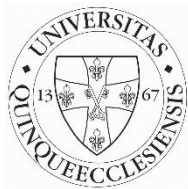


**A PACAP expressziójának és funkciójának vizsgálata a  
gasztrointesztinális traktus gyulladásos megbetegedéseiben és  
azok modelljeiben**

**Ph.D. tézis**

**Szerző: Dr. Illés Anita**

**Témavezetők: Prof. Dr. Reglódi Dóra  
Dr. Horváth Gabriella**



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Anatómia Intézet, I.sz.Belgyógyászati Klinika

2019

## 1. Bevezetés:

A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP) egy neuropeptid, mely a szekretin/glukagon/vazoaktív intesztinális polipeptid peptidcsalád tagja. Birka hipotalamuszból izolálták először a hipofízis sejt kultúrákban kifejtett adenilát cikláz aktiváló hatása révén. A szervezet egészében széles körben elterjedt, jól ismert számos élettani hatása a gasztrointesztinális traktusban is. A PACAP és receptorainak előfordulása, valamint azok funkciója jól ismert a neuroendokrin és az intersticiális sejtekben, a myentericus és submucosus plexusban a gasztrointesztinum egész hosszában, valamint a hasnyálmirigyben, epehólyagban, májban. A PACAP-nak számos, sokrétű hatását igazolták a gyomor-bél traktus egész területén. Befolyásolja a bélfal motilitását, gátolja az intersticiális Cajal-sejtek pacemaker aktivitását, regulálja a sphincter funkciót, hatással van a mirigyszekrécióra és a gyomorsav elválasztásra is. A gyomorban a corpus és a fundus területén relaxáló hatással bír, emellett PACAP immunoreaktív rostok találhatóak a gyomor ereinek falában is. A PACAP általános vazodilatátor hatása jól ismert, ez a vazodilatátor hatás a gyomor falában is érvényesül. Számos in vivo és in vitro vizsgálat igazolta a PACAP általános citoprotektív, antiapoptotikus, antioxidáns és antiinflammatorikus védő hatását. Ezen hatásait G-protein kapcsolt receptorokon fejt ki, így a specifikus PAC1, valamint a VPAC1, VPAC2 receptorokon, mely utóbbiakhoz a VIP egyenlő affinitással tud kötődni. A bélben a PACAP védő hatását számos vizsgálat során igazolták, így iszkémia-reperfüziós, vékonybél transzplantációs és gyulladásos bélbetegség modellekben. Vékonybél iszkémia esetén mind az endogén, mind az exogén PACAP védő hatású. A PACAP antiinflammatorikus hatását az immun és a gyulladásos sejtek gátlása révén fejt ki. Csökkenti a gyulladásos kemokinek és citokinek elválasztását, így a TNF- $\alpha$  és IL-6 felszabadulását, emellett gátolja a kemotaxist és a fagocitózist. Így a PACAP egy fontos endogén immunmoduláns fehérje számos gyulladásos betegség modellben. Korábban számos humán vizsgálat igazolta a PACAP szintjének változását a vastagbél betegségei esetén is. A rektum és a szigma területén talált tumorok szövettani mintáiban szignifikánsan alacsonyabb PACAP-szintet találtak, mint a normál nyálkahártya területéről vett mintákban, ugyanakkor tüneteket okozó vastagbél divertikuláris betegség, vagy manifeszt divertikulitisz esetén a mintákban a PACAP szintje kifejezetten emelkedett. Gyermekkorú colitis ulcerosa esetén a gyulladt területekről vett mintákban a PACAP-tartalmú idegrostok csökkenését igazolták. Egereken Toxoplasma gondii-indukálta experimentális akut ileitisz esetén profilaxisként alkalmazott exogén PACAP javítja a túlélést és az antiinflammatorikus citokin választ. Egy friss tanulmány igazolta a PACAP38 direkt antibakteriális hatását Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok esetén. Mindezen eredmények azt jelzik, hogy a PACAP direkt és indirekt módon is befolyásolja a bélfalot, és a bakteriális kolonizációt, amely összefüggésben állhat a PACAP génhányos egerek bélgyulladásra és béltumorokra való fokozott fogékonyságával. A PACAP-hányos egerek sokkal sérülékenyebben reagálnak mind a központi idegrendszerre, mind a perifériás szervekre, így a perifériás idegeket, vesét, béltraktust érintő inzultusokra. Dextrán-szodium-szulfát (DSS)-indukálta colitis esetén a PACAP-hányos egerek mortalitása 50 %-kal magasabb, mint a vad

egereké. Emellett a PACAP-hiányos egerek bélgyulladásra súlyosabb, mint a vad egereké, valamint a KO egerek 60 %-ában agresszív típusú colon tumor alakul ki. Érdekes ugyanakkor, hogy a naív PACAP-hiányos egerek intesztinális mukozájában nincs hisztopatológiai eltérés. Mégis az endogén PACAP hiánya fokozott fogékonyságot jelent a KO egér számára a bélgyulladás és a gyulladás indukálta vastagbél tumor kialakulására.

Számos korábbi tanulmány igazolta, hogy gerincesek esetén az egészség fenntartásában és a betegségek kialakulásában a bélflóra kulcsfontosságú. Jól ismert, hogy a bélflóra fontos szerepet játszik számos fiziológiai folyamatban, így az emésztésben, a zsírok metabolizmusában, a vitamin szintézisben, az intesztinális angiogenezisben, az enterális idegrendszer működésében, a kórokozókkal szembeni védekezésben, valamint az immunsejtek fejlődésében. Ellenben, ebben a komplex bél ökoszisztémában kialakult zavar, azaz a diszbiózis összefüggésben van a szervezet fokozott fogékonyságával számos bélbetegség (pl.: gyulladós bélbetegség, irritábilis bél szindróma, lisztérzékenység), valamint extraintesztinális immunpatológiai kórkép (pl.: sclerosis multiplex, autizmus, depresszió, allergia, asztma, kardiovaszkuláris megbetegedés) iránt.

## 2. Célkitűzés

1. A PACAP hatása sokrétű, antiapoptotikus, neuroprotektív, antiinflammatorikus, valamint sejttúlélést elősegítő hatása jól ismert. Vizsgálatunk célja volt meghatározni a PACAP hatását humán intesztinális epitéliumból származó INT407 sejtek esetén különböző károsító behatásokkal szemben, mint oxidatív stressz, in vitro hipoxia, gamma-sugárzás.

2. A bélrendszeri bakteriális infekciók kialakulása esetén döntő jelentőségű a baktériumok és az intesztinális epiteliális sejtek felszíne közt létrejövő adhézió. Célul tűztük ki a bakteriális adhézió vizsgálatát vékonybél eredetű INT407 és colon adenocarcinomból származó Caco-2 sejttenyészetben. Vizsgálatunkat kiterjesztettük az irányba, hogy további információt nyerjünk a PACAP hatásairól a bélrendszeri gyulladós folyamatok esetén INT407 sejttenyészet felhasználásával. Jól ismert, hogy PACAP KO egerek esetén a DSS-indukálta colitis súlyosabb formában jelenik meg, mint a vad egerekben. Ugyanakkor a bélflóra számos fiziológiai folyamatban jelentős szerepet játszik, emellett a diszbiózis kulcsfontosságú számos megbetegedés, így a gyulladós bélbetegség patogenezisében is. Emiatt célul tűztük ki a bélflóra összetételének összehasonlítását PACAP KO és vad egerek esetében.

3. A PACAP és receptorai a gasztrointesztinális traktus teljes hosszában jelen vannak. Korábban számos közlemény igazolta a PACAP különböző hatását a gyomor-bél traktus egész területén. Vizsgálatunk során célul tűztük ki a PACAP szintjeinek meghatározását a gyomor-bél traktus egyes gyulladós megbetegedései esetén humán szöveti minták felhasználásával.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. INT407-sejtek

Az INT407 sejtvonalat 2 hónapos humán embrió jejunumából és ileumából izolálták és széles körben alkalmazzák kutatási célokra. A sejteket Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) médiumban (Lonza, Switzerland) növesztették, melyhez 10% FBS-t (foetal bovine serum) (Biosera, USA) és 1% penicillin-streptomycint (Biosera, USA) adtunk. A sejteket tripszinnel (Trypsin/EDTA; Biosera, USA) történő izolálás után 96-lyukú microplate-re helyeztük és 10% FBS-t tartalmazó RPMI médiumban 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>-tartalom mellett inkubáltuk 24 órán keresztül.

