

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
(PACAP) vizsgálata állatkísérletes modellekben és
klinikai kórképekben**

Dr. Tamás Andrea



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet

2024

TARTALOM

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
ELŐSZÓ	9
I. BEVEZETÉS	11
I.1. Hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)	11
I.2. PACAP-génkiütött egereken végzett vizsgálataink kísérletes előzményei. 12	
I.3. PACAP vizsgálata a várandósság és a laktáció során	16
I.5. Klinikai kórképekkel kapcsolatos vizsgálataink kísérletes előzményei	17
II. CÉLKITŰZÉSEK	25
III. A FEJEZETEK RÉSZLETES CÉLKITŰZÉSEI ÉS RÖVID METODIKAI LEÍRÁSA	26
III.1. PACAP hatásainak és szerepének vizsgálata a hallórendszerben in vitro és in vivo modellekben	26
III.2. PACAP hatásainak és szerepének vizsgálata a fogfejlődés során	27
III.3. PACAP vizsgálata tejmintákban, plazmamintákban és különböző szöveti mintákban várandósság alatt és laktáció során	28
III.4. PACAP mennyiségének és szerepének vizsgálata Parkinson- kórban és állatkísérletes modelljeiben	29
III.5. PACAP plazmaszintjének vizsgálata politraumatizált páciensekben	30
III.6. PACAP plazma és szöveti szintjeinek vizsgálata cardiovascularis kórképekben	31
III.7. PACAP plazma és szöveti szintjeinek vizsgálata malignus betegségekben	32
IV. EREDMÉNYEK DISZKUZZIÓJA	33
IV.1. PACAP hatásainak és szerepének vizsgálata a hallórendszerben in vitro és in vivo modellekben	33
IV.2. PACAP hatásainak és szerepének vizsgálata a fogfejlődés során	39
IV.3. PACAP vizsgálata tejmintákban, plazmamintákban és különböző szöveti mintákban várandósság alatt és laktáció során	44
IV.4. PACAP mennyiségének és szerepének vizsgálata Parkinson- kórban és állatkísérletes modelljeiben	51
IV.5. PACAP plazmaszintjének vizsgálata politraumatizált páciensekben	61
IV.6. PACAP plazma és szöveti szintjeinek vizsgálata cardiovascularis kórképekben	63
IV.7. PACAP plazma és szöveti szintjeinek vizsgálata malignus betegségekben	73
IV.8. PACAP szint vizsgálata különböző fiziológias állapotokban és klinikai kórképekben	82

V. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	84
V.1. PACAP hatásainak és szerepének vizsgálata a hallórendszerben in vitro és in vivo modellekben	84
V.2. PACAP hatásainak és szerepének vizsgálata a fogfejlődés során	84
V.3. PACAP vizsgálata tejmintákban, plazmamintákban és különböző szövettani mintákban várandósság alatt és laktáció során.....	85
V.4. PACAP mennyiségének és szerepének vizsgálata Parkinson-kórban és állatkísérletes modelljeiben.....	86
V.5. PACAP plazmaszintjének vizsgálata politraumatizált páciensekben.....	87
V.6. PACAP plazma és szöveti szintjeinek vizsgálata cardiovascularis kórképekben	87
V.7. PACAP plazma és szöveti szintjeinek vizsgálata malignus betegségekbenn.....	89
VI. SAJÁT IRODALOMJEGYZÉK	91
VI.1. A dolgozatban részletesen ismertetett közlemények listája	91
VI.2. A dolgozat témájához tartozó diszkusszióban említett közlemények:	97
VII. TUDOMÁNYMETRIAI TÁBLÁZAT	107
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	109
IX. TÁMOGATÓK	113

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

6-OHDA: 6-hidroxidopamin	ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group performance státuszra vonatkoztatott beosztása
AC: adenilát-cikláz	
ACE: angiotenzin-konvertáló enzim	
AD: aktív betegség	ELISA: enzimhez kötött immunszorbens assay
ASZE: akut szívelégtelenség	
AU1: elsődleges hallókéreg	ESS: Epworth Sleepiness Scale, aluszékonysági teszt
B2M: β -2-microglobulin	FGF: fibroblast növekedési faktor
Bad: Bcl-2 asszociált halál promóter	FWHM: félértékszélesség (full width at half maximum)
Bax: Bcl-2 asszociált X, apoptózis regulátor	G-CSF: granulocita-kolónia stimuláló faktor
Bcl-2: B-sejtes lymphoma protein 2	GDNF: gliális neurotrofikus faktor
Bcl-xL: B-sejtes lymphoma protein – extra large	GH: növekedési hormon
BDI: Beck-féle depresszió skála	Gli: glioma-asszociált onkogén 1
BDNF: agyi eredetű neurotrofikus faktor	HAP: hidroxipapit
BJ: Bence-Jones fehérje	HbA1c: hemoglobin A1c
BK: bal kamra	HFrEF: csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenség
BK-I: bal kamra ischaemiás régiója	Hgb: hemoglobin
BK-NI: bal kamra nem ischaemiás régiója	HPLC-MS: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria
BMP: csont morfogénikus protein	hs-cTn: magas szenzitivitású cardialis troponin
cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát	Htc: hematokrit
CARS: antiinflammatorikus válasz szindróma	HUN-REG: Magyar Kutatási Hálózat
CD34⁺: egyezményes névsor (Cluster of Differentiation) alapján azonosított, 34-es jelöléssel ellátott sejtfelszíni markerrel rendelkező sejt	HY: Hoehn-Yahr skála
CGM: corpus geniculatum mediale	ICM: ischaemiás cardiomyopathia
ChAT: kolin-acetiltransferáz	IFN-γ: interferon-gamma
CI: colliculus inferior	IL: interleukin
CI_{Raman}: kristályossági index	IMWG: International Myeloma Working Group – Nemzetközi Myeloma Munkacsoport
CR: komplett remisszió	ISZB: ischaemiás szívbetegség
CRP: C-reaktív protein	iv.: intravénás
CSF: cerebrospinalis folyadék	KO: homoizgota PACAP-génkiütött (knock-out)
DBS: mély agyi stimuláció	KSZE: krónikus szívelégtelenség
DCM: dilatatív cardiomyopathia	LAR: antiszedimentációs ráta
DCN: nucleus cochlearis dorsalis	
DPP-IV: dipeptidil-peptidáz-IV	

LDH: laktát-dehidrogenáz	PACAP-27 LI: PACAP-27-szerű immunreaktivitás
L-DOPA: levodopa	PACAP-27: a PACAP 27 aminosavból álló izoformája
LED: levodopa ekvivalens dózis	PACAP-38 LI: PACAP-38-szerű immunreaktivitás
MCP-1: monocyta kemotaktikus protein	PACAP-38: a PACAP 38 aminosavból álló izoformája
MDS-UPDRS: Movement Disorder Society – Unified Parkinson's Disease Rating Skála	PACAP6-38: PACAP fragmens
MI: myocardialis infarctus	PCI: percutan coronaria intervenció
MI-BK-I: myocardialis infarctuson átesett bal kamra ischaemiás régiója	PCT: procalcitonin
MI-BK-NI: myocardialis infarctuson átesett bal kamra nem ischaemiás régiója	PD: Parkinson-kór
MM: myeloma multiplex	PDSS-2: Parkinson's Disease Sleep Scale (Parkinson-kór alvási skála)
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin	PR: parciális válasz
MRA: mineralokortikoid receptor antagonist	R-ISS: Revised-ISS
MRD: minimális reziduális betegség	RVd: lenalidomid-bortezomib-dexamethason
MSO: oliva superior, nucleus medialis	SHH: sonic hedgehog fehérje
MTT: (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid)	SH-SY5Y: dopaminerg neuroblastoma sejtvonal
NICM: nem ischaemiás cardiomyopathia	SIRS: szisztémás gyulladásos válasz szindróma
NLL: nuclei lemnisci lateralis	SOC: oliva superior complex
NT-proBNP: N-terminális pro B-típusú natriuretikus peptid	STEMI: ST-elevációval járó myocardialis infarctus
Numb: Numb fehérje	TH: tirozin-hidroxiláz
NYHA st.: New York Heart Association = New York-i Kardiológus Társaság funkcionális klasszifikációja szívelégtelenségben	TNF-α: tumor nekrosis faktor α
PAC1/PAC1R: a PACAP 1-es típusú szelektív receptora	UTP: vizelet összfehérje
PACAP: hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid	VCN: nucleus cochlearis ventralis
	VIP: vasoaktiv intestinalis polipeptid
	VLPN, VMPN: nucleus periolivaris ventrolateralis/medialis
	VPAC1, VPAC2: VIP/PACAP receptor 1-es és 2-es típus
	VT: vad típus
	WNT: wingless-related integration site

ELŐSZÓ

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Anatómiai Intézetében több mint 20 éve foglalkozom a hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) hatásainak vizsgálatával a HUN-REG (Magyar Kutatási Hálózat) – PTE PACAP kutatócsoport tagjaként. Az egyik kutatási területem a PACAP vizsgálata különböző állatkísérletes modellekben, ezen belül is a Parkinson-kórral kapcsolatos vizsgálatokat, valamint a fogfejlődéssel és hallórendszerrel összefüggő kutatásokat koordinálok. Emellett másik fontos témám az endogén PACAP szerepének feltérképezése különböző fiziológiás folyamatok során, mint a várandósság és a laktáció, valamint olyan patológias klinikai kórképekben, ahol a PACAP potenciális biomarker szerepét kutatjuk.

Tudományos dolgozatomat hét alfejezetre osztottam, amikben a témához kapcsolódó legfontosabb, főképp első és utolsó szerzős közleményekben publikált eredményeimet kívánom bemutatni.

Az első két fejezetben a PACAP hallórendszer működésében és a fogfejlődés során betöltött szerepével kapcsolatos eredményeket foglalom össze, amelyeket in vitro sejtenyírástokban és in vivo PACAP-génkiűtött állatokon végzett kísérletek segítségével igazoltunk (1-8). A PACAP-génkiűtött egerekkel kapcsolatos további eredményekből egy összefoglaló közlemény is született (9).

Egyre több adat áll rendelkezésünkre arról, hogy a plazma és a szövetek PACAP szintje dinamikusan változik különböző fiziológiás és patológias körülmények között, ami a PACAP potenciális biomarker szerepét feltételezheti egyes betegségekből. A PACAP mennyiségi változásának detektálása nemcsak lehetőséget nyújthat az egyes elváltozások korai diagnózisára, hanem potenciálisan felhasználható a betegségek prognózisának megjelölésére, a klinikai terápia tervezésére, vagy akár új terápiás irányok meghatározására. A legtöbb ezzel kapcsolatos adat az elmúlt években jelent meg, ami bizonyítja a kutatási téma időszerűségét és jelentőségét. Vizsgálataink kezdetén az endogén PACAP gonadalis és reprodukciós folyamatokban betöltött szerepével kapcsolatban számos állatkísérletes adattal rendelkezünk, azonban a várandósság alatt és a szoptatás során betöltött szerepével kapcsolatban csak nagyon kevés klinikai adat állt a rendelkezésünkre, ezért legelső klinikai kutatásunk során a várandós és szoptatós kismamák vizsgálatát tűztük ki célul. Ezen eredményeket a harmadik fejezetben részletezem (10-15).

Az ezt követő fejezetekben azokat a klinikai és transzlációs állatkísérletes eredményeinket mutatom be, amelyek a társadalom nagy részét érintő kórképek vizsgálata során születtek. Ilyenek a Parkinson-kór (16-19), a politraumás sérülések (20), a cardiovascularis betegségek (21-23) és a különböző malignus elváltozások, mint az urogenitalis tumorok (24) és a myeloma multiplex (25). Ezen témákkal kapcsolatban is több összefoglaló közlemény született (26-31), valamint egy könyvet is szerkesztünk (32).

A dolgozatban részletezett munkákból témavezetésemmel 5 Ph.D. dolgozat született (Dr. Csanaky Katalin Andrea 2014, Dr. Németh Adrienne 2015, Dr. Sándor Balázs Attila 2018, Dr. Fülöp Balázs Dániel 2020, Dr. Szabó Dóra 2022).

I. BEVEZETÉS

I.1. HYPOPHYSIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP)

A PACAP egy pleiotrop és multifunkcionális neuropeptid, amit Arimura és munkacsoportja izolált birka hypothalamusból a hypophysisben kifejtett adenilát-cikláz (AC) aktiváló hatása alapján. A szekretin/glükagon/vasoactiv intestinalis polipeptid (VIP) peptidcsalád tagja, és 68%-os homológiát mutat a VIP-vel. Szerkezete csak néhány aminosavban különbözik az alacsonyabb rendű gerincesekben és az emberekben, így ez az evolúció során konzerválódott szerkezet fontos élettani szerepet feltételez. A PACAP legnagyobb mennyiségben az idegrendszerben és az endokrin mirigyekben detektálható. Felfedezése óta a szervezetben való előfordulásán és általános fiziológiás szerepének kutatása mellett neurotrofikus, neuroprotektív és általános citoprotektív hatását is széles körben vizsgálták, amelyek háttérében antiapoptotikus, antiinflammatorikus és antioxidáns hatásai feltételezhetők (26, 27, 32, 34, 36, 37, 39, 41, 42, 45, 82, 83, 92, 95, 104).

A PACAP-nak két biológiailag aktív izoformája ismert. Az elsőként izolált 38 aminosavat tartalmazó domináns izoforma (PACAP-38) mellett az N-terminális 27 aminosavból álló forma (PACAP-27) szintén előfordul a szervezetben, de ez a neuropeptid az izoformák kevesebb mint 10%-át teszi ki. Az említett izoformákon kívül a kutatások számos, mesterségesen előállítható agonista vagy antagonistá hatású fragmentek vizsgálatával is foglalkoznak. A PACAP receptorai a G-proteinhez kapcsolt receptorok családjába tartoznak. A VPAC1 (VIP/PACAP receptor 1-es típus) és a VPAC2 (VIP/PACAP receptor 2-es típus) receptorok egyforma affinitással kötik a PACAP-ot és a VIP-t, míg a PAC1 receptor (PACAP 1-es típusú receptora, PAC1R) szelektíven csak a PACAP hatását közvetíti. A PACAP receptorok szinte minden szervben kimutathatók, azonban nem szövetspecifikusak, így az altípusok eloszlása szervrendszerenként változó és emellett egy adott szöveten belül is nagy variabilitást mutat, amely a pleiotrop hatás magyarázatául is szolgálhat. A PACAP PAC1 receptoron keresztül aktiválódó legfontosabb szignalizációs útvonalak az értekezésben részletesen bemutatásra kerültek.

I.2. PACAP-GÉNKIÜTÖTT EGEREKEN VÉGZETT VIZSGÁLATAINK KÍSÉRLETES ELŐZMÉNYEI

I.2.1. PACAP-GÉNKIÜTÖTT EGEREK

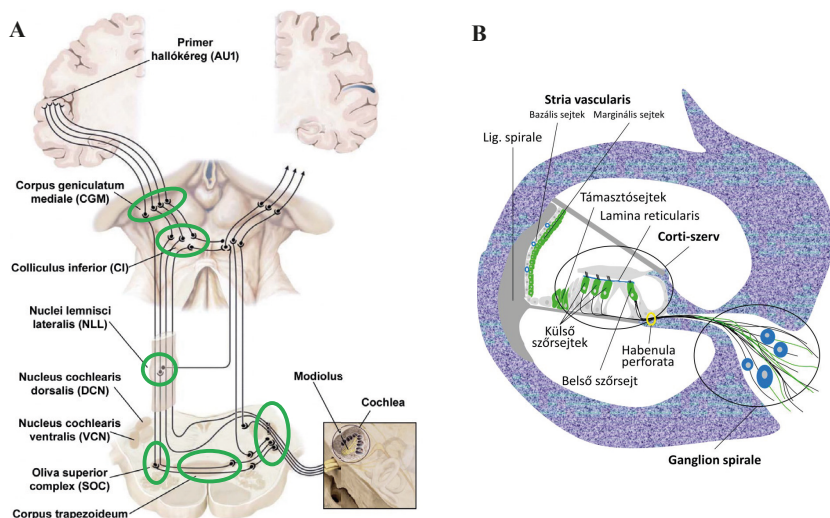
Az endogén PACAP teljes vagy részleges hiányából adódó elváltozások tanulmányozására homo- és heterozigóta PACAP-génkiütött egerek vizsgálatával nyílik lehetőség. Hashimoto és munkacsoportja a génmódosított egértörzs előállításához génkiütési technikát alkalmazott, amely során az 5. exonon módosítás történt, ami megakadályozza a PACAP gén átíródását.

A vad típusú és PACAP-génkiütött állatok morfológiai és funkcionális összehasonlító vizsgálataival számos munkacsoport foglalkozott korábban, akik a makroszkópos

vizsgálatok során kevés szignifikáns különbséget észleltek az egércsoportok között. Ezzel szemben a mikroszkópos elemzések (elektromikroszkópia, immunhisztokémia), valamint a biokémiai és funkcionális vizsgálatok számos eltérést mutattak ki. A PACAP-génkiütött állatok csökkent szaporodási képességgel, metabolikus eltérésekkel, memória- és magatartászavarokkal, valamint hőmérséklet és napi ritmus szabályozási problémákkal jellemezhetők. Emellett csökkent stressztűrő képesség, felgyorsult öregedés és fokozott halálozási arány is megfigyelhető ennél az egértörzsnél (9, 78, 80).

Az endogén PACAP neuroprotektív és általános citoprotektív hatásának hiányából következik az, hogy a PACAP-génkiütött egerek a vad típusú egerekhez képest szignifikánsan nagyobb érzékenységet mutatnak különböző károsító hatásokkal szemben, amelyek háttérben megnövekedett apoptózis, gyulladásos reakció és oxidatív stressz feltételezhető (9). Különböző idegrendszeri károsodásokat követően, mint az agyi ischaemia, a retinalis vagy az axonalis károsodás, szignifikánsan nagyobb sérülést szenvednek, mint vad társaik. Emellett érzékszervekben és számos más szervrendszer, mint a gastrointestinalis, a cardiovascularis, az urogenitalis, és a locomotoros, károsodása esetén is kimutatták a PACAP-génkiütött egerek fokozott sérülékenységet (9, 87, 90, 96).

Vizsgálataink első részében az endogén PACAP hiányából adódó eltéréseket vizsgáltuk a hallórendszerben és a fogfejlődés során homo- és heterozigóta PACAP-génkiütött egerek segítségével.



1.2.2. ábra: A PACAP és PAC1 receptor előfordulása a hallópálya különböző magjaiban (A) és a belső fülben (B). A nuclei lemnisci lateralis kivételével, ahol csak PAC1 receptor mRNS-t tudták kimutatni, mindegyik zölddel jelölt magban találtak PACAP és PAC1 receptor pozitivitást (A). A belső fülben (B) a PACAP kimutatható a habenula perforata területén (sárga szín). PAC1 receptor a stria vascularis területén az erek endothelsejtjeiben, a lamina reticularisban és a ganglion spirale sejttestjein detektálható (kék szín). PACAP-ot és PAC1 receptort is kimutattak a stria vascularis marginális sejtjeiben, a belső és külső szőrsejtek körül, a támasztősejtekben és a ganglion spirale rostjaiban (zöld szín) (munkacsoportunk ábrája).

1.2.2. A PACAP SZEREPE A HALLÓRENDSZERBEN

Korábbi vizsgálatok mind a PACAP-ot mind annak receptorát kimutatták a hallórendszer különböző részeiben, így a belső fülben és a hallópálya különböző magjaiban is. A belső fül morfológiai analízise során PACAP mRNS-t mutattak ki a Corti-szervben, a ganglion spirale neuronjaiban és a stria vascularis területén, így feltételezhetően szerepe lehet az endolympha termelésének szabályozásában is (1.2.2. ábra).

A szörsejtek egészséges működéséhez az endolympha megfelelő Ca^{2+} koncentrációja is szükséges, melyet a szörsejtekben található Ca^{2+} -kötő fehérjék szabályoznak (parvalbumin, calbindin, calretinin), melyeknek fontos szerepük lehet a különböző ototoxikus ágensek szörsejtkárosító hatásának kivédésében, amik a szörsejtek apoptózisát indukálhatják, így halláskárosodáshoz vezethetnek. Ez alapján feltételezhető, hogy az antiapoptotikus és antioxidáns hatásokkal rendelkező PACAP is szerepet játszhat a szörsejtek védelmében és a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziójának szabályozásában.

1.2.3. A PACAP SZEREPE A FOGFEJLŐDÉSBEN

Az egerek fogzatának felépítése több szempontból különbözik az emberi fogazattól, mivel kvadránsoként csak egy folyamatosan növekvő metszőfogból és három molaris fogból áll. Fejlődésük mégis számos hasonlóságot mutat. A fogfejlődés a primitív szájrégi ectoderma és az alatta elhelyezkedő dúcléc eredetű ectomesenchyma folyamatos egymásra hatása révén jön létre. A belső zománcsejtekből differenciálódnak később a zománctermelésért felelős ameloblastok. A korai harang stádiumban a belső zománcsejtek bazális felszínén elkülöníthető a stratum intermedium, megkezdődik az ectomesenchyma kondenzációja és a zománcszerv alatt kialakul a dentalis papilla. A dentalis papillából differenciálódnak a dentintermelésért felelős odontoblastok, az ezek alatt elhelyezkedő subodontoblast réteg és a későbbi fogpulpa.

A rágcsálók érett fogai esetén az emberhez hasonlóan megkülönböztethetünk koronát és gyökeret. A korona felszínén a dentin réteg felett zománc található, míg a gyökeret cement borítja. A rágcsálók metszőfogai folyamatosan nőnek, és míg labiális felszínükön zománc, az orális felszínükön cement található. Az ameloblastok által termelt zománc a szervezet legkeményebb szövete, közel 96% szervetlen anyagot tartalmaz, mely főképp hidroxipatit (HAP-kalcium-foszfát) kristályokból épül fel és zománcprizmákat alkot. A zománcprizmák körül található szerves mátrix alkotásában 90%-ban heterogén amelogenin fehérje csoport vesz részt. Az odontoblastok által termelt dentin alkotja a fog mineralizált szöveteinek fő tömegét. Az érett dentin 65-70%-ban anorganikus anyagokból (kalcium-hidroxipatit és kalcium-karbonát), 20%-ban organikus összetevőkből és 10%-ban vízből épül fel. A szerves állomány nagy részét I-es típusú kollagén teszi ki (90%).

A fogfejlődés szabályozásában több mint 300 gén, számos transzkripciós faktor és jelátviteli útvonal játszik szerepet, mint a csont morfogenetikus fehérjék (bone morphogenetic protein, BMP), fibroblast növekedési faktorok (fibroblast growth factor, FGF), sonic hedgehog (SHH) és a Notch és Wingless fehérjecsaldók (WNT). Ezen jelátviteli utak gátlásával a fogfejlődés késleltethető, vagy teljesen megállítható. A jelátviteli utak részletes leírása az értekezésben olvashatók. Vizsgálataink során az SHH

és a Notch jelátviteli útvonal elemeinek expresszió változását elemeztük PACAP-génkiütött állatokban.

Korábbi vizsgálatok PACAP pozitív rostokat detektáltak patkány és emberi fogpulpá mintákban az erek körül, az odontoblast sejtekben és a subodontoblast rétegben is. Korábban kimutatták, hogy a PACAP pozitív idegrostok száma és a PAC1 receptor expressziója is emelkedik a ligamentum parodontaléban luxációt követően patkányban, így feltételezhetően fontos szerepe lehet a luxációt követő regenerációs folyamatok szabályozásában. Homo- és heterozigóta PACAP-génkiütött egerek fejlődésének vizsgálata során munkacsoportunk megfigyelte, hogy hím állatoknál a metszőfogak szignifikánsan előbb törnek elő a PACAP-génkiütött állatoknál, mint a vad egerekben (56). Emellett kutatócsoportunk 5 napos egerekből készült metszeteken PAC1 receptor expressziót mutatott ki a subodontoblast rétegben. A PACAP fogfejlődésre gyakorolt hatását korábban nem vizsgálták, ezért munkánk során célul tűztük ki ennek feltérképezését.

I.3. PACAP VIZSGÁLATA A VÁRANDÓSSÁG ÉS A LAKTÁCIÓ SORÁN

A PACAP felfedezését követően a reprodukív és endokrin funkciókra kifejtett hatását is széles körben kutatták (84). Bizonyítást nyert, hogy a PACAP és receptorai nagy mennyiségben detektálhatók a hypothalamus különböző magjaiban és szabályozzák a fő gonadális hormonok termelését. Korábban már említésre került, hogy a PACAP-génkiütött egerek magasabb mortalitással és csökkent fertilitással rendelkeznek (9, 78-80).

A PACAP szerepet játszik az ovarialis funkciókban is a follikulusok apoptózisának, fejlődésének és növekedésének szabályozásában. A PACAP-27 és PACAP-38 jelenlétét kimutatták emberi uterusban, placentában és köldökszínórban, de később ezt más munkacsoport a PAC1 receptor jelenlétének igazolásával is kiegészítette. A PACAP és PAC1 receptor mRNS expressziójának növekedését mutatták ki a placentában a várandósság előrehaladtával, ami a neuropeptid placenta fejlődésére kifejtett hatását igazolja. Emellett a PACAP az uteroplacentaris keringés és a placenta hormontermelésének és a trophoblast sejtek proliferációjának szabályozásában is részt vesz (46, 64).

Humán esettanulmányokban először az intravénás PACAP infúzió hatását vizsgálták egészséges férfiakban, ahol a kezelés stimulálta a vazopresszin és prolaktin szekréciót, de nem befolyásolta az oxitocin, a gonadotrop hormonok és a növekedési hormon (GH) szintjét. Nőkkel kapcsolatos eredmények nem álltak rendelkezésre, ezért klinikai vizsgálatainkat egészséges önkéntesek, várandósok és szoptatós kismamák vizsgálatával kezdtük abból a célból, hogy feltérképezzük a PACAP szerepét ezen fiziológias folyamatok során.

Az anyatej egy komplex biológiai folyadék, amely számos tápanyagot és élettani folyamatok szabályozásában szerepet játszó bioaktív faktort tartalmaz, amelyek fontos szerepet töltenek be az újszülött egészséges növekedésében és fejlődésében. Az elmúlt években az anyatejjel kapcsolatos kutatásokban központi szerepet töltenek be a neuropeptidekkel kapcsolatos vizsgálatok. A PACAP izolációját megelőzően igazolták a

struktúrájával szoros homológiát mutató VIP jelenlétét az emberi anyatejmintákban. A PACAP jelenlétét és annak eloszlását először laktáló és nem laktáló patkány emlőmirigyben vizsgálták. Emellett számos, több esetben ellentmondásos kísérletes eredményt is publikáltak a PACAP prolaktin és oxitocin termelést szabályozó hatásával kapcsolatban, ami alapján feltételezhető, hogy a PACAP-nak fontos szerepe lehet az emlőmirigy beidegzésében, a tejtermelés, a tejelválasztás és a szopóreflex szabályozásában.

A PACAP és receptorait emberi emlőmirigyben és emlőtumoros mintákban is vizsgálták, amely azt feltételezi, hogy a PACAP-nak az emlőmirigy fiziológiás működésének szabályozása mellett fontos szerepe lehet a tumorigenesisben is. Ezen előzetes előzményekre alapozva kutatásaink során célul tűztük ki a PACAP szerepének vizsgálatát a laktációs folyamatokban és várandósság során.

1.5. KLINIKAI KÓRKÉPEKKEL KAPCSOLATOS VIZSGÁLATAINK KÍSÉRLETES ELŐZMÉNYEI

1.5.1. A PACAP VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ KLINIKAI KÓRKÉPEKBEN

Klinikai vizsgálataink célja, hogy feltérképezzük azokat a társadalom nagy részét érintő klinikai kórképeket, amelyekben a PACAP potenciális biomarker lehet. Olyan betegségekre fókuszálunk, ahol korábbi alapkutatási eredményeink és más klinikai kutatások szignifikáns változásokat írtak le. Korábbi kutatások egészséges önkéntesek plazma PACAP szintjének vizsgálata során nem találtak szignifikáns eltérést. Az is bizonyítást nyert, hogy a neuropeptid intravénás beadását követően szintje gyorsan emelkedik, de a dipeptidil-peptidáz-IV (DPP-IV) enzimnek köszönhetően rövid plazma eliminációs idővel rendelkezik (5-10 perc), ezért koncentrációja az infúzió leállítását követően gyorsan csökken.

A neurológiai betegségekkel kapcsolatos vizsgálatok közül a legelső klinikai kutatásban szignifikánsan magasabb PACAP szintet detektáltak poszttraumás stressz szindrómában szenvedő nőknél. Emellett számos központi idegrendszeri vérzésben, így az akut spontán törzsdúci- és subarachnoidealis vérzésekben is leírták a PACAP szint szignifikáns emelkedését. Komplex vizsgálatok épültek a PACAP-38 szint változásának jellemzésére migrénes páciensek esetében, ahol az interiktális periódusban szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 koncentrációt mértek az egészséges páciensekhez képest, ami emelkedett a rohamok alatt. Korábban azt is bebizonyították, hogy intravénás PACAP kezelés egészséges önkéntesekben fejfájást, migrénre hajlamos páciensekben pedig migrénszerű rohamokat idéz elő. Az elmúlt években számos kutatás foglalkozott a neurodegeneratív betegek vizsgálatával is. Alzheimer-kóros betegek liquorából és különböző agyterületekből származó minták elemzése során alacsonyabb PACAP szinteket detektáltak hasonlóan a sclerosis multiplexben szenvedő betegek liquor mintáihoz (30, 31).

Korábbi laboratóriumi és klinikai vizsgálatok eredményeire alapozva több kórkép esetén is felmerült a PACAP kezelés klinikai alkalmazhatóságának lehetősége, így sclerosis multiplexben, vagy intranasalis terápia segítségével különböző neurodegeneratív kórképekben, kognitív zavarok vagy stroke esetén, valamint szemcsepp formájában

retinadegeneráció kapcsán. Migrént indukáló hatása miatt migrénes páciensek kezelésében a PACAP antagonistákkal kapcsolatos vizsgálatok kerültek előtérbe. Mindezen kísérletes előzmények alapján feltételezhető, hogy az endogén PACAP változásának vizsgálata különböző klinikai kórképekben segíthet egyes betegségek klinikai diagnózisában, prognózisának feltérképezésében és a terápia megtervezésében.

1.5.2. PARKINSON-KÓRRAL KAPCSOLATOS VIZSGÁLATOK

A Parkinson-kór a második leggyakoribb neurodegeneratív kórkép az Alzheimer-kór után. Az idősebb populációt érinti és három jellegzetes motoros tünettel jár, ami a nyugalmi tremor, a rigor és a hypo/bradykinesis. A betegség hátterében a substantia nigra dopaminerg sejtjei és a nigrostriatalis pályarendszer károsodása áll. A Parkinson-kór kezelésének célja a tünetek enyhítése, amihez kezdetben különböző gyógyszeres terápiát alkalmaznak. A nem kellően hatásos gyógyszeres kezelés, vagy előrehaladott stádium esetén a mély agyi stimulátor implantációja (DBS) további terápiás lehetőségként szolgál a betegek számára.

