



Prof. Dr. Alpár Alán  
egyetemi tanár  
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet  
Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2025. március 4.

*Válaszok Professor Alpár Alán MTA Doktori Értekezés bírálatában megfogalmazott kérdésekre*

*Tisztelt Professor Úr!*

Mindenekelőtt szeretném megköszönni dolgozatom bírálatára fordított munkáját! Köszönöm építő kritikai megjegyzéseit és kérdéseit, melyek számos új kutatási hipotézis és cél megfogalmazásában is nagy segítségünkre lesznek a jövőben.

Professor Úr kérdéseire adott részletes válaszaim az alábbiakban olvashatók:

*Bevezető*

*17. oldal: kéttucat irodalmi hivatkozást illeszteni egyetlen mondat után nem informatív.*

Egyetérték a Bíráló megjegyzésével, a jövőben törekedni fogok a hivatkozások számának redukálására egy mondaton belül.

*24. oldal: a kalcium-kötő fehérjék, különösen is a kalcium-puffer fehérjék emelkedett kalcium szinttel való összefüggése, védelmi szerepe rendkívül kérdéses; több ipari támogatással készült (pl. Bayer) kutatás feneklett meg, melyek nagy reményt fűztek ezen pufferfehérjék szerepéhez, célfehérjeként való alkalmazásához (egyes tanulmányok egyenesen a pufferfehérjét tartalmazó idegsejtek nagyobb sérülékenységét írták le). Mire gondol, amikor Hackney 2005-ben szerzett munkáját idézi, milyen bizonyítékokat ismertet?*

Hackney és munkacsoportja (2005) patkány cochlearis szőrsejtekben vizsgálta a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjék koncentrációját (calbindin, calretinin és parvalbumin) abból a célból, hogy feltérképezzék azon fehérjék szerepét a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli folyamatok szabályozásában, melyek fontos szerepet töltenek be a szőrsejtek transzdukciós és szinaptikus folyamatainak szabályozásában. Kutatásaik során azt találták, hogy a cochlearis érési folyamatok során a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjék mennyisége csökken a belső szőrsejtekben, ezzel szemben a külső szőrsejtekben magasabb koncentrációkat detektáltak. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli folyamatoknak eltérő szerepe lehet a két szőrsejtben, ami tükrözi az ingerfeldolgozásban betöltött eltérő funkciójukat. Míg a külső szőrsejtek az ingerek erősítésében, addig a belső szőrsejtek az erősített ingerek gyors transzmissziójában játszanak szerepet. Feltételezésük szerint a külső szőrsejtekben detektálható, a vázizomzathoz hasonlóan magas  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje koncentráció védelmet nyújthat a küszöbértéket meghaladó zajterhelés miatt kialakuló, fokozott  $\text{Ca}^{2+}$ -terhelés káros hatásaival szemben. Ezt a megállapítást Fridberger és munkatársainak (1998) korábbi vizsgálatára alapozták, akik tengerimalacból izolált halántékcsontról preparátum segítségével jellemezték a cochlearis elektromos válaszokat akusztikus stimuláció során. Azokban az esetekben, ahol a zajterhelés a cochlearis válaszok csökkenését eredményezte, a külső szőrsejtek citoplazmájában detektálható  $\text{Ca}^{2+}$  mennyisége szignifikáns emelkedést mutatott, ami erőteljes kontrakcióval járt. Ebből arra következtettek, hogy a zajterhelés során jelentkező fokozott  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlásnak fontos szerepe lehet

a funkcióvesztés kialakulásában. Eredményeik arra utalnak, hogy a külső szőrsejtekben nagy mennyiségben detektálható  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjék szerepet játszhatnak a károsodás elleni védekezésben.

*Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R. The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. J Neurosci. 2005 Aug 24;25(34): 7867-75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1196-05.2005. PMID: 16120789; PMCID: PMC6725244.*

*Fridberger A, Flock A, Ulfendahl M, Flock B. Acoustic overstimulation increases outer hair cell  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jun 9;95(12):7127-32. doi: 10.1073/pnas.95.12.7127. PMID: 9618550; PMCID: PMC22763.*

**27. oldal: „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.” Ennek mechanizmusát bizonyították, vagy csak feltételezés?**

Nonaka és munkatársai (2013) kimutatták, hogy patkány első moláris fogának luxációs sérülését követően a ligamentum parodontaléban szignifikánsan emelkedik a PACAP immunpozitív idegrostok mennyisége az intakt fogakhoz képest. Emellett vizsgálták a regenerációs folyamatokban fontos szerepet betöltő sejtek közül az osteoclastokat és osteoblastokat is. Az osteoclastok jelöléséhez TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) ellenes antitestet, az osteoblastok jelölésére ALP (alkaline phosphatase) festést alkalmaztak. Mindkét sejtípus fokozott PAC1 receptor expressziót mutatott a luxációt követően. Kettős immunhisztokémiai jelöléssel bizonyították a PACAP immunpozitív rostok és a PAC1 receptor pozitív sejtek közötti kapcsolatot. Ezek alapján feltételezték a szerzők, hogy az immunmoduláló, neurotrofikus és neuroprotektív hatással rendelkező PACAP szerepet játszhat a luxációs során kialakuló immunológiai és regenerációs folyamatok szabályozásában, de a pontos hatásmechanizmusra még nem találtak bizonyítékot.

*Nonaka S, Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Takano-Yamamoto T. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and PAC1 in the periodontal ligament after tooth luxation. Cell Mol Neurobiol. 2013 Oct;33(7):885-92. doi: 10.1007/s10571-013-9953-4. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23801193.*

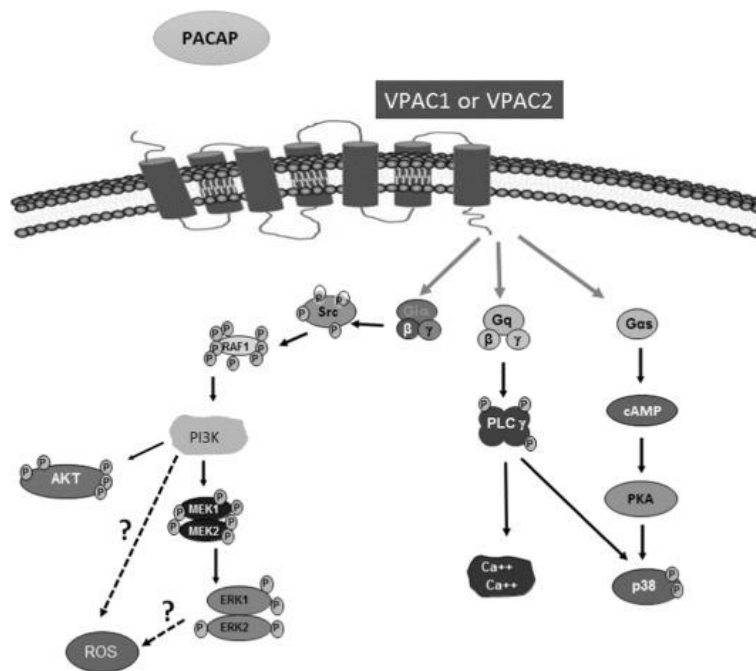
**29. oldal: „A PACAP mindhárom receptorát, így a VPAC1, VPAC2 és a PAC1 receptort is kimutatták emberben normál és tumoros emlőmirigy mintákban (García-Fernández et al. 2004; Moody és Gozes 2007), amely azt feltételezi, hogy a PACAP-nak az emlőmirigy fiziológiás működésének szabályozása mellett fontos szerepe lehet a tumorgenesisben is.” Nem látok ok-okozati viszonyt. Milyen bizonyítékot, mechanizmust mutattak arra nézve, hogy a PACAP daganatképző hatású lehet?**