#### 3.2. Caco-2 sejtek

A Caco-2 sejtvonalat humán colon adenocarcinomából izolálták, számos területen alkalmazzák a klinikai kutatásban. A sejteket magas glükóztartalmú DMEM/F-12 médiumban (Biosera, USA) növesztették, melyet 10 % FBS (foetal bovine serum) és 1% penicillin-streptomycin (Biosera, USA) hozzáadásával egészítettünk ki. A sejteket tripszinnel passzáltuk (Trypsin/EDTA; Biosera, USA), majd 10% FBS-t tartalmú DMEM médiummal hígítottuk. A vizsgálatokat megelőzően a sejteket 24 órán át, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó termosztátban inkubáltuk.

#### 3.3. PACAP38

Valamennyi vizsgálatunkhoz PACAP38-at használtunk, melyet Prof. Dr. Tóth Gábor laborjában szintetizáltak a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében. A kísérletekhez használt koncentrációkat korábbi in vitro kísérleteink során határoztunk meg.

#### 3.4. A PACAP INT407-sejtek proliferációjára kifejtett hatása

##### 3.4.1. Proliferációs teszt

A PACAP hatását a sejtproliferációra 96 lyukú plate segítségével vizsgáltuk. A sejteket az alábbi csoportokra osztottuk: kezelés nélküli kontroll csoport, különböző koncentrációjú PACAP-pal kezelt sejtek (10 nM, 100 nM, 1 µM). 24 órás inkubáció után a PACAP hatását a sejtproliferációra MTT-teszt ((3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, Hungary) segítségével vizsgáltuk.

##### 3.4.2. Klonogén assay

A PACAP INT407-sejtek klonogenitására kifejtett hatását klonogén assay segítségével vizsgáltuk. A sejteket 6-lyukú plate-re raktuk ki úgy, hogy 500 sejt/2ml médium jusson egy lyukba, majd a vizsgálat másnapján a sejteket vagy kezelés nélkül hagytuk, vagy 100 nM PACAP-pal kezeltük. 7 napos inkubációt követően a médiumot leöntöttük, a sejteket Coomassie brilliant blue-val festettük és a legalább 50 sejtet tartalmazó kolóniákat számláltuk.

### 3.3. *Oncology array*

Az oncology array segítségével vizsgáltuk a PACAP különböző tumorgenezisben szerepet játszó fehérje expressziójára kifejtett hatását (Proteome Profiler Human XL Oncology Array). A vizsgálathoz 6-lyukú plate-et használtunk, a kontroll csoportként használt INT 407-sejteket kezelés nélkül hagytuk, míg a másik sejtcsoporthoz 100 nM PACAP-ot adtunk, majd a vizsgálatot 24 órás inkubálást követően végeztük el. Inkubálás után a leöntött felülűszót felhasználva az array-t a gyártó leírása alapján készítettük elő és végeztük el. A membránokat egy órán át blokkoltuk, majd a felülűszóval egy éjszakán át 2-8°C-on rázógépen inkubáltuk. Lemosást követően a membránokat detektáló antitest koktéllal inkubáltuk egy órán át, majd ismételt mosást követően a membránokra HRP (horseradisch peroxidase)-konjugált sztreptavidint tettünk 30 percre, ezután a membránokra kemilumineszcens reagenst pipettáztunk, majd röntgenfilmre előhívtuk. A filmet szkennelés után ImageJ szoftver segítségével analizáltuk.

### 3.5. *A PACAP INT407-sejtekre kifejtet hatása gamma-sugárzás mellett*

#### 3.5.1. *Irradiációs kezelés*

Az INT407-sejtek irradiációjához telekobalt külső besugárzó berendezést alkalmaztunk (Theratron 780C, átlagos foton energia: 1.25 MeV), a besugárzást 0,5, 1, 2, 3 vagy 4 Gray sugárdózissal végeztük.

#### 3.5.2. *A sejtek viabilitása*

Az izolált sejteket 96-lyukú plate-re helyeztük (10000 sejt/well). A vizsgálathoz az alábbi sejtcsoportokat alkalmaztuk: kezelés nélküli kontroll csoport, 100 nM PACAP-pal kezelt csoport, 0,5, 1, 2, 4 Gy irradiációnak kitett sejtek, 0,5, 1, 2, 4 Gy irradiációnak kitett sejtek 100 nM PACAP-pal előkezelve. A PACAP-ot a kezelt csoporthoz a besugárzást megelőzően két órával adtuk. Az irradiációt követően 24 órával sejttúlélést vizsgáltunk MTT teszt segítségével.

#### 3.5.3. *Klonogén assay*

A sejt túlélés vizsgálata mellett a sejtek klónképző képességét is meghatároztuk klonogén assay segítségével. A fent leírtaknak megfelelően 6-lyukú plate-et használtunk, melybe a sejteket úgy raktuk ki, hogy lyukanként 500 sejt jusson. A vizsgálat másnapján a sejtek felét kezelés nélkül hagytuk, míg a másik felét 100 nM PACAP-pal kezeltük az irradiációt megelőzően két órával. 7 napos inkubációt követően a médiumot eltávolítottuk, majd a sejteket Coomassie brilliant blue-val festettük és a legalább 50 sejtet tartalmazó kolóniákat számláltuk.

#### 3.5.4. *Phospho-ERK 1/2 western blot*

A vizsgálathoz 6-lyukú plate-et használtunk, valamennyi lyukba  $10^6$  sejtet helyeztünk. A sejteket az alábbiak szerint csoportosítottuk: kezelés nélküli kontroll csoport, 100 nM PACAP-pal kezelt, 0,5 és 1 Gy irradiációnak kitett sejtek, 0,5 és 1 Gy irradiációnak kitett sejtek 100 nM PACAP-pal előkezelve. A vizsgálat másnapján, egy napos inkubáció után a sejtek membránját foszfatáz inhibitor ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )-tartalmú jéghideg lízis pufferben és proteáz inhibitor tartalmazó PBS-ben lizáltuk (Sigma, Hungary), majd 5 percig, 4 °C-on centrifugáltuk (12000x g) az

oldatot. A fehérjemintákat 12%-os SDS-poliakrilamid gélen (SDS-PAGE) szeparáltuk, majd nitrocellulóz membránra vittük át. A következő lépésben a membránokat sovány tejpörrel blokkoltuk, majd anti- $\beta$ -aktin és anti-p-ERK1/2 antitesttel (Cell Signaling Technology, USA) kezeltük. Másodlagos antitestként HRP-konjugált anti-nyúl IgG-t (Bio-Rad, Hungary) alkalmaztunk. Az előhívást ECL kemolumineszcens rendszer segítségével (Amersham Pharmacia Biotech, UK) végeztük.

### *3.6. A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása in vitro hipoxiában*

A PACAP in vitro hipoxiában kifejtett hatásának vizsgálata során az alábbi sejtcsoportokat alkalmaztuk: kezelés nélküli kontroll csoport, 100 nM PACAP-pal kezelt csoport, 500  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>-dal kezelt csoport, 100 nM PACAP+ szimultán adott 500  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>-dal együtt kezelt csoport vagy 100 nM PACAP+ 2 órával később 500  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> kezelés. A CoCl<sub>2</sub> kezelés 24 órán át tartott, majd a sejtek életképességét MTT assay-vel vizsgáltuk.

### *3.7. A PACAP INT407 sejtekre kifejtett hatása oxidatív stresszben*

A PACAP oxidatív stressz mellett kifejtett hatásának vizsgálata során az alábbi sejtcsoportokat alkalmaztuk: kezelés nélküli kontroll csoport, 100 nM PACAP-pal kezelt csoport, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt csoport, 100 nM PACAP+ szimultán adott 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vagy 100 nM PACAP előkezelés után 2 óra múlva 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt csoport. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést 24 órán át végeztük, majd a sejtek viabilitását MTT assay segítségével vizsgáltuk meg.