Munkacsoportunk a PACAP neuroprotektív hatásának vizsgálatához kezdetben patkány Parkinson-kór modellt alkalmazott, ahol unilaterális 6-hidroxidopamin (6-OHDA) kezeléssel roncsoltuk a substantia nigra pars compacta területét. A féloldali károsodást követően az állatok súlyos hypokinetikus tüneteket és aszimmetrikus mozgásokat mutattak. A PACAP előkezelésben részesült patkányok a roncsolást követően enyhébb hypokinetikus és aszimmetrikus tünetekkel rendelkeztek és rövidebb idő alatt regenerálódtak a kezeletlen állatokhoz képest. Emellett tirozin-hidroxiláz (TH) immunhisztokémiával is kimutattuk a PACAP kezelés protektív hatását, ugyanis szignifikánsan több dopaminerg sejtet találtunk a substantia nigra pars compacta és a ventralis tegmentalis area területén a PACAP-pal kezelt csoportban, mint a kontroll állatokban, ahol közel 90%-os neuron pusztulást detektáltunk a 6-OHDA kezelést követően (36, 101-103). A PACAP dopaminerg sejtekre kifejtett neuroprotektív hatását *in vitro* és *in vivo* kísérletek is igazolták, ami azt feltételezi, hogy ennek a neuropeptidnek fontos szerepe lehet a betegség patomechanizmusában (26). Ezért Parkinson-kórral kapcsolatos vizsgálataink első részében tovább folytattuk a PACAP neuroprotektív hatásának feltérképezését különböző állatkísérletes modellekben.

Kezdetben nem találtak szignifikáns eltéréseket a Parkinson-kóros betegek klinikai vizsgálatain során a beteg és a kontroll csoportok liquor mintái között. Ezt követően a kutatásainkkal párhuzamosan egy másik munkacsoport csökkent PACAP szinteket detektált Parkinson-kóros betegek vérmintáiban, és szignifikáns korrelációt mutattak ki a PACAP szintek és a betegek kognitív, nem motoros tünetei között, azonban nem találtak szignifikáns összefüggést a motoros tünetek súlyosságát tekintve. Ezért klinikai kutatásunk során célul tűztük ki a PACAP-38 szint vizsgálatát Parkinson-kóros betegekben, nagy hangsúlyt fektetve a betegség progressziójára és a motoros tünetekkel kapcsolatos összefüggésekre.

1.5.3. POLITRAUMATIZÁLT BETEGEKKEK KAPCSOLATOS KLINIKAI VIZSGÁLATOK

Minden évben több mint 5 millió ember veszti életét világszerte különböző traumák miatt, ami az összes halálozás közel 9%-át jelenti. A traumát követően számos pro- és antiinflammatorikus faktor aktivációja miatt egy komplex és dinamikus immunválasz indul meg. A politraumatizált betegek esetében ezért is elengedhetetlen fontosságú a különböző inflammatorikus komplikációt jelző biomarkerek vizsgálata (C-reaktív protein (CRP), procalcitonin (PCT)), ugyanis ezek monitorozásával a betegek túlélése nagymértékben javítható. Legújabb kutatási eredmények azt feltételezik, hogy a súlyos traumatizáció által indukált oxidatív stressz képes transzkriptomikai változásokat indukálni a leukocytákban, ami detektálására a leukocyták antiszedimentációs ráta (LAR) meghatározása alkalmas, ami, bár a mindennapi klinikai gyakorlatban nem alkalmazott, mégis segítséget nyújt a gyulladásos komplikációk korai diagnosztikájában.

A szimpatikus idegrendszer és a hypothalamo-hypophysealis rendszer szintén aktívódik trauma következtében. A neuroendocrin és az immunrendszer között folyamatos interakció lép fel, amelyben fontos szerepet töltenek be a különböző neuropeptidek, amelyek közé tartozik a PACAP is, melynek stresszreakciót szabályozó, immunmodulátor és antiinflammatorikus hatása is jól ismert.

Munkánk során célul tűztük ki politraumatizált betegek PACAP-38 szintjének vizsgálatát a traumát követő 5 napon keresztül, valamint a PACAP-38 szint változásának korrelációs vizsgálatát más, a klinikai ellátás során gyakran alkalmazott markerekkel, mint a CRP és PCT, valamint a mindennapi gyakorlatban még nem rutinszerűen használt markerrel, a LAR-al.

1.5.4. CARDIOVASCULARIS KÓRKÉPEKKEL KAPCSOLATOS VIZSGÁLATOK

A PACAP pozitív chronotrop, inotrop, dromotrop, és potens vazodilatátor hatását is igazolták különböző in vitro és in vivo modellekben (29, 77, 94). Klinikai vizsgálatok során egészséges önkéntesekben intravénás PACAP kezelést követően markáns vazodilatációt, bőrpírt, ödémát, hypertermiát és tachycardiát írtak le. A PACAP vazodilatátor hatása feltételezhető a korábban már ismertetett, migrén indukáló hatásának hátterében is.

A PAC1 receptor jelenlétét igazolták különböző kísérleti állatokból származó cardiomyocytákban és az intracardialis neuronokban, emellett vizsgálták a PACAP és a PAC1 receptor mRNS expresszióját pitvari és kamrai mintákban is patkányban és egerben. A PACAP direkt szívre kifejtett hatásaival kapcsolatban csak kevés humán adat állt rendelkezésünkre vizsgálataink kezdetén. A PACAP in vitro kardioprotektív hatást munkacsoportunk is igazolta izolált cardiomyocytákon ischaemia/reperfúzió és oxidatív stressz-indukálta károsodás kapcsán (59, 77, 97). Patkány cardiomyocytá sejtkulturában a PACAP csökkenti a myocardialis fibrózist. Akut myocardialis infarctus eger modelljében, szignifikánsan magasabb PACAP immunreaktivitást igazoltak a bal kamrában az érelzárást követően a sham-operált csoporthoz képest. Doxorubicin-indukálta szívelégtelenségben és mitoxandron kezelést követően is igazolták a PACAP protektív

hatását. Korábbi kutatások PAC1 receptor-deficiens egerekben pulmonalis hypertóniát és jobb szívfél elégtelenséget találtak.

Az akut myocardialis infarctus az egyik vezető halálok a fejlett országokban. Az utóbbi évtizedben számos biomarkert vizsgáltak (magas szenzitivitású cardialis troponin (hs-cTn), CRP), melyek segítségül szolgálhatnak a betegség korai diagnózisában vagy prognózisának meghatározásában. Napjainkban leggyakrabban zárt mellkasú intervencionális kardiológiai beavatkozásokat alkalmaznak az állatkísérletes modelleken, ami tökéletesen modellezi a valódi percutan coronaria intervenciót (PCI). Ezen modellek emellett a különböző pre- és poszt-kondicionálási technikák kardioprotektív hatásának vizsgálatára is alkalmasak, amivel kapcsolatban számos ígéretes kísérleti eredményről is beszámoltak már.

A szívelégtelenség egy szintén nagy morbiditással és mortalitással járó, egyre nagyobb incidenciával előforduló cardiovascularis kórkép, mely számos olyan funkcionális és strukturális eltéréssel jár, ami csökkent perctérfogathoz és emelkedett intracardialis nyomáshoz vezet. A szívelégtelenség hátterében, sok esetben coronaria betegség áll (ischaemiás cardiomyopathia, ICM), de az esetek közel felében egyéb károsító tényező szerepel, mint például az alkohol, genetikai kórképek, vagy toxémia (nem ischaemiás cardiomyopathia, NICM). A szívelégtelenségek egy speciális formája, a dilatatív cardiomyopathia (DCM) esetén a szívműködés meggyűlnak, a kamrafal elvékonyodik és az üregek kórosan kitágulnak. Mindegyik kórképben cardialis remodelling alakul ki, ami a myocyták hypertrophiájához, apoptózisához vezet, és hátterében, sok esetben a reaktív oxigén szabadgyökök felszabadulása miatt kialakuló oxidatív stressz feltételezhető. Ezek mellett különböző proinflammatorikus citokinek, chemokinek szintje is megemelkedik, mely jól korrelál a szívelégtelenség súlyosságával és prognózisával.

A szívelégtelen betegek diagnózisának felállításában és prognózisának becslésében fontos szerepet töltenek be a különböző klasszifikációk (pl.: New York Heart Association klasszifikáció, NYHA), a képalkotó vizsgálatok (echokardiográfia, coronaria CT), és a rutin diagnosztikában alkalmazott laboratóriumi paraméterek (N-terminális pro B-típusú natriuretikus peptid (NT-proBNP)). Emellett számos potenciális biomarker szerepét is vizsgálják, melyekkel kapcsolatos kutatási eredmények sokszor ellentmondásosak, így felvetik potenciális új biomarkerek szükségességét a pontosabb prognosztikai becslések, ezáltal a személyre szabott, optimális kezelés beállítása érdekében.

Annak ellenére, hogy számos in vivo és in vitro kísérletben bebizonyították a PACAP kardioprotektív hatását, és így feltételezhető, hogy fontos szerepet tölt be a szívelégtelenség és az ischaemiás szívbetegségek patomechanizmusában, klinikai adatok nem álltak rendelkezésünkre vizsgálatainkat megelőzően, ezért állatkísérletes kutatásaink mellett célul tűztük ki a PACAP klinikai vizsgálatát akut myocardialis infarctusban és szívelégtelenségben szenvedő páciensek mintáinak feldolgozásával.

1.5.5. MALIGNUS BETEGSÉGEKKEL KAPCSOLATOS VIZSGÁLATOK

Számos korábbi kísérletben kimutatták a PACAP és a VIP receptorait különböző tumorokban, és vizsgálták a neuropeptidek onkogenetikus hatását. Ahogy már korábban is említésre került, a PACAP általános citoprotektív hatással rendelkezik, és a külön-

bőző pro- és antiapoptotikus jelátviteli útvonalak szabályozásával szerepet játszik a tumorok növekedésében, proliferációjában és differenciálódásában, mely hatás sokszor ellentétes eredményekkel jár a tumorok típusától függően. A PACAP gátló hatást fejt ki a myeloma és a glioma sejtek esetén, valamint gátolja a cervixcarcinoma és a medulloblastoma növekedését. Ezzel szemben stimulálja pheochromocytoma sejt vonal, a colon, a kissejtes tüdőrák, az astrocytoma, a pancreas carcinoma és a glioblastoma fejlődését. Számos kutatásban vizsgálták a PACAP és receptorainak jelenlétét különböző egészséges és tumoros tüdőmintákban, és colorectalis carcinomában is. Emellett a PAC1 receptor antagonistá PACAP6-38 kezelés gátolja a prosztata, az emlőtumor és a nem kissejtes tüdőrák sejtjeinek szaporodását. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a neuropeptidnek fontos szerepe van a tumorsejtek szaporodásának szabályozásában.

Munkánk során urogenitalis tumorokból származó szövetminták PACAP szintjének vizsgálatát tűztük ki célul. A PACAP és receptorai az urogenitalis rendszerben is kimutathatók, ahol szerepet játszanak a hólyag beidegzésében, a vizeletürítés és a vese renintermelésének szabályozásában, emellett a PACAP nagy mennyiségben mutatható ki hereszövetből is, ahol a spermatogenesisben fontos szerepet tölt be (50). Vizsgálataink előtt csak néhány humán adat állt rendelkezésünkre urogenitalis tumorokkal kapcsolatos eredményekről, amikben leírták a PACAP és receptorainak expresszióját vese-, hólyag- és prosztatatumorban, valamint here és testicularis összejtumorokban is.

A rosszindulatú elváltozások vizsgálatát myeloma multiplexben szenvedő páciensekkel is kiegészítettük. A myeloma multiplex a plazmasejtek monoklonális szaporulatával járó, főképp idős korosztályt érintő hematológiai körkép. Számos in vitro és in vivo kutatási eredmény áll rendelkezésünkre a PACAP protektív hatásával kapcsolatban myeloma multiplexben. Korábban kimutatták a PACAP receptorok mRNS-ének expresszióját a humán csontvelő stromasejtjein, a proximális tubulussejteken és a myelomás sejteken. Emellett azt is igazolták, hogy a PACAP védi a vese proximális tubulussejtjeit a károsodástól, gátolja a myelomás sejtek proliferációját és szerepet játszik az osteolyticus csontdestrukciók kialakulásának szabályozásában. Vesefunkcióra kifejtett kedvező hatása és tumorelleses ágensként való potenciális alkalmazhatósága klinikai vizsgálatokban is bizonyítást nyert. A PACAP haematopoiesisben betöltött pontos szerepe még nem ismert. A VPAC1 receptor megtalálható a megacaryocyták felszínén, amin keresztül a PACAP szabályozza a megacaryopoiesist és a thrombopoiesist. Emelkedett PAC1 receptor expressziót találtak CD34⁺ haemopoieticus őssejteken, ami csökken a myeloid út vonal érése során, exogén PACAP kezelés in vitro kísérletben pedig növelte a granulocyt/macrophag érési sor progenitor sejtjeinek számát.

Mindezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a PACAP-nak fontos szerepe lehet rosszindulatú betegségekben szenvedő páciensek körlefolrásában, ezért klinikai vizsgálatainkat malignus betegségben szenvedő páciensek mintáinak elemzésével is kiegészítettük.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám fő célkitűzéseit hét pontban foglaltam össze, amelyek meghatározzák értekezésem fő szerkezeti egységét. A dolgozatomban az egyes területekkel kapcsolatos eredményeinket a következő fő célkitűzési pontok alapján kívánom részletezni:

1. PACAP hatásainak és szerepének vizsgálata a hallórendszerben in vitro és in vivo modellekben
2. PACAP hatásainak és szerepének vizsgálata a fogfejlődés során
3. PACAP vizsgálata tejmintákban, plazmamintákban és különböző szövettani mintákban várandósság alatt és laktáció során
4. PACAP mennyiségének és szerepének vizsgálata Parkinson-kórban és állatkísérletes modelleiben
5. PACAP plazmaszintjének vizsgálata politraumatizált páciensekben
6. PACAP plazma és szöveti szintjeinek vizsgálata cardiovascularis kórképekben
7. PACAP plazma és szöveti szintjeinek vizsgálata malignus betegségekben.

III. A FEJEZETEK RÉSZLETES CÉLKITŰZÉSEI ÉS RÖVID METODIKAI LEÍRÁSA

III.1. PACAP HATÁSAINAK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A HALLÓRENDSZERBEN IN VITRO ÉS IN VIVO MODELLEKBEN

Munkánk során célul tűztük ki a PACAP hallórendszerben betöltött szerepének vizsgálatát, és ototoxikus károsodásokkal szemben kifejtett protektív hatásának igazolását.

1. A PACAP antiapoptotikus hatását csirke belső fül sejtenyészetben vizsgáltuk H_2O_2 -indukálta oxidatív stressz károsodás esetén in vitro modellben. A sejtek életképességének vizsgálatához MTT tesztet használtunk. Az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányának meghatározásához annexin V és propidium jodid kettős festést és caspase-3 festést alkalmaztunk, majd áramlási citométerrel analizáltuk a sejteket.
2. Ezt követően heterozigóta és homozigóta PACAP-génkiütött egerek segítségével térképeztük fel az endogén PACAP részleges vagy teljes hiányából adódó cochlearis morfológiai elváltozásokat fiziológiás körülmények között és kanamicin-indukálta ototoxikus károsodás esetén. Immunhisztológiai vizsgálatok segítségével hasonlítottuk össze a PAC1 receptor expresszióját, valamint a belső fül károsodására utaló Ca^{2+} -kötő fehérjék (parvalbumin, calretinin, calbindin) lokalizációját és expresszióját homozigóta és heterozigóta PACAP-génkiütött és vad egerek belső füléből készült metszeteken.
3. A PACAP-génkiütött és a vad egerek hallórendszerének funkcionális vizsgálata során hanginger alkalmazását követően hasonlítottuk össze a hallópálya különböző magjainak c-Fos expresszióját. A következő magok vizsgálatát végeztük: ventralis és dorsalis cochlearis magok (nucleus cochlearis ventralis, VCN, nucleus cochlearis dorsalis DCN), az oliva superior complex (SOC) különböző részei, a nuclei lemnisci lateralis (NLL), a colliculus inferior (CI) valamint az elsődleges hallókéreg (AU1). Emellett elemeztük a cochlearis magok neuronjainak számát Nissl-festéssel, a különböző magok PAC1 receptor expresszióját, és a ductus cochlearisok lizátumainak fehérje összetételét „Cytokine Array Panel A” és „Angiogenesis Array Kit”-ek segítségével.

III.2. PACAP HATÁSAINAK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A FOGFEJLŐDÉS SORÁN

Számos kísérleti eredmény bizonyítja a PACAP idegrendszer fejlődésében betöltött fontos szerepét, ezért vizsgálataink során célul tűztük ki az idegrendszerhez hason-

lóan ectodermalis eredetű fogfejlődés morfológiai és szövettani vizsgálatát endogén PACAP hiányában PACAP-génkiütött és vad típusú egerek segítségével.

1. Munkánk első részében vad típusú és homozigóta PACAP-génkiütött egerek fejlődő molaris fogait vizsgáltuk. Morfometriai és szerkezeti összehasonlításokat végeztünk szövettani és Raman mikroszkópia segítségével, melyet immunhisztokémiával is kiegészítettünk a fogfejlődés szabályozásában szerepet játszó SHH és Notch molekuláris biológiai útvonalak feltérképezése céljából. Az SHH útvonal tagjai közül az SHH, PTCH1 és Gli1, míg a Notch jelátviteli útvonal tagjai közül a Notch1,2,3,4, DLL1,3,4, Jagged1,2, CSL, TACE és Numb expressziót vizsgáltuk immunhisztológia segítségével.
2. Kutatásunk második felében 1 éves vad típusú és homozigóta PACAP-génkiütött egerek folyamatosan fejlődő alsó metszőfogait hasonlítottuk össze micro-CT-vel, amely során morfológiai és denzitometriás méréseket is végeztünk. Emellett a metszőfogakból készült fogcsiszolatokat Raman mikroszkópia segítségével is elemeztük.

III.3. PACAP VIZSGÁLATA TEJMINTÁKBAN, PLAZMAMINTÁKBAN ÉS KÜLÖNBÖZŐ SZÖVETTANI MINTÁKBAN VÁRANDÓSSÁG ALATT ÉS LAKTÁCIÓ SORÁN

Vizsgálataink kezdetén számos állatkísérletes adat állt rendelkezésünkre azzal kapcsolatban, hogy a PACAP fontos szerepet tölt be a gonadalis és reprodukciók szabályozásában, az emlőmirigy beidegzésében, a tejtermelés, a tejelválasztás és a szopóreflex szabályozásában, de csak nagyon kevés klinikai vizsgálati eredményt ismertünk a PACAP emberi szervezetre kifejtett hatásáról és a különböző fiziológiás folyamatokban detektálható változásával kapcsolatban. Ezért klinikai kutatásaink első részében célul tűztük ki a PACAP szint változásának vizsgálatát várandósság és szoptatás alatt. Ennek során várandósokból, szoptatós kismamákban és újszülöttekből származó vérmintákat és szövettani mintákat, valamint a szoptatás különböző szakaszaiból származó tejmintákat, és összehasonlítóképpen bolti tejkészítményeket dolgoztunk fel.

1. Vizsgálataink első felében munkacsoportunk által kifejlesztett specifikus és szenzitív radioimmuno-assay (RIA) módszer (74, 98, 99) segítségével mértük meg az egészséges önkéntesek és szoptatós kismamák plazmamintáinak PACAP-38 szintjét, hogy jellemezzük annak változását a laktáció során.
2. Ezután, a szoptatási periódus különböző szakaszai során gyűjtött tejminták PACAP szintjét vizsgáltuk. Mértük a kolosztrum, az átmeneti tej és érett anyatejminták PACAP-38-szerű immunreaktivitását (PACAP-38 LI) és annak változását egy szoptatáson belül (előtej, utótej), valamint hosszú utánkövetés során. Emellett analizáltuk a friss és bolti forgalomban kapható pasztörözött tehéntejminták, valamint tápszerek és tejporok PACAP-38-szerű immunreaktivitását is RIA módszerrel.

3. Ezt követően várandósság során, a szülés alatt és a szülés után elemeztük a PACAP-38 szintjének változását kismamákból és újszülöttekből származó plazmaminták, és különböző korú placenták, valamint köldökzsinórból származó szövettani minták feldolgozásával. A szövettani minták mérése során a PACAP-38 szint mellett a PACAP-27 szintet is vizsgáltuk RIA módszerrel.
4. Összehasonlító immunhisztokémiai festéseket is végeztünk, ahol a PAC1 receptor expresszióját birkából származó laktáló és nem laktáló emlőszöveteken és nem laktáló humán emlőmintákon vizsgáltuk.

III.4. PACAP MENNYISÉGÉNEK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA PARKINSON-KÓRBAN ÉS ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEIBEN

Munkacsoportunkkal együtt számos más kutatócsoport is igazolta korábban a PACAP neuroprotektív hatását különböző in vitro és in vivo Parkinson-kór modellekben, de a protektív hatás hátterében álló pontos molekuláris biológia útvonalak még nem ismertek. Emellett a Parkinson-kóros betegek széleskörű klinikai vizsgálatával sem foglalkozott még egy kutatócsoport sem, ezért munkánk során célul tűztük ki a Parkinson-kórral kapcsolatos állatkísérletes vizsgálataink folytatását, valamint a Parkinson-kóros betegek klinikai vizsgálatát.

1. Állatkísérletes munkánk során a PACAP neuroprotektív hatását csiga (rotenon kezelés) és patkány (unilateralis 6-OHDA kezelés) Parkinson-kór modellben hasonlítottuk össze. A kezeléseket követően magatartási vizsgálatokat végeztünk. Az idegrendszeri mintákból származó monoamin szintek (dopamin és szerotonin) és a PARK7/DJ-1 fehérje vizsgálatához HPLC-MS analízist és ELISA mérést végeztük.
2. Az ingergazdag környezet és a PACAP kezelés hatását fiatal és idősödő parkinsonos patkányokon vizsgáltuk magatartási tesztek, tirozin-hidroxiláz (TH) immunhisztokémia, dopamin szint mérés és PARK7/DJ-1 fehérje analízis segítségével.
3. Ezt követően munkánkat klinikai kutatásokkal folytattuk, amelynek célja az volt, hogy széleskörben vizsgáljuk a Parkinson-kóros betegek plazmájából mérhető PACAP szintek változását, és összefüggéseket keressünk a klinikai gyakorlatban alkalmazott terápiás módszerekkel, valamint különböző klinikai tüneteket értékelő skálák eredményeivel (pl.: Hoehn-Yahr (HY) skála, Movement Disorder Society – Unified Parkinson's Disease Rating Skála (MDS-UPDRS), Epworth Sleepiness Skála (ESS)). A PACAP-38 szintek vizsgálatához ELISA módszert (humán PACAP-38 ELISA kit, MyBiosource, Cat.No: MBS109020) alkalmaztunk.

III.5. PACAP PLAZMASZINTJÉNEK VIZSGÁLATA POLITRAUMATIZÁLT PÁCIENSEKBEN

A PACAP stresszreakciót szabályozó, immunmodulátor és antiinflammatorikus hatása következtében fontos szerepet játszhat olyan klinikai kórképek patomechanizmusának szabályozásában is, mint a különböző traumás sérülések, ahol a károsodást követően számos pro- és antiinflammatorikus faktor aktivációja miatt egy komplex és dinamikus immunválasz indul meg. Klinikai munkánk során további célul tűztük ki a politraumatizált betegek PACAP-38 szintjének vizsgálatát a traumát követő 5 napon keresztül, valamint a PACAP-38 szint változásának korrelációs vizsgálatát más, a klinikai ellátás során gyakran alkalmazott markerekkel, mint a CRP és PCT, valamint a mindennapi gyakorlatban még nem rutinszerűen használt markerrel, a LAR-ral.

III.6. PACAP PLAZMA ÉS SZÖVETI SZINTJEINEK VIZSGÁLATA CARDIOVASCULARIS KÓRKÉPEKBEN

A kardiológiai kórképek vizsgálata során akut myocardialis infarctuson (AMI) áteső betegek és csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenségben szenvedő páciensek mintáinak elemzését végeztük el. Emellett transzlációs vizsgálatokkal is kiegészítettük kutatásainkat akut myocardialis infarctus sertés modelljének alkalmazásával. Célunk a szöveti és plazma PACAP szintek változásának jellemzése volt a különböző kórképekben, valamint az esetleges korrelációk feltérképezése a PACAP szint változások és a jelenleg használt prognosztikai biomarkerek között.

1. Transzlációs állatkísérletes vizsgálatunk során zárt mellkasú sertés AMI modellt alkalmaztunk, ahol a szív különböző üregeiből származó myocardialis mintákból határoztuk meg a PACAP szinteket egészséges szövetekben és myocardialis infarctust követő reperfúzió után. Emellett vizsgáltuk a különböző pre- és poszt-kondicionálási technikák hatását is a myocardialis mintákból mérhető PACAP koncentrációk mennyiségi változására. A szívizomminták PACAP-38 szintjének meghatározásához ELISA módszert alkalmaztunk.
2. Cardiovascularis betegekkel kapcsolatos klinikai vizsgálataink első részében ST-elevációval járó myocardialis infarctus (STEMI) miatt hospitalizált betegek plazma PACAP-38 szintjét mértük a percutan coronaria intervenciót (PCI) megelőzően, majd az azt követő 4., 24., és 48. órában. Emellett korrelációs vizsgálatokat végeztünk a PACAP-38 és plazma hs-cTn szintek, valamint számos rutin laborparaméter, echokardiográfia paraméter, társbetegségek és a STEMI előtt regulárisan szedett gyógyszerek között.
3. Kardiológiai klinikai kutatásaink során ischaemiás (ICM) és nem ischaemiás cardiomyopathiában (NICM) szenvedő szívelégtelen betegeket is vizsgáltunk. Krónikus, kompenzált szívelégtelen (HFrEF) betegek és cardialis dekompenzáció miatt akut szívelégtelenségben szenvedő páciensek plazma PACAP szintjét mértük, és korrelációs vizsgálatokat végeztünk a PACAP-38, NT-proBNP szintek, különböző laborparaméterek, echokardiográfias paraméterek, társbetegségek, és az

alkalmazott gyógyszeres terápia között. Emellett különböző citokinek változását is vizsgáltuk a PACAP szintekkel összefüggésben Luminex módszerrel.

4. Végül végstádiumú szívelégtelenség miatt szívtranszplantáción átesett betegek és egészséges, balesetben elhunyt páciensek myocardialis szövetmintáinak PACAP-38 szintjét és PAC1 receptor expresszióját vizsgáltuk és korreláltattuk az ismert laboratóriumi adatokkal és társbetegségekkel.

III.7. PACAP PLAZMA ÉS SZÖVETI SZINTJEINEK VIZSGÁLATA MALIGNUS BETEGSÉGEKBEN

Ahogy már a bevezetésben is említésre került, a PACAP általános citoprotektív hatással rendelkezik, és a különböző pro- és antiapoptotikus jelátviteli útvonalak szabályozásával szerepet játszik a tumorok növekedésében, proliferációjában és differenciálódásában, ezért klinikai kórképekkel kapcsolatos vizsgálatainkat különböző malignus betegségekből szenvedő páciensek vizsgálatával is kiegészítettük.

1. Vizsgáltuk különböző urogenitalis tumorokból (vese-, hólyag-, prosztata-, heretumor) származó szövetminták PACAP-27 és PACAP-38 szintjét RIA módszerrel.
2. Emellett myeloma multiplexben szenvedő páciensek plazma PACAP-38 szintjét mértük, és vizsgáltuk annak korrelációját a különböző klinikai és laboratóriumi eredményekkel, a betegség stádiumát meghatározó skálákkal is.

IV. EREDMÉNYEK DISZKUSSZIÓJA

IV.1. PACAP HATÁSAINAK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A HALLÓRENDSZERBEN IN VITRO ÉS IN VIVO MODELLEKBEN

IV.1.1. PACAP KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA CSIRKE COCHLEARIS SEJTTENYÉSZETBEN OXIDATÍV STRESSZ-INDUKÁLTA SEJTKÁROSODÁSSAL SZEMBEN

A PACAP hallórendszerben betöltött szerepének vizsgálatát in vitro kísérletekkel kezdtük, ahol a neuropeptid protektív hatását oxidatív stressz-indukálta toxicitással szemben igazoltuk csirke cochlearis sejttenyészetben. PACAP kezelést követően a H₂O₂ kezelés sejtkárosító hatása szignifikánsan csökkent, amit MTT teszttel igazoltunk. Emellett vizsgáltuk az apoptotikus és nekrotikus sejtek számát annexin V és propidium jodid kettős jelöléssel, ahol a PACAP kezelés növelte az élő sejtek számát és csökkentette a korai apoptotikus sejtek mennyiségét. A peptid antiapoptotikus képességét a caspase-3 aktiváció gátlásának kimutatásával is igazoltuk áramlási citometria segítségével (1).

Az apoptotikus folyamatoknak kiemelt szerepe van a belső fül fiziológiás és patológias folyamataiban egyaránt. Napjainkig több klinikai kutatás is foglalkozott az antiapoptotikus és antioxidáns faktorok potenciális otoprotektív hatásának igazolásával. A PACAP antiapoptotikus hatása is számos korábbi kísérletben bizonyítást nyert (32). Munkacsoportunk in vivo kísérletekben is bizonyította a PACAP zebraalak oldalszervében elhelyezkedő speciális szőrsejtekre kifejtett védő hatását oxidatív stressz-indukálta károsodással szemben a caspase-3 aktivitás gátlásán keresztül (69). Az értekezésben bemutatásra kerültek azon legfontosabb jelátviteli útvonalak, melyeken keresztül a PACAP elősegítheti a sejtek túlélését. Munkánk során bizonyítottuk a PACAP védő hatását oxidatív stressz-indukálta sejtkárosodással szemben szőrsejttenyészetekben, ami alapján feltételezhető potenciális otoprotektív szerepe különböző akusztikus traumák, toxikus ágensek és öregedés során kialakuló károsodások esetén.

IV.1.2. VAD TÍPUSÚ ÉS PACAP-GÉNKIÜTÖTT EGEREK HALLÓRENDSZERÉNEK VIZSGÁLATA

IV.1.2.1. PAC1 receptor és Ca²⁺-kötő fehérjék vizsgálata az egerek belső fülében

fiziológiás körülmények között és kanamicin-indukálta ototoxicitást követően

Az in vitro vizsgálatok után vad típusú és PACAP-génkiütött egerek segítségével folytattuk a belső fül szerkezeti összehasonlítását. Hematoxilin-eozin festéssel nem találtunk szignifikáns különbséget a két állatcsoport között, ezzel szemben a PAC1 receptor immunhisztokémiai analízise szignifikáns eltérést mutatott. PAC1 receptor expressziót tudtunk kimutatni mindkét csoport egyedeinél a belső és külső szőrsejtekben, a Deiters-

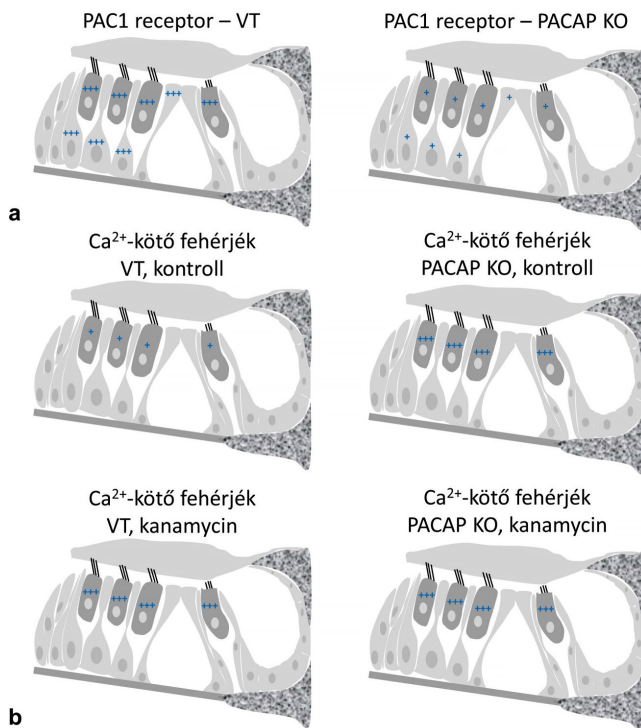
sejtek és a külső pillér sejtek területén, amely eredmények megegyeznek más korábbi munkacsoporthoz által leírt lokalizációkkal. Elsőként mi mutattuk ki, hogy a PACAP-génkiűtött egerek Corti-szervében a jelintenzitás szignifikánsan alacsonyabb, mint a vad egerekben (2). A PAC1 receptor expresszió változásának pontos mechanizmusa nem ismert. Korábban is kimutatták a PACAP receptorok mindhárom altípusának késleltetett expresszióját a fejlődés során a PACAP- és VIP-génkiűtött egerekben.