A PACAP antiapoptotikus hatásának hátterében álló különböző molekuláris biológiai útvonalakat a dolgozat bevezetőjében röviden ismertettem. A PACAP a proapoptotikus útvonalak gátlásával és az antiapoptotikus útvonalak serkentésével képes az egészséges sejtek túlélését segíteni különböző károsító tényezőkkel szemben. Eddigi ismereteink szerint az egészséges sejteken a PACAP-nak nincs daganatképző hatása, de különböző tumorsejtekből készült sejtenyészetekben is hasonló jelátviteli útvonalakat aktivál, ami a sejtek típusától függően sejtproliferációt serkentő vagy gátló hatással is bírhat.

Számos korábbi vizsgálat és in vitro sejt kultúra-modell bizonyította a PACAP mindhárom receptorának jelenlétét és biológiai szerepét emlőtumoros mintákban, melyek alátámasztják a PAC1/VPAC útvonalak aktivációjának kiemelkedő szerepét az emlőrák növekedésében. Különböző emlőtumoros sejt vonalakban kimutatták, hogy a VIP és a PACAP aktiválja az adenilát-cikláz, növeli a VEGF (vascularis endothelialis növekedési faktor) expresszióját és szekrécióját, valamint

serkenti a tumor növekedést. Emellett a különböző sejtekre kifejtett hatásuk gátolható PAC1 és VPAC1 receptor antagonisták segítségével (Leyton et al. 1999; Moody et al. 2001; 2003; 2013; 2016; García-Fernández et al. 2005). Továbbá, a VPAC-inhibitor (SN)VIPhyb hozzáadása különböző emlőrák sejtvonalakhoz, erősítette a taxol proliferációgátló képességét (Moody et al. 2001). Az emlőtumor fokozott VPAC receptor expresszióját diagnosztikus képalkotó módszerek fejlesztéséhez és célzott terápiás módszerek kidolgozására is alkalmazzák. Zhang és munkatársai emlőtumor PET vizsgálat során <sup>64</sup>Cu-val jelöl VIP és a PACAP 4 szintetikus analógjait alkalmazták, amelyek nagy affinitással rendelkeznek a VPAC és a PAC1 receptorokhoz (Zhang et al. 2007).

A PACAP emlőtumor sejtekre kifejtett hatásának molekuláris biológiai hátterét MCF-7 emlőtumor sejtvonalon vizsgálták Zibara és munkatársai (2018). Kimutatták, hogy a sejtvonalon a három PACAP receptor közül csak a VPAC1 és VPAC2 receptorok expresszálódnak. Eredményeik azt mutatták, hogy a PACAP kezelés növelte a p-STAT-1 (foszforilált STAT), p-Src (foszforilált Src), p-Raf (foszforilált Raf), p-AKT (foszforilált protein kináz B), p-ERK (foszforilált extracelluláris szignálregulált kináz) és p-p38 (foszforilált p38) szintjét a G-proteinhez kötött útvonalakon keresztül. A VPAC receptorok stimulálása több másodlagos jelátviteli útvonalat is aktivált, mint például a PI3K (foszfatidil-inozitol-3-kináz), a cAMP (ciklikus adenosin-monofoszfát) vagy a PLC (foszfolipáz C). Kimutatták, hogy a p-ERK és a p-AKT aktiválása a PI3K útvonalon át a VPAC1 receptoron keresztül valósul meg, valamint bebizonyították, hogy MCF-7 emlőcarcinoma sejtekben a PACAP által indukált PI3K/AKT foszforiláció FPR2 (formil peptid receptor 2) receptorokon keresztül is megvalósulhat. Ezek a másodlagos jelátviteli útvonalak (cAMP és a PLC), a VPAC2 receptorokon keresztül a p-p38 növekedését is serkentik a MAPK (mitogén aktivált protein kináz)-útvonalon keresztül, melyet az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> felszabadulás szabályoz. A munkacsoport azt is leírta, hogy az MCF-7 sejtek PACAP-pal történő stimulálása a NOX2-n (NADPH-oxidáz) keresztül a ROS (reaktív oxigén gyökök) szint gyors és erőteljes növekedését okozta, ami a p-AKT és a p-ERK expressziójával egyidejűleg történik (1. ábra). Végül azt is kimutatták, hogy a PACAP receptorok aktivitása proapoptotikus útvonalakat is stimulál a Bax (Bcl-2 asszociált apoptózis regulátor) serkentésével és a Bcl-2 (B-sejtes lymphoma protein 2) gátlásával. Mindezen eredmények azt bizonyítják, hogy a PACAP receptorok stimulálása számos olyan jelátviteli útvonalat aktivál, melyek pro- és antiapoptotikus útvonalakat is befolyásolhatnak, így a jelátviteli útvonalak PACAP-függő szabályozásának pontosabb megértése nagy jelentőséggel bír az emlőtumor kezelése során alkalmazható, új terápiás lehetőségek kidolgozása során.



1. ábra A PACAP hatásának molekuláris biológiai feltérképezése MCF-7 sejteken (Zibara et al. 2018). AKT (foszforilált protein kináz B), ERK (foszforilált extracelluláris szignálregulált kináz), PI3K (foszfatidil-inozitol-3-kináz), cAMP (ciklikus adozin-monofoszfát), PLC (foszfolipáz C), ROS (reaktív oxigén gyökök).

García-Fernández MO, Collado B, Bodega G, Cortés J, Ruíz-Villaespesa A, Carmena MJ, Prieto JC. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide/vasoactive intestinal peptide receptors in human normal mammary gland and breast cancer tissue. *Gynecol Endocrinol.* 2005 Jun;20(6):327-33. doi: 10.1080/09513590500098240. PMID: 16019382.

Leyton J, Gozes Y, Pisegna J, Coy D, Purdom S, Casibang M, Zia F, Moody TW. PACAP(6-38) is a PACAP receptor antagonist for breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 Jul;56(2):177-86. doi: 10.1023/a:1006262611290. PMID: 10573110.

Moody TW, Chan D, Fahrenkrug J, Jensen RT. Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Curr Pharm Des.* 2003;9(6):495-509. doi: 10.2174/1381612033391621. PMID: 12570813.

Moody TW, Gozes I. Vasoactive intestinal peptide receptors: a molecular target in breast and lung cancer. *Curr Pharm Des.* 2007;13(11):1099-104. doi: 10.2174/138161207780619000. PMID: 17430173.

