

A PACAP CITOPROTEKTÍV HATÁSAINAK VIZSGÁLATA VESÉBEN ÉS TOBOZMIRIGYBEN

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Horváth Gabriella

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet

Pécs, 2010



Programvezető: Dr. Csernus Valér
egyetemi tanár

Témavezetők: Dr. Reglődi Dóra
egyetemi docens

Dr. Csernus Valér
egyetemi tanár

I. 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 peptid a szervezetben 27 és 38 aminosavas formában fordul elő, melyek közül utóbbi a domináns. A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intesztinális peptid családba tartozó polipeptid, melynek N-terminális szakasza 68%-os homológiát mutat a VIP-pel. Legnagyobb mennyiségben a központi és a perifériás idegrendszerben található, de jelenléte kimutatható nem-neuronális szövetekben is. A PACAP hatásait G-protein receptorokon keresztül fejtik ki. 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.

A PACAP védő hatását korábban főként különböző idegrendszeri károsodások modelljeiben mutatták ki. Azóta azonban számos tanulmány igazolta a peptid protektív hatását nem-neuronális szövetekben is, többek között szívizom-, endothelsejtekben, hypophysis adenoma sejtekben, ovarialis follicularis sejtekben, T-lymphocytákban. Ugyanakkor a PACAP protektív hatása nem minden sejtípusban érvényesül. Korábbi vizsgálataink során azt találtuk, hogy károsító hatásnak kitett JAR human choriocarcinoma sejtek esetén a peptid nem növelte a sejt túlélést. A PACAP védő hatásának hátterében feltehetőleg antiapoptotikus, ill. antiinflammatorikus hatása áll.

2. A PACAP RENOPROTEKTÍV HATÁSA

A PACAP vesében kifejtett hatásai még nem minden részletében ismertek. Élettani jelentőségét valószínűsíti mindhárom receptorának jelenléte.

A PACAP renoprotektív hatását korábban igazolták myeloma multiplex okozta károsodásban, ahol csökkentette a TNF- α szintjét patkány vesében. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során igazolódott, hogy intravénásan adott PACAP szignifikánsan

javítja a vese ischaemia/reperfúzióknak kitett állatok túlélését, emellett csökkenti a tubuláris károsodás mértékét. 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 vizsgálatainak során bebizonyosodott, hogy a PACAP neuroprotektív hatása a Parkinson-kór kísérletes állatmodelljében egyértelmű nem- és korfüggést mutat. A korkülönbség mellett nemi különbségek is megfigyelhetők voltak. Emellett, a PACAP gonadotrop sejtekre kifejtett hatásai függenek a kezelés időpontjától, valamint nőstény patkányok esetén a ciklus-állapottól. 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.

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. 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. Madár pinealocyták *in vitro*, sejtenyészetben megtartják a melatonin termelés circadian ritmusát. 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.

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. Ennek megfelelően 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 hátterében 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.

II. A PACAP RENOPROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. PACAP szerepének vizsgálata PACAP knockout (KO) egereken

I/1. In vitro vizsgálatok

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 sejtenyészeten végeztük. A vesék eltávolítását követően 48 óra múlva mind a vad, mind pedig a PACAP knockout egerek veséiből származó sejteket csoportokra osztottuk és a következőképpen kezeltük: kontroll csoport kezelés nélkül; 0,5, 1,5 és 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 vizsgálatkor tapasztalt magasabb fokú érzékenység enyhíthető-e exogén PACAP kezeléssel. A sejteket a fent leírt körülményekkel azonos módon nyertük,

majd 48 óra után kezeltük őket. Az alkalmazott csoportok: kontroll csoport kezelés nélkül; 10 nM és 100 nM PACAP1-38-cal; 0,5 mM (4h), illetve 1 mM (2h) H₂O₂-dal önállóan; 0,5 mM (4h), illetve 1 mM (2h) H₂O₂-dal és 10 vagy 100 nM PACAP1-38-cal együttesen kezelt sejtek.

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 előzőekhez hasonlóan mind a vad, mind pedig a PACAP KO egerek veséiből származó sejteket csoportokra osztottuk és a következőképpen kezeltük: kontroll csoport kezelés nélkül; 500 µM CoCl₂. 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, majd az abszorbancia ELISA leolvasó segítségével 570 nm hullámhosszon mérhető, amely arányos az élő sejtek számával.