#### *3.7.1. RNS csendesítés*

Az exogén PACAP-pal történt vizsgálatok után olyan kísérletet végeztünk, melynek célja az endogén PACAP szerepének tisztázása RNS interferencia segítségével. A kísérlet során 5-5 nmol GAPD kontroll pool, Non-targeting pool és ADCYAP1 specifikus siRNS-t (Dharmacon, GE Healthcare, Lafayette, CO, USA ) oldottunk fel 1x RNáz-mentes pufferben. Az RNáz-mentes puffer összetétele: 60 mM KCl, 6 mM HEPES-pH 7, 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>. Valamennyi siRNS sejtekbe történő transzfekciójához DharmaFECT1 transzfekciós reagenst (Dharmacon, GE Healthcare, Lafayette, CO, USA) használtunk szérum mentes RPMI médiumban. A vizsgálathoz humán INT407-es sejt kultúrát használtunk. A kísérletek előtt wellenként 10<sup>4</sup> sejtet vettünk fel 96-lyukú lemezen. A gyártó leírását követve 25-25 nM GAPD kontroll pool-t, Non-targeting pool-t és ADCYAP1 siRNS-t oldottunk fel DharmaFECT1 transzfekciós reagens (Dharmacon, GE Healthcare, Lafayette, CO, USA) tartalmú, szérum mentes RPMI médiumban. A transzfekció során 200  $\mu$ l siRNS-t adtunk wellenként, majd a sejteket 48 órán át inkubáltuk. Az inkubációt követően a következő csoportokban kezeltük a mintákat: kezeletlen kontroll csoport, 100 nM PACAP-pal kezelt, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt, 100 nM PACAP-pal+1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt sejtek. A sejtek viabilitását MTT teszt segítségével mértük.

### 3.7.2. MTT-teszt

Az inkubációs periódust követően a sejtek viabilitását MTT-teszt segítségével vizsgáltuk. A vizsgálatához alkalmazott sárga színű MTT festéket lila színű formazánná alakítják az élő sejtekben lévő mitokondriális enzimek. Az inkubációs periódus végén a sejteket PBS-ben (Sigma, Hungary) átmoszuk, majd 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT-t tartalmazó PBS-t adtunk a sejtekhez és 3 órán át 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> tartalmazó közegben inkubáltuk. Ezt követően az oldatot leszívjuk és a formazán tartalmú partikulumokat 200 µl DMSO-val (dimetil-szulfoxid) feloldottuk, majd ELISA olvasó (Dialab Kft, Hungary) segítségével, 570 nm hullámhosszon lemértük az abszorbancia értéket.

### 3.7.3. Statisztikai analízis

Valamennyi vizsgálatot minimum három alkalommal ismételtünk meg. A statisztikai analízist kétutas ANOVA segítségével végeztük,  $p < 0,05$  valószínűséget tartottuk szignifikánsnak.

## 3.8. A PACAP hatásának vizsgálata a bakteriális adhézióra és a bélflórára

### 3.8.1. A bakteriális adhézió vizsgálata

A vizsgálat megkezdése előtt az INT407 és Caco-2 sejteket tripánkékekkel való festést követően megszámoltuk. A vizsgálatához 24-lyukú plate-et használtunk, valamennyi lyukba  $3 \times 10^5$  sejtet helyeztünk. Mind a vékonybélből származó INT407 sejteket, mind a vastagbél karcinómából származó Caco-2 sejteket 10 % FBS-t tartalmazó médiumban növesztettük antibiotikum nélkül, 5 % CO<sub>2</sub>-tartalom mellett, 37°C-on. A 24-lyukú plate well-jeinek felébe a médiumhoz 400 ng/ml PACAP38-at adtunk. 24 órás inkubálást követően a sejteket három alkalommal átmostuk 1ml/well DPBS-el (Dulbecco's phosphate-buffered saline), majd  $3 \times 10^8$  baktérium hozzáadásával megfertőztük a sejteket. 3 órán át, 5 % CO<sub>2</sub>-tartalom mellett, 37°C-on inkubáltuk, majd ismét három alkalommal mostuk át DPBS-sel. A baktériummal fertőzött sejtek kinyerése céljából az INT407 és Caco-2 sejteket átmostuk, valamennyi well-be 1 ml 0,1% Triton-X100-at, 0,25% tripszint tettünk, majd a plate-eket 10 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A lizátumokat ismételt pipettázással homogenizáltuk, majd tízszeres hígítás után 10 µl-t raktunk Mueller-Hinton agar lemezre és 24 órán át, 37°C-on inkubáltuk. A következő napon megszámoltuk a kolóniákat meghatározva ezzel a vékony- és vastagbélhámsejtekhez tapadt baktériumok mennyiségét. A vizsgálat során az alábbi baktériumokat használtuk: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833, *Enterococcus faecalis*. A vizsgálatot hat alkalommal ismételtük meg.

### 3.8.2. Citokin array

A PACAP citokin-expresszióra kifejtett hatását Proteome Profiler Human Cytokine Array kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével vizsgáltuk. A vizsgált INT407-sejteket 6-lyukú plate-re helyeztük, majd az alábbi sejtcsoportokat alkalmaztuk: kezelés nélküli kontroll csoport, 100 nM PACAP-pal 24 órán át kezelt csoport, 100 ng/ml lipopoliszachariddal (LPS) 24 órán át kezelt csoport, 100 nM PACAP-pal 2 órán át előkezelt, majd 24 órán át 100 ng/ml LPS-sel kezelt csoport. Az inkubációt követően a leöntött felülűszót összegyűjtöttük, majd a vizsgálatot a gyártói leírás alapján készítettük végeztük el. A kit valamennyi szükséges összetevőt tartalmazta. A membránokat egy órán át blokkoltuk, majd detektáló antitest koktéllal

inkubáltuk ismét egy órán át szobahőmérsékleten. Ezt követően a membránokat minta/antitest koktéllal egy éjszakán át 2-8 °C-on inkubáltuk. Lemosást követően a membránokra HRP (horseradisch peroxidase)-konjugált sztreptavidint tettünk 30 percre, majd a membránokra kemilumineszcens reagenst pipettáztunk, majd röntgenfilmre előhívtuk. Az adatokat ImageJ szoftver segítségével analizáltuk. A vizsgálatot három alkalommal ismételtük meg.

### 3.8.3. Statisztikai analízis:

A statisztikai analízist kétutas variancia analízis segítségével végeztük,  $p < 0,05$  valószínűséget tartottuk szignifikánsnak.

## 3.9. A bélflóra összetételének összehasonlítása PACAP-hiányos és vad egereknél

### 3.9.1. Kísérleti egerek

Mind a PACAP-hiányos (KO), mind a vad egerek nyitott ketrecekben nőttek fel standard körülmények között, 22-24 °C szobahőmérsékleten,  $55 \pm 15$  % páratartalom mellett a Pécsi Tudományegyetem Állatházában. Az egerek korlátlanul hozzáfértek sterilizált vízhez és standard élelemhez. A PACAP KO egerek genotípusa PCR segítségével volt megerősítve korábbi vizsgálataink során. Valamennyi állatkísérlet során az állatok jólétéről szóló Európai Irányelveket követtük (2010/63/EU), etikai bizottság jóváhagyását követően (BA02/2000-15024/2011).

### 3.9.2. A széklet bélflóra molekuláris analízise

Friss székletet gyűjtöttünk össze 2 hetes, 1 hónapos, 3 hónapos, 6 hónapos, 12 hónapos és 15 hónaposnál idősebb (15-18 hónap közötti) KO és vad egerektől, majd azt azonnal folyékony nitrogénbe téve fagyasztottuk és a mintákat feldolgozásukig -80 °C-on tároltuk. A vizsgálatra a Berlieni Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Laborjában került sor, ahol az egerek bélflórájának vizsgálata során *Enterobaktériumok*, *Enterococcusok*, *Lactobacillus*, *Bifidobaktérium*, *Bacteroides/Prevotella* spp., eger intesztinális *Bacteroides* törzsek, *Clostridium coccoides* csoport, és *Clostridium leptum* vizsgálatára került sor kvantitatív real-time PCR (qRT-PCR) segítségével. Jelen tézisben a DNS analízis pontos, részletes leírásától eltekintünk.

### 3.9.3. Statisztikai analízis:

Mann-Whitney *U* teszt (GraphPad Prism v5, La Jolla, CA, USA) segítségével határoztuk meg a szignifikanciát.  $p < 0.05$  valószínűséget tartottuk szignifikánsnak.

