

3.1.6.1. RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*)

Első lépésként az összegyűjtött sejtekből RNS-t izoláltunk, mintáink tisztaságát az RNS koncentrációjának mérésével ellenőriztük, azonos koncentrációt állítottunk be. Az RNS-t cDNS-sé írtuk, majd azt polimeráz-lánreakció elvén programozható termosztát segítségével ciklikusan felszorzoztuk. A futtatást 1,2%-os ethidium-bromidot tartalmazó agarózzgélén végeztük. Az eredményeinket géldokumentációs 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.

3.1.6.2. Western blot

Proteázgátlókat is tartalmazó homogenizáló pufferben vettük fel a mintákat, melyeket fehérjemeghatározás segítségével azonos koncentrációra állítottunk be. A fehérjéket 7,5%-os SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) használatával választottuk el egymástól, ezt követően nitrocellulóz membránra transzferáltuk őket, majd az aspecifikus kötőhelyeket blokkoltuk. Primer antitestként anti-PKA (protein kinase A), anti-P-PKA (phospho-protein kinase A), anti-BMPR1 (bone morphogenetic protein receptor 1), anti-BMP2 (bone morphogenetic protein 2), anti-BMP4 (bone morphogenetic protein 4), anti-Smad1 ("small" worm phenotype, "mothers against decapentaplegic"), anti-ColIV (collagen IV) és anti-aktin, secunder antitestként anti-nyúl és anti-egér tormaperoxidáz-konjugált antitestet alkalmaztunk. Az előhíváshoz chemilumineszcens folyadékot használtunk, a jeleket a FluorChem E géldokumentációs rendszerrel rögzítettük. 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 fixálást követően beágyaztuk és lemetszettük. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolása után a primer antitest (anti-BMP4, anti-BMPRI, anti-Smad1, anti-ColIV) alkalmazását követően ezen ellenanyagokat Alexa 555-tel jelölt anti-nyúl/Alexa 488-cal jelölt anti-egér antitestek hozzáadásával tettük láthatóvá. Magfestőt (DAPI-4',6-diamidino-2-phenylindole) tartalmazó Vectashield fedőanyaggal fedtük le mintáinkat. A különböző felvételek készítése során ugyanazokat az expozíciós időket használtuk, hogy a felvételek összehasonlíthatóak legyenek. A subcelluláris lokalizációt Olympus FV1000S konfokális mikroszkóp segítségével jelenítettük meg.

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 csoportokban kifejezettebbnek bizonyult. A hím kontroll patkányokban már 24 órás reperfuziót követően súlyos szövettani károsodás volt megfigyelhető, az idő előrehaladtával (48 órás és 14 napos csoport) számottevő progresszió nem volt észlelhető. 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, de csak 14 nap után volt tapasztalható a hím patkányokban már 24 órás reperfúziót követően kialakuló komolyabb szövettani károsodás. A PACAP-kezelt csoportokban mindkét nem esetében szignifikánsan enyhébb eltéréseket találtunk a kontrollhoz képest. A hím patkányokban a PACAP-kezelés szignifikáns mértékben csökkentette a szövettani károsodást mindhárom időintervallum esetében. Az idő múltával – a 24 órás csoporthoz képest szignifikáns mértékű – progresszió volt megfigyelhető. 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 hímekekhez képest is. Az idő előrehaladtával nem tapasztaltunk változást a tubularis károsodás súlyosságában, a PACAP-kezelt hímekekkel és a kontroll nőstény patkányokkal ellentétben nem volt megfigyelhető a szövettani károsodás progressziója.

3.2.2. Citokinexpresszió tanulmányozása

Ischaemia-reperfúziót követően a fractalkine, az L-selectin, a RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) és az sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule) 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. A csökkenés mértéke az sICAM-1 tekintetében hasonló volt mindkét nemből, a csökkenés nem érte el a szignifikáns mértéket. Jelentős nemi különbséget tapasztaltunk a TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) és a MIP-3 α (macrophage inflammatory protein) kapcsán, a hím patkányokban szignifikánsan magasabb expressziós szinttel, mind a kontroll, mind a PACAP-kezelt csoportban. PACAP-kezelés hatására mindkét nemből az expresszió csökkenése volt észlelhető, mely a nőstényekben a TIMP-1 és MIP-3 α , a hímekekben a TIMP-1 esetében szignifikánsnak bizonyult. A CNTF (ciliary neurotrophic factor) jelenléte érdemben csak a kontroll nőstények veséjében volt kimutatható, a hímekekhez és a PACAP-kezelt nőstényekhez képest is szignifikánsan magasabb értéket kaptunk.