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 10µm vastagságú sorozat metszeteket készítettünk. A metszeteket haematoxylin-eosinnal, illetve PAS-sal (perjódsav–Schiff) festettük. A metszetekben az alábbi morfológiai jegyeket értékeltük: tubuláris dilatáció, megtartott PAS+ glycocalyx réteg a proximalis tubulusban, gyulladós sejtek (lymphocyta, 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 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. 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 sejteket 2, illetve 4 órán keresztül kezeltük. Ezt követően azt vizsgálandó, hogy melyik a legkisebb még hatást mutató PACAP-koncentráció, kísérleteink során alacsonyabb PACAP-koncentrációkat (10pM, 100pM, 1nM, 10 nM) alkalmaztunk. 1., kontroll csoport kezelés nélkül,

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

A vizsgálatok során 300-350 g súlyú hím Wistar patkányokat isoflurannal altattunk. A műtét előtt 100 IU/kg heparinnal, illetve intravénásan vagy PACAP-pal (100 µg PACAP1-38 100 µl fiziológiás sóoldatban oldva) vagy vivőanyaggal (100 µl fiziológiás 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. Ezt követően a Bcl-2 mennyiségét Western blot segítségével vizsgáltuk.

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

Isofluran anaesthesia mellett hím Wistar patkányok jobb v. jugularisába heparint (100 IU/ttkg) injektáltunk. Emellett a laparotomiát megelőzően az állatok vagy intravénásan 100µg PACAP-ot, vagy 100µl fiziológiás 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-, vivőanyag-kezelt

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

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.

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

Kísérleteinket szintén 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 specifikus és szenzitív radioimmunoassay módszerrel határoztuk meg a PACAP1-27 és PACAP1-38 mennyiségét.

EREDMÉNYEK

I. PACAP szerepének vizsgálata PACAP knockout egereken

I/1. *In vitro* vizsgálatok

A vad típusú, illetve PACAP KO egerekből származó vesesejtek életképességének vizsgálatakor az alkalmazott H₂O₂-kezelés dóziszfüggő módon csökkentette a sejtek életképességét. Mind a 2 órás, mind pedig a 4 órás H₂O₂-kezelést kapott csoportokban azt figyeltük meg, hogy a PACAP KO egerek veséiből származó sejtek szignifikánsan érzékenyebben reagálnak a H₂O₂-indukálta oxidatív stresszre. Exogén PACAP adását követően a PACAP KO egerekből származó vesesejtek oxidatív stressz által kiváltott károsodása szignifikánsan kisebb mértékűnek bizonyult. CoCl₂-indukálta *in vitro* hypoxia esetében a H₂O₂-kezelés során megfigyeltékhez hasonló eredményt kaptunk. Az alkalmazott CoCl₂-kezelés szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét. Mind a 24

órák, mind pedig a 48 órák kezelését kapott csoportokban szignifikáns mértékű különbséget találtunk a vad, illetve PACAP KO egerekből származó vesesejtek túlélésében.

I/2. PACAP knockout egerek veséjének szövettani vizsgálata

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

A kontroll (nem leköttött oldali) vesékben szignifikáns különbséget figyeltünk meg a Bowman-tok tágulatában a vad, illetve PACAP knockout egerek veséinek vizsgálatakor.

A kontroll vesék esetében tapasztalt megfigyelésekkel szemben, markáns különbség mutatkozott renális ischaemia/reperfúzió esetében, mind a 45, mind pedig a 60 percig tartó ischaemia esetén. A PACAP knockout egerek veséiben szignifikánsan súlyosabb formában jelentkeztek az ischaemiás károsodásra jellemző eltérések tubuláris degenerációval, valamint lymphocita beszűrődéssel. A vad egerekhez képest, a PACAP knockout egerek veséiben az ischaemia/reperfúzió szignifikáns mértékben súlyosabb fokú károsodást eredményezett.

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.

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 a vesesejtek túlélésére. 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. Ezt követően alacsonyabb PACAP-koncentrációkat használtunk annak vizsgálatára, hogy megállapítsuk a PACAP legalacsonyabb, de még protektív hatású koncentrációját. Vizsgálataink során azt figyeltük

meg, hogy a PACAP sejt túlélését elősegítő hatása már 100 pM koncentrációban detektálható.

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, 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. Mindkét esetben – reperfúzió esetén, illetve közvetlenül az ischaemiát követően – a megelőző PACAP-kezelés képes volt meggátolni az ischaemia/reperfúzió indukálta Bcl-2 csökkenést.

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. 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.

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.

Vizsgálataink során PAC1 receptor immunpozitivitást detektáltunk az általunk vizsgált vesemetszetekben. Erősebb jelölődést találtunk a vese kéregállományában, különösen a

tubulusok kanyarultas szakaszain. Kevésbé intenzív immunreaktivitást találtunk a velőállomány területén.

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

A RIA mérések során mind a kéregállomány, mind pedig a velőállomány területén PACAP38- és PACAP27-szerű immunreaktivitás (IR) volt megfigyelhető. 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 intakt 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.

