

A PACAP CITOPROTEKTÍV HATÁSAINAK VIZSGÁLATA VESÉBEN ÉS TOBOZMIRIGYBEN

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Horváth Gabriella

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet
Pécs, 2010**

**Doktori Iskola vezetője: Dr. Lénárd László
egyetemi tanár**

**Programvezető: Dr. Csernus Valér
egyetemi tanár**

**Témavezetők: Dr. Reglődi Dóra
egyetemi docens
Dr. Csernus Valér
egyetemi tanár**

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
II. BEVEZETÉS	3
1. A HYPOPHYSIS ADENILÁT CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP) 3	3
A PACAP előfordulása a szervezetben	4
A. Idegrendszer	4
B. Nem-neuronális szövetek	5
PACAP receptorok	5
A PACAP protektív hatásai	6
A PACAP protektív hatásának mechanizmusai	8
A. Antiapoptotikus hatás	8
B. Antiinflammatorikus hatások	10
2. A PACAP RENOPROTEKTÍV HATÁSA	11
3. A PACAP HATÁSAIT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK:	
A PACAP ÉS BIOLÓGIAI RITMUSOK	12
A PACAP szerepe a circadian ritmusok szabályozásában	12
A PACAP hatásának molekuláris mechanizmusa	14
4. CÉLKITŰZÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA	17
III. A PACAP RENOPROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA	18
Anyagok és módszerek	19
PACAP szerepének vizsgálata PACAP knockout egereken	19
PACAP szerepének vizsgálata patkány vesében	22
Eredmények	29
Megbeszélés	50
IV. A PACAP HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA TOBOZMIRIGYBEN	58
Anyagok és módszerek	59
Eredmények	61
Megbeszélés	69
V. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	72
VI. IRODALOMJEGYZÉK	74

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

6-OHDA	6-hidroxidopamin
AA-NAT	arilalkilamin N-acetiltranszferáz
CINC	cytokine induced neutrophil chemoattractant
CNTF	ciliary neurotrophic factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECL	enhanced chemiluminescence labeling
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
ERK	extracelluláris szignál által regulált kináz
FBS	foetal bovine serum
FITC	fluoreszcein izothiociánát
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
IFN	interferon
IL	interleukin
IP-10	interferon-induced protein-10
IU	nemzetközi egység (international unit)
JNK	c-jun N-terminális kináz
KO	knockout
LIX	LPS induced CXC chemokine
MALDI TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MAPK	mitogén aktiválta protein kináz
MIG	monokine induced by gamma interferon
MIP-3alpha	macrophage inflammatory protein-3 alpha
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium bromid
NGF	nerve growth factor
NO	nitrogén-monoxid
PACAP	hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (pituitary anenylate cyclase activating polypeptide)
PAC1R	PACAP 1. típusú receptor
PAS	perjódsav Schiff (periodic acid Schiff)
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RIA	radioimmunassay
sICAM-1	soluble intercellular adhesion molecule-1
SDS	sodium dodecyl sulphate
TGF-beta	transzforming growth factor beta
TNF- α	tumor necrosis factor α
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase-1
TBS	Tris-buffered saline
TCA	triklórecetsav
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIP	vazoaktív intesztinális polipeptid

II. BEVEZETÉS

1. A HYPOPHYSIS ADENILÁT CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP)

A hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptidet (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide – PACAP) 1989-ben izolálták birka hypothalamusból, patkány hypophysisben kifejtett adenilát cikláz aktiváló hatása alapján. A PACAP-ot tartalmazó hypothalamikus neuronok az eminentia mediana területére vetülnek, ahol eléri a hypothalamo-hypophysealis portalis rendszer kapillárisait (Miyata et al., 1989). 1990-ben azonosították 27 aminosavból felépülő rövidebb fragmensét, a PACAP27-et (Miyata et al., 1990). A két forma közül emlősökben a 38 aminosavat tartalmazó PACAP38 fordul elő nagyobb mennyiségben (Arimura et al., 1991) A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intesztinális peptid családba tartozó polipeptid (1. ábra), melynek N-terminális szakasza (1-28) 68%-os homológiát mutat a VIP-pel (Miyata et al., 1989).

```
PACAP38 HSDGIFTDSYSRYRKQHAVEKYLA AVLGERYKQRVENK-NH2
PACAP27 -----NH2
VIP ---AV---N-T-L-----HSI-N-NH2
Secretin ----T--SEL--L-EGARLQRL-QGLV-NH2
GHRH YA-A---N---KVLG-LSAR-L-QDIMSROQGESNQERGARARL-NH2
Helodermin ---A---EE--KLLAKL-LQ---SI--S-TSPFP-NH2
Glucagon --Q-T--SD--K-LDSRRAQDFVQWLHNT
GLP-2 -A--S-S-EMNTILDNL-ARDFINWLIQTKITD
PRP DVAH--LNEA-RKVLG-LSAG-H-QSLVA
PHM -A--V--SDF-KLLG-LSA----ESLM-NH2
GIP YAE-T-ISD--IAMDKIHQQDFVNWNL-AQKG-KNDWKHNITQ
```

1. ábra A szekretin/glukagon/vazoaktív intesztinális peptid családba tartozó peptidek aminosav szekvenciái (Vaudry et al. 2009)

A peptid a filogenezis során nagy mértékben konzerválódott, aminosav-szekvenciája minden emlős fajban azonos. Egyéb gerincesekben is csupán 1-4 aminosav eltérés mutatható ki (2. ábra) (Vincze és Köves, 2001; Vaudry et al., 2000). Továbbá, a PACAP nagyfokú konzerváltságát bizonyítja az is, hogy PACAP-tartalmú neuronok jelenléte kimutatható nem- emlős szövetekben is, így pl. madarakban (Nowak és Zawilska, 2003), halakban (Matsuda et al., 1997; Montero et al., 1998; Jakab et al., 2004) és kétélűekben (Yon et al., 2001) is.

ember, szarvasmarha, juh, sertés, egér, patkány, tengerimalac	HSDGIFTDYSRYRQMAVKKYLAAVLGRYKQRVKPK	100 %
csirke	-I-----	97 %
gyík	-----	100 %
béka	-----I--	97 %
lazac	-----R--YR--	92 %
törpeharcsa	-----R--R--FR--	89 %
lepényhal, stb	-----Q-----R--R--R--	89 %

2. ábra A PACAP aminosav-szekvenciája különböző fajokban

A PACAP előfordulása a szervezetben

A. Idegrendszer

A peptid izolálása után számos vizsgálatot végeztek előfordulásának feltérképezésére emlős, illetve nem- emlős mintákon. Legnagyobb mennyiségben a központi és a perifériás idegrendszerben található. Patkány központi idegrendszer különböző területeinek analízisével kimutatták, hogy legnagyobb mennyiségben a hypothalamusban fordul elő, ahol főleg a nucleus supraopticus és paraventricularis magno- és parvocelluláris rendszerhez tartozó neuronjaiban detektálható (Köves et al., 1991; Kivipelto et al., 1992; Ando et al., 1994; Kimura et al., 1994; Hannibal et al., 1995a,b; Piggins et al., 1996). Emellett jelenléte kimutatható a retinában is (Seki et al., 2000; Hannibal et al., 1997). Továbbá, a PACAP detektálható többek között: a bulbus olfactoriusban (Skoglösa et al., 1999a), a hippocampus CA1-3 zónáiban (Köves et al., 1994), az amygdala különböző területein (Köves et al., 1991; Piggins et al., 1996), az agykéregben (Köves et al., 1991; Kivipelto et al., 1992; Hannibal et al., 2002), a diencephalonban (Köves et al., 1991, 1994; Hannibal et al., 2002; Skoglösa et al., 1999), a mesencephalonban (Kivipelto et al., 1992), a cerebellumban (Skoglösa et al., 1999b) és a medulla oblongatában (Légrádi et al., 1994).

A PACAP két formája közül, a központi idegrendszerben a 38 aminosavat tartalmazó PACAP38 a domináns. A PACAP27 a teljes peptid tartalom kevesebb, mint 10 %-át teszi ki (Arimura et al., 1991; Ghatei et al., 1993; Masuo et al., 1993; Hannibal et al., 1995a; Piggins et al., 1996).

A PACAP, VIP-hez való hasonlósága ellenére, attól eltérő eloszlást mutat a központi idegrendszerben (Masuo et al., 1993). A két peptid kolokalizációja figyelhető meg az agyi erekben: VIP-, és PACAP-immunopozitív rostok egyaránt kimutathatóak az agyi erek falában (Jansen-Olesen et al., 1994).

B. Nem-neuronális szövetek

A nem-neuronális szövetekben – az idegrendszerhez hasonlóan – szintén a PACAP38 a domináns forma, bár a két peptid aránya a különböző szervekben változó (Arimura et al., 1991). A peptidet kimutatták az endokrin szervek többségében, többek között az adenohypophysisben (Vigh et al., 1993; Kimura et al., 1994; Mikkelsen et al., 1995; Köves et al., 1998; Heinzlmann et al., 2008), a mellékvesében (Ghatei et al., 1993; Kántor et al., 2002), az endokrin pancreasban (Filipsson et al., 1998, Hannibal és Fahrenkrug, 2000) és a mellékpajzsmirigyben (Luts és Sundler, 1994).

Patkányban a legnagyobb mennyiségben a herében detektálható, koncentrációja meghaladja az egyéb, ismert peptidek mennyiségét (Arimura et al., 1991). Ezenkívül a PACAP jelenléte kimutatható: az ovariumban (Fahrenkrug és Hannibal, 1996; Gras et al., 1996), a placentában (Scaldeferri et al., 2000), az uterusban (Spencer et al., 2001), a kiválasztó rendszerben (Fahrenkrug és Hannibal, 1998; Radziszewski et al., 1996; Moller et al., 1993), a légzőrendszerben (Moller et al., 1993) és a gastrointestinalis tractusban (Arimura et al., 1991; Hauser-Kronberger et al., 1992; Ghatei et al., 1993; Mao et al., 1998; Vincze et al., 1999).

PACAP receptorok

A PACAP hatásait G-protein receptorokon keresztül fejti ki. A receptor hét transzmembrán kart és egy intracellulárisan G-proteint kötő domént tartalmaz. A receptoroknak két fő típusa ismert: a PAC1 receptor nagyságrendekkel nagyobb affinitással köti a PACAP-ot, mint a VIP-et, míg a VPAC1 és VPAC2 receptorok mindkét peptidet egyforma erősséggel kötik (Arimura 1998; Laburthe et al., 2007). A PAC1 receptornak 8 splice variánsa ismert (Vaudry et al., 2000).

A PACAP receptorok eloszlása függ a receptor típusától: PAC1 receptor található a központi idegrendszerben, az adenohipophysisben, a mellékvesevelőben és a herében. A specifikus PAC1 receptor kimutatható a hypothalamus különböző területein, a cortexben, a thalamusban, a mesencephalonban, a ponsban és a kisagyban (Masuo et al., 1992).

A PACAP-ot és VIP-et egyforma erősséggel kötő VPAC1 receptor megtalálható a központi idegrendszer mellett a tüdőben, a májban, a lépben, a thymusban, az ovariumban és a gastrointestinalis tractusban (Hashimoto et al., 1996; Joo et al., 2004). A központi idegrendszer területén főleg a nagyagykéregben és a hippocampusban detektálható (Usdin et al., 1994; Sheward et al., 1995). A PACAP-ot hasonló affinitással kötő VPAC2 receptor az előbb említett VPAC1 receptortól teljesen eltérő eloszlást mutat (Usdin et al., 1994; Ishihara et al., 1992). A VPAC2 receptor mRNS-e nagy mennyiségben kimutatható a thalamusban, a nucleus suprachiasmaticusban, az amygdalában, illetve a ponsban. A VPAC1, illetve VPAC2 receptor eloszlása csupán a hippocampus területén mutat átfedést (Usdin et al., 1994).

Specifikus PAC1 receptor van jelen többek között: a retinában (D'Agata és Cavallaro, 1998), a pancreasban, a májban, az ovarium granulosa sejtjeiben (Usdin et al., 1994), a vesében (Peeters et al., 1999), a placentában (Koh et al., 2003). VPAC1, illetve VPAC2 receptor azonosítható: a herében, a gyomorban, az ovariumban, a pancreas beta-sejtjeiben, illetve a mellékvesében (Usdin et al., 1994).

A PACAP protektív hatásai

A PACAP védő hatását először kisgyi szemcsesejteken mutatták ki (Canonica et al., 1996). Hasonló protektív hatást figyeltek meg PC12 sejteken, szérum- és NGF megvonás által kiváltott apoptózis esetén (Tanaka et al., 1997). Cerebellaris szemcsesejteken a PACAP antiapoptotikus hatást mutat ethanol, oxidatív stressz és ceramid-indukálta károsodáskor (Vaudry et al., 2002a,b, 2003). Továbbá, a PACAP protektív hatását igazolták beta-amiloid protein, 6-hidroxidopamin (6-OHDA), HIV-burokfehérje, *in vitro* hypoxia és emelkedett Ca^{2+} szint-indukálta sejtkárosodással szemben is (Onoue et al., 2002a,b,c; Brenneman et al., 2002; Takei et al., 1998). Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során igazolódott a peptid védő hatása arteria cerebri media okklúzió

okozta fokális agyi ischaemiában (Reglődi et al., 2000), 6-OHDA-indukálta Parkinson-kór (Reglődi et al., 2004) és quinolinsav indukálta Huntington-chorea modellekben (Tamás et al., 2006a) *in vivo*. Ezek mellett a PACAP enyhíti a koponyasérülés kiváltotta diffúz axonális károsodást (Tamás et al., 2006c).

A PACAP protektív hatását először a központi idegrendszerben igazolták (Canonic et al., 1996), azóta azonban számos tanulmány igazolta nemcsak a PACAP, hanem receptorai jelenlétét is a nem idegi struktúrákban. Felfedezése óta számos nem-neuronális modellben igazolódott antiapoptotikus hatása, többek között: hypophysis adenoma sejtekben TGF β -indukálta sejt-károsodással szemben (Oka et al., 1999), ovarialis follicularis sejtekben (Lee et al., 1999), PC-3 prostata tumorsejtekben (Gutierrez-Canas et al., 2003). Protektív hatását mutatták ki T-lymphocytákban Fas-ligand, illetve glukokortikoid indukálta apoptózis esetén (Delgado és Ganea, 2000; Delgado et al., 1996).

Kutatócsoportunk korábbi tanulmányai során igazolódott a PACAP antiapoptotikus hatása több, különböző nem-neuronális sejtenyészeten. H₂O₂-indukálta oxidatív stressznek kitett EOMA endothelsejtek életképességének vizsgálata során egyidejű PACAP kezelés szignifikánsan megnövelte az életképes sejtek számát. Ezt a védő hatást a PAC1 receptor antagonistá, PACAP6-38 szimultán alkalmazása blokkolta (Rácz et al., 2007b). Ehhez hasonló hatás volt megfigyelhető primer cardiomyocytá sejtenyészeten vizsgálatakor (Gasz et al., 2006). Emellett a PACAP a vékonybél ischaemia esetén szintén protektív hatást mutat (Ferencz et al., 2009). Továbbá, a PACAP antiapoptotikus hatása nem korlátozódik a gerinces fajokra, hanem védő hatása detektálható gerinctelenekben is (Pirger et al., 2008).

Ugyanakkor a PACAP protektív hatása nem minden sejt-típusban érvényesül. Korábbi vizsgálataink során azt találtuk, hogy az oxidatív stressznek és *in vitro* hypoxiának kitett JAR human choriocarcinoma sejtek esetén a peptid nem növelte a sejttúlélést, hanem inkább csökkentette azt (Boronkai et al., 2009). Ezenfelül a JAR sejtekben, az egyébként PAC1 receptor antagonistaként alkalmazott PACAP6-38 az általában megfigyeltektől eltérően agonista hatással rendelkezik (Reglődi et al., 2009).

A PACAP protektív hatásának mechanizmusai

A. Antiapoptotikus hatás

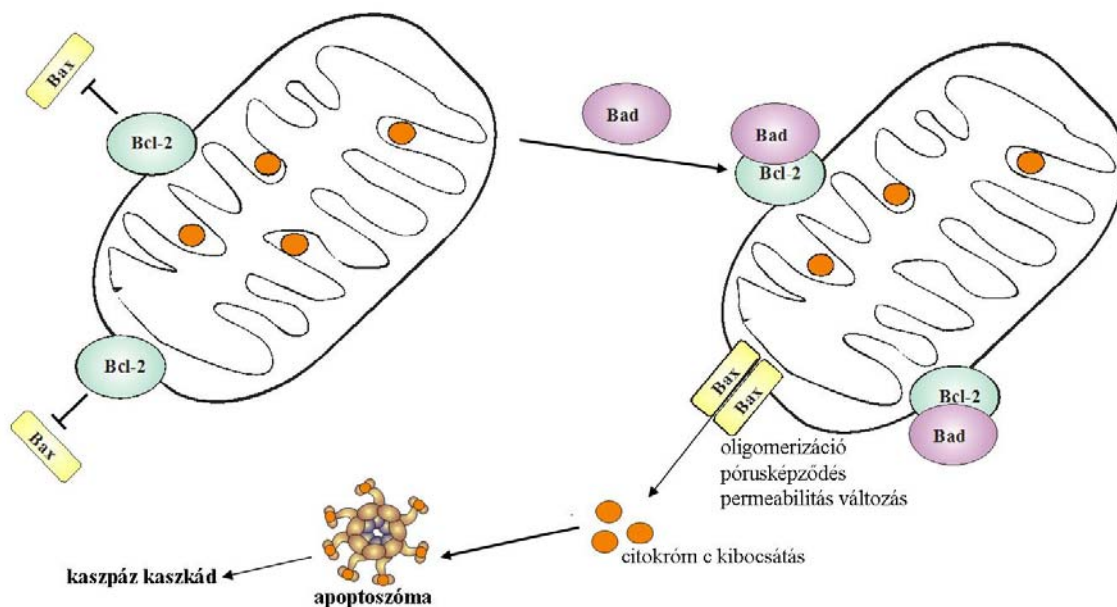
Az apoptotikus sejthalál kiemelkedő szerepet játszik a vese ischaemia/reperfúzió-indukálta károsodása esetén (Saikumar és Venkatachalam, 2003). Az apoptózis (programozott sejthalál) – a nekrozissal ellentétben - fiziológias körülmények között is lezajló folyamat. Az egyedfejlődés során bizonyos időszakokban nélkülözhetetlen a normális fejlődés eléréséhez. Viszont élettani szerepe mellett számos patológiás állapot, betegség patomechanizmusában is részt vesz.

Az apoptózis molekuláris mechanizmusában több, egymástól független jelátviteli útvonal azonosítható, amelyek egy közös végrehajtó rendszer felé konvergálnak. A folyamat végrehajtó elemei a kaszpázok, amelyek inaktív prekuzorként várják az aktiválódásukat jelentő szignált (Strasser, 2000). A kaszpázaktiválódás két különböző úton mehet végbe: a halálligand-halálreceptor úton vagy a mitokondriális citokróm c kibocsátással előidézett úton. Jelen vizsgálatainkban a mitokondriális útvonalra fókuszáltunk, vizsgálva a renalis ischaemia/reperfúzió kapcsán létrejövő változásokat a mitokondriális útvonalhoz tartozó Bcl-2 fehérjére (3. ábra).

A Bcl-2 fehérjecsaládon belül két csoportot különböztetünk meg az apoptózisban betöltött szerepüknek megfelelően: az antiapoptotikus fehérjék közé tartozik többek között a Bcl-2 és a Bcl-XL. A Bcl-2 család egyes képviselői proapoptotikus funkcióval rendelkeznek, mint pl. a Bax, Bad, Bak, Bik stb. A család pro-és antiapoptotikus tagjai az élő, intakt sejtben (halálszignál nélkül) külön kompartmentekben, szeparáltan helyezkednek el: az antiapoptotikus molekulák többnyire membránhoz (mitokondrium, endoplazmás retikulum, stb.) kötve, a proapoptotikus molekulák pedig szabadon a citoszólban.

A proapoptotikus Bax molekula monomer formában van jelen vagy a citoszólban, vagy membránokhoz lazán kapcsolódva. Amennyiben a sejtet apoptózist indukáló hatás éri, a citoszólban lévő monomer szerkezetű Bax transzlokálódik a mitokondriumba, ahol integráns membrán proteinné válik és homodimerré alakul (Wolter et al., 1997; Gross et al., 1998), majd kifejti proapoptotikus hatását. Hatására a mitokondriális membránpotenciál és permeabilitás megváltozik, majd az addig a mitokondriális térbe zárt citokróm c

felszabadul. Ezt követően több lépés eredményeként a végrehajtó kaszpázok aktiválódnak és a sejt az apoptózis következtében elpusztul. Az antiapoptotikus Bcl-2 és Bcl-XL jelenléte képes meggátolni a Bax aktivációját (Gross et al., 1998). A szintén proapoptotikus Bad fehérje a citoplazmában található, foszforilált formában, 14-3-3 fehérjéhez kötött. Amennyiben a Bad defoszforilálódik, a 14-3-3-mal való kapcsolata megszakad, lehetővé téve transzlokációját a mitokondriumba, ahol az antiapoptotikus Bcl-2 fehérjéhez kötődve gátolja azok funkcióját. A Bcl-2 és Bcl-XL proteinek a mitokondrium membránjában lévő integráns proteinek, amelyek megakadályozzák a citokróm c kibocsátását a citoszólba, megelőzve ezzel a sejt apoptózisát.



3. ábra A Bcl-2 fehérjék szerepe az apoptózisban

A PACAP antiapoptotikus hatásának egyik lehetséges eleme az antiapoptotikus molekulák expressziójának fokozása. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatait során igazolódott, hogy a PACAP fokozza a Bcl-2 és Bcl-XL expressziót cardiomyocytákban (Gasz et al., 2006, Rácz et al., 2008), illetve növeli a Bcl-XL szintjét retinában (Rácz et al., 2007a).

Kísérleteink során vizsgáltuk az antiapoptotikus Bcl-2 molekula expressziójának változását a vese ischaemia/reperfúzió okozta károsodása esetén, illetve a PACAP ezen változásokra kifejtett hatását.

B. Antiinflammatorikus hatások

Egy másik, a PACAP protektív hatásaiban fontos szerepet játszó tényező az antiinflammatorikus hatás. A PACAP immunrendszerben kifejtett hatása igen összetett (Ganea és Delgado, 2002). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a PACAP gátolja a hypoxia-indukálta microglia aktivációt (Suk et al., 2004). Az idegrendszeri léziók során a gliasejtek gyorsan aktiválódnak, és stimulálják más gyulladásosejtek migrációját, sejtadhéziós molekulák, citokinek és kemokinek fokozott elválasztását, melyek hatása rendkívül összetett (Falus, 1998; Stoll et al., 2002). A microglia sejtek számos gyulladásose faktort termelnek, pl. TNF- α , IL-1 β , IL-12, NO és több kemokint, melyeket a PACAP és VIP egyaránt csökkent (Ábrahám et al., 2003; Delgado et al., 2002, 2003; Lee és Suk, 2004). Ezen hatások többnyire nem a PAC1, hanem a VIP-pel közös, VPAC receptorokon keresztül valósulnak meg. Újabb megfigyelések arra utalnak, hogy az *in vitro* megfigyelt hatások *in vivo* körülmények között is érvényesülnek (Abad et al., 2006). A PACAP antiinflammatorikus hatását korábbi vizsgálatok is igazolták. Perifériás gyulladásose folyamatokban a PACAP felszabadul a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekből és ez gátolja a gyulladásose keltő szenzoros neuropeptidek (mint a substance P és a calcitonin gene-related peptide) felszabadulását (Németh et al., 2006). Továbbá a szisztémás PACAP kezelés szintén gátló hatást fejt ki a periférián kapszaicinnal vagy resiniferatoxinnal kiváltott akut neurogén és karrageninnel kiváltott vegyes gyulladásose esetén (Helyes et al., 2007). A legújabb vizsgálatok szerint perifériás gyulladásose modellekben a PACAP antinociceptív, antihyperalgéziás és antiallodíniás hatással is rendelkezik (Sándor et al., 2009).

Miután ismert, hogy a PACAP neuroprotektív hatásában fontos szerephez jut az antiinflammatorikus hatása, arra voltunk kíváncsiak, hogy a vese ischaemia/reperfúzió okozta károsodásában is érvényesül-e ez a hatás.

2. A PACAP RENOPROTEKTÍV HATÁSA

A PACAP jelenlétét leírták a patkány vizeletelvezető rendszerében. A PACAP immunreaktivitást idegrostokra korlátozódva kimutatták az ureterben, a húgyhólyagban, illetve a húgycsőben. A PACAP38-pozitív rostokat az erek falában, illetve a simaizomrétegekben lokalizálták. A PACAP 27 és 38 aminosavat tartalmazó formája közül utóbbi bizonyult a dominánsnak (Fahrenkrug és Hannibal, 1998).

1991-ben Shivers és munkatársai vizsgálták a PACAP receptorainak lehetséges szervezeten belüli eloszlását. Vizsgálataikban nem találtak arra vonatkozó adatokat, hogy a vesében lenne a PACAP számára megfelelő receptor (Shivers et al., 1991). Viszont a későbbiekben több tanulmány is leírta a PACAP mindhárom receptorának jelenlétét a vesében (Harmar et al., 2004; Lam et al., 1990; Peeters et al., 1999; Reubi 2000; Sreedharan et al., 1995; Wei és Mojssov, 1996). Azonban a receptorok vesén belüli eloszlása nem volt ismert. Annak ellenére, hogy a PACAP mindhárom receptora kimutatható a vesében, a PACAP jelenlétét mindeddig nem detektálták.

A PACAP vesében kifejtett hatásai még nem minden részletében ismertek. Élettani jelentőségét valószínűsíti mindhárom receptorának jelenléte. Emellett PAC1 receptor aktiváción keresztül megvalósuló mechanizmussal stimulálja a renin szekrécióját (Hautmann et al., 2007), valamint fokozza a vesén átáramló vér mennyiségét (Gardiner et al., 1994; Nilsson, 1994).

A PACAP renoprotektív hatását korábban igazolták myeloma multiplex okozta károsodásban, ahol csökkentette a TNF- α szintjét patkány vesében. Emellett – szintén patkány vese vizsgálatakor - védő hatása igazolódott diabetes, illetve gentamicin okozta vesekárosodásban (Li et al., 2008). Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során igazolódott, hogy intravénásan adott PACAP szignifikánsan javítja a vese ischaemia/reperfúzióknak kitett állatok túlélését, emellett csökkenti a tubuláris károsodás mértékét (Szakály et al., 2008). Viszont a PACAP vesevédő hatásának mechanizmusa még nem minden részletében ismert, ezért jelen értekezés egyik részében a PACAP eloszlásának és vesére kifejtett hatásának vizsgálatát célzó kísérleteinket és azok eredményeit ismertetném.

3. A PACAP HATÁSAIT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK: A PACAP ÉS BIOLÓGIAI RITMUSOK

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során bebizonyosodott, hogy a PACAP neuroprotektív hatása a Parkinson-kór kísérletes állatmodelljében egyértelmű nem- és korfüggést mutat (Tamás et al., 2006b). 6-OHDA indukálta substantia nigra károsodás esetén az akutan fellépő tünetek, illetve a neurológiai állapot javulása idősebb állatokban lényegesen rosszabb, annak ellenére, hogy a dopaminerg sejtek pusztulásának mértéke csak kissé fokozottabb. A korkülönbség mellett nemi különbségek is megfigyelhetők voltak. Nőstény állatok esetén mind a dopaminerg sejtek pusztulása, mind pedig a neurológiai tünetek megjelenése sokkal mérsékeltebb volt. Ez a megfigyelés azonban nemcsak a Parkinson-kórra jellemző, hanem egyéb idegrendszeri károsodások esetében is megfigyelhető (Alkayed et al., 1998; Stein, 2001; Suzuki et al., 2003). A substantia nigrából a striatumba húzódó nigrostriatalis pálya működésében is kimutathatók a nemi különbségek, emellett az ösztrogén dopaminerg neuronokra gyakorolt protektív hatása is ismert (Dluzen és Horstink, 2003). Az ösztrogénnek tulajdonított endogén neuroprotektív magyarázhatja a PACAP neuroprotektív hatásában megfigyelt nemi különbségeket, miszerint a PACAP kezelés Parkinson-kór modellben csökkentette a dopaminerg sejtek pusztulásának mértékét, illetve a hiánytüneteket hímekben és ovariektomizált nőstényekben, viszont csupán kismértékű magatartási javulás volt detektálható nőstényekben és kasztrált hím állatokban. Ezen megfigyelések háttérében feltehetőleg az állhat, hogy ösztrogén és a PACAP által kifejtett neuroprotektív hatások nem additívek.

Emellett, a PACAP gonadotrop sejtekre kifejtett hatásai függenek a kezelés időpontjától, valamint nőstény patkányok esetén a ciklus-állapottól (Szabó et al., 2004). Jelen dolgozatban tárgyalt vizsgálatainkban a PACAP hatásait befolyásoló lehetséges tényezőként vizsgáltuk a napi ritmust.

A PACAP szerepe a circadian ritmusok szabályozásában

Az élővilágban az élettani jelenségek nagy része periódikusan ismétlődik, azaz ritmusosan működik. A különböző periódusidejű ritmusok közül a leginkább

tanulmányozott a circadian ritmus. Circadian (napszaki) ritmusnak nevezzük bizonyos folyamatok kb. 24 órás periódusonkénti ismétlődését.