Moody TW, Leyton J, Chan D, Brenneman DC, Fridkin M, Gelber E, Levy A, Gozes I. VIP receptor antagonists and chemotherapeutic drugs inhibit the growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2001 Jul;68(1):55-64. doi: 10.1023/a:1017994722130. PMID: 11678309.

Moody TW, Nuche-Berenguer B, Jensen RT. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2016 Feb;23(1):38-47. doi: 10.1097/MED.0000000000000218. PMID: 26702849; PMCID: PMC4844466.

Zhang K, Aruva MR, Shanthly N, Cardi CA, Patel CA, Rattan S, Cesarone G, Wickstrom E, Thakur ML. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) receptor specific peptide analogues for PET imaging of breast cancer: In vitro/in vivo evaluation. *Regul Pept.* 2007 Dec 4;144(1-3):91-100. doi: 10.1016/j.regpep.2007.06.008. Epub 2007 Jul 6. PMID: 17727979; PMCID: PMC2587158.

Zibara K, Zeidan A, Mallah K, Kassem N, Awad A, Mazurier F, Badran B, El-Zein N. Signaling pathways activated by PACAP in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Signal.* 2018 Oct;50:37-47. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.06.009. Epub 2018 Jun 20. PMID: 29935235.

**37. oldal: Mi az oka annak, hogy a PACAP a különböző típusú rosszindulatú betegségekre eltérő módon hat (serkent vagy gátol)?**

A PAC1 receptor stimulálásával számos daganat növekedése serkenthető, beleértve a neuroendokrin, agyi, emlő, prosztatata, hasnyálmirigy, vastagbél és tüdő daganatokat, míg ezzel szemben növekedésgátló hatással van olyan központi idegrendszeri daganatokra, mint a medulloblastoma és a gliómák (Moody et al. 2016). Ezen eredmények azt bizonyítják, hogy a PACAP-nak eltérő hatásai lehetnek a különböző szövettani típusú tumorok növekedésére, ahol a különböző jelátviteli útvonalak az egészséges sejtekhez képest eltérő hatást fejthetnek ki. Vannak olyan tumorok, ahol a PACAP serkenti a tumorsejtek növekedését, más sejtvonalakon pedig gátolja a migrációt vagy proapoptotikus hatású (Germano et al. 2009; D'Amico et al. 2021; Lee et al. 2014). Az ellenkező hatások hátterében több feltételezett patomechanizmus is állhat. Számos korábbi tanulmány is bebizonyította, hogy az egyes sejtvonalak különböző receptor expressziós mintát mutatnak, amely következtében a különböző sejtvonalak aktivációja más-más biológiai hatást fejthet ki (Zibara et al. 2018). Emellett a PACAP receptorok aktiválása során más receptorok is aktiválódhatnak a közös jelátviteli útvonalakon keresztül. Monocytákön kimutatták, hogy a PACAP receptorok stimulálásával a TrkA (tropomyosin receptor kináz A) receptor is transzaktiválható (Shi et al. 2010). A G-proteinhez kapcsolt jelátviteli útvonalak, amelyek a PACAP receptorokhoz kapcsolódnak, a sejttípustól, a helytől és a külső tényezőktől függően ellentétes mechanizmusokat befolyásolhatnak, így serkenthetik a sejtek túlélését, differenciálódását, apoptózist vagy migrációját is (Cameron et al. 2007; Fila et al. 2009).

*D'Amico AG, Maugeri G, Vanella L, Pittalà V, Reglodi D, D'Agata V. Multimodal Role of PACAP in Glioblastoma. Brain Sci. 2021 Jul 28;11(8):994. doi: 10.3390/brainsci11080994. PMID: 34439613; PMCID: PMC8391398.*

*Cameron DB, Galas L, Jiang Y, Raoult E, Vaudry D, Komuro H. Cerebellar cortical-layer-specific control of neuronal migration by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Neuroscience. 2007 May 11;146(2):697-712. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.02.025. Epub 2007 Mar 23. PMID: 17383102; PMCID: PMC1951536.*

*Fila T, Trazzi S, Crochemore C, Bartesaghi R, Ciani E. *Lot1* is a key element of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/cyclic AMP pathway that negatively regulates neuronal precursor proliferation. J Biol Chem. 2009 May 29;284(22):15325-38. doi: 10.1074/jbc.M109.002329. Epub 2009 Apr 3. Erratum in: J Biol Chem. 2020 Mar 13;295(11):3746. doi: 10.1074/jbc.AAC120.013005. PMID: 19346254; PMCID: PMC2685713.*

*Germano PM, Lieu SN, Xue J, Cooke HJ, Christofi FL, Lu Y, Pisegna JR. PACAP induces signaling and stimulation of 5-hydroxytryptamine release and growth in neuroendocrine tumor cells. J Mol Neurosci. 2009 Nov;39(3):391-401. doi: 10.1007/s12031-009-9283-7. Epub 2009 Aug 23. PMID: 19701709; PMCID: PMC6736522.*

*Lee JH, Lee JY, Rho SB, Choi JS, Lee DG, An S, Oh T, Choi DC, Lee SH. PACAP inhibits tumor growth and interferes with clusterin in cervical carcinomas. FEBS Lett. 2014 Dec 20;588(24):4730-9. doi: 10.1016/j.febslet.2014.11.004. Epub 2014 Nov 15. PMID: 25451228.*

*Moody TW, Nuche-Berenguer B, Jensen RT. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2016 Feb;23(1):38-47. doi: 10.1097/MED.0000000000000218. PMID: 26702849; PMCID: PMC4844466.*

*Shi GX, Jin L, Andres DA. Src-dependent TrkA transactivation is required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38-mediated Rit activation and neuronal differentiation. Mol Biol Cell. 2010 May 1;21(9):1597-608. doi: 10.1091/mbc.e09-12-1033. Epub 2010 Mar 10. PMID: 20219970; PMCID: PMC2861617.*

*Zibara K, Zeidan A, Mallah K, Kassem N, Awad A, Mazurier F, Badran B, El-Zein N. Signaling pathways activated by PACAP in MCF-7 breast cancer cells. Cell Signal. 2018 Oct;50:37-47. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.06.009. Epub 2018 Jun 20. PMID: 29935235.*

***Célkitűzések Általában: azoknál a témaköröknél, ahol a PACAP mennyiségét méri, milyen lehetőségeket lát a terápiás beavatkozásokkal kapcsolatban; mennyiben segíti a molekuláris mechanizmusok azonosítását?***

A diszkusszió végén említést tettem arról, hogy a preklinikai vizsgálatok eredményei alapján több kórkép esetén is felmerült a PACAP kezelés klinikai alkalmazhatóságának lehetősége, így sclerosis multiplexben (Tan et al. 2011), vagy intranasalis terápia segítségével különböző neurodegeneratív kórképek, kognitív zavarok vagy stroke esetén (Solés-Tarrés et al. 2020; Cherait et al. 2021; Guo et al. 2021), valamint szemcsepp formájában retinadegeneráció kapcsán (Szabó et al. 2021). A fázis II. klinikai vizsgálatokig csak a migrénes páciensekkel kapcsolatos kutatások jutottak (Rustichelli et al. 2020; Togha et al. 2021; Dominguez-Moreno et al. 2022; Tanaka et al. 2023).