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. Az MDA és a GSH tekintetében a vizsgált csoportok között nem igazolódott számottevő különbség.

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. A PKA aktivációja (phosphorilációja) a 24 órás csoportban mindkét nem esetén szignifikánsan emelkedett PACAP-kezelés hatására. 48 órával az ischaemia-reperfúziót követően a PKA mRNS-expressziója a PACAP-kezelt csoportokban szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott a kontrollokhoz képest. 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 nemben sem változott. Ezzel szemben a BMP4 mRNS- és fehérjeexpresszió szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető mind a hímek, mind a nőstények esetében. A BMP4-immunpozitivitás a PACAP-kezelt csoportokban erősebbnek bizonyult, elsősorban a corticalis tubulusokban koncentrálódva. 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. A BMP2 és BMP4 fehérjeexpresszió csak a nőstényekben mutatott emelkedést, a PACAP-kezelt hímekben nem volt számottevő eltérés 48 órával az ischaemia-reperfúzió után. A BMPR1 mindkét nemben kimutatható volt, a PACAP hatására az mRNS- és a proteinexpresszió egyaránt emelkedett a hím és nőstény patkányokban a 24 órás csoportban. A corticalis tubulusokban a BMPR1 erősebb jelet adott PACAP-kezelés után. Érdekes módon, 48 órával az ischaemia-reperfúziót követően a BMPR1 mRNS-expresszió mindkét nemben csökkenést mutatott PACAP-kezelés esetén, azonban a proteinszint állandó maradt. A BMPR1 egy targetjének, a Smad1-nek az mRNS-expressziója szignifikánsan magasabb volt a PACAP-kezelt csoportokban 24 órával az ischaemia-reperfúzió után. A Smad1 protein szintje szintén emelkedett

a PACAP-kezelt hím és nőstény patkányokban a 24 órás csoportban. Továbbá a tubulusok immunpozitivitása jelentősen fokozódott a PACAP-kezelt csoportokban. A Smad1 mRNS-expressziója viszont csökkent PACAP-kezelés esetén a 48 órás csoportban, de meglepően a fehérjeexpresszió még emelkedett szintet mutatott. 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. Továbbá a proteinexpresszió tekintetében is kifejezett emelkedés volt észlelhető mindkét nemből. A tubulusok és a Malpighi-testek körül kollagén IV-immunpozitív vonal volt megfigyelhető a PACAP-kezelt csoportokban. A PACAP-kezelés azonban csökkent kollagén IV mRNS-expressziót eredményezett 48 órával az ischaemia-reperfúziót követően, bár a fehérjeexpresszió még magasabb volt a kontrollhoz képest a hímekben és nőstényekben egyaránt.

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. 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, azonban ezen vizsgálatokban mind hím egyedek szolgálták 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 hímekhez képest. A PACAP protektív hatását illetően nemi különbségek leírásra kerültek már többek között Parkinson-kórban.

Vizsgálataink a citokinexpressziós mintázat meghatározására is kiterjedtek, a PACAP-kezelés hatására számos citokin (fractalkine, sICAM-1, L-selectin, RANTES, CNTF, MIP-3 α , thymus chemokine, TIMP-1) expressziójának

csökkenése volt megfigyelhető, mely eredmény összhangban van a diabeteses nephropathia modelljében PACAP-kezelés esetén tapasztaltakkal. Ismert továbbá, hogy retinalis hypoperfusio esetén a PACAP alkalmazása szintén számos citokin expressziójának csökkenését idézte elő. A fractalkine, L-selectin, MIP-3 α , RANTES, TIMP-1 és CNTF tekintetében a PACAP-kezelés hatására kísérletünkben a nőstényekben jelentősebb csökkenés volt észlelhető, mint a hímek esetében. Jelentős nemi különbségek voltak megfigyelhetők továbbá a TIMP-1 és MIP-3 α -expresszióban, magasabb szinttel a hímekben. Egerekben máj ischaemia-reperfusio esetén a vizsgált citokinek többségének esetében is hasonló megfigyeléseket tettek.