Többek között circadian ritmikus változások figyelhetők meg számos endokrin szerv esetében. A pajzsmirigyben a szezonális változásokon kívül napi ritmus is megfigyelhető. Circadian ritmust mutat a szérum trijód-tironin és tiroxin (csúcs a világos fázis végén), valamint a szérum TSH szintje (csúcs a világos fázis közepén) (Weeke és Gundersen, 1978; Kalsbeek et al., 2000). Emellett a mellékvesekéreg glukokortikoid termelése is napi ritmust mutat (Lengvári és Halász, 1973).

A keringési rendszeren belül napi ritmus figyelhető meg a vérnyomás és a pulzus tekintetében is. Mindezen jelenségekre vezethető vissza, hogy az akut myocardialis infarktus, egyéb akut ischaemiás történések és a hirtelen szívhalál nagyobb számban fordulnak elő a reggeli órákban. Napszaki ingadozást mutat még a sympathicus aktivitás, a plazma katecholamin szint, a coronaria tónus, a coagulabilitás, a haemorrheológiai paraméterek és a myocardialis O₂-igény is.

A ritmus fenntartásáért és szinkronizálásáért felelős élettani mechanizmusokat biológiai órának nevezzük. A biológiai óra (oszcillátor) környezettől független módon működik, ugyanakkor a környezet befolyásolja a biológiai óra fázisát, amennyiben periódikusan ismétlődve hat a rendszerre.

A hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) circadian ritmusokban betöltött szabályozó szerepe már bizonyítást nyert emlősök esetében. Az emlősök biológiai órája a nucleus suprachiasmaticus, amely a retinából vizuális információt kap a tractus retinohypothalamicuson keresztül (Fahrenkrug, 2006). Emlősökben a PACAP kimutatható a retinális ganglionsejtek egy részében és emellett a tractus retinohypothalamicusban a glutamát fő ko-transzmittere (Hannibal, 2002; Hannibal and Fahrenkrug, 2004; Hannibal et al., 1997, 2000, 2002).

A circadian ritmikus folyamatok vezérlésében a tobozmirigy kiemelkedő szerepet játszik. Az általa termelt melatoninon keresztül a szervezetben lévő legtöbb circadian folyamatra hat. A szerv emlősökben effektor funkcióval rendelkezik, míg madarakban komplett működésű biológiai órát tartalmaz (Csernus, 2006). A melatonin mindamelllett, hogy a napi ritmusok fő szabályozó faktora, szintén circadian ritmusban termelődik a tobozmirigyben.

A PACAP detektálható mind az emlős, mind pedig a madár tobozmirigyben (Csernus et al., 2004; Moller et al., 1999), ahol stimulálja a melatonin termelését (Csernus et al., 2004; Faluhelyi et al., 2006; Nakahara, 2002; Simonneaux et al., 1993). Ezen hatások mellett a PACAP stimulálja az arilalkilamin N-acetiltranszferáz (AA-NAT) enzimet, amely a tobozmirigy által termelt melatonin szintézisének sebességmeghatározó lépését katalizálja (Rékási és Czömpöly, 2002).

Madár pinealocyták *in vitro*, sejtenyészeten megtartják a melatonin termelés circadian ritmusát (Faluhelyi et al., 2004). Habár a PACAP serkenti a melatonin szintézisét, a biológiai óra fázisát nem tolja el, amennyiben azt megelőzően nem volt kitéve a periódikusan változó környezeti hatásoknak (Csernus et al., 2004; Faluhelyi et al., 2004; Nakahara et al., 2002). Viszont állandó sötét környezetben, kora este, a PACAP képes módosítani az óragének expresszióját mind csirke tobozmirigyben (Nagy és Csernus, 2007), mind pedig emlős nucleus suprachiasmaticusban (Minami et al., 2002; Nielsen et al., 2001).

A PACAP hatásának molekuláris mechanizmusa

A molekuláris mechanizmusok, amelyeken keresztül a PACAP befolyásolja a circadian ritmikus folyamatokat, illetve a melatonin szintézisét, még nem teljesen ismertek. A PACAP nagy valószínűséggel komplex jelátviteli útvonalakon keresztül valósítja meg hatásait.

MAPK kaszkádok

A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) családba tartozó enzimek szabályozzák a sejtek növekedését, differenciálódását, apoptózisát, illetve részt vesznek a biológiai óra szabályozásában. Az összes eukarióta sejtben zajlanak komplex MAPK jelátviteli útvonalak, amelyek különböző celluláris folyamatokban szabályozásában vesznek részt, többek között befolyásolják a mitotikus folyamatokat, a génexpressziót, a sejtek differenciálódását, túlélését, illetve a sejthalált.

A tudomány mai állása szerint emlősökben a klasszikus MAP kinázok 4 csoportját különböztetjük meg:

1. extracelluláris szignál által regulált kináz 1/2(ERK1/2)
2. c-Jun amino-terminalis kináz 1,2,3 (JNK)
3. p38 MAP kinázok (α , β , γ , δ)
4. ERK5

A MAP kinázok számos stimulus hatására aktiválódhatnak. Általánosságban az ERK1/2 növekedési faktorok hatására aktiválódik, míg a JNK és a p38 MAPK fő serkentő faktorai a sejtet érő különféle stressz hatások (ozmotikus sokk, ionizáló sugárzás stb.).

Feltehetőleg, nem- emlősökben a p38 MAPK a circadian folyamatok szabályozásában szerepet játszó fő MAP kináz (Hayashi et al., 2003; Yadav et al., 2003). Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a p38 MAPK központi szerepet játszik a madár tobozmirigyben lévő biológiai óra periódusidejének fenntartásában. Az enzim gátlásakor drámaian megnő a periódusidő, viszont ez a hatás csak nappal érvényesül. A csirkében végzett vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy a p38 MAPK foszforilációja függ a környezeti megvilágítástól, mégpedig a fény fokozza azt (Hayashi et al., 2003). Emlős tobozmirigyen végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy a p38 MAPK aktiváció gátolja az AA-NAT enzim aktivitását, így csökkentve a melatonin termelését (Chik et al., 2004).

A p38 MAPK-on kívül a circadian oszcilláció fenntartásában fontos szerepet játszik az ERK1/2 is. A p38 MAPK-zal szemben az ERK1/2 szintje éjszaka magasabb (Hayashi et al., 2001).

14-3-3 fehérje

A 14-3-3 fehérjecsaládba tartozó proteinek számos sejtben zajló folyamatban szerepet játszanak, többek között a melatonin szintézist is befolyásolják. (Rosiak and Zawilska, 2006). A melatonin szintézis sebességmeghatározó enzime, az AA-NAT, foszforilált formában komplexet képez a 14-3-3 fehérjével, ami stabilizálja az enzimet és megvédi a proteolyticus hatásoktól. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során igazolódott, hogy a PACAP bizonyos sejt típusokban aktiválja a 14-3-3 fehérjét (Rácz et al., 2007a,c).

Az előbbiek alapján célul tűztük ki a PACAP p38 MAPK foszforilációra és 14-3-3 fehérjére kifejtett hatásainak, illetve ezek napszaki ingadozásának vizsgálatát.

4. CÉLKITŰZÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Célul tűztük ki a PACAP jelenlétének és a PAC1 receptor vesén belüli eloszlásának vizsgálatát patkány vesében.
2. Emellett vizsgáltuk a PACAP vesében mutatott protektív hatását és annak háttérben álló mechanizmusokat *in vitro* és *in vivo* kísérleti körülmények között.
3. Továbbá, tobozmirigy modellben vizsgáltuk a napi ritmus befolyását a PACAP antiapoptotikus, illetve jelátviteli útvonalakra kifejtett hatásaira.

III. A PACAP RENOPROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

Az endogén PACAP szerepének vizsgálatát célzó kísérleteinket PACAP génnel nem rendelkező egereken végeztük (Osaka University , Japán). A PACAP KO egereken végzett vizsgálataink eredményét endogén PACAP-pal rendelkező, vad típusú egerekkel hasonlítottuk össze.

Patkány vesén végzett vizsgálatainkhoz Wistar patkányokat használtunk.

Az állatok gondozása, tartása és kísérleteinkben való alkalmazása az aktuális egyetemi ajánlásoknak megfelelően történt (No: BA02/2000-20/2006, Pécsi Tudományegyetem). Az állatokat normál megvilágításban (12 óra sötét, 12 óra világos), élelem és víz folyamatos biztosítása mellett tartottuk.

I. PACAP szerepének vizsgálata PACAP knockout (KO) egereken

I/1. Endogén PACAP szerepének vizsgálata oxidatív stressz és hypoxia indukálta vesesejtkárosodásban *in vitro*

A. *In vitro* oxidatív stressz hatása vad és PACAP KO egerek vesesejtjeire

A vizsgálatokat 2-7 napos újszülött vad, illetve PACAP KO egerek (n=7 minden kísérlet alkalmával; négyszer ismételve) veséiből nyert primer sejttenyészetben végeztük. A vesék eltávolítása után a szervdarabkákat kollagenázzal (collagenase type II) emésztettük. Az izolált vesesejteket 96 lyukú plate-re helyeztük és 10% FBS-t (foetal bovine serum), illetve 100IU/ml penicillin/streptomycint tartalmazó médiumban inkubáltuk 48 órán keresztül.

Ezt követően mind a vad, mind pedig a PACAP knockout egerek veséiből származó sejteket csoportokra osztottuk és a következőképpen kezeltük:

- 1., kontroll csoport kezelés nélkül;
- 2., 0,5 mM H₂O₂
- 3., 1,5 mM H₂O₂

4., 3 mM H₂O₂

A kezelés időtartama 2, illetve 4 óra volt.

B. Exogén PACAP hatása PACAP KO egerek oxidatív stressznek kitett vesesejtjeire

A kísérlet második részében azt vizsgáltuk, hogy a vad, illetve PACAP KO egerek vesesejtjeinek vizsgálatakor tapasztalt magasabb fokú érzékenység enyhíthető-e exogén PACAP kezeléssel. Ehhez a dolgozatban bemutatott eredményeinket megelőző kísérletek során alkalmazott H₂O₂-koncentrációk közül azt a legkisebb koncentrációt választottuk, amely képes volt szignifikánsan csökkenteni az élő sejtek arányát. A 2 órás kezelés során 1mM H₂O₂, a 4 órás kezelés alkalmával 0,5mM H₂O₂ bizonyult megfelelőnek. A sejteket a fent leírt körülményekkel azonos módon nyertük, majd 48 óra után kezeltük őket. Az alkalmazott csoportok:

1., kontroll csoport kezelés nélkül;

2., 10 nM PACAP1-38-cal;

3., 100 nM PACAP1-38-cal;

4., 0,5 mM (4h), illetve 1 mM (2h) H₂O₂-dal

5., 0,5 mM (4h), illetve 1 mM (2h) H₂O₂-dal és 10 nM PACAP1-38-cal;

6., 0,5 mM (4h), illetve 1 mM (2h) H₂O₂-dal és 100 nM PACAP1-38-cal együttesen kezelt sejtek.

A vizsgálatok során alkalmazott PACAP1-38 Tóth Gábor professzor úr laboratóriumából származik (Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézet).

C. *In vitro* hypoxia hatása vad és PACAP KO egerek vesesejtjeire

A vizsgálatokat a fent leírt (ld. 1.) kísérleti körülmények között végeztük. Az *in vitro* hypoxiát CoCl₂-kezeléssel hoztuk létre. Az alkalmazott CoCl₂ hatására intracellulárisan az *in vivo* hypoxia esetén fellépő molekuláris mechanizmusok zajlanak, a CoCl₂ stabilizálja a HIF- α (hypoxia inducible factor- α) transzkripciósi faktort, amely központi szerepet játszik a hypoxia során játszódó sejten belüli változásokban (Yuan et al., 2003).

Az előzőekhez hasonlóan mind a vad, mind pedig a PACAP KO egerek veséiből származó sejteket csoportokra osztottuk és a következőképpen kezeltük:

1., kontroll csoport kezelés nélkül;

2., 500 μM CoCl_2 .

A kezelés időtartama 24, illetve 48 óra volt.

A sejtek életképességének vizsgálata

A sejtek életképességének vizsgálatához kolorimetrikus MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium bromid) tesztet használtunk. A teszt során az élő sejtek mitokondriumai az eredetileg sárga MTT-t kék formazán festékké alakítják. A kezeléseket követően a médiumokat lecseréltük egy 0,5mg/ml koncentrációjú PBS-ben oldott MTT-re, melyben 3 óráig tartottuk a sejteket. A 3 óra elteltével a folyadékot óvatosan leszívtuk, majd a kék festék partikulumokat lyukanként 200 μl dimetilszulfoxidban újra feloldottuk.

Ezt követően az abszorbanciát ELISA leolvasó segítségével 570 nm hullámhosszon megmértük, amely arányos volt az élő sejtek számával (Mosmann, 1983).

I/2. PACAP knockout egerek veséjének szövettani vizsgálata

Vad, illetve PACAP KO egerek (n=4 minden csoportban) veséit vizsgáltuk. Az állatokat isoflurannal altattuk, median laparotomiát követően izoláltuk a veseereket, majd az egyik oldali vesét 45 vagy 60 percre kirekesztettük a keringésből. Ezt követően az erek lekötését felengedtük, az állatokat 2 hétig életben tartottuk, majd a pentobarbital anaesthesia mellett eltávolított vesékből, paraformaldehides fixálást követően 10 μm vastagságú sorozat metszeteket készítettünk. A metszeteket haematoxylin-eosinnal, illetve PAS-sal (perjódsvav-Schiff) festettük. A metszetekben az alábbi morfológiai jegyeket értékeltük: tubuláris dilatáció, megtartott PAS+ glycocalyx réteg a proximális tubulusban, gyulladásos sejtek (lymphocytá, macrophag) jelenléte, vesetestecske morfológiája, PAS+ cylinderek jelenléte a tubulusokban. A megfigyelt szövettani szerkezetet egy 0-2 skálának megfelelően értékeltük. Grade 0: nincs patológiás eltérés, grade 1: enyhén patológiás megjelenés, grade 2: súlyos patológiás eltérések.

I/3. PACAP jelenlétének vizsgálata egér vesében

A PACAP38 egér vesében (n=3) történő detektálását MALDI TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) tömegspektrometriával végeztük.

A vad típusú egerek veséiből származó mintákat homogenizáltuk, majd centrifugális ultraszűrőn átszűrve tisztítottuk (Amicon Ultra-4 10,000 MWCO, Millipore Kft, Hungary). Mindegyik minta esetében 500 µl homogenizátumot mértünk be egy speciális membránnal ellátott centrifugacsőbe, majd azokat 30 percig 3000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk. Ezt követően a filtrátumokat liofilizáltuk, majd trifluor-ecetsavban (TFA, Sigma-Aldrich) újra feloldottuk. Ezt követően a további tisztítás céljából ZipTip18 pipettahegyet alkalmaztunk (Millipore). A tisztított proteineket és peptideket a ZipTip felszínéről a MALDI mintatartó plate-re (MTP 384 massive target T, Bruker Daltonics) 3 µl acetonitril/0,1% trifluor-ecetsav 1:1 keverékével oldottuk le. Ezt követően a leoldott mintához 1 µl telített mátrixot adtunk (CHCA mátrix, alfa-ciano-4-hidroxi-fahéjsav acetonitril/0,1% trifluor-ecetsav 1:2 arányú keverékében oldva), majd a mintákat tömegspektrométer (Bruker Daltonics) segítségével vizsgáltuk. A vizsgálat során kapott spektrumot PACAP38 standard segítségével értékeltük.

II. PACAP szerepének vizsgálata patkány vesében

II/1. Exogén PACAP hatása a sejttúlélésre *in vitro*

Kísérleteinket 4-7 napos újszülött Wistar patkányok veséiből nyert primer sejtenyészeten végeztük. A szervek eltávolítását követően azokat feldaraboltuk, majd az így nyert szervdarabkákat kollagenázzal (collagenase type II, Gibco, Magyarország) emésztettük. Az izolált vesesejteket 96 lyukú platerre helyeztük és 10% FBS-t (foetal bovine serum), illetve 100IU/ml penicillin/streptomycint tartalmazó médiumban inkubáltuk 48 órán keresztül.

Ezt követően a sejteket random módon csoportokra osztottuk és a következőképpen kezeltük: kontroll csoport kezelés nélkül; 10, illetve 100 nM PACAP-pal önállóan kezelt sejtek, 1, 3 és 6 mM H₂O₂-dal kezelt csoportok, valamint a fent említett koncentrációjú H₂O₂-dal egyidőben szimultán PACAP-pal inkubált sejtek. A csoportok:

- 1., kontroll csoport,
- 2., 10nM PACAP1-38,
- 3., 100nM PACAP1-38
- 4., 1mM H₂O₂
- 5., 1mM H₂O₂ +10nM PACAP1-38,
- 6., 1mM H₂O₂ +100nM PACAP1-38,
- 7., 3mM H₂O₂
- 8., 3mM H₂O₂ +10nM PACAP1-38,
- 9., 3mM H₂O₂ +100nM PACAP1-38,
- 10., 6mM H₂O₂
- 11., 6mM H₂O₂ +10nM PACAP1-38,
- 12., 6mM H₂O₂ +100nM PACAP1-38,

A sejteket a fent részletezett protokoll szerint 2, illetve 4 órán keresztül kezeltük.

Ezt követően azt vizsgálándó, hogy melyik a legkisebb még hatást mutató PACAP-koncentráció, kísérleteink során alacsonyabb PACAP-koncentrációkat alkalmaztunk. Szintén újszülött patkányok veséiből primer tenyészetet készítettünk, majd az előkészítést követően az alábbiak szerint kezeltük:

- 1., kontroll csoport kezelés nélkül,
- 2., csak 10nM PACAP1-38-cal,
- 3., csak 100nM PACAP1-38-cal kezelt sejtek,
- 4., 1mM H₂O₂,
- 5., 1mM H₂O₂ + 10pM PACAP1-38,
- 6., 1mM H₂O₂ + 100pM PACAP1-38,
- 7., 1mM H₂O₂ +1nM PACAP1-38,
- 8., 1mM H₂O₂ +10nM PACAP1-38.

A kezelés időtartama 2 óra volt.

II/2. PACAP hatása a Bcl-2 szintre vese ischaemia/reperfúziót követően *in vivo*

A vizsgálatokhoz 300-350 g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat szintén isoflurannal altattuk. A műtét előtt 100 IU/kg heparinnal, illetve intravénásan vagy PACAP-pal (100 µg PACAP1-38 100 µl fiziológias sóoldatban oldva) vagy vivőanyaggal (100 µl fiziológias sóoldat) kezeltük az állatokat. Medián laparotomiát követően a veseereket 45 vagy 60 percig lekötöttük (n=5/csoport). Az állatok veséit az ischaemia letelte után vagy azonnal vagy 10 percig tartó reperfúziót követően távolítottuk el.



4. ábra Műtéti képek a vese ereinek lekötéséről. (A) a veseerek feltárása; (B) az erek lekötése.

Ezt követően a Bcl-2 mennyiségét Western blot segítségével vizsgáltuk. A mintákat izotóniás, 0,5 mM nátrium-metavanadádot, 1 mM EDTA-t, és Protease Inhibitor Cocktail-t (1:1000, Sigma-Aldrich) tartalmazó Tris pufferben (50 mM, pH:8,0) homogenizáltuk.

A sejtmembránokat ultrahanggal roncsoltuk, a fehérjéket triklórecetsavval kicsaptuk, majd -20°C hőmérsékletű acetonnal háromszor átmostuk és Laemmli pufferben oldottuk. Az elektroforézishez 12% SDS-poliakrilamid gélt használtunk. A szeparálást követően a mintákat nitrocellulóz membránra vittük át.

Ezt követően 2 órán keresztül TBS-ben (Tris-buffered saline) oldott 3% sovány tejpor felhasználásával blokkoltuk, majd egy éjszakán keresztül inkubáltuk a membránokat 4°C-on, anti-Bcl-2-t tartalmazó oldatban (1:1000 hígítás, Cell Signaling Technology).

Másodlagos antitestként peroxidáz-konjugált anti-nyúl IgG-t alkalmaztunk (1:3000 hígítás, Bio-Rad), majd az immunreaktív band-eket ECL (enhanced chemiluminescence labeling) rendszer (ECL Western blotting detection system, Amersham Biosciences) segítségével

tettük láthatóvá. A band-ek intenzitásának kiértékelésére NIH's Image J szoftvert használtunk. Az adatok statisztikai analízisét ANOVA, illetve t-teszt segítségével végeztük.

II/3. In vivo ischaemia/reperfúziót követő citokin array

Isofluran anaesthesia mellett 300-350g súlyú hím Wistar patkányok jobb v. jugularisába heparint (100 IU/ttkg) injektáltunk. Emellett a laparotomiát megelőzően az állatok vagy intravénásan 100µg PACAP-ot (100µl fiziológias sóoldatban oldva), vagy 100µl fiziológias sóoldatot kaptak. A median laparotomiát követően a veseereket izoláltuk, majd mindkét oldali vesét 45 vagy 60 percre kirekesztettük a keringésből. A kontroll állatoknál csak 1 másodpercre fogtuk le az ereket. 24 óra elteltével az állatok veséit eltávolítottuk, majd a kontroll, PACAP-, vivóanyag-kezelt csoportok

ból származó mintákat citokin array módszerrel (Rat Cytokine Array Panel A Array kit, R & D Systems, Biomedica) vizsgáltuk (n=4 minden csoportban).

A módszer lényege: az általunk alkalmazott kit 4 nitrocellulóz membránt tartalmaz, amelyen a vizsgált citokinek/kemokinek ellen termeltetett antitestek duplikátumban a membránhoz kötve található. A homogenizált vesemintákat biotinilált (szintén a vizsgált antigénekre specifikus) antitestekkel kezeljük, majd ezt az elegyet helyezzük a citokinek/kemokinek elleni specifikus antitesteket hordozó nitrocellulóz membránra. A biotinilált antitest-citokin/kemokin-citokin/kemokin elleni specifikus antitest komplex kemilumineszcens módszerrel detektálható.

A mintákat proteáz inhibitorokat tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk, majd ezt követően, 1%-nyi Triton X-100 hozzáadása után -80°C-on lefagyasztottuk és a minták újbóli felolvadását követően 5 percig centrifugáltuk (10000 rpm). A minták fehérjetartalmának meghatározását követően a citokinek/kemokinek 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 a membránokat pufferben oldott streptavidin-

tormaperoxidázzal inkubáltuk szobahőmérsékleten 30 percig. 3x10 perc mosás után kemilumineszcens reagens hozzáadását követően az immunpozitív foltokat vizualizáltuk. A foltok intenzitásának kiértékeléséhez GenePix Pro 3.0 szoftvert használtunk. Az adatok statisztikai analízisét ANOVA, illetve t-teszt segítségével végeztük.

II/4. PACAP és PAC1 receptor jelenlétének vizsgálata

A PACAP38 patkány vesében (n=3) történő azonosítását az I/3. pontban leírtaknak megfelelően MALDI TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) tömegspektrometriával végeztük. A vizsgálat során kapott spektrumot PACAP38 standard felhasználásával értékeltük.

A PAC1 receptor jelenlétét immunhisztokémiával detektáltuk. Az eltávolított veséket (n=4) 4% paraformaldehid oldatban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. Ezt követően 10 µm vastagságú metszeteket készítettünk, majd poliklonális PAC1 receptor antitesttel (1:100, Sigma) festettük. Az inkubálást követően Vectastain ABC kit-et (Biomarker, Magyarország) használtunk, a lépéseket a gyártó leírásának megfelelően végeztük. Az elkészült metszetekről Nikon FXA mikroszkóphoz csatolt Spot RT digitális kamerával felvételeket készítettünk.

II/5. A PACAP mennyiségének vizsgálata vese ischaemia/reperfúziót követően *in vivo*

Kísérleteinket 300-350 g súlyú hím Wistar patkányokon végeztük. Isofluran anaesthesia mellett az egyik a. renalis-t 60 percre kirekesztettük a keringésből. Ezt követően az állatok veséit – az ischaemiás és az intakt oldalit egyaránt - a reperfúzió után 1, 6 és 24 óra múlva eltávolítottuk (n=5 minden csoportban). A kontroll csoportba tartozó állatokon műtéti beavatkozás nem történt. Az eltávolított vesékben egy, a kutatócsoportunk által korábban kifejlesztett specifikus és szenzitív radioimmunassay módszerrel határoztuk meg a PACAP1-27 és PACAP1-38 mennyiségét (Jakab et al., 2004; Németh et al., 2007).

RIA módszer leírása röviden

Antiszérum:

Az általunk használt PACAP1-38 antiszérumot karbodiimid által konjugált Cys²³-PACAP24-28 és borjú thyreoglobulin antigén ellen termeltetik nyúlban. A „88111-3”-as számú antiszérum, 1:10 000 hígításban bizonyult a legeredményesebbnek a RIA kifejlesztése során.

A PACAP1-27 esetén a „88123-3” számú antiszérumot használtuk 1:45 000 hígításban. Az antiszérum előállítása az előzőben leírtaknak megfelel. Az antiszérumok Akira Arimura professzor (Tulane University, New Orleans, USA) laboratóriumából származnak.

Jelöletlen antigén:

Saját laboratóriumban készült mono-¹²⁵I izotóppal jódozott birka PACAP24-38 és birka PACAP1-27 (5000 cpm/ tubus).

Standard:

A RIA mérés során birka PACAP1-27 illetve PACAP1-38 peptidet (Sigma) használtunk standardként 0-1000 fmol/ml tartományban.

Pufferoldat (assay-puffer)

A RIA tesztek 1 ml 0,05 mol/l koncentrációjú (pH 7,4) foszfát pufferben végeztük. Az oldat összetevői:

-0,25 % (w/v) BSA,

-0,1 mol/l NaCl,

-0,05 % (w/v) NaN₃

Immunoassay eljárás

A polipropilén RIA csövekbe (Merck) duplikátumban az alábbi inkubációs elegyet mértük be:

- 100 µl PACAP1-27 vagy PACAP1-38 standard, ill. mérni kívánt/ismeretlen minta,
- 100 µl antiszérum⁸⁸¹¹¹⁻³ PACAP1-38 (1: 10000 hígításban), vagy „88123-3” PACAP1-27 (1: 45000 hígításban),
- 100 µl (kb. 5000cpm) ¹²⁵I izotóppal jelölt PACAP24-38 vagy PACAP1-27
- assay-puffer.

A mintákat, az összekeverést követően 4 °C-on 48-72 óráig inkubáltuk. Ez után az antitesthez kötött jelölt antigén frakciót elválasztottuk a szabad jelölt peptidektől oly módon, hogy csövenként 100 µl szeparáló oldatot mértünk hozzá, melynek összetétele:

- 10 g mosott szén,
- 1 g dextrán,
- 0,5 g zsírintes tejpör,
- 100 ml desztillált víz.

A csöveket 4 °C-on 15 percig 3000 rpm-en centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük, és itatóspapírral leitattuk. A szénhez kötődött szabad peptidfrakció radioaktivitását (gammaszugárzást) NZ310 típusú spektrométeren megmértük. Ebből következtethetünk az ellenanyaghoz kötött radioaktivitás értékére, majd egy kalibrációs görbéről leolvashatjuk az ismeretlen minta PACAP1-38 vagy PACAP1-27 koncentrációját (Németh et al., 2007; Jakab et al., 2004).

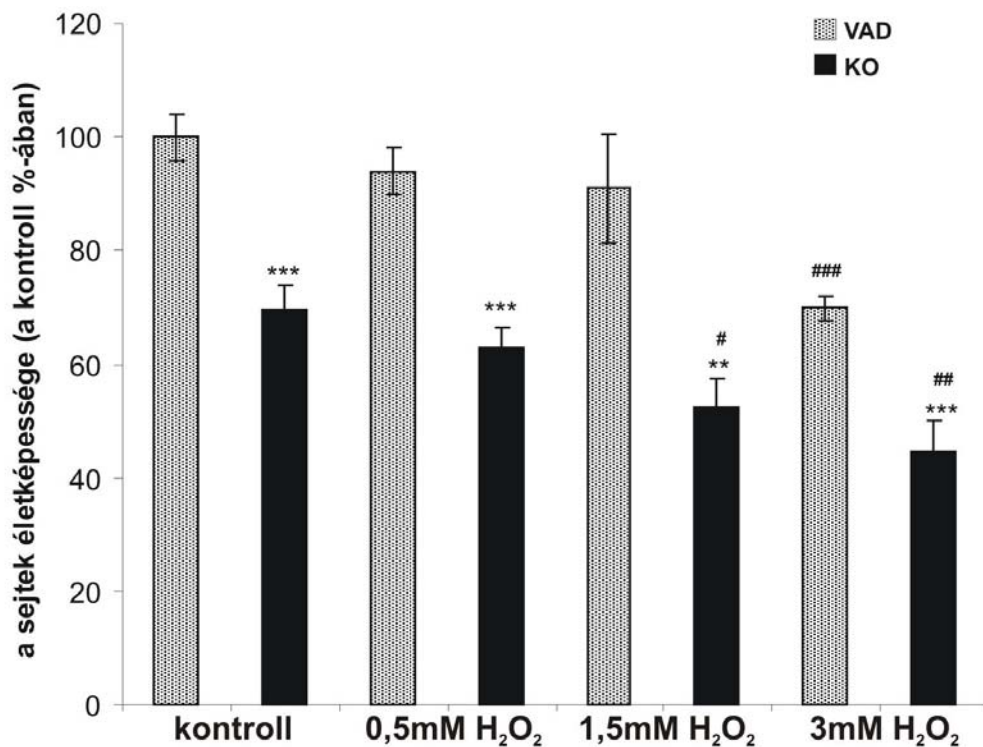
EREDMÉNYEK

I. PACAP szerepének vizsgálata PACAP knockout egereken

I/1. Endogén PACAP szerepének vizsgálata oxidatív stressz és hypoxia indukálta vesesejtkárosodásban *in vitro*

A. *In vitro* oxidatív stressz hatása vad és PACAP KO egerek vesesejtjeire

A vad típusú, illetve PACAP KO egerekből származó vesesejtek életképességének vizsgálatakor az alkalmazott H₂O₂-kezelés dóziszfüggő módon csökkentette a sejtek életképességét (5.A és 5.B ábra). A sejtek életképességének csökkenése markánsabban mutatkozott meg a H₂O₂-dal 4 órán keresztül kezelt csoportban.