Ezt követően a Ca^{2+} -kötő fehérjék (parvalbumin, calretinin, calbindin) lokalizációját vizsgáltuk kontroll körülmények között és kanamicin kezelést követően a különböző állatsoporthoz. Normál körülmények között a vad egerek szőrsejtjei csak kismértékű Ca^{2+} -kötő fehérje (parvalbumin, calretinin, calbindin) expressziót mutattak, ami kanamicin kezelés hatására szignifikánsan emelkedett. Ezzel szemben a PACAP-génkiűtött egerek már kezelést megelőzően is szignifikánsan magasabb expressziót mutattak, ami a kanamicin kezelés hatására a heterozigóta PACAP-génkiűtött egerekben kisebb mértékben tovább emelkedett, míg a homozigóta PACAP-génkiűtött egerekben további szignifikáns emelkedést már nem tudtunk detektálni (2,3).

A Ca^{2+} -kötő fehérjéknek (calretinin, calbindin, parvalbumin) fontos szerepe van a Ca^{2+} homeosztázis szabályozásában. A különböző ototoxikus hatások hátterében, sok esetben a szőrsejtek megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja áll, amely a sejtek apoptózisához vagy nekrozisához vezethet. Ezen károsodás kivédésében játszanak fontos szerepet a Ca^{2+} -kötő fehérjék. A különböző neuronális károsodások és neurodegeneratív betegségek hátterében is gyakran a Ca^{2+} homeosztázis zavara áll.

Vizsgálataink során a PACAP-génkiűtött egerekben szignifikánsan magasabb Ca^{2+} -kötő fehérje expressziót találtunk, mint a vad egerekben, és ebből arra következtethetünk, hogy az endogén PACAP hiányából adódóan a szőrsejtek Ca^{2+} homeosztázisa zavart szenvedhet, és a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció következtében a Ca^{2+} -kötő fehérje expressziója megnő. Így azt feltételezzük, hogy az endogén PACAP-nak fontos szerepe lehet a szőrsejtek fiziológiai működésének fenntartásában, és hiányában a szőrsejtek jóval sérülékenyebbek a Ca^{2+} homeosztázist is érintő ototoxikus károsodással szemben.

Az aminoglikozid antibiotikumok ototoxikus hatásának hátterében is a szabadgyökök fokozott termelése és az intrinsic apoptotikus útvonalak aktivációja által indukált intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés áll, emiatt a Ca^{2+} -kötő fehérjék ezen folyamatokban is fontos szerepet töltenek be. Vizsgálataink során a kanamicin-indukálta ototoxicitást vizsgáltuk 7 napos vad típusú és PACAP-génkiűtött egerekben a Ca^{2+} -kötő fehérjék segítségével (3). Mivel a rácsálókban a hallórendszer fejlődése csak postnatalisan fejlődik be, ezért az újszülött állatok éretlen belső füle fokozottabban érzékeny az aminoglikozidok-indukálta károsító hatásokra, így munkánk során a kezelést 5 napos egereken hajtottuk végre. A vad típusú egereknél és a heterozigóta PACAP-génkiűtött egereknél a kezelést követően szignifikánsan magasabb Ca^{2+} -kötő fehérje expressziót találtunk, míg homozigóta PACAP-génkiűtött állatok esetében az alaphelyzetben is emelkedett expresszió nem nőtt tovább. Ebből arra következtethetünk, hogy endogén PACAP hiányában a PACAP-génkiűtött egerekben a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziója már alapállapotban elért egy olyan szintet, ami további upregulációra nem képes, ezért a szőrsejteket ért ototoxikus hatásokat nem képes kivédeni és a sejtek korai apoptózisa már normál körülmények között is elkezdődik. Vizsgálataink során elsőként mutattuk ki az endogén PACAP hiányából adódó fokozott vulnerabilitást kanamicin-indukálta károsodással szemben, ezért



IV.1.2.1. ábra: Vad típusú (VT) és homozigóta PACAP-génkiültött (KO) egerek Corti-szervének összehasonlító morfológiai vizsgálata. Az „a” ábra a PAC1 receptor expresszióját mutatja kontroll körülmények között, a „b” ábra pedig a Ca²⁺-kötő fehérjék immunpozitivitását ábrázolja kontroll körülmények között és kanamycin-kezelést követően. +: alacsony; +++: emelkedett immunpozitivitás (*munkacsoportunk ábrája*).

feltételezhetően az exogén PACAP kezelésnek védő hatása lehet ilyen sérülések esetén, amely bizonyítására a jövőben további kísérleteket tervezünk.

A vad típusú és homozigóta PACAP-génkiültött egerek belső fül morfológiai vizsgálatának eredményeit az **IV.1.2.1. ábra** foglalja össze.

IV.1.2.2. Az idegsejtek aktivációjának vizsgálata a hallópálya különböző magjaiban c-Fos immunhisztokémiával

C-Fos immunhisztokémia segítségével morfológiai összehasonlítást is végeztünk, amely során hanginger követő neuronális aktivációt mutattunk ki a hallórendszer különböző magjaiban vad típusú és PACAP-génkiültött egerekben. A cochlearis magok területén (VCN, DCN) mindkét csoportnál zajmentes környezetben csak néhány sejtben tudtunk kimutatni c-Fos aktivitást, amely jelölődés a hanginger hatására szignifikáns neurona-

lis aktivációt mutatott mindkét csoportban, de a PACAP-génkiűtött egerek esetében ez szignifikánsan kisebb volt, mint a vad egerekben. Ezen eredményeinket, a funkcionális vizsgálataink is megerősítették, ahol a PACAP-génkiűtött egereknél hallásküszöb növekedést találtunk, és az ABR hullámok morfológiai eltérései is az aktiválódott neuronok csökkent számát igazolták. Nissl-festés segítségével kimutattuk, hogy mindkét egércsoport cochlearis magjaiban hasonló mennyiségű neuron található, így az immunpozitivitás csökkenés nem a neuronszám, hanem ténylegesen a sejtaktiváció csökkenésének következménye. Ezen magokat PAC1 receptor immunisztokémiával is analizáltuk, ahol a korábbi Corti-szervben tapasztalt eredményeinkhez hasonlóan, a PACAP-génkiűtött egerek stratum granulosumában kevesebb sejtben találtunk PAC1 receptor immunreaktivitást a vad egerekhez képest (4).

A hallópálya centrálisabb részében, a SOC, NLL, IC magokban, a csendben tartott állatok esetében is emelkedett sejtaktivációt írtunk le, ami zaj hatására további szignifikáns növekedést mutatott minden állatban, azonban nem találtunk eltérést a vad és PACAP-génkiűtött egerek között. Végül a hallókéreg (AU1) vizsgálata során már zajmentes környezetben is olyan magas sejtaktiváció volt mérhető, ami már zaj hatására sem mutatott további emelkedést. A centrális magokban zajmentes környezetben detektálható fokozott neuronális aktiváció arra utal, hogy ezen magok komplex szerepet töltenek be a hangingerhez kapcsolódó más információk feldolgozásában, és a hallópályán kívül más idegrendszeri összeköttetéssel is rendelkeznek (4).

A komplex neuronális összeköttetésekkel rendelkező hálózatokban számos különböző neurotranszmitter vesz részt, amelyek szerepet játszhatnak az endogén PACAP hiányából adódó aktivációs különbségek kiegyenlítésében, ami magyarázatul szolgálhat a két egércsoport hasonló eredményeire a hallópálya centrálisabb területein. Ezen kompenzációs folyamatok pontos feltérképezése a jelenleg is folyamatosan zajló kutatásaink célja.

IV.1.2.3. Egér ductus cochlearisból készült homogenizátumok fehérjeösszetételének vizsgálata

Korábban már említésre került, hogy a ductus cochlearisban található endolympha összetételének vizsgálata fontos a halláskárosodás pontos okának feltérképezéséhez. Mivel a PACAP-ot és a PAC1 receptort a belső fül különböző sejtjei mellett a stria vascularis területén is kimutatták már, ezért feltételezhető, hogy a neuropeptid szerepet játszik az endolympha termelésének szabályozásában. Csirkéken végzett kísérleteink során nem találtunk különbséget az endolympha fehérje összetételében exogén PACAP kezelés hatására (58), ezért vad típusú és PACAP-génkiűtött egerekben tovább folytattuk a ductus cochlearisból készült lizátumok fehérjeprofíl vizsgálatát a gyulladásos és az angiogenetikus utakra fókuszálva, amelyek szabályozásában a PACAP-nak fontos szerepe lehet. Bár számos fehérjét azonosítani tudtunk mintáinkban, szignifikáns eltérést nem találtunk az állatsoportok között.

A PACAP-génkiűtött egerek halláscsökkenésének hátterében több morfológiai és funkcionális eltérést is igazoltunk a Corti-szervben és a hallópálya területén, de a pontos hatásmechanizmust még nem ismerjük. Feltételezhetően az endogén PACAP hiányából adódó korai halláscsökkenés hátterében a PACAP-génkiűtött egerekre jellemző felgyorsult öregedési folyamatok is állhatnak. A bevezetőben már említésre kerültek

azon vizsgálatok, melyek az endogén PACAP hiányából adódó eltéréseket mutatják be a PACAP-génkiütött egértörzsekben, amit részletesen egy összefoglaló közleményben is publikáltuk (9). Ezen elváltozások közül fontos kiemelni, hogy az endogén PACAP antiapoptotikus és antiinflammatorikus hatásának hiányában ezen egereknél egy fokozott öregedési folyamat figyelhető meg számos szervrendszer érintettségével (72, 73, 78-80). A különböző hatásokkal szemben mutatott fokozott vulnerabilitás következményeként a szervrendszerek korai degenerációja, a korai apoptotikus elváltozások, valamint a gyulladás és az oxidatív folyamatok aktivitása mind hozzájárulnak az egerek gyorsabb öregedéséhez (78). Emellett számos kutatás bizonyította a retina korai degenerációját is PACAP-génkiütött egerekben, ami a retina morfológiai eltéréseivel, a ganglion sejtek számának csökkenésével és a Müller-glia sejtek degenerációjában nyilvánul meg (72). Ezen felül kutatócsoportunkkal a PACAP-génkiütött egerek szisztémás vizsgálata során szinte minden szervben korai amyloidosist mutattunk ki (80). Jelenleg folynak azon kutatásaink, amelyek célja a szörsejtek degenerációjának vizsgálata, valamint a hallópálya különböző magjainak komplex morfológiai feltérképezése, melyek segítségével még pontosabb képet kaphatunk a halláscsökkenés hátterében álló morfológiai vagy funkcionális eltérésekről. Hosszútávú célunk az exogén PACAP kezelés otoprotektív szerepének vizsgálata öregedéssel járó halláskárosodásban, vagy más ototoxikus hatás indukálta halláskárosodás esetén, mivel az exogén PACAP kezelés protektív hatása már több érzékszervi károsodást modellező állatkísérletben is bizonyítást nyert.

IV.2. PACAP HATÁSAINAK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A FOGFEJLŐDÉS SORÁN

IV.2.1. VAD TÍPUSÚ ÉS PACAP-GÉNKIÜTÖTT EGEREK FEJLŐDŐ MOLARIS FOGAINAK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA

A 7 napos egerek fejlődő molaris fogainak összehasonlítása során is szignifikáns különbséget találtunk a vad és homozigóta PACAP-génkiütött egerek között. Morfológiai vizsgálataink során kimutattuk, hogy a PACAP-génkiütött egerek fogainak dentin rétege szignifikánsan vékonyabb, ami a fogfejlődés elmaradására utal, és hátterében a predentin képződési zavar vagy mineralizációs eltérések állhatnak. Ez a különbség leginkább a második molaris fogak esetében volt szembevetendő, melyek a fejlődés korábbi stádiumában voltak (6).

A Raman spektroszkópiával végzett vizsgálataink is eltéréseket mutattak a két állatcsoport között. A dentin hidroxipatit fázisában detektálható foszfát csúcsok (ν_1 PO_4^{3-}) vizsgálata során szignifikánsan magasabb félértékszélesség (FWHM) értékeket mértünk a PACAP-génkiütött állatokban, ami a hidroxipatit kristályok magasabb fokú rendezetlenségére utal. A rendezetlenség mértéke függ a kristályok méretétől és azok relatív karbonát tartalmától, így a Raman mérés során a kisebb nanométeres apatit kristályok esetében a foszfát csúcsok FWHM értéke magasabb a nagyobb rendezetlenség miatt. A kristályok rendezetlenségéhez járulhat hozzá a „ β szubsztitúció” is, amely során foszfát csoportok (PO_4^{3-}) karbonát csoportokkal (CO_3^{2-}) helyettesítődnek, és meghatározására a karbonát és foszfát (ν_1 CO_3^{2-}/ν_1 PO_4^{3-}) sávok relatív intenzitása használható. Méréseink

során a PACAP-génkiűtött egereknél magasabb ionizációs szubsztitúciót detektáltunk az apatit kristályokban, amely összefügg a dentin csökkent mértékű kristályosságával a génkiűtött csoportban. Ezen megfigyeléseinket támasztják alá a kristályossági index (CIRaman) számítása során kapott adataink, amelyek a PACAP-génkiűtött állatoknál alacsonyabb értékek körül rendeződnek (6). Eredményeink arra utalnak, hogy a PACAP-génkiűtött állatok dentinje kevésbé kristályosodott, rendezetlenebb, kisebb krisztallit méretű bioapatit jellemzi, és fejlődésében is elmarad a vad egerekhez képest.

A fejlődő molaris fogak zománc rétegének vizsgálata során az anorganikus állományban nem találtunk eltérést, de különbséget találtunk az amid III sávok deformációs rezgéseinek (kötésszög változás) intenzitás-hányadosában, ami a fehérjék másodlagos szerkezetének eltérésére utal. A vad típusú egerekben a rendezett és rendezetlen („random coil”) szakaszok nagyobb fokú diverzitását detektáltuk a PACAP-génkiűtött egerekhez képest, ugyanis az 1240 és 1270 cm^{-1} hullámszámú amid III csúcsok intenzitás arányai szélesebb skálán helyezkedtek el (6). A fehérjék rendezett („ α -hélix”, „ β -redők” és „ β -kanyar”) és rendezetlen konformációinak kialakításában az aminosav szekvenciának fontos szerepe van, így feltételezhetően a különböző zománcfehérjék egymáshoz viszonyított arányában, vagy adott fehérjék izoformái közötti arányban van eltérés a két csoport zománca között. A fehérjék másodlagos konformáció változásában detektálható eltérések kimutathatók a zománc fejlődését is érintő betegségekben, mint például amelogenesis imperfectában, aminek az amelogenin konformációs zavara áll a hátterében.

IV.2.2. SHH, PTCH1, GLI1 ÉS NOTCH JELÁTVITELI ÚTVONALAK VIZSGÁLATA FEJLŐDŐ MOLARIS FOGAKBAN

A morfológiai vizsgálatokat követően 7 napos PACAP-génkiűtött egerek molaris fogában immunhisztológiával emelkedett SHH expressziót tudtunk kimutatni a dentin és a szekretoros ameloblastok területén, és az alattuk elhelyezkedő stratum intermediumban a vad egerekhez képest. Az ameloblastokban és az odontoblastok nyúlványainak a területén az SHH útvonala receptora a PTCH1 is fokozott immunpozitivitást mutatott. Emellett ezen útvonala intracelluláris célpontja, a GLI1 is intenzívebb jelölődést adott a szekretoros ameloblastok apicalis területén (6).

Korábban számos kutatásban igazolták már, hogy a PACAP szerepet játszik a fogfejlődésben is részt vevő fontos molekuláris biológiai útvonalak szabályozásában, mint az SHH és BMP által aktivált folyamatok. A PACAP hatásai jól ismertek a csontfejlődésben fontos szerepet játszó faktorok szabályozásában, ezért a csont és fogak fejlődésében igazolt hasonlóságok miatt feltételezhető, hogy a PACAP hatásai a fogakban is ugyanúgy érvényesülnek. Ezen ismeretek szerint a PAC1 receptor aktivációjának hatására megemelkedik az intracelluláris cAMP szint, amely a PKA aktivációját eredményezi, ami gátolja az SHH-indukálta Gli1 nuclearis transzlokációját (66-68, 91). Ezen molekuláris útvonala jól magyarázzák azon kutatási eredményeinket, hogy az endogén PACAP hiányában az SHH, PTCH1 és Gli1 esetében is fokozott expressziót találtunk a PACAP-génkiűtött egerekben a vad egerekhez képest.

A SHH jelátviteli útvonala mellett a fejlődő molaris fogakban a Notch jelátviteli útvonala változásait is feltérképeztük PACAP-génkiűtött egerekben. Ezen útvonala fontos szerepet tölt be a sejtek differenciációjában, ugyanis a Notch receptort expresszáló sejtek a

sejtosztódás fázisában maradnak, míg ezen folyamatok gátlása (például a Numb fehérjén keresztül) a sejtek differenciációját segíti elő. Vizsgálataink során a PACAP-génkiütött egerek ameloblast és odontoblast sejtjeit vizsgáltuk és kimutattuk a Notch2 receptor, a DLL1 és Jagged1 ligandok és a CSL intracelluláris jelátviteli molekula fokozott immunpozitivitását a vad egerekhez képest (8). Számos molekuláris jelátviteli útvonal szerepe felmerült már az endogén PACAP hiányából adódó eltérések kompenzálásának hátterében. Kísérleteink során igazoltuk, hogy a Notch jelátviteli útvonal aktiválódik PACAP-génkiütött állatokban, amelynek szerepe lehet a kompenzációs folyamatokban, azonban a mechanizmusok kapcsolódási pontjai még feltérképezésre várnak. Több komplex szabályozási mechanizmus is szerepet játszhat ebben a folyamatban, melyek részletesen az értekezésben olvashatók.

Összességként elmondható, hogy a fejezetben ismertetett jelátviteli útvonalak fokozott aktiválódásának feltételezhetően fontos szerepe lehet az endogén PACAP hiányából adódó eltérések kompenzálásában, de ezen változások és a morfológiai eltérések közötti pontos összefüggések még nem ismertek. Jövőbeni célunk a jelátviteli útvonalak pontos feltérképezése, más, a fogfejlődésben fontos szerepet játszó faktorok vizsgálatával, mint a BMP vagy FGF.

IV.2.3. FELNÖTT (1 ÉVES) PACAP-GÉNKIÜTÖTT ÉS VAD TÍPUSÚ EGEREK ALSÓ METSZŐFOGAINAK STRUKTURÁLIS ÉS MORFOMETRIAI ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Az egyéves (felnőtt) egerek alsó metszőfogainak vizsgálata során is szignifikáns különbséget találtunk a vad típusú és PACAP-génkiütött egerek között (7). Micro-CT vizsgálat tal szignifikánsan kisebb metszőfog méreteket találtunk a PACAP-génkiütött egerekben, ami megerősíti azon korábbi eredményt, miszerint a PACAP-génkiütött egerek növekedése elmarad a vad típusú állatokéhoz képest (56). A pulpa/dentin arányának vizsgálata során szignifikánsan szűkebb pulpakamrát találtunk a PACAP-génkiütött csoportban, ami akár egy korai öregedési jel is lehet, vagy a fokozott károsító hatásokkal szembeni védekezőreakció következménye (7).

Raman spektroszkópiával az 1 éves állatok metszőfogainak dentinjének anorganikus részében is hasonló eltéréseket találtunk, mint a 7 napos egerekben, ugyanis a PACAP-génkiütött állatokban itt is magasabb karbonát/foszfát arányt (nagyobb fokú β -szubsztitúciót) detektáltunk, ami kisebb méretű kristályokra, és a kristályszerkezet nagyobb fokú rendezetlenségére utal (7). Ezen eredményt denzitometriás vizsgálataink is megerősítették, mely szerint a dentin kalcium-hidroxipatit térfogati sűrűsége szignifikánsan alacsonyabb a PACAP-génkiütött csoportban. A dentin csökkent denzitása, valamint kristályszerkezeti eltérései a PACAP-génkiütött egerekben, csökkent ellenállási képességet is jelenthet, mivel a kisebb kristálméret a specifikus felszín növekedésével jár, így nagyobb felszínt biztosít a savas behatásoknak. Ez is oka lehet a pulpakamra szűkülésének.

A Raman mérések a dentin organikus állományában is különbséget mutattak a metszőfogakban a két állatcsoport között. A PACAP-génkiütött egerekben az amid III 1240/1270 csúcsok arányai keskenyebb skálán helyezkedtek el a vad egerekhez képest, ami egy kisebb fokú strukturális diverzitásra (kevesebb „random coil”) utal a fehérjék

másodlagos konformációját illetően (7). A dentin fő organikus alkotóeleme az I-es típusú kollagén, de emellett más, nem kollagén típusú fehérjék is megtalálhatók. A PACAP-génkiűtött egereknél kimutatott kisebb „random coil” diverzitás befolyásolhatja a fehérjék ásványi anyagokhoz, kollagénekhez és a sejtfelszínekhez való kötődését, és így szerkezeti eltérésekhez vezethet.

A PACAP neurotrofikus és neuroprotektív hatása révén fontos szerepet tölt be az idegrendszeri fejlődésben, ezért nem meglepőek az endogén PACAP hiányából adódó eltérések a szintén ectodermális eredetű fogak fejlődése során. A PACAP-génkiűtött egerek fogfejlődésében kimutatott eltérések hátterében számos, egymással szoros összefüggésben álló molekuláris útvonal feltételezhető, melyek finom egyensúlya az endogén PACAP hiányában zavart szenved és morfológiai eltéréseket okoz.

Jelenlegi kutatásainkban a PACAP-génkiűtött egerek fogfejlődésének vizsgálata során is olyan elváltozásokat igazoltunk, amely az egerek korai öregedési folyamatait támasztják alá. A fogfejlődés kapcsán részletesen ismertetésre kerültek az SHH és Notch jelátviteli útvonalakkal kapcsolatos változások, melyek szerepet játszhatnak az endogén PACAP hiányából adódó elváltozások kompenzálásában. Ezek a folyamatok részt vehetnek a PACAP hiányából adódó korai öregedési folyamatok gátlásában, de feltételezhetően ezen jelátviteli útvonalak nem képesek teljes mértékben pótolni a PACAP hatásait. A PACAP öregedésben betöltött szerepét jelenleg is folyamatosan vizsgáljuk korral összefüggő összehasonlító morfológiai vizsgálatokkal a hallórendszerben, az idegrendszerben és a fogfejlődés során abból a célból, hogy pontosan feltérképezhessük a korai öregedés hátterében álló lehetséges patomechanizmusokat.

IV.3. PACAP VIZSGÁLATA TEJMINTÁKBAN, PLAZMAMINTÁKBAN ÉS KÜLÖNBÖZŐ SZÖVETANI MINTÁKBAN VÁRANDÓSSÁG ALATT ÉS LAKTÁCIÓ SORÁN

IV.3.1. PACAP VIZSGÁLATA AZ ANYATEJBEN ÉS LAKTÁCIÓ SORÁN

Vizsgálataink kezdetén már számos, a bevezetésben részletezett in vitro és in vivo kísérletes eredmény számolt be a PACAP gonadális és reprodukív funkciókra kifejtett hatásáról, de csak limitált számban voltak elérhetőek olyan kutatási adatok, melyek klinikai beteganyagból származtak. Ezért klinikai kutatásaink kezdetén célul tűztük ki az endogén PACAP vizsgálatát fiziológiás körülmények között, egészséges, fiatal (20-40 éves) önkéntesek plazmamintájának elemzésével. RIA méréseink nem mutattak szignifikáns eltérést a különböző nemű páciensek között, és az eltérő menstruációs ciklusban lévő nők esetében sem találtunk nagy individuális eltéréseket (10). Ezzel szemben, a várandós kismamáknál a 2. és 3. trimeszterben, valamint a szoptatós édesanyák plazmamintáiban szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet detektáltunk az egészséges önkéntes nőkhöz képest (10,12). Ezt követően kutatásunkat anyatejminták vizsgálatával folytattuk, ahol 5-20-szoros PACAP-38 koncentrációt mértünk a plazmamintákhoz képest, hasonlóan számos más bioaktív faktorhoz (10).

Az anyatej összetétele folyamatosan változik a szoptatási periódus alatt az újszülöttek és csecsemők igényeinek megfelelően, ezért a PACAP-38 szintek vizsgálatát a különböző szoptatási időpontokban gyűjtött anyatejminták analízisével folytattuk. A méréseket a szoptatás első három napjában gyűjtött kolosztrum minták vizsgálatával kezdtük, majd ezt követően a szoptatás 4. napján átmeneti tejet, majd ezt követően az 5. naptól érett tejet gyűjtöttünk havi rendszerességgel a szoptatás első 17 hónapján keresztül. Hasonlóan más bioaktív faktorokhoz, mi is szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet mértünk a kolosztrumban az átmeneti vagy az érett tejmintákhoz képest (13,14). A kolosztrumban magasabb a különböző hormonok, növekedési faktorok, oligoszacharidok, citokinek és immunregulációs szereppel bíró faktorok szintje, melyek fontos szerepet töltenek be a neonatalis immunrendszer fejlődésében és különböző gyulladásos és allergiás betegségek megelőzésében. A fejlődés első hat hónapjában az anyatejes táplálásnak nagyon fontos szerepe van az újszülöttek és csecsemők egészséges fejlődésében, ezért a WHO ebben a periódusban a kizárólagos anyatejes táplálást ajánlja. A szoptatás első 6 hónapjában gyűjtött érett anyatejek között nem találtunk szignifikáns eltérést a PACAP-38 szintekben, de ezt követően a 11. hónaptól szignifikánsan magasabb PACAP szinteket mértünk a szoptatási periódus előrehaladtával, amely az anyatej elválasztott mennyiségének csökkenésével állhat összefüggésben. A tej összetétele egy szoptatáson belül is változik, így a szoptatás elején gyűjtött előtejben kevesebb, míg a szoptatás végén gyűjtött utótejben magasabb zsír és laktóz tartalom mérhető. Számos bioktív faktor esetén szintén kimutatható ez a koncentrációváltozás az előtej és az utótej között. Méréseink során nem találtunk szignifikáns különbséget az előtej és az utótej PACAP-38 szintje között, hasonlóan a tejminták pitvari natriuretikus faktor és granulocita-kolónia stimuláló faktor szintjéhez.

A szoptatás első hat hónapjában gyűjtött anyatejmintákban a PACAP mellett más bioaktív faktorok változását is vizsgáltuk az anyatej vizes és zsíros fázisában Luminex módszer segítségével (CD40, Flt-3L, MCP-1, RANTES, GRO, MIP-1 β , MDC, eotaxin, farnesin, EGF) (35). A vizes fázisban található faktorok a tápcsatorna kezdeti szakaszán, míg a zsíros fázisból szeparálható bioaktív molekulák legtöbb esetben zsírcsepp-membránba csomagolva ellenállóbbak, így a gastrointesztinális rendszer mélyebb részében hasznosulnak. Jelenlegi kutatásaink célja a PACAP-38 kimutatása az anyatej vizes és zsíros fázisában, valamint exosomák izolálásával, hogy ezáltal még pontosabb képet kaphassunk a peptid biológiai hasznosulásáról a szoptatás során.

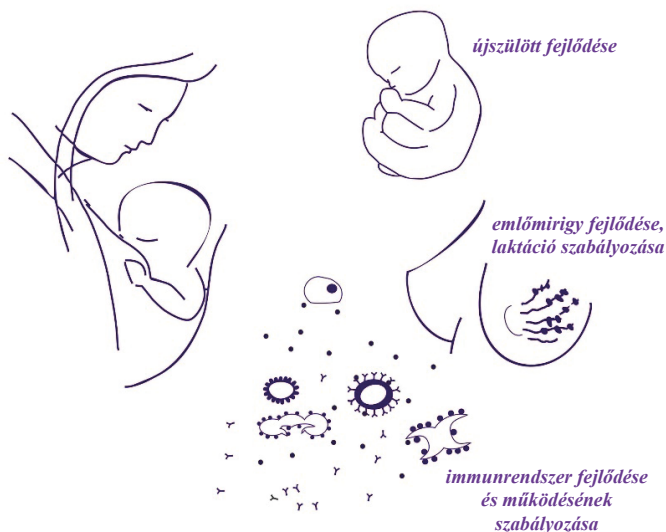
Az emberi tejminták vizsgálatát kiegészítettük különböző háziállatokból származó minták PACAP-38 szintjének elemzésével, amit a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tanszékével végeztünk kollaborációban és Dr. Czeglédi Levente nagydoktori értekezésének részét képezik (53, 75). Az emberi tejmintákhoz hasonlóan a szarvasmarha-, birka- és kecsketejek vizsgálata során is közel tízszeres PACAP-38 szintet mértünk a tejmintákban az adott állat plazmamintáihoz képest, ami szignifikánsan nem változott a szoptatás első 3 hónapjában (53). A bárányok plazmamintájának vizsgálata során szignifikáns emelkedést találtunk 1 órával a szoptatást követően, ami a kiinduló plazmaszintre tért vissza 2 órát követően (75). Emellett ezen kísérletben birka laktáló emlőmintákból származó homogenizátumból is ki tudtuk mutatni a PACAP-38 jelenlétét RIA vizsgálattal (53), és igazoltuk a PACAP és PAC1 receptor mRNS jelenlétét PCR segítségével (75). A dolgozatban részletezésre kerültek azon vizsgálataink, ahol a PAC1 receptor expressziót vizsgáltuk immunhisztokémia módszerrel emberi emlőminták, valamint laktáló és nem laktáló birka emlőszövetek összehasonlításával. A nem laktáló szövetekben csak nagyon

gyenge immunpozitivitást találtunk a glandularis szövetekben, ezzel szemben a laktáló birka emlőmirigysejtjei szignifikáns PAC1 receptor expresszió emelkedést mutattak, de a mirigyeket körülvevő kötőszöveti elemekben nem találtunk PAC1 receptor pozitivitást (13).

A tehéntejből készült, kereskedelmi forgalomban megtalálható pasztörözött tejtermékek és különböző tápszer (hipoallergén és nem hipoallergén) vizsgálatát is elvégeztük munkánk során (14). Vizsgálataink során a friss tehéntejben és a pasztörözött tejmin-tákban az érett anyatejmintákhoz hasonló PACAP-38 szintet mértünk. Szintén ki tudtuk mutatni a PACAP-38 jelenlétét a vizsgált tápszerekben is, ami a neuropeptid kis molekulatömegéből adódóan jobban ellenáll a tápszerkészítés kémiai folyamatainak, mint a komplexebb fehérjék. Meglepő volt, hogy a hipoallergén tápszerekben magasabb PACAP koncentrációt mértünk a nem hipoallergén készítményekhez képest, aminek hátterében azt feltételezzük, hogy a tejben a PACAP egy része valamilyen hordozó molekulához (pl. ceruloplazminhoz), vagy exosomákhoz kötötten található, ami a hipoallergén tápszer-ek extenzívebb hidrolitikus folyamatai során felszabadul, és mérhetővé válik. Jelenleg is folyamatosan zajlanak azon kísérleteink, ahol az anyatejmintákban mérhető PACAP exo-soma frakciókban való jelenlétét szeretnénk bizonyítani.

