

**Az F67830 számú „Hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) hatásának vizsgálata különböző károsító tényezők következtében kialakuló cochleáris- és retinális károsodásban” című OTKA Kutatási támogatás szakmai zárójelentése**

Az F67830 számú kutatási támogatás segítségével 2007. júliusától 48 tudományos publikációban (IF: 124,798), 60 idézhető absztraktban és számos hazai és nemzetközi konferencián kb. 150 poszter prezentációban és 27 előadásban ismertettük azon eredményeket, melyek a kutatási támogatás segítségével születtek. Legszorosabban a kutatási témához tartozó közlemények száma 21 (IF: 62,474), de a pályázatban kitűzött célok mellett számos más, a pályázatban megfogalmazott célokhoz kapcsolódó témában is értünk el sikeres eredményeket a támogatás segítségével. A kutatási pályázat két fő témája a PACAP hatásának vizsgálata különböző cochleáris és retinális károsodásokban. A PACAP otoprotektív hatásának vizsgálata során kimutattuk a peptid védő hatását oxidatív stressz-indukálta belső fül károsodásban csirkében (Rác et al., Regul Pept 2010). Az *in vitro* kísérleteink során 1 napos csirkék belső fülének kipreparálását követően sejtenyészetet készítettünk, ahol PACAP segítette a sejtek túlélését H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indukálta oxidatív stresszel szemben, amit MTT teszttel, JC-1 apoptózis assay-vel és annexin V/propidium iodide flowcitometriával igazoltunk, valamint a PACAP csökkentette a proapoptikus caspase-3 aktivitását is. A csirke ductus cochleárisának kipreparálását követően vizsgáltuk a PACAP endolympha proteinösszetételére kifejtett hatását is (Gaál et al., J Mol Neurosci 2008). Ezenkívül mértük a beltenyészett Wistar patkányok congenitális halláskárosodásának mértékét különböző funkcionális (BERA, Otoacusticus Emissio) és hisztológiai vizsgálatokkal is, mely adatokat előadás és poszter formájában prezentáltuk a Magyar Élettani Társaság LXXI. és a Magyar Fül-orr-gegeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekciójának 44. Vándorgyűlésén (Németh et al. Acta Physiol Hung 2007). A kutatási pályázat egyik fő célja a PACAP hatásának vizsgálata különböző ototoxikus anyagokkal szemben (pl.: ciszplatin, aminoglycosid antibiotikumok). A Wistar patkányokkal tervezett kísérleteinket nagymértékben hátráltatta a congenitális sükettség magas százalékos előfordulása, valamint a BERA és Otoacusticus Emissios standardizálása, ezért kísérleteinket egereken folytattuk, ugyanis kutatócsoportunk japán kollaborációjának köszönhetően az elmúlt évtől már PACAP knock out egerek (KO) vizsgálatára is lehetőségünk nyílik. A PACAP KO egerekről általánosságban a csökkent reprodukciós képesség és a visszamaradott növekedés jellemző, és széles körben használják ezen egértörzset az endogén PACAP szerepének vizsgálatához. Jelenleg a vad és PACAP KO egerek cochleájának morfológiai összehasonlításán dolgozunk. Ezen kutatások során vizsgáljuk a PAC1-receptor valamint a különböző Ca<sup>2+</sup>-kötő fehérjék (parvalbumin, calretinin, calbindin) előfordulását a belsőfülben. Több cochleáris kutatásban is foglalkoznak a Ca<sup>2+</sup>-kötő fehérjékkel, ugyanis ezeknek fontos szerepe van az endolympha Ca<sup>2+</sup> koncentrációjának szabályozásában, ami elengedhetetlen a normális halláshoz. Legfrissebb kutatási eredményeink nem mutattak eltérést a PAC1-receptorok lokalizációjában, de a vad típusú egerek külső szőrsejtjei és támasztó sejtjei sokkal intenzívebben jelölődtek a PACAP KO egerekhez képest. Ezzel szemben a Ca<sup>2+</sup>-kötő fehérjék vizsgálata során a PACAP KO egerek belső és külső szőrsejtjei sokkal kifejezettebb parvalbumin, calretinin és calbindin immunpozitivitást