A velőállományban sem a PACAP27, sem a PACAP38 szintje nem mutatott szignifikáns eltérést az intakt oldalon. Ezzel szemben az ischaemiás oldalon, 1 óra reperfúziót 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.

MEGBESZÉLÉS

I. PACAP szerepének vizsgálata PACAP knockout egereken

Az oxidatív stressznek kitett vesesejtek vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a vad és a PACAP knockout egerekből származó sejtek esetén szignifikáns különbség mutatkozott, mégpedig a PACAP KO egerekből származó sejtenyészet szignifikánsan érzékenyebben reagált a H₂O₂-indukálta oxidatív stresszre és a CoCl₂-indukálta *in vitro* hypoxiára. 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.

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. 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.

A vad és PACAP knockout egerekből származó vesék szövettani analízise során nem találtunk nagyfokú különbséget a vese morfológiájában. Ezek az eredményeink azt mutatják, hogy az endogén PACAP hiánya nem eredményez morfológiai eltéréseket. Ennek hátterében két lehetséges mechanizmus szerepe feltételezhető: vagy bizonyos kompenzatorikus mechanizmusok veszik át az endogén PACAP szerepét, vagy a PACAP nem játszik szerepet az intrauterin fejlődési folyamatokban.

A 45, illetve 60 perces ischaemiának kitett vesék esetében szignifikáns különbséget figyeltünk meg a vad, illetve PACAP knockout egerek között. Ischaemia/reperfúzió esetén a KO egerek szövettanilag detektálhatóan súlyosabb károsodást szenvedtek. Ezen eredményeink összhangban vannak primer vesesejttenyészetben végzett vizsgálatainkkal.

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 sejtmagokban mutat eltérést illetve hosszú távon befolyásolja a veseműködést.

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.

II. PACAP vizsgálata patkány vesében

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

A hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid sejtülélést elősegítő hatása neuronális és nem-neuronális szövetekben is kimutatható. Protektív hatása igazolható a vesében is. 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.

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 preoperatívén adott intravénás PACAP-kezelés képes volt enyhíteni az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje szintjének csökkenését, amennyiben azt a károsodás szignifikáns mértékben csökkentette. Vizsgálatainkban 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.

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 produkciót csökkentő hatása is feltételezhető.

A PACAP proinflammatorikus citokinekre kifejtett gátló hatása jelentős szerepet játszik különféle gyulladásos állapotokban megfigyelt protektív hatásában. 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 többi, vizsgált citokin esetében az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között nem találtunk eltéréseket. 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.

A PACAP specifikus receptora, a PAC1 receptor elleni antitesttel végzett immunfestéssel vizsgáltuk a receptor patkány vesén belüli eloszlását. Vizsgálataink során intenzívebb jelölődést találtunk a vesetubulusokban, a velőállományban enyhébb fokú immunpozitivitás volt megfigyelhető. 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.

Bár ezen változások pontos mechanizmusa, illetve funkcionális jelentősége nem tisztázott, az emelkedett endogén PACAP szint valószínűleg a PACAP renoprotektív hatásának tudható. 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.

III. A PACAP HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA TOBOZMIRIGYBEN

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálatainkhoz napos csibék tobozmirigyéből nyert primer sejtenyészetet használtunk.

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

A sejteket tripszines emésztést követően 5-5 csoportra osztottuk: kontroll csoport kezelés nélkül; csak 100 nM PACAP1-38-cal; 1 mM H₂O₂-dal önállóan; 1mM H₂O₂-dal, illetve PACAP1-38-cal szimultán kezelt sejtek; 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 nekrozis detektálása annexin V/propidium jodid festéssel

Az eljárás a sejthalál típusainak elkülönítésére alkalmas. Az annexinV-t propidium jodid

festéssel együtt alkalmaztuk és így az annexinV pozitív apoptotikus sejtek elkülöníthetővé váltak a propidium jodid pozitív nekrotikus sejtektől. 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: kontroll csoport kezelés nélkül; 1 nM PACAP1-38-cal; 10 nM PACAP1-38-cal; 100 nM PACAP1-38-cal kezelt sejtek. A p38 MAPK és 14-3-3 fehérjéket áramlási citometriás módszerrel határoztuk meg.

EREDMÉNYEK

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

Az annexin V/propidium jodid festés során eredményeink azt mutatják, hogy a H₂O₂-kezelt csoportban az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent mind 9, mind pedig 21 órákor alkalmazott kezelés esetén. A H₂O₂-kezeléssel egyidőben történt PACAP szignifikánsan emelte az élő sejtek arányát, amennyiben a kezelés 21 órákor történt. Reggel 9 órákor az oxidatív stressznek kitett sejtekhez adott PACAP nem befolyásolta az élő sejtek számát. A PACAP 21 órákor tapasztalt védő hatását az antagonistá PACAP6-38 képes volt megakadályozni.