## 3.10. A PACAP vizsgálata humán szöveti mintákban

53 gyulladássos bélbetegségben szenvedő (23 Crohn-beteg, 30 colitis ulcerosás), valamint 13 ép nyálkahártyával bíró, funkcionális hasmenés miatt colonoscopián átesett beteg szöveti mintáiban hasonlítottuk össze a PACAP38 és 27 szinteket. A betegeket a vizsgálat során vett szövettani minta alapján soroltuk 3 alcsoportba: 1. akut gyulladással járó csoport, szövettani mintáiban kriptitisz, kripta abscessus vagy neutrofil granulocita infiltráció észlelhető, 2.



krónikus gyulladással bíró csoport, szövettani mintáiban limfocita vagy plazmasejtes infiltráció látható, 3. ép nyálkahártyával bíró csoport, szövettani mintáiban ép nyálkahártya észlelhető, gyulladással jelek nem láthatók. Mindemellett megvizsgáltuk, hogy akut gyulladás esetén a betegek által szedett antibiotikus kezelés (metronidazol vagy metronidazol/ciprofloxacín) befolyásolja-e a minták PACAP szintjét. Emellett 8 antrum gasztritiszben és 6 gyomorfekélyben szenvedő beteg szöveti mintáit is megvizsgáltuk. Antrum gasztritisz esetén a gyulladt és ép (corpus) nyálkahártya adatait, míg fekély esetén a fekélyalap, fekélyszél és az ép gyomor nyálkahártya szöveti mintáit hasonlítottuk össze, emellett *Helicobacter pylori* pozitívitás alapján is elvégeztük a szöveti minták PACAP szintjeinek összehasonlítását. A vizsgálatot az etikai bizottság előzetes engedélyével végeztük (2784,3117, Pécsi Tudományegyetem; 8-28/92 009-10 I 8EKU, ETT TUKEB). A vizsgált mintákat lemértük, majd jéghideg desztillált vízzel homogenizáltuk. A homogenizátumot lecentrifugáltuk (12.000 rpm, 4 °C, 30 min), majd a felülúszót felhasználva a vizsgálatok során a PACAP27 és 38 szinteket radioimmúnassay (RIA) módszerrel mértük. A vizsgálathoz PACAP38 “88111-3” antiszérumot (1:10.000 hígításban) és PACAP27 “88123” antiszérumot (1:45.000 hígításban) használtunk.

#### **4.Eredmények:**

##### *4.1.A PACAP INT407-sejtek proliferációjára kifejtett hatása*

A PACAP sejtproliferációra kifejtett hatását MTT-teszt segítségével vizsgáltuk. A túlélő sejtek aránya tekintetében az alkalmazott PACAP-koncentrációk egyike sem okozott szignifikáns változást. Mivel az MTT-teszt csak arról ad információt, hogy a sejtek élnek-e vagy sem, míg a klonogén túlélési teszt a súlyosan sérült élő, de már replikációra nem képes sejteket is tudja vizsgálni, így az eredmények pontosabb értékelése végett klonogén túlélési assay-t is végeztünk. A vizsgálat során a 100 nM koncentrációban alkalmazott PACAP nem befolyásolja a kolónia számot 7 napos inkubációs idő után. A PACAP viabilitást és kolóniaszámot befolyásoló hatása mellett a különböző tumorképződés-asszociált faktorok expressziójára kifejtett hatását is vizsgáltuk oncology array segítségével. A Proteome Profiler Human XL oncology array során a felülúszóban található szénsav-anhidráz IX, FoxO1 és p27 szintje szignifikánsan csökkent, míg az enoláz-2 és a galektin-3 expressziójában nem észleltünk változást.

##### *4.2.A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása gamma-sugárzás mellett*

A sejtek életképességének MTT-teszt segítségével való vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy valamennyi alkalmazott sugárdózis csökkentette a sejtek viabilitását és az irradiációt megelőzően 2 órával történt PACAP-előkezelés nem befolyásolta a túlélő sejtek arányát. Ezzel szemben az elvégzett klonogén assay azt mutatta, hogy a PACAP képes befolyásolni a gamma-sugárzásnak kitett sejtek klónképző képességét. Az irradiáció megváltoztatta a sejtek mitotikus aktivitását a használt dózistól függően, 0,5 Gy besugárzás esetén szignifikánsan nőtt, ugyanakkor 2, 3, illetve 4 Gy dózis alkalmazásakor jelentősen csökkent a klónképző potenciál. Mindemellett valamennyi esetben alacsonyabb proliferációs rátát eredményezett a PACAP-előkezelés, szignifikáns különbséget 0,5, 1 és 2 Gy sugárdózis alkalmazása esetén találtunk.

Ezen jelenség molekuláris biológiai hátterének elemzése céljából western blot vizsgálatot végeztünk, mely a p-ERK1/2 szintjének jelentős csökkenését mutatta PACAP-előkezelést követően 1 Gy dózisú irradiáció esetén.

#### 4.3.A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása in vitro hipoxiában

A kobalt-kloriddal végzett vizsgálat során a sejtek viabilitása szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest. A vizsgálat során a sejtekhez szimultán vagy a CoCl<sub>2</sub>-kezelés megkezdése előtt 2 órával adott PACAP a túlélő sejtek arányát nem változtatta meg, a sejttúlélés valamennyi esetben jelentősen csökkent.

#### 4.4.A PACAP INT407-sejtekre kifejtett hatása oxidatív stresszben

Az oxidatív stresszt 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hozzáadásával modelleztük. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilyen mennyiségben szignifikáns viabilitás-csökkenést eredményez, ugyanakkor elegendő még a túlélő sejtek száma a kísérletek elvégzéséhez. A PACAP-pal való előkezelés nem befolyásolta a túlélő sejtek arányát, ugyanakkor a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal szimultán adott PACAP szignifikánsan mérsékelte az oxidatív stressz hatását. Az exogén PACAP hatásának vizsgálata után kísérleteink az endogén PACAP szerepének feltérképezésére irányultak. Ezen célból ADCYAP1 siRNS transzfekciót végeztünk. A csendesítés után a sejtek életképességét MTT-teszt segítségével vizsgáltuk. Mind az siRNS-sel transzfektált, mind a nem csendesített csoportban a sejtek túlélését szignifikánsan csökkentette az oxidatív stressz. Ugyanakkor összehasonlítva a két csoport viabilitását, azt találtuk, hogy a csendesítésen átesett csoportban jelentősen alacsonyabb számú sejt maradt életképes, ezek a sejtek sokkal érzékenyebben reagáltak az oxidatív stressz károsító hatására. Exogén PACAP hozzáadása mellett mindkét csoportban mérsékelhető volt a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> okozta viabilitást-csökkentő hatás.

#### 4.5. A PACAP bakteriális adhézióra kifejtett hatása

A PACAP bakteriális adhézióra kifejtett hatásának vizsgálata során PACAP-pal előkezelt és kezeletlen INT407 és Caco-2 sejt kultúrák felhasználásával az alábbi baktériumokat vizsgáltuk: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833, és *Enterococcus faecalis* (klinikailag izolált). Vizsgálatunk során a PACAP-nak a vékony- és vastagbél sejtekhez kitapadt baktérium kolóniák számára kifejtett hatását vizsgáltuk. A vizsgált baktériumok közül egyik esetben sem észleltünk PACAP hozzáadása mellett szignifikáns változást a bakteriális adhézióban. A PACAP kezelés sem az INT407, sem a Caco-2 sejt kultúra esetén nem fejtett ki szignifikáns hatást a bakteriális adhézióra.

#### 4.6. A PACAP citokin-expresszióra kifejtett hatásának vizsgálata

A PACAP citokin expresszióra kifejtett hatását INT407 sejtenyészet felhasználásával, humán citokin array segítségével vizsgáltuk. A PACAP önmagában szignifikánsan emelte az IL-8 és IL-18 expresszióját, kis mértékben változtatta a CXCL-1 (C-X-C motif ligand 1) és a MIF

(macrophage migration inhibitory factor) expresszióját. 100 ng/ml lipopoliszacharid hatására magas CXCL-1, IL-8, IL-18 és MIF szinteket mértünk. Ez a változás IL-8 és IL-18 esetében szignifikáns volt. A PACAP-előkezelés csökkentette az LPS-indukálta emelkedett IL-8 és CXCL-1 expressziót. Mind a PACAP, mind az LPS egy enyhe, de nem szignifikáns, aktiváló hatást gyakorolt a MIF-re.