mutattak, mint a vad típusú egerek. Több kutatás is bizonyította, hogy az endolympha megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja ártalmas a belső fül működésére, amivel szemben a szőrsejtekben megemelkedő  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje koncentráció védelmet nyújthat. Az, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjék immunreaktivitása megnövekedett PACAP hiányában, további bizonyítékként szolgál arra, hogy a PACAP-nak fontos szerepe lehet a hallás szabályozásában, amely hatás pontos feltérképezése további kutatásunk célja. Több olyan fül-orr-gégészeti betegség van, amely pathomechanizmusa eddig még nem pontosan ismert pl.: Méniér-betegség, melynek hátterében az endolympha elváltozások következtében kialakuló szőrsejtkárosodások feltételezhetők, ezért lehetséges, hogy a PACAP-nak is fontos szerepe lehet ezen folyamatokban. Ezen kutatási eredmények idézhető absztrakt formájában már bemutatásra kerültek (Tamás et al. *Acta Physiol* 2011), jelenleg eredményeink „Comparative examination of inner ear in wild type and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) deficient mice” (Tamás et al.) címmel a *Neurotoxicity Research* folyóiratnál közlés alatt állnak. Legújabb kísérleteink során kezdtük el különböző aminoglycosid antibiotikumok (kanamycin, amikacin) hatásának vizsgálatát vad és PACAP KO egerekben. Jelenleg folynak a különböző károsító hatások következtében fellépő változások összehasonlító vizsgálatai. A jövőben ezen károsodások kivédését szeretnénk PACAP kezeléssel is kiegészíteni, hogy felderítsük az exogén PACAP kezelés esetleges védő hatását ezen modellekben.

A PACAP retinális károsodásban kifejtett hatását számos retinotoxikus modellben kutattuk *in vivo* és *in vitro*. Monosodium glutamát-indukálta retinális károsodásban vizsgáltuk a különböző sejtérintettséget (Atlasz et al., *J Mol Neurosci* 2008), a PACAP protektív hatásának molekuláris biológiai hátterét (Rácz et al., *Neurotox Res* 2007), valamint a különböző PACAP fragmentumok védő hatását (Atlasz et al., *Ann NY Acad Sci* 2009), és ebből egy összefoglaló közlemény is született (Atlasz et al., *Ann NY Acad Sci* 2010).

Munkánk során bilaterális carotis lekötés következtében kialakuló ischaemiás retinakárosodási modellel is dolgoztunk, ahol bebizonyítottuk a PACAP védő hatását (Atlasz et al., *Brain Res Bull* 2010), ezenkívül kimutattuk a diazoxid (Atlasz et al., *Neurotox Res* 2007), az urocortin 2 (Szabadfi et al., *Neurosci Lett* 2009), a PARP inhibitor (Mester et al., *Neurotox Res* 2009) védő szerepét is ebben a modellben. Ezen eredményeket egy összefoglaló közleményben is megjelentettük (Szabadfi et al., *Int J Mol Sci* 2010). Legújabb vizsgálati eredményeink a PACAP KO egerek ischaemiás retinadegenerációjának vizsgálata során születtek. Vizsgálataink során azt figyeltük meg, hogy bár a PACAP KO egerek retinájának morfológiája makroszkóposan nem mutat szignifikáns különbséget a vad típushoz képest, ugyanazon lézió a PACAP KO egerekben szignifikánsan nagyobb léziót hoz létre, mint a vad állatokban (Szabadfi et al., *Neurotox Res* 2011). A PACAP KO egerekkel kapcsolatos vizsgálataink jelenleg a kutatások központjában állnak, amelyről egy összefoglaló közleményünk „PACAP is an endogenous protective factor – lessons from PACAP deficient mice” (Reglődi et al.) címmel az *Acta Physiologica* folyóiratnál állnak közlés alatt.