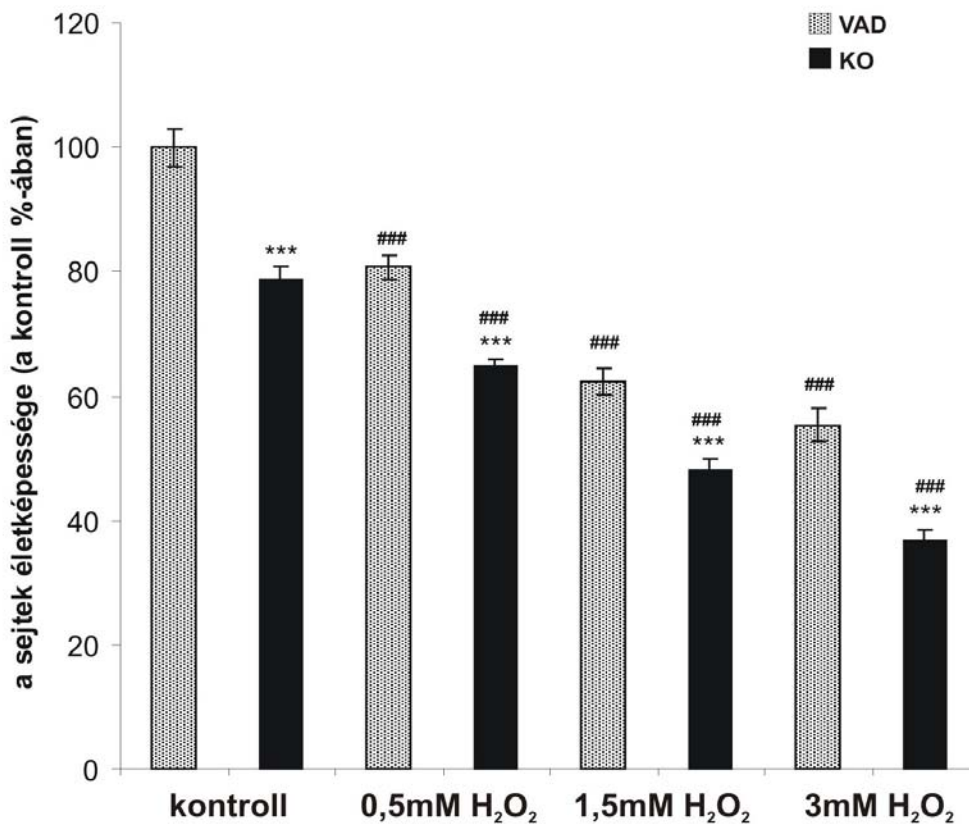
5.A ábra

2 órás H₂O₂-kezelés hatása a vad és PACAP KO egerek vesesejtjeinek túlélésére (átlag%±SEM)

P < 0,01, *P < 0,001 vs azonos koncentrációjú H₂O₂-dal kezelt vad sejtek.

#P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001 vs megfelelő kontroll sejtek csoportja.

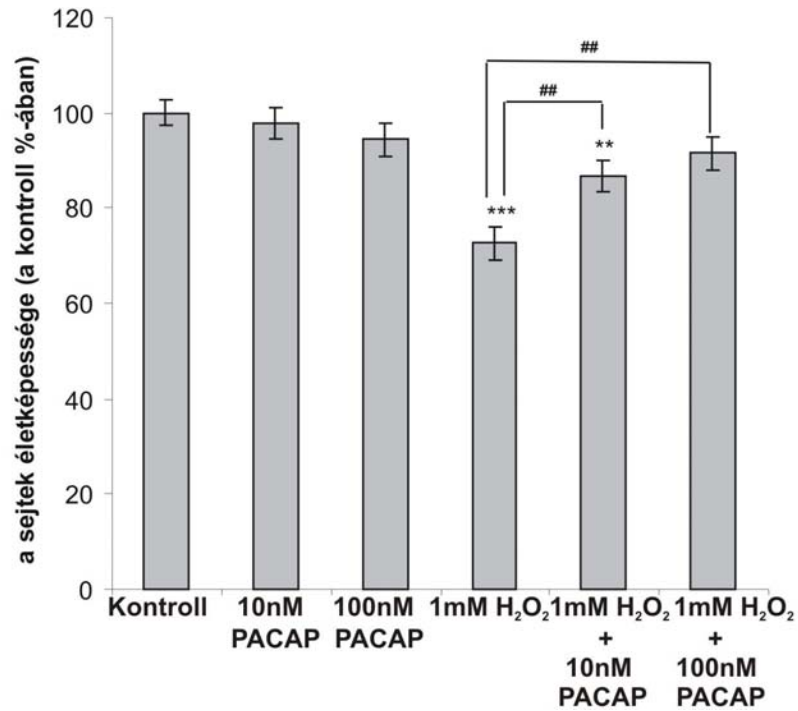
Mind a 2 órás (5.A ábra), mind pedig a 4 órás (5.B ábra) H₂O₂-kezelést kapott csoportokban azt figyeltük meg, hogy a PACAP KO egerek veséiből származó sejtek szignifikánsan érzékenyebben reagálnak a H₂O₂-indukálta oxidatív stresszre.



5.B ábra 4 órás H₂O₂-kezelés hatása a vad és PACAP KO egerek vesesejtjeinek túlélésére (átlag%±SEM) (MTT assay)
 ***P < 0,001 vs az azonos koncentrációjú H₂O₂-dal kezelt vad sejtek.
 ###P < 0,001 vs a megfelelő kontroll sejtek csoportja.

B. Exogén PACAP hatása PACAP KO egerek oxidatív stressznek kitett vesesejtjeire

Ezt követő kísérleteinkben vizsgáltuk az exogén PACAP hatását a PACAP KO egerek vesesejtjeire, amennyiben H₂O₂-dal kezeljük őket. Önállóan alkalmazott 10, illetve 100 nM PACAP-kezelés nem volt hatással a sejtek túlélésére. 2 órás 1mM (6.A ábra), illetve 4 órás 0,5mM H₂O₂-kezelés (6.B ábra) szignifikánsan csökkentette az élő sejtek arányát. Egyidejűleg alkalmazott PACAP-kezelés – mindkét vizsgált koncentrációban – szignifikánsan enyhítette a H₂O₂ károsító hatását (6.A és 6.B ábra).

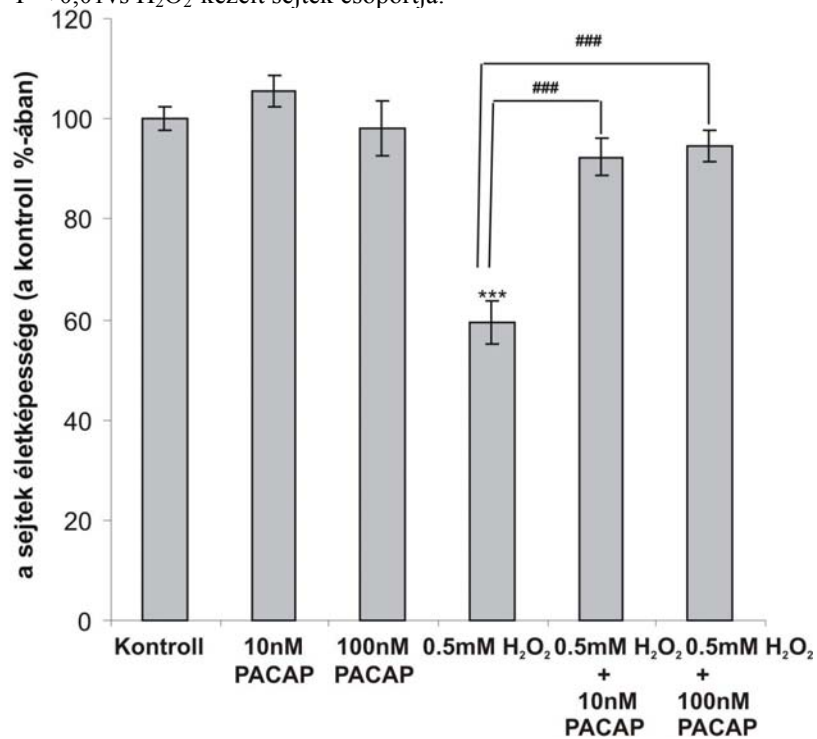


6.A ábra

PACAP KO vesesejtek túlélése 2 órás H₂O₂-kezelés esetén a kontroll sejtek túléléséhez viszonyítva (átlag%±SEM) (MTT assay)

P < 0,01, *P < 0,001 vs kontroll csoport;

##P < 0,01 vs H₂O₂-kezelt sejtek csoportja.



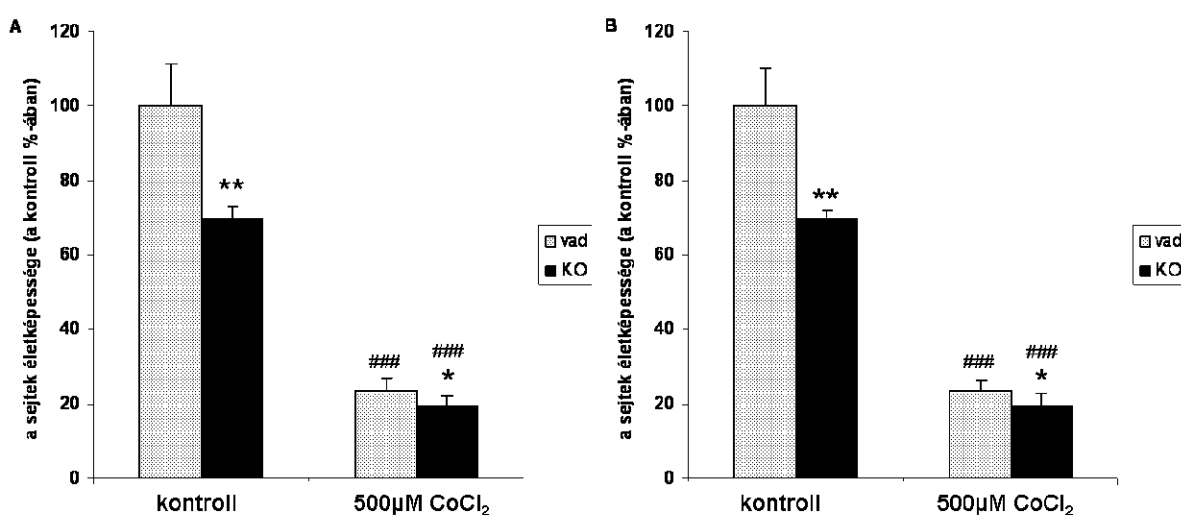
6.B ábra

PACAP KO vesesejtek túlélése 4 órás H₂O₂-kezelés esetén a kontroll sejtek túléléséhez viszonyítva (átlag%±SEM) (MTT assay)

***P < 0,001 vs kontroll csoport; ###P < 0,001 vs H₂O₂-kezelt sejtek csoportja.

C. *In vitro* hypoxia hatása vad és PACAP KO egerek vesesejtjeire

CoCl₂-indukálta *in vitro* hypoxia esetében a H₂O₂-kezelés során megfigyeltekhez hasonló eredményt kaptunk. Az alkalmazott CoCl₂-kezelés szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét. Mind a 24 órás (7.A ábra), mind pedig a 48 órás (7.B ábra) kezelést kapott csoportokban szignifikáns mértékű különbséget találtunk a vad, illetve PACAP KO egerekből származó vesesejtek túlélésében.



7. ábra

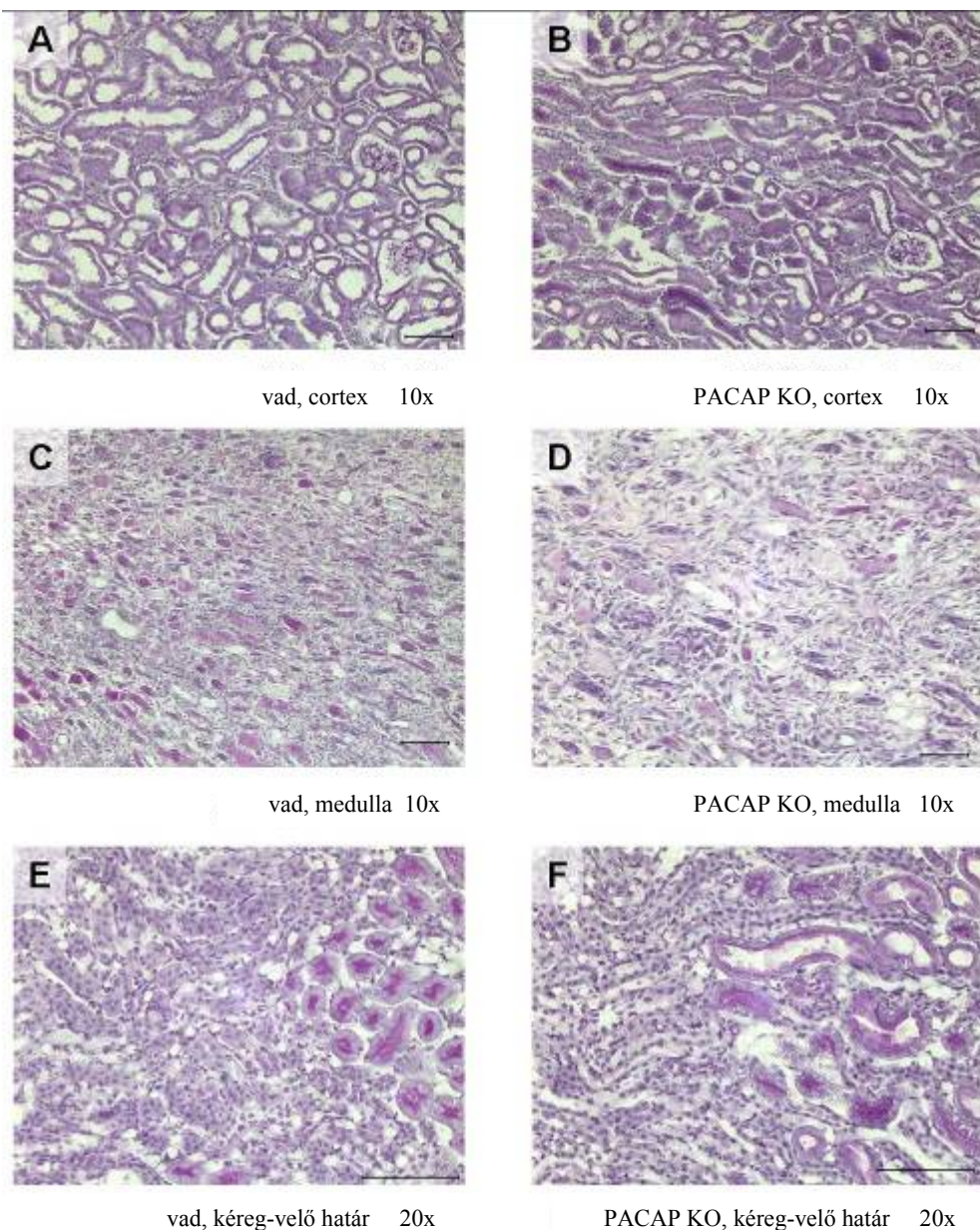
A. 24 és B. 48órás CoCl₂-kezelés hatása a vad és PACAP KO egerek vesesejtjeinek túlélésére (átlag%±SD)

*P < 0,05, **P < 0,01 vs vad sejtek.

###P < 0,001 vs a megfelelő kontroll sejtek csoportja.

I/2. PACAP knockout egerek veséjének szövettani vizsgálata

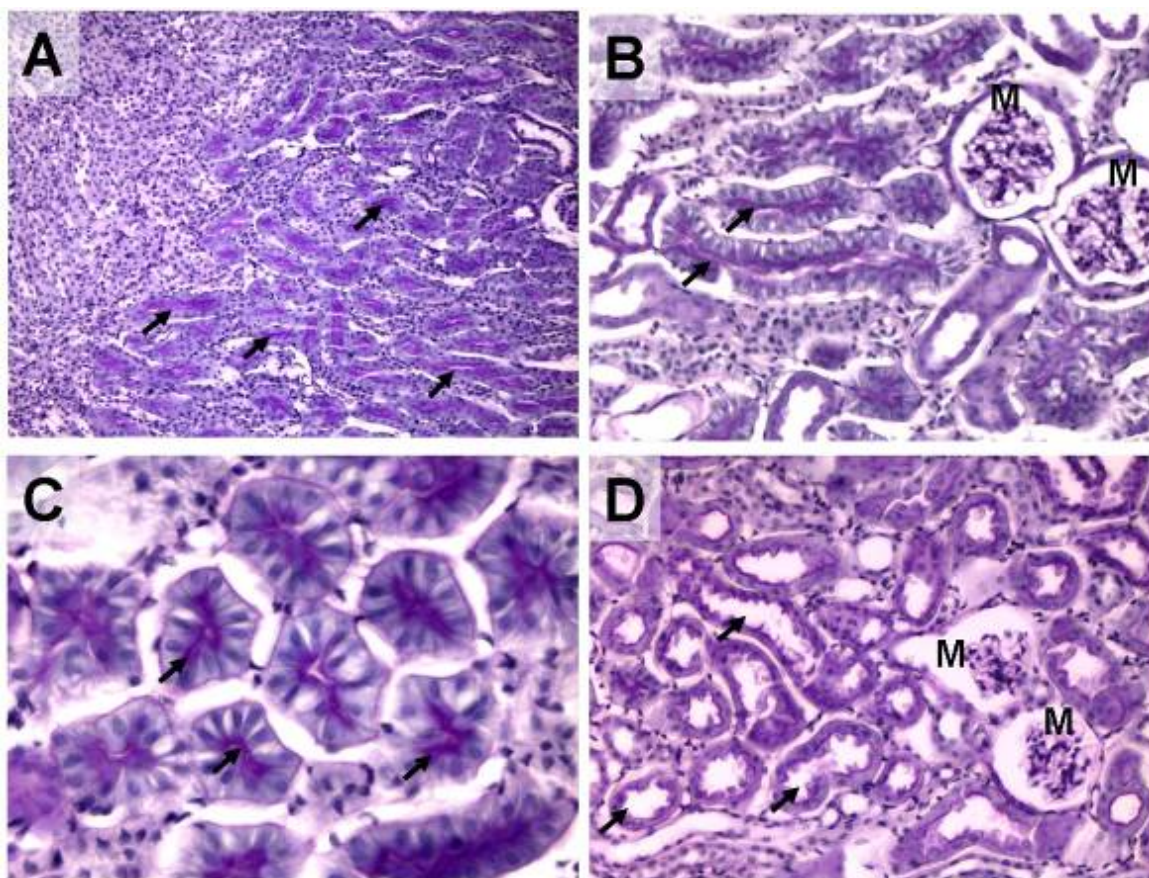
A vad és PACAP knockout egerek veséinek szövettani analizise során nem találtunk eltérést a vese szerkezetében (8. ábra). A kéreg-velő arány is mindkét vizsgált csoportban normálisnak bizonyult.



8. ábra Vad és PACAP knockout egér vese szövettani képei PAS festéssel. A: vad, kéregállomány; B: PACAP knockout, kéregállomány; C: vad, velőállomány; D: PACAP knockout, velőállomány; E: vad, kéreg-velő határ; F: PACAP knockout, kéreg-velő határ. Aránymérték: 100 μ m.

Lymphocyta vagy macrophag infiltratio, illetve PAS+ cylinderek egyik csoportban sem voltak megfigyelhetőek (grade mindkét csoportban: 0 ± 0). A proximális tubulus kefeszegély alatti PAS+ glycocalyx rétege $0,033 \pm 0,023$ volt a vad, illetve $0,067 \pm 0,046$ a PACAP KO egerekben. A tubuláris morfológia mértéke az osztályozás alapján $0,183 \pm 0,050$ volt a vad, $0,233 \pm 0,070$ volt a PACAP KO vesékben. A vesetestecskék analízise során szintén nem találtunk szignifikáns eltérést. (a grade-ek: $0,11 \pm 0,02$ a vad, $0,12 \pm 0,02$ a PACAP KO egerekben).

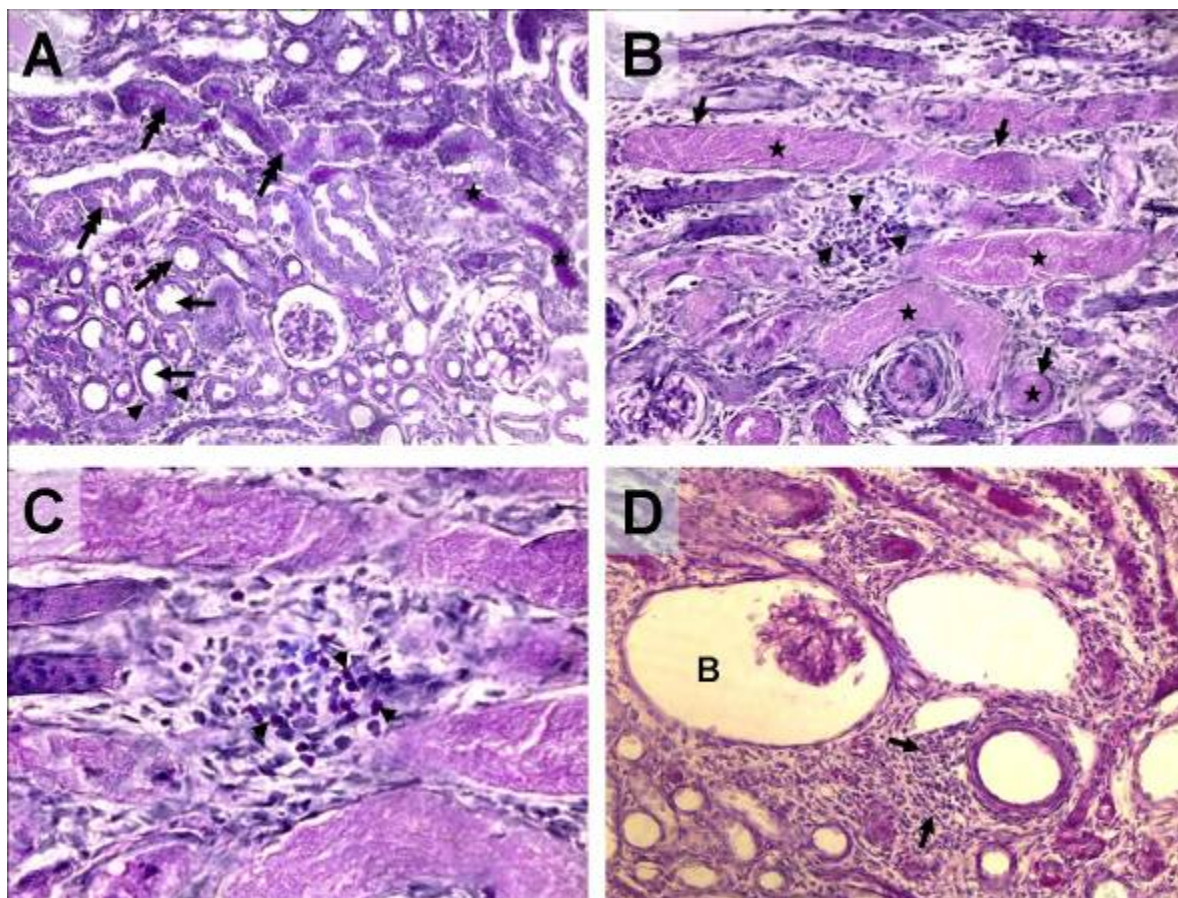
A kontroll (nem lekötött oldali) vesékben (9. ábra) szignifikáns különbséget figyeltünk meg a lymphocyta és macrophag infiltratio mértékében, a PAS+ glycocalyx vastagságában, valamint a Bowman-tok tágulatában a vad, illetve PACAP knockout egerek veséinek vizsgálatakor (12. ábra).



9. ábra **A-C** normál szerkezetet mutató vesemetszetek vad egérből, PAS festéssel; a lumenális felszínen jól látható a PAS+ glycocalyx (*nyilak*); *M*: Malpighi-testecske
A kéreg-velő határ; **B** kéregállomány; **C** tubulusok keresztmetszete (nagyobb nagyítással)
D PACAP knockout egér vese PAS festéssel. A tubulusok enyhén tágultak (*nyilak*), a Bowman-tok ürege néhol kiszélesedett (*M*).

Néhány KO egér esetében lymphaticus infiltráció, valamint a vesetestecskék tágulata volt látható (9.D. ábra).

A kontroll vesék esetében tapasztalt megfigyelésekkel szemben, markáns különbség mutatkozott renalis ischaemia/reperfúzió esetében, mind a 45 (10. ábra), mind pedig a 60 percig tartó ischaemia esetén (11. ábra).



10. ábra

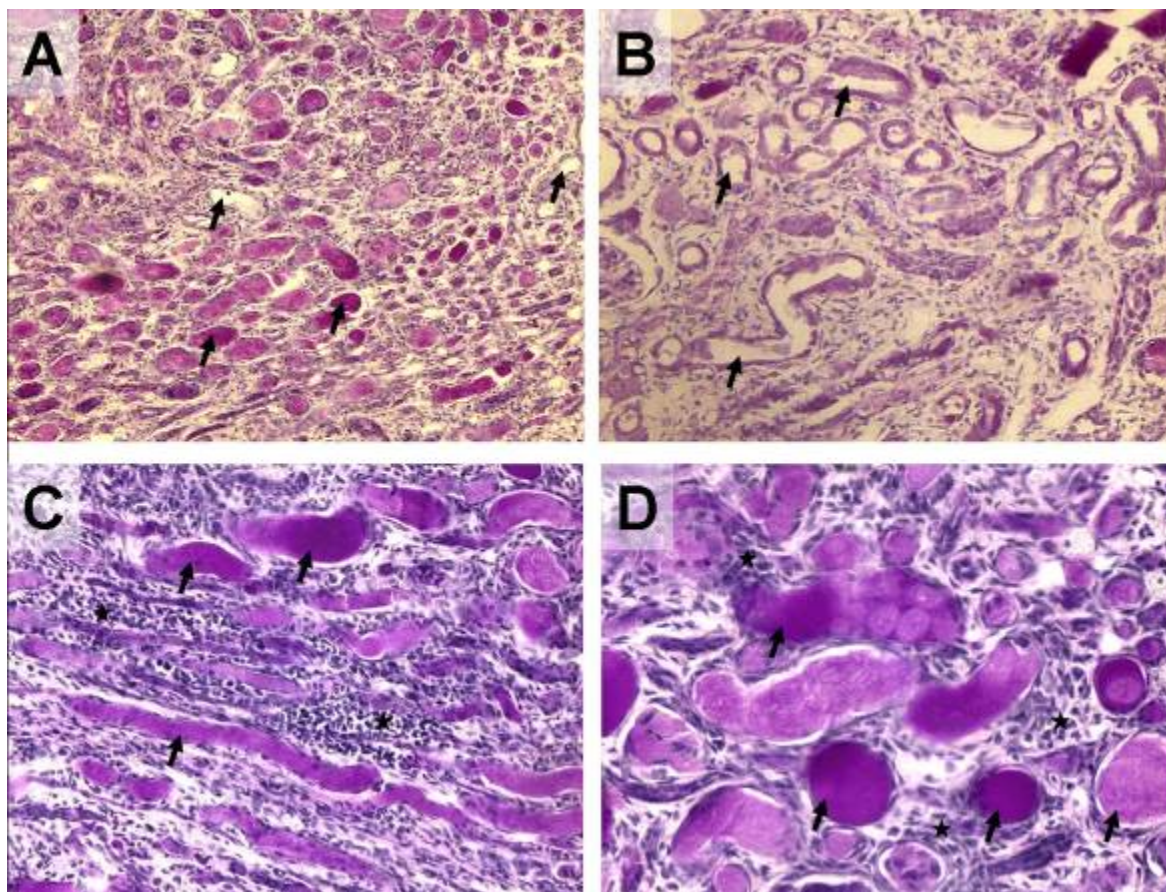
Veseszövet fénymikroszkópos felvételei 45 perces ischaemiát követően vad (A), illetve PACAP KO egerekből (B-D) PAS festéssel.