#### 4.7. A bélflóra összetételének vizsgálata PACAP KO és vad egereknél

A bélflóra összetételének vizsgálata során posztpartum 2 hetes kortól 18 hónapos korig vizsgáltuk a PACAP hiányos és vad egerek mintáit. Vizsgálatuk során életkor szerinti különbség is adódott, vad egerek esetén a 2 hetes és az 1 hónapos egerek esetében szignifikánsan több az Enterobaktériumok, így az *Escherichia coli* száma, mint 3 hónapnál idősebbeknél. PACAP KO egerekben az idősebb, 12 hónapos állatok szignifikánsan kevesebb Enterobaktériummal rendelkeznek, mint az 1 és a 3 hónapos társaik. Lactobacillusok esetén genotípustól függetlenül szintén a 3 hónaposnál fiatalabb állatok esetében észleltünk jelentősen magasabb csíraszámot. A Bifidobaktériumok vizsgálata során vad egerekben 2 hetes életkorban találtuk a legnagyobb csíraszámot, míg 6 hónaposnál idősebb állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt a Bifidobaktériumok jelenléte. Ugyanakkor PACAP-hiányos egerek esetében a Bifidobaktériumok valamennyi életkorban nagyon alacsony számban voltak jelen. Az obligát anaerob, Gram negatív baktériumokat vizsgálva a Bacterioides/Prevotella törzsek fiatalabb állatokban nagyobb számban voltak jelen, mint időseknél vad egerekben. PACAP-hiányos egerek esetében 3 hónapos korig volt észlelhető mérsékelt csökkenés, utána növekedést észleltünk. A *Clostridium coccooides* esetében vad egereknél enyhe csökkenés volt igazolható 15 hónapnál idősebb állatokban összehasonlítva a 3 hónapnál fiatalabbakkal, míg PACAP-hiányos egerek esetében 6 hónapos kor után észlelhető csökkenés a baktériumszámban a fiatalabb állatokkal összehasonlítva. PACAP KO és vad egerek bélflórájának összetételét összehasonlítva azt találtuk, hogy a teljes baktériumgénszámot tekintve nincs különbség a két csoport között, ugyanakkor az egyes baktériumokat külön véve jelentős különbségek voltak igazolhatók. Az Enterobaktériumok kisebb mennyiségben vannak jelen KO egerekben 1 hónapos életkorban, míg Enterococcusok esetében a 6 hónapnál idősebb állatokban észlelhető különbség, a vad egerekben magasabb számban mutatható ki. Az egér intesztinális Bacterioides törzsek mérsékeltén nagyobb mennyiségben voltak kimutathatók PACAP KO egerek bélflórájában 1 és 6 hónapos korban, míg későbbi életkorban, 12 hónaposnál idősebb egerek esetén Bacterioides/Prevotella spp., 15 hónapos kor után Lactobacillusok esetén volt hasonló változás igazolható. A legszembetűnőbb különbség azonban a Bifidobaktériumok esetén adódott, KO egereknél voltaképpen hiányzott a bélflórából, aminek komoly patofiziológiai jelentősége lehet egyes betegségek kialakulása esetén.

#### 4.8. A PACAP vizsgálata humán szöveti mintákban

Gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek szöveti mintáiban mért PACAP38- és PACAP27- szintek vizsgálata kapcsán azt találtuk, hogy Crohn-betegség esetén nem volt jelentős különbség a PACAP-szintekben az ép és gyulladt nyálkahártya adatait összehasonlítva,

míg colitis ulcerosa esetén az akut gyulladással járó megbetegedés mellett vett szöveti minták PACAP-szintjei jelentősen magasabbak voltak a normál nyálkahártyában mértékhez képest. Összehasonlítva az antibiotikumot szedő és antibiotikum-kezelésben nem részesülő colitis ulcerosás betegek mintáit, azt találtuk, hogy antibiotikum-szedés mellett szignifikánsan alacsonyabb mind a PACAP27, mind a PACAP38 szintje. Az antrum gastritiszben szenvedő betegek szöveti mintáinak vizsgálata során nem észleltünk jelentős különbséget a gyulladt antrum és az ép corpusminták PACAP38-szintjeinek összehasonlítása során. Összehasonlítva a *Helicobacter pylori* pozitív és negatív mintákat szintén nem találtunk szignifikáns különbséget. A gyomorfekély esetén a fekélyalap, fekélyszél és az ép gyomornyálkahártya szöveti mintáiban mérhető PACAP38 értékeiben szintén nem észleltünk szignifikáns különbséget.

## **5.Megbeszélés:**

### *5.1. A PACAP hatása különféle inzultusoknak kitett intesztinális epitél sejtekre*

Vizsgálatunk célja volt a PACAP vékonybélhámsejtekre kifejtett hatásának meghatározása. Vizsgálatunk első részében a PACAP sejtproliferációra és a sejtek klónképző képességére kifejtett hatását vizsgáltuk, majd a sejtciklusban szereplő, tumorképződésben részt vevő faktorok expressziójára kifejtett hatását teszteltük Proteome Profiler Human XL Oncology array segítségével. Eredményeinkben a PACAP önmagában alkalmazva nem változtatta meg a sejtek viabilitását MTT-teszt során és klonogén assay esetén sem befolyásolta a klónképző képességet. Mindez korábbi megfigyeléseinkkel összhangban van, mely szerint a PACAP önmagában való exogén adása nem befolyásolja in vitro az élő sejtek arányát. Human XL Oncology array során a PACAP szignifikánsan csökkentette a szénsav-anhidráz IX, FoxO1 és p27 expresszióját. A szénsav-anhidráz IX a vesetumrok kialakulásában játszó faktor, szintje szignifikánsan csökken PACAP-kezelés hatására. A FoxO1 az apoptózist és a sejtciklus felfüggesztését elősegítő peptid, szintje szintén szignifikánsan csökken PACAP hatására. A p27 (vagy Kip1) a ciklin-dependens kináz inhibitorok közé tartozik, melynek mind pozitív, mind negatív hatása lehet a ciklin-dependens kináz aktivitásra. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP részt vesz a sejtciklus szabályozásában INT407-sejtek esetén, de nincs jelentős hatása normál körülmények között. Vizsgálatunk következő részében a PACAP különböző stresszorok mellett kifejtett hatását vizsgáltuk. Első lépésben in vitro hipoxiát modellezve CoCl<sub>2</sub>-ot adtunk a sejtekhez, majd vizsgáltuk a PACAP hatását. Eredményeinkben sem a PACAP-előkezelés, sem a CoCl<sub>2</sub>-vel együtt adott PACAP nem javította jelentősen a sejtek túlélését. A következőkben a PACAP gamma-sugárzás mellett kifejtett hatását vizsgáltuk. Tekintettel arra, hogy a sugárterápiának komoly szövődménye a gyors turnover-ű bélhámsejteket károsító hatása, ezért vizsgálatunk célja volt meghatározni, vajon a PACAP befolyásolja-e a besugarazott vékonybélhámsejtek túlélését. A hipoxiánál tapasztaltakhoz hasonlóan a PACAP az irradiált sejtek túlélését nem befolyásolta, viszont csökkentette a sejtek klonogén potenciálját, azaz felerősítette a sugárzás károsító hatását. A háttérben zajló molekuláris mechanizmusok feltérképezése céljából végzett western blot során a p-ERK1/2 szintjének csökkenése volt detektálható 1 Gy sugárdózis esetén PACAP-előkezelés mellett. Az ERK egy antiapoptotikus hatású szignáltranszdukciós útvonal tagja, így a PACAP sugárzás okozta sejtkárosító hatásának fokozását támasztotta alá ez a vizsgálatunk is. A következő