A vese ischaemia-reperfusiók károsodásának kialakulásában az oxidatív stressz nagy jelentőséggel bír. A lipidperoxidatio 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-reperfusiót követően, mely megfigyelés összhangban van korábbi vizsgálati eredményekkel intestinalis ischaemiában. A PACAP-kezelt és kontroll csoport közötti különbség csupán a nőstények esetében mutatkozott szignifikánsnak, felvetve a PACAP védő hatását illetően nemi különbségek fennállását.

A gyulladós folyamat résztvevői lehetnek a BMP-út vonal tagjai. Korábban munkacsoportunk igazolta, hogy a PACAP a BMP-expressziót növeli osteoblastokban és chondroblastokban, ahol a BMP-jelátvitel az extracelluláris mátrix productióját indukálja. A BMP receptorához (BMPRI) történő kötődését követően a Smad1 nuclearis translocációját idézi elő, mely a basalis membrán részét képező IV-es típusú kollagén termelődését indukálhatja, befolyásolhatja. A vesetubulusokban a IV-es típusú kollagén szükséges a BMP-út vonal normális aktiválódásához. 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 nemben emelkedett volt PACAP-kezelés esetén 24 órát követően, azonban 48 óra elteltével

csupán a nőstényekben találtunk emelkedést. A jelen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a BMP2 nem bír jelentős szereppel a renalis ischaemia-reperfusio során a PACAP-indukált folyamatokban. A BMP4 direkt kapcsolatban lehet a kollagén IV-szintézissel, melyen keresztül a tubulusrendszer basalis membránjának megvastagodását eredményezheti. Kísérletünkben igazoltuk a BMP4-BMPRI-Smad1 expressziójának nem- és időfüggő emelkedését, mely megnövekedett kollagén IV-expresszióhoz vezet. Ezen eredmény a PACAP által finoman szabályozott jelátviteli kaszkád meglétét valószínűsíti, mely rendszerben az ischaemia-reperfusió vesekárosodás során zavar keletkezik. A PACAP alkalmazása kettős hatással bírhat, a gyulladáshatásokat közvetlenül csökkentheti, a BMP-út vonal egyensúlyát pedig a membrana basalis megvastagodásának irányában eltolja.

Következtetésként elmondható, hogy a PACAP mindkét nemben képes az ischaemia-reperfusió vesekárosodás mérséklésére, a nőstényekben következményesen enyhébb eltérések jelenlétével. Hogy a nemek közötti különbségek háttérben hormonális eltérések állnak, 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 EGEREK BEN

Munkacsoportunkkal korábban tanulmányoztuk PACAP +/+ és PACAP -/- egerek ischaemia-reperfusió 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 +/- csoportban is, kiegészítve egyéb antioxidáns marker és a jelátviteli út vonal 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 reperfúziót 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 reperfúziót elszenvedett PACAP +/+ (n=5) és PACAP -/- (n=5).

4.1.2. Műtét

Az egerek műtete előtt intraperitonealis ketamin-xylozin anaesthesiát alkalmaztunk, 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-reperfúziót követően ketamin-xylozin anaesthesiában fiziológiás 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 µm-es HE és PAS/H festett metszeteket készítettünk. A szövettani értékelés a korábban munkacsoportunk által kidolgozott, PACAP -/- és PACAP +/+ egereken végzett kísérletünkben alkalmazott módszer szerint történt. Az alábbi paraméterek értékelése zajlott egy hármass (0-2) súlyossági fokozatú skálán (0-nincs, 1-enyhe-közepes, 2-súlyos): tubularis dilatatio, glycocalyx károsodása a tubulusokban, thyreoidisatio (cylinderek megjelenése a tubulusokban), lymphocytainfiltratio, macrophag-infiltratio és a Bowman-tok dilatációja.