A vad, kéregállomány. A tubulusok kitágultak (*nyilak*) és közülük néhány PAS+ homogén anyaggal kitöltött (*csillagok*). A lumenális felszínen lévő glycocalyx megtartott (*kettős nyilak*).

B-C KO, kéregállomány a tubulusok nagyobb mértékben tágultak, a hámréteg erősen ellaposodott (*nyilak*). A tubulusok döntő részében megfigyelhető a (*csillagok*). A tubulusok körüli kötőszövetben néhány PAS-festett macrophag (*nyílhegyek*) láthatók, nagyobb nagyítással a macrophagok egy csoportja jól látható a C képen (*nyílhegyek*).

D KO, kéregállomány. Extrém mértékben tágult Bowman-tok (*B*), periarterialis lymphocytá infiltráció (*nyilak*).

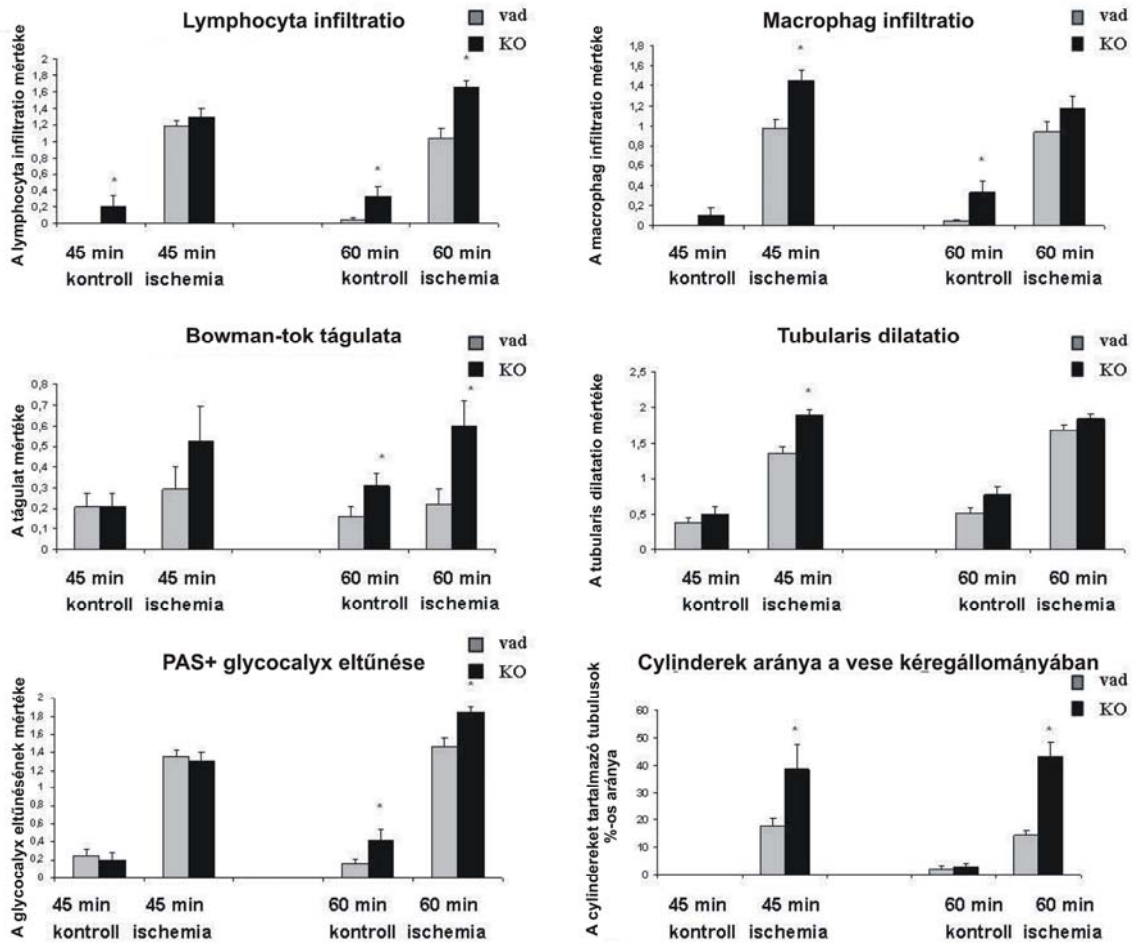
A vad egerek veséiben mérsékelten jelentkeztek az ischaemiás károsodásra jellemző eltérések tubuláris degenerációval, valamint lymphocyta beszűrődéssel. Azonban a vad egerekhez képest, a PACAP knockout egerek veséiben az ischaemia/reperfúzió szignifikáns mértékben súlyosabb fokú károsodást eredményezett. A tubuláris károsodás súlyosabb fokban jelentkezett, illetve a Bowman-tok nagymértékű dilatációja a PACAP KO egerek kéregállományát szivacsos megjelenésűvé tette.



11. ábra Veseszövet fénymikroszkópos felvételei 60 perces ischaemiát követően vad (A-B), illetve PACAP KO egerekből (C-D) PAS festéssel.

A-B vad, kéregállomány. A tubulusok kitágultak és cylinder képződést mutatnak. A PAS+ glycocalyx jelenléte nagyobb nagyítással egyértelműen látható.

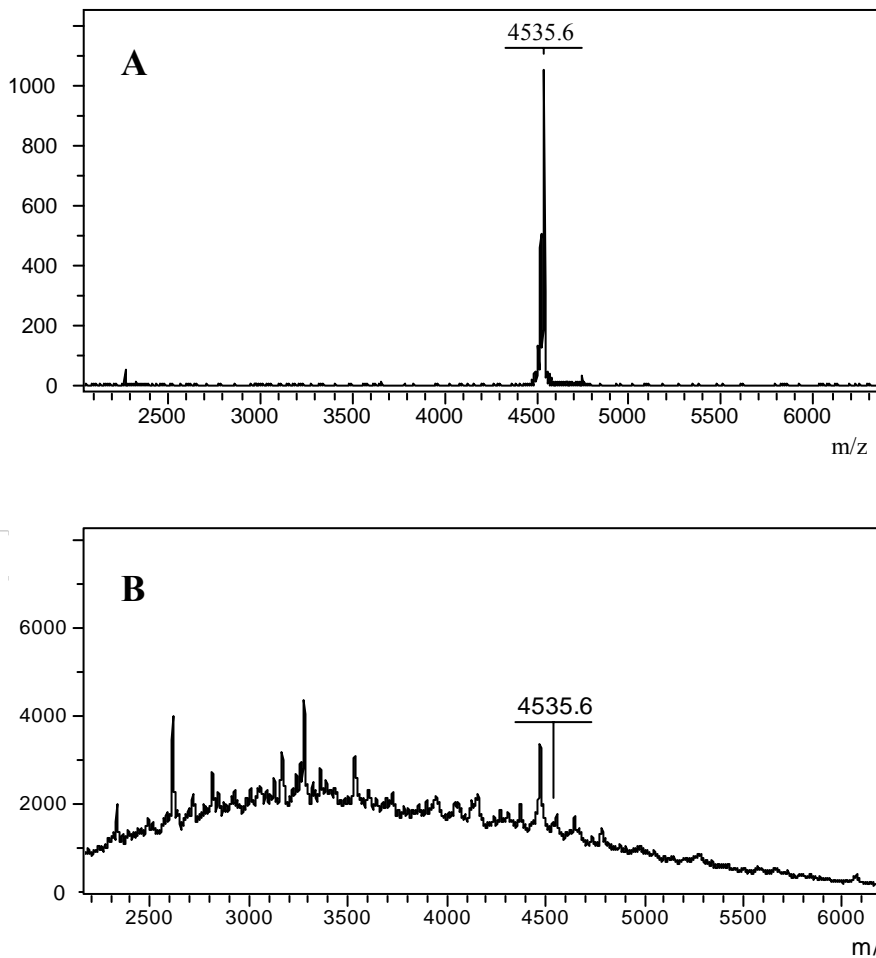
C-D KO, kéregállomány. Mindkét felvételen nagyszámú, tág PAS+ homogén anyaggal kitöltött tubulus (*nyilak*), nagymértékű lymphocyta infiltráció (*csillagok*) látható. A PAS+ glycocalyx teljesen eltűnt.



12. ábra Ischaemia/reperfúzió okozta szövettani eltérések mértéke vad, illetve PACAP knockout egerekben
*P < 0,05 vs vad egereknél mért értékek

I/3. PACAP jelenlétének vizsgálata

A PACAP jelenlétét az eltávolított patkány vesékben MALDI TOF tömegspektrometriával vizsgáltuk. A mérés során a vese homogenizátumokban a PACAP standardra jellemző csúcsot detektáltunk 4535Da-nál (13. ábra) (Börzsei et al., 2009).

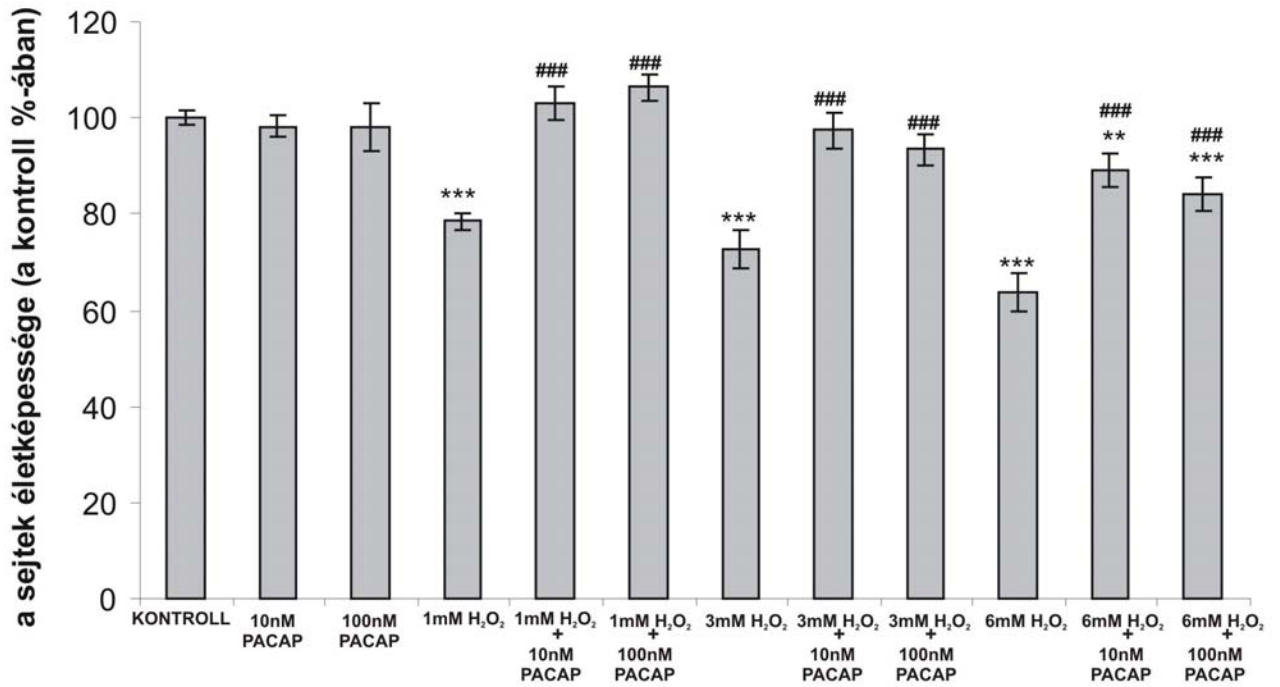


13. ábra MALDI TOF tömegspektrometria (A) PACAP38 standard spektruma, (B) egér vese homogenizátum.

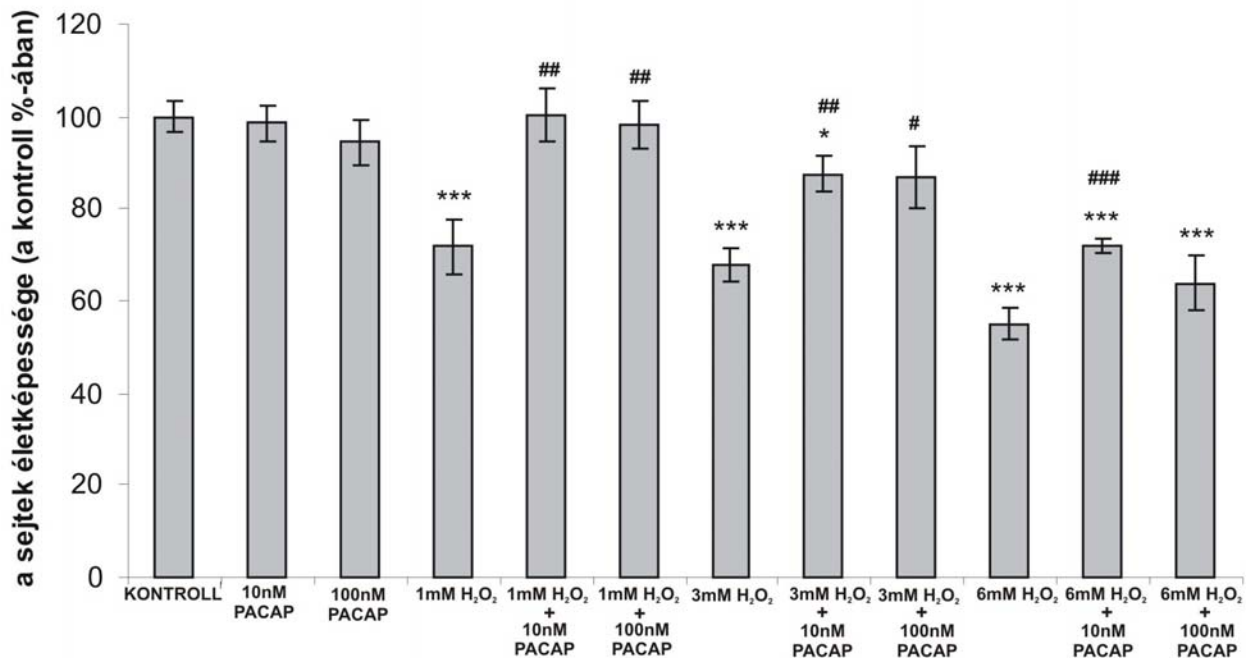
II. PACAP vizsgálata patkány vesében

II/1. Exogén PACAP hatása a sejt túlélésre *in vitro*

A sejtek életképességét MTT teszt segítségével határoztuk meg. Önállóan alkalmazott PACAP1-38-kezelés nem volt hatással az újszülött patkányok veséiből nyert vesesejtek túlélésére sem a 2 órás, sem a 4 órás kezelés esetén (14., 15. és 16. ábra). Ezzel szemben, az alkalmazott különböző időtartamú és koncentrációjú H₂O₂-kezelés minden esetben szignifikáns mértékben csökkentette az élő sejtek arányát. A H₂O₂-kezeléssel egyidőben alkalmazott 10, illetve 100 nM PACAP1-38 kezelés szignifikáns mértékben képes volt csökkenteni a H₂O₂ sejt túlélést csökkentő hatását minden esetben, kivéve a 4 óra időtartamú 6mM H₂O₂-kezelés esetén fellépő károsodást (15. ábra).

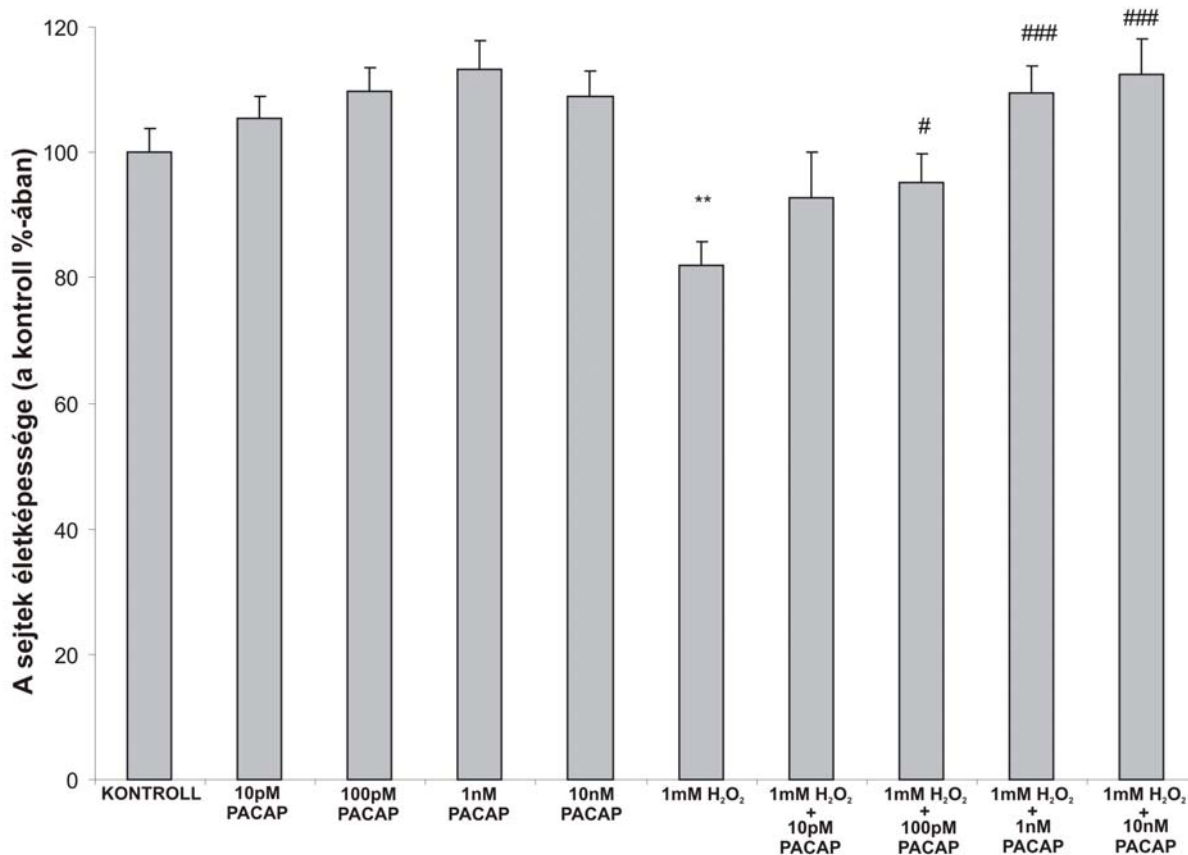


14. ábra PACAP-kezelés hatása a vesesejtek túlélésére 2 órás H₂O₂-kezelés esetén a kontroll sejtek túléléséhez viszonyítva (átlag%±SEM) (MTT assay)
 ***P < 0,001 vs kontroll csoport; ###P < 0,001 vs H₂O₂-kezelt sejtek csoportja.



15. ábra PACAP-kezelés hatása a vesesejtek túlélésére 4 órás H₂O₂-kezelés esetén a kontroll sejtek túléléséhez viszonyítva (átlag%±SEM) (MTT assay)
 P < 0,01, *P < 0,001 vs kontroll csoport; ###P < 0,001 vs H₂O₂-kezelt sejtek csoportja.

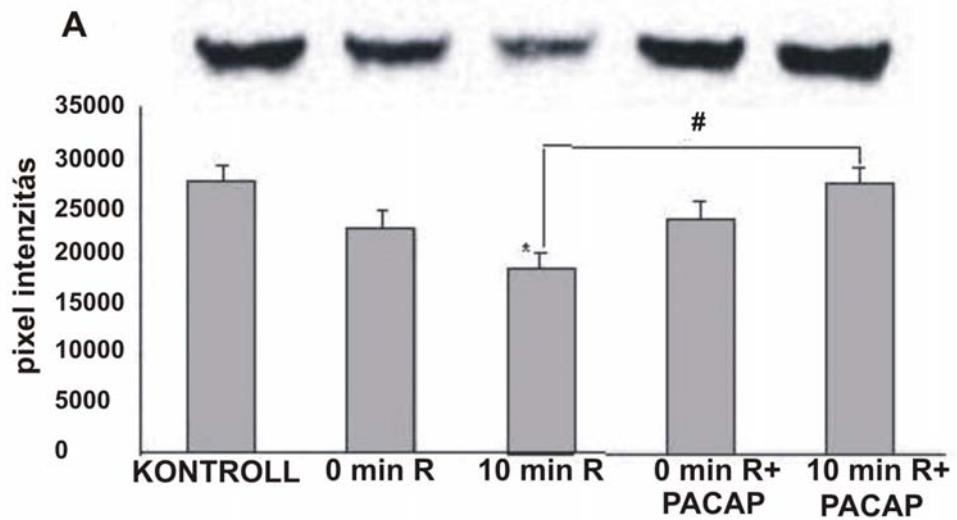
Mivel az általunk alkalmazott 10, illetve 100 nM PACAP koncentrációk hatása között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, kiválasztottunk egy kísérleti csoportot (2h, 1 mM H₂O₂-kezelés), amely segítségével vizsgáltuk a PACAP ezen kísérleti körülmények közötti legalacsonyabb, de még protektív hatású koncentrációját. Vizsgálataink során azt figyeltük meg, hogy a PACAP sejttúlélést elősegítő hatása már 100 pM koncentrációban detektálható (16. ábra). Már az alacsonyabb (10 pM) koncentrációnál is megfigyelhető a protektív hatást valószínűsítő tendencia, ez azonban statisztikailag még nem bizonyult szignifikánsnak.



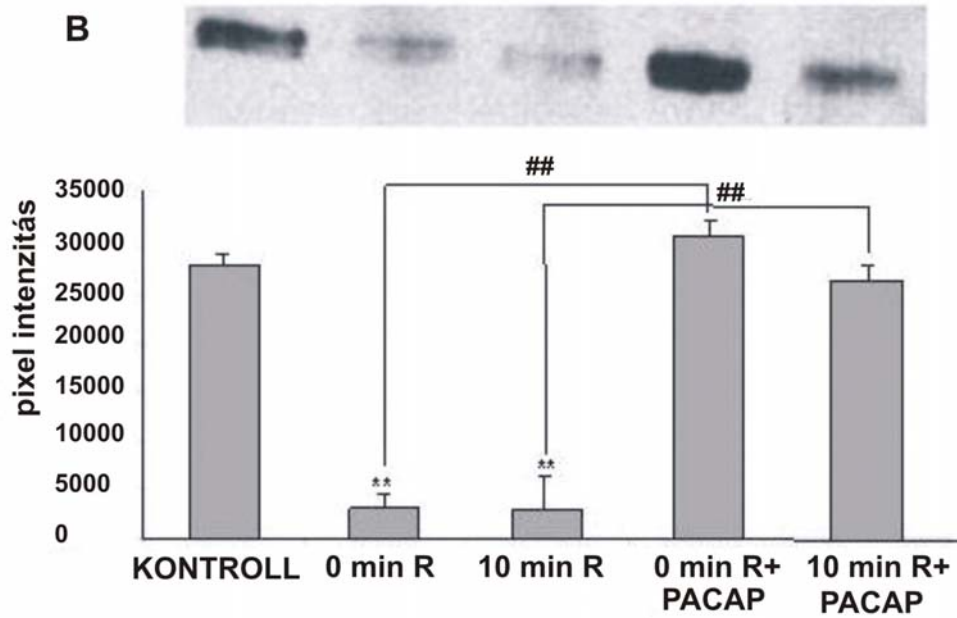
16. ábra PACAP-kezelés dóziszfüggő hatásának vizsgálata a vesesejtek túlélésére 2 órás 1mM H₂O₂-kezelés esetén a kontroll sejtek túléléséhez viszonyítva (átlag%±SEM) (MTT assay)
 **P < 0,01 vs kontroll csoport; #P < 0,05, ###P < 0,001 vs H₂O₂-kezelt sejtek csoportja.

II/2. PACAP hatása a Bcl-2 szintre vese ischaemia/reperfúziót követően

A veseerek lekötésével modellezett ischaemia/reperfúziós károsodás vizsgálatokor végzett Western blot analízis azt mutatta, hogy reperfúzió nélkül 45 percig tartó ischaemia nem okozott változást a Bcl-2 fehérje szintjében. Ezzel szemben 10 perc reperfúziót követően mennyisége szignifikánsan csökkent (17.A ábra), ez a csökkenés azonban kivédhetőnek bizonyult preoperatív intravénás PACAP-kezeléssel. A 60 percig tartó veseischaemiát elszenvedett állatok esetén a Bcl-2 expressziója már közvetlenül az ischaemiát követően – reperfúzió nélkül – szignifikánsan lecsökkent (17.B ábra). Mindkét esetben – reperfúzió esetén, illetve közvetlenül az ischaemiát követően – a megelőző PACAP-kezelés képes volt meggátolni az ischaemia/reperfúzió indukálta Bcl-2 csökkenést.



45 MIN ISCHAEMIA

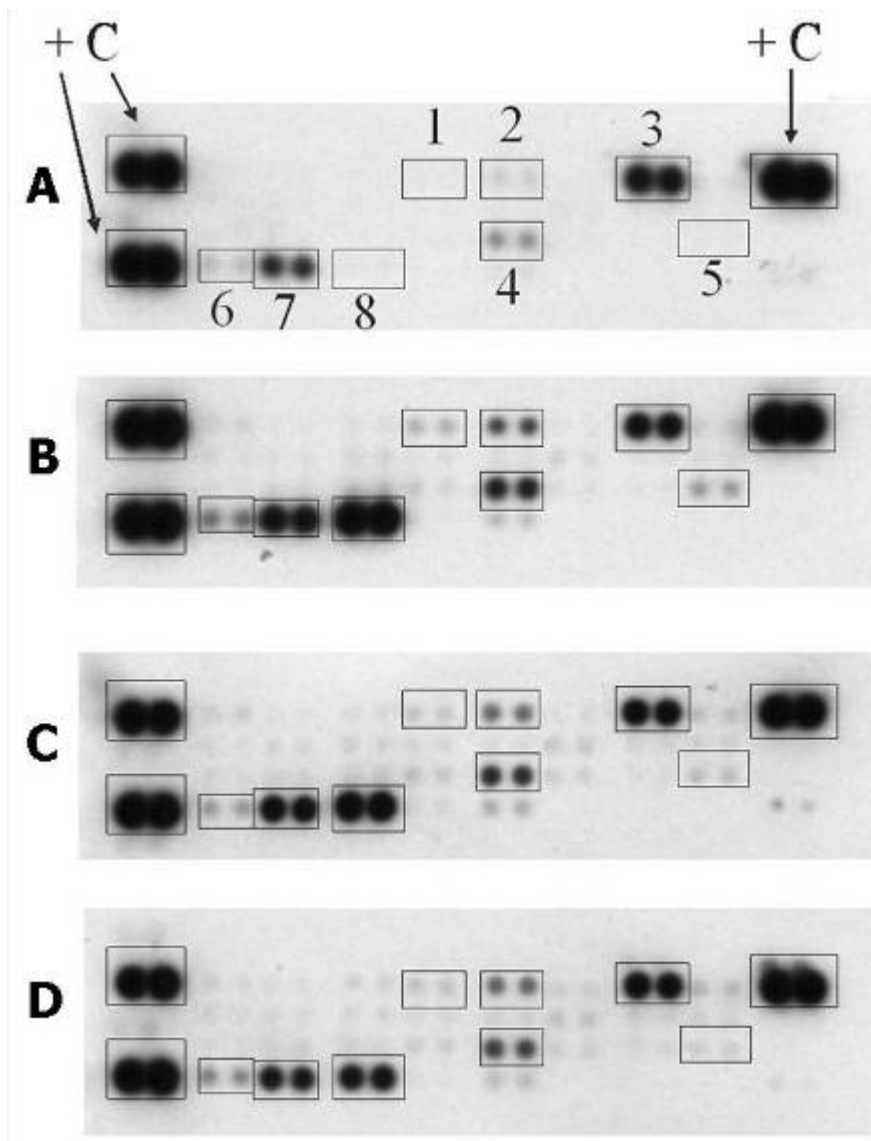


60 MIN ISCHAEMIA

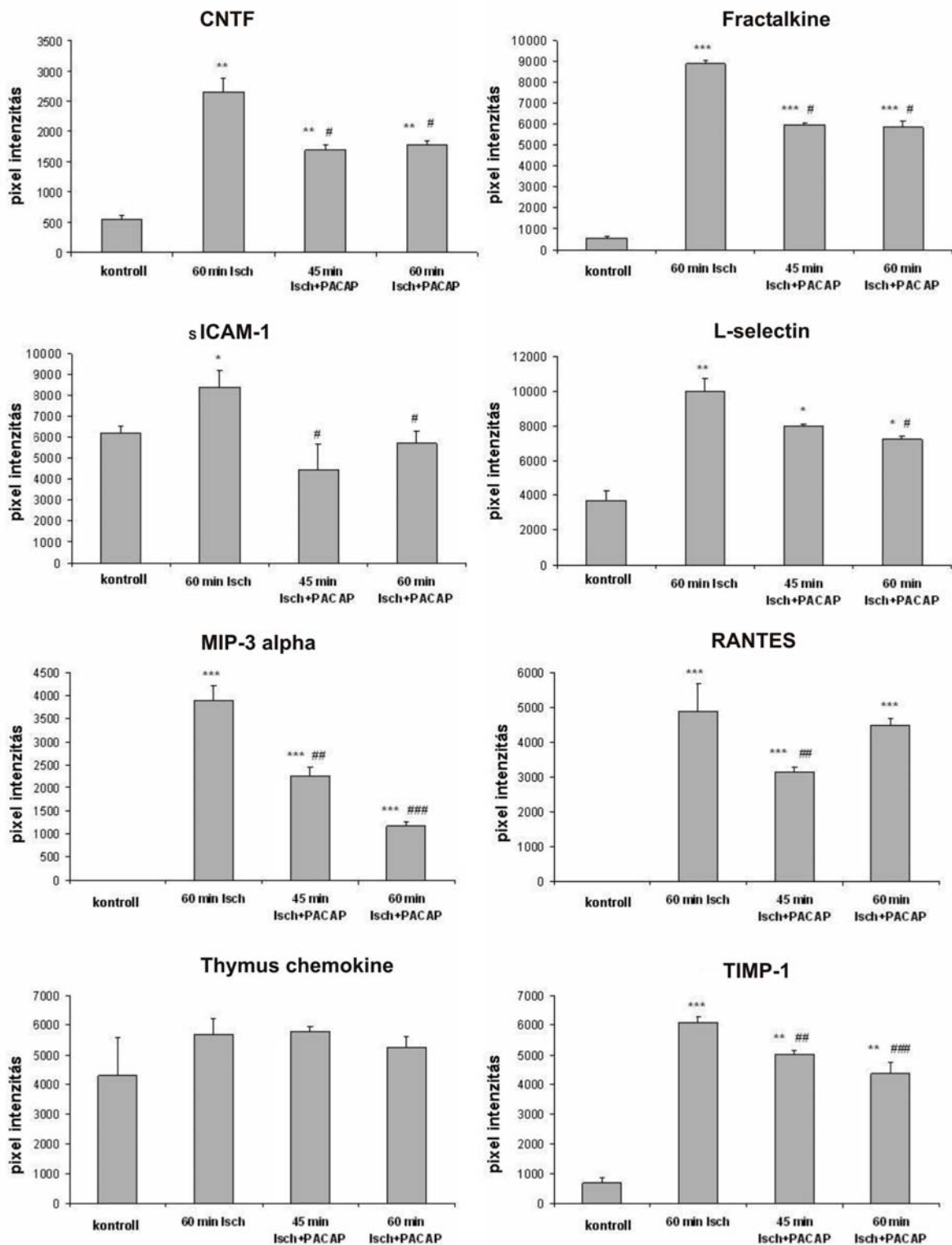
17. ábra PACAP-kezelés hatása a Bcl-2 expresszióra 45 (A) és 60 (B) perc ischaemiát követően 10 pernyi reperfúzióval (3. és 5. oszlop) vagy reperfúzió nélkül (2. és 4. oszlop). Átlag±SEM, *P < 0,05, **P < 0,01 vs kontroll csoport.