A PACAP anyatejben betöltött pontos szerepe még nem ismert. Feltételezzük, hogy neurotrofikus, immunmodulátor, antiinflammatorikus és antiapoptotikus hatásainak kö-zönhetően fontos szabályozó szerepe lehet az újszülöttek növekedésében, az immu-nrendszer és a gastrointestinalis rendszer fejlődésében, valamint szerepet játszhat az em-lőmirigy fejlődésében és a laktáció folyamatának szabályozásában (IV.3.1. ábra). Ezen biológiai hatásokkal kapcsolatos részletes összefoglalók PACAP könyvünk megfelelő fejezeteiben olvashatók (15, 32).

PACAP szerepe az anyatejben



IV.3.1. ábra: A PACAP anyatejben feltételezett szerepe (munkacsoportunk ábrája).

A PACAP neurotrofikus faktorként kiemelt szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében, így a neurogenesis, myelinizáció, neuronális differenciáció és migráció szabályozásában, emiatt feltételezhető, hogy az anyatejben detektálható magas PACAP koncentráció az újszülöttek idegrendszeri fejlődésének regulációjában is részt vesz. Immunmodulátorként a PACAP elengedhetetlen az újszülöttek immunrendszerének fejlődésében, különböző patogénekkal szembeni védekezésben és a gastrointestinalis rendszer immunológiai mikrokörnyezetének kialakításában. Antiapoptotikus hatásának köszönhetően pedig az emlőmirigy növekedésében és a tejelválasztás szabályozásában lehet fontos szerepe. A szoptatás során számos antiapoptotikus faktor expressziója fokozódik a tejben kiválasztódó bioaktív molekulák hatásának köszönhetően. A PACAP antiapoptotikus molekulaként képes befolyásolni számos, a laktáció regulációjában fontos citokin, chemokin, angiogenetikus faktor és hormon (ösztrogén, progeszteron, prolaktin, oxitocin) szekrécióját. Munkacsoportunk korábban a PACAP kezelés hatását HC11 egér emlő epithelialis sejtvonalon vizsgálta, ahol a sejtek laktogén homonokkal-indukált differenciációját β -casein mérésével vizsgáltuk. A PACAP kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a sejtek differenciációját, ugyanis nem volt hatással a sejtek β -casein expressziójára. Emellett a nem differenciált sejtekben csökkentette az amphiregulin és az epidermalis növekedési faktor kibocsátását, ami szerepet játszhat az emlőmirigy patológias elváltozásainak kialakulásában és a betegségek progressziójában (54).

Az anyatejben detektálható bioaktív faktorok származhatnak az emlőmirigy sejtekből, vagy a tejben található különböző sejtek is szekretálhatják őket, emellett származhatnak az anyai szérumból is. A PACAP esetében ezek mellett még feltételezhető forrás lehet a mirigyeket körülvevő idegelemek, vagy a laktáció során stimulálódó, idegrendszeri, laktációval kapcsolatos endokrin központok is. A tejben található PACAP biológiai stabilitása és orális hasznosulásának hatékonysága még nem pontosan ismert. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a plazmában a PACAP mérhető félféltideje csak pár perc a DPP-IV enzim aktivitásának köszönhetően. Ezzel szemben a tejminták esetében nem szükséges a minták protein inhibitor kezelése, mivel a -20°C -on tartott mintákban több héttel a mintagyűjtést követően is hasonló mennyiségű PACAP-ot tudunk detektálni, mint a friss mintákban. Az jól ismert, hogy az emlőmirigy termel különböző proteáz inhibitorokat a tejben található bioaktív fehérjék védelmében, az újszülöttek DPP-IV aktivitása alacsonyabb, valamint az intestinalis epithelialis sejtek permeabilitása is nagyobb a makromolekulákkal szemben. Ezen hatások alapján feltételezhető a tejben detektálható PACAP effektív hasznosulása a szoptatás során, amit bárányok plazmamintájának vizsgálatával is bizonyítottunk, ahol a plazma PACAP szintje szignifikánsan emelkedett 1 órával a szoptatást követően (75).

V.3.2. PACAP VIZSGÁLATA VÁRANDÓSSÁG ALATT, A SZÜLÉS ALATT, A SZÜLÉS UTÁN ÉS A PLACENTÁBAN

Az előző fejezetben már említésre került, hogy egészséges önkéntesek és szoptatós kismamák mellett vizsgáltuk várandósok plazmamintáit is és szignifikáns emelkedést találtunk a 2. és 3. trimeszterben az egészséges önkéntesekhez képest (12). A szülés során a plazma PACAP-38 szintje szignifikánsan csökkent, ami összefüggésben lehet az uteroplacentaris keringési változásokkal és az uterus kontrakciójával, de 3 nappal a szülést követően újra visszatért az eredeti szintre. Az anyai plazmaminták mellett az újszülöttektől is gyűjtöttünk

vérmentát a perifériáról és a köldökzsinórban található arteria és vena umbilicalisból. A perifériás vérmentában nem találtunk különbséget az anyai vérben mért PACAP szinthez képest, ezzel szemben a köldökerekben alacsonyabb volt a PACAP-38 koncentrációja. Az arteria umbilicalisban, amely a magzat vénás vérét szállítja a placentába, szignifikánsan magasabb PACAP szintet mértünk, mint a vena umbilicalisban, ami a placentából szállítja az oxigéndús és tápanyagban gazdag vért a magzathoz, ami arra utal, hogy a placentán és az anyai szöveteken kívül a magzatnak is fontos szerepe van a PACAP termelésében, amely elengedhetetlen az egészséges magzati fejlődés során (12).

A vérmentákon kívül follicularis folyadékából és 15-19 hetes önkéntes várandósok amniocentesis során gyűjtött amnionfolyadékából is kimutatta munkacsoportunk a PACAP jelenlétét (51, 71, 93), melynek pontos eredete még nem ismert. Stabil PACAP szintet mértünk a folliculusokból gyűjtött mintákban, melyek PACAP koncentrációja szignifikáns korrelációt mutatott a stimulációt követően nyert oocyták számával (71), amely a neuropeptid oogenesisben betöltött szerepével is magyarázható.

Korábban az endogén PACAP-ot és PAC1 receptort is kimutatták már az uteroplacentaris egység részeiben különböző állatokban és emberi mintákban, így feltételezhető, hogy a neuropeptidnek szerepe van a placenta működésének szabályozásában. A dolgozatban részletezett vizsgálataink során a placenta anyai és magzati részéből gyűjtött mintákban is ki tudtuk mutatni a PACAP két izoformájának, a PACAP-38-nak és PACAP-27-nek a jelenlétét. Az érett placentaminták esetében szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet találtunk a PACAP-27-hez viszonyítva, amely a placenta érése során szignifikáns emelkedést mutatott. A köldökzsinór mintákban szignifikánsan alacsonyabb peptid szinteket mértünk (11). Eredményeinkhez hasonlóan, korábban más kutatócsoportok is magasabb PACAP-38 koncentrációt találtak az uterusban és a placenta különböző részeiben a PACAP-27-hez képest, és szintén szignifikánsan alacsonyabb szinteket mértek a köldökzsinór esetében. Emellett bizonyították a PACAP és a PAC1 receptor jelenlétét patkányban és különböző korú emberi placentamintákban is, ahol az érett placentában erős PACAP és PAC1 receptor mRNS expressziót találtak. Ezen eredmények megerősítik saját méréseinket, miszerint az érett placentában RIA módszerrel magasabb peptid szintet mértünk, mint a korai placentából származó mintákban.

A PACAP uterusra és placentaris funkciókra kifejtett pontos hatása még nem ismert. A legújabb, sertéseken végzett kutatási eredmények szerint a PACAP fokozza az uterus kontrakciók frekvenciáját, és csökkenti a kontrakciók amplitúdóját. Emellett ismert, hogy a PACAP szabályozza az uteroplacentaris keringést az erek és a simaizom sejtek kontraktilitásának szabályozásával. Emellett az implantáció során betöltött szerepére utal az a korábbi kutatási eredményünk is, ahol szignifikáns PACAP mRNS emelkedést írtunk le egész uterusban a blastocytá beágyazódása során (86). A PACAP a VIP-hez hasonlóan a placenta hormontermelését is szabályozza, amely hatások feltételezhetően a VPAC receptorokon keresztül érvényesülnek, valamint szerepet játszik számos angiogenetikus faktor regulációjában is (62). Végül a PACAP trophoblast sejtekre kifejtett hatásait más kutatócsoport mellett mi is vizsgáltuk egészséges és tumoros sejteken (46, 62, 64).

Összefoglalásként elmondható, hogy a PACAP és receptorainak jelenléte is kimutatható az uterusban és a placentában, ahol fontos szerepet játszik a vérkeringés, a méhkontrakció és a placentafejlődés szabályozásában mind a fiziológiás, mind pedig a patológiás folyamatok során egyaránt, azonban pontos biológiai szerepének feltérképezése még további vizsgálatokat igényel.

IV.4. PACAP MENNYISÉGÉNEK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA PARKINSON-KÓRBAN ÉS ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEIBEN

IV.4.1. PACAP SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA PARKINSON-KÓR ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEIBEN

A PACAP felfedezése óta számos in vitro és in vivo kísérletben bizonyították neuroprotektív hatását különböző károsító hatásokkal szemben, amely kutatások eredményeit összefoglaló közleményekben részletesen publikáltuk (26, 27, 104). Ebben a fejezetben a PACAP és a Parkinson-kór kapcsolatát részletező eredményeink kerülnek bemutatásra különböző állatkísérletes modellekben, számos magatartási, immunhisztológiai és molekuláris biológiai vizsgálat tükrében.

A dolgozatban részletezett vizsgálataink során gerinctelen és gerinces állatkísérletes modellek összehasonlításával vizsgáltuk a PACAP szerepét Parkinson-kórban (18). A gerinctelen állatokon végzett vizsgálatainkhoz rotenonnal kezelt csigákat alkalmaztunk, ahol a PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette az állatok mortalitását és javította a rotenon kezelés következtében kialakuló hypokineticus tüneteket. A gerinces állatmodell az általunk korábban is alkalmazott unilaterális 6-OHDA-indukálta substantia nigra károsodás volt patkány modellben, ahol korábbi vizsgálataink szintén bizonyították a magatartási jelek javulását a PACAP-kezelt csoportokban (36, 101-103). Korábban TH-immunhisztokémia segítségével azt is kimutattuk, hogy a dopaminerg sejtkárosodás mértéke is szignifikánsan kisebb a PACAP-kezelt csoportokban (101, 102), amit jelenlegi vizsgálataink is alátámasztanak, ugyanis PACAP kezelés után mindkét kísérletes modellben szignifikánsan magasabb dopamin szintet mértünk a csak 6-OHDA-nal vagy csak rotenonnal kezelt állatok mintáihoz képest (18).

Munkacsoporthunk korábban a PACAP neuroprotektív hatását unilaterális 6-OHDA kezeléssel indukált Parkinson-kór modellben igazolta, ahol PACAP kezelés hatására javultak a neurológiai tünetek, és szövettani vizsgálattal is kisebb sejtpusztulást detektáltunk a substantia nigra és a ventralis tegmentalis area területén a kezelt parkinsonos állatokban (36, 101-103). A kezdeti patkánykísérletek után, in vitro Parkinson-kór modellben is feltérképeztük a PACAP protektív hatásának hátterében álló molekuláris biológiai útvonalakat salsolinol és inflammatorikus mediátorok által indukált toxicitással szemben dopaminerg neuroblastoma (SH-SY5Y) sejtvonalon. Ezen in vitro kísérletben a PACAP kezelés koncentráció függő módon csökkentette a sejtpusztulás mértékét és az apoptotikus útvonalak aktiválódását a caspase-3 gátlásával, amely hatás a PACAP receptor antagonistá PACAP6-38 kezelést követően nem érvényesült (47, 48).

Az in vitro kísérletek mellett a PACAP jelátviteli útvonal protektív hatásának bizonyítására 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinnel (MPTP) kezelt Parkinson-kóros makákókban vizsgáltuk a PAC1 receptor expresszióját a basalis ganglionok területén. Vizsgálataink során szignifikánsan kisebb immunpozitivitást találtunk a nucleus caudatus, a putamen és globus pallidus területén a parkinsonos állatokban, de nem találtunk változást a cortexből származó mintákban. L-DOPA (levodopa) kezelés hatására egyes agyterületeken kisebb mértékű expresszió csökkenést találtunk, ami szintén alátámasztja a PACAP szerepét ezen kórfolyamatban (57).

A PACAP kezelés Parkinson-kór esetén kifejtett potenciális neuroprotektív hatása több útvonalon keresztül is érvényesülhet (26). Többek között a PACAP képes a dopamin szintézist is befolyásolni, a tirozin-hidroxiláz enzim aktivitásának fokozásával és a dopamin exocitózisának serkentésével. Vizsgálataink során a szerotonin szintben nem találtunk eltérést a különböző kezelések követően, de ezen mechanizmus hátterében álló folyamatok még kutatás alatt állnak.

A Parkinson-kór patomechanizmusában számos fehérje játszik szerepet. Ezen fehérjék változását nano-HPLC-MS módszer segítségével vizsgáltuk 6-OHDA kezelést követően a substantia nigrában (73). A mérés során 95 különböző fehérjét analizáltunk, de ezek közül csak a PARK7 chaperon fehérje esetében találtunk szignifikáns eltérést a kezelést követően, ezért munkánk során a PARK7 (DJ-1) chaperon fehérjeváltozását is vizsgáltuk mindkét állatmodellben. A *PARK7* gén mutációja okozza a Parkinson-kór egy autoszomális recesszív módon öröklődő típusát, ami a betegség korai megjelenésével jár. A *DJ-1*-géndeficiens egerekben csökken a striatalis dopaminszint, a motoros aktivitás és TH-pozitív sejtek száma a nigrostriatalis rendszer területén, emellett motoros és nem motoros eltérést is leírtak a *PARK7*-génkiütött egerekben. A PARK7 fehérje antioxidáns hatásának köszönhetően védő hatást fejt ki H_2O_2 - és 6-OHDA-indukálta toxicitással szemben különböző neuronális sejtvonalakon, és védi a dopaminerg sejteket a károsító hatásokkal szemben. Mindkét állatunk vizsgált állatmodellben a toxikus kezelés hatására csökkent a PARK7/DJ-1 fehérje mennyisége, amit patkányok esetében PACAP kezelést követően már nem tudtunk kimutatni. A csigákban a PARK7 fehérje expressziója nem változott PACAP kezelés hatására, de a magatartási tünetek javulásából és a dopamin szint emelkedésből arra következtethetünk, hogy a PACAP neuroprotektív hatása más molekuláris biológiai útvonalon érvényesül (18). Mivel a PACAP hatását gerinctelen és gerinces Parkinson-kór modellben is egyaránt ki tudtuk mutatni, így azt feltételezzük, hogy a neuroprotektív hatás érvényesülését evolucionálisan konzervált molekuláris útvonalak szabályozhatják.

IV.4.2. INGERGAZDAG KÖRNYEZET HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PARKINSON-KÓR MODELLBEN FIATAL FELNŐTT PATKÁNYOKBAN

Parkinson-kór állatkísérletes modelljében a korai ingergazdag környezet protektív hatását is igazoltuk. A korai életszakaszban elszenvedett negatív hatások vagy traumák (pl.: perinatalis asphyxia, toxikus ágensek) befolyásolhatják az idegrendszer fejlődését, és szerepet játszhatnak különböző neuropszichiátriai és neurodegeneratív betegségek kialakulásában. Ezért ezen hatásokat széles körben kutatják rácsálókban (55, 70, 100) és emberekben is egyaránt. Számos kísérletben bizonyították már az ingergazdag környezet protektív hatását ischaemiát, toxikus hatásokat és traumát követően is (65). Mindemellett Parkinson-kór állatkísérletes modelljeiben is bizonyították az ingergazdag környezet védő hatását MPTP-indukálta károsodás és 6-OHDA kezelés esetén. A legtöbb korábbi vizsgálatban a fiatal (1-6 hónapos) állatokat közvetlenül a kezelés előtt vagy azt követően helyezték ingergazdag környezetbe különböző ideig, azonban a születés után alkalmazott ingergazdag környezet hosszútávú hatásait kísérletünk előtt még nem vizsgálták. Kutatásunk során a kispatkányokat születésüket követően 5 hétig ingergazdag környezetben, számos játékot tartalmazó nagy ketrecben tartottuk, amely környezetet naponta vál-

toztattunk az állandó kognitív stimuláció fenntartása érdekében. Ezt követően a 3 hónapos állatoknál unilaterális 6-OHDA kezeléssel roncsoltuk a substantia nigrát, majd vizsgáltuk a magatartási tüneteket és a morfológiai eltéréseket. Míg TH-immunhisztológiával szignifikáns dopaminerg sejtpusztulást találtunk a substantia nigra területén a standard ketrecben tartott állatokban 6-OHDA kezelés után, addig az ingergazdag környezetben tartott patkányoknál nem találtunk jelentős eltérést a kezeletlen csoporthoz képest (16). A dopaminerg sejtszámban észlelt különbségek magyarázatul szolgálhatnak a magatartási tünetek gyorsabb javulásáért. Az ingergazdag környezetben tartott állatoknál tapasztalt eredményeket korábban is leírtunk már ebben a Parkinson-kór modellben, ahol különböző korú és nemű patkányokat és a nemi hormonok protektív hatását vizsgáltuk (38, 40). A motoros tünetek vizsgálata során (ágaskodások száma, gyors mozgással töltött idő) szignifikánsan jobban teljesítettek az ingergazdag környezetben nevelkedett állatok, míg az aszimmetrikus tüneteknél nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között. Feltételezzük, hogy az utóbbi jelenség hátterében a kis fokú neuronális károsodás állhat, ami maximum 24%-os volt ebben a modellben, hiszen az jól ismert, hogy a dopaminerg sejtek legalább 50%-os károsodása szükséges az aszimmetrikus tünetek kialakulásához (36, 38, 103). Munkánk során tovább bővítettük azon kísérletes eredmények számát, amely bizonyította az ingergazdag környezet protektív hatását Parkinson-kór modellben, és alátámasztottuk azon megfigyeléseket, ahol a rendszeres fizikális aktivitás jótékony hatását igazolták Parkinson-kórban szenvedő pácienseknél.

IV.4.3. AZ INGERGAZDAG KÖRNYEZET ÉS PACAP KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PARKINSON-KÓR MODELLBEN IDŐSÖDŐ PATKÁNYOKBAN

Az ingergazdag környezet és a PACAP kezelés együttes hatását idősödő Parkinson-kóros patkányokban is vizsgáltuk (17). Először kezeletlen állatokban mértük a substantia nigra dopamin tartalmát, és a várt eredményeknek megfelelően az idősödő állatokban alacsonyabb dopamin szintet találtunk a fiatal állatokhoz képest, amely a dopaminerg sejtek korral összefüggő degenerációjával magyarázható. Korábbi kísérleteinkben is már bizonyítottuk az idős patkányok fokozott vulnerabilitását ezen Parkinson-kór modellben, amely súlyosabb neurológia tünetekben és morfológiai eltérésekben nyilvánult meg 6-OHDA kezelést követően (103). Ezért tartottuk fontosnak az ingergazdag környezet és a PACAP kezelés hatásának vizsgálatát idősödő patkányokban létrehozott Parkinson-kór modellben is. Az ingergazdag környezet jótékony hatását fiatal állatokban már igazoltuk korábbi kísérletünkben. Itt ezt a hatást PACAP kezeléssel is kiegészítettük, ugyanis az jól ismert, hogy az ingergazdag környezet számos neuroprotektív faktor (pl.: GDNF, BDNF) mellett a PACAP-27 és PACAP-38 szintjét is emeli a felnőtt patkányok agyának különböző területein (65).

Az idősödő patkányok vizsgálata során is hasonló eredményt kaptunk, mint a fiatal patkányoknál, ugyanis a 6-OHDA kezelés csak a standard ketrecben tartott idősödő állatokban okozott szignifikáns dopaminszint csökkenést, ezzel szemben az ingergazdag környezetben tartott állatoknál nem találtunk szignifikáns eltérést. Ebben a kísérletben a PACAP kezelés hatását is vizsgáltuk, ami kivédte a 6-OHDA-indukálta dopamin szint változást a standard ketrecben tartott állatoknál. Az ingergazdag csoportban nem találtunk eltérést a kezeletlen állatokhoz képest.

A PACAP neuroprotektív hatásmechanizmusának pontosabb feltérképezése céljából a PARK7/DJ-1 fehérjének változását is vizsgáltuk idősödő állatokban. A PARK7 fehérje vizsgálata során nem találtunk szignifikáns különbséget sem a különböző korú, sem pedig a standard vagy ingergazdag környezetben tartott állatok mintái között. A toxikus kezeléseket követően szignifikánsan csökkent a PARK7 fehérje mennyisége, ezzel szemben a fiatal állatokhoz hasonlóan az idős állatokban is szignifikánsan magasabb PARK7 fehérje szintet mértünk mindkét vizsgált csoportban a PACAP-kezelést követően.

A PACAP-hoz hasonlóan a PARK7 fehérje sejtvédő hatásának hátterében is számos molekuláris biológiai útvonal feltételezhető, többek között a PACAP a PARK7 fehérjéhez hasonlóan a TH aktivitásának fokozásával is képes a dopamin szint emelésére.

Eddigi kutatások még nem vizsgálták az ingergazdag környezet és a PACAP kezelés együttes hatását Parkinson-kór modellben. Korábban már kimutattuk, hogy az ingergazdag környezet hatására emelkedik az agyban mérhető PACAP koncentrációja (65), aminek következtében az ingergazdag környezetben tartott állatoknál kissé emelkedett DA szintet és PARK7 szintet mértünk 6-OHDA kezelést követően a standard körülmények között tartott állatokhoz képest. Ezzel szemben nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző környezetben nevelkedett állatok között a PACAP kezelést követően, ami arra utalt, hogy az ingergazdag környezet a PACAP védő hatását nem befolyásolta.

Vizsgálataink során további eredményeket szolgáltatottunk a PACAP neuroprotektív hatásával kapcsolatban in vitro és in vivo Parkinson-kór modellekben. Emellett fiatal és idősödő parkinsonos patkányok esetében is bizonyítottuk a korai ingergazdag környezet protektív hatását, ami tovább erősíti a fizikális aktivitás és a kognitív képességek fejlesztésének fontosságát a betegség prevenciójában.

IV.4.4. PARKINSON-KÓROS BETEGEK KLINIKAI VIZSGÁLATA

Miután számos in vitro és in vivo állatkísérletes Parkinson-kór modell segítségével is bebizonyítottuk a PACAP neuroprotektív hatását, munkánkat klinikai kutatásokkal folytattuk, ahol a plazma endogén PACAP szintjének változását mértük Parkinson-kóros betegekben. Vizsgálataink során szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szinteket mértünk kezetlen Parkinson-kóros betegek plazmamintájában az egészséges kontroll páciensekhez képest, míg DBS kezelést követően az endogén PACAP szintje szignifikáns emelkedést mutatott. Alacsonyabb PACAP szinteket detektáltunk a betegség progressziója során és a súlyosabb motoros tünetekkel járó akinetikus-rigid tüneteket mutató csoportban. Nem találtunk szignifikáns korrelációt az MDS-UPDRS eredményeinek értékelése során, sem a gyógyszeres terápia összefüggésében, sem pedig a depressziós skálák összehasonlításával, de a PACAP szint emelkedését detektáltuk a súlyos alvászavarral járó esetekben (19).

Klinikai vizsgálataink kezdetén csak néhány adat állt rendelkezésünkre az endogén PACAP változásával kapcsolatban különböző fiziológias és patológias folyamatok során, ahol bizonyították a neuropeptid szignifikáns változását és korrelációját különböző klinikai paraméterekkel. A neurológiai körképek már kezdetektől a kutatások fókuszában álltak, amelyek közül számos vizsgálatot a bevezetésben már részleteztem (30, 31). A neurodegeneratív betegségekkel kapcsolatban is több publikáció született. Alzheimer-kóros betegekben csökkent PACAP szintet mutattak ki különböző agyterületek vizsgálá-

latakor és a cerebrospinalis folyadék (CSF) elemzése során. Az alacsony CSF PACAP szintek korrelációt mutattak a demencia súlyosságával, és a PACAP szint párhuzamos változását írták le a CSF és agyszöveti minták összehasonlítása során. Szintén alacsonyabb CSF PACAP szintet találtak sclerosis multiplex esetén. Az Alzheimer-kór mellett nyolc Parkinson-kórban szenvedő páciens liquor mintáját is vizsgálták korábban, de nem találtak szignifikáns eltérést a tesztelt minták között. Kutatásunkkal párhuzamosan, egy másik munkacsoport a PACAP és VIP szintek változását vizsgálták Parkinson-kórban a nem motoros tünetekkel összefüggésben. Saját eredményeinkhez hasonlóan a kezeletlen Parkinson-kóros betegekben alacsonyabb PACAP szintet detektáltak, és korrelációt mutattak ki a nem motoros tünetek esetében. Kognitív diszfunkció kapcsán alacsonyabb PACAP szintet mértek, míg a hangulatzavar esetén a VIP szintek változásával találtak szignifikáns korrelációt. Ez az eredmény arra utal, hogy a motoros tünetek mellett a kognitív zavarok kialakulásában is szerepet játszhat a PACAP szint csökkenése a Parkinson-kóros betegekben.

Vizsgálataink során elsőként mi mutattuk ki, hogy a DBS kezelést követően a Parkinson-kóros betegekben szignifikánsan magasabb PACAP szint mérhető, mint a kezeletlen betegcsoportban, ami szintén a PACAP neuroprotektív szerepére utal. A PACAP szint emelkedésének hátterében a direkt neuronstimuláció mellett számos más mechanizmus is feltételezhető. Mivel a mikroelektrodák beültetése akut szöveti károsodást, vagy vér-agy gát károsodást okozhat, ami akutan befolyásolhatja a plazma PACAP koncentrációját, emiatt vizsgálatainkat minden esetben legalább 1 hónappal a beavatkozás után végeztük. Az ismert, hogy a DBS kezelés képes befolyásolni egyes neurotranszmitterek szekrécióját, ami szerepet játszhat terápiás hatásának kifejtésében, de a PACAP expresszióra kifejtett pontos hatása még további vizsgálatokat igényel.

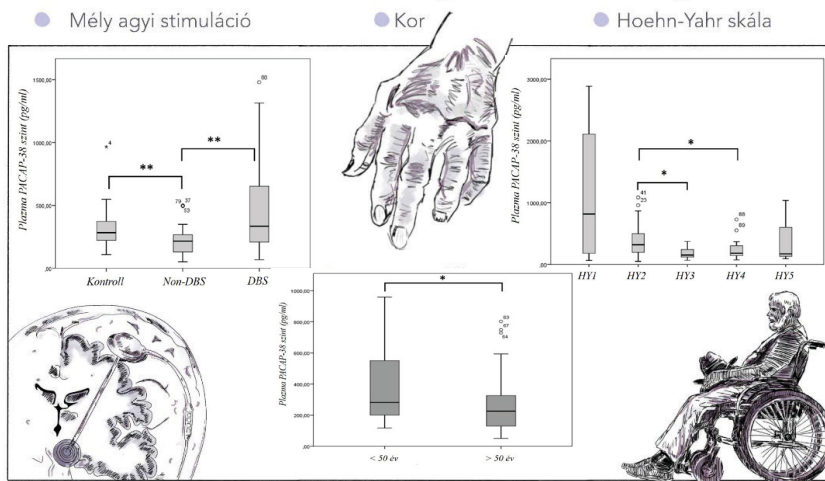
A PACAP neuroprotektív szerepét igazolja az az eredményünk is, hogy a betegség progressziójával egyre alacsonyabb plazma PACAP szinteket detektáltunk, amit korábbi kísérletekben eddig nem tudtak igazolni. Vizsgálataink során alacsonyabb PACAP szinteket mértünk a Hoehn-Yahr skála szerinti HY3 és HY4 stádiumban, amely szignifikáns csökkenést jelentett a HY2 stádiumhoz képest. Emellett a motoros tünetekkel kapcsolatban is találtunk szignifikáns eltérést az egyes csoportok között. Az akinetikus-rigid csoportban alacsonyabb PACAP szinteket mértünk a tremor-domináns vagy kevert csoporthoz képest. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az akinetikus-rigid betegcsoport páciensei rendelkeznek a legrosszabb prognózissal. Korábbi állatkísérletes Parkinson-kór modellünkben mi is bebizonyítottuk, hogy PACAP kezelést követően szignifikánsan javultak a hypokinetikus és aszimmetrikus motoros tünetek (36, 101-103), amely alátámasztja a PACAP szint és a motoros tünetek súlyosságának összefüggését Parkinson-kórban.

Az MDS-UPDRS az egyik legszélesebb körben alkalmazott skála a Parkinson-kór betegek tüneteinek osztályozására, amely értékeli a betegség súlyosságát a mindennapi élettel összefüggő eltérések és különböző motoros tünetek alapján. Vizsgálataink nem találtak összefüggést a skála értéke és a PACAP szintek változása között, ami a skála számos limitációjából is adódhat, miszerint a terápiarezisztens állapotok értékelésére kevésbé alkalmas és a levodopa kezelés mellékhatásai is befolyásolhatják a pontszámokat. Kutatásunk során a gyógyszeres terápia hatását is vizsgáltuk a PACAP szint változására, de itt sem találtunk szignifikáns összefüggést a vizsgált paraméterek között.

Végül korábbi kutatásokhoz hasonlóan mi is elemeztük az olyan tüneteket, mint az alvászavar és a depresszió, melyek a Parkinson-kóros betegek leggyakoribb nem motoros tünetei közé tartoznak. Klinikai vizsgálatunkban két skálát is alkalmaztunk az ESS-t és PDSS-2-t (Parkinson's Disease Sleep Scale) az alvási problémák osztályozására. Korábbi kutatásokban leírták, hogy az ESS pontok korrelálnak a betegség súlyosságával, ezzel szemben mi az ESS 4. csoportjában találtuk a legmagasabb PACAP szinteket, ami feltehetőleg az alvásszabályozás zavarából adódhat ennél a csoportnál. Ezzel szemben a PDSS-2 skála értékeinek elemzése során nem találtunk szignifikáns eltérést annak ellenére, hogy ez az irodalom szerint egy érzékenyebb skálának számít. A PACAP fontos szerepet tölt be a cirkadián ritmus szabályozási folyamataiban, ugyanis részt vesz a retinohypothalamicus rendszer és a corpus pineale melatonin szintézisének szabályozásában, de a PACAP alvási ciklusokra kifejtett pontos hatása nem ismert. A depresszió is a gyakori nem motoros tünetek közé sorolható Parkinson-kórban. Korábban alacsonyabb PACAP szinteket mértek a kognitív tünetekkel rendelkező csoportokban, ezzel szemben az általunk alkalmazott BDI (Beck-féle depressziós skála) skálával nem találtunk szignifikáns összefüggést.

A korral való összefüggés vizsgálata során szignifikánsan magasabb PACAP szintet mértünk az 50 évnél fiatalabb Parkinson-kóros betegeknél, ami azzal áll összefüggésben, hogy a DBS beavatkozáson átesett páciensek átlagéletkora alacsonyabb volt, mint a nem műtött betegeké. Abban az esetben, amikor külön elemeztük a DBS-kezelt és kezeletlen csoportokat, nem találtunk korral összefüggő PACAP szinteket, ami a betegek alacso-

A Parkinson-kóros betegek klinikai vizsgálata



IV.4.4. ábra: Parkinson-kóros betegek klinikai vizsgálati eredményeinek összefoglalása.

Plazma PACAP-38 szintek vizsgálata mély agyi stimuláción átesett (DBS, n = 46) és kezelésben nem részesült Parkinson-kóros betegekben (non-DBS, n = 60) és egészséges kontroll (n = 37) páciensekben; a Hoehn-Yahr (HY) skála szerinti különböző stádiumú betegcsoportokban (HY1 n = 4, HY2 n = 64, HY3 n = 17, HY4 n = 17, HY5 n = 3), és különböző korú betegekben (< 50 év, n = 33; > 50 év, n = 73). *p < 0,05, **p < 0,001 (munkacsoportunk ábrája).

nyabb átlagéletkorával magyarázható, ugyanis más klinikai vizsgálatunkban 70-80 éves pácienseknél tudunk csak korral összefüggő csökkenést kimutatni.