4.1.4. Western blot – jelátviteli útvonalak vizsgálata

A 60 perces ischaemiát és 24 óra reperfúziót elszenvedett, valamint a kontrollként szolgáló sham operált PACAP +/+ és PACAP +/- egerek veséjéből származó mintákat előkészítést követően fehérjemeghatározás segítségével azonos koncentrációra állítottuk be. A 7,5% SDS-PAGE gélben történő szeparálást

követően a mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránok blokkolását követően azokat a következő primer antitestekkel inkubáltuk: anti-tAkt, anti-pAkt, anti-tERK1/2, anti-pERK1/2, anti-p38MAPK, anti-pp38MAPK, valamint anti-aktin. Másodlagos antitestként tormaperoxidáz-konjugált anti-egér és anti-nyúl IgG-t alkalmaztunk. Az antigén-antitest komplexek vizualizálása erősített chemilumineszcencia 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, R&D Systems) elvégzése céljából eltávolítottuk, kontrollként sham operált PACAP +/+, PACAP +/- és PACAP -/- egerek szolgáltak. Az array a nitrocellulóz membránra kötött antitestek és a mintában levő fehérjék közti kötésen alapul. Az array-t a minták előkészítését és fehérjemeghatározást követően a gyártó utasításai szerint végeztük. Chemilumineszcens detektálást alkalmaztunk, 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 reperfúziót elszenvedett PACAP +/+ és PACAP +/-, valamint PACAP -/- egereket használtunk, kontrollként sham operált állatok szolgáltak. A SOD-mérés a vesehomogenizátumokból SOD assay kit 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, a 3.1.5. fejezetben szereplő leírásnak megfelelően.

4.1.7. Statisztikai analízis

A kapott eredmények statisztikai értékelése SPSS 15.0 szoftver segítségével történt. Az 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 ++ és PACAP +/- egerek veséinek szövettani analízise során normális szövettani kép volt megfigyelhető. Ischaemia-reperfúziót követően azonban különbséget tapasztaltunk a PACAP ++ és PACAP +/- egerek eredményei között. A lymphocyt- és macrophag-infiltratio szignifikánsan súlyosabbnak bizonyult a PACAP +/- állatokban (60, illetve 45 perces ischaemia során). 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. A glycocalyx károsodása a PACAP +/- egerekben mindkét alkalmazott ischaemiás időtartam esetén szignifikánsan súlyosabb volt. A tubularis dilatatio és a Bowman-tok tágulata tekintetében a PACAP ++ és PACAP +/- egerek eredménye között nem tapasztaltunk számottevő különbséget.

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

A tAkt expressziója tekintetében a vizsgált csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget. A pAkt expressziója ischaemia-reperfúzió 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. A p38MAPK expressziójában nem mutatkozott szignifikáns különbség a vizsgálati csoportok 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. A tERK1,2 expressziója mindkét vizsgált kontroll csoportban 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.

4.2.3. Citokinexpresszió tanulmányozása

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

A kontroll PACAP ++ és PACAP +/- egerek citokinexpressziós mintázatát tekintve nem találtunk lényegi különbséget. Ischaemia-reperfúzió hatására azonban számos citokin expressziójának növekedése volt megfigyelhető, a PACAP ++ és PACAP +/- csoport között különbségeket eredményezve. A PACAP +/- egerekben az IL-1ra (interleukin-1 receptor antagonist), KC (keratinocyte chemoattractant), M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), RANTES és TIMP-1 szignifikánsan magasabb expresszióját találtuk a PACAP ++ egerekhez képest ischaemia-reperfúziót követően. Az ischaemia-reperfúzió hatására bekövetkező expressziónövekedés a PACAP ++ egerekben a BLC (B lymphocyte chemoattractant), IL-1ra, IL-27 (interleukin-27), valamint a TIMP-1 esetében bizonyult szignifikánsnak. A PACAP +/- egerekben ezen expressziónövekedés az IL-1ra, KC, M-CSF, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein), MIP-2 és TIMP-1 tekintetében érte el a szignifikáns mértéket.

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

A kontroll PACAP ++ és PACAP -/- egerek eredményei között a citokinexpresszió tekintetében nem találtunk lényegi különbséget. Ischaemia-reperfúzió hatására azonban mind a PACAP ++, mind a PACAP -/- csoportban változás mutatkozott a kontroll állatok eredményéhez képest, számos citokin/chemokin expressziója fokozottabbnak bizonyult. A PACAP ++ és PACAP -/- egerekben egyaránt szignifikáns mértékű expressziónövekedés volt megfigyelhető a BLC, C5a (complement 5a), G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), IL-16, IL-1ra,

KC, MCP-1, M-CSF, MIP-2 és a TIMP-1 esetében. Ischaemia-reperfüsiót követően a BLC, C5a, G-CSF, IL-1ra, KC, MCP-1, MIP-2, TIMP-1 és TREM (triggering receptor expressed on myeloid cells) expressziója a PACAP -/- egerekben szignifikánsan nagyobbak mutatkoztak, mint PACAP +/+ társaikban.