II/3. *In vivo* ischaemia/reperfúziót követő citokin array

Az *in vivo* ischaemia/reperfúziót követően elvégzett citokin array-k adatai azt mutatták, hogy a vesék keringésből történő 60 perces kirekesztése és az azt követő reperfúzió alkalmával emelkedik a chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (fractalkine, CX3CL1), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1, CD54), L-selectin (CD62L/LECAM-1), regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES, CCL5), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), ciliary neurotrophic factor (CNTF) és a macrophage inflammatory protein (MIP)-3 alpha expressziója a kontroll értékekhez képest (18. ábra, 1. és 2. panel; 19. ábra). A thymus chemokin (CXCL7) szintjében enyhe, nem szignifikáns emelkedést detektáltunk. 45 perces arteria renalis okklúzió esetén ugyanezek a változások voltak megfigyelhetőek. Az alkalmazott preoperatív PACAP-kezelés mind a 45, mind pedig a 60 perces ischaemiás csoportban a fent említett citokinek expressziójának csökkenését eredményezte (18. ábra, 3. és 4. panel; 19. ábra).



18. ábra PACAP hatása különböző citokinek expressziójára vese ischaemia/reperfúziót követően. **A.** Kontroll vese. **B.** 60 perc renalis ischaemia/reperfúzió hatása a citokin expresszióra. **C.** 45 perc ischaemia/reperfúzió megelőző intravénás PACAP-kezeléssel. **D.** 60 perc ischaemia/reperfúzió preoperatív PACAP-kezeléssel. Szignifikáns eltérést figyeltünk meg a jelzett citokinek esetében: (1), Fractalkine (2), sICAM-1 (3), L-selectin (4), MIP-3 alpha (5), RANTES (6), Thymus chemokine (7) és TIMP-1 (8). +C jelzi a pozitív kontrollt. A többi vizsgált citokin, ahol nem találtunk szignifikáns eltérést (balról jobbra, fentről lefelé): CINC-1, CINC-2 α/β , CINC-3, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , -1 β , -1ra, -2, -3, -4, -6, -10, -13, -17, IP-10, LIX, MIG, MIP-1 α , TNF α , VEGF.

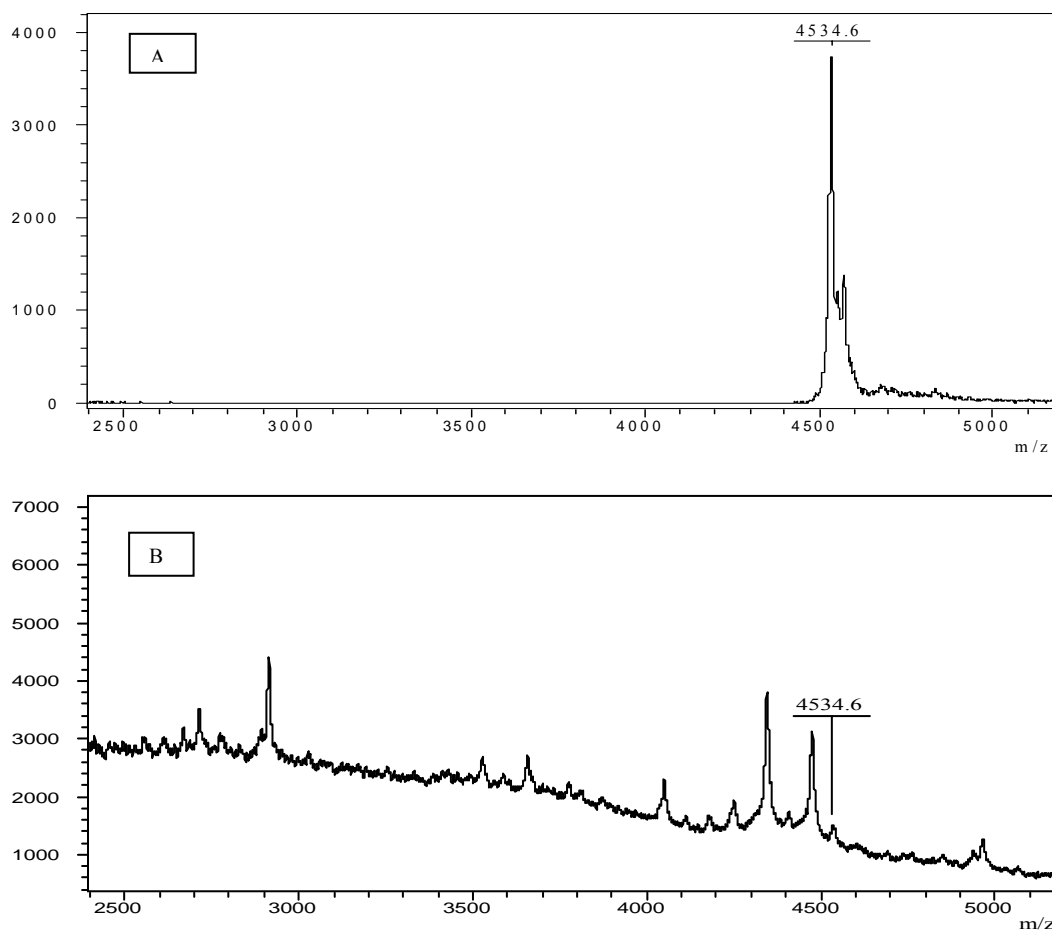


19. ábra

A citokin array kvantitatív analízise.
 Átlag±SEM. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs kontroll.
 #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs 60 min ischaemia csoport.

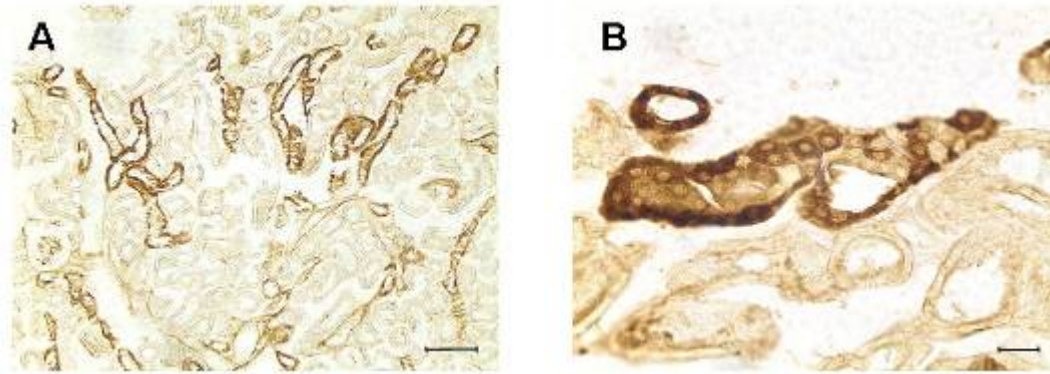
II/4. PACAP és PAC1 receptor jelenlétének vizsgálata patkány vesében

A PACAP jelenlétét az eltávolított patkány vesékben MALDI TOF tömegspektrometriával vizsgáltuk. A mérés során a vese homogenizátumokban a PACAP standardra jellemző csúcsot detektáltunk 4535Da-nál (20. ábra) (Börzsei et al., 2009).



20. ábra MALDI TOF tömegspektrometria (A) PACAP38 standard spektruma, (B) patkány vese homogenizátum.

Vizsgálataink során PAC1 receptor immunpozitivitást detektáltunk az általunk vizsgált vesemetszetekben (20. ábra). Erősebb jelölődést találtunk a vese kéregállományában, különösen a tubulusok kanyarulatos szakaszain. Kevésbé intenzív immunreaktivitást találtunk a velőállomány területén.



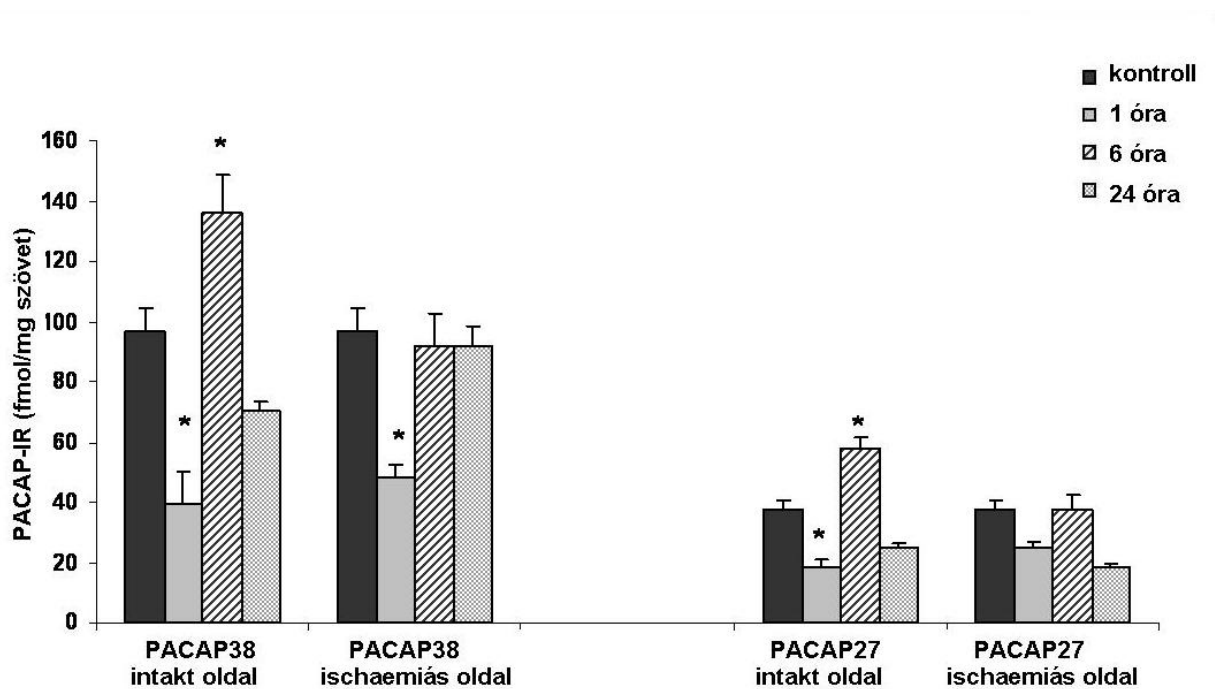
21. ábra Patkány vese szövettani képe PAC1 receptor immunfestéssel. **A.** Kis nagyítással: immunpozitív tubulusok a kéregállományban; **B.** Nagyobb nagyítással: immunpozitív sejtek egy proximális kanyarulat csatornában.
Aránymértékek: A. 100 μ m; B. 20 μ m.

II/5. A PACAP mennyiségének vizsgálata vese ischaemia/reperfúziót követően *in vivo*

Az állatok veséi a különböző időtartamú ischaemia/reperfúziót követően specifikus és szenzitív radioimmunassay (RIA) segítségével vizsgáltuk. A RIA mérések során mind a kéregállomány, mind pedig a velőállomány területén PACAP38- és PACAP27-szerű immunreaktivitás (IR) volt megfigyelhető (22. és 23. ábra). A PACAP27-IR szintje minden esetben alacsonyabb volt, mint a PACAP38-é. Mindkét peptid alacsonyabb mennyiségben volt detektálható a medulla területén.

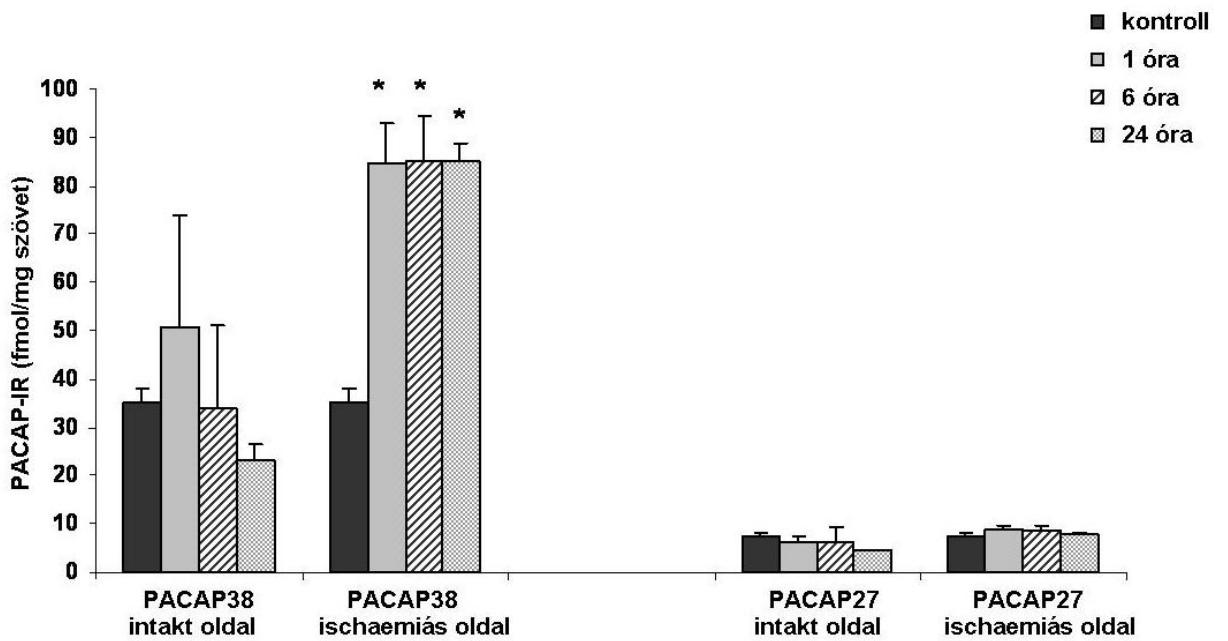
A cortexben 60 percnyi ischaemiát követő 1 óra reperfúzió után mindkét peptid esetén az immunreaktivitás szignifikáns csökkenését figyeltük meg. Majd 6 óra reperfúziót követően az intakt oldali vesében mind a PACAP38-IR, mind pedig a PACAP27-IR szignifikáns emelkedést mutatott. A 24 órás mintákban már nem találtunk további szignifikáns eltérést a kontroll mintákhoz képest. Az arteria renalis lekötés oldalán a PACAP38-IR akut csökkenése volt detektálható, viszont – az intact oldali eredményekkel ellentétben - 6 óra reperfúzió után a PACAP38-IR szintje nem emelkedett. 6, illetve 24 órányi reperfúzió után a PACAP38-IR szintje visszatért a kontrollra jellemző értékre. A PACAP27-IR szintje az ischaemiás oldalon nem mutatott szignifikáns változást a kontroll mintákhoz képest (22.

ábra).



22. ábra PACAP38- és PACAP27-szerű immunreaktivitás (IR) a vese kéregállományában 60 perces ischaemiát követő 1, 6, 24 óra reperfüzió esetén. Átlag±SEM. *P<0,05 vs kontroll csoport.

A velőállományban sem a PACAP27, sem a PACAP38 szintje nem mutatott szignifikáns eltérést az intakt oldalon. Ezzel szemben az ischaemiás oldalon, 1 óra reperfüziót követően a PACAP38-IR szintjének markáns emelkedését detektáltuk. Ez az emelkedett szint a következő 24 órában változatlanul kimutatható volt. A PACAP27-IR egyik kísérleti csoportban sem változott a medulla területén (23. ábra).



23. ábra

PACAP38- és PACAP27-szerű immunreaktivitás (IR) a vese velőállományában 60 perces ischaemiát követő 1, 6, 24 óra reperfüzió esetén. Átlag±SEM.*P<0,05 vs kontroll csoport.

MEGBESZÉLÉS

I. PACAP szerepének vizsgálata PACAP knockout egereken

I/1. Endogén PACAP szerepének vizsgálata oxidatív stressz és hypoxia indukálta vesesejtkárosodásban *in vitro*

Az oxidatív stressznek kitett vesesejtek vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy mind a vad, mind pedig a PACAP knockout egerekből származó sejtek esetén az alkalmazott kezelés szignifikánsan csökkentette a károsító hatásnak kitett sejtek túlélését. Viszont a két csoport között szignifikáns különbség mutatkozott, mégpedig a PACAP KO egerekből származó sejtenyészet szignifikánsan érzékenyebben reagált a H₂O₂-indukálta oxidatív stresszre (5.A és 5.B ábra). Az oxidatív stressz alkalmazása esetén megfigyelt fokozott érzékenység mellett megfigyelhető a kontroll (nem kezelt) csoportok közötti szignifikáns különbség is. Ez a differencia statisztikailag kevésbé markáns, amennyiben a 'p' számszerű értékét figyelembe vesszük. Tehát a PACAP KO egerek veséiből származó sejtek már eleve sérülékenyebbek, rosszabb a túlélésük, amit tovább súlyosbít a H₂O₂-indukálta oxidatív stressz. A kísérlet második felében azt vizsgáltuk, hogy ezen fokozott érzékenység hátterében valóban az endogén PACAP hiánya áll-e. Ezért a H₂O₂-kezelésnek kitett sejtekhez exogén PACAP-ot adagoltunk és megnéztük, hogy a PACAP-pal történő koinkubáció képes-e enyhíteni a H₂O₂ károsító hatását. Vizsgálataink során azt az eredményt kaptuk, hogy az exogén PACAP1-38 szignifikáns mértékben csökkenti a toxikus hatást (6.A és 6.B ábra).

A PACAP KO vesesejtek fent említett fokozott szenzitivitása nem korlátozódik a H₂O₂-kezelés okozta toxicitásra. Hasonlóan a H₂O₂-kezeléshez, CoCl₂-indukálta *in vitro* hypoxia esetén is megfigyelhető a szignifikáns mértékű differencia a vad, illetve a PACAP KO egerekből származó vesesejtek túlélésének vizsgálatakor (7.A és 7.B ábra).

Az exogén adott PACAP citoprotektív hatásait kezdetben neuronális sejtenyészetekben vizsgálták, majd igazolták ezen védő hatást *in vivo* kísérletekben is (Brenneman, 2007; Somogyvári-Vigh és Reglödi, 2004; Vaudry et al., 2009). A PACAP

sejttúlélést elősegítő hatása nem korlátozódik az idegrendszerre, hanem védő szerepe igazolódott nem-neuronális sejtek *in vitro* körülmények között történő vizsgálatokor is (Arimura et al., 2006a, 2006b; Delgado és Ganea, 2000; Li et al., 2007, 2008; Rácz et al., 2007b,c, 2008; Somogyvári-Vígh és Reglödi, 2004). A PACAP védő hatása nemcsak *in vitro*, hanem *in vivo* modellekben is detektálható (Ferencz et al., 2009; Li et al., 2007, Szakály et al., 2008). Jelen megfigyeléseink összhangban vannak a PACAP knockout egerekkel végzett kísérleteket leíró, korábbi tanulmányokkal, miszerint változatos morfológiai és funkcionális eltérések mutathatók ki a PACAP KO egerekben. Így például korábbi vizsgálatok során kimutatták, hogy a PACAP knockout egerek érzékenyebben reagálnak az agy ischaemiás károsodásra, illetve axotomia esetén, ezzel azt a feltevést valószínűsítve, hogy az endogén PACAP fontos szerepet tölt be a fiziológiás védekező mechanizmusokban és a regenerációs folyamatokban (Armstrong et al., 2008; Chen et al., 2006; Ohtaki et al., 2008). Emellett PACAP KO egerekből származó kisagyi szemcsesejtek esetén – eredményeinkhez hasonlóan – szintén megfigyelhető az oxidatív stresszel szembeni fokozott érzékenység (Vaudry et al., 2005). Mindezek azon feltételezést támasztják alá, mely szerint a PACAP a sejteket ért károsodásra válaszolva elősegíti a sejtek túlélését. Vizsgálataink eredményeként elsőként mutattuk ki vesében az endogén PACAP jelentőségét. Az általunk alkalmazott *in vitro* oxidatív stressz modell a vesebetegségek patomechanizmusa szempontjából is fontos, mivel különböző vesebetegségek esetében mint kóroki tényező vagy a betegséget súlyosbító faktor szerepelhet.

I/2. PACAP knockout egerek veséjének szövettani vizsgálata

A vad és PACAP knockout egerekből származó vesék szövettani analízise során nem találtunk különbséget a vese morfológiájában (8. ábra). Ezek az eredményeink azt mutatják, hogy az endogén PACAP hiánya nem eredményez morfológiai eltéréseket. Korábbi tanulmányokban leírták, hogy bizonyos szervekben az endogén PACAP hiánya megváltozott fejlődéshez vezet. PACAP KO egerekben a cerebellum fejlődésének zavara miatt a kisagykéreg stratum moleculare rétege elvékonyodott a vad egerek kisagyához képest (Allais et al., 2007). A mi adatainkkal megegyezően, az endogén PACAP hiánya

nem befolyásolja a monoaminerg neuronális fejlődést. Ennek hátterében két lehetséges mechanizmus szerepét feltételezik: vagy bizonyos kompenzatorikus mechanizmusok veszik át az endogén PACAP szerepét, vagy az intrauterin fejlődés során anyai eredetű PACAP pótolja a PACAP knockout egerekből hiányzó peptidet (Ogawa et al., 2005).

A 45, illetve 60 perces ischaemiának kitett vesék esetében szignifikáns különbséget figyeltünk meg a vad, illetve PACAP knockout egerek között (10. és 11. ábra). Az operált állatoknak csak egyik oldali veséjét zártuk ki a keringésből, így a másik oldali vese kontrollként szolgált. A kontroll szövetminták esetén jelentős eltérést találtunk a vad, ill. KO egerekből származó minták között a lymphocytá és macrophag infiltratio mértékében, a PAS+ glycocalyx vastagságában, valamint a Bowman-tok tágulatában (9. ábra). Emellett ischaemia/reperfúzió esetén a KO egerek szövettanilag detektálhatóan súlyosabb károsodást szenvedtek (10., 11. és 12. ábra). Ezen eredményeink összhangban vannak primer vesesejttenyészetben végzett vizsgálatainkkal. Kimutattuk, hogy a PACAP KO egerekből származó vesesejtek szignifikánsan érzékenyebben reagálnak oxidatív stresszre és *in vitro* hypoxiára.

Eredményeinkhez hasonlóan, a vastagbélben sem figyelhetők meg látványos morfológiai változások, illetve gyulladásos jelek intakt bél esetén. Azonban dextranszulfát-indukálta colitis esetén az endogén PACAP-pal nem rendelkező KO egyedek szignifikánsan súlyosabb tüneteket mutatnak, valamint szövettanilag értékelhetően súlyosabb morfológiai eltérések jelentkeznek (Nemetz et al., 2008; Azuma et al., 2008). Hasonló eredményt kapott munkacsoportunk vékonybél ischaemia vizsgálata esetén (Ferencz et al., 2010).

Szövettani vizsgálataink azt mutatják, hogy a PACAP hiánya ellenére a vese fejlődése nem szenved szövettanilag értékelhető zavart. Azonban nem zárhatjuk ki teljes bizonyossággal azt, hogy a peptid hiánya esetleg ultrastrukturális eltéréseket okoz, vagy sejtmargerekben mutat eltérést illetve hosszú távon befolyásolja a veseműködést.

I/3. A PACAP jelenlétének vizsgálata egér vesében

Annak ellenére, hogy a PACAP előfordulását számos szervben leírták, vesében vizsgálatainkat meglezően jelenlétét nem igazolták. Kísérleteink során egér vesében MALDI TOF tömegspektrometriával kimutattuk a PACAP38 jelenlétét (13.ábra).

II. PACAP vizsgálata patkány vesében

II/1. Exogén PACAP hatása a sejt túlélésre *in vitro*

A hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid sejt túlélést elősegítő hatása neuronális és nem-neuronális szövetekben is kimutatható. Protektív hatása igazolható a vesében is. Korábbi vizsgálatokban igazolódott, hogy a PACAP gátolja a myeloma multiplex esetén fellépő proinflammatorikus citokin expressziót a vesében *in vitro* (Li et al., 2008). Emellett ischaemia/reperfúzió okozta károsodás esetén csökkenti a károsító hatás okozta morfológiai eltéréseket, illetve a vizsgált állatok mortalitását (Szakály et al., 2008). Kísérleteink során annak vizsgálatát tűztük ki célul, hogy a PACAP *in vitro* körülmények között képes-e befolyásolni az oxidatív stressznek kitett vesesejtek túlélését, és ha igen, akkor melyik az a legkisebb koncentráció, amely még szignifikánsan módosítja a sejtek életképességét. Vizsgálataink eredményeként azt tapasztaltuk, hogy a PACAP *in vitro* körülmények között viszonylag széles koncentráció-tartományban (10pM→100nM) képes csökkenteni a H₂O₂ által kiváltott oxidatív stressz sejt túlélést csökkentő hatását (14., 15. és 16. ábra).

A PACAP vesesejtekben kifejtett protektív hatásában szerepet játszó mechanizmusok még nem tisztázottak. Azonban, valószínűsíthetően a protektív mechanizmus nem direkt gyökfogó hatáson alapszik, mivel korábbi vizsgálatok szerint a PACAP szabad gyök képződésre kifejtett hatása enyhe és csak nagyobb (μM) koncentráció esetén detektálható (Reglódi et al., 2004). Feltehetőleg – hasonlóan az egyéb, korábban vizsgált sejt típusokhoz – a protektív hatásért a PACAP apoptotikus jelátviteli útvonalak egyes komponenseire kifejtett hatása lehet a felelős.

II/2. PACAP hatása a Bcl-2 szintre vese ischaemia/reperfúziót követően

A vese keringésből történő kirekesztésével modellezett ischaemia/reperfúziós károsodás után az eltávolított veseminták Western blot vizsgálata azt mutatta, hogy a preoperatíven adott intravénás PACAP-kezelés képes volt enyhíteni az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje szintjének csökkenését, amennyiben azt a károsodás szignifikáns mértékben csökkentette (17.A és 17.B ábra).

Az apoptotikus sejthalál kiemelkedő szerepet játszik a vese ischaemia/reperfúzió-indukálta károsodása esetén (Saikumar és Venkatachalam, 2003). A renalis ischaemia esetén már 5-10 perccel a reperfúzió után aktiválódnak a p38 MAPK és JNK útvonalak (Yin et al., 1997). Vizsgálatainkban is megfigyelhettük, hogy a Bcl-2 szintje már 10 perc reperfúziót követően szignifikáns mértékű csökkenést mutatott mindkét vizsgált időtartamú ischaemia esetén, illetve 60 percnyi ischaemia esetén még korábban, már a reperfúziós károsodás nélkül is lecsökkent az antiapoptotikus fehérje mennyisége. A PACAP-kezelés esetén tapasztalt Bcl-2 expresszió növekedés hozzájárul a mitokondriális integritás fenntartásához. Azok az ágensek, amelyek fokozzák a Bcl-2 expresszióját védő hatást fejtenek ki vesekárosodás esetén, mint pl. minociklin (Wang et al., 2004), ulinastatin (Chen et al., 2004). A veséhez hasonlóan a PACAP egyéb sejttípusok esetén is emeli a Bcl-2 fehérje mennyiségét, amely sejtekben szintén citoprotektív hatású. Többek között, fokozza a Bcl-2 expressziót különböző károsító hatásoknak kitett kisagyú szemcsesejtekben és cardiomyocytákban (Aubert et al., 2006; Falluel-Morel et al., 2004; Gasz et al., 2006). Az általunk tapasztalt PACAP-indukálta Bcl-2 expressziófokozás szintén hozzájárul a PACAP renoprotektív hatásához.