Ezen vizsgálatok alapját az képezte, hogy a PACAP tartós értágító hatásán keresztül képes fejfájást kiváltani, és ezért feltételezhető, hogy a PACAP útvonal célzott gátlása ígéretes terápiás lehetőséget jelenthet migrénben (Rubio-Beltrán et al. 2018). Több klinikai vizsgálat is indult ezzel kapcsolatban az elmúlt években. Az első vizsgálatban az AMG 301-et, egy PAC1 receptort gátló monoklonális antitestet alkalmaztak epizodikus vagy krónikus migrénben szenvedő betegeknél, de nem találtak szignifikáns különbséget a placebóval kezelt csoporthoz képest (Ashina et al. 2021; Clinical Trial NCT03238781). Egy másik vizsgálatban egy PACAP-hoz kötődő monoklonális antitestet vizsgáltak (Lu AG09222), amely megakadályozza a PACAP receptorhoz való kötődését, és kimutatták, hogy a kezelés szignifikánsan csökkentette a havi migrénes napok számát a placebóval kezelt csoporthoz képest (Lundbeck 2021; Clinical Trial NCT05133323). Végül a legújabb klinikai vizsgálatban a PAC1 receptort célzó monoklonális antitestet, a LY3451838-at vizsgálták terápiaerezisztens migrénes csoportban, azonban a végleges kísérleti eredmény még nem került publikálásra (Clinical Trial NCT04498910).

A szisztémás PACAP kezelés klinikai alkalmazhatóságának sajnos korlátja lehet az, hogy a molekula olyan széleskörű hatással rendelkezik, mint a korábban említett migrén aktiváló hatás vagy az általános antiapoptotikus hatás, amely a rosszindulatú sejtek növekedését is elősegítheti. Különböző neuropeptid-analógok vagy kémiai modifikáció segítségével azonban lehetőség nyílna specifikus, célzott terápiák kidolgozására. A PACAP glikozilálásával például növelhető a vér-agy gáton való átjutás, ami protektív hatású a Parkinson-kór modelljében és traumás agysérülésben (Apostol et al. 2022). Emellett az analógok alkalmazása a terápiás felhasználás alternatív módja lehet olyan molekulák esetében, amelyek a PACAP-hoz hasonló protektív hatással rendelkeznek, de kisebb mértékű cardiovascularis mellékhatásokat mutatnak (Lee és Seo 2014; Lamine et al. 2016).

A PACAP kezelés korábban felsorolt korlátjai miatt klinikai vizsgálataink legfontosabb célja a PACAP potenciális biomarker szerepének vizsgálata különböző akut és krónikus kórképekben. Munkánk során arra törekszünk, hogy részletesen feltérképezzük a PACAP-38 változását különböző fiziológiás és patológiás állapotokban és azonosítsuk a szignifikáns korrelációkat a klinikai gyakorlatban széles körűen alkalmazott betegség-specifikus biomarkerekkel. Fontos megjegyezni, hogy a keringő PACAP-38 szintje nem biztos, hogy önálló biomarkere lehet az egyes betegségeknek, de több, a klinikai gyakorlatban is alkalmazott markerrel egy diagnosztikai panelben kombinálva felhasználható lehet egyes betegségek korai diagnózisára és a progresszió vagy a terápiás válasz megbízható előrejelzésére. Ezek a multiplex diagnosztikai panelek nemcsak fokozhatják a laboratóriumi vizsgálatok specificitását, érzékenységét és megbízhatóságát, de javíthatják a diagnosztikai értéküket egyetlen markerhez képest. Az, hogy a PACAP jó prognosztikai, prediktív vagy hatékonysági biomarker lesz-e a különböző betegségekben, és hogy beépíthető lesz-e a rutin klinikai gyakorlatba, a jövőben megválaszolendő kérdés.

A dolgozatban szereplő klinikai vizsgálatokat legtöbb esetben számos in vitro és in vivo kísérlet előzte meg, ahol a molekuláris hatásmechanizmusokra korábban már próbáltunk választ találni az adott kórfolyamatok kapcsán. Ezen eredményeket a diszkusszióban kerültek részletezésre.

Apostol CR, Bernard K, Tanguturi P, Molnar G, Bartlett MJ, Szabó L, Liu C, Ortiz JB, Saber M, Giordano KR, Green TRF, Melvin J, Morrison HW, Madhavan L, Rowe RK, Streicher JM, Heien ML, Falk T, Polt R. *Design and Synthesis of Brain Penetrant Glycopeptide Analogues of PACAP With Neuroprotective Potential for Traumatic Brain Injury and Parkinsonism. Front Drug Discov (Lausanne).* 2022 Jan;1:818003. doi: 10.3389/fddsv.2021.818003. Epub 2022 Jan 14. PMID: 35237767; PMCID: PMC8887546.

Ashina M, Doležil D, Bonner JH, Zhou L, Klatt J, Picard H, Mikol DD. *A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of AMG 301, a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide PAC1 receptor monoclonal antibody for migraine prevention. Cephalalgia.* 2021 Jan;41(1):33-44. doi: 10.1177/0333102420970889. Epub 2020 Nov 24. PMID: 33231489; PMCID: PMC7786389.

Cherail A, Maucotel J, Lefranc B, Leprince J, Vaudry D. *Intranasal Administration of PACAP Is an Efficient Delivery Route to Reduce Infarct Volume and Promote Functional Recovery After Transient and Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Jan 20;11: 585082. doi: 10.3389/fendo.2020.585082. PMID: 33551991; PMCID: PMC7855853.

Dominguez-Moreno R, Do TP, Ashina M. *Calcitonin gene-related peptide and pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide in migraine treatment. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2022 Apr 1;29(2): 225- 231. doi: 10.1097/MED.0000000000000717. PMID: 35066541.

Guo X, Tian Y, Yang Y, Li S, Guo L, Shi J. *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Protects Against Cognitive Impairment Caused by Chronic Cerebral Hypoperfusion. Mol Neurobiol.* 2021 Sep;58(9): 4309- 4322. doi: 10.1007/s12035-021-02381-2. Epub 2021 May 17. PMID: 33999349.

Lamine A, Létourneau M, Doan ND, Maucotel J, Couvineau A, Vaudry H, Chatenet D, Vaudry D, Fournier A. *Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model. Neuropharmacology.* 2016 Sep;108:440-50. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.05.014. Epub 2015 May 22. PMID: 26006268.

Lee EH, Seo SR. *Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. BMB Rep.* 2014 Jul;47(7):369-75. doi: 10.5483/bmbrep.2014.47.7.086. PMID: 24856828; PMCID: PMC4163857.

Lundbeck News Room: *Lundbeck Announced the Start of a Phase II Clinical Study to Assess Lu AG09222 for Migraine Prevention.* [(accessed on 29 August 2023)]. Available online: <https://newsroom.lundbeckus.com/news-release/2021/lundbeck-announced-start-of-phase-ii-clinical-study-for-migraine-prevention>.