A Parkinson-kórral kapcsolatos in vivo állatkísérletes modellek és klinikai vizsgálataink segítségével tovább bővítettük azon eredményeket, amelyek a PACAP szerepét igazolták a betegség patomechanizmusában. A jövőben további vizsgálatokat tervezünk a PACAP neuroprotektív hatásának hátterében álló molekuláris útvonalak feltérképezésére Parkinson-kórban, hogy még pontosabb képet kapjunk a PACAP potenciális diagnosztikus, prognosztikus és terápiás szerepéről ebben a körképben.

A Parkinson-kóros betegek klinikai vizsgálati eredményeit a **IV.4.4. ábra** foglalja össze.

IV.5. PACAP PLAZMASZINTJÉNEK VIZSGÁLATA POLITRAUMATIZÁLT PÁCIENSEKBEN

Klinikai kutatásaink következő szakaszában elsőként vizsgáltuk a PACAP-38 plazmaszintjének változását a politraumatizált betegekben a traumát követő 5 napon keresztül, és korreláltattuk változását a CRP, PCT és LAR értékekkel (20).

Méréseink során a PACAP-38 és CRP szintek között gyenge pozitív korrelációt találunk a traumát követő 4. napon és szignifikáns, mérsékelt erős pozitív korrelációt találunk 5 nappal a baleset után. A PACAP antiinflammatorikus hatása alapján feltételezhető, hogy a két marker párhuzamos emelkedésének hátterében a trauma következtében aktiválódott endogén szisztémás gyulladásos válaszreakció (SIRS) állhat. Korábban számos in vitro és in vivo kísérlet bebizonyította, hogy a PACAP gátolni képes a különböző proinflammatorikus citokinek (pl.: IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α) és chemokinek szekrécióját, és aktiválni képes antiinflammatorikus citokinek (pl.: IL-10) termelését, így fontos szerepet tölt be a gyulladásos folyamatok szabályozásában. Korábbi klinikai vizsgálatok is feltételezik, hogy az akut traumák vagy vérzések kapcsán detektálható emelkedett PACAP szint, a neuropetid protektív és antiinflammatorikus képességének köszönhetően aktív részét képezi a traumát követő akut válaszreakciónak (52).

A teljes vizsgálati periódus eredményeinek analízise során szignifikáns összefüggést találtunk a PACAP-38 és a LAR értékek között, ugyanis mindkét faktor szintje emelkedő tendenciát mutatott a vizsgálat során. Korábbi kutatások bebizonyították, hogy a LAR szintek változásának ismeretében következtethetünk a leukocyták aktiválódására. A magas LAR szintek az aktiválódott leukocyták magas számára utal, és a magas LAR értékekkel rendelkező páciensek jobb prognózissal rendelkeznek. A politrauma következtében kialakuló immunológiai válaszreakció a SIRS-sel kezdődik, amely szignifikánsan emeli az aktivált leukocyták számát, majd ezután az adaptív immunrendszer kompenzációja révén antiinflammatorikus válasz szindróma indul be (CARS), mely szintén magyarázhatja mindkét faktor emelkedett szintjét.

Bár a PACAP-38 szintek változása során nem tudunk kimutatni szignifikáns különbségeket az egyes időpontok között, a CRP-vel hasonló dinamikája, miszerint enyhe emelkedő tendenciát figyeltünk meg a 4. napig, arra utalhat, hogy fontos szerepe lehet a betegség patomechanizmusában. Az jól ismert, hogy a PACAP plazmában mérhető féléletideje viszonylag rövid (3-10 perc), ami a vérben található DPP-IV-nek köszönhető. Emiatt

a hosszú ideig detektálható elhúzódó emelkedő tendencia arra utalhat, hogy olyan másodlagos regulációs folyamatok állhatnak a háttérben, melyek a CARS során aktiválódó PACAP antiinflammatorikus és protektív hatásával magyarázhatók, de a SIRS és a CARS során betöltött pontos szerepének feltérképezéséhez további vizsgálatok szükségesek.

A PACAP antiinflammatorikus képessége már korábban is említésre került, mely hatása a különböző proapoptotikus faktorok gátlásában és antiinflammatorikus útvonalak serkentésében nyilvánul meg. Mindezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a PACAP szerepet játszhat a SIRS során aktiválódó inflammatorikus folyamatok szabályozásában, így felmerülhet potenciális terápiás alkalmazhatósága akut és krónikus gyulladásos kórképek és autoimmun betegségek során.

Munkánk során elsőként tudtuk kimutatni azt, hogy a politraumatizált betegek plazmájában mérhető PACAP szintek változása a traumát követő akut időszakban szignifikáns korrelációt mutat más klinikai biomarkerrel, mint a CRP és a LAR, így további eredményekkel erősítettük meg a PACAP potenciális biomarker szerepét a klinikai gyakorlatban.

IV.6. PACAP PLAZMA ÉS SZÖVETI SZINTJEINEK VIZSGÁLATA CARDIOVASCULARIS KÓRKÉPEKBEN

IV.6.1. MYOCARDIALIS INFARCTUS VIZSGÁLATA ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLBEN ÉS KLINIKAI VIZSGÁLATOKBAN

Bár a PACAP kardioprotektív hatását munkacsoportunk mellett számos más kutatócsoport is igazolta különböző in vitro és in vivo állatkísérletes modellekben (29, 32, 59, 76, 77, 97), azonban vizsgálataink kezdetén csak kevés klinikai adat állt rendelkezésünkre a kardiológiai betegségekkel kapcsolatban. Ezért munkánk során célul tűztük ki olyan kórképek vizsgálatát, melyek patomechanizmusában a PACAP a korábbi vizsgálati eredmények alapján feltételezhetően szerepet játszhat. Munkacsoportunk elsőként végzett olyan transzlációs kutatást, amely során bizonyítást nyert az endogén PACAP-38 szintek szignifikáns változása reperfüziós MI sertés modelljéből származó szívizommintákban és akut myocardialis infarctuson átesett páciensek plazmamintájában (22).

Korábban nem találtak eltérést a PAC1 receptor mRNS expressziójában egerek pitvari és kamrai mintái között. Ezzel szemben a sertés szívizommintákban szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet detektáltunk a kamrai mintákban a pitvarhoz képest egészséges sertés szövetek összehasonlítása során, ami a PACAP lokális felszabadulására vagy akkumulációjára utalhat. Ezt követően, munkánk során a kamrai szövetminták elemzésére fókuszáltunk myocardialis infarctus után. Az érelzáródást követően szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szintet mértünk a bal kamra nem ischaemiás régiójában az ischaemiás területhez és a sham-operált állatok mintáihoz képest. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az endogén PACAP-nak fontos reguláló szerepe lehet az ischaemiás folyamatok szabályozásában (22).

A szívizomszövetben mérhető endogén PACAP forrásának elsősorban a myocyták között elhelyezkedő idegrostok tekinthetők (32). Korábban leírták a sympaticus rostok denzitásának csökkenését az infarctus területén az infarctus körüli és az egészséges szö-

vetekhez képest, míg PACAP-38 pozitív idegrostokat nem tudtak kimutatni az infarctus körüli szövetekben. Ezen megfigyelések a mi eredményeinket is megerősítik, ugyanis a nem ischaemiás mintákban mi is szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szintet mérünk. Ezzel szemben, az ischaemiás mintákban az idegrostok károsodása ellenére sem találtunk eltérést a PACAP-38 szintben a sham-operált állatok mintáihoz képest. Ezen eredményeinket is igazolják korábbi megfigyelések, ahol az idegrostok károsodása mellett fokozott PACAP immunreaktivitást írtak le az extracelluláris mátrixban, myocytákban és a macrophagokban az infarctust területén MI egér modellben, ami feltételezhetően kompenzálhatja az idegkárosodás következtében kialakuló PACAP szint csökkenést. Az akut myocardialis infarctus következtében aktiválódó inflammatorikus folyamatok gátlása elengedhetetlen a szöveti regeneráció során, ami szintén magyarázhatja az antiinflammatorikus hatással rendelkező endogén PACAP szöveti szintjének változását az infarctus területén.

Az elmúlt évtizedekben számos preklinikai kutatás foglalkozott a különböző ischaemiás kondicionálási technikákkal az ischaemiás/reperfúziós károsodás mértékének csökkentésére, myocardialis infarctust követően. Bár vizsgálataink során mi is mértük az ischaemiás bal kamrából származó szövetminták PACAP szintjének változását többféle kondicionálási eljárás során sertés ischaemia-reperfúzió modellben, nem találtunk szignifikáns eltéréseket a minták között. Ezt a különböző alcsoportok alacsony mintaszáma is magyarázhatja, ezért ezen összefüggések vizsgálatára a jövőben további kísérleteket tervezünk.

Klinikai kutatásunk kezdetén csak néhány humán eredmény állt rendelkezésünkre, ezért állatkísérleteink után kutatásunkat myocardialis infarctuson átesett betegek vizsgálatával folytattuk. Először munkacsoportunk szívűtétek során eltávolított emberi pitvarmintákat analizált, ahol extracorporalis keringést biztosító kanülbeültetés során eltávolított pitvari szövetmintákon végeztünk immunhisztológiai jelölést és RIA méréseket. A szövettani vizsgálat segítségével kimutattuk a PAC1 receptor expresszióját a szívműsejteken, és RIA módszerrel szignifikánsan magasabb PACAP-38 és PACAP-27 szinteket mértünk az ischaemiás betegekben a billentyűbetegségben szenvedő páciensek mintáihoz képest (33).

Mivel korábban szövetminták elemzésére nyílt csak lehetőségünk, ezért jelen kutatásunkat plazmaminták vizsgálatával is bővítettük. Korábbi klinikai mérésekhez hasonlóan, melyek szignifikáns PACAP szint emelkedést mutattak ki akut vérzésekben (spontán törzsdúci- és subarachnoidealis vérzések), mi is emelkedett PACAP-38 szintet detektáltunk közvetlenül az infarctust követően a kontroll páciensekhez képest, ami szignifikáns csökkenést mutatott a percutan coronaria intervenció (PCI) beavatkozás után. Két nappal a beavatkozást követően a páciensek PACAP szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges kontrolloké (22). A myocardialis infarctus után detektálható szignifikáns PACAP emelkedés alapján arra következtethetünk, hogy a PACAP-nak fontos szerepe lehet ezen ischaemiás folyamatok pathomechanizmusában, így potenciális prognosztikai biomarkerré válhat ezen kórképekben.

A myocardialis infarctust követően detektálható szisztemás PACAP szint emelkedés pontos forrása nem ismert. Irodalmi adatok alapján azt feltételezzük, hogy azok a szervek játszhatnak ebben fontos szerepet, ahol a legmagasabb PACAP koncentráció mérhető, mint például az agy és az endokrin szervek. Myocardialis infarctus esetén a PACAP lokális expressziója is megnövekedhet, amely forrása az idegelemekeken kívül a cardiomyocy-

ták és különböző kötőszöveti- és immunsejtek is lehetnek, mint a macrophagok vagy a lymphocyták (30, 31). Két nappal a beavatkozás után mért alacsonyabb PACAP szint arra utal, hogy a betegek valószínűleg már az infarctus előtt alacsonyabb PACAP szinttel rendelkeztek, amely szintén prediktív értékkel bírhat a szívbetegségek kialakulása esetén.

Munkánk során a PACAP-38 szint eltéréseket a klinikai gyakorlatban alkalmazott laboratóriumi biomarkerek változásával összefüggésben is megvizsgáltuk. A PACAP-38 és troponin szintek korrelációs elemzése során szignifikáns enyhe negatív korrelációt találtunk abban az esetben, amikor a vizsgálati periódus összes mintáját hasonlítottuk össze.

Az egyes rizikófaktorok elemzése során nem találtunk korrelációt a PACAP-38 szintek és az életkor, a dohányzás, a diabetes mellitus vagy az emelkedett lipid szintek között. Ezzel szemben, szignifikáns pozitív korreláció igazolódott a hypertóniával összefüggésben, és multivariancia analízissel a hypertonia és a hemoglobin A1c (HbA1c) értékek additív hatását is kimutattuk, amely alapján feltételezzük, hogy a hypertonia és a kezeletlen diabetes mellitus szoros kapcsolatban állhat a PACAP szintek változásával. Ezt számos állatkísérletes vizsgálat is igazolta korábban, felfedve, hogy a PACAP szerepet játszik a vérnyomás szabályozásában, antidiabetikus hatást fejt ki a pancreas glükóz-indukálta inzulinszekréciójának szabályozásával, és protektív hatású diabeteses nephropathia, retinopathia és különböző vascularis komplikációk esetén (43, 44, 85, 88). Az egyes rizikófaktorokkal kapcsolatos pontos összefüggések feltérképezése céljából további vizsgálatokat tervezünk.

A myocardialis infarctuson átesett betegek minden esetben részletes echokardiográfiásvizsgálaton estek át a második napon. Vizsgálataink során nem találtunk szignifikáns korrelációt a különböző echokardiográfiás paraméterek (bal kamrai ejekciós frakció, falmozgás indexek) és a PACAP szintek között, de fontos azt megemlíteni, hogy a systolés bal kamra funkció a reperfúziót követően javulást mutat, és az átmenetileg „bódult” („stunned”) myocardium regenerációja akár 4-6 hetet is igénybe vehet, így az infarctust követően a tényleges bal kamra funkció mérése csak 6 hét után lehetséges.

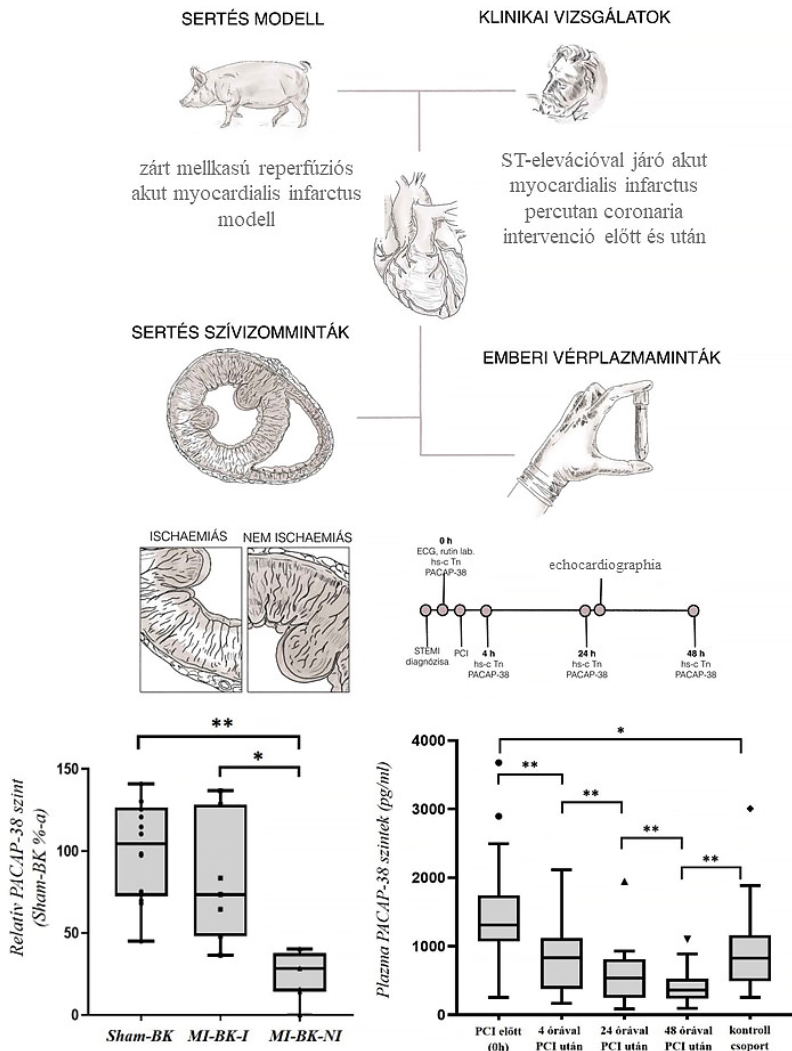
Mivel betegeink több, mint 50%-a valamilyen antiischaemiás vagy antianginás gyógyszeres kezelésben is részesült, ezért a gyógyszeres kezelésekkel való korrelációt is vizsgáltuk, de nem találtunk szignifikáns összefüggést a terápiák és a PACAP szintek között, azonban ezen összefüggések pontos feltérképezése széleskörű klinikai vizsgálatokat igényel.

A myocardialis infarctus vizsgálatához kapcsolódó fő eredményeket a **IV.6.1. ábra** foglalja össze.

IV.6.2. SZÍVELÉGTELENSÉGBEN SZENVEDŐ BETEGEK KLINIKAI VIZSGÁLATA

A myocardialis infarctuson átesett betegeken kívül különböző etiológiájú (ischaemiás és nem ischaemiás) cardiomyopathiás betegeket is vizsgáltunk, és elsőként mutattunk ki szignifikáns korrelációt a PACAP-38 szintek változása és a klinikai gyakorlatban rutinszerűen alkalmazott prognosztikai marker, az NT-proBNP szintek között, amely eredmények szintén felvetik a neuropeptid prognosztikai szerepét szívelégtelenség kapcsán. Az NT-proBNP-n kívül több más biomarkerre is igaz, hogy szintjét számos faktor befolyásolja, mint a kor, a társbetegségek vagy gyógyszeres kezelések, valamint különbözőképpen változnak akut, dekompenzált és krónikus, kompenzált szívelégtelenség esetén, így

Myocardialis infarctus vizsgálata állatkísérletes modellben és klinikai vizsgálatokban



IV.6.1. ábra: Myocardialis infarctus vizsgálata állatkísérletes modellben és klinikai vizsgálatokban.

Bal oldali „box plot”: PACAP-38 szintek vizsgálata a különböző bal kamrai (BK) mintákban sham-operált állatokban (Sham) és myocardialis infarctuson, majd 3 órás reperfúzió után átesett (MI) állatokban az infarctusos területről (MI-BK-I) és nem infarctusos területről származó mintákban (MI-BK-NI). Az adatokat a Sham-BK PACAP-38 szintjének százalékos értékeként tüntették fel. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ vs Sham-BK csoport $n = 7$.

Jobb oldali „box plot”: Plazma PACAP-38 szintek változása ST-elevációval járó myocardialis infarctuson átesett betegekben és kontroll csoportban a percutan coronaria intervenció (PCI) előtt és 4, 24, 48 órával a PCI után. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. (munkacsoportunk ábrája).

munkánk során mi is elemeztük ezen különböző betegcsoportok eredményeit a klinikai paraméterekkel összefüggésben (21, 23).

Azon szívelégtelen betegek vizsgálata során, akik akut dekompenzáció miatt kerültek felvételre, szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet mértünk a krónikus, kompenzált betegekhez és az egészséges kontroll páciensekhez képest. Feltételezésünk szerint ez a változás egy olyan akut stresszreakció része lehet, amely a bal kamrai ejekciós frakció hirtelen romlásának következménye és célja a cardiomyocyták károsodásának csökkentése. A szívizomsejtek károsodásának hátterében az oxidatív stressz és az apoptotikus útvonalak aktiválódása feltételezhető. Korábbi kísérleteinkben bebizonyítottuk, hogy a PACAP cardiomyocytákban gátolja az apoptózist a PKA-Bad-14-3-3 és az Akt-Bad-14-3-3 jelátviteli utakon keresztül (77), gátolja a proapoptotikus caspase-3 kiáramlást, és serkenti az antiapoptotikus Bcl-2 és phospho-Bad expressziót (59, 77, 97). Emellett, a PACAP endothel sejtekben is gátolni képes az oxidatív stressz-indukálta proapoptotikus hatásokat a JNK és p38 MAPK útvonalakon keresztül (76). Akut szívelégtelenséghez hasonlóan szignifikáns PACAP szint emelkedést detektáltunk akut myocardialis infarctusban és akut traumás agysérülés esetén is (22, 52), amit más kutatócsoportok is megerősítettek akut intracerebrális vérzés során, ahol szintje összefüggést mutatott a károsodott agyterület nagyságával. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP egy olyan általános biomarker lehet, amely antioxidáns, antiapoptotikus és antiinflammatorikus hatásának köszönhetően egy akut sejtkárosodás következtében kialakuló válaszreakció részeként a károsodás súlyosságának megfelelően szignifikáns változást mutat.

Ezzel szemben a krónikus, kompenzált szívelégtelen betegek esetében szignifikánsan alacsonyabb szintet mértünk az akut, dekompenzált betegekhez és a kontroll páciensekhez képest ugyanúgy, mint 48 órával a PCI beavatkozás után infarctusos betegekben. Ezek alapján feltételezzük, hogy az alacsonyabb endogén PACAP-38 szint egy gyengült kardioprotektív funkció részeként hozzájárulhat az elváltozások gyorsabb progressziójához, ezáltal a szívbetegségek prognózisát tekintve akár egy negatív prediktív faktor is lehet. Az endogén PACAP szívizomsejtekre kifejtett védő hatását különböző toxikus károsodásokkal szemben állatkísérletekben is igazolták, mint doxorubicin- és mioxandron-indukálta szívkárosodások esetén.

A PACAP-38 szintek változását a szívelégtelen betegek esetében is korreláltattuk a klinikai rutinvizsgálatok részét képező laboratóriumi markerekkel. Az NT-proBNP esetében szignifikáns negatív korrelációt igazoltunk a krónikus szívelégtelen csoportban, és az összefüggést tovább erősítette, ha multivariancia analízissel a cardiomyopathia etiológiáját (ICM vagy NICM) is figyelembe vettük. Hasonló eredményeket találtunk legelső vizsgálatunk során is, ahol ischaemiás etiológiájú szívelégteleneknél negatív korrelációt találtunk a két marker között. Mindezen eredmények alátámasztják azt a feltételezésünket, hogy a krónikus szívelégtelenségben detektálható alacsonyabb PACAP szint a magas NT-proBNP sinthez hasonlóan rosszabb prognózisra utalhat. Ezzel szemben akut, dekompenzált szívelégtelen betegek vizsgálata során a PACAP és NT-proBNP szintek között pozitív tendencia volt megfigyelhető. Ez azzal magyarázható, hogy akut esetekben az NT-proBNP prognosztikai értéke csökken a kompenzált állapothoz képest, ugyanis az akut dekompenzáció következtében kialakuló pitvari falfeszülés emeli a plazma NT-proBNP szintet.

Szignifikáns pozitív korrelációt igazoltunk a PACAP-38 és a CRP szintek vizsgálata során is, ami tovább erősíti a neuropeptid potenciális biomarker szerepét. Az infekció-

val nem összefüggő CRP szintemelkedés a szisztémás stresszreakció részeként fontos prognosztikai szereppel bír szívelégtelenség esetén, emiatt vizsgálataink során azon betegeket, akiknél felmerült akut infekció lehetősége, kizártuk a vizsgálatból. Hasonló eredményeket találtunk a korábbi fejezetben ismertetett kutatásban, ahol politrauma akut fázisában mutattuk ki a két marker pozitív korrelációját (20).

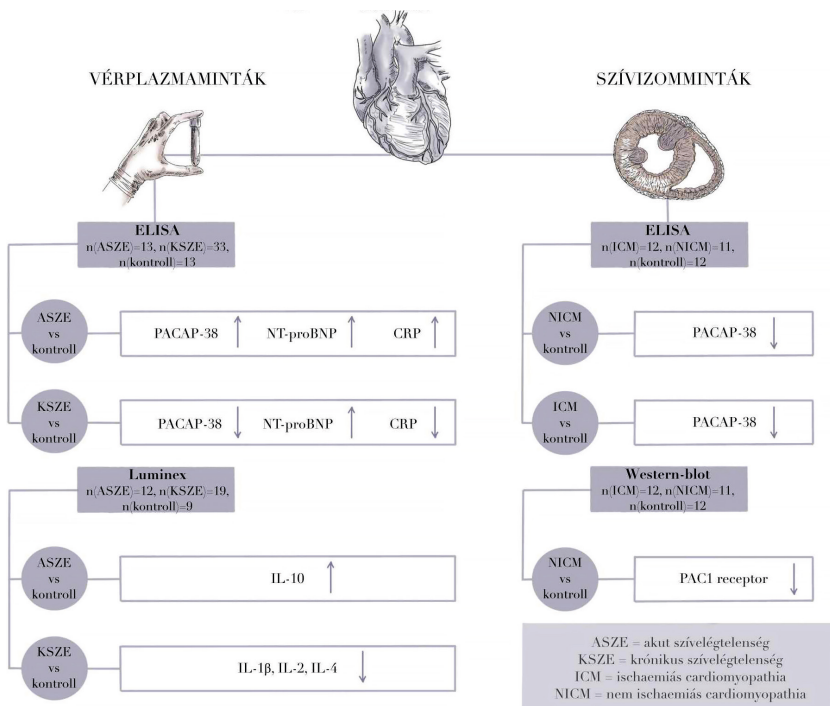
A szívelégtelen betegek plazmamintájában különböző pro- és antiinflammatorikus citokinek mennyiségét is vizsgáltuk (23). Nem találtunk szignifikáns különbséget az IL-6, IFN- γ és TNF- α szintek között akut és krónikus szívelégtelenségben, ezzel szemben szignifikánsan alacsonyabb IL-1 β , IL-2 és IL-4 szinteket mértünk a krónikus szívelégtelen csoportban az akut és a kontroll csoporthoz viszonyítva. A különböző citokinek szívelégtelenségben kifejtett szerepével kapcsolatban számos ellentmondásos kutatási eredményt publikáltak már. A legtöbb esetben mi nem találtunk változást, vagy alacsonyabb szinteket detektáltunk, aminek több okát is feltételezzük. Számos kísérlet igazolja, hogy a szívelégtelenség bázis terápiájának (angiotenzin-konvertáló enzim (ACE)-gátló, β -blokkoló, mineralokortikoid receptor agonista (MRA)) hatására a citokin szintek jelentősen csökkennek, és jelen vizsgálatunkban minden beteg részesült ACE-gátló és β -blokkoló kezelésben, 81,8%-uk pedig MRA kezelést is kapott. Emellett a citokinek szintjét a szívelégtelenség súlyossága és NYHA státusza is befolyásolja, miszerint magasabb citokin szintek mérhetők súlyosabb stádiumokban (NYHA III-IV.). Az általunk vizsgált krónikus szívelégtelen betegek NYHA I-II stádiumban voltak, ami szintén magyarázhatja az alacsonyabb citokin szinteket. Ezzel szemben az IL-10 vizsgálata során az akut szívelégtelen csoportban szignifikánsan magasabb szinteket mértünk a kontroll csoporthoz viszonyítva, valamint az IL-1 β , IL-2, IL-4 citokinekhez hasonlóan az IL-10 esetén is pozitív korrelációt találtunk a PACAP-38 szintekkel összehasonlítva, amit további multivariancia analízis is megerősített, amely a szívelégtelenség típusát (akut/krónikus) is figyelembe vette. Az IL-10 antiinflammatorikus hatása a proinflammatorikus citokinek gátlásán keresztül nyilvánul meg és szerepet játszik a myocardialis remodellingben, valamint a ROS (reaktív oxigén szabadgyökök) gátlásán keresztül képes az oxidatív stressz csökkentésére, mindezen eredmények alapján magyarázható az emelkedett IL-10 szint akut szívelégtelenség során.

A szívelégtelenségben szenvedő betegek plazmamintájának vizsgálata mellett szívtranszplantáción átesett páciensek szívvizomintáit is vizsgáltuk. Korábban szívműtéten átesett betegek pitvari mintájának elemzése során mértük a szöveti homogenizátumok PACAP-38 és PACAP-27 szintjét (33), ahol mindegyik mintában szignifikánsan magasabb PACAP-38 szinteket detektáltunk a PACAP-27 szintekhez képest. Mindkét izoforma szintje magasabb volt az ischaemiás szívbetegség esetében a billentyűbetegséghez viszonyítva. Jelen kutatásunkban szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szintet mértünk a cardiomyopathiás csoportokban a kontroll mintákhoz képest, de szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni az ischaemiás és nem ischaemiás etiológiájú betegek között. Ezen eredményeinket támasztják alá azok a kutatások, ahol a végstádiumú szívelégtelenségben szenvedő páciensekben a sejtkárosodás és az idegi károsodás mellett a neurohormonális rendszer zavarát is leírták, amely következtében alacsony natriureticus peptid szinteket detektáltak. Ezek összességében mind magyarázatul szolgálhatnak a szívelégtelen betegek mintáiban mérhető alacsonyabb PACAP szintekre. A plazmaminták vizsgálati eredményeivel ellentétben a szöveti PACAP-38 szintek és az NT-proBNP szintek között nem találtunk szignifikáns összefüggést, valamint különböző laboratóriumi és

echokardiográfiás eredmények elemzése során sem találtunk korrelációt a mért paraméterek között.

A szöveti PACAP-38 szintek vizsgálata mellett Western blot analízis segítségével a szívizommintákban a PAC1 receptor mennyiségét is meghatároztuk, mivel korábbi vizsgálataink során pitvari mintákban a szívizomsejteken már kimutattuk a PAC1 receptor expresszióját immunhisztológia segítségével (33). Méréseink során a nem ischaemiás etiológiájú csoportban szignifikánsan alacsonyabb PAC1 receptor expressziót mértünk a kontroll csoporthoz viszonyítva, míg az ischaemiás csoportnál nem találtunk szignifikáns eltérést a kontroll mintákhoz képest (23). A nem ischaemiás eredetű szívelégtelenség patomechanismusában fontos szerepe van az apoptózisnak és a myocardialis fibrózisnak valamint a cardialis remodellingnek, amelyek a sejtkárosodás következtében szerepet játszhatnak a PAC1 receptor expressziójának csökkentésében. Ischaemiás károsodás esetén kimutatható magasabb PAC1 receptor expresszió hátterében pedig ischaemiás prekonicionálási mechanizmusok feltételezhetők, melyek képesek különböző protektív mechanizmusok beindítására, így a PACAP-mediált útvonalak aktiválására. Ezen hatások pontos feltérképezésre még további vizsgálatokra van szükség.

A szívelégtelenség vizsgálatával kapcsolatos klinikai eredményeinket a **IV.6.2. ábra** foglalja össze.



IV.6.2. ábra: PACAP-38 és PAC1 receptor vizsgálata akut, dekompenzált és krónikus kompenzált szívelégtelen betegekben és kontroll páciensekben (*munkacsoportunk ábrája*).

A cardiovascularis betegek PACAP szintjének vizsgálata során szignifikáns eltérést találtunk a plazmamintákban és szívizommintákban is, amely eredmények tovább erősítik azon feltételezésünket, miszerint a PACAP potenciális prognosztikai biomarker lehet ezen kórképekben, de ehhez további után követéses, multicentrikus vizsgálatok szükségesek.

IV.7. PACAP PLAZMA ÉS SZÖVETI SZINTJEINEK VIZSGÁLATA MALIGNUS BETEGSÉGEKBEN

IV.7.1. UROGENITALIS TUMOROK VIZSGÁLATA

A bevezetésben már említést tettünk azon vizsgálatokról, amelyek széles körben kutatták a PACAP szerepét különböző rosszindulatú kórképekben. Malignus betegségekkel kapcsolatos kutatásaink első részében különböző urogenitalis tumorokból és egészséges szövetekből származó mintákban vizsgáltuk a PACAP-27-szerű és PACAP-38-szerű immunreaktivitást RIA módszerrel. A legtöbb urogenitalis mintában, a prosztatatumor kivételével, szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet detektáltunk a PACAP-27 szintekhez képest. Vesetumoros minták vizsgálata során szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szintet mérünk az ép szövetekkel összehasonlítva, emellett prosztatatumorból származó mintákban pedig szignifikánsan magasabb PACAP-27 szintet találtunk a jóindulatú prosztata megnagyobbodásból származó mintákhoz viszonyítva. A különböző urogenitalis tumorokban detektálható szignifikáns PACAP szint eltérések arra utalnak, hogy a PACAP-nak szerepe lehet az urogenitalis tumorok patogenezisének szabályozásában (24).