II/3. *In vivo* ischaemia/reperfúziót követő citokin array

A PACAP nemcsak az apoptotikus jelátviteli útvonalak befolyásolja, hanem antiinflammatorikus hatással is rendelkezik. Az antiinflammatorikus hatás hátterében a citokin/kemokin termelést csökkentő hatása is feltételezhető (Abad et al., 2006; Delgado és Ganea, 2001; Ganea és Delgado, 2002; Gomariz et al., 2006). A citokinek és kemokinek

fontos szerepet játszanak a vese ischaemia/reperfúziós károsodás patogenezisében (Basile et al., 1998; Jain et al., 2000; Vannay et al., 2009).

A PACAP proinflammatorikus citokinekre kifejtett gátló hatása jelentős szerepet játszik különféle gyulladásoz állapotokban megfigyelt protektív hatásában. Gátolja a proinflammatorikus citokinek termelődését rheumatoid arthritis és Crohn-betegség állatkísérletes modelljeiben (Abad et al., 2006; Gomariz et al., 2006).

A PACAP csökkenti a TNF- α és TGF- β expresszióját diabeteses nephropathiában és gentamicin-indukálta vesekárosodásban (Arimura et al. 2006b; Li et al., 2008).

Jelen vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a vese ischaemia/reperfúziós károsodása esetén 24 óra reperfúzió után emelkedik a fractalkine, soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1, CD54), L-selectin, RANTES, CNTF, MIP-3 alpha és TIMP-1 expressziója (18. és 19. ábra). A szöveti metalloproteináz inhibitorok (TIMP-ek) különféle folyamatok szabályozásában vesznek részt. Többek között, részt vesznek az extracelluláris mátrix remodellálásában a mátrix metalloproteinázok gátlásán keresztül hatva. Jelenleg 4 típusa ismert: TIMP1-4 (Melendez-Zajgla et al., 2008). A TIMP család tagjainak fokozott expresszióját írták le a vesében különféle etiológiájú károsodásban, illetve eltérő kísérleti körülmények között. Emelkedett TIMP1 expresszió figyelhető meg a nephrotoxicus ciklosporin-kezelés alatt (Jin et al., 2008), valamint – eredményeinkhez hasonlóan - ischaemia/reperfúzió esetén (Basile et al., 1998; Jain et al., 2000). A RANTES expressziójának növekedése szintén jellemző változás renalis ischaemiában (Fischereder, 2007; Jones és Shoskes, 2000). A PACAP-hoz hasonlóan egyéb, szintén renoprotektív hatást mutató ágensek csökkentik a RANTES expresszióját (Jones és Shoskes, 2000). Az L-selectin, egy leukocytá adhéziós molekula, szintén emelkedett expressziót mutat ischaemia/reperfúzió után, amely emelkedés szintén csökkenthető preoperatíván adott PACAP-pal. Ez szintén összhangban van azon megfigyelésekkel, melyek szerint protektív mechanizmusokban az L-selectin expressziója csökken (Turunen et al., 2005). Hasonló változásokat tapasztaltunk a CNTF nevű neurotrophicus factor kapcsán is. Azonban a CNTF általában nem proinflammatorikus hatású, hanem védő szereppel bír. A PACAP azon hatása, hogy ezen általában protektívként viselkedő ágens ellen hat még nem tisztázott. Nem feltétlenül a protektív hatást gátolja, hanem emellett feltételezhető, hogy az ischaemia/reperfúzió okozta változások ellen irányul a hatása. A fractalkine és a thymus

kemokin ischaemia-indukálta expresszió fokozódása szintén jellemző renalis ischaemiában, illetve expressziójuk csökkenése szintén a renoprotektív hatás részét képezi (Hasegawa et al., 2003; Oh et al., 2008).

A többi, általunk vizsgált citokin esetében nem találtunk eltéréseket PACAP hatására. Ez azonban nem zárja ki azt a lehetőséget, hogy esetleg más citokinek is szerepet játszanak a PACAP renoprotektív hatásában.

II/4. PACAP és PAC1 receptor jelenlétének vizsgálata patkány vesében

Tekintettel arra, hogy kísérleteink jelentős részét patkányokon végezzük, indokoltnak láttuk a PACAP egér vesén belüli kimutatása után jelenlétét patkány vesében is kísérletesen igazolni. Kísérleteink során patkány vesében MALDI TOF tömegspektrometriával kimutattuk a PACAP38 jelenlétét (20. ábra).

A PACAP specifikus receptora, a PAC1 receptor elleni antitesttel végzett immunfestéssel vizsgáltuk a receptor patkány vesén belüli eloszlását (21. ábra). Korábbi tanulmányok felvetették annak lehetőségét, hogy a vesében nem is található PACAP receptor (Shivers et al., 1991). Viszont későbbi vizsgálatok bizonyították a PACAP mindhárom receptorának (PAC1, VPAC1, VPAC2 receptor) jelenlétét (Harmar et al., 2004; Lam et al., 1990; Peeters et al., 1999; Reubi 2000; Sreedharan et al., 1995; Wei és Mojsov, 1996). Viszont a receptor vesén belüli eloszlása még nem volt ismert. Vizsgálataink során intenzívebb jelölődést találtunk a vesetubulusokban (21.A és 21.B ábra), a velőállományban enyhébb fokú immunpozitivitás volt megfigyelhető. A PACAP számos, egyéb élettani hatása mellett protektív hatást fejt ki különböző etiológiájú vesekárosodások esetén. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során igazolódott, hogy ischaemia/reperfúzió esetén alkalmazott PACAP-kezelés csökkenti a mortalitást, illetve a tubularis atrophia mértékét. A tubulusok területén megfigyelhető intenzívebb jelölődés azt mutatja, hogy a receptorok főként a tubularis epithelialis sejteken találhatóak, ami a PACAP tubuloprotektív hatásának morfológiai alapját képezheti.

II/5. A PACAP mennyiségének vizsgálata vese ischaemia/reperfúziót követően *in vivo*

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a vesében detektálható PACAP38-és PACAP27-szerű immunreaktivitás érzékenyen reagál az ischaemia/reperfúziós károsodásra: szignifikáns mértékű változásokat detektáltunk az ischaemiát követő 24 órán belül (22. és 23. ábra).

A reperfúzió után 1 órával, a kéregállományban (22. ábra) megjelenő akut csökkenés mindkét forma esetében az ischaemiás fázis alatti lecsökkent véráramlással magyarázható. Ugyanakkor az intakt oldali vesében is megfigyelhető mindkét peptid mennyiségének csökkenése, aminek oka még nem tisztázott. A nem-operált oldalon 6 órával a reperfúziót követően a PACAP szintje szignifikánsan magasabb, mint a kontroll vesékben, míg az operált oldalon addigra visszatér az eredeti, kontrollra jellemző értékre.

A velőállományban (23. ábra) a PACAP38-szerű immunreaktivitás mindegyik vizsgált időpontban szignifikánsan emelkedett az ischaemiás oldalon, míg az intakt oldalon csak egy akut emelkedés észlelhető.

Bár ezen változások pontos mechanizmusa, illetve funkcionális jelentősége nem tisztázott, az emelkedett endogén PACAP szint valószínűleg a PACAP renoprotektív hatásának tudható. A PACAP upregulációja figyelhető meg különböző, főleg az idegrendszeret érintő károsodások esetén (Somogyvári-Vígh és Reglődi, 2004; Zhou et al., 1999). Jelen adataink arra utalnak, hogy a PACAP upreguláció a renoprotekció egyik fontos eleme. A velőállományban megfigyelt kifejezettebb és hosszabb időtartamú emelkedés magyarázhatja a velőállomány nagyobb fokú rezisztenciáját az ischaemiás károsodásokkal szemben.

IV. A PACAP HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA TOBOZMIRIGYBEN

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálatainkhoz napos csibék tobozmirigyeiből nyert primer sejttenyészetet használtunk.

1. PACAP hatásának vizsgálata a sejtülésre H₂O₂-indukálta oxidatív stressz esetén

A sejteket kollagenázos emésztést követően 5-5 csoportra osztottuk:

- 1., kontroll csoport kezelés nélkül;
- 2., 100 nM PACAP1-38-cal;
- 3., 1 mM H₂O₂-dal;
- 4., 1mM H₂O₂-dal, illetve PACAP1-38-cal szimultán kezelt sejtek;
- 5., 500 nM PACAP receptor antagonistá, PACAP6-38-cal , 1mM H₂O₂-dal, illetve PACAP1-38-cal együttesen kezelt sejtek.

A sejteket a fent említett anyagokkal 1 órán át kezeltük, a kezeléseket 9 és 21 órakor történtek.

Apoptózis és nekrosis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel

Az eljárás a sejthalál típusainak elkülönítésére alkalmas. Az apoptózis korai szakaszában változások figyelhetők meg a plazmamembránban. Az apoptotikus sejtek membránjában a foszfolipid-foszfátidilszerin a belső felszínről a külső felszínre transzlokálódik. Az annexinV igen nagy affinitást mutat a foszfolipid-foszfátidilszerinhez. A fluoreszcens festéssel (FITC) jelzett annexinV alkalmas az apoptotikus sejtek áramlási citometriás kimutatására. Az annexinV-t propidium jodid festéssel együtt alkalmaztuk és így az annexinV pozitív apoptotikus sejtek elkülöníthetővé váltak a propidium jodid pozitív nekrotikus sejtektől (Vermees et al., 2000). A mintákat BD FACS Calibur flow citométerrel vizsgáltuk, az analízishez Cellquest software-t használtunk. Kvadráns dot plot segítségével meghatározható az élő, a nekrotikus (propidium jodid pozitív) a korai apoptotikus (annexinV pozitív), valamint a késői apoptotikus (annexinV és propidium jodid pozitív) sejtek százalékos aránya.

2. PACAP hatásának vizsgálata a jelátviteli útvonalakra

Primer pinealocyta sejttenyészetben vizsgáltuk a p38 MAPK és a 14-3-3 fehérje napszaki változásait, illetve a PACAP hatásait ezen mechanizmusokra.

A sejteket 24 órán keresztül vizsgáltuk, 4 óránként történtek a kezelések (8, 12, 16, 20, 0, 4 órákor). Minden időpontnak megfelelő csoportban 4 alcsoportot alakítottunk ki, amelyeket 1 órán keresztül a következőképp kezeltünk:

- 1., kontroll csoport kezelés nélkül;
- 2., 1 nM PACAP1-38-cal;
- 3., 10 nM PACAP1-38-cal;
- 4., 100 nM PACAP1-38-cal kezelt sejtek.

A jelátviteli utak komponenseinek vizsgálata áramlási citometriás módszerrel

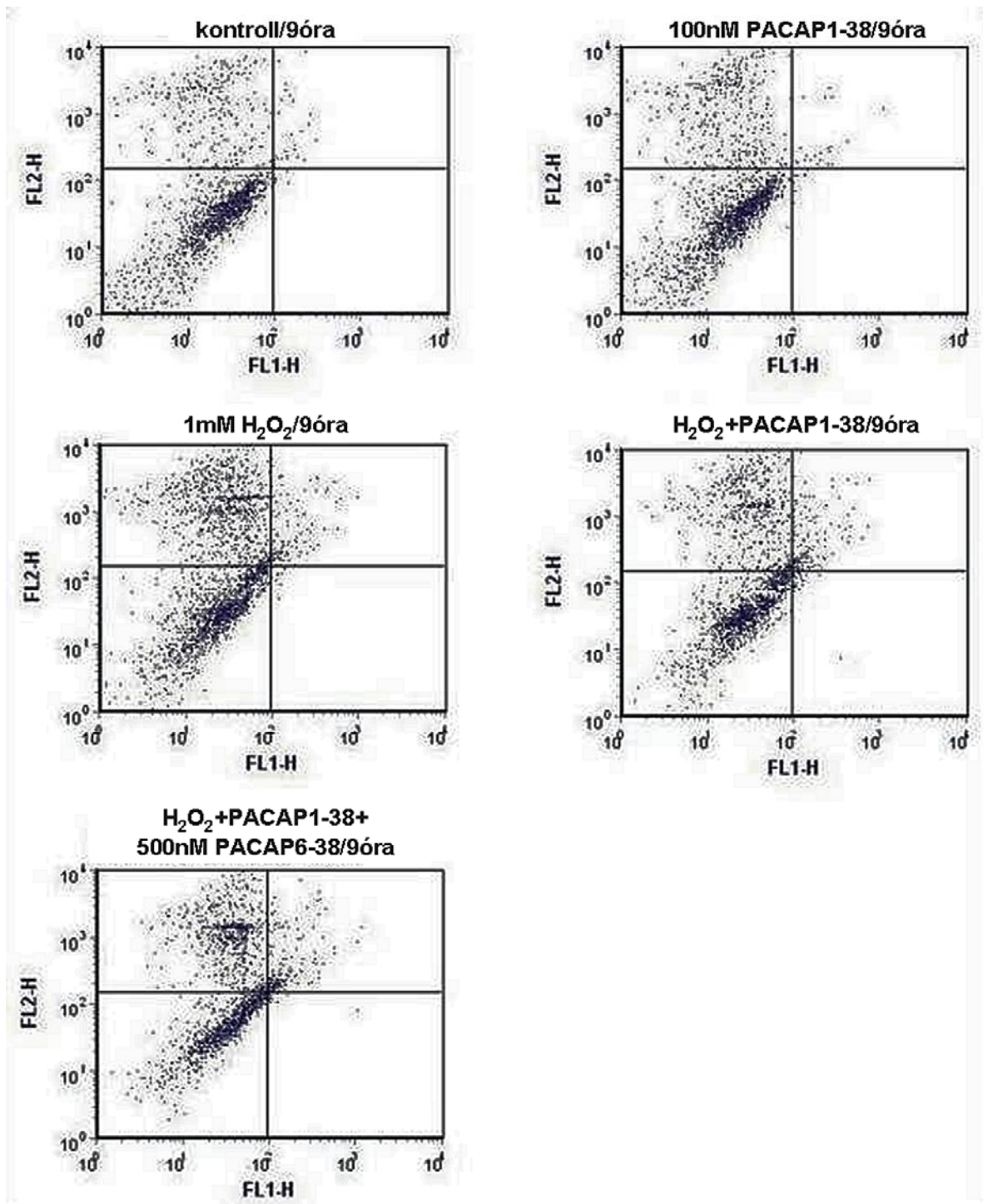
A kezeléseket követően, a sejteket primér antitesttel, anti-foszfo-p38 MAPK (1:100) és anti-14-3-3 fehérje (1:50), majd FITC konjugált szekunder anti-nyúl IgG antitesttel (1:50) jelölt sejteket BD FACS Calibur áramlási citométerrel mértük. Az adatok analízisét Cellquest software-rel végeztük. A statisztikai analízishez ANOVA tesztet használtunk, amit Neuman-Keul *post hoc* analízis követett.

EREDMÉNYEK

1. PACAP hatásának vizsgálata a sejt túlélésre H₂O₂-indukálta oxidatív stressz esetén

Apoptózis és nekrozis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel

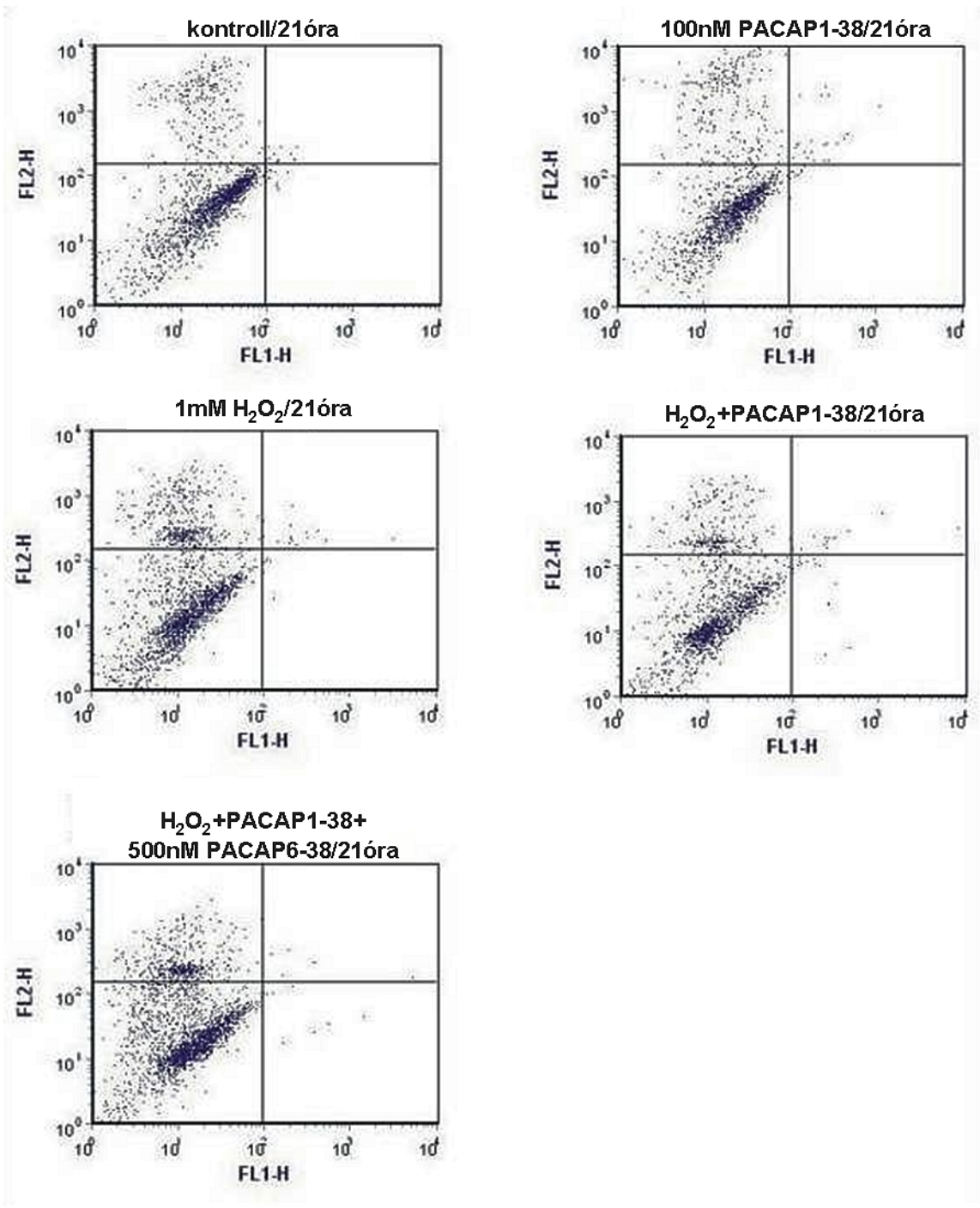
A flow citométerrel kapott eredményeink azt mutatják, hogy a H₂O₂-kezelt csoportban az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent mind 9 (24. és 26. ábra), mind pedig 21 órákor (25. és 27. ábra) alkalmazott kezelés esetén. A PACAP1-38-kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz képest egyik időpontban sem. Reggel 9 órákor az oxidatív stressznek kitett sejtekhez adott PACAP nem befolyásolta az élő sejtek számát. Viszont a H₂O₂-kezeléssel egyidőben történt PACAP szignifikánsan emelte az élő sejtek arányát, amennyiben a kezelés 21 órákor történt. A PACAP ekkor tapasztalt védő hatását az antagonistá PACAP6-38 képes volt megakadályozni.



24. ábra

PACAP hatása az oxidatív stressznek kitett pinealocyták túlélésére **9 órakor** alkalmazott kezelések esetén.

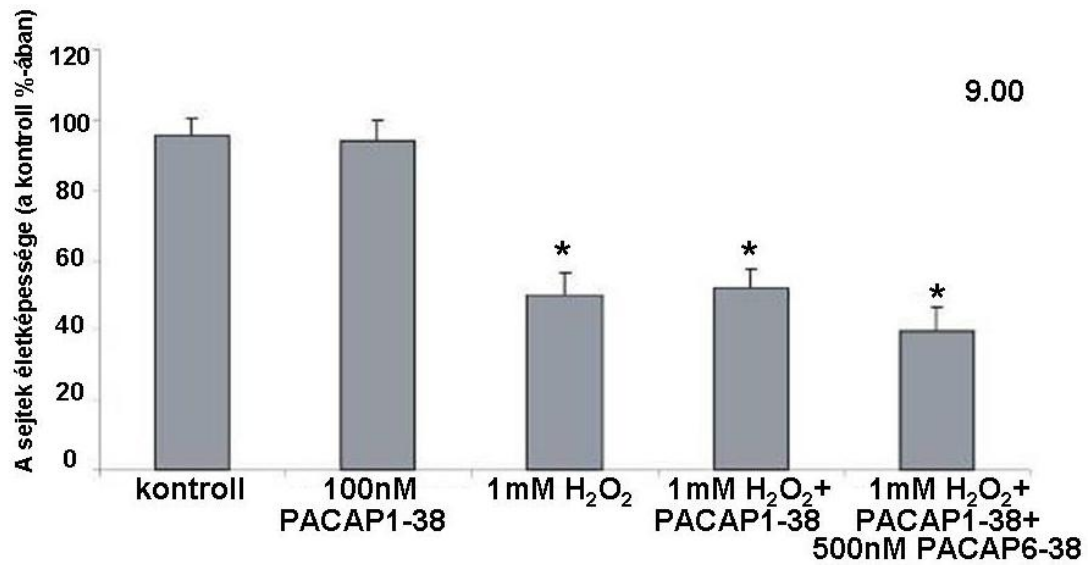
Flow citometriai analízis az élő, nekrotikus, korai és késői apoptotikus pinealocyták elkülönítésére. Bal alsó kvadráns: egészséges sejtek; jobb alsó kvadráns: korai apoptotikus sejtek; jobb felső kvadráns: késői apoptotikus sejtek; bal felső kvadráns: nekrotikus sejtek.



25. ábra

PACAP hatása az oxidatív stressznek kitett pinealocyták túlélésére 21 órakor alkalmazott kezelések esetén.

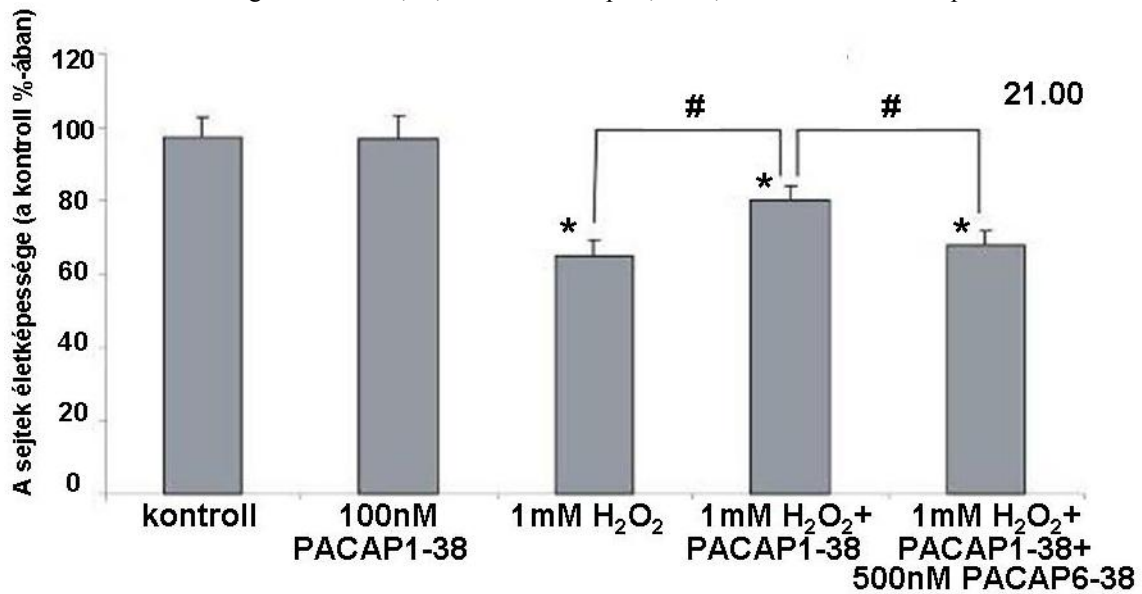
Flow citometriai analízis az élő, nekrotikus, korai és késői apoptotikus pinealocyták elkülönítésére. Bal alsó kvadráns: egészséges sejtek; jobb alsó kvadráns: korai apoptotikus sejtek; jobb felső kvadráns: késői apoptotikus sejtek; bal felső kvadráns: nekrotikus sejtek.



26. ábra

A pinealocyták túlélésének flow citométerrel kapott eredményeinek számszerű ábrázolása 9 órákor alkalmazott kezelés esetén.

Átlag±SEM. *P<0,05; vs kontroll csoport, #P<0,05 vs H₂O₂ kezelt csoport.



27. ábra

A pinealocyták túlélésének flow citométerrel kapott eredményeinek számszerű ábrázolása 21 órákor alkalmazott kezelés esetén.

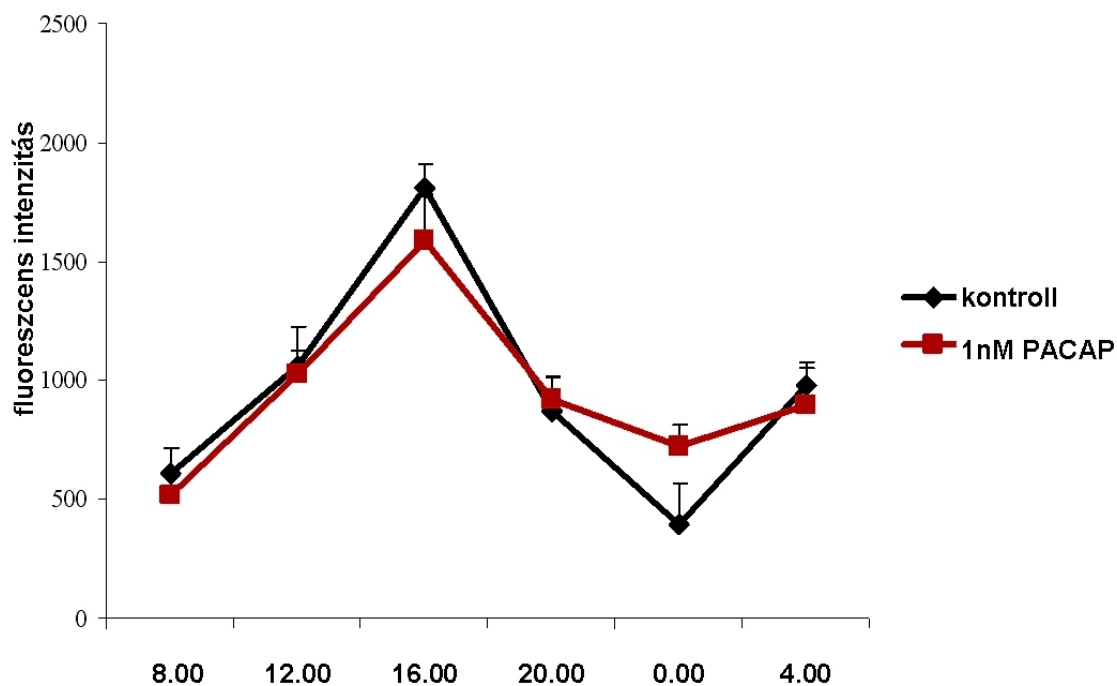
Átlag±SEM. *P<0,05; vs kontroll csoport, #P<0,05 vs H₂O₂ kezelt csoport.