Rubio-Beltrán E, Correnti E, Deen M, Kamm K, Kelderman T, Papetti L, Vigneri S, MaassenVanDenBrink A, Edvinsson L; *European Headache Federation School of Advanced Studies (EHF-SAS). PACAP38 and PAC<sub>1</sub> receptor blockade: a new target for headache? J Headache Pain.* 2018 Aug 7;19(1):64. doi: 10.1186/s10194-018-0893-8. PMID: 30088106; PMCID: PMC6081277.

Rustichelli C, Lo Castro F, Baraldi C, Ferrari A. *Targeting pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) with monoclonal antibodies in migraine prevention: a brief review. Expert Opin Investig Drugs.* 2020; 29(11): 1269-1275. doi: 10.1080/13543784.2020.1811966. PMID: 32877252.

Solés-Tarrés I, Cabezas-Llobet N, Vaudry D, Xifró X. *Protective Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Peptide Against Cognitive Decline in Neurodegenerative Diseases. Front Cell Neurosci.* 2020 Jul 17;14: 221. doi: 10.3389/fncel.2020.00221. PMID: 32765225; PMCID: PMC7380167.

Szabo E, Patko E, Vaczy A, Molitor D, Csutak A, Toth G, Reglodi D, Atlasz T. *Retinoprotective Effects of PACAP Eye Drops in Microbead-Induced Glaucoma Model in Rats. Int J Mol Sci.* 2021 Aug 17;22(16): 8825. doi: 10.3390/ijms22168825. PMID: 34445531; PMCID: PMC8396165.

Tan YV, Waschek JA. *Targeting VIP and PACAP receptor signalling: new therapeutic strategies in multiple sclerosis. ASN Neuro.* 2011 Oct 6;3(4): e00065. doi: 10.1042/AN20110024. PMID: 21895607; PMCID: PMC3189630.

Tanaka M, Szabó Á, Körtési T, Szok D, Tajti J, Vécsei L. *From CGRP to PACAP, VIP, and Beyond:*

*Unraveling the Next Chapters in Migraine Treatment. Cells. 2023 Nov 17;12(22):2649. doi: 10.3390/cells12222649. PMID: 37998384; PMCID: PMC10670698.*

*Togha M, Ghorbani Z, Ramazi S, Zavvari F, Karimzadeh F. Evaluation of Serum Levels of Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1, Vasoactive Intestinal Polypeptide, and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in Chronic and Episodic Migraine: The Possible Role in Migraine Transformation. Front Neurol. 2021 Dec 23;12: 770980. doi: 10.3389/fneur.2021.770980. PMID: 35002925; PMCID: PMC8733698.*

#### **Clinical Trials:**

*Study to Evaluate the Efficacy and Safety of AMG 301 in Migraine Prevention 2020. [(accessed on 4 September 2023)]; Available online: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03238781>.*

*A Study With Lu AG09222 in Adults With Migraine Who Have Not Been Helped by Prior Preventive Treatments 2023. [(accessed on 4 September 2023)]; Available online: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05133323>.*

*A Study of LY3451838 in Participants with Migraine 2023. [(accessed on 4 September 2023)]; Available online: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04498910>.*

**41. oldal: „... de a protektív hatás háttérében álló pontos molekuláris biológia útvonalak még nem ismertek. Emellett a Parkinson-kóros betegek széleskörű klinikai vizsgálatával sem foglalkozott még egy kutatócsoport sem” Előbbivel kapcsolatban sikerült eredményt felmutatni, vagy más munkacsoport jelentetett meg eredményeket sejtszintű mechanizmussal kapcsolatban?**

A PACAP Parkinson-kórban bizonyított neuroprotektív hatásának háttérében álló mechanizmusok feltérképezésével munkacsoportunk is foglalkozott a klinikai vizsgálatokat megelőzően. Ennek során számos in vitro és in vivo Parkinson-kór modellben vizsgáltuk a PACAP hatását immunhisztológia és molekuláris biológiai vizsgálatok segítségével.

A PACAP protektív hatásának háttérében álló molekuláris biológiai útvonalakat salsolinol és inflammatorikus mediátorok által indukált toxicitással szemben dopaminerg neuroblastoma (SH-SY5Y) sejtvonalon vizsgáltuk. Ebben az in vitro Parkinson-kór modellben a PACAP kezelés koncentrációfüggő 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 (Brown et al. 2013, 2014). 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 immunpozitivást 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 (Fehér et al. 2018). A Parkinson-kór patomechanizmusában számos fehérje játszik szerepet. Ezen fehérjék változását nano-HPLC-MS módszer segítségével vizsgáltuk 6-OHDA kezelést követően a substantia nigrában (Maász et al. 2014). 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 jellemeztük patkány Parkinson-kór modellben. A 6-OHDA kezelés hatására csökkent a PARK7/DJ-1 fehérje mennyisége, amit PACAP kezelést követően már nem tudtunk kimutatni (Jüngling et al. 2021).

Munkacsoportunkon kívül számos más kutatócsoport is vizsgálta a PACAP dopaminerg sejtekre kifejtett protektív hatásának háttérében álló mechanizmusokat. Bizonyítást nyert, hogy a PACAP stimulálja a dopamin szintézisében fontos szerepet játszó tirozin-hidroxiláz (TH) enzim aktivitását különböző sejtvonalakon (Moser et al. 1999; Corbitt et al. 2002). A PACAP azonban nem csak az enzim aktivitást képes befolyásolni, hanem a dopaminerg sejtek számát is növeli



mesencephalicus dopaminerg sejt kultúrában 6-OHDA kezelést követően (Takei et al. 1998). Egy másik modellben a PACAP kezelés megvédte a PC12 pheochromocytoma sejteket az 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP<sup>+</sup>) toxicitással szemben (Chung et al. 2005). Ez a védőhatás igazolódott neuroblastoma sejtekben (Deguil et al. 2007) és mesencephalicus neuron-glia kultúrákban is a lipopoliszacharid (LPS) (Yang et al. 2006), valamint PC12 sejtekben a rotenon által kiváltott toxicitással szemben (Wang et al. 2005).

A legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy 6-OHDA-nal kezelt SH-SY5Y neuroblastoma sejt vonal esetében a CREB, AKT és ERK foszforiláció fokozható lipid nanopartikulumokhoz asszociált PACAP kezelés során (Wu et al. 2023). Egy másik tanulmány azt is megerősítette, hogy a liposzómák által szállított PACAP az MPP<sup>+</sup> toxicitással szemben is képes megvédeni az SH-SY5Y neuroblastoma sejteket (Barra et al. 2022). Ugyanezen sejtek felhasználásával Fan és munkatársai (2022) kimutatták, hogy a PAC1 receptor alloszterikus modulátora neuroprotektív hatást fejt ki az MPTP toxicitással szemben. Yu és munkatársai kimutatták (2020), hogy a PACAP növelte a sejtek életképességét és a dopaminszintet, miközben csökkentette a caspase-3 aktivációt az MPP<sup>+</sup> toxicitásnak kitett Neuro2a sejtekben. Az MPP<sup>+</sup>-toxicitással szembeni in vitro védő potenciált egy rövidebb PACAP fragmentum, a PACAP1-23, kapcsán is kimutatták (Lamine et al. 2019), valamint bebizonyították, hogy a PACAP38 és analógjai hatékonyabb védelmet fejtenek ki neuroblastoma sejteken, mint a PACAP27 (Poujol et al. 2018). Számos tanulmány írta le azt is, hogy a PACAP gyulladáscsökkentő hatása szerepet játszik neuroprotektív hatásának kifejtésében. Broome és munkatársai (2022) kimutatták, hogy BV-2 microglia sejt kultúrában mind a PACAP, mind a VIP képes ellensúlyozni a rotenon által kiváltott microglia-aktivációt azáltal, hogy megakadályozza a gyulladási markerek, például a nitrogén-oxid, CD11b, MMP-9 és IL-6 emelkedését.