Az urogenitalis tumorok vizsgálatát a veseszövetek analizisével kezdtük. Korábbi kutatások már kimutatták a PACAP és receptorainak jelenlétét különböző állatokból származó vesemintákban. Emellett munkacsoportunk patkány veseszövetben jelenlegi humán eredményeinkhez hasonlóan szintén magasabb PACAP-38 szintet mért (49). Munkacsoportunk mellett számos más kutatócsoport is bizonyította a PACAP nephroprotektív hatását különböző toxikus hatásokkal szemben (81), mint az oxidatív stressz (60, 61), vese ischaemia (63, 89), diabetes mellitus (43, 44), myeloma multiplex, gentamicin-, ciszplatin- és cyclosporin A-indukálta vesekárosodás esetén, de a vesetumorokkal kapcsolatosan csak limitált eredményekkel rendelkezünk vizsgálatunk előtt. Mivel korábban kimutatták a VIP-t és a VPAC1 receptor expresszióját tumoros proximalis tubulussejteken, és bebizonyították a VIP protektív hatását a tumor progresszióval szemben, feltételeztük, hogy a PACAP-nak is szerepe lehet ezen folyamatokban.

Vizsgálataink során a PACAP-27 és PACAP-38 jelenlétét is bizonyítottuk emberből származó tumoros és egészséges vesemintákban, és korábbi méréseinkhez hasonlóan magasabb PACAP-38 szintet detektáltunk a PACAP-27 szinthez képest. A vesetumoros mintákban szignifikánsan kevesebb PACAP-38 szintet mérünk az egészséges szövetekhez viszonyítva (24). Jelen vizsgálatainkhoz hasonlóan számos korábbi kutatásban csökkent szöveti PACAP szintet találtak különböző malignus tumorok esetében. Munkacsoportunk mutatta ki korábban, hogy a PACAP szöveti szintje csökken colontumorból és kissejtek tüdőtumorból származó mintákban (33), papillaris pajzsmirigy carcinomában, pancreas ductalis adenocarcinomában és insulinomában. Emellett más kutatócsoport szintén alacsonyabb PACAP szintet detektált hypophysis adenomában. A tumorszövetben mért ala-

csenyebb PACAP szintek pontos oka még nem ismert. Ennek hátterében a nagy mennyiségű PACAP-ot expresszáló neuronális struktúrák károsodása állhat, valamint adódhat a tumorsejtek károsodott fehérje expressziójából, vagy az autokrin növekedési faktor funkcióval is rendelkező PACAP túlzott felhasználásából is.

A PACAP és receptorai a kiválasztó szervrendszer alsóbb szakaszában (a húgyvezetékben, a hólyagban és a húgycsőben) is kimutathatók. Patkányból származó mintákból szignifikánsan magasabb PACAP-38-szerű immunreaktivitást detektált a PACAP-27-szerű immunreaktivitáshoz képest RIA segítségével. Immunhisztológiai módszerrel PACAP pozitív rostokat találtak a szervek simaizomzatában és az erek falában található idegelemekben, amely alapján feltételezhető, hogy a PACAP fontos szerepet tölt be a szervek beidegzésének szabályozásában. Emberrel kapcsolatos vizsgálatok száma ebben a témában is limitált, stressz-indukálta inkontinencia esetén mutattak ki csökkent PACAP expressziót a páciensek hüvelyében. Számos más tumorhoz hasonlóan humán hólyagcarcinómában is kimutatták a PACAP receptorok expresszióját. Vizsgálataink során mindkét PACAP izoformát ki tudtuk mutatni RIA módszerrel tumoros és egészséges hólyagmintákban. Minden hólyagminta esetén, a korábbi méréseinhez hasonlóan, PACAP-38 dominanciát találtunk, de szignifikáns különbséget nem tudunk kimutatni az egészséges és tumoros szövetek között (24).

Egészséges prosztataszövetben és prosztatata adenocarcinómából származó mintákban is ismert a PACAP és receptorainak jelenléte. Korábban a VPAC1 receptor expresszióját igazolták autoradiográfia segítségével egészséges és tumoros prosztatamintákban, míg emberi prosztatatumoros sejtvonalon PAC1 receptort mutattak ki, melyeken keresztül PACAP antagonistá kezeléssel gátolta a tumorsejtek növekedését. Jóindulatú prosztata megnagyobbodás esetén is mindhárom receptor expresszióját bizonyították már. Immunhisztológiai vizsgálatok fokozott PACAP expressziót igazoltak a prosztatamirigyek epithelialis rétegében, míg sem az egészséges sem a tumoros szövetek stromája nem mutatott PACAP pozitívítást a lymphocytákon kívül, mely a PACAP immunmodulátor szerepére utalhat. Korábbi vizsgálatainkhoz hasonlóan a jóindulatú prosztatamintákban is magasabb PACAP-38 szintet detektáltunk a PACAP-27 szintekhez képest, de a korábbiakkal ellentétben, a tumoros mintákban szignifikánsan magasabb PACAP-27-szerű immunreaktivitást igazoltunk a jóindulatú prosztata megnagyobbodásból származó mintákhoz viszonyítva (24). Ezzel szemben a PACAP-38 szintben nem találtunk eltérést a minták között. Korábban szintén magasabb PACAP szinteket mértek neuroblastomában, ductalis és lobaris emlőcarcinómában és cervixcarcinoma esetén. Azt is bizonyították már, hogy a PACAP-27-nek fontos szerepe lehet a prosztata sejtek proliferációjának szabályozásában, ugyanis ezen sejtek olyan speciális PAC1 receptor subtípust expresszálnak, amelyeken keresztül csak a PACAP-27 (a PACAP-28 és a VIP nem) képes a phosphoinositidek szintézisének növelésére, amely fontos szerepet tölt be a sejtek proliferációjának regulációjában.

Az urogenitalis tumorok vizsgálatát a heretumorok analízisével zártuk. Korábban kimutatták, hogy a patkány testisben hasonlóan magas PACAP koncentráció mérhető, mint a központi idegrendszerben. A testisben szintén mindkét PACAP izoforma kimutatható, és fontos szerepet töltenek be a Sertoli és Leydig sejtek funkciójának szabályozásában. Munkacsoportunk korábban bizonyította, hogy a PACAP-génkiütött egerek spermiumjainak motilitása károsodott, valamint igazolta a PACAP kezelés spermium motilitásra gyakorolt serkentő hatását is (50, 79). A PACAP és receptorainak mRNS expresszióját is detektálták már humán testisszövetben. Emellett a normál testis herecsatornáiban találha-

tó spermatogoniumok és spermatidák is PACAP immunpozitivitást mutattak, míg diffúz PACAP pozitivitást találtak seminómában. Ezzel szemben embrionalis carcinómában csak nagyon gyenge immunreakciót tudtak kimutatni. Vizsgálataink során mi is igazoltuk a PACAP-38 jelenlétét a normál és tumoros mintákban, de a korábbi eredményekkel ellentétben szignifikáns különbséget nem találtunk a tumoros és normál szövetek összehasonlítása során (24).

Vizsgálataink igazolták mindkét PACAP izoforma jelenlétét a különböző tumoros és egészséges urogenitalis mintákban. A vese és prosztataminták esetén szignifikáns különbséget találtunk a normál és tumoros minták között, amely a PACAP tumorigenesisben betöltött szerepére utalhat, de hatásmecanizmusának pontos feltérképezése további vizsgálatokat tesz szükségessé.

IV.7.2. MYELOMA MULTIPLEXES (MM) BETEGEK VIZSGÁLATA

Az urogenitalis tumorok vizsgálatát követően az egyik leggyakoribb hematológiai rosszindulatú betegség, a myeloma multiplex vizsgálatával folytattuk kutatásainkat. Ezen kutatás azért is fontos jelentőséggel bír, mert már egy korábbi klinikai vizsgálat kimutatta a PACAP-38 infúziós kezelés hatását egy 81 éves myelomás beteg kezelése során, amely hatására csökkent a páciens szabad lambda könnyű lánc ürítése. Munkánk célja a PACAP-38 szintjének vizsgálata volt különböző stádiumú MM betegek mintáiban, és összefüggések kimutatása különböző klinikai tünetekkel, terápiás kezelésekkal és laboratóriumi paraméterek változásával (25).

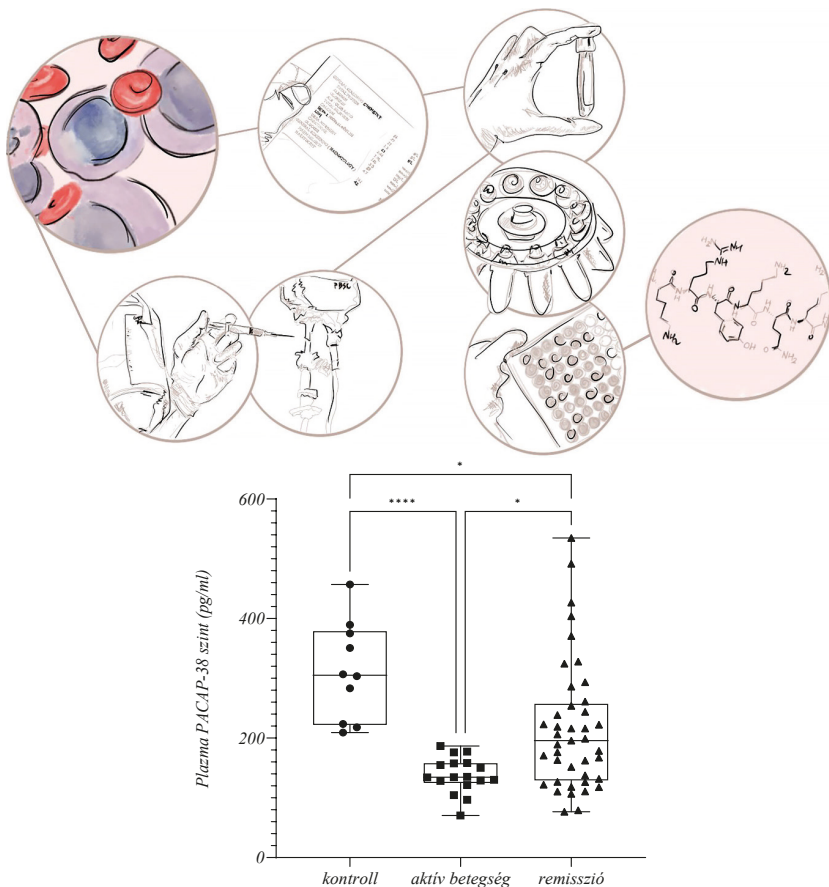
Vizsgálatunk során szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szintet tudtunk kimutatni az MM betegek plazmájában az egészséges, korban illesztett kontroll páciensek mintáihoz képest. A fejezet elején már ismertettünk számos olyan rosszindulatú elváltozást, ahol a PACAP szint szignifikáns eltérését írták le, amely feltételezi a PACAP diagnosztikus és prognosztikus biomarker szerepét a malignus kórképekben. A PACAP renoprotektív hatását több in vitro és in vivo MM modellben bebizonyították már, és emellett gátolja az osteolyticus csontdestrukciók kialakulását is számos olyan jelláviteli út szabályozásával, amelyek szerepet játszanak a sejtek túlélésében és a betegség progressziójában. A PACAP receptorának expressziója is kimutatható a csontvelő stromasejtjein, a proximális tubulus-sejteken és az MM sejteken is, ami azt feltételezi, hogy a PACAP-nak fontos szerepe lehet a csontvelői mikrokörnyezet homeosztázisának szabályozásában. A PAC1 receptoron keresztül a neuropeptid képes befolyásolni különböző sejtciklusszabályozó faktorok hatását, így a haemopoetikus folyamatok szabályozásában is részt vesz.

Ez a vizsgálat volt az első, ahol szignifikáns korral összefüggő PACAP szint csökkenést tudtunk kimutatni MM páciensekben. Számos korábbi in vivo állatkísérletes vizsgálatban bizonyítást nyert, hogy a PACAP fontos szerepet tölt be az öregedési folyamatok szabályozásában, és szintje szignifikánsan csökken a kor előrehaladtával (78, 80). Az idős kor számos tumor esetében, így az MM esetében is egy fontos rizikófaktor. A betegség kialakulásában fontos szerepet játszanak a plazmasejtek differenciációját érintő, korral összefüggő immunológiai változások, amelyek olyan genetikai, epigenetikai és celluláris változásokat idézhetnek elő, melyek az MM sejtek klonális szelekciójához vezetnek. A PACAP korábban ismertett antioxidáns, antiinflammatorikus és immunmoduláns hatásának köszönhetően protektív szerepet tölthet be ezen folyamatokban az oxidatív stressz-

sz, a DNS károsodás, valamint a kromoszómális aberrációk kialakulásának gátlásával. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az idős korral detektálható alacsonyabb PACAP szint következtében ezen hatások nem tudnak érvényesülni, így hozzájárulhat a betegség gyakoribb kialakulásához az idősebb populációban (25).

Statisztikai elemzéseink során nem találtunk szignifikáns összefüggést a hypertonia, diabetes, ECOG státusz és a PACAP szintek összehasonlítása során, amely azt bizonyította, hogy a leggyakoribb komorbiditások és a betegek aktuális performace státusza nem befolyásolta a mért eredményeinket.

Ezzel szemben az aktív betegségben szenvedő és a remisszióban lévő betegek PACAP-38 szintje között szignifikáns különbséget tudtunk kimutatni, ugyanis azoknál a pácienseknél, akik aktív betegségben szenvedtek, alacsonyabb szinteket mértünk



IV.7.2. ábra: Myeloma multiplexes (MM) betegek vizsgálata. PACAP-38 szintek vizsgálata az egészséges, kontroll (n = 10) és az aktív betegségben szenvedő (n = 17) és remisszióban lévő MM betegekben (n = 41).

* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. (munkacsoportunk ábrája).

(IV.7.2. ábra). A remisszióban lévő betegeknel a terápiás válaszok elemzése során szignifikáns különbséget tapasztaltunk, ugyanis a jobb terápiás válasszal rendelkező csoportok PACAP-38 szintje folyamatos emelkedést mutatott. A minimális reziduális betegség nélküli (MRD neg.) csoport betegeiben szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet mértünk, mint a parciális választ (PR) elérő csoportban. A kontroll páciensek és az aktív betegségben szenvedő vagy parciális választ elérő betegek eredményei között kimutatott szignifikáns különbség a terápiás válasz elmélyülésével már nem volt kimutatható. A legjobb prognózissal rendelkező MRD negatív betegeknel mért magas PACAP-38 szintek, és az a megfigyelés, hogy az újonnan diagnosztizált MM betegek esetében az alacsonyabb PACAP szinttel rendelkezőknél kisebb gyakorisággal tapasztaltunk komplett remissziót, megerősítik a PACAP szintek detektálásának prognosztikai szerepét.

A csontvelő plazmasejtes infiltrációnak szintén fontos szerepe van a terápiás válasz hatékonyságának meghatározása szempontjából. Kutatásunk során szignifikáns mérsékelt negatív korrelációt találtunk a szövettani analízis és az áramlási citometriás vizsgálatok esetében is a plazmasejtarány és a PACAP-38 szintek között. Ezen eredmények meg egyeznek azon korábbi adatokkal, miszerint a PACAP gátolni képes a plazmasejtek proliferációját.

Az MM betegek különböző szervkárosodásának vizsgálatai során nem találtunk összefüggéseket a PACAP szint változásának tükrében sem a csontkárosodás, sem a vesekárosodásra vagy anaemiára utaló laboratóriumi paraméterek vizsgálata kapcsán, sem pedig az MM különböző előrehaladottabb állapotaiiban.

Az IMWG (Nemzetközi Myeloma Munkacsoport) ajánlásának megfelelően a betegek stádiumának meghatározásához és a rizikómeghatározáshoz 3 különböző skálát alkalmaztunk (ISS (Intrantional Staging System), R-ISS (Revised-ISS), citogenetikai rizikóbesorolás), de csak az ISS stádiumbesoroló skála esetén találtunk szignifikáns eltérést, ahol a magasabb stádiumú, rosszabb prognózisú betegeknel alacsonyabb PACAP szinteket mértünk. Az ISS skálabesorolás esetén a β -2-microglobulin (B2M) szint az egyik meghatározó tényező, amely vizsgálatával kapcsolatban szignifikáns negatív korrelációt találtunk a PACAP szintekkel összehasonlítva. Emellett a tumortömeggel összefüggést mutató magasabb laktát-dehidrogenáz (LDH) szint esetében is szignifikánsan alacsonyabb PACAP szinteket detektáltunk. Mindkét faktor emelkedése rossz prognosztikai markerként értékelhető. A különböző szérumban és vizeletben mérhető fehérjék közül a Bence-Jones (BJ) fehérje és a vizelet összfehérje (UTP) szintek emelkedése kapcsán szignifikánsan alacsonyabb PACAP szinteket mértünk. Ezen eredményeinket erősítik azon korábbi mérések, amik PACAP kezelést követően csökkent szabad lambda könnyű lánc ürítést detektáltak MM páciensnél. BJ fehérje mennyiségének változása a vesekárosodásra és a tumortömeggel is utalhat, mivel betegeink közül egy kivételével mindegyik károsodott vesefunkcióval rendelkezett, ezért feltételezhetően az általunk kimutatott összefüggés a csontvelői klonális plazmasejtes infiltráció előrehaladottságával van kapcsolatban. A paraproteinek vizsgálatához a kappa/lambda könnyű lánc arány meghatározását alkalmaztuk, de szignifikáns eltéréseket nem tudtunk kimutatni, ahogy az erythrocyta szedimentációs ráta vizsgálata kapcsán sem. A prognosztikai markerként alkalmazott klinikai paraméterekkel kimutatott szignifikáns korrelációk szintén megerősítik a PACAP prognosztikai és diagnosztikai biomarker szerepét ezen kórképben.

A különböző laboratóriumi paramétereken kívül a terápiás beavatkozások hatását is vizsgáltuk a PACAP szintekkel összefüggésben. A kombinációs kezelések közül a RVd

(lenalidomid-bortezomib-dexamethason) terápiában részesült betegeknél mértünk szignifikánsan magasabb PACAP szinteket. Számos tanulmány igazolta, hogy jelenleg a myeloma kezelésében alkalmazott leghatékonyabb terápia az RVD kezelés, amely a többi kombinációs kezeléstől eltérően immunmodulációs hatással rendelkező lenalidomidot is tartalmaz. Amikor a terápiás szerek hatását külön is megvizsgáltuk, csak a lenalidomid esetében tudtunk szignifikáns PACAP szint emelkedést kimutatni a kezelés hatására, míg az alkiláló ágensekkel történő kezelést követően csökkent a PACAP szint. A PACAP és a lenalidomid is csökkenti az inflammatorikus citokinek szintjét (IL-6, TNF- α), így gátolni képesek azon hatásokat, amelyek segítik az MM sejtek túlélését a csontvelőben. Az alkiláló ágensek (cyclophosphamid, melphalan) esetén detektált alacsonyabb PACAP szint hátterében álló folyamatok még nem pontosan ismertek.

A különböző terápiás kezelések mellett a PACAP szint vizsgálatát az őssejtgyűjtéskor alkalmazott mobilizációs kezelés során is nyomon követtük. Szignifikáns PACAP szint emelkedést mutattunk ki a mobilizációs kezeléseket követően, amely hátterében a G-CSF (granulocita-kolónia stimuláló faktor) stimulációs kezelés állhat. Korábbi vizsgálatokban már bebizonyították, hogy a PACAP szerepet játszik a haematopoiesis szabályozásában, ugyanis receptorain keresztül részt vesz a CD34+ haematopoieticus őssejtek érésének szabályozásában, emellett a haematopoiesist érintő kóros esetekben gátolni képes a megacaryopoiesist, de erythropoiesisre és lymphopoiesisre kifejtett pontos hatásmechanizmusa még nem ismert.

Végül a PACAP-38 szintek prognosztikai értékének meghatározásához újonnan diagnosztizált MM betegek teljes túlélési idejét és progresszió mentes túlélési idejét vizsgáltuk a PACAP szintekkel összefüggésben, és mindkét esetben szignifikáns erős pozitív korrelációt találtunk. Emellett a progresszió mentes túlélést és a PACAP-38 szintek közötti összefüggést az autológ őssejttranszplantáción átesett betegeknél is megvizsgáltuk, ahol a transzplantációtól a progresszióig eltelt időt határoztuk meg hónapokban, és itt is szignifikáns mérsékelt pozitív korrelációt találtunk a vizsgált paraméterek között, amely adatok szintén alátámasztják a PACAP potenciális prognosztikai szerepét. A PACAP-38 specifikációs és szenzitivitási adatai alapján is kiváló diagnosztikus markernek bizonyult.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy MM betegekből szignifikánsan alacsonyabb PACAP szint mérhető az egészséges kontrollcsoporthoz képest, és a kor előrehaladtával szintje szignifikánsan csökken. Feltételezhetően a PACAP a PAC1 receptor rövid variánsán keresztül képes a plazmasejtekre direkt hatást kifejteni, és a csontvelői mikrokörnyezet szabályozásával közvetett hatást gyakorolni a sejtek proliferációjára, túlélésére és migrációjára. Az MM betegekből kimutatott alacsonyabb PACAP szint hátterében álló folyamatok még nem pontosan ismertek. Feltételezhetően ebben szerepet játszhatnak az öregedéssel kapcsolatos fiziológiás és patológias változások (25, 30), valamint a csontvelői mikrokörnyezeti változások egyaránt. Azt feltételezzük, hogy a korral detektálható PACAP szint csökkenés elősegítheti a betegség kialakulását a csontvelői mikrokörnyezetre kifejtett regulációs funkciójának károsodása révén. Emellett a csökkent PACAP szint szerepet játszhat a betegség kapcsán kialakuló veseelégtelenség és csontkárosodás progressziójában is a korábban ismertetett vesevédő funkciójának és osteoclast gátló hatásának defektusa miatt.

Munkánk során azt is bebizonyítottuk, hogy a PACAP szint szoros korrelációt mutat a betegség súlyosságával, ugyanis aktív betegség, magasabb plazmasejtes infiltráció, emelkedett tumormarker szint (LDH, B2M, BJ fehérje) és magasabb ISS státusz esetén

alacsonyabb PACAP szint detektálható. Emellett azt is kimutattuk, hogy az újonnan diagnosztizált betegek közül a magasabb PACAP szinttel rendelkezők jobb terápiás válaszzal és jobb prognózzal rendelkeztek. Emellett szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a páciensek progresszió mentes túlélési ideje és a PACAP szintekkel összefüggésben is. Feltételezésünk szerint a PACAP szintek vizsgálatával nem csak a tumortömegre tudunk következtetni, hanem csontvelői mikrokörnyezet inflammatorikus változásaira is, amelyek a plazmasejtek eliminációja után is fennmaradnak, és alapot biztosítanak a következő relapszus kialakulásához. Ezen változások nyomon követhetők a remissziós fázisban, segítséget nyújtva az esetleges visszaesések megőlésében.

Mindezek alapján bizonyítást nyert, hogy a PACAP-nak fontos szerepe van ezen haemetológiai kórkép patomechanizmusában is, és tovább bővítettük azon vizsgálati eredményeinket, melyek alátámasztják a PACAP biomarkerként való alkalmazhatóságát a klinikai gyakorlatban.

IV.8. PACAP SZINT VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ FIZIOLÓGIÁS ÁLLAPOTOKBAN ÉS KLINIKAI KÓRKÉPEKBEN

Az elmúlt években egyre több klinikai kórképben igazolták a PACAP szint szignifikáns változását, amely sok esetben szoros korrelációt mutatott az egyes betegségek progressziójával. Akut nem traumás eredetű aneurizma ruptúra után kialakuló subarachnoideális vérzés során is bizonyították prognosztikus biomarker szerepét, mivel szintje szoros összefüggést mutatott a betegség súlyosságával és a hosszútávú túléléssel. Akut spontán basalis ganglionokat érintő vérzés kapcsán is szignifikáns pozitív korrelációt találtak a PACAP szintek és a betegség súlyossága és mortalitása között. Munkacsoportunk traumás agysérültek CSF és plazmamintáinak vizsgálata során talált szoros összefüggést a magas PACAP szintek és a korai halálozás között (52). Emellett emelkedett PACAP szinteket detektáltak migrénés rohamok során, női páciensekben poszttraumás stressz szindrómában. Ezzel szemben, korábbi fejezetben már említésre került, hogy egyes neurológiai kórképekben, mint Parkinson-betegségben (19), Alzheimer-kórban és sclerosis multiplexben és számos más klinikai kórképben, mint a májcirrózis, krónikus hepatitis B, nephrosis szindróma, idiopathiás hypogonadotrop hypogonadismus, postmenopausalis osteoporosis esetén viszont alacsonyabb szintet mértek. Ezen vizsgálatok részletes összefoglalója a következő publikációkban olvashatók: *Reglődi et al. 2016; Tóth D. et al. 2023.*

Értekezésemben bemutatott kutatásaink során vizsgáltuk a PACAP és más bioaktív faktorok változását a szoptatás és várandósság során, hogy feltérképezzük szerepét ezen fiziológiás folyamatokban. Emellett számos eredményt publikáltunk a PACAP szint szignifikáns változásával kapcsolatban cardiovascularis betegségekben, Parkinson-kórban, politraumas sérülésekben és különböző daganatos betegségekben (19-25). Kutatási eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a PACAP szint változásának vizsgálata más, a klinikai gyakorlatban is alkalmazott biomarkerrel együtt segítséget nyújthat az egyes elváltozások korai diagnózisában, optimális terápia megtervezésében vagy a betegség prognózisának pontosabb meghatározásában.

V. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

V.1. PACAP HATÁSAINAK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A HALLÓRENDSZERBEN IN VITRO ÉS IN VIVO MODELLEKBEN

1. Igazoltuk a PACAP antiapoptotikus hatását csirke cochleából izolált sejtenyészetben oxidatív stressz-indukálta károsodással szemben (1).
2. A PACAP-génkiütött egerek immunhisztológiai vizsgálatai során csökkent PAC1 receptor expressziót és emelkedett Ca^{2+} -kötő fehérje expressziót találtunk a Corti-szerv sejteiben a vad típusú egerekhez képest. A Ca^{2+} -kötő fehérje expressziója kanamicin kezelést követően szignifikánsan megemelkedett a vad típusú és a heterozigóta PACAP-génkiütött egerekben, de az alaphelyzetben is magas fehérje expresszió a homozigóta PACAP-génkiütött egerekben nem emelkedett tovább (2, 3).
3. A hallópálya funkcionális vizsgálata során hanginger hatására a PACAP-génkiütött egerek cochlearis magjaiban csökkent aktivációt mutattunk ki a vad egerekhez képest és kevesebb PAC1 receptor jelölődést detektáltunk. A ductus cochlearis fehérjeanalízise során nem találtunk különbséget a két állatcsoport között (4).

V.2. PACAP HATÁSAINAK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A FOGFEJLŐDÉS SORÁN

1. A fejlődő molaris fogak összehasonlítása során szignifikáns különbséget találtunk a vad és a homozigóta PACAP-génkiütött egerek között. A PACAP-génkiütött egerek fogainak dentin rétege szignifikánsan kisebb volt, és Raman vizsgálattal a dentin hidroxipapatit kristályainak magasabb fokú rendezetlenségét és a zománc fehérjék másodlagos szerkezeti eltérését írtuk le a vad egerekhez képest. A molaris fogaiban az SHH útvonal (SHH, PTCH1, Gli1) és a Notch útvonal elemei (Notch2, Jagged1, DLL1, CSL) is fokozott expressziót mutattak a PACAP-génkiütött egerekben a vad egerekhez képest (6, 8).
2. Micro-CT vizsgálattal szignifikánsan kisebb metszőfog méreteket, szűkebb pulpakamrát és csökkent dentin denzitást találtunk, és emellett a Raman vizsgálat a dentin organikus és anorganikus részében is szerkezeti eltéréseket írt le az egyéves PACAP-génkiütött egerek metszőfogaiban a vad egerekhez képest (7).

V.3. PACAP VIZSGÁLATA TEJMINTÁKBAN, PLAZMAMINTÁKBAN ÉS KÜLÖNBÖZŐ SZÖVETANI MINTÁKBAN VÁRANDÓSSÁG ALATT ÉS LAKTÁCIÓ SORÁN

1. RIA méréseink a várandós kismamáknál a 2. és 3. trimeszterben, valamint a szoptatós édesanyák plazmamintáiban szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet detektáltak az egészséges önkéntes nőkhöz képest (10, 12).
2. A szülés során a plazma PACAP-38 szintje szignifikánsan csökkent, de 3 nappal a szülést követően újra visszatért az eredeti szintre. A köldökerekben alacsonyabb volt a PACAP-38 koncentrációja, mint a perifériás vérmintákban (12). Az érett placentaminták esetében szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet találtunk a PACAP-27-hez viszonyítva, amely a placenta érése során szignifikáns emelkedést mutatott. A köldökzsinór mintákban szignifikánsan alacsonyabb peptid szinteket mértünk a placentához képest (11).
3. A tejmintákban 5-20-szoros PACAP-38 koncentrációt tudtunk kimutatni a plazmamintákhoz képest, ami a legmagasabb a kolosztrumban volt az átmeneti vagy az érett tejmintákhoz képest. A szoptatás első 6 hónapjában a PACAP-38 szint nem változott, de ezt követően a 11. hónaptól szignifikánsan magasabb PACAP szinteket mértünk a szoptatási periódus előrehaladtával. Szintén ki tudtuk mutatni a PACAP-38 jelenlétét bolti forgalomban lévő tejekben és tápszerekben (10, 13, 14).
4. Immunhisztológia segítségével a laktáló birka emlőmirigysejteken szignifikáns PAC1 receptor expresszió emelkedést mutattunk ki a nem laktáló birkához és az emberi emlőszövethez képest (13).

V.4. PACAP MENNYISÉGÉNEK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA PARKINSON-KÓRBAN ÉS ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEIBEN

1. Gerinctelen (rotenonnal kezelt csiga) és gerinces (unilateralis 6-OHDA-indukálta substantia nigra károsodás patkányban) állatkísérletes modellek összehasonlításával vizsgáltuk a PACAP szerepét Parkinson-kórban. Mindkét kísérletes modellben a PACAP kezelés szignifikánsan javította a hypokinetikus tüneteket és a PACAP-kezelt állatokban magasabb dopamin szintet mértünk a csak 6-OHDA-nal vagy csak rotenonnal kezelt állatok mintáihoz képest. Mindkét általunk vizsgált állatmodellben a toxikus kezelés hatására csökkent a PARK7/DJ-1 fehérje mennyisége, amit patkányok esetében PACAP kezelést követően már nem tudtunk kimutatni (18).

A korai ingergazdag környezet protektív hatását is igazoltuk patkány Parkinson-kór modellben fiatal és idősödő állatokban egyaránt. Idősödő parkinsonos állatokon a PACAP kezelés hatását is vizsgáltuk, ami kivédte a 6-OHDA-

indukálta dopamin szint változást a standard ketrecben tartott állatoknál (16, 17).