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. A SOD aktivitása azonban 60 perc ischaemiát és 24 óra reperfüsiót követően szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a PACAP +/- csoportban a PACAP +/+ csoporthoz képest, a kontrollhoz viszonyítva a PACAP +/- egerek esetében szignifikáns mértékű csökkenés volt megfigyelhető. A GSH-expresszió tekintetében a vizsgált csoportok között számottevő különbséget nem találtunk.

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

A kontroll PACAP +/+ és PACAP -/- egerek veséjében a SOD-aktivitás tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget. Ischaemia-reperfüzio hatására a PACAP -/- egerek veséjében a SOD-aktivitás szignifikáns mértékű csökkenése volt megfigyelhető a kontrollhoz viszonyítva, az ischaemia-reperfüsiót követően mért érték PACAP +/+ társaikéhoz képest szignifikánsan alacsonyabb volt.

4.3. MEGBESZÉLÉS

Munkacsoportunk korábbi vizsgálata során igazolást nyert, hogy a PACAP -/- egerek fokozott érzékenységet mutatnak renalis ischaemia-reperfüzio 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. Ez jelen vizsgálatunk során is hasonlóan alakult, a kontroll PACAP +/+ és PACAP +/- egerek eredményei között nem találtunk eltérést. Ischaemia-reperfüzio hatására azonban megmutakoztak a vizsgálati csoportok közötti különbségek. Hasonló megfigyeléseket tettek retinalis ischaemia kapcsán is PACAP-génhiányos egerekben. Munkacsoportunk korábban

igazolta, hogy a PACAP -/- egerek súlyosabb szövettani károsodást szenvednek el renalis ischaemia-reperfusio során, mint PACAP +/+ társaik. 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 glyocalyx károsodása tekintetében.

Továbbá számos proinflammatoricus citokin/chemokin expressziója is kifejezettebbnek bizonyult ischaemia-reperfusiót követően a PACAP +/- és PACAP -/- egerekben egyaránt, a KC, MCP-1 és TIMP-1 szignifikánsan magasabb expressziót mutatott a PACAP +/+ egerekhez képest. A BLC, C5a, G-CSF, MIP-2, TREM-1 expressziója a PACAP -/- állapotban bizonyult szignifikánsan magasabbnak, míg a RANTES és M-CSF expressziója a PACAP +/- egerekben. Mindez megerősíti a korábbi tanulmányokban leírtakat, mely szerint a PACAP-kezelés számos proinflammatoricus citokin/chemokin expresszióját képes csökkenteni különböző szerveket ért károsodás esetén.

A SOD-enzim aktivitásának szignifikáns mértékű csökkenése figyelhető meg ischaemia-reperfusio hatására a homo- és heterozigóta génhíányos egerekben egyaránt, az ischaemia-reperfusiót 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.

Ismert, hogy a p38MAPK aktivitásának gátlása az ischaemia-reperfusió károsodás mérsékléséhez vezet. Kísérletünkben a PACAP +/- egerek esetében a p38MAPK-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. 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-útvonal aktivációján keresztül az ischaemia-reperfusió vesekárosodás enyhíthető.

A vizsgálatunk során tapasztaltak összhangban vannak számos tanulmánnyal, ahol bizonyításra került, hogy a PACAP-génhiányos egerek érzékenyebben reagálnak különböző káros behatásokra, súlyosabb eltérések kialakulásához vezetve, mely intestinalis, retinalis és cerebralis ischaemia esetén egyaránt igazolódott. Jelen kísérletünk során igazolást nyert, hogy a szervezetben jelen levő PACAP az endogén védekezési rendszer részének fontos tagja, részleges/teljes hiányában a szervezetet érő káros stimulusok komolyabb következményekkel járnak, a védő szerep hátterében a fehérje antiapoptoticus, antiinflammatoricus, 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 supplementált médiumban tenyésztettük. A sejtek passzálása tripszinezést követően, 10% FBS-tartalmú DMEM/F-12 médiumban történő hígítással történt. A kísérletek a médiumban, a 95% páratartalmú, 5% CO₂-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) használtunk. A teszt során az élő sejtek mitochondriumi az eredetileg sárga MTT-t kék formazán festékké alakítják, mely absorptióját vizsgálva tudunk az élő sejtek mennyiségére következtetni.