A sejtszintű mechanizmusok feltérképezéséhez számos állatkísérletes modellt is alkalmaztak. Wang és munkatársai kimutatták, hogy a PACAP védi a dopaminerg neuronokat az MPTP-indukálta egér Parkinson-kór modellben, ahol bebizonyították, hogy neuroprotektív háttérben nemcsak dopaminerg útvonalak, hanem a cholinerg neurotranszmisszió változásának is szerepe lehet, amely a striatalis D2-receptorokhoz kapcsolódik (Wang et al. 2008). Egy másik kísérletben a PACAP és analógja az MPTP által kiváltott gyulladási (TNF- $\alpha$ , IL-6) és apoptotikus (caspase-3) markerek expresszióját is csökkentette (Lamine et al. 2016). Prostaglandin J2-vel indukált neuroinflammációs Parkinson-kór modellben Shivers és munkatársai (2014) azt is megállapították, hogy a PACAP infúzió képes csökkenteni a dopaminerg sejtvesztést és a motoros deficitet, de nem tudta ellensúlyozni a microglia aktivációt. A PACAP antiapoptotikus és antiinflammatorikus hatása mellett egy új mechanizmust is leírtak Lamine-Ajili és munkatársai (2016), akik kimutatták, hogy a PACAP az autophagia gátlásával is képes csökkenteni a sejt által MPTP-indukált sejt károsodás esetén.

Barra T, Falanga A, Bellavita R, Pisano J, Laforgia V, Prisco M, Galdiero S, Valiante S. *Neuroprotective Effects of gH625-lipoPACAP in an In Vitro Fluid Dynamic Model of Parkinson's Disease. Biomedicines.* 2022 Oct 20;10(10):2644. doi: 10.3390/biomedicines10102644. PMID: 36289905; PMCID: PMC9599564.

Broome ST, Musumeci G, Castorina A. *PACAP and VIP Mitigate Rotenone-Induced Inflammation in BV-2 Microglial Cells. J Mol Neurosci.* 2022 Nov;72(11):2163-2175. doi: 10.1007/s12031-022-01968-1. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35199308; PMCID: PMC9726775.

Brown D, Tamas A, Reglödi 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.

Brown D, Tamas A, Reglödi 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.

Chung CY, Seo H, Sonntag KC, Brooks A, Lin L, Isacson O. *Cell type-specific gene expression of*

midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Hum Mol Genet.* 2005 Jul 1;14(13):1709-25. doi: 10.1093/hmg/ddi178. Epub 2005 May 11. PMID: 15888489; PMCID: PMC2674782.

Corbitt J, Hagerty T, Fernandez E, Morgan WW, Strong R. Transcriptional and post-transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase messenger RNA in PC12 cells during persistent stimulation by VIP and PACAP38: differential regulation by protein kinase A and protein kinase C-dependent pathways. *Neuropeptides.* 2002 Feb;36(1):34-45. doi: 10.1054/npep.2002.0885. PMID: 12147212.

Deguil J, Jailloux D, Page G, Fauconneau B, Houeto JL, Philippe M, Muller JM, Pain S. Neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in MPP<sup>+</sup>-induced alteration of translational control in Neuro-2a neuroblastoma cells. *J Neurosci Res.* 2007 Jul;85(9):2017-25. doi: 10.1002/jnr.21318. PMID: 17492795.

Fan G, Chen S, Tao Z, Zhang H, Yu R. A novel small positive allosteric modulator of neuropeptide receptor PAC1-R exerts neuroprotective effects in MPTP mouse Parkinson's disease model. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2022 Sep 25;54(9):1349-1364. doi: 10.3724/abbs.2022126. PMID: 36082935; PMCID: PMC9909460.

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.

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.

Lamine-Ajili A, Fahmy AM, Létourneau M, Chatenet D, Labonté P, Vaudry D, Fournier A. Effect of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on the autophagic activation observed in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Apr;1862(4):688-695. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.01.005. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26769362.

Lamine, A.; Létourneau, M.; Doan, N.D.; Maucotel, J.; Couvineau, A.; Vaudry, H.; Chatenet, D.; Vaudry, D.; Fournier, A. Characterizations of a Synthetic Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Analog Displaying Potent Neuroprotective Activity and Reduced in Vivo Cardiovascular Side Effects in a Parkinson's Disease Model. *Neuropharmacology* 2016, 108, 440–450, doi:10.1016/j.neuropharm.2015.05.014.

Lamine A, Poujol de Molliens M, Létourneau M, Hébert TE, Vaudry D, Fournier A, Chatenet D. The amidated PACAP<sub>1-23</sub> fragment is a potent reduced-size neuroprotective agent. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2019 Nov;1863(11):129410. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.08.003. Epub 2019 Aug 8. PMID: 31401178.

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.

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.

Moser A, Scholz J, Gänslé A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-27) enhances tyrosine hydroxylase activity in the nucleus accumbens of the rat. *Neuropeptides.* 1999 Dec;33(6):492-7. doi: 10.1054/npep.1999.0768. PMID: 10657530.

Poujol de Molliens M, Létourneau M, Devost D, Hébert TE, Fournier A, Chatenet D. New insights about the peculiar role of the 28-38 C-terminal segment and some selected residues in PACAP for signaling and neuroprotection. *Biochem Pharmacol.* 2018 Aug;154:193-202. doi: 10.1016/j.bcp.2018.04.024. Epub 2018 Apr 25. PMID: 29704474.

Shivers KY, Nikolopoulou A, Machlovi SI, Vallabhajosula S, Figueiredo-Pereira ME. PACAP27 prevents Parkinson-like neuronal loss and motor deficits but not microglia activation induced by prostaglandin J2. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Sep;1842(9):1707-19. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.020. Epub 2014 Jun 23. PMID: 24970746; PMCID: PMC4125523.

Takei N, Skoglösa Y, Lindholm D. Neurotrophic and neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurosci Res*. 1998 Dec 1;54(5):698-706. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19981201)54:5<698::AID-JNR15>3.0.CO;2-5. PMID: 9843161.

Wang G, Pan J, Tan YY, Sun XK, Zhang YF, Zhou HY, Ren RJ, Wang XJ, Chen SD. Neuroprotective effects of PACAP27 in mice model of Parkinson's disease involved in the modulation of K(ATP) subunits and D2 receptors in the striatum. *Neuropeptides*. 2008 Jun;42(3):267-76. doi: 10.1016/j.npep.2008.03.002. Epub 2008 Apr 28. PMID: 18440632.