2. Klinikai vizsgálatunk során szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szinteket mértünk kezeletlen Parkinson-kóros betegek plazmamintájában az egészséges kontroll páciensekhez képest, míg DBS kezelést követően az endogén PACAP szintje szignifikáns emelkedést mutatott. Alacsonyabb PACAP szinteket detektáltunk a betegség progressziója során és a súlyosabb motoros tünetekkel járó akinetikus-rigid tüneteket mutató csoportban. Nem találtunk szignifikáns korrelációt az MDS-UPDRS eredményeinek értékelése során, sem a gyógyszeres terápia összefüggésében, sem pedig a depressziós skálák összehasonlításával, de a PACAP szint emelkedését detektáltuk a súlyos alvászavarral járó esetekben (19).

V.5. PACAP PLAZMASZINTJÉNEK VIZSGÁLATA POLITRAUMATIZÁLT PÁCIENSEKBEN

Méréseink során a PACAP-38 és CRP szintek között gyenge pozitív korrelációt találtunk a traumát követő 4. napon és szignifikáns mérsékelt erős pozitív korrelációt találtunk 5 nappal a baleset után. A teljes vizsgálati periódus eredményeinek analízise során szignifikáns összefüggést írtunk le a PACAP-38 és a LAR értékek között, ugyanis mindkét faktor szintje emelkedő tendenciát mutatott a vizsgálat alatt (20).

V.6. PACAP PLAZMA ÉS SZÖVETI SZINTJEINEK VIZSGÁLATA CARDIOVASCULARIS KÓRKÉPEKBEN

1. Munkacsoportunk elsőként végzett olyan transzlációs kutatást, amely során bizonyítást nyert az endogén PACAP-38 szintek szignifikáns változása reperfüziós MI sertés modelljéből származó szívizommintákban, ahol szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet detektáltunk a kamrai mintákban a pitvarhoz képest, és érelzáródást követően alacsonyabb PACAP-38 szintet mértünk a bal kamra nem ischaemiás régiójában az ischaemiás területhez és a sham-operált állatok mintáihoz viszonyítva (22).
2. Klinikai kutatásaink során emelkedett PACAP-38 szintet detektáltunk közvetlenül az infarktust követően a kontroll páciensekhez képest, ami szignifikáns csökkenést mutatott a PCI beavatkozás után. Két nappal a beavatkozást követően a páciensek PACAP szintje alacsonyabb volt, mint az egészséges kontrolloké. A PACAP-38 és troponin szintek korrelációs elemzése során szignifikáns, enyhe negatív korrelációt találtunk, és emellett szignifikáns, pozitív korreláció igazolódott a hypertóniával összefüggésben. Ezen felül multivariancia analízissel a hypertonia és a hemoglobin A1c (HbA1c) értékek additív hatását is kimutattuk (22).

3. Azon szívelégtelen betegek vizsgálata során, akik akut dekompenzáció miatt kerültek felvételre, szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet mértünk a krónikus, kompenzált betegekhez és az egészséges kontroll páciensekhez képest. Az NT-proBNP esetében szignifikáns negatív korrelációt igazoltunk a krónikus szívelégtelen csoportban, és szignifikáns pozitív korrelációt igazoltunk a PACAP-38 és a CRP szintek vizsgálata során. Alacsonyabb IL-1 β , IL-2 és IL-4 szinteket mértünk a krónikus szívelégtelen csoportban az akut és a kontroll csoporthoz viszonyítva. Emellett az IL-10 vizsgálata során az akut szívelégtelen csoportban mértünk magasabb szinteket a kontroll csoporthoz viszonyítva. A citokinek változása pozitív korrelációt mutatott a PACAP-38 szintekkel összehasonlítva (21, 23).
4. A cardiomyopathiás csoport szívvizommintáiban alacsonyabb PACAP-38 szintet mértünk a kontroll mintákhoz képest. A nem ischaemiás etiológiájú csoportban emellett alacsonyabb PAC1 receptor expressziót mértünk a kontroll csoporthoz viszonyítva (23).

V.7. PACAP PLAZMA ÉS SZÖVETI SZINTJEINEK VIZSGÁLATA MALIGNUS BETEGSÉGEKBEN

1. Malignus betegségekkel kapcsolatos kutatásaink első részében a legtöbb urogenitalis mintában, a prosztatatumor kivételével, szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet detektáltunk a PACAP-27 szintekhez képest. Vesetumoros minták vizsgálata során szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szintet mértünk az ép szövetekkel összehasonlítva, emellett prosztatatumorból származó mintákban pedig szignifikánsan magasabb PACAP-27 szintet találtunk a jóindulatú prosztata megnagyobbodásból származó mintákhoz viszonyítva (24).
2. Az MM betegekben szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szintet mértünk az egészséges, korban illesztett kontroll páciensek mintáihoz képest. Az aktív betegségben szenvedő betegeknél alacsonyabb PACAP-38 szinteket mértünk a remisszióban lévő betegekhez képest.

Szignifikáns, mérsékelt negatív korrelációt találtunk a szövettani analízis és az áramlási citometriás vizsgálatok esetében is a plazmasejtarány és a PACAP-38 szintek között.

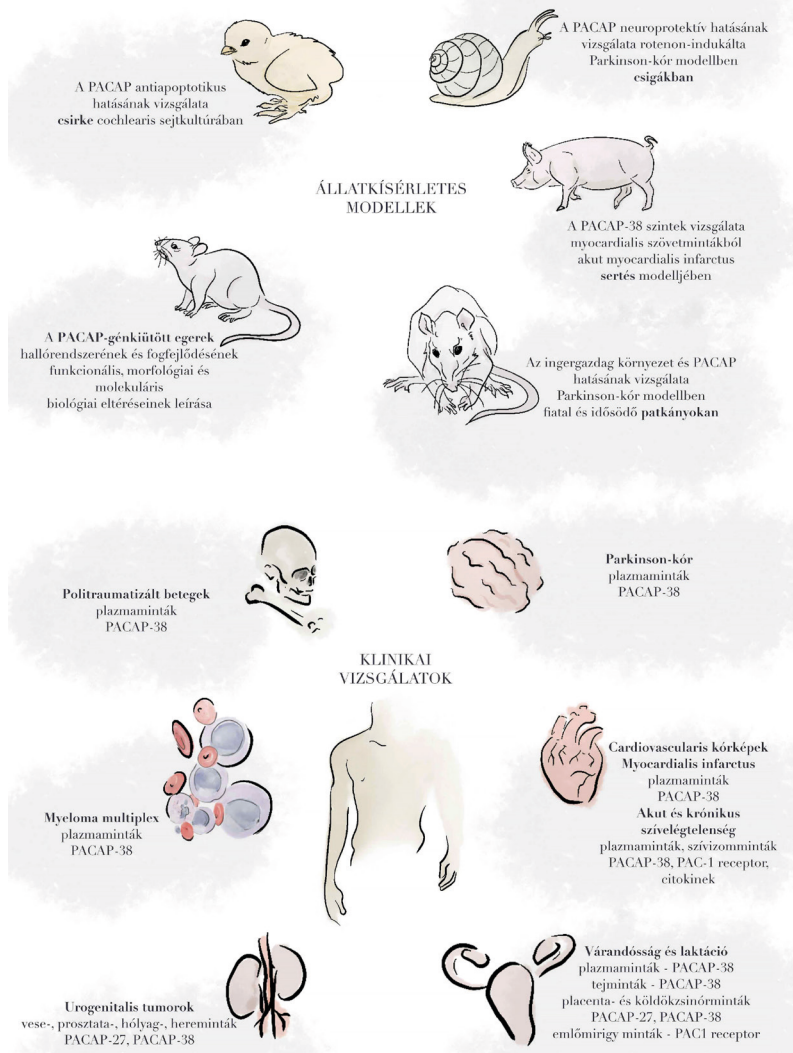
Az ISS stádiumbesoroló skála alapján a magasabb stádiumú, rosszabb prognózisú betegeknél alacsonyabb PACAP szinteket mértünk. A B2M és LDH szintek elemzése során szignifikáns negatív korrelációt találtunk a PACAP szintekkel összehasonlítva.

A kombinációs kezelések közül a RVd (lenalidomide-bortezomib-dexametasone) terápiában részesült betegeknél mértünk szignifikánsan magasabb PACAP szinteket.

Szignifikáns PACAP szint emelkedést mutattunk ki az őssejtgyűjtés során alkalmazott mobilizációs kezeléseket követően.

Végül a PACAP-38 szintek prognosztikai értékének meghatározásához újonnan diagnosztizált MM betegek teljes túlélési idejét és progresszió mentes túlélési idejét vizsgáltuk a PACAP szintekkel összefüggésben, és mindkét esetben szignifikáns, erős pozitív korrelációt találtunk. A PACAP-38 specificitása 100% és a szenzitivitása pedig 88% volt (25). Nagydoktori értekezésem kutatásait az **V.1. ábra** foglalja össze.

A HYPHYSIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP) VIZSGÁLATA ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEKBEN ÉS KLINIKAI KÖRKÉPEKBEN



V.1 ábra: Nagydoktori értekezés kutatásai (munkacsoportunk ábrája).

VI. SAJÁT IRODALOMJEGYZÉK

VI.1. A DOLGOZATBAN RÉSZLETESEN ISMERTETETT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

VI.1.1. PACAP HATÁSAINAK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A HALLÓRENDSZERBEN IN VITRO ÉS IN VIVO MODELLEKBEN

Eredeti közlemények

1. Racz B, Horvath G, Reglodi D, Gasz B, Kiss P, Gallyas F Jr, Sumegi B, Toth G, Nemeth A, Lubics A, **Tamas A**. PACAP ameliorates oxidative stress in the chicken inner ear: an in vitro study. Regul Pept. 2010 Feb 25;160(1-3): 91-8. doi: 10.1016/j.regpep.2009.12.003. Epub 2009 Dec 4. PMID: 19969027. Q2; IF: 2,473; Nyilvános idéző összesen: 31; Független: 15
2. **Tamas A**, Szabadfi K, Nemeth A, Fulop B, Kiss P, Atlasz T, Gabriel R, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Helyes Z, Reglodi D. Comparative examination of inner ear in wild type and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. Neurotox Res. 2012 May;21(4): 435-44. doi: 10.1007/s12640-011-9298-z. Epub 2011 Dec 28. PMID: 22203609. Q1; IF: 2,865; Nyilvános idéző összesen: 13; Független: 3
3. Nemeth A, Szabadfi K, Fulop B, Reglodi D, Kiss P, Farkas J, Szalontai B, Gabriel R, Hashimoto H, **Tamas A**. Examination of calcium-binding protein expression in the inner ear of wild-type, heterozygous and homozygous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-knockout mice in kanamycin-induced ototoxicity. Neurotox Res. 2014 Jan;25(1): 57-67. doi: 10.1007/s12640-013-9428-x. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24155155. Q1; IF: 3,538; Nyilvános idéző összesen: 14; Független: 5
4. Fulop DB, Humli V, Szepeszy J, Ott V, Reglodi D, Gaszner B, Nemeth A, Szirmai A, Tamas L, Hashimoto H, Zelles T, **Tamas A**. Hearing impairment and associated morphological changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. Sci Rep. 2019 Oct 10;9(1): 14598. doi: 10.1038/s41598-019-50775-z. PMID: 31601840; PMCID: PMC6787024. (b) D1; IF: 3,998; Nyilvános idéző összesen: 9; Független: 3

Könyvfejezet

5. Fulop BD, Reglodi D, Nemeth A, **Tamas A**. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the auditory system. In: Reglodi D, **Tamas A**. (eds) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-PACAP. Springer, Cham; 2016; pp. 529-546. doi.org: 10.1007/978-3-319-35135-3_31 Nyilvános idéző összesen: 2; Független: 0

VI.1.2. PACAP HATÁSAINAK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A FOGFEJLŐDÉS SORÁN

Eredeti közlemények

6. Sandor B, Fintor K, Felszeghy S, Juhasz T, Reglodi D, Mark L, Kiss P, Jungling A, Fulop BD, Nagy AD, Hashimoto H, Zakany R, Nagy A, **Tamas A**. Structural and morphometric comparison of the molar teeth in pre-eruptive developmental stage of PACAP-deficient and wild-type mice. *J Mol Neurosci*. 2014 Nov;54(3): 331-41. doi: 10.1007/s12031-014-0392-6. Epub 2014 Aug 12. PMID: 25112419. Q1; IF: 2,343; Nyilvános idéző összesen: 20; Független: 6
7. Sandor B, Fintor K, Reglodi D, Fulop DB, Helyes Z, Szanto I, Nagy P, Hashimoto H, **Tamas A**. Structural and Morphometric Comparison of Lower Incisors in PACAP-Deficient and Wild-Type Mice. *J Mol Neurosci*. 2016 Jun;59(2): 300-8. doi: 10.1007/s12031-016-0765-0. Epub 2016 May 6. PMID: 27154515. Q1; IF: 2,229; Nyilvános idéző összesen: 21; Független: 8
8. Fulop BD, Sandor B, Szentleleky E, Karanyicz E, Reglodi D, Gaszner B, Zakany R, Hashimoto H, Juhasz T, **Tamas A**. Altered Notch Signaling in Developing Molar Teeth of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)-Deficient Mice. *J Mol Neurosci*. 2019 Jul;68(3): 377-388. doi: 10.1007/s12031-018-1146-7. Epub 2018 Aug 10. PMID: 30094580. (a) Q1; IF: 2,678; Nyilvános idéző összesen: 16; Független: 2

Összefoglaló közlemény

9. Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, Laszlo E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, **Tamas A**. PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci*. 2012 Nov;48(3): 482-92. doi: 10.1007/s12031-012-9762-0. Epub 2012 Apr 14. PMID: 22528455. Q1; IF: 2,891; Nyilvános idéző összesen: 108; Független: 43

VI.1.3. PACAP VIZSGÁLATA TEJMINTÁKBAN, PLAZMAMINTÁKBAN ÉS KÜLÖNBÖZŐ SZÖVETANI MINTÁKBAN VÁRANDÓSSÁG ALATT ÉS LAKTÁCIÓ SORÁN

Eredeti közlemények

10. Borzsei R, Mark L, **Tamas A**, Bagoly T, Bay C, Csanaky K, Banki E, Kiss P, Vaczy A, Horvath G, Nemeth J, Szauer E, Helyes Z, Reglodi D. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur J Endocrinol*. 2009 Apr;160(4): 561-5. doi: 10.1530/EJE-08-0911. Epub 2009 Jan 27. PMID: 19174531. D1; IF: 3,539; Nyilvános idéző összesen: 47; Független: 17
11. Brubel R, Boronkai A, Reglodi D, Racz B, Nemeth J, Kiss P, Lubics A, Toth G, Horvath G, Varga T, Szogyi D, Fonagy E, Farkas J, Barakonyi A, Bellyei S, Szereday L, Koppan M, **Tamas 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 Nov;42(3): 450-8. doi: 10.1007/s12031-010-9374-5. Epub 2010 May 7. PMID: 20449689. Q1; IF: 2,922; Nyilvános idéző összesen: 21; Független: 7
12. Reglodi D, Gyarmati J, Ertl T, Borzsei R, Bodis J, **Tamas A**, Kiss P, Csanaky K, Banki E, Bay C, Nemeth J, Helyes Z. Alterations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *J Endocrinol Invest*. 2010 Jul-Aug;33(7): 443-5. doi: 10.1007/BF03346621. PMID: 20671407. Q2; IF: 1,476; Nyilvános idéző összesen: 22; Független: 8
 13. Csanaky K, Banki E, Szabadfi K, Reglodi D, Tarcai I, Czegledi L, Helyes Z, Ertl T, Gyarmati J, Szanto Z, Zapf I, Sipos E, Shioda S, **Tamas A**. Changes in PACAP immunoreactivity in human milk and presence of PAC1 receptor in mammary gland during lactation. *J Mol Neurosci*. 2012 Nov;48(3): 631-7. doi: 10.1007/s12031-012-9779-4. Epub 2012 Apr 27. PMID: 22539193. Q1; IF: 2,891; Nyilvános idéző összesen: 15; Független: 1
 14. Csanaky K, Reglodi D, Bánki E, Tarcai I, Márk L, Helyes Z, Ertl T, Gyarmati J, Horváth K, Sántik L, **Tamas A**. Examination of PACAP38-like immunoreactivity in different milk and infant formula samples. *Acta Physiol Hung*. 2013 Mar;100(1): 28-36. doi: 10.1556/APhysiol.100.2013.1.2. PMID: 23471040. Q3; IF: 0,747; Nyilvános idéző összesen: 8; Független: 2

Könyvfejezet

15. **Tamas A**, Vass RA, Helyes Z, Csanaky K, Szanto Z, Nemeth J, Reglodi D. Examination of PACAP During Lactation. In: Reglodi D, **Tamas A**. (eds) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-PACAP*. Springer, Cham; 2016; pp. 833-840. doi.org: 10.1007/978-3-319-35135-3_49 Nyilvános idéző összesen: 3; Független: 2

VI.1.4. PACAP MENNYISÉGÉNEK ÉS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA PARKINSON-KÓRBAN ÉS ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEIBEN

Eredeti közlemények

16. Jungling A, Reglodi D, Karadi ZN, Horvath G, Farkas J, Gaszner B, **Tamas A**. Effects of Postnatal Enriched Environment in a Model of Parkinson's Disease in Adult Rats. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 14;18(2): 406. doi: 10.3390/ijms18020406. PMID: 28216584; PMCID: PMC5343940. Q1; IF: 3,687; Nyilvános idéző összesen: 34; Független: 33
17. Jungling A, Reglodi D, Maasz G, Zrinyi Z, Schmidt J, Rivnyak A, Horvath G, Pirger Z, **Tamas A**. Alterations of Nigral Dopamine Levels in Parkinson's Disease after Environmental Enrichment and PACAP Treatment in Aging Rats. *Life (Basel)*. 2021 Jan 8;11(1): 35. doi: 10.3390/life11010035. PMID: 33429934; PMCID: PMC7827131. Q2; IF: 3,253; Nyilvános idéző összesen: 9; Független: 5

18. Maasz G, Zrinyi Z, Reglodi D, Petrovics D, Rivnyak A, Kiss T, Jungling A, **Tamas A***, Pirger Z*. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models. *Dis Model Mech.* 2017 Feb 1;10(2): 127-139. doi: 10.1242/dmm.027185. Epub 2016 Dec 22. PMID: 28067625; PMCID: PMC5312006. D1; IF: 4,398; Nyilvános idéző összesen: 54; Független: 36 *megosztott utolsó szerzőség
19. Pham D, Polgar B, Toth T, Jungling A, Kovacs N, Balas I, Pal E, Szabo D, Fulop BD, Reglodi D, Szanto Z, Herczeg R, Gyenesei A, **Tamas A**. Examination of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in Parkinson's disease focusing on correlations with motor symptoms. *Geroscience.* 2022 Apr;44(2): 785-803. doi: 10.1007/s11357-022-00530-6. Epub 2022 Feb 26. PMID: 35220508; PMCID: PMC9135934. D1; IF: 5,6; Nyilvános idéző összesen: 7; Független: 3

VI.1.5. PACAP PLAZMASZINTJÉNEK VIZSGÁLATA POLITRAUMATIZÁLT PÁCIENSEKBEN

Eredeti közlemény

20. **Tamas A**, Tóth D, Pham D, Loibl C, Rendeki S, Csontos C, Rozanovic M, Bogár L, Polgár B, Németh J, Gyenesei A, Herczeg R, Szántó Z, Reglodi D. Changes of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) level in polytrauma patients in the early post-traumatic period. *Peptides.* 2021 Dec;146: 170645. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170645. Epub 2021 Sep 1. PMID: 34478801. Q2; IF: 3,867; Nyilvános idéző összesen: 5; Független: 0

VI.1.6. PACAP PLAZMA ÉS SZÖVETI SZINTJEINEK VIZSGÁLATA CARDIOVASCULARIS KÓRKÉPEKBEN

Eredeti közlemények

21. Sarszegi Z, Szabo D, Gaszner B, Konyi A, Reglodi D, Nemeth J, Lelesz B, Polgar B, Jungling A, **Tamas A**. Examination of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) as a Potential Biomarker in Heart Failure Patients. *J Mol Neurosci.* 2019 Jul;68(3): 368-376. doi: 10.1007/s12031-017-1025-7. Epub 2018 Jan 20. PMID: 29353438. Q1; IF: 2,678; Nyilvános idéző összesen: 23; Független: 9
22. Szabo D, Sarszegi Z, Polgar B, Saghy E, Nemeth A, Reglodi D, Makkos A, Gorbe A, Helyes Z, Ferdinandy P, Herczeg R, Gyenesei A, Cziraki A, **Tamas A**. PACAP-38 in Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction in Humans and Pigs: A Translational Study. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 12;22(6): 2883. doi: 10.3390/ijms22062883. PMID: 33809145; PMCID: PMC8002092. D1; IF: 6,208; Nyilvános idéző összesen: 10; Független: 3

23. Szabó D, Sárszegi Z, Polgár B, Ságghy É, Reglődi D, Tóth T, Onódi Z, Leszek P, Varga ZV, Helyes Z, Kemény Á, Ferdinandy P, **Tamas A.** PACAP-38 and PAC1 Receptor Alterations in Plasma and Cardiac Tissue Samples of Heart Failure Patients. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 28;23(7): 3715. doi: 10.3390/ijms23073715. PMID: 35409075; PMCID: PMC8998504. D1; IF: 5,6; Nyilvános idéző összesen: 8; Független: 4

VII.1.7. PACAP PLAZMA ÉS SZÖVETI SZINTJEINEK VIZSGÁLATA MALIGNUS BETEGSÉGEKBEN

Eredeti közlemények

24. **Tamas A,** Javorhazy A, Reglodi D, Sarlos DP, Banyai D, Semjen D, Nemeth J, Lelesz B, Fulop DB, Szanto Z. Examination of PACAP-Like Immunoreactivity in Urogenital Tumor Samples. *J Mol Neurosci.* 2016 Jun;59(2): 177-83. doi: 10.1007/s12031-015-0652-0. Epub 2015 Oct 10. PMID: 26454744. Q1; IF: 2,229; Nyilvános idéző összesen: 21; Független: 4
25. Tóth T, Alizadeh H, Polgár B, Csalódi R, Reglődi D, **Tamas A.** Diagnostic and Prognostic Value of PACAP in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 28;24(13): 10801. doi: 10.3390/ijms241310801. PMID: 37445974; PMCID: PMC10341744. D1; IF: 5,6

Klinikai kutatásokkal kapcsolatos összefoglaló közlemény

26. Reglodi D, Kiss P, Lubics A, **Tamas A.** Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des.* 2011;17(10): 962-72. doi: 10.2174/138161211795589355. PMID: 21524257. Q1; IF: 3,87; Nyilvános idéző összesen: 169; Független: 114
27. Reglodi D, Atlasz T, Jungling A, Szabo E, Kovari P, Manavalan S, **Tamas A.** Alternative Routes of Administration of the Neuroprotective Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide. *Curr Pharm Des.* 2018;24(33): 3892-3904. doi: 10.2174/138161282466618112110934. PMID: 30417775. Q2; IF: 2,412; Nyilvános idéző összesen: 13; Független: 9
28. Jungling A, Reglodi D, **Tamas A.** Review on the Neuroprotective Effects of Environmental Enrichment in Models of Parkinson's Disease. *Clin Pharmacol Transl Med.* 2018;2(2): 101–107. http://real.mtak.hu/83629/1/Jungling_et_al._Clin_Pharmacol_Transl_Med_2018_u.pdf
29. Szabó D, Szántó Z, Jungling A, Polgár B, Reglődi D, Cziráki A, **Tamas A,** Sárszegi Z. A Hypophysis Adenilát-Cikláz Aktiváló Poli-peptid (PACAP) Hatása a Kardiovaszkuláris Rendszerre. *Cradiologia Hungarica* 2018; 48(2): 129-135. doi: 10.26430/CHUNGARICA.2018.48.2.129.
30. Toth D, Reglodi D, Schwieters L, **Tamas A.** Role of endocrine PACAP in age-related diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 Mar 9;14: 1118927. doi: 10.3389/fendo.2023.1118927. PMID: 36967746; PMCID: PMC10033946. Q1; IF: 5,2; Nyilvános idéző összesen: 2; Független: 0

Könyvfejezet és könyv

31. Reglodi D, Helyes Z, Nemeth J, Vass RA, **Tamas A.** PACAP as a Potential Biomarker: Alterations of PACAP Levels in Human Physiological and Pathological Conditions. In: Reglodi D, **Tamas A.** (eds) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-PACAP. Springer, Cham; 2016; pp. 815-832. doi: 10.1007/978-3-319-35135-3_48 Nyilvános idéző összesen: 11; Független: 3
32. Reglodi D, **Tamas A.** Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP. Current Topics in Neurotoxicity, vol 11. Springer, Cham. 2016 <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-35135-3?page=4#toc>

Értekezés alapját képező Ph.D. dolgozatok

Dr. Csanaky Katalin Andrea A PACAP és receptorának vizsgálata az anyatejben, különböző tejalapú készítményekben, az emlő szövetében és sejtenyészeteiben Ph.D. értekezés 2014 https://aok.pte.hu/docs/phd/file/dolgozatok/2014/Csanaky_Katalin_Andrea_PhD_dolgozat.pdf

Dr. Németh Adrienn PACAP (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid) hatásának vizsgálata a belső fülben in vitro és in vivo kísérletekben Ph.D. értekezés 2015 https://aok.pte.hu/docs/phd/file/dolgozatok/2015/Nemeth_Adrienn_PhD_dolgozat.pdf

Dr. Sándor Balázs Attila PACAP (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid) fogfejlődésre gyakorolt hatásainak vizsgálata állatmodellben Ph.D. értekezés 2018 https://aok.pte.hu/docs/phd/file/dolgozatok/2018/Sandor_Balazs_Atila_PhD_dolgozat.pdf

Dr. Fülöp Balázs Dániel PACAP (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid) fogfejlődésre gyakorolt hatásainak vizsgálata állatmodellben Ph.D. értekezés 2020 https://aok.pte.hu/docs/phd/file/dolgozatok/2020/Fulop_Balazs_Daniel_PhD_dolgozat.pdf

Dr. Szabó Dóra A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid vizsgálata cardiovascularis kórképekben Ph.D. értekezés 2022 https://aok.pte.hu/docs/phd/file/dolgozatok/2022/Szabo_Dora_PhD_dolgozat.pdf

VI.2. A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ TARTOZÓ DISZKUSSZIÓBAN EMLÍTETT KÖZLEMÉNYEK:

Első és utolsó szerzős közlemények

33. Szanto Z, Sarszegi Z, Reglodi D, Nemeth J, Szabadfi K, Kiss P, Varga A, Banki E, Csanaky K, Gaszner B, Pinter O, Szalai Z, **Tamas A.** PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. J Mol Neurosci. 2012 Nov;48(3): 667-73. doi: 10.1007/s12031-012-9815-4. Epub 2012 May 31. PMID: 22648511. Q1; IF: 2,891; Nyilvános idéző összesen: 34; Független: 12
34. **Tamas A,** Reglodi D, Farkas O, Kovessi E, Pal J, Povlishock JT, Schwarcz A, Czeiter E, Szanto Z, Doczi T, Buki A, Bukovics P. Effect of PACAP in central and peripheral nerve injuries. Int J Mol Sci. 2012;13(7): 8430-8448. doi: 10.3390/

- ijms13078430. Epub 2012 Jul 6. PMID: 22942712; PMCID: PMC3430243. Q2; IF: 2,464; Nyilvános idéző összesen: 63; Független: 42
35. Vass RA, Kemeny A, Dergez T, Ertl T, Reglodi D, Jungling A, **Tamas A**. Distribution of bioactive factors in human milk samples. *Int Breastfeed J*. 2019 Feb 11;14: 9. doi: 10.1186/s13006-019-0203-3. PMID: 30792750; PMCID: PMC6371541. D1; IF: 2,545; Nyilvános idéző összesen: 30; Független: 23
- Ph.D. dolgozatban már szereplő első és utolsó szerzős közlemények
36. Regődi D, Lubics A, Kiss P, Lengvári I, Gaszner B, Tóth G, Hegyi O, **Tamás A**. Effect of PACAP in 6-OHDA-induced injury of the substantia nigra in intact young and ovariectomized female rats. *Neuropeptides*. 2006 Aug;40(4): 265-74. doi: 10.1016/j.npep.2006.06.001. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16904179. Q1; IF: 2,789; Nyilvános idéző összesen: 42; Független: 24
 37. **Tamás A**, Gábel R, Rác B, Dénes V, Kiss P, Lubics A, Lengvári I, Reglodi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neurosci Lett*. 2004 Nov 30;372(1-2): 110-3. doi: 10.1016/j.neulet.2004.09.021. PMID: 15531098. Q2; IF: 2,019; Nyilvános idéző összesen: 67; Független: 23
 38. **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Reglodi D. Effects of age, gender, and gonadectomy on neurochemistry and behavior in animal models of Parkinson's disease. *Endocrine*. 2006 Apr;29(2): 275-87. doi: 10.1385/ENDO: 29: 2: 275. PMID: 16785603. Q2; IF: 1,805; Nyilvános idéző összesen: 29; Független: 22
 39. **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Reglodi D. Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. *Ann NY Acad Sci*. 2006 Jul;1070: 570-4. doi: 10.1196/annals.1317.083. PMID: 16888227. (a) Q1; IF: 1,93; Nyilvános idéző összesen: 24; Független: 14
 40. **Tamás A**, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I, Reglodi D. Age and gender differences in behavioral and morphological outcome after 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Behav Brain Res*. 2005 Mar 30;158(2): 221-9. doi: 10.1016/j.bbr.2004.09.002. PMID: 15698888. Q2 ; IF: 2,865; Nyilvános idéző összesen: 67; Független: 62
 41. **Tamás A**, Reglodi D, Szántó Z, Borsiczky B, Németh J, Lengvári I. Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002 Jun;23(3): 249-54. PMID: 12080287. Q2; IF: 1,278; Nyilvános idéző összesen: 33; Független: 20
 42. **Tamás A**, Zsombok A, Farkas O, Reglodi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishock JT, Dóczy T. Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. *J Neurotrauma*. 2006 May;23(5): 686-95. doi: 10.1089/neu.2006.23.686. PMID: 16689670. (b) Q1; IF: 3,453; Nyilvános idéző összesen: 39; Független: 29
- Diszkuisszióban szereplő társszerzős közlemények
43. Banki E, Degrell P, Kiss P, Kovacs K, Kemeny A, Csanaky K, Duh A, Nagy D, Toth G, **Tamas A**, Reglodi D. Effect of PACAP treatment on kidney morphology

- and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides*. 2013 Apr;42: 125-30. doi: 10.1016/j.peptides.2013.02.002. Epub 2013 Feb 13. PMID: 23416022.
44. Banki E, Kovacs K, Nagy D, Juhasz T, Degrell P, Csanaky K, Kiss P, Jancso G, Toth G, **Tamas A**, Reglodi D. Molecular mechanisms underlying the Nephroprotective effects of PACAP in diabetes. *J Mol Neurosci*. 2014 Nov;54(3): 300-9. doi: 10.1007/s12031-014-0249-z. Epub 2014 Feb 19. PMID: 24535559.
 45. Banki E, Pakai E, Gaszner B, Zsiborasz C, Czett A, Bhuddi PR, Hashimoto H, Toth G, **Tamas A**, Reglodi D, Garami A. Characterization of the thermoregulatory response to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rodents. *J Mol Neurosci*. 2014 Nov;54(3): 543-54. doi: 10.1007/s12031-014-0361-0. Epub 2014 Jul 4. PMID: 24994541.
 46. Boronkai A, Brubel R, Racz B, **Tamas A**, Kiss P, Horvath G, Lubics A, Szigeti A, Bellyei S, Toth G, Lakatos A, Reglodi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on the survival and signal transduction pathways in human choriocarcinoma cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Apr;1163: 353-7. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03630.x. PMID: 19456358.
 47. Brown D, **Tamas A**, Reglodi D, Tizabi Y. PACAP protects against inflammatory-mediated toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2014 Oct;26(3): 230-9. doi: 10.1007/s12640-014-9468-x. Epub 2014 Apr 17. PMID: 24740430.
 48. Brown D, **Tamas A**, Reglodi D, Tizabi Y. PACAP protects against salsolinol-induced toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*. 2013 Jul;50(3): 600-7. doi: 10.1007/s12031-013-0015-7. Epub 2013 Apr 28. PMID: 23625270; PMCID: PMC3676705.
 49. Brubel R, Horvath G, Reglodi D, Lubics A, **Tamas A**, Kiss P, Laszlo E, Nemeth J, Mark L, Szakaly P. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. *Transplant Proc*. 2011 May;43(4): 1297-9. doi: 10.1016/j.transproceed.2011.03.081. PMID: 21620115.
 50. Brubel R, Kiss P, Vincze A, Varga A, Varnagy A, Bodis J, Mark L, Jambor E, Maasz G, Hashimoto H, Helyes Z, Toth G, **Tamas A**, Koppan M, Reglodi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on human sperm motility. *J Mol Neurosci*. 2012 Nov;48(3): 623-30. doi: 10.1007/s12031-012-9806-5. Epub 2012 May 26. PMID: 22638857.
 51. Brubel R, Reglodi D, Jambor E, Koppan M, Varnagy A, Biro Z, Kiss P, Gaal V, Matkovits A, Farkas J, Lubics A, Bodis J, Bay C, Veszpremi B, **Tamas A**, Nemeth J, Mark L. Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2011 Feb;46(2): 189-94. doi: 10.1002/jms.1884. Epub 2011 Jan 24. PMID: 21259400.
 52. Bukovics P, Czeiter E, Amrein K, Kovacs N, Pal J, **Tamas A**, Bagoly T, Helyes Z, Buki A, Reglodi D. Changes of PACAP level in cerebrospinal fluid and plasma of patients with severe traumatic brain injury. *Peptides*. 2014 Oct;60: 18-22. doi: 10.1016/j.peptides.2014.07.001. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25017241.