5.1.3. Vese biomarker array

Proteome Profiler Human Kidney Biomarker Array (R&D Systems)-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 szupernatánsgyűjtést követően a vizsgálat a gyártó leírása szerint történt, a kít az összes szükséges összetevőt tartalmazza. Az array a nitrocellulóz membránra kötött antitestek és a mintában levő fehérjék közti kötésen alapul. Chemilumineszcens detektálást alkalmaztunk, a kiértékelés során az immunpozitivitás pixeldenzitását ImageJ 1.40 szoftver segítségével határoztuk meg.

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 μ M) sem volt képes szignifikáns változást előidézni a sejtproliferációban. A 2 μ g/ml gentamicin-expozíció a sejttúlélés szignifikáns mértékű csökkenéséhez vezetett. 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.

5.2.2. Vese biomarker array

A PACAP önmagában a DPPIV és VEGF (vascular endothelial growth factor) expressziójának szignifikáns mértékű növekedéséhez vezetett. A gentamicin a DPPIV és VEGF szignifikáns mértékű csökkenését idézte elő, melyet a PACAP képes volt mérsékelni, szignifikánsan magasabb értéket eredményezve.

5.3. MEGBESZÉLÉS

Az aminoglikozid-toxicitás a klinikailag egyik legfontosabb vesét érintő gyógyszer-toxicitás, mely elsősorban a proximális tubulusok károsodását idézi elő. HK-2-sejteken végzett vizsgálataink során bizonyítást nyert a PACAP védő szerepe gentamicin indukálta toxicitás során. A PACAP képes volt a gentamicin által előidézett csökkent sejttúlélés szignifikáns mértékű javítására.

Vizsgálatunkban a PACAP a DPPIV-szint gentamicin által kiváltott változása ellen hatott – a gentamicin hatására a DPPIV szintjének *in vitro* csökkenését tapasztaltuk, melyet PACAP-kezelés mérsékelni tudott. Megfigyeléseink a gentamicin DPPIV-suppressiót okozó hatásáról összhangban vannak az irodalomban található adatokkal. A DPPIV két formában található meg: sIolubilis formája a keringő PACAP degradációjában *in vivo* fontos szerepet játszik, másik formája membránkötött, melyet már számos epithelialis sejttípusban kimutattak, azonban a fő előfordulása a vesecortex proximális tubulus kefeszegélyéhez köthető, mely alapján a renalis fehérjetranszport-rendszer részének tekinthető. Mindezek alapján

feltételezhető a PACAP hozzájárulása a proximalis tubularis epithelium fehérjetranszport-rendszerének védelméhez.

Tanulmányunkban a PACAP a VEGF-expressziót szignifikáns mértékben emelte, valamint a gentamicin által előidézett csökkenését mérsékelte. A VEGF hatással bír az endothelsejt-proliferációra és -differentiációra, befolyásolja a vascularis permeabilitást és az érátmérőt. 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. Vizsgálatunk során az *in vitro* gentamicintoxicitás következtében csökkent VEGF-expresszió volt megfigyelhető a humán 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.

Egy korábbi tanulmányban igazolták a PAC1- és a VPAC1-receptor jelenlétét a HK-2 sejteken, a mechanizmus, melyen keresztül a PACAP a HK-2 sejteken a gentamicintoxicitás ellen hat, feltehetőleg a PACAP specifikus PAC1-receptorának aktivációjához kötött.

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

- ✓ 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 hátterében 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 hátterében 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 proximális tubulus sejtjeinek 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 a gentamicin indukálta károsodásban is igazolást nyert a szervezetben is jelen levő fehérje védő hatása, mely a jövőben akár potenciális terápiás jelentőséggel is bírhat.

7. 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, Bognar 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 Dóranak**, 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 veseopathológia rejtelseibe, 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 munkámat. Bármikor fordulhattam hozzá kérdéssel, tudására, tapasztalatára mindig számíthattam.