Wang G, Qi C, Fan GH, Zhou HY, Chen SD. PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS Lett*. 2005 Jul 18;579(18):4005-11. doi: 10.1016/j.febslet.2005.06.013. PMID: 16004991.

Wu Y, Angelov B, Deng Y, Fujino T, Hossain MS, Drechsler M, Angelova A. Sustained CREB phosphorylation by lipid-peptide liquid crystalline nanoassemblies. *Commun Chem*. 2023 Nov 6;6(1):241. doi: 10.1038/s42004-023-01043-9. PMID: 37932487; PMCID: PMC10628290.

Yang S, Yang J, Yang Z, Chen P, Fraser A, Zhang W, Pang H, Gao X, Wilson B, Hong JS, Block ML. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP4-6 are neuroprotective through inhibition of NADPH oxidase: potent regulators of microglia-mediated oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Nov;319(2):595-603. doi: 10.1124/jpet.106.102236. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16891616.

Yu R, Li J, Lin Z, Ouyang Z, Huang X, Reglodi D, Vaudry D. TAT-tagging of VIP exerts positive allosteric modulation of the PAC1 receptor and enhances VIP neuroprotective effect in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2020 Aug;1864(8):129626. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129626. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32335135.

#### **46. oldal: Az *in vitro* kísérletekben mi alapján határozták meg a PACAP koncentrációját? (Miért 100nM?)**

A vizsgálataink során alkalmazott 100 nM-os koncentráció kiválasztásához korábbi *in vitro* vizsgálatok eredményét vettünk alapul, ahol a saját kísérleti protokollunkhoz hasonlóan más kutatócsoportok is a 10-100 nM-os PACAP koncentrációt találták effektívnek a különböző toxikus károsító hatásokkal szemben.

A szőrsejtek *in vitro* vizsgálatait megelőzően munkacsoportunk több más sejttípuson is tanulmányozta a PACAP citoprotektív hatását H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indukálta oxidatív stresszel szemben, ahol szintén nM-os koncentrációban alkalmaztuk a PACAP-ot. Myocardialis és endothel sejttípusokban igazoltuk a PACAP antiapoptotikus hatását oxidatív stressz-indukálta károsodás esetén (Gasz et al. 2006 a,b; Rácz et al. 2007). E kísérletekhez hasonlóan a belső fül sejttípuson is előteszteléseket végeztünk az optimális dózis meghatározása céljából.

Az egyik legelső publikációban Vaudry és munkacsoportja vizsgálta a PACAP koncentráció-függő védő hatását H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indukálta oxidatív stressz károsodással szemben cerebellaris szemcsesejt kultúrában. Ebben a vizsgálatban a leghatékonyabb dózissnak a 10<sup>-7</sup> M-os PACAP kezelés bizonyult, ezért alkalmaztunk mi is a 100 nM-os koncentrációt (Vaudry et al. 2002) a vizsgálataink során.

Gasz B, Rácz B, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserpes B, Lubics A, Gallyas Jr F, Tóth G, Lengvári I, Reglodi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides*. 2006; 27(1): 87-94. doi: 10.1016/j.peptides.2005.06.022. PMID: 16095757. (a)

Gasz B, Rác B, Róth E, Borsiczky B, Tamás A, Boronkai A, Gallyas Jr F, Tóth G, Reglődi D. PACAP-38 inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1070(1): 293-7. doi: 10.1196/annals.1317.029. PMID: 16891268. (b)

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.ygcn.2006.12.006. Epub 2006 Dec 27. PMID: 17270184.

Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ. PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur J Neurosci.* 2002 May;15(9):1451-60. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.01981.x. PMID:12028355.

**49. oldal: „A képeket a Spot Basic Programmal készítettük és Adobe Photoshop 7.0 segítségével analizáltuk.” A Photoshop programmal milyen analízis történt? (Ez a program nem analízis program).**

Elnézést kérek a pontatlan fogalmazásért! Természetesen az Adobe Photoshop 7.0 programot nem analízishez használtuk, hanem a publikációhoz szükséges ábrák elkészítéséhez.

**52. oldal: „Nissl-festés analízise során azon sejteket vettük számításba, amelyeket nucleolusok alapján egyértelműen idegsejtként lehetett definiálni.” A kariometriai analízisek – melyek jelenleg alkalmazottaknál összetettebbek (értsd: egymást követő metszeteken történő különbségek összehasonlítása, stereologia, Abercrombie-módszer, stb.) - csak az idegsejtekre korlátozódnak? Gliasejtek az analízisből a magvacska megléte/nem megléte esetén valóban kizárható? Idegsejt nem lehet olyan sejt, melynek éppen az adott metszeten éppen nem látszik a magvacskája?**

Természetesen egyetértek a Bíráló felvetésével, miszerint valószínűleg voltak a képeinken olyan sejtek, amik idegsejtek voltak, de nem látszott a nucleolus és ezért nem számoltuk őket. Jelenleg nem ismerünk olyan irodalmi adatot, amiben a vad és a PACAP KO egerek idegsejtjeinek morfológiája és mérete között szignifikáns különbség mutatkozott volna, így azt feltételezzük, hogy az idegsejt morfológia azonos, és statisztikai alapon a két metszetben ugyanolyan arányban fordulhat elő, hogy egy idegsejt nucleolusa beleesik vagy nem esik bele a képbe. Mivel nem találtunk a két csoport között eltérést, ilyen irányban nem vizsgáltunk tovább. Amennyiben lett volna eltérés, a pontosabb analízis céljából neuron-specifikus markerrel végeztünk volna immunfestést (pl. NeuN).

**60. oldal: a Saint Maire fixáló oldat a leírás szerint 99%-os etilalkoholt tartalmaz. Hogyan kell ezután értelmezni/miért kell ezután felszálló alkoholsort alkalmazni?**

A Saint Marie fixáló oldat 100 ml-re számolva 99 ml 96%-os ethanolból és 1 ml tömény ecetsavból áll. Mivel az immunhisztokémiai eljárások során a tömény ecetsav zavarhatja az antitest bekötődését vagy akár ki is csaphatja azt, ezért a fixálást követően alkoholos mosást végzünk, mely így maximálisan eltávolítja az ecetsav nyomait anélkül, hogy a korábbi fixálást és az epitópok szerkezetét befolyásolná.