stresszor alkalmazása esetén a PACAP az oxidatív stressznek kitett sejtek túlélését javította, de csak abban az esetben, amikor a PACAP-ot  $H_2O_2$ -dal együtt adtuk a sejtekhez. Az ionizáló sugárzás sejtkárosodáshoz vezető mechanizmusa több ponton megegyezik az oxidatív stressz esetén zajló folyamattal, amelynek során a hidrogén-peroxid-kezelés reaktív oxigéngyökök (reactive oxygen species, ROS) felszabadulásával vezet a sejtek károsításához. A gamma-sugárzás nagyon gyorsan ROS-képződéshez vezet, hidroxilgyök ( $OH^\cdot$ ), ionizált víz ( $H_2O^+$ ), hidrogén gyök ( $^{\cdot}H$ ) és hidrált elektronok ( $e_{aq}^-$ ) keletkeznek, majd szekunder ROS-termékek alakulnak ki ( $O_2^{\cdot-}$  és  $H_2O_2$ ). Ezek a ROS-termékek reaktív nitrogéngyökökkel együtt számos kaskádot indítanak el, melyek a sejtek károsodását okozzák. A PACAP gamma-sugárzás mellett kifejtett hatásának vizsgálata során azt találtuk, hogy a sejtek viabilitását a gamma-sugárzás csökkentette, azonban a sejtek életképességét a PACAP-előkezelés nem befolyásolta. A PACAP csak abban az esetben javította a sejtek túlélését, ha hidrogén-peroxiddal együtt adtuk a sejtekhez, viszont a kísérleti elrendezés miatt a besugarazott sejteket szimultán kezelni nem lehetett. A sejtek életképességének vizsgálatát mind MTT-teszt, mind klonogén assay segítségével elvégeztük, mivel az MTT-teszt csak arról ad információt, hogy a sejt a károsító faktor hatására elpusztult-e, míg a szenzitívebb klonogén assay arról is informál, hogy az élő sejt milyen mértékben károsodott, mivel a súlyosan károsodott sejtek nem képesek klónképzésre. Vizsgálatunk során a PACAP csökkentette az irradiált sejtek klonogén potenciálját valamennyi sugárdózis mellett, ugyanakkor a PACAP-kezelés irradiáció nélkül nem rontotta az INT407-sejtek klónképző képességét. A klonogén assay-t  $H_2O_2$ -kezelt sejtek esetén nem tudtuk alkalmazni, mivel ezek a sejtek nem élik túl a klonogén assay-vel járó hosszú kísérleti procedúrát. Mindezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a PACAP hatásai nagymértékben függenek az alkalmazás időpontjának megválasztásától. Ezt támasztja alá munkacsoportunk egy korábbi vizsgálata is, melynek során a PACAP protektív hatású volt a HTR8/SVneo humán trofoblaszt sejtekre 2 órával az oxidatív stressz kezdete előtt adva, de ugyanakkor a PACAP és a  $H_2O_2$  együttes alkalmazásakor nem befolyásolta az oxidatív stressz hatását. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az exogén PACAP hatásai nemcsak a sejt típusától, hanem az alkalmazás időpontjától és a celluláris stresszor fajtájától is függenek. Az exogén PACAP hatásainak vizsgálatát követően a sejtekben lévő, endogén PACAP szerepét vizsgáltuk posztttranszkripciós géncsendesítés segítségével. A vizsgálataink során használt sejt vonalat embrionális szövetből izolálták, ezek a sejtek az enteroendokrin sejteknek is prekursorai, így feltehetően tartalmaznak endogén PACAP-ot. Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy  $H_2O_2$ -indukálta oxidatív stressz-szel szemben az ADCYAP1 siRNS-sel történt transzfekció a sejtek fokozott érzékenységét váltotta ki, mely korábbi vizsgálatainkkal összhangban van, a PACAP-génhiányos egerek különféle károsító hatással szemben sokkal sérülékenyebbek, mind a vad típusú egerek. Ugyanakkor PACAP KO egerekből származó primer vesesejtkultúrát vizsgálva azt találtuk, hogy  $H_2O_2$ -indukálta oxidatív stressz mellett a sejtek túlélése rosszabb, annak ellenére, hogy normál körülmények között nincs különbség a PACAP KO és a vad egerekből származó sejtek között. Számos korábbi közlemény eredményei is azt támasztják alá, hogy a PACAP KO egerek valamennyi stresszor hatására sérülékenyebbek, mint a vad társaik, így renális iszkémia/reperfúzió mellett, kisagyi szemcsesejtek esetén in vitro, vékonybél-iszkémia és colitis in vivo modelljeiben. Mindezek az adatok jelenlegi vizsgálati eredményeinkkel összhangban azt támasztják alá, hogy az endogén PACAP-nak védő szerepe van a különböző szövetekben, különböző körülmények között,

különböző stresszorok mellett. Mind az exogén, mind az endogén PACAP-nak szabályozó szerepe van a vékonybél epiteliális sejtjeiben, de ez bizonyos keretek között érvényesül csak, elsősorban a stresszor típusától és a PACAP alkalmazási idejétől függően. A három különféle stresszorral (hipoxia, oxidatív stressz, ionizáló sugárzás) végzett vizsgálataink adatait összehasonlítva arra a következtetésre juthatunk, hogy a PACAP védi az oxidatív stressz-szel szemben a sejteket mind exogén, mind endogén formában, de nem képes az INT407-sejtek életképességét javítani gamma-sugárzás és in vitro hipoxia mellett.

## 5.2. A PACAP bakteriális adhézióra kifejtett hatásának vizsgálata

Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy a PACAP önmagában is, de különösen LPS beadása után befolyásolja a citokin-expressziót INT407 vékonybélhámsejtek esetén. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az endotoxin hatás után mérhető csökkent citokin-expresszió egy további tényező lehet a PACAP gyulladáscsökkentő hatásmechanizmusában a bélrendszer gyulladással járó folyamataiban. Vizsgálatunk során nem találtunk direkt hatást a bakteriális adhézióra, ami azt sugallja, hogy a PACAP nem befolyásolja közvetlenül a baktériumok bélhámsejtekhez való tapadását, azonban részt vesz a különböző kórokozók által indukált gyulladással járó reakciókban. Korábbi irodalmi adatok alapján is feltételezhető, hogy a PACAP közvetlen hatással lehet a baktériumokra és más kórokozókra. Egy a közelmúltban publikált vizsgálat igazolta, hogy a PACAP, valamint a vele rokon peptidek és analógok képesek közvetlen antibakteriális hatást kifejteni. Mind a PACAP38, mind a PACAP27, valamint a vele rokon VIP és szekretin rendelkezik antibakteriális hatással a Gram-negatív kórokozók, így például az *Escherichia coli*-val szemben. A PACAP hatással van a Gram-pozitív *Staphylococcus aureus*-ra is. Egy másik vizsgálat azt mutatta, hogy a PACAP mérsékelt sterilizáló hatást gyakorolt a *Pseudomonas aeruginosa*-val és az *Escherichia coli*-val szemben, míg ezt a hatást a többi peptid esetében nem lehetett ilyen markánsan bizonyítani. A PACAP emellett mérsékelt aktivitást mutatott a *Bacillus cereus* ellen is. A PACAP antibakteriális hatását membrán-permeabilizációs hatásnak találták anélkül, hogy toxikus mellékhatásokat okozna. Ezt támasztja alá a vörösvérsejtek zavartalan hemolitikus aktivitása. Mindezen adatok mellett szólnak, hogy a PACAP közvetlenül a baktériumokra hat. Vizsgálatunk során felvetettük, hogy a PACAP hatással van a baktériumok bélhámsejtekhez való adhéziójára is, azonban ezt igazolni nem tudtuk. Így jelenlegi tudásunk alapján úgy tűnik, hogy a PACAP védő hatást fejt ki a bél gyulladással járó megbetegedésekben mind direkt antibakteriális hatásával, mind citoprotektív hatásán keresztül anélkül, hogy befolyásolná a baktériumok bélfalhoz történő tapadását. A következő lépésben megvizsgáltuk a PACAP citokin-expresszióra való hatását INT407 sejtkultúra felhasználásával. Ismert, hogy a PACAP hatással van a gyulladással járó citokinek és kemokinek képződésére különböző sejtek esetén, ezért célul tűztük ki ezen hatás vizsgálatát vékonybélhámsejtek esetén. Azt találtuk, hogy a PACAP megváltoztatta számos citokin expresszióját. Az IL-8 a kemokincsalád tagja, mely erős kemotaktikus hatással rendelkezik és fontos szerepet játszik a gyulladással járó, autoimmun és fertőző megbetegedések esetén. Jelen vizsgálatunk során LPS hatására szignifikánsan megnőtt az IL-8 expressziója, amit a PACAP-kezelés képes volt megakadályozni. Eredményünk összhangban van Zhang és munkacsoportjának vizsgálati eredményével, akik a PACAP expresszió-csökkentő hatását írták le IL-1 $\beta$ -vel stimulált ARPE sejtek esetén. Vizsgálatunkban LPS hatására szignifikáns IL-18 expressziót is találtunk, melyet

azonban a PACAP-kezelés nem befolyásolt. LPS hatására emelkedett CXCL-1-expressziót mértünk, melyet a PACAP-előkezelés szignifikánsan csökkentett. Delgado és munkatársai korábban leírták a PACAP expresszió-csökkentő hatását LPS-stimulálta peritonealis makrofágok és mikroglia sejtek esetén. Összességében elmondható, hogy a PACAP képes számos citokin expresszióját befolyásolni. Ezt bizonyították már számos sejt és szövet esetében, így limfociták, asztrociták és mikroglia sejtek esetén, retina krónikus hipoperfúziós modelljében és a vesében diabéteszes és iszkémiás nefropátia esetén. A PACAP citokin-expresszióra kifejtett hatása különböző az egyes sejtek esetén és függ a károsító tényező típusától is. Számos esetben a PACAP önmagában nem hat a citokin-expresszióra, de ellensúlyozza a károsító tényező okozta változásokat. Összességében megfigyeléseink azt mutatják, hogy a PACAP nincs közvetlen hatással a baktériumok bélfalhoz történő adhéziójára, ugyanakkor képes ellensúlyozni az endotoxinnal kiváltott citokin-expressziót, ami valószínűleg hozzájárul a peptid jól ismert bélvédő hatásaihoz.