A fentiekben felsorolt modelleken kívül bebizonyítottuk a PACAP védő hatását UV-A sugárzás, valamint egyéb citotoxikus hatások következtében kialakuló retinális károsodással szemben (Atlasz et al., Varga et al., *J Mol Neurosci* 2011), és oxidatív stressz-indukálta humán retinális pigment sejteken (Mester et al., *J Mol Neurosci* 2010).

Felnőtt patkányokon kívül újszülött patkányok retinális és idegrendszeri fejlődését is vizsgáltuk különböző kísérleti körülmények között. Először a monosodium–glutámát kezelés (Kiss et al., *Neurotox Res* 2007), perinatális asphyxia (Kiss et al., *Brain Res* 2009) valamint az anyai megvonás hatásait figyeltük meg (Farkas et al., *Brain Res Bull* 2009) a reflexek, a magatartásmintázat és a retina fejlődésére, majd ezt követően bebizonyítottuk a korai ingergazdag környezet jótékony hatását glutamát-indukálta retinakárosodásban (Szabadfi et al., *Brain Res* 2009). Összehasonlítottuk továbbá a PACAP kezelés és az ingergazdag környezet retinoprotektív hatását is MSG-vel kezelt újszülött patkányoknál (Kiss et al. *Neurosci Lett* 2011).

Korábban a munkacsoport számos adatot publikált a PACAP neuroprotektív tulajdonságával kapcsolatban. Ezen témában is születtek újabb eredmények, amely a PACAP traumás agykárosodásban kifejtett protekcióját írja le (Kövesdi et al., *Neurotox Res* 2008). Ebben az évben a PACAP neurodegeneratív betegségeket modellező állatkísérletekben kifejtett hatását egy összefoglaló dolgozatban publikáltuk (Reglődi et al. *Curr Pharm Des* 2011), jelenleg közlés alatt áll az „Effect of PACAP in central and peripheral nerve injuries” (Tamás et al.) című összefoglaló közleményünk is az *Acta Physiologica* című folyóiratban.

Az OTKA pályázatban tervezett kutatásokon kívül számos új kutatási témán is dolgoztunk az elmúlt időszakban, melyek ugyancsak közelebb vihetnek bennünket a PACAP protektív szerepének megismeréséhez – ezen belül a retinoprotektív és otoprotektív hatások megismeréséhez. Az egyik fontos kutatási téma a PACAP különböző klinikai mintákban történő meghatározása radioimmunoassay és tömegspektrometria segítségével. Eredményeink bizonyították a PACAP jelenlétét humán plazmamintákban, melynek koncentrációja viszonylag állandó értéket mutat. Mérsékelt magasabb koncentráció mérhető azonban terhes és szoptatós édesanyák mintáiban. Továbbá elsőként bizonyítottuk kísérleteinkben a PACAP jelenlétét az anyatejben, mely vizsgálatok során jelentős felhalmozódását találtunk (Börzsei et al., *Eur J Endocrinol* 2009). Hasonló eredményeket mutattunk ki háziállatok mintáiból is (Czeglédi et al. 2011). További vizsgálataink során igazoltuk a PACAP szignifikáns emelkedését a 2. és 3. trimeszterben, ami a szülés során szignifikánsan csökkent, de 3 nappal a szülést követően később ismét az átlag populációéval megegyező értéket mutatott (Reglődi et al., *J Endocrinol Invest* 2010). RIA segítségével feltérképeztük a PACAP38 és PACAP27 megoszlását a placentában és vizsgáltuk a PACAP hatását choriocarcinoma sejtek túlélésére is (Brubel et al., *J Mol Neurosci* 2010, Boronkai et al., *Ann NY Acad Sci* 2009). Tömegspektrometria segítségével vizsgáltuk a PACAP jelenlétét különböző klinikai mintákban (folliculus folyadék, magzatvíz, csarnokvíz, orrváladék stb.) (Brubel et al. *Mass Spectr* 2011). Ennek a technikának a további standardizációjával az a célunk, hogy különböző pathológiás folyamatokban esetleges eltérést mutassunk ki a PACAP koncentrációkban, beleértve szemészeti és fülészeti mintákat is.