2. PACAP hatásának vizsgálata a jelátviteli útvonalakra

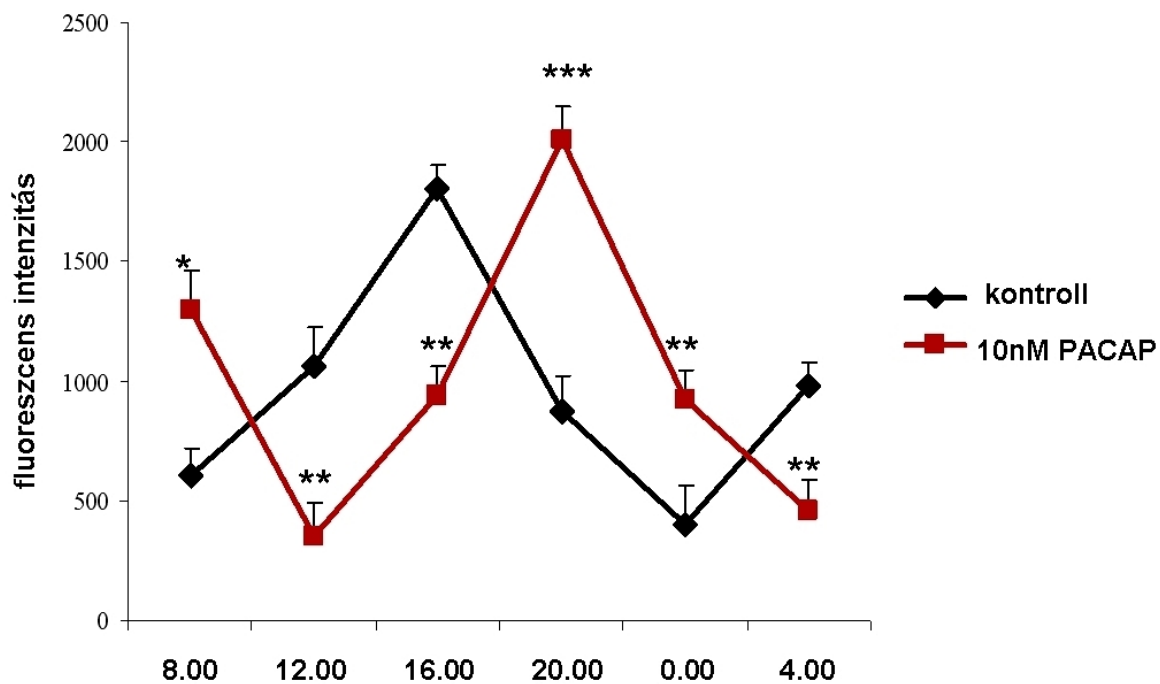
Primer pinealocyta sejtenyészetben vizsgáltuk a p38 MAPK és a 14-3-3 fehérje circadian változásait, illetve a PACAP hatásait ezen mechanizmusokra.

A kontroll csoportban a p38MAPK foszforilációjában a vizsgált 24 órában szignifikáns változásokat detektáltunk (28., 29. és 30. ábra). A foszfo-p38 MAPK-t legnagyobb intenzitásban a 16 órás mintákban mértünk. A foszforiláció mértéke folyamatosan emelkedett 8 órától 16 óráig, majd folyamatosan csökkent éjfélig.

1 nM koncentrációjú PACAP-pal történő kezelés nem befolyásolta a p38 MAPK napszaki változásait (28. ábra), míg 10 nM PACAP minden vizsgált időpontban szignifikáns eltérést eredményezett (29. ábra). 10 nM PACAP hatására emelkedett a foszfo-p38 MAPK szintje 8 és 20 órákor, valamint éjfélnél, illetve csökkent délben, 16 és 4 órákor. A legmagasabb szintek 16 és 20 órákor detektáltuk. A foszforilációs szint változásai hasonlóak voltak a kontroll csoportban megfigyeltékhez, viszont ahhoz képest az alkalmazott PACAP-kezelés a napszaki mintázatot 4 órával eltolta.

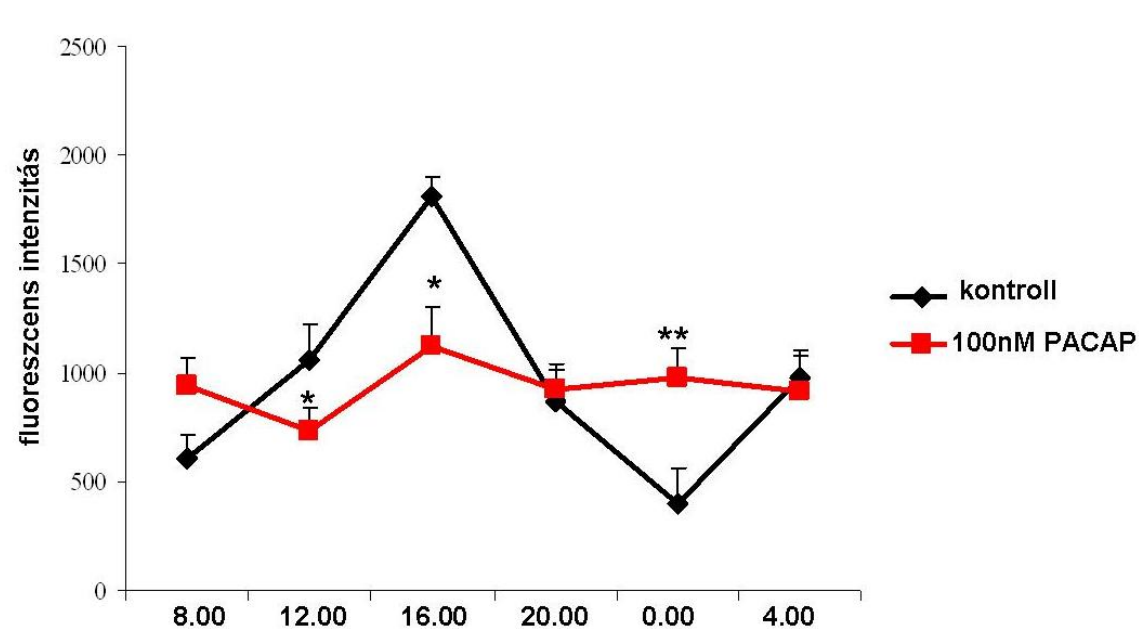


28. ábra 1nM PACAP hatása a p38 MAPK foszforilációjára. Átlag±S.E.M.



29. ábra

10nM PACAP hatása a p38 MAPK foszforilációjára.
 Átlag±S.E.M. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 vs kontroll csoport



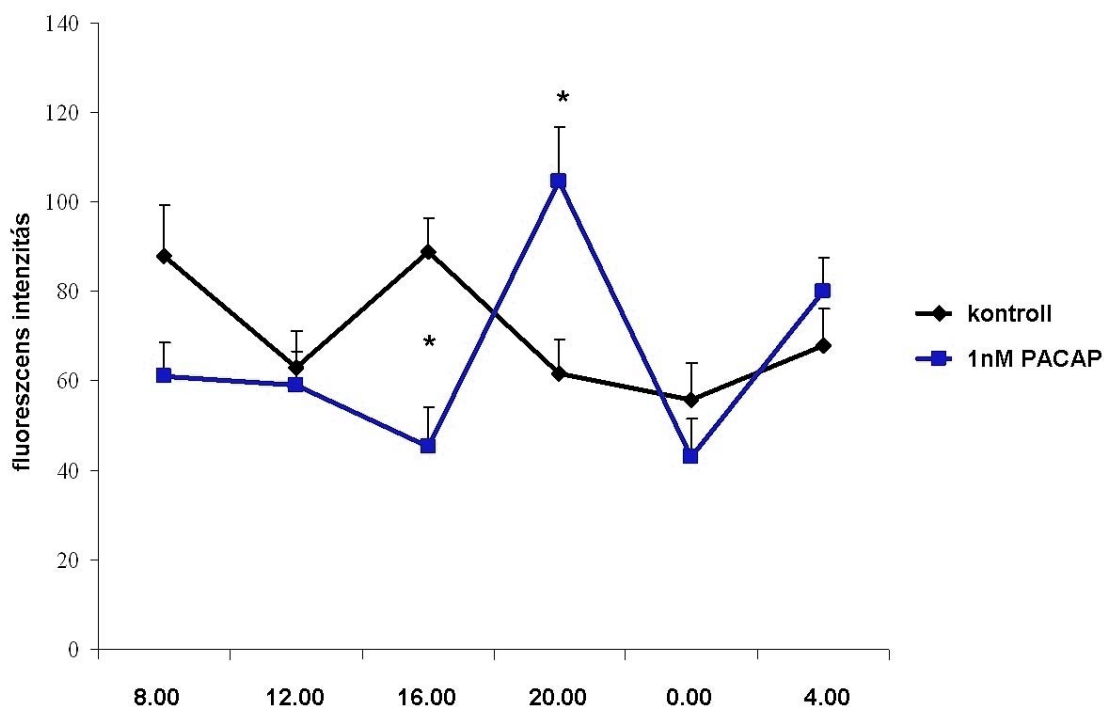
30. ábra

100nM PACAP hatása a p38 MAPK foszforilációjára.
 Átlag±S.E.M. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 vs kontroll csoport

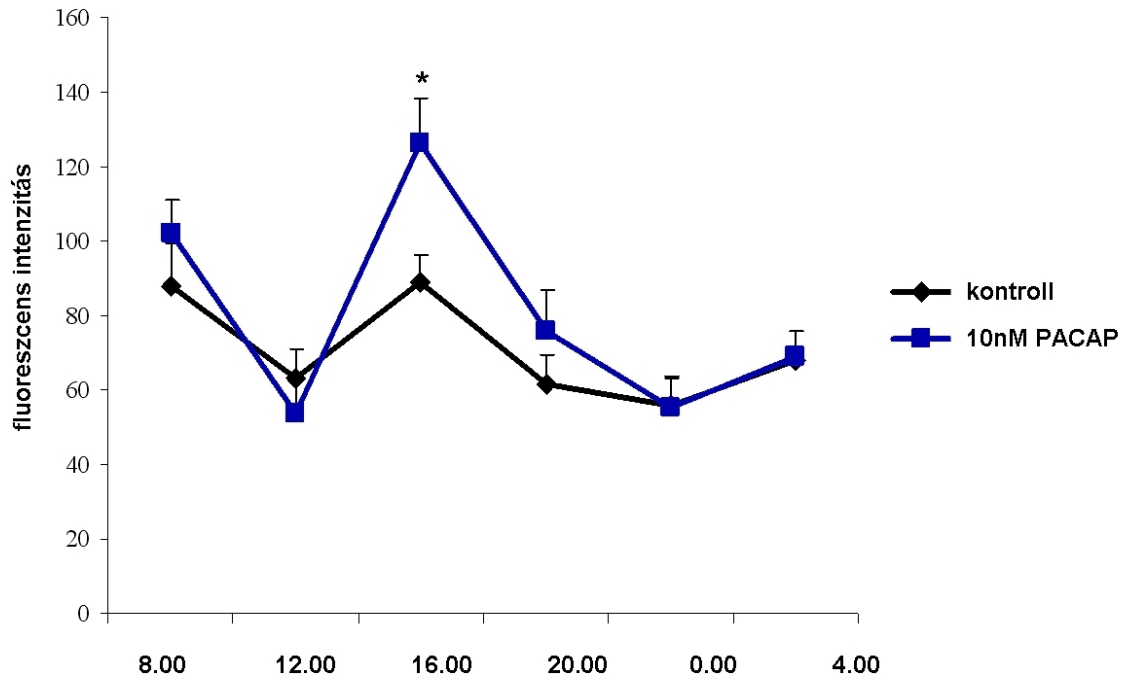
100 nM koncentrációjú PACAP alkalmazása esetén a p38 MAPK foszforilációjában nem találtunk szignifikáns eltéréseket a vizsgált időpontok között a kontroll mintákban megfigyelt változásokkal ellentétben (30. ábra). A kontroll értékekhez képest szignifikáns különbséget találtunk a p38 MAPK szintjében éjfélkor 12 és 16 órakor, a p38 MAPK foszforilációjában megfigyelhető circadian változások megszűntek.

A 14-3-3 szintjét vizsgálva nem találtunk szignifikáns eltérést az egyes időpontokban mért értékek között (31. ábra). 1 nM PACAP-pal történt inkubáció esetében 16 és 20 órakor szignifikáns eltéréseket találtunk a protein expressziójában.

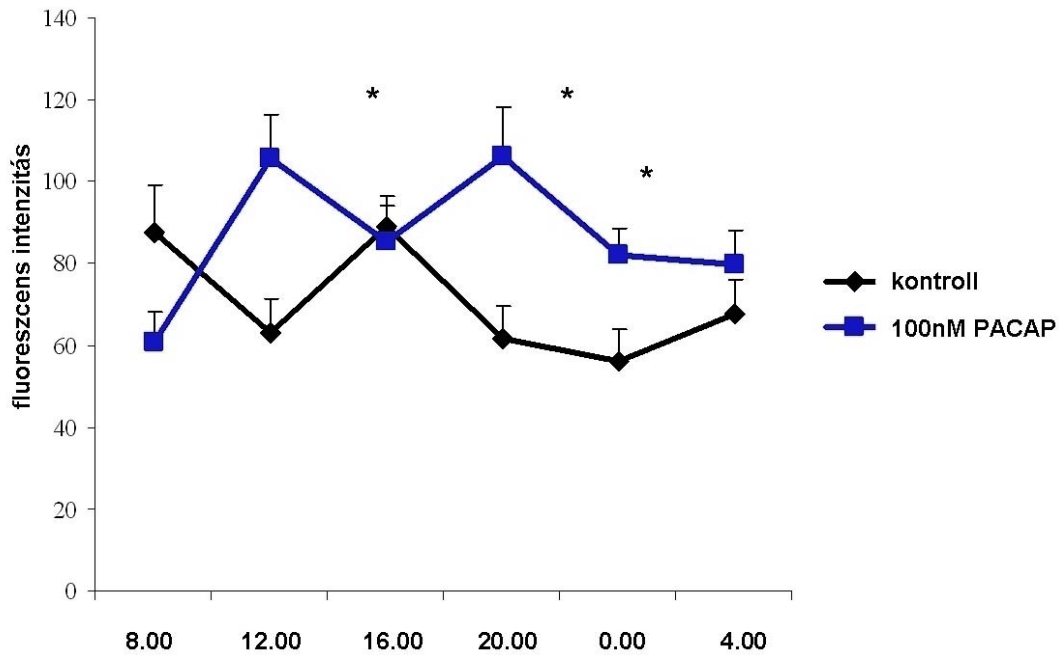
Ehhez hasonlóan, 10 nM koncentrációjú PACAP nem befolyásolta a 14-3-3 mennyiségét a vizsgált időtartam nagy részében, csupán 16 órakor emelte szignifikánsan a protein szintjét. (32. ábra). Az általunk alkalmazott legmagasabb koncentráció fokozta a 14-3-3 expresszióját délben, éjfélkor és 20 órakor (33. ábra). A többi időpontban nem találtunk jelentős különbséget a kontroll és a PACAP-kezelt csoportok között.



31. ábra 1nM PACAP hatása a 14-3-3 protein mennyiségére. Átlag±S.E.M. *P<0.05 vs kontroll csoport



32. ábra 10nM PACAP hatása a 14-3-3 protein mennyiségére.
 Átlag±S.E.M. *P<0.05 vs kontroll csoport



33. ábra 100nM PACAP hatása a 14-3-3 protein mennyiségére.
 Átlag±S.E.M. *P<0.05 vs kontroll csoport

MEGBESZÉLÉS

1. PACAP hatásának vizsgálata a sejttúlélésre H₂O₂-indukálta oxidatív stressz esetén

A H₂O₂-indukálta oxidatív stressznek kitett pinealocyták túlélését annexinV/propidium jodid festéssel vizsgáltuk. A napi ritmusok sajátosságainak megfelelően a PACAP hatásait egy napi ciklus különböző időpontjaiban vizsgáltuk. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az oxidatív stressz szignifikánsan csökkentette az élő sejtek arányát mindkét vizsgált időpontban. Az önállóan alkalmazott PACAP1-38 kezelés nem befolyásolta a sejtek életképességét. A H₂O₂-dal és PACAP1-38-cal szimultán kezelt csoportban a csak oxidatív stressznek kitett sejtcsoporthoz képest nem találtunk szignifikáns eltérést a sejtek túlélésének mértékében, amennyiben a kezeléseket reggel 9 órakor történtek (24. és 26. ábra). Ezzel szemben, az este 9 órakor kezelt pinealocyták esetében a PACAP1-38-cal történő koinkubáció szignifikánsan enyhítette a H₂O₂ sejttúlélést csökkentő hatását (25. és 27. ábra). Ugyanakkor a PAC1 receptor antagonistája, PACAP6-38 meggátolta a PACAP1-38 sejttúlélést segítő hatását (25. és 27. ábra).

Korábbi tanulmányok igazolták a PACAP sejttúlélést serkentő szerepét különböző neuronális sejtekben (Vaudry et al., 2000; Somogyvári-Vigh és Reglödi, 2004; Rácz et al., 2007a). A PACAP hasonló protektív hatást mutat károsító hatásoknak kitett nem-neuronális sejtekben, ú.m. endothel-, szívizomsejtekben (Rácz et al., 2007b,c; Gasz et al., 2006) és lymphocytákban (Delgado et al., 2000). A pinealocyták vizsgálata során tapasztalt eredményeink háttérében - miszerint a PACAP protektív hatása csak az esti órákban alkalmazott kezelés esetén érvényesül - a madár tobozmirigy circadian ritmikus folyamatokban betöltött vezérlő szerepe feltételezhető. A csirke tobozmirigy – szemben az emlős szervvel – nemcsak effektor funkcióval rendelkezik, hanem önálló, komplett biológiai órát tartalmaz (Csernus, 2006). Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP serkenti az oxidatív stressz károsító hatásának kitett pinealocyták túlélését, viszont ezen protektív hatás megléte függ a circadian biológiai óra fázisától. Elsőként mutattuk ki, hogy a PACAP sejttúlélést befolyásoló hatása függhet a PACAP alkalmazásának időpontjától, illetve a biológiai ritmusok fenntartásáért felelős biológiai óra fázisától.

2. PACAP hatásának vizsgálata a jelátviteli útvonalakra

Primer pinealocyta sejtenyészetben vizsgáltuk a p38 MAPK (28., 29. és 30. ábra) és a 14-3-3 (31., 32. és 33. ábra) fehérje circadian változásait, illetve a PACAP hatásait ezen mechanizmusokra.

A PACAP hatásait a MAPK jelátviteli útvonalak komponenseire számos tanulmányban vizsgálták különböző sejtípusokban (Rácz et al., 2006; Ravni et al., 2006; Vaudry et al., 2000). A mitogén-aktivált proteinkináz útvonalak fontos szerepet töltenek be a fény-indukálta génextpresszióban, illetve a fény - mint befolyásoló környezeti tényező - hatásainak kifejeződésében (Coogan és Piggins, 2004; Dziema et al., 2003).

A p38 MAPK ritmicitást és fényérzékenységet mutat az emlős biológiai óra központját képező nucleus suprachiasmaticusban. Az enzimet – hasonlóan a többi MAP kinázhoz - különböző tényezők képesek modulálni ú.m. fény és egyéb extracelluláris szignálok (pl. NGF, EGF, GRP) (Antle et al., 2005; Coogan és Piggins, 2004; Pizzio et al., 2003, 2005). A nucleus suprachiasmaticus neuronjaiban a PACAP a MAPK útvonalak aktiválódását idézi elő (Dziema és Obrietan, 2002) és az emlős circadian folyamatok szabályozásában is szerepet játszik (Colwell et al., 2004; Hannibal et al., 1997; Harrington et al., 1999; Kawaguchi et al., 2003). Különböző kísérleti körülmények között a PACAP képes arra, hogy a circadian óra fázisát eltolja (Hannibal et al., 2001; Harrington et al., 1999; Piggins et al., 2001). A p38 MAPK foszforilációjának változása – fokozódása vagy csökkenése - szerepet játszhat a pinealocyták melatonin termelésének regulációjában (Chik et al., 2004; Hayashi et al., 2003). Vizsgálataink kapcsán kapott eredményeink szintén alátámasztják azt az elképzelést, miszerint a PACAP hatással van a circadian ritmus fenntartásában résztvevő jelátviteli folyamatokra. A PACAP p38 MAP kináz útvonalakra kifejtett hatása nem korlátozódik a melatonin release-t befolyásoló tényezőkre, hanem a molekuláris óramechanizmusra is hatással van. Eredményeink összhangban vannak azon korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint a PACAP ritmikus funkciókra kifejtett hatásai fázis-és dózisdependensek (Harrington et al., 1999). A PACAP – az általunk is alkalmazott – nanomolos koncentrációban elősegíti az endogén ritmus fázis eltolódását. Ezenkívül, az emlős biológiai óra központjaként működő nucleus suprachiasmaticusban indukálja az

óragének expresszióját. Ugyanezen változások detektálhatók megvilágítás hatására is (Harrington et al., 1999; Nilsen et al., 2001; Minami et al., 2002).

A vizsgálatainkban tapasztaltakhoz hasonlóan a PACAP p38 MAPK foszforilációjára kifejtett dóziszfüggő hatás figyelhető meg idegsejtekben (Stumm et al., 2007). Eredményeink azt mutatták, hogy a PACAP alacsony dózisban nem okoz változást a p38 MAPK napszaki változásában, míg nagyobb dózisban fáziskésést eredményez, illetve a legmagasabb alkalmazott koncentráció megszünteti a p38 MAPK aktivációjának circadian ingadozását. A circadian oszcilláció mechanizmusában detektálható dózisdependens változások funkcionális jelentősége még nem tisztázott.

A 14-3-3 fehérje számos élettani folyamatban (apoptózis, enzimaktivitás stb.) fontos szerepet játszik. A tobozmirigyben, a 14-3-3 komplexet képez a melatonin szintézis sebességmeghatározó lépését katalizáló enzimmel, az arilalkilamin-N-acetil-transzferázzal (AANAT), ezzel stabilizálva és megvédve azt a proteolitikus hatásoktól (Rosiak és Zawilska, 2006). Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai alkalmával igazolódott, hogy a PACAP aktiválja a 14-3-3 proteint oxidatív stressznek kitett cardiomyocytákban *in vitro*, illetve *in vivo* glutamát okozta retinakárosodásban (Rácz et al., 2007a, 2007c). A dolgozatban tárgyalt eredményeink (31., 32. és 33. ábra) azt mutatják, hogy a PACAP a tobozmirigy sejtjeiben is hatással van a 14-3-3 fehérje mennyiségére. A PACAP ezen hatása függ a biológiai óra fázisától, valószínűsítve azt, hogy a 14-3-3 funkciója és annak az AANAT enzimhez való kapcsolata szintén a csirke pinealocytákban található molekuláris óra hatása alatt áll.

Jelen eredményeinket összegezve, a PACAP védő hatással rendelkezik csirke pinealocyták esetén is, illetve moduláló hatással bír a p38 MAPK foszforilációjára, valamint a 14-3-3 fehérjére csirke pinealocytákban, de ezen hatások függenek a PACAP dózisától, illetve a molekuláris óra aktuális fázisától.

V. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

I. PACAP szerepének vizsgálata PACAP KO egereken

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy az endogén PACAP hiánya a vesében *in vitro* hypoxia és oxidatív stressz esetén, valamint *in vivo* vese ischaemia/reperfúzió modellben a károsító hatásokkal szemben fokozott érzékenységet eredményez. Ezzel bizonyítottuk, hogy nemcsak az exogén módon alkalmazott PACAP-kezelés renoprotektív hatású, hanem az endogén PACAP is segíti a károsító hatásoknak kitett sejtekben a sejthalál-túlélés egyensúlyát a túlélés irányába terelni.

II. PACAP hatásának vizsgálata patkány vesében

A PACAP ismert renoprotektív hatásának mechanizmusát vizsgálva igazoltuk, hogy szignifikáns mértékben képes enyhíteni az ischaemia/reperfúziós károsodás okozta Bcl-2 expresszió csökkenést. Emellett szintén vese ischaemia/reperfúzió modellben a reperfúziót követően a PACAP upregulációja figyelhető meg. Továbbá, bizonyítottuk, hogy ugyanazon modellben a PACAP szignifikáns mértékben csökkenti a gyulladásos citokinek/kemokinek ischaemia/reperfúzió okozta expresszió fokozódását. Szintén patkány veséből származó mintákban MALDI TOF tömegspektrometria alkalmazásával detektáltuk a PACAP38 jelenlétét. Ezenfelül, a PACAP specifikus receptorának, a PAC 1 receptornak vesén belüli eloszlását vizsgálva kimutattuk, hogy a receptor főként a kérgi területeken, a tubuláris hámsejteken található meg, ami morfológiai alapját képezi a PACAP – korábban megfigyelt- tubuloprotektív hatásának.

III. PACAP hatásának vizsgálata tobozmirigyben

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a PACAP egyéb sejt típusokban megfigyelt citoprotektív hatása a tobozmirigyből izolált pinealocyták esetében szintén érvényesül. Pinealocyták esetében azonban ez a hatás függ a biológiai óra aktuális fázisától. Hasonló

eredményeket kaptunk a jelátviteli útvonalak két komponensét vizsgálva is. A PACAP mind a sejttúlélésre, mind pedig a jelátviteli útvonalakra kifejtett hatásai dóziszfüggők, valamint függenek a biológiai óra aktuális állapotától.

Ezen eredmények klinikai jelentőséget mutathatnak, miszerint az egyes gyógyszereként felhasználni kívánt anyagok hatásai napszaktól függően eltérőek lehetnek.

VI. IRODALOMJEGYZÉK

Abad C, Gomariz RP, Waschek JA. Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Curr Top Med Chem* 2006; 6:151-163.

Ábrahám H, Somogyvári-Vigh A, Maderdrut JL, Vigh S, Arimura A. Rapidly activated microglial cells in the preoptic area may play a role in the generation of hyperthermia following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *Exp Brain Res* 2003; 153:84-91.

Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke* 1998; 29:159-165.

Allais A, Burel D, Isaac ER. Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Eur J Neurosci* 2007; 25:2604-2618.

Ando E, Nokihara K, and Naruse S. Development of pituitary adenylate cyclase activating polypeptides (PACAPs) specific radioimmunoassay systems and distribution of PACAP-like immunoreactivity in guinea pig tissues. *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1994; 1:45-50.

Antle MC, Kriegsfeld LJ, Silver R. Signaling within the master clock of the brain: localized activation of mitogen-activated protein kinase by gastrin-releasing peptide. *J Neurosci* 2005; 25:2447-2454.

Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, and Kitada C. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 1991; 129:2787-2789.

Arimura A, Li M, Batuman V. Potential protective action of pituitary adenylate cyclase activating 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 N Y Acad Sci* 2006b; 1070:1-4.

Armstrong BD, Abad C, Chhith S, Cheung-Lao G, Hajji OE, Nobuta H, Waschek JA. Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating peptide. *Neuroscience* 2008; 151:63-73.

Aubert N, Falluel-Morel A, Vaudry D. PACAP and C2-ceramide generate AP-1 complexes through a MAP-kinase-dependent pathway: involvement of c-Fos in PACAP-induced Bcl-2 expression. *J Neurochem* 2006; 99:237-1250.

Azuma YT, Hagi K, Shintani N. PACAP provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis. *J Cell Physiol* 2008; 216:111-119.

Basile DP, Martin DR, Hammerman, MR. Extracellular matrix-related genes in kidney after ischemic injury: potential role for TGF-beta in repair. *Am J Physiol* 1998; 275:894-903.

Brenneman DE, Hauser JM, Spong C, and Phillips TM. Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. *Neuropeptides* 2002; 36:271-280.

Brenneman DE. Neuroprotection: a comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Peptides* 2007; 28:1720-1726.

Boronkai A, Brubel R, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, Lubics A, Szigeti A, Bellyei Sz, Tóth G, Lakatos A, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the survival and signal transduction pathways in human choriocarcinoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1163:353-357.

Börzsei R, Márk L, Tamás A, Bagoly T, Bay C, Csanaky K, Bánki E, Kiss P, Váczy A, Horváth G, Németh J, Szauer E, Helyes Z, Reglődi D. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur J Endocrinol* 2009; 160:561-565.

Canonica PL, Copani A, D'Agata V, Misco S, Petralia S, Travali S, Stivala F, Cavallaro S. Activation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptors prevents apoptotic cell death in cultured cerebellar granule cells. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 805:470-472.

Chen CC, Liu ZM, Wang HH, He W, Wang Y, Wu WD. Effects of ulinastatin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25:1334-1340.

Chen Y, Samal B, Hamelink CR, Xiang CC, Chen Y, Chen M, Vaudry D, Brownstein MJ, Hallenbeck JM, Eiden LE. Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regul Pept* 2006; 137:4-19.

Chen W, Inui T, Hachiya T, Ochi Y, Nakajima Y, Kajita Y. Stimulatory action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on thyroid gland. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194:923-929.

Chik CL, Mackova M, Price D, Ho AK. Adrenergic regulation and diurnal rhythm of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the rat pineal gland. *Endocrinology* 2004; 145:5194-201.

Colwell CS, Michel S, Itri J. Selective deficits in the circadian light response in mice lacking PACAP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287:1194-1201.

Coogan AN, Piggins HD. MAP kinases in the mammalian circadian system-key regulators of the clock function. *J Neurochem* 2004; 90:769-775.

Csernus VJ. The avian pineal gland. *Chronobiol Int* 2006; 23: 329-339.

Csernus V, Józsa R, Reglódi D. The effect of PACAP on rhythmic melatonin release of avian pineals. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 135:62-69.

D'Agata V, Cavallaro S. Functional and molecular expression of PACAP/VIP receptors in the rat retina. *Mol Brain Res* 1998; 54:161-164.

Delgado M, Garrido E, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptides (PACAP27 and PACAP38) protect CD4⁺CD8⁺ thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Blood* 1996; 12:5152-5161.

Delgado M. VIP and PACAP inhibit activation induced apoptosis in T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 921:55-67.

Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibit antigen-induced apoptosis of mature T lymphocytes by inhibiting Fas ligand expression. *J Immunol* 2000; 164:1200-1210.

Delgado M, Ganea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in vitro and in vivo. *J Immunol* 2001; 167:966-975.

Delgado M, Jonakait GM, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia* 2002; 39:148-161.

Dluzen D, Horstink M. Estrogen as neuroprotectant of nigrostriatal dopaminergic system: laboratory and clinical studies. *Endocrine* 2003; 21: 67-75.