2. PACAP hatásának vizsgálata a jelátviteli útvonalakra

A kontroll csoportban a p38MAPK foszforilációjában a vizsgált 24 órában szignifikáns változásokat detektáltunk. A foszfo-p38 MAPK-t legnagyobb intenzitásban a 16 óras 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, míg 10 nM PACAP minden vizsgált időpontban szignifikáns eltérést eredményezett. A foszforilációs szint változásai hasonlóak voltak a kontroll csoportban megfigyeltékhez, viszont ahhoz képest az alkalmazott

PACAP-kezelés a napszaki mintázatot 4 órával eltolta. 100 nM koncentrációjú PACAP alkalmazása esetén a p38 MAPK foszforilációjában nem találtunk szignifikáns eltéréseket a vizsgált időpontok között a kontroll mintákban megfigyelt változásokkal ellentétben. 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. 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. Az általunk alkalmazott legmagasabb koncentráció fokozta a 14-3-3 expresszióját délben, éjfélkor és 20 órakor. A többi időpontban nem találtunk jelentős különbséget a kontroll és a PACAP-kezelt csoportok között.

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 kezelések 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 antagonistá, PACAP6-38 meggátolta a PACAP1-38 sejttúlélést segítő hatását.

Korábbi tanulmányok igazolták a PACAP sejttúlélést serkentő szerepét különböző neuronális sejtekben. A PACAP hasonló protektív hatást mutat károsító hatásoknak kitett

nem-neuronális sejtekben, ú.m. endothel-, szívizomsejtekben és lymphocytákban. A pinealocyta 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. Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP serkenti az oxidatív stressz károsító hatásának kitett pinealocyta túlélését, viszont ezen protektív hatás megléte függ a circadian biológiai óra fázisától. Kimutattuk, hogy a PACAP sejt túlélést 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 sejttenyészetben vizsgáltuk a p38 MAPK és a 14-3-3 fehérje circadian változásait, illetve a PACAP hatásait ezen mechanizmusokra.

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 (AA-NAT), ezzel stabilizálva és megvédve azt a proteolitikus hatásoktól. Jelen eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP a tobozmirigy sejtjeiben 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 AA-NAT enzimhez való kapcsolata szintén a csirke pinealocytaokban található molekuláris óra hatása alatt áll.

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

IV. 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 gyulladáshoz vezető 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 sejttípusokban 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 dóziszfüggőek, valamint függnak a biológiai óra aktuális állapotától.

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

Jelen PhD. dolgozat alapjául szolgáló közlemények

1. **Horváth G**, Márk L, Brubel R, Szakály P, Rácz B, Kiss P, Tamás A, Helyes Z, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Fürjes G, Németh J, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide display increased sensitivity to renal oxidative stress in vitro. *Neurosci Lett.* 2010; 469:70–74. (IF: 1,925)
2. **Horváth G**, Rácz B, Reglődi D, Kovács K, Kiss P, Gallyas F Jr, Bognár Z, Szabó A, Magyarlaci 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: 2,72)
3. **Horváth G**, Rácz 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; 42: 2293-2295. (IF: 0,994)
4. **Horváth G**, Brubel R, Kovács K, Reglődi D, Opper B, Ferencz A, Szakály P, László E, Hau L, Kiss P, Tamás A, Rácz B. Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. *J Mol Neurosci* 2010; in press PMID: 20676802 (IF: 2,72)
5. **Horváth G**, Reglődi D, Opper B, Brubel R, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Csernus V, Matkovits A, Rácz B. Effects of PACAP on the oxidative stress-induced cell death in chicken pinealocytes is influenced by the phase of the circadian clock. *Neurosci Lett.* 2010; 484: 148-152. (IF: 1,925)
6. Rácz 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)
7. Szakály P, **Horváth G**, Kiss P, László E, Farkas J, Fürjes G, Németh J, Reglődi D. Changes in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide following renal ischemia-reperfusion in rats. *Transplant Proc* 2010; 42: 2283-2286. (IF: 0,994)

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények összes impact faktora: **13,339**

Egyéb közlemények:

1. Reglődi D, Börzsei R, Bagoly T, Boronkai A, Rácz 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)
2. 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 NY Acad Sci* 2009; 1163:353-357. (IF: 2,67)

3. 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: 2,67)

4. 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: 3,539)

5. Rác 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: 2,16)

6. Rác 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 PMID: 20405239 (IF: 2,72)

7. Brubel R, Boronkai A, Reglődi D, Rác 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 PMID: 20449689 (IF: 2,72)

Tudományos közlemények összesített impact faktora: **31,879**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Családomnak, akik minden helyzetben mellettem álltak.

Témavezetőimnek, Dr. Reglődi 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, Dr. Brubel Rékának 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.