### 5.3. A bélflóra összetételének vizsgálata PACAP KO és vad egereknél

A béltraktus bakteriális kolonizációja közvetlenül a születés után kezdődik fakultatív anaerob, kommenzális baktériumok, így Enterobaktériumok, Enterococcusok, Lactobacillusok kolonizációjával. A székletben a bakteriális génszámok fokozatosan csökkennek az életkor előrehaladtával különösen 3 hónapos kor után. Ezzel szemben az obligát anaerob baktériumok, mint a Bacteroides és Clostridium törzsek és a Bifidobaktérium is általában folyamatosan jelen vannak. Vizsgálati eredményeink ennek megfelelőek voltak tekintetben, hogy az egér intesztinális Bacteroides törzsek száma egy hónapos korra megnőtt, habár a Bacteroides/Prevotella spp. száma alacsonyabb volt 15 hónapos kor után vad egerekben. Azonban a Bifidobaktériumok PACAP KO egerekben szinte alig voltak kimutathatók már 2 hetes korban is, míg vad egerekben 2 hetes korban volt a legmagasabb a szintjük, majd 3 hónapos kor után volt megfigyelhető enyhe csökkenés. A Bifidobaktériumok fontos szerepet töltenek be az intesztinális homeosztázisban, az alacsony Bifidobaktérium számmal jellemezhető diszbiózis számos immunpatológiai folyamatban játszhat szerepet, így IBD, irritábilis bél szindróma, cöliákia és atópiás megbetegedések esetén. Arra, hogy pontosan mivel magyarázható a Bifidobaktérium jótékony hatása genom alapú elemzések során derült fény. Ezek közül kiemelendő a laktát- és ecetsavtermelés, ezáltal az intraluminalis pH csökkentése, a funkcionális oxidatív stressz mechanizmusok aktiválása, mely az enterális patogénekkal szembeni védekezésben segít, emellett a Bifidobaktériumnak metabolikus hatásai vannak, így vitaminképzés, epesavak hidrolízise, konjugált lenolajsav termelés, oxalát lebontás. A számos jótékony hatása közül is talán a legfontosabb, hogy a *Bifidobacterium dentium* képes a béltraktusban a vizscerális szenzitivitást módosítani  $\gamma$ -amino-vajsav termelés által, amely primer gátló neurotranszmitter a központi idegrendszerben emlősöknél. Ezek alapján nagyon valószínű, hogy PACAP KO egerek esetén a Bifidobaktérium hiánya kulcsfaktor a különböző toxikus ágensek mellett észlelt fokozott sérülékenységekben és a különböző intesztinális és extraintesztinális immunpatológiai folyamatokra észlelt fokozott fogékonyság esetén.

#### 5.4. A PACAP vizsgálata humán szöveti mintákban

Gyulladásos bélbetegség esetén felmerül a PACAP védő hatása, IBD-ben szenvedő kutyák vékony- és vastagbélének mukozájában elhelyezkedő axon terminálisokban a PACAP fokozott expressziót mutat. A gyulladásos bélbetegség pontos patomechanizmusa a mai napig sem ismert, azonban az oxidatív stressz, a reaktív oxigén metabolitok szerepe egyértelmű a betegség kialakulásában. INT407-sejteken végzett vizsgálataink igazolták, hogy a PACAP védő hatást fejt ki az oxidatív stressz-szel szemben. Emiatt vizsgálatunk további célja volt meghatározni gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek szöveti mintáiban a PACAP szintjét, összehasonlítva ép, egészséges vastagbélnyálkahártyából vett szöveti minták PACAP-szintjeivel. Vizsgálataink során Crohn-betegség esetén a szöveti mintákban mért PACAP38- és PACAP27-szintekben nem volt jelentős különbség az ép és gyulladt nyálkahártya adatait összehasonlítva sem az akut, sem a krónikus gyulladásos csoport esetén. Colitis ulcerosában szenvedő betegek mintái esetén az akut gyulladással járó megbetegedés mellett vett szöveti minták PACAP-szintjei jelentősen magasabbak voltak a normál nyálkahártyában mértékhez képest. Akut gyulladás mellett észlelt magas PACAP-szinteket elsősorban a PACAP antiinflammatorikus hatásával magyarázhatjuk, a szövetekben jelen lévő gyulladásos citokinek hatására növekedett meg feltehetően a PACAP mennyisége. Emellett az antibiotikumot szedő és antibiotikum-kezelésben nem részesülő colitis ulcerosás betegek mintáit összehasonlítva azt találtuk, hogy antibiotikum-szedés mellett szignifikánsan alacsonyabb mind a PACAP27, mind a PACAP38 szintje. A bélflóra fontos szerepet játszik a gyulladásos bélbetegség patogenezisében és a szövődmények kialakulásában. A bélflóra megváltozása, különösen az intesztinális flóra diverzitásának csökkenése összefüggésben áll a krónikus bélgyulladással. Bizonyos kórokozók, mint a virulens *Escherichia coli* törzsek, bizonyos *Bacteroides* speciesek és a *Mycobacterium avium* szerepét már korábban összefüggésbe hozták a gyulladásos bélbetegség patogenezisével. Az antibiotikumok csökkenthetik ezen baktériumok koncentrációját a bél lumenében, valamint megváltoztatják a bélflóra összetételét. A klinikai gyakorlatban elsősorban a ciprofloxacint és a metronidazolt alkalmazzuk gyulladásos bélbetegség esetén. Vizsgálatunkban a betegek metronidazolt vagy kombinált ciprofloxacint és metronidazolt kezelést kaptak, mely mellett feltehetően csökkent a szövetekben a gyulladásos és immunsejtek jelenléte, feltehetően ezzel összefüggésben csökkent le a PACAP mennyisége is. A vékony és vastagbél mellett a PACAP a gyomor működésére is hat. Vizsgálataink során humán szöveti mintákban vizsgáltuk a PACAP-szinteket, ennek kapcsán 8 antrum gastritiszben és 6 gyomorfekélyben szenvedő beteg szöveti mintáit vizsgáltuk meg. A gastritiszes minták vizsgálata során nem találtunk jelentős különbséget a gyulladt és ép nyálkahártya adatait összehasonlítva, ugyancsak nem volt szignifikáns különbség a *Helicobacter pylori*-pozitív és -negatív betegek szöveti mintáiban mérhető PACAP38-szintek között. Fekélybetegség esetén látható volt különbség a fekély széli részéből vett minták PACAP-szintje és a normál nyálkahártya adatai között, tehát a tendencia hasonló volt, mint a korábban, patkányoknál kísérletes körülmények között talált különbség, mely szerint a fekély széli részén csökkent a PACAP-expresszió, azonban az értékeket kielemezve a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Feltehetően a különbség oka az, hogy állatkísérletek során kontrollált, egyéb betegségek nélküli, teljesen homogén csoportok vannak, viszont humán vizsgálatok során a betegek sokkal diverzebbek, mint az indukált fekélymodellben a patkányok.



## Köszönetnyilvánítás

Tisztelettel köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Dr. Reglődi Dóra professzor asszonynak és Dr. Horváth Gabriella docensnek a rengeteg segítségért, amit a tudományos munkám során nyújtottak nekem és ezáltal lehetővé tették a dolgozatom létrejöttét. Külön köszönet illeti Mercz Tünde asszisztensnőt a laboratóriumban elvégzett sok-sok munkáért, támogatásért és biztatásért. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Kerényi Mónika és Dr. Boronkai Árpád docenseknek, valamint Markus Heimesaat Professzor Úrnak, akik segítségükkel hozzájárultak a dolgozatom elkészültéhez. Szeretnék köszönetet mondani a PTE I. Belgyógyászati Klinika Gasztroenterológiai Tanszék munkatársainak a szövettani minták gyűjtésében való segítségükért. Végül köszönet illeti az Anatómiai Intézet valamennyi munkatársát, akik tudományos munkámat segítették, lehetővé tették.