Dziema H, Obrietan K. PACAP potentiates L-type calcium channel conductance in suprachiasmatic nucleus neurons by activating the MAPK pathways. *J Neurophysiol* 2002; 88:1374-1386.

Dziema H, Oatis B, Butcher GQ. The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 2003; 17:1617-1627.

Fahrenkrug J, Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide innervation of the rat female reproductive tract and the associated paracervical ganglia: effect of capsaicin. *Neuroscience* 1993; 73:1049-1060.

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.

Fahrenkrug J. PACAP-a multifaceted neuropeptide. *Chronobiol Int* 2006; 23:53-61.

Falluel-Morel A, Aubert N, Vaudry D. Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinasedependent mechanism in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 2004; 91:1231-2143.

Faluhelyi N, Reglődi D, Lengvári I, Csernus V. Development of the circadian melatonin rhythm and the effect of PACAP on melatonin release in the embryonic chicken pineal gland. An in vitro study. *Regul Pep* 2004;123:23-28.

Faluhelyi N, Reglődi D, Csernus V. The effects of PACAP and VIP on the in vitro melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070:271-275.

Falus A. Az immunológia élettani és molekuláris alapjai. Semmelweis Kiadó, Budapest, 1998.

Ferencz A, Rácz B, Tamás A, Reglődi D, Lubics A, Németh J, Nedvig K, Kalmár-Nagy K, Horváth OP, Weber G, Róth E. Influence of PACAP on oxidative stress and tissue injury following small bowel autotransplantation. *J Mol Neurosci* 2009; 37:168-176.

Filipsson K, Pacini G, Scheurink AJ, Ahrén B. PACAP stimulates insulin secretion but inhibits insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol* 1998; 274:E834–E842.

Fischereder M. Chemokines and chemokine receptors in renal transplantation from bench to bedside. *Acta Physiol Hung* 2007; 94: 67-81.

Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13:229-237.

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, Rácz B, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 2006; 27: 87-94.

Ghatei MA, Takahashi K, Suzuki Y, Gardiner J, Jones PM, Bloom SR. Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its

precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J Endocrinol* 1993; 136:159–166.

Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martinez C. VIP-PACAP system in immunity. New insights for multitarget therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070:51-74.

Gräs S, Hannibal J, Georg B, Fahrenkrug J. Transient periovulatory expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide in rat ovarian cells. *Endocrinology* 1996; 137:4779-4785.

Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 1998; 17:3878-3885.

Gutierrez-Canas I, Rodriguez-Henche N, Bolanos O, Carmena MJ, Prieto JC, Juarranz MG. VIP and PACAP are autocrine factors that protect the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 from apoptosis induced by serum withdrawal. *Br J Pharmacol* 2003; 139:1050-1058.

Hannibal J, Mikkelsen JD, Clausen H, Holst JJ, Wulff BS, Fahrenkrug J. Gene expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the rat hypothalamus. *Regul Pept* 1995a; 55:133–148.

Hannibal J, Mikkelsen JD, Fahrenkrug J, and Larsen PJ (1995b) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide gene expression in corticotropin-releasing factor-containing parvicellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus is induced by colchicine, but not by adrenalectomy, acute osmotic, ether, or restraint stress. *Endocrinology* 1995b; 136:4116–4124.

Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU, Mikkelsen JD. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* 1997; 17:2637–2644.

Hannibal J, Fahrenkrug J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in intrinsic and extrinsic nerves of the rat pancreas. *Cell Tissue Res* 2000; 299:59–70.

Hannibal J, Hindersson P, Nevo E, Fahrenkrug J. The circadian photopigment melanopsin is expressed in the blind subterranean mole rat, Spalax. *Neuroreport* 2000;13: 1411-1414.

Hannibal J., Møller M, Ottersen OP, Fahrenkrug J. PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol* 2000; 418:147-155.

Hannibal J, Jamen F, Nielsen HS, Journot L, Brabet P, Fahrenkrug J. Dissociation between light-induced phase shift of the circadian rhythm and clock gene expression in mice lacking the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor. *J Neurosci* 2001; 21:4883-4890.

- Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 2002; 453:389–417.
- Hannibal J, Fahrenkrug J. Melanopsin containing retinal ganglion cells are light responsive from birth. *Neuroreport* 2004; 15:2317-2320.
- Hannibal J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 2006; 309: 73-88.
- Harmar AJ, Sheward WJ, Morrison CF, Waser B, Gugger M, Reubi JC. Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology* 2004; 145:1203-1210.
- Harrington ME, Hoque S, Hall A, Golombek D, Biello S. Pituitary adenylate cyclase activating peptide phase shifts circadian rhythms in a manner similar to light. *J Neurosci* 1999; 19:6637-6642.
- Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M. Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2555-2566.
- Hashimoto H, Nogi H, Mori K, Ohishi H, Shigemoto R, Yamamoto K, Matsuda T, Mizuno N, Nagata S, Baba A. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 1996; 371: 567-577.
- Hauser-Kronberger C, Albegger K, Saria A and Hacker GW. Neuropeptides in human salivary (submandibular and parotid) glands. *Acta Otolaryngol* 1992; 112:343-348.
- Hautmann M, Friis UG, Desch M. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1150-1156.
- Hayashi Y, Sanada K, Hirota T, Shimizu F, Fukada Y. p38 mitogen-activated protein kinase regulates oscillation of chick pineal circadian clock. *J Biol Chem* 2003; 278:25166-25171.
- Heinzlmann A, Kirilly E, Meltzer K, Szabó E, Baba A, Hashimoto H, and Köves K. PACAP is transiently expressed in anterior pituitary gland of rats: in situ hybridization and cell immunoblot assay studies. *Peptides* 2008; 29:571-577.
- Helyes Zs, Pozsgai G, Börzsei R, Németh J, Bagoly T, Márk L, Pintér E, Tóth G, Elekes K, Szolcsányi J, Reglődi D. Inhibitory effect of PACAP38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammation in the rat. *Peptides* 2007; 28:1847-1855.

Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 1992; 8:811-819.

Jain S, Bicknell GR, Nicholson ML. Molecular changes in extracellular matrix turnover after renal ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 2000; 87:1188-1192.

Jakab B, Reglódi D, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Oroszi G, Szilvássy Z, Szolcsányi J. Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Methods* 2004; 61:189-198.

Jansen-Olesen I, Goadsby PJ, Uddman R, and Edvinsson L (1994) Vasoactive intestinal peptide (VIP) like peptides in the cerebral circulation of the cat. *J Auton Nerv Syst* 1994; 49:97-103.

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.

Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, Cha CI. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol* 2004; 476: 388-413.

Kalsbeek A, Fliers E, Franke AN, Wortel J, Buijs RM. Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat. *Endocrinology* 2000; 141:3832-3841.

Kawaguchi C, Tanaka K, Isojima Y. Changes in light-induced phase shift of circadian rhythm in mice lacking PACAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310:169-175.

Kántor O, Heinzlmann A, Suzuki N, Vincze E, Kocsis K, Köves K. Distribution of PACAP and its mRNA in several nonneural tissues of rats demonstrated by sandwich enzyme immunoassay and RT-PCR technique. *Regul Pept* 2002; 109:103-105.

Kimura S, Ohshige Y, Lin L, Okumura T, Yanaihara C, Yanaihara N, Shiotani Y. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the hypothalamus-pituitary system in rats: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Neuroendocrinol* 1994; 6:503-507.

Kivipelto L, Absood A, Arimura A, Sundler F, Håkanson R, Panula P. The distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity is distinct from

helodermin- and helospectin-like immunoreactivities in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 1992; 5:85-94.

Koh PO, Kwak SD, Kim HJ, Roh G, Kim JH, Kang SS, Choi WS, Cho GJ. Expression patterns of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor mRNAs in the rat placenta. *Mol Reprod Dev* 2003; 64:27-31.

Köves K, Arimura A, Görcs TG, and Somogyvári-Vigh A. Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 1991; 54:159-169.

Köves K, Görcs TJ, Kausz M, and Arimura A. Present status of knowledge about the distribution and colocalization of PACAP in the forebrain. *Acta Biol Hung* 1994; 45:297-321.

Köves K, Kántor O, Scammell JG, Arimura A. PACAP colocalizes with luteinizing and follicle-stimulating hormone immunoreactivities in the anterior lobe of the pituitary gland. *Peptides* 1998; 19:1069-1072.

Lam HC, Takahashi K, Ghatei MA, Kanse SM, Polak JM, Bloom SR. Binding sites of a novel neuropeptide pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the rat brain and lung. *Eur J Biochem* 1990; 193:725-729.

Lee J, Park HJ, Choi HS, Kwon HB, Arimura A, Lee BJ, Choi WS, Chun SY. Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of PACAP as a follicle survival factor. *Endocrinology* 1999; 140:818-826.

Lengvári I, Halász B. Evidence for a diurnal fluctuation in plasma corticosterone levels after fornix transection in the rat. *Neuroendocrinology* 1973; 11:191-196.

Légrádi G, Shioda S, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in autonomic regulatory areas of the rat medulla oblongata. *Neurosci Lett* 1994; 176:193-196.

Li M, Maderdrut JL, Lertora JJ, 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, Maderdrut JL, Lertora JJ, Arimura A, Batuman V. Renoprotection by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in multiple myeloma other kidney diseases. *Regul Pept* 2008; 145:24-32.

Luts L, Sundler F. Peptide-containing fibers in the parathyroid glands of different species. *Regul Pept* 1994; 50:147-158.

Mao YK, Wang YF, Moogk C, Fox-Threlkeld JE, Xiao Q, McDonald TJ, Daniel EE. Locations and molecular forms of PACAP and sites and characteristics of PACAP receptors in canine ileum. *Am J Physiol* 1998; 274:G217-G225.

Masuo Y, Ohtaki T, Masuda Y, Tsuda M, Fujino M. Binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): Comparison with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) binding site localization in rat brain sections. *Brain Res* 1992; 575:113–123.

Masuo Y, Suzuki N, Matsumoto H, Tokito F, Matsumoto Y, Tsuda M, Fujino M. Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Res* 1993; 602:57-63.

Matsuda K, Takei Y, Katoh J, Shioda S, Arimura A, Uchiyama M. Isolation and structural characterization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like peptide from the brain of a teleost, stargazer, *Uranoscopus japonicus*. *Peptides* 1997; 18:723-727.

Melendez-Zajgla J, Del Pozo L, Ceballos G, Maldonado V. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled. *Mol Cancer* 2008; 7:85.

Mikkelsen JD, Hannibal J, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Olcese J, McArdle C. Pituitary adenylate cyclase activating peptide-38 (PACAP-38), PACAP-27, and PACAP related peptide (PRP) in the rat median eminence and pituitary. *J Neuroendocrinol* 1995; 7:47-55.

Minami Y, Furuno K, Akiyama M, Moriya T, Shibata S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide produces a phase shift associated with induction of mPer expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 2002 ; 113:37-45.

Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164:567-574.

Miyata A, Jiang L, Dahl RR, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170:643-648.

Moller K, Zhang YZ, Håkanson R, Luts A, Sjölund B, Uddman R, Sundler F. Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience* 1993; 57:725-732.

Moller M, Fahrenkrug J, Hannibal J. Innervation of the rat pineal gland by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-immunoreactive nerve fibres. *Cell Tissue Res* 1999; 296:247-257.

- Montero M, Yon L, Rousseau K, Arimura A, Fournier A, Dufour S, and Vaudry H. Distribution, characterization, and growth hormone-releasing activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Endocrinology* 1998; 139:4300-4310.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Imm Meth* 1983; 65:55-63.
- Nagy AD, Csernus VJ. The role of PACAP in the control of circadian expression of clock genes in the chicken pineal gland. *Peptides* 2007; 28:1767-1774.
- Nakahara K, Abe Y, Murakami T, Shiota K, Murakami N. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is involved in melatonin release via the specific receptor PACAP-r1, but not in the circadian oscillator, in chick pineal cell. *Brain Res* 2002; 939:19-25.
- Németh J, Reglődi D, Pozsgai G, Szabó Á, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs. Effect of PACAP-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience* 2006; 143:223-230.
- Németh J, Jakab B, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Kiss P, Oberitter Zs, Horváth B, Szilvássy Z, Reglődi D. PACAP-27 radioimmunoassay: Description and application of a novel method. *J Radioanal Nucl Chem* 2007; 273:327-332.
- Nemetz N, Abad C, Lawson G. Induction of colitis and rapid development of colorectal tumors in mice deficient in the neuropeptide PACAP. *Int J Cancer* 2008; 122:1803-1809.
- Nielsen HS, Hannibal J, Knudsen SM, Fahrenkrug J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide induces period1 and period2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus during late night. *Neuroscience* 2001; 103:433-441.
- Nilsson SF. PACAP-27 and PACAP-38: Vascular effects in the eye and some other tissues in the rabbit. *Eur J Pharmacol* 1994; 253:17-25.
- Nowak JZ, Zawilska JB. PACAP in avians: origin, occurrence, and receptors pharmacological and functional considerations. *Curr Pharm Des.* 2003; 9:467-481.
- Ogawa T, Nakamachi T, Ohtaki H et al: Monoaminergic neuronal development is not affected in PACAP-gene-deficient mice. *Regul Pept* 2005; 126:103-108.
- Oh DJ, Dursun B, He Z. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *Am J Renal Physiol* 2008; 294:F264-271.
- Ohtaki H, Nakamachi Z, Dohi K, Shioda S. Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci* 2008; 36:16-25.

Oka H, Jin L, Kulig E, Scheithauer BW, Lloyd RV. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibits transforming growth factor- β 1-induced apoptosis in a human pituitary adenoma cell line. *Am J Pathol* 1999; 155:1893-1900.

Onoue S, Endo K, Yajima T, Kashimoto K. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide attenuate glutamate-induced nNOS activation and cytotoxicity. *Regul Pept* 2002a; 107:43-47.

Onoue S, Endo K, Ohshima K, Yamija T, Kashimoto K. The neuropeptide PACAP attenuates β -amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* 2002b; 23:1471-1478.

Onoue S, Ohshima K, Endo K, Yajima T, Kashimoto K. PACAP protects neuronal PC12 cells from the cytotoxicity of human prion protein fragment 106-126. *FEBS Lett* 2002c; 522:65-70.

Peeters K, Gerets HH, Princen K, Vandesande F. Molecular cloning and expression of a chicken pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Mol Brain Res* 1999; 71:244-255.

Piggins HD, Stamp JA, Burns J, Rusak B, Semba K. Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) immunoreactivity in the hypothalamus and extended amygdala of the rat. *J Comp Neurol* 1996; 376:278-294.

Pirger Zs, Németh J, Hiripi L, Tóth G, Kiss P, Lubics A, Tamás A, Hernádi L, Kiss T, Reglődi D. PACAP has anti-apoptotic effect in the salivary gland of an invertebrate species, *Helix pomatia*. *J Mol Neurosci* 2008; 36:105-114.

Pizzio GA, Hainich EC, Ferreyra GA, Coso OA, Golombek DA. Circadian and photic regulation of ERK, JNK and p38 in the hamster SCN. *Neuroreport* 2003; 14:1417-1419.

Pizzio GA, Hainich EC, Plano SA, Ralph MR, Golombek DA. Nerve growth factor-induced circadian phase shifts and MAP kinase activation in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci* 2005; 22:665-671.

Radziszewski P, Ekblad E, Sundler F, Mattiasson A. Distribution of neuropeptide-, tyrosine hydroxylase- and nitric oxide synthase containing nerve fibers in the external urethral sphincter of the rat. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1996; 179:81-85.

Ravni A, Bourgault S, Lebon A. The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *J Neurochem* 2006; 98:321-329.

RÁCZ B, Gallyas F Jr, Kiss P. The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involves inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul Pept* 2006; 137:20-26.

RÁCZ B, GALLYAS F JR, KISS P, TAMÁS A, LUBICS A, LENGVÁRI I, RÓTH E, TÓTH G, HEGYI O, VERZÁL Z, FABRICSEK C, REGLÓDI D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the PKA-Bad-14-3-3 signaling pathway in glutamate-induced retinal injury in neonatal rats. *Neurotox Res* 2007a; 12:95-104.

RÁCZ B, GASZ B, BORSICZKY B, GALLYAS F JR, TAMÁS A, JÓZSA R, LUBICS A, KISS P, RÓTH E, FERENCZ A, TÓTH G, HEGYI O, WITTMANN I, LENGVÁRI I, SOMOGYVÁRI-VÍGH A, REGLÓDI D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol* 2007b; 153:115-123.

RÁCZ B, GASZ B, GALLYAS F JR, KISS P, TAMÁS A, SZÁNTÓ Z, LUBICS A, LENGVÁRI I, TÓTH G, HEGYI O, RÓTH E, REGLÓDI D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul Pept* 2007c; 145:105-115.

Reubi JC. In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 921:1-25.

RÉKÁSI Z, CZÖMPÖLY T. Accumulation of rat pineal serotonin N-acetyltransferase mRNA induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in vitro. *J Mol Endocrinol* 2002; 28:19-31.

ROSIÁK J, ZAWILSKA JB. 14-3-3 proteins- a role in the regulation of melatonin biosynthesis. *Postepy Biochem* 2006; 52:35-41.

REGLÓDI D, SOMOGYVÁRI-VÍGH A, VÍGH S, KOZICZ T, ARIMURA A. Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 2000; 31:1411-1417.

REGLÓDI D, LUBICS A, TAMÁS A, SZALONTAY L, LENGVÁRI I. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2004; 151:303-312.

REGLÓDI D, FÁBIÁN ZS, TAMÁS A, LUBICS A, SZEBERÉNYI J, ALEXY T, TÓTH K, MÁRTON Z, BORSICZKY B, RÓTH E, SZALONTAY L, LENGVÁRI I. Effects of PACAP on in vitro and in vivo neuronal cell death, platelet aggregation and production of reactive oxygen radicals. *Regul Pept* 2004; 123:51-59.

SAIKUMAR P, VENKATACHALAM MA. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol* 2003; 23:511-521.

SÁNDOR K, BÖLCSKEI K, MCDougall JJ, Schuelert N, REGLÓDI D, ELEKES K, PETHŐ G, PINTÉR E, SZOLCSÁNYI J, HELYES ZS. Divergent peripheral effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 38 on nociception in rats and mice. *Pain* 2009; 141:143-150.

Scaldeferri ML, Modesti A, Palumbo C, Ulisse S, Fabbri A, Piccione E, Frajese G, Moretti C. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP-receptor type 1 expression in rat and human placenta. *Endocrinology* 2000; 141:1158–1167.

Seki T, Shioda S, Izumi S, Arimura A, Koide R. Electron microscopic observation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-containing neurons in the rat retina. *Peptides* 2000; 21:109-113.

Sheward WJ, Lutz EM and Harmar AJ. The distribution of vasoactive intestinal peptide 2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by *in situ* hybridization. *Neuroscience* 1995; 67:409-418.

Shivers BD, Görcs TJ, Gottschall PE, Arimura A. Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology* 1991;128:3055-3065.

Simonneaux V, Ouichou P, Pevet P. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates melatonin synthesis from rat pineal gland. *Brain Res* 1993; 603:148-152.

Skoglösa Y, Takei N, and Lindholm D. Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain. *Mol Brain Res* 1999a; 65:1-13.

Skoglösa Y, Patrone C, and Lindholm D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is expressed by developing rat Purkinje cells and decreases the number of cerebellar gamma-amino butyric acid positive neurons in culture. *Neurosci Lett* 1999b; 265:207-210.

Somogyvári-Vigh A, Reglödi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr Pharm Des* 2004; 10:2861-2889.

Spencer F, Chi L, Zhu M. Temporal relationships among uterine pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, decidual prolactin-related protein and progesterone receptor mRNAs expressions during decidualization and gestation in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001; 129:25-34.

Sreedharan SP, Huang JX, Cheung MC, Goetzl EJ. Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2939-2943.

Stein DG. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogens? *Trends Neurosci* 2001; 24:386-391.

Stoll G, Jander S, Schroeter M. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 2002; 115: 87-113.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Ann Rev Biochem* 2000; 69:217-245.

Stumm R, Kolodziej A, Prinz V, Endres M, Wu DF, Holtt V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage. *J Neurochem* 2007; 103:1666-1681.

Suk K, Park JH, Lee WH. Neuropeptide PACAP inhibits hypoxic activation of brain microglia: a protective mechanism against microglial neurotoxicity in ischemia. *Brain Res* 2004; 1026:151-156.

Suzuki T, Bramlett HM, Dietrich D. The importance of gender on the beneficial effects of posttraumatic hypothermia. *Exp Neurol* 2003; 184:1017-1026.

Szabó E, Nemeskéri A, Arimura A, Köves 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.

Szakály P, Kiss P, Lubics A, Magyarlaci T, Tamás A, Rác B, Lengvári I, Tóth G, Reglődi D. Effects of PACAP on survival and renal morphology in rats subjected to renal ischemia-reperfusion. *J Mol Neurosci* 2008; 36:89-96.

Takei N, Skoglosa Y, Lindholm D. Neurotrophic and neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 1998; 54:698-706.

Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. *Ann N Y Acad Sci* 2006a;1070:570-574.

Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of age, gender, and gonadectomy on neurochemistry and behavior in animal models of Parkinson's disease. *Endocrine* 2006b; 29:275-287.

Tamás A, Zsombok A, Farkas O, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishock JT, Dóczi T. Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. *J Neurotrauma* 2006c; 23: 686-695.

Tanaka J, Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Yanaihara N, Kato Y. Neuronal protection from apoptosis by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Regul Pept* 1997; 72:1-8.

Turunen AJ, Fernandez JA, Lindgrem L. Activated protein C reduces graft neutrophil activation in clinical renal transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5:2204-2212.

Usdin TB, Bonner TI, Mezey E. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 1994; 135:2662-2680.

Yadav G, Straume M, Heath J, Zatz M. Are changes in MAPK/ERK necessary or sufficient for entrainment in chick pineal cells? *J Neurosci* 2003; 23:10021-10031.

Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem* 1997; 272:19943-19950.

Yon L, Alexandre D, Montero M, Chartrel N, Jeandel L, Vallarino M, Conlon JM, Kikuyama S, Fournier A, Gracia-Navarro F. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors in amphibians. *Microsc Res Tech* 2001; 54:137-157.

Yuichiro H, Kamon S, Yoshitaka F. Circadian and photic regulation of MAP kinase by Ras- and protein phosphatase-dependent pathways in the chick pineal gland. *FEBS Letters* 2001; 491:71-75.

Vannay A, Fekete A, Langer R, Tóth T, Sziksz E, Vásárhelyi B, Szabó AJ, Losonczy G, Adori C, Gál A, Tulassay T, Szabó A.. Dehydroepiandrosterone pretreatment alters the ischaemia/reperfusion-induced VEGF, IL-1, and IL-6 gene expression in acute renal failure. *Kidney Blood Press Res* 2009; 32:175-184.

Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 269-324.

Vaudry D, Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci* 2002a; 99: 6398-6403.

Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ. PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur J Neurosci* 2002b;15:1451-1560.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 2003; 72:303-316.

Vaudry D, Hamelink C, Damadzic R, Eskay RL, Gonzalez B, Eiden LE. Endogenous PACAP acts as a stress response peptide to protect cerebellar neurons from ethanol or oxidative insult. *Peptides* 2005; 26:2518–2524.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz A, Fournier A, Chow KCB, 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.

Vigh S, Arimura A, Gottschall PE, Kitada C, Somogyvári-Vigh A, Childs GV. Cytochemical characterization of anterior pituitary target cells for the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), using biotinylated ligands. *Peptides* 1993; 14:59-65.

Vincze E, Kántor O, Kiss A, Gonda G, Gombás P, Kiss J, Juhász M, Arimura A, Köves K. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is present in human and cat gastric glands. *Peptides* 1999; 20:937-941.

Vincze E, Köves K. A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerkezete, előfordulása és szerepe az élettani működésekben. *Orvosi Hetilap* 2001; 142:491-496.

Wang J, Wei Q, Wang CY. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *J Biol Chem* 2004; 279:19948-19954.

Weeke J, Gundersen HJ. Circadian and 30 minutes variations in serum TSH and thyroid hormones in normal subjects. *Acta Endocrinol* 1978; 89:659-672.

Wei Y, Mojsov S. Tissue specific expression of different human receptor types for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide: implications for their role in human physiology. *J Neuroendocrinol* 1996; 8: 811-817.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139:1281-1292.

Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn ED. Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia-inducible Factor- α and von Hippel-Lindau Protein by Direct Binding to Hypoxia-inducible Factor- α . *J Biol Chem* 2003; 278: 15911-15916.

Zhou X, Rodriguez WI, Casillas RA, Ma V, Tam J, Hu Z, Lelievre V, Chao A, Waschek JA. Axotomy-induced changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP receptor gene expression in the adult rat facial motor nucleus. *J Neurosci Res* 1999; 57:953-961.

Jelen PhD. dolgozat alapjául szolgáló közlemények

- 1. Horváth G**, Márk L, Brubel R, Szakály P, Rác B, Kiss P, Tamás A, Helyes Z, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Fűrjes G, Németh J, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide display increased sensitivity to renal oxidative stress in vitro. *Neurosci Let.* 2010; 469:70–74. (IF: 2,2)
- 2. Horváth G**, Rác B, Reglődi D, Kovács K, Kiss P, Gallyas F Jr, Bognár Z, Szabó A, Magyarlaki T, László E, Lubics A, Tamás A, Tóth G, Szakály P. Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion. *J Mol Neurosci* 2010; PMID: 20229361 (IF: 2,061)
- 3. Horváth G**, Rác B, Szakály P, Kiss P, László E, Hau L, Tamás A, Helyes Zs, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Reglődi D. Mice deficient in the neuropeptide PACAP display increased sensitivity to in vitro kidney hypoxia. *Transplant Proc* 2010; in press (IF: 1,055)
- 4. Rác B, Horváth G**, Faluhelyi N, Nagy AD, Tamás A, Kiss P, Gallyas F Jr, Tóth G, Gaszner B, Csernus V, Reglődi D. Effects of PACAP on the circadian changes of signaling pathways in chicken pinealocytes. *J Mol Neurosci* 2008; 36:220-226. (IF: 2,061)
- 5. Szakály P, Horváth G**, Kiss P, László E, Farkas J, Fűrjes G, Németh J, Reglődi D. Changes in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide *Transplant Proc* 2010; in press (IF: 1,055)

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények összes impact faktora: 8,432

Egyéb közlemények:

- Reglődi D, Börzsei R, Bagoly T, Boronkai A, Rác B, Tamás A, Kiss P, **Horváth G**, Brubel R, Németh J, Tóth G, Helyes Z. Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J Mol Neurosci* 2008; 36:270-278. (IF: 2,061)
- Boronkai A, Brubel R, Rác B, Tamás A, Kiss P, **Horváth G**, Lubics A, Szigeti A, Bellyei Sz, Tóth G, Lakatos A, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the survival and signal transduction pathways in human choriocarcinoma cells. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1163:353-357. (IF: 2,303)
- Róth E, Wéber Gy, Kiss P, Horváth G, Tóth G, Gasz B, Ferencz A, Gallyas F Jr, Reglődi D, Rác B. Effects of PACAP and preconditioning against ischaemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1163:512-516. (IF: 2,303)
- Börzsei R, Márk L, Tamás A, Bagoly T, Bay Cs, Csanaky K, Bánki E, Kiss P, Váczy A, **Horváth G**, Németh J, Szauer E, Helyes Zs, Reglődi D. Presence of pituitary adenylate

cyclase activating polypeptide-38 (PACAP-38) in human plasma and milk. *Eur J Endocrinol* 2009; 160:561-565. (IF: 3,791)

5. RÁCZ B, **HORVÁTH G**, Reglődi D, Gasz B, Kiss P, Gallyas F Jr, Sümegi B, Tóth G, Németh A, Lubics A, Tamás A. PACAP ameliorates oxidative stress in the chicken inner ear: An in vitro study. *Regul Pept* 2010; 160: 91-98 (IF: 2,276)

6. RÁCZ B, Reglődi D, **HORVÁTH G**, Szigeti A, Balatonyi B, Roth E, Wéber Gy, Alotti N, Toth G, Gasz B. Protective effect of PACAP against doxorubicin-induced cell death in cardiomyocyte culture. *J Mol Neurosci* 2010; in press (IF: 2,061)

7. Brubel R, Boronkai A, Reglődi D, RÁCZ B, Németh J, Kiss P, Lubics A, Tóth G, **HORVÁTH G**, Varga T, Szőgyi D, Fónagy E, Farkas J, Barakonyi A, Bellyei S, Szereday L, Koppán M, Tamás A. Changes in the expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. *J Mol Neurosci* 2010; in press (IF: 2,061)

Tudományos közlemények összesített impact faktora: 25,288

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Családomnak, akik minden helyzetben mellettem álltak.

Témavezetőimnek, Dr. Reglódi Dórának és Dr. Csernus Valérnak köszönöm az általuk nyújtott szakmai és baráti segítséget.

Emellett szeretnék köszönetet mondani Dr. Rác Boglárkának, aki nélkül nehezebben boldogultam volna a kísérletes munka világában, illetve a kutatócsoport többi tagjának is: Dr. Kiss Péternek, Dr. Lubics Andreának és Dr. Tamás Andreának.

Továbbá, szeretnék köszönetet mondani Mercz Tündének és Dittrich Erzsébetnek az eddigi munkám során nyújtott segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom az Anatómiai Intézet minden dolgozójának.