A PACAP hatását különböző sejt kultúrákban is vizsgáltuk *in vitro*. Kimutattuk a PACAP védő hatását ischaemia-reperfúzió indukálta szívizomsejt károsodásban (Rácz et al., *Regul Pept* 2008), leírtuk a PACAP1-38 és 6-38 hatását cytotrophoblast kultúrában (Reglődi et al., *J Mol Neurosci* 2008) valamint a circadián ciklusra kifejtett hatását pinealocyta sejteken (Rácz et al., *J Mol Neurosci* 2008). A PACAP ischaemiás és oxidatív stressz indukálta vesekárosodásban *in vitro* és *in vivo* (Szakály et al., *J Mol Neurosci* 2008;

Neuropeptides 2011; Horváth et al., Neurosci Lett 2010, Transplant Proc 2010; J Mol Neurosci 2010, 2011; Brubel et al. Transplant Proc 2011) és bélkárosodásban (Ferencz et al., J Mol Neurosci, Transplant Proc 2009) betöltött szerepével kapcsolatban is több publikáció jelent meg az elmúlt években. A PACAP intravénás adása markánsan csökkenti a mortalitást és javítja a vesében kialakuló fokális tubuláris atrophia mértékét (Szakály et al., J Mol Neurosci 2008). Hasonló eredményeket kaptunk vékonybél ischemia/reperfúziós károsodásban, ahol azt is igazoltuk, hogy a PACAP tartalmú oldatban tartott vékonybél kisebb oxidatív károsodást mutat, melynek autotransplantációnál lehet jelentősége (Ferencz et al., J Mol Neurosci 2008). A PACAP vesében kifejtett hatásáról egy összefoglaló dolgozat is készült (Reglódi et al. Neuropeptides 2011). Ezen vizsgálatok során kidolgozott módszerekkel lehetőségünk nyílt a retinális pigment epithel sejteken végzett kísérletekre, melyek során a fenti már közölt eredményeken kívül tanulmányozzuk a pigment epithel sejtek apoptotikus és angiogenetikus markereit oxidatív stressz illetve hypoxia hatására, mely eredmények ugyancsak a PACAP retinoprotektív szerepének megismeréséhez járulhatnak hozzá. Ezen kísérletek jelenleg még folyamatban vannak, de eddigi kísérleteink alapján a PACAP jelentősen visszafordítja a stresszhatásokra bekövetkezett változásokat az apoptotikus és angiogenetikus marker profilban.

Munkacsoportunk kollaborációs munka keretében részt vesz puhatestűekkel kapcsolatos vizsgálatokban is. Több publikáció született *Eisenia fetida* (Molnár et al., Reg Pept 2008; Boros et al., Varhalmi et al., J Mol Neurosci 2008; Somogyi et al., Ann NY Acad Sci 2009) és *Helix pomatia* (Pirger et al., J Mol Neurosci 2008; Hernádi et al., Neuroscience 2008) fajokban végzett vizsgálatokból. Ezen vizsgálatok ugyan szorosan nem kapcsolódnak az OTKA-ban megjelölt témákhoz, de a vásárolt antitestek széleskörű tesztelése, valamint a PACAP alapvető biológiai szerepének megismerése segítheti a PACAP-pal kapcsolatos vizsgálatokat emlősökben is, ezen belül a szenzoros funkciók megismerése kapcsolódik az OTKA témához.