**73. oldal: Mit tud a PARK7/DJ-1 fehérje filogenetikai megőrzöttségéről? A puhatestűekben azonos az emberben találttal? Vizsgálható az emlősökben/emberben alkalmazott reagensekkel?**

A Parkinson-kórral kapcsolatos vizsgálataink során elsőként mutattuk ki a PARK7/DJ-1 fehérje jelenlétét gerinctelen modellszervezetben. A Balatoni Limnológiai Kutatóintézetben dolgozó kollaborátoraink, Pirger Zsolt és munkacsoportja, holland kollégákkal közösen, szekvenálták a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) központi idegrendszerének teljes transzkriptómját részben abból a célból, hogy feltárják az öregedésben és a neurodegeneratív betegségekben szerepet játszó, evolúciósan konzervált homológ szekvenciákat (Fodor et al. 2020). Az elvégzett elemzéssel az volt a céljuk, hogy megerősítsék a gerincteleneken végzett vizsgálatok relevanciáját az öregedésben és a neurodegeneratív elváltozások hátterében álló patomechanizmusok kutatásában. Számos evolúciósan magasan konzervált molekula jelenlétét igazolták az *L. stagnalis* központi idegrendszerében, köztük például a gelsolin, a presenilin, a huntingtin, és az amiloid prekursor fehérjét, melyek az öregedés, amyloidosis és az Alzheimer-kór kapcsán ismertek, továbbá, ezek mellett a Parkinson-kór fehérje 7/Protein deglycase DJ-1 szekvenciáját is azonosítani tudták. Noha a PARK7/DJ1 fehérje valós fiziológiai funkcióját ezidáig nem tárták fel a gerinctelen modellben, azt azonban igazolták, hogy magas homológiával jelen van a központi idegrendszerben, mennyisége szignifikánsan megváltozik a rotenonnal indukált dopamin depléción során, így jelen tudásunk szerint feltételezzük, hogy a PARK7/DJ-1 fehérje az emlős szövetek analízise során használt reagensekkel gerinctelen szervezetekben, így csigákban is vizsgálható.

*Fodor I, Urbán P, Kemenes G, Koene JM, Pirger Z. Aging and disease-relevant gene products in the neuronal transcriptome of the great pond snail (Lymnaea stagnalis): a potential model of aging, age-related memory loss, and neurodegenerative diseases. Invert Neurosci. 2020 May 24;20(3):9. doi: 10.1007/s10158-020-00242-6. PMID: 32449011; PMCID: PMC7246240.*

**100. oldal: „Vad típusú és homozigóta PACAP-génkiütött egerek cochleájának morfológiai összehasonlítása során a hematoxilin-eozinnal festett metszeteken nem találtunk szignifikáns eltérést” Ez minőségi megállapítást jelent? Ha igen, a szignifikáns jelző nem értelmezhető.**

Elnézést a pontatlan fogalmazásért, a HE festést követő morfológiai összehasonlítás során kvantitatív összehasonlító vizsgálatokat nem végeztünk, ezért egyetértünk azzal, hogy a szignifikáns jelző nem értelmezhető.

**108. oldal: Mi lehet a magyarázata annak, hogy hang hatására a sejtaktiváció számossága csak a hallópálya első szakaszán marad el PACAP KO állatokban? Milyen eredményt várna a hallókéregben?**

A cochlearis magok területén (VCN, DCN) mindkét csoportnál zajmentes környezetben csak néhány sejtben tudtunk kimutatni c-Fos aktivitást, amely jelölődés a hanginger hatására szignifikáns neuronális aktivációt mutatott mindkét csoportban, de a PACAP-génkiütött egerek esetében ez szignifikánsan kisebb volt, mint a vad egerekben. Ezzel szemben a hallópálya centrálisabb részében, a SOC (oliva superior complex), NLL (nuclei lemnisci lateralis), IC (colliculus inferior) 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-génkiütött egerek között. Végül a hallókéreg (AU1) vizsgálata során már zajmentes környezetben is olyan magas sejtaktiváció volt mérhető, ami 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 információk feldolgozásában, és a hallópályán kívül más idegrendszeri összeköttetéssel is rendelkeznek. A SOC afferentációja érkezik az IC-on kívül a thalamusból és az elsődleges hallókéregből is, de emellett különböző szerotoninerg és noradrenerg központokból is. Az NLL az IC-ból, és azon keresztül az elsődleges szomatoszenzoros kéregből, az agytörzsi szomatoszenzoros magokból is kap információt, és természetesen, az elsődleges hallókéregből, ahol emellett a multimodális információfeldolgozás is zajlik (Thompson és Thompson 1993; Thompson és Schofield 2000; Bajo és King 2013). 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.

*Bajo VM, King AJ. Cortical modulation of auditory processing in the midbrain. Front Neural Circuits. 2013 Jan 3;6: 114. doi: 10.3389/fncir.2012.00114. PMID: 23316140; PMCID: PMC3539853.*

*Thompson AM, Schofield BR. Afferent projections of the superior olivary complex. Microsc Res Tech. 2000 Nov 15;51(4): 330-54. doi: 10.1002/1097-0029(20001115)51: 43.0.CO;2-X. PMID: 11071718.*

*Thompson AM, Thompson GC. Relationship of descending inferior colliculus projections to olivocochlear neurons. J Comp Neurol. 1993 Sep 15;335(3): 402-12. doi: 10.1002/cne.903350309. PMID: 8227527.*

**110. oldal: A jelölt két KIT-et használ, hogy egér ductus cochlearisból készült homogenizátumok fehérjeösszetételét megvizsgálja; nem talál különbséget. Milyen fehérjéket/típusú fehérjéket tekintve várt változást PACAP KO egerekben? Lefedte az alkalmazott vizsgálat 93 fehérjéje ezeket a várakozásokat; nem kapott fals negatív eredményt a következtetést tekintve (nincs különbség)?**

Ductus cochlearis homogenizátum fehérjeösszetételének vizsgálatával az volt a célunk, hogy feltérképezzük a gyulladáshoz kapcsolódó markerként definiált különböző citokinek és az érrendszeri elváltozásokhoz kapcsolódó angiogenetikus fehérjék szintjét vad egerek és PACAP KO egerek összehasonlításával. Ezen kitéket azért választottuk, mert az jól ismert, hogy a gyulladással és érrendszeri elváltozásokkal kapcsolatos eltérések kulcsszerepet játszanak az idegi halláskárosodás különböző típusainak kialakulásában (London és Gurgel, 2014; Kalinec et al., 2017; Köles et al., 2019). A fehérjeprofili analízis során a 93 vizsgált faktorból csak 13 fehérje esetében tudtunk detektálható mennyiséget kimutatni. Ezek közül több olyan molekulát azonosítottunk, amelyek részt vesznek az angiogenetikus folyamatokban (pl. savas-fibroblaszt növekedési faktor [FGF], C-X-C motif chemokine 12 [CXCL12]), az antiangiogenetikus folyamatokban (pl. endostatin, Serpin F1), kemotaktikus hatással bírnak (pl. B-lymphocytá kemoattraktáns [BLC], thrombocytá faktor 4 [PF4], CXCL12), vagy a koagulációban játszanak szerepet (pl. PF4, szöveti faktor [TF]). Emellett az ubikviter sejt felszíni dipeptidyl-peptidáz-4-et (DPP4), az antiapoptotikus osteopontint és a sejt közötti adhéziós molekula CD54 jelenlétét is kimutattuk. Szignifikáns különbséget nem találtunk ezen fehérjék esetében a vad és PACAP KO egerek között, amely alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a PACAP KO egerek halláscsökkenése valószínűleg nem a belső fül gyulladáshoz vagy angiogenetikus eredetű elváltozásaiból származik, de természetesen ezt nem tudjuk teljes bizonyossággal kizárni. Számos olyan kit is létezik, amely az általunk vizsgált faktorokon kívül más faktorok vizsgálatára is alkalmas. A negatív eredményt az is okozhatta, hogy mintáinkban a célzott