GINOP-2.3.2-15- 477 2016-00050 “PEPSYS”

## PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

**Illés A**, Opper B, Reglődi D, Kerényi M, Czétány P, Boronkai A, Schäfer E, Tóth G, Fábián E, Horváth G. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on small intestinal INT407 cells. *Neuropeptides*. 2017; 65:106-113. (IF: 2,915)

**Illés A**, Horváth G, Schäfer E, Kerényi M, Opper B, Tóth G, Reglődi D. Effect of PACAP on bacterial adherence and cytokine expression in intestinal cell cultures. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2018; accepted (DOI: 10.1007/s10989-018-9748-z ) (IF: 1,132)

Reglődi D, **Illés A**, Opper B, Schäfer E, Tamás A, Horváth G. Presence and effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide under physiological and pathological conditions in the stomach. *Frontiers of Endocrinology (Lausanne)*. 2018;19:9:90.(IF: 3,519)

Heimesaat MM, Reifenberger G, Vicena V, **Illés A**, Horváth G, Tamás A, Fülöp BD, Bereswill S, Reglődi D. Intestinal microbiota changes in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)- Bifidobacteria make the difference. *European Journal of Microbiology and Immunology*. (Bp). 2017;11;7:187-199.

Horváth, G., **Illés, A.**, Heimesaat, M.M., Bárdosi, A., Bárdosi, S., Tamás, A., Fülöp, B.D., Opper, B., Németh, J., Ferencz, A., Reglődi, D., 2016. Protective intestinal effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. In: Reglődi Dóra, Tamás Andrea (Eds.), Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP, Springer Nature., New York, pp. 271–288.

## Egyéb, a dolgozat témájához nem kapcsolódó közlemények:

Balázs A, Ruffert C, Hegyi E, Hritz I, Czákó L, Takács T, Szepes Z, Németh BC, Gervain J, Izbéki F, Halász A, Kelemen D, Szmola R, Novák J, Crai S, **Illés A**, Vincze Á, Molnár Z, Varga M, Bod B, Farkas G Jr, Sümegi J, Szepes A, Dubravcsik Z, Lásztity N, Párniczky A, Hamvas J, Andorka C, Veres G, Szentkereszty Z, Rakonczay Z Jr, Maléth J, Sahin-Tóth M, Rosendahl J, Hegyi P, ; Hungarian Pancreatic Study Group. Genetic analysis of the bicarbonate secreting anion exchanger SLC26A6 in chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2015;15:508-513. ( IF: 2,406)

Horváth G, Opper B, Czétány P, **Illés A**, Tóth G, László E, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human proximal tubule cells against gentamicin toxicity. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2017 (IF 2017: 1,132)

**Illés A**, Farkas N, Hegyi P, Garami A, Szabó I, Solymár M, Pétervári E, Balaskó M, Pár G, Sarlós P, Bajor J, Szűcs Á, Czimmer J, Szemes K, Vincze Á. Is Heller myotomy better than balloon dilation? A meta-analysis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*. 2017;26:121-127. (IF: 1,964)

**Illés A.**, Király Á. A székrekedés okának felderítése és a terápiás lehetőségei. *Magyar Radiológia*. 2007; 81:24-30.

**Illés A.**, Vincze Á., Solt J. A cardia pneumatikus tágításának hatékonysága achalasiában. *Magyar Belorvosi Archivum*. 2012;65:45-49.

Kalmár K, Baracs J, **Illés A**, Czimmer J, Weninger C, Horváth OP. Functional proctology at the University of Pécs. *Magyar Sebészet*. 2012;65:370-379.

Király Á, Czimmer J, **Illés A**, Mózsik Gy, Sütő G. Otilonium bromide enhances sensory thresholds of volume and pressure in patients with irritable bowel syndrome. *Digestive Diseases and Sciences*. 2003;48:1872.

Király Á, Csizmadia Cs, **Illés A**, Undi S. Investigation of visceral hyperesthesia in irritable bowel syndrome. *Orvosi Hetilap*. 2006;147:23-28.

Király Á., **Illés A.**, Undi S., Varga G., Kalmár K., Horváth Ö.P. Gastroesophageal reflux disease progressing to achalasia. *Diseases of the Esophagus*. 2005;18:355-358.

Márta K, Farkas N, Szabó I, **Illés A**, Vincze Á, Pár G, Sarlós P, Bajor J, Szűcs Á, Czimmer J, Mosztbacher D, Párniczky A, Szemes K, Pécsi D, Hegyi P. Meta-analysis of early nutrition: the benefits of enteral feeding compared to a nil per os diet not only in severe, but also in mild and moderate acute pancreatitis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;20;17. (IF: 3,226)

Mikó A, Pótó L, Mátrai P, Hegyi P, Füredi N, Garami A, **Illés A**, Solymár M, Vincze Á, Balaskó M, Pár G, Sarlós P, Bajor J, Tenk J, Rostás I, Pétervári E. Gender difference in the effects of interleukin-6 on grip strength-a systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatrics*. 2018;18:107. (IF: 2,866)

Pár G, Trosits A, Pakodi F, Szabó I, Czimmer J, **Illés A**, Gódi S, Bajor J, Sarlós P, Kenyeres P, Miseta A, Vincze A, Pár A. Transient elastography as a predictor of oesophageal varices in patients with liver cirrhosis. *Orvosi Hetilap*. 2014;155:270-276.

Párniczky A, Kui B, Szentesi A, Balázs A, Szűcs Á, Mosztbacher D, Czimmer J, Sarlós P, Bajor J, Gódi S, Vincze Á, **Illés A**, Szabó I, Pár G, Takács T, Czakó L, Szepes Z, Rakonczay Z, Izbéki F, Gervain J, Halász A, Novák J, Crai S, Hritz I, Góg C, Sümegi J, Golovics P, Varga M, Bod B, Hamvas J, Varga-Müller M, Papp Z, Sahin-Tóth M, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Prospective, multicentre, nationwide clinical data from 600 cases of acute pancreatitis. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165309. (IF: 2,806)

Pécsi D, Farkas N, Hegyi P, Balaskó M, Czimmer J, Garami A, **Illés A**, Mosztbacher D, Pár G, Párniczky A, Sarlós P, Szabó I, Szemes K, Szűcs Á, Vincze Á. Transpancreatic sphincterotomy has a higher cannulation success rate than needle-knife precut papillotomy-a meta-analysis. *Endoscopy*. 2017;49:874-887. (IF: 6,629)

Rostás I, Póto L, Mátrai P, Hegyi P, Tenk J, Garami A, **Illés A**, Solymár M, Pétervári E, Szűcs Á, Párniczky A, Pécsi D, Rumbus Z, Zsiborás C, Füredi N, Balaskó M. In middle-aged and old obese patients, training intervention reduces leptin level: A meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182801. (IF: 2,766)

Rumbus Z, Matics R, Hegyi P, Zsiborás C, Szabó I, **Illés A**, Pétervári E, Balaskó M, Márta K, Mikó A, Párniczky A, Tenk J, Rostás I, Solymár M, Garami A. Fever is associated with reduced hypothermia with increased mortality in septic patients: A meta-analysis of clinical trials. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170152. (IF: 2,766)

Sarlós P, Szemes K, Hegyi P, Garami A, Szabó I, **Illés A**, Solymár M, Pétervári E, Vincze Á, Pár G, Bajor J, Czimmer J, Huszár O, Varjú P, Farkas N. Steroid but not biological therapy elevates the risk of venous thromboembolic events in inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2018;12:489-498. (IF: 6,637)

Szabó IL, Matics R, Hegyi P, Garami A, **Illés A**, Sarlós P, Bajor J, Szűcs A, Mosztbacher D, Márta K, Szemes K, Csekő K, Kövári B, Rumbus Z, Vincze Á. PPIs Prevent Aspirin-Induced Gastrointestinal Bleeding Better than H2RAs. A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*. 2017;26:395-402. (IF:1,1964)

Szűcs Á, Marjai T, Szentesi A, Farkas N, Párniczky A, Nagy G, Kui B, Takács T, Czakó L, Szepes Z, Németh BC, Vincze Á, Pár G, Szabó I, Sarlós P, **Illés A**, Gódi S, Izbéki F, Gervain J, Halász A, Farkas G, Leindler L, Kelemen D, Papp R, Szmola R, Varga M, Hamvas J, Novák J, Bod B, Sahin-Tóth M, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Chronic pancreatitis: multicentre prospective data collection and analysis by the Hungarian Pancreatic Study Group. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171420. (IF: 2,766)

Varjú P, Farkas N, Hegyi P, Garami A, Szabó I, **Illés A**, Solymár M, Vincze Á, Balaskó M, Pár G, Bajor J, Szűcs Á, Huszár O, Pécsi D, Czimmer J. Low fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols (FODMAP) diet improves symptoms in adults suffering from irritable bowel syndrome (IBS) compared to standard IBS diet: A meta-analysis of clinical studies. *PLoS One*. 2017 Aug 14;12(8):e0182942. (IF: 2,766)