53. Czegledi L, **Tamas A**, Borzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horvath G, Brubel R, Nemeth J, Szalontai B, Szabadfi K, Javor A, Reglodi D, Helyes Z. Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *Gen Comp Endocrinol*. 2011 May 15;172(1): 115-9. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.12.012. Epub 2010 Dec 23. PMID: 21185294.
54. Csanaky K, Doppler W, **Tamas A**, Kovacs K, Toth G, Reglodi D. Influence of terminal differentiation and PACAP on the cytokine, chemokine, and growth factor secretion of mammary epithelial cells. *J Mol Neurosci*. 2014 Jan;52(1): 28-36. doi: 10.1007/s12031-013-0193-3. Epub 2013 Dec 10. PMID: 24323361.
55. Farkas J, Reglodi D, Gaszner B, Szogyi D, Horvath G, Lubics A, **Tamas A**, Frank F, Besirevic D, Kiss P. Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Res Bull*. 2009 May 29;79(3-4): 208-14. doi: 10.1016/j.brainresbull.2008.12.011. Epub 2009 Jan 15. PMID: 19150489.
56. Farkas J, Sandor B, **Tamas A**, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, Fulop BD, Juhasz T, Manavalan S, Reglodi D. Early Neurobehavioral Development of Mice Lacking Endogenous PACAP. *J Mol Neurosci*. 2017 Apr;61(4): 468-478. doi: 10.1007/s12031-017-0887-z. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28168413.
57. Feher M, Gaszner B, **Tamas A**, Gil-Martinez AL, Fernandez-Villalba E, Herrero MT, Reglodi D. Alteration of the PAC1 Receptor Expression in the Basal Ganglia of MPTP-Induced Parkinsonian Macaque Monkeys. *Neurotox Res*. 2018 May;33(4): 702-715. doi: 10.1007/s12640-017-9841-7. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29230633.
58. Gaal V, Mark L, Kiss P, Kustos I, **Tamas A**, Kocsis B, Lubics A, Nemeth V, Nemeth A, Lujber L, Pytel J, Toth G, Reglodi D. Investigation of the effects of PACAP on the composition of tear and endolymph proteins. *J Mol Neurosci*. 2008 Nov;36(1-3): 321-9. doi: 10.1007/s12031-008-9067-5. Epub 2008 Apr 18. PMID: 18421426.
59. Gasz B, Rác B, Röth E, Borsiczky B, **Tamás A**, Boronkai A, Gallyas F Jr, Tóth G, Reglodi D. PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Jul;1070: 293-7. doi: 10.1196/annals.1317.029. PMID: 16891268.
60. Horvath G, Brubel R, Kovacs K, Reglodi D, Oppel B, Ferencz A, Szakaly P, Laszlo E, Hau L, Kiss P, **Tamas A**, Racz B. Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. *J Mol Neurosci*. 2011 Jan;43(1): 67-75. doi: 10.1007/s12031-010-9428-8. Epub 2010 Jul 30. PMID: 20676802.
61. Horvath G, Mark L, Brubel R, Szakaly P, Racz B, Kiss P, **Tamas A**, Helyes Z, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Furjes G, Nemeth J, Reglodi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide display increased sensitivity to renal oxidative stress in vitro. *Neurosci Lett*. 2010 Jan 18;469(1): 70-4. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.046. Epub 2009 Nov 22. PMID: 19932736.

62. Horvath G, Racz B, Reglodi D, Kovacs K, Kiss P, Gallyas F Jr, Bognar Z, Szabo A, Magyarlaki T, Laszlo E, Lubics A, **Tamas A**, Toth G, Szakaly P. Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci*. 2010 Nov;42(3): 411-8. doi: 10.1007/s12031-010-9342-0. Epub 2010 Mar 16. PMID: 20229361.
63. Horvath G, Reglodi D, Brubel R, Halasz M, Barakonyi A, **Tamas A**, Fabian E, Oppel B, Toth G, Cohen M, Szereday L. Investigation of the possible functions of PACAP in human trophoblast cells. *J Mol Neurosci*. 2014 Nov;54(3): 320-30. doi: 10.1007/s12031-014-0337-0. Epub 2014 May 30. PMID: 24874580.
64. Horvath G, Reglődi D, Farkas J, Vadasz G, Mammel B, Kvarik T, Bodzai G, Kiss-Illes B, Farkas D, Matkovits A, Manavalan S, Gaszner B, **Tamas A**, Kiss P. Perinatal positive and negative influences on the early neurobehavioral reflex and motor development. *Adv Neurobiol*. 2015;10: 149-67. doi: 10.1007/978-1-4939-1372-5_8. PMID: 25287540.
65. Juhász T, Helgadottir SL, **Tamás A**, Reglődi D, Zákány R. PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides*. 2015 Apr;66: 51-7. doi: 10.1016/j.peptides.2015.02.001. Epub 2015 Feb 19. PMID: 25701761.
66. Juhász T, Matta C, Katona É, Somogyi C, Takács R, Gergely P, Csernoch L, Panyi G, Tóth G, Reglődi D, **Tamás A**, Zákány R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) signalling exerts chondrogenesis promoting and protecting effects: implication of calcineurin as a downstream target. *PLoS One*. 2014 Mar 18;9(3): e91541. doi: 10.1371/journal.pone.0091541. PMID: 24643018; PMCID: PMC3958376. (a)
67. Juhász T, Matta C, Katona É, Somogyi C, Takács R, Hajdú T, Helgadottir SL, Fodor J, Csernoch L, Tóth G, Bakó É, Reglődi D, **Tamás A**, Zákány R. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) signalling enhances osteogenesis in UMR-106 cell line. *J Mol Neurosci*. 2014 Nov;54(3): 555-73. doi: 10.1007/s12031-014-0389-1. Epub 2014 Aug 12. PMID: 25112418. (b)
68. Kasica N, Podlasz P, Sundvik M, **Tamas A**, Reglodi D, Kaleczyc J. Protective Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Against Oxidative Stress in Zebrafish Hair Cells. *Neurotox Res*. 2016 Nov;30(4): 633-647. doi: 10.1007/s12640-016-9659-8. Epub 2016 Aug 24. PMID: 27557978; PMCID: PMC5047952.
69. Kiss P, Vadasz G, Kiss-Illes B, Horvath G, **Tamas A**, Reglodi D, Koppan M. Environmental enrichment decreases asphyxia-induced neurobehavioral developmental delay in neonatal rats. *Int J Mol Sci*. 2013 Nov 13;14(11): 22258-73. doi: 10.3390/ijms141122258. PMID: 24232451; PMCID: PMC3856064.
70. Koppan M, Varnagy A, Reglodi D, Brubel R, Nemeth J, **Tamas A**, Mark L, Bodis J. Correlation between oocyte number and follicular fluid concentration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in women after superovulation treatment. *J Mol Neurosci*. 2012 Nov;48(3): 617-22. doi: 10.1007/s12031-012-9743-3. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22415357.

71. Kovács-Valasek A, Szabadfi K, Dénes V, Szalontai B, **Tamás A**, Kiss P, Szabó A, Setalo G Jr, Reglődi D, Gábrriel R. Accelerated retinal aging in PACAP knock-out mice. *Neuroscience*. 2017 Apr 21;348: 1-10. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.02.003. Epub 2017 Feb 13. PMID: 28215987.
72. Maasz G, Pirger Z, Reglodi D, Petrovics D, Schmidt J, Kiss P, Rivnyak A, Hashimoto H, Avar P, Jambor E, **Tamas A**, Gaszner B, Mark L. Comparative protein composition of the brains of PACAP-deficient mice using mass spectrometry-based proteomic analysis. *J Mol Neurosci*. 2014 Nov;54(3): 310-9. doi: 10.1007/s12031-014-0264-0. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24643519.
73. Nemeth J, Jakab B, Jozsa R, Hollosy T, **Tamas A**, Lubics A, Lengvari I, Kiss P, Oberitter Zs, Horvath B, Szilvassy Z, Reglodi D (2007) PACAP-27 radioimmunoassay: Description and application of a novel method. *J Radioanal Nucl Chem*. 2007; 273: 327-332. doi: 10.1007/s10967-007-6862-3
74. Pohóczky K, **Tamás A**, Reglődi D, Kemény Á, Helyes Z, Czeglédi L. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide concentrations in the sheep mammary gland, milk, and in the lamb blood plasma after suckling. *Physiol Int*. 2020 Mar;107(1): 92-105. doi: 10.1556/2060.2020.00006. PMID: 32491290.
75. Rác B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, **Tamás A**, Józsa R, Lubics A, Kiss P, Roth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglodi D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol*. 2007 Aug-Sep;153(1-3): 115-23. doi: 10.1016/j.ygcen.2006.12.006. Epub 2006 Dec 27. PMID: 17270184.
76. Rác B, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, **Tamás A**, Szántó Z, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Roth E, Reglodi D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul Pept*. 2008 Jan 10;145(1-3): 105-15. doi: 10.1016/j.regpep.2007.09.015. Epub 2007 Sep 18. PMID: 17981349.
77. Reglodi D, Atlasz T, Szabo E, Jungling A, **Tamas A**, Juhasz T, Fulop BD, Bardosi A. PACAP deficiency as a model of aging. *Geroscience*. 2018 Dec;40(5-6): 437-452. doi: 10.1007/s11357-018-0045-8. Epub 2018 Oct 22. PMID: 30345481; PMCID: PMC6294727.
78. Reglodi D, **Tamas A**, Koppan M, Szogyi D, Welke L. Role of PACAP in Female Fertility and Reproduction at Gonadal Level - Recent Advances. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012 Dec 11;3: 155. doi: 10.3389/fendo.2012.00155. PMID: 23248616; PMCID: PMC3518703.
79. Reglodi D, **Tamas A**, Koppan M, Szogyi D, Welke L. Role of PACAP in Female Fertility and Reproduction at Gonadal Level - Recent Advances. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012 Dec 11;3:155. doi: 10.3389/fendo.2012.00155. PMID: 23248616; PMCID: PMC3518703.
80. Reglodi D, Cseh S, Somoskoi B, Fulop BD, Szentleky E, Szegezcki V, Kovacs A, Varga A, Kiss P, Hashimoto H, **Tamas A**, Bardosi A, Manavalan S, Bako E, Zakany

- R, Juhasz T. Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient mice. *Reproduction*. 2018 Feb;155(2): 129-139. doi: 10.1530/REP-17-0470. Epub 2017 Nov 3. PMID: 29101268.
81. Reglodi D, Jungling A, Longuespée R, Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann M, Juhasz T, Bardosi S, **Tamas A**, Fulop BD, Kovacs K, Nagy Z, Sparks J, Miseta A, Mazzucchelli G, Hashimoto H, Bardosi A. Accelerated pre-senile systemic amyloidosis in PACAP knockout mice - a protective role of PACAP in age-related degenerative processes. *J Pathol*. 2018 Aug;245(4): 478-490. doi: 10.1002/path.5100. Epub 2018 Jul 4. PMID: 29774542; PMCID: PMC6055756.
 82. Reglodi D, Kiss P, Horvath G, Lubics A, Laszlo E, **Tamas A**, Racz B, Szakaly P. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the urinary system, with special emphasis on its protective effects in the kidney. *Neuropeptides*. 2012 Apr;46(2): 61-70. doi: 10.1016/j.npep.2011.05.001. Epub 2011 May 31. PMID: 21621841.
 83. Reglodi D, Renaud J, **Tamas A**, Tizabi Y, Socías SB, Del-Bel E, Raisman-Vozari R. Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Prog Neurobiol*. 2017 Aug;155: 120-148. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.10.004. Epub 2015 Nov 2. PMID: 26542398.
 84. Reglodi D, **Tamas A**, Jungling A, Vaczy A, Rivnyak A, Fulop BD, Szabo E, Lubics A, Atlasz T. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide against neurotoxic agents. *Neurotoxicology*. 2018 May;66: 185-194. doi: 10.1016/j.neuro.2018.03.010. Epub 2018 Mar 28. PMID: 29604313.
 85. Solymár M, Ivic, I, Balaskó M, Fülöp BD, Tóth G, **Tamás A**, Reman G, Koller A, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates vascular dysfunction induced by hyperglycaemia. *Diabetes Vasc Dis Res*. 2018; 15(4): 277-285. doi: 10.1177/1479164118757922. PMID: 29466879.
 86. Somoskői B, Török D, Reglődi D, **Tamás A**, Fülöp BD, Cseh S. Possible effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on early embryo implantation marker HB-EGF in mouse. *Reprod Biol*. 2020 Mar;20(1): 9-13. doi: 10.1016/j.repbio.2020.01.005. Epub 2020 Jan 18. PMID: 31964586.
 87. Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Danyadi B, **Tamas A**, Helyes Z, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Toth G, Gabriel R, Reglodi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotox Res*. 2012 Jan;21(1): 41-8. doi: 10.1007/s12640-011-9254-y. Epub 2011 Jun 30. PMID: 21717232.
 88. Szabadfi K, Reglődi D, Szabó A, Szalontai B, Valasek A, Setalo Jr G, Kiss P, **Tamás A**, Wilhelm M, Gabriel R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, a potential therapeutic agent for diabetic retinopathy in rats: focus on the vertical information processing pathway. *Neurotox Res*. 2016; 29(3): 432-446. doi: 10.1007/s12640-015-9593-1. PMID: 26739825.
 89. Szakaly P, Kiss P, Lubics A, Magyarlaki T, **Tamas A**, Racz B, Lengvari I, Toth G, Reglodi D. Effects of PACAP on survival and renal morphology in rats

- subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci.* 2008 Nov;36(1-3): 89-96. doi: 10.1007/s12031-008-9064-8. Epub 2008 May 14. PMID: 18478450.
90. Szakaly P, Laszlo E, Kovacs K, Racz B, Horvath G, Ferencz A, Lubics A, Kiss P, **Tamas A**, Brubel R, Oppel B, Baba A, Hashimoto H, Farkas J, Matkovits A, Magyarlaki T, Helyes Z, Reglodi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides.* 2011 Apr;45(2): 113-21. doi: 10.1016/j.npep.2010.12.003. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21211837.
 91. Szegezcki V, Bauer B, Jüngling A, Fülöp BD, Vágó J, Perényi H, Tarantini S, **Tamás A**, Zákány R, Reglődi D, Juhász T. Age-related alterations of articular cartilage in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene-deficient mice. *Geroscience.* 2019 Dec;41(6): 775-793. doi: 10.1007/s11357-019-00097-9. Epub 2019 Oct 26. PMID: 31655957; PMCID: PMC6925077.
 92. Toth D, Szabo E, **Tamas A**, Juhasz T, Horvath G, Fabian E, Oppel B, Szabo D, Maugeri G, D'Amico AG, D'Agata V, Vicena V, Reglodi D. Protective Effects of PACAP in Peripheral Organs. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Jul 14;11: 377. doi: 10.3389/fendo.2020.00377. PMID: 32765418; PMCID: PMC7381171.
 93. Toth D, Veszpremi B, Koppan M, **Tamas A**, Szogyi D, Brubel R, Nemeth J, Shams M, Reglodi D. Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human amniotic fluid samples. *Reprod Biol.* 2020 Dec;20(4): 491-495. doi: 10.1016/j.repbio.2020.07.013. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32859528.
 94. Vámos Z, Ivic I, Cséplő P, Tóth G, **Tamás A**, Reglődi D, Koller A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) induces relaxations of peripheral and cerebral arteries, which are differentially impaired by aging. *J Mol Neurosci.* 2014; 54(3): 535-542. doi: 10.1007/s12031-014-0349-9. PMID: 24939249.
- További könyvfejezetek
95. Atlasz T, Vaczy A, Werling D, Kiss P, **Tamas A**, Kovacs K, Fabian E, Kvarik T, Mammel B, Danyadi B, Lokos E, Reglodi D. Protective effects of PACAP in the retina. In: Reglodi D, **Tamas A**. (eds) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-PACAP. Springer, Cham; 2016; pp. 501–529. doi: 10.1007/978-3-319-35135-3_30
 96. Horvath G, Illes A, Heimesaat MM, Bardosi A, Bardosi S, **Tamas A**, Fulop BD, Oppel B, Nemeth J, Ferencz A, Reglodi D. Protective Intestinal Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide. In: Reglodi D, **Tamas A**. (eds) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-PACAP. Springer, Cham; 2016; pp. 271–288. doi: 10.1007/978-3-319-35135-3_17
- Diszkuisszióban szereplő Ph.D. előtti társszerzős közlemények
97. Gasz B, Rác B, Roth E, Borsiczky B, Ferencz A, **Tamás A**, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Tóth G, Lengvári I, Reglodi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides.* 2006 Jan;27(1): 87-94. doi: 10.1016/j.peptides.2005.06.022. Epub 2005 Aug 10. PMID: 16095757.

98. Jakab B, Reglodi D, Józsa R, Hollósy T, **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Oroszi G, Szilvássy Z, Szolcsányi J, Németh J. Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Methods*. 2004 Oct 29;61(1-2): 189-98. doi: 10.1016/j.jbbm.2004.03.002. PMID: 15560935.
99. Németh J, Jakab B, Reglodi D, Lubics A, Józsa R, Hollósy T, **Tamás A**, Lengvári I, Görös T, Szolcsányi J. Comparative distribution of VIP in the central nervous system of various species measured by a new radioimmunoassay. *Regul Pept*. 2002 Nov 15;109(1-3): 3-7. doi: 10.1016/s0167-0115(02)00165-9. PMID: 12409208.
100. Reglodi D, Kiss P, **Tamás A**, Lengvári I. The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. *Behav Brain Res*. 2003 Mar 18;140(1-2): 131-9. doi: 10.1016/s0166-4328(02)00289-9. PMID: 12644286.
101. Reglodi D, Lubics A, **Tamás A**, Szalontay L, Lengvári I. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2004 May 5;151(1-2): 303-12. doi: 10.1016/j.bbr.2003.09.007. PMID: 15084446.
102. Reglodi D, **Tamás A**, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I. Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul Pept*. 2004 Dec 15;123(1-3): 85-94. doi: 10.1016/j.regpep.2004.05.016. PMID: 15518897.
103. Reglodi D, **Tamás A**, Lengvári I, Toth G, Szalontay L, Lubics A. Comparative study of the effects of PACAP in young, aging, and castrated males in a rat model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Jul;1070: 518-24. doi: 10.1196/annals.1317.072. PMID: 16888218.
104. Reglodi D, **Tamás A**, Somogyvári-Vigh A. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide in Animal Models of Neurodegenerative Disorders - Implications for Huntington and Parkinson's Diseases." *Letters in Drug Design & Discovery* 2005; 2(4): 311–315. doi: 10.2174/1570180054038440.

A közleményeinek kumulatív impakt faktora: 528,058

VII. TUZOMÁNYMETRIAI TÁBLÁZAT

Tamás Andrea tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály

(2024.01.08)

Tudományos és oktatási közlemények	Számá		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összesen
I. Folyóiratcikk ²	194	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	165	2295	4517
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	5	18	38
szakcikk, magyar nyelvű	---	2	0	2
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	0	0	0
összefoglaló közlemény	---	20	466	764
rövid közlemény	---	2	18	39
II. Könyv	1	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	11	---	---	---
idegen nyelvű	---	8	23	73
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	3	0	0
IV. Konferenciaközlemény ⁴	0	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	3	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV)	---	203	2820	5433
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV)	206	---	2820	5433
V. További tudományos művek	30	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	30	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
Olthalmak (szabadalmak)	---	0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok ⁵	14	---	8	20
Összes hivatkozás ¹	---	---	2828	5453
Hirsch index ⁶	40	---	---	---
g index ⁶	58	---	---	---

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	10	343
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	27	660
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2006) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	160	3883
Az utolsó 10 év (2014 - 2024) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	89	1655
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	196	3,59%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	538 + 0
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

Megjegyzések:

¹ a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok

² lektorált, tudományos folyóiratban

³ a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja

⁴ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

⁵ nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

⁶ a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója

⁷ közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek az értekezésem alapját képező kutatómunkában, támogattak és utat mutattak pályafutásom során és jelenleg is mellettem állnak.

Mindenekelőtt köszönöm mentoromnak Dr. Reglődi Dórának, a PTE ÁOK Anatómiai Intézet igazgatójának, aki több mint 20 éve, Tudományos Diákkörös hallgatóként ismertetett meg a tudomány csodálatos világával, és aki azóta is a szakmai munkám támogatása mellett a magánéletem szeretetteljes fontos pillérét képezi. Elhivatottsága, lelkesedése, szakmai tudása, önzetlen, másokra mindig nagy figyelmet fordító személyisége példaképként szolgál számomra. Szeretettel gondolok Dr. Lengvári Istvánra, aki az Anatómiai Intézetbe invitált demonstrátorként, és ezzel lehetőségem nyílt az anatómia oktatás megismerésére, és köszönöm Dr. Csernus Valérnak, az Anatómiai Intézet akkori igazgatójának, hogy állást ajánlott az intézetben, ami azóta is életem fontos részét képezi. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Lubics Andreának, Dr. Horváth-Opper Gabriellának, Dr. Rácz Boglárkának, Dr. Atlasz Tamásnak és Dr. Kiss Péternek, akik a PACAP munkacsoport legrégebbi tagjaiként mindig mellettem álltak és segítettek munkámat. Az Intézetből szeretném még megköszönni Dr. Gaszner Balázsnak azt, hogy mindig szívesen segít immunhisztológiai vizsgálatainkkal kapcsolatos kérdéseink megválaszolásában. A klinikai vizsgálatokkal kapcsolatos laboratóriumi munka koordinálását Nagy Enikőnek köszönöm, aki mellett a szövettani és molekuláris biológiai feladatok elvégzésében Dittrich Erzsébet, Godáné Brumán Beatrix és Mertz Tünde segítettek, valamint Kiss Mária és Frank Andrea segítségével is nélkülözhetetlen az adminisztratív feladatok ellátásában.

Hálás köszönettel tartozom azoknak a jelenlegi vagy már végzett Ph.D. hallgatóimnak Dr. Csanaky Katalinnak, Dr. Bánki Eszternek, Dr. Brubel Rékának, Dr. Németh Adriennek, Dr. Sándor Balázsnak, Dr. Fülöp Balázs Dánielnek, Dr. Szabó Dórának, Dr. Jüngling Adélnak, Dr. Tóth Dénesnek, Dr. Tóth Tündének és Dr. Pham Dánielnek, akik szorgalmas és sokszor önfeláldozó munkája nélkül az értekezés nem született volna meg. Köszönöm a jelenlegi és már végzett Tudományos Diákkörös hallgatóimnak, hogy kiemelkedő eredményeikkel igazolják a tudományos tehetséggondozás fontosságát, és biztosítják a jövő tudományos generációját. Köszönettel tartozom az Anatómiai Intézetünk minden további munkatársának, akik segítenek a barátságos és támogató légkör megteremtésében.

Szeretném megköszönni azon kollégáim segítségét is, akik kollaborációs munka keretében vesznek részt kutatásainkban. Kiemelten szeretném megköszönni az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet munkatársának, Dr. Polgár Beátának az ELISA mérések szakmai felügyeletét, amit mindig nagy szorgalommal és szakmai precizitással végez.

A RIA és Luminex mérések lebonyolításáért és szakmai felügyeletéért szeretnék köszönetet mondani a PTE Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet korábbi és jelenlegi munkatársainak, Dr. Németh Józsefnek, Bagoly Teréznek, Dr. Pohóczky Krisztinának, Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Börzsei Ritának és Dr. Helyes Zsuzsannának, akinek szakmai elhivatottsága szintén példaértékű számomra. A Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetből köszönöm Dr. Márk Lászlónak a MALDI méréseket és

Dr. Kovács Krisztinának a molekuláris biológiai vizsgálatok lebonyolítását, a Szegedi Tudományegyetemről Dr. Tóth Gábornak a PACAP szintetizálását.

A Raman mérések szakmai irányításáért Dr. Fintor Krisztiánnak tartozom köszönettel, aki a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Ásványtani, Geokémiai és Kőzettani Tanszékének munkatársa. A Parkinson-kórral kapcsolatos kutatásainkban való segítségét köszönöm Dr. Maász Gábornak és Dr. Pirger Zsoltnek a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet korábbi és jelenlegi munkatásainak. Immunhisztológiai és molekuláris biológiai vizsgálatokban nyújtott segítségét köszönöm a Debreceni Egyetem anatómusainak, Dr. Juhász Tamásnak és Dr. Felszegy Szabolcsnak, valamint a Debreceni Egyetem egy másik munkatársának, Dr. Czeglédi Leventének, aki a háziállatokon végzett laktációs kutatásainkat irányította. Myocardialis infarctussal kapcsolatos kollaborációért szeretnék köszönetet mondani Dr. Ferdinandy Péternek és munkacsoportjának, akik a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetének munkatársai. A hallásvizsgálatokban nyújtott segítséget szintén a Semmelweis Egyetemről Dr. Zelles Tibornak és Humli Viktóriának köszönöm. A precíz statisztikai elemzésekben Dr. Gyenesei Attila és Herczeg Róbert, a micro-CT vizsgálatokban Kiss Tamás, a Szentágotthai János Kutatóközpont munkatársai segítettek.

Ph.D. hallgató koromban kollaborációs munka keretében lehetőségem nyílt dolgozni Dr. Büki András, Dr. Gábel Róbert és Dr. Lénárd László munkacsoportjával, amely munka során szerzett tapasztalataim máig hasznosak számomra.

Hálás vagyok azért, hogy kutatómunkám során lehetőségem nyílt számos klinikai kollaboráció létrehozására, amely során kiemelkedő szaktudású klinikusokat ismerhettem meg, akik elhivatott és professzionális klinikai munkájuk mellett időt szakítottak a vizsgálatainkhoz szükséges minták gyűjtésére és szakmai tanácsokkal támogatják munkánkat. A mintagyűjtésben résztvevő kollégák közül szeretném kiemelni a Pécsi Tudományegyetem Neurológiai és Idegsebészeti Klinikájáról Dr. Kovács Norbertet, Dr. Pál Endrét és Dr. Balás Istvánt, a Szívgyógyászati Klinikáról Dr. Sárszegi Zsoltot és Dr. Kónyi Attilát, az Urológiai Klinikáról Dr. Jávorházy Andrást, Dr. Sarlós Pétert, Dr. Bányai Dánielt, az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézetből Dr. Csontos Csabát, Dr. Loibl Csabát, Dr. Rozanovic Martint, Dr. Rendeki Szilárdot és Dr. Bogár Lajost, a Sebészeti Klinikáról Dr. Szántó Zalánt és Dr. Zapf Istvánt, a Pathológiai Intézetből Dr. Semjén Dávidot, a Hematológiai Tanszékről Dr. Alizadeh Hussaint és Dr. Csalódi Renátát, a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról Dr. Ertl Tibort, Dr. Gyarmati Juditot, Dr. Varga Tamást, Dr. Koppán Miklóst, Dr. Várnagy Ákost, Dr. Bay Csabát és Dr. Fónai Fruzsínát. Az emberi szívizomminták gyűjtését a varsói Cardinal Stefan Wyszyński Institute of Cardiology, Department of Heart Failure and Transplantology osztály munkatársai végezték Przemyslaw Leszek vezetésével. A várandós és szoptatós kismamák mintáinak gyűjtésében Dr. Szauer Edit és Tarcai Ibolya védőnő munkája nélkülözhetetlen volt.

A dolgozat nyelvi lektorálásában, szerkesztésében és tördelésében Hegedüs Dániel, Dr. Németh Timea és Czulák Szilvia segítségét köszönöm. A dolgozatban szereplő ábrák grafikáját egyedülálló rajzkészségével Dr. Tóth Tünde készítette, amit ezúton is köszönök.

Értekezésem megírása és az idáig vezető munka biztos és szeretetteljes háttér nélkül nem valósulhatott volna meg. Köszönöm szépen családomnak, hogy mindig mellettem

állnak, barátaimnak, hogy csüggedt pillanatimban is felvidítanak. Külön köszönöm Éva barátnőmnek, hogy lelkemnek oly sokszor támaszt ad. Szavakkal nem kifejezhető az a hála és köszönet, amivel férjemnek Dr. Szántó Zalánnak és gyermekeinknek Dórának és Donátnak tartozom a biztos, kiegyensúlyozott és boldog családi háttér megteremtéséért, és ami szüleinket illeti, példamutató és odaadó gondoskodásukért. Értekezésemet Szántó János szeretett emlékének is ajánlom.

IX. TÁMOGATÓK

Tudományos munkámat a következő támogatások segítségével végeztem:

Vezető kutatóként elnyert támogatások és ösztöndíjak

NKFIH F67830, K119759; Akira Arimura Foundation Grant; FIKP 2019; PTE ÁOK Kutatási Alap pályázat KA-2019-30; TKP2021-EGA-16, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (2009-2012) (2015-2019); Konvergencia-Magyary Zoltán Posztdoktori Ösztöndíj-2012 (2013-2014); PTE ÁOK Ifjú-Kutatói Romhányi-ösztöndíj (2014-2015); Új Nemzeti kiválóság program ösztöndíj (2016); Új Nemzeti kiválóság program Bolyai + Ösztöndíj (2018).

Társkutatóként elnyert pályázatok

OTKA K72592, 104984, 115874, 129190; Magyar Tudományos Akadémia „Lendület” Program 2011-2016; Richter Kutatási támogatás 2011, 2012; Nemzeti Agykutató Program: NAP-A-III/5. 2014-2017, NAP2017-1.2.1-NKP-2017-00002, NAP 3.0; 20765/3/2018/FEKUTSTRAT; ELKH-TKI-14016 Magyar Tudományos Akadémia PACAP Kutatócsoport; GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS”; EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-15 2017-00008, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009; TÁMOP 4.2.1. B-10/2/KONV-2010-002, TÁMOP 4.2.2. B-10/1-2010-0029, TÁMOP 4.2.2. A-11/1/KONV-2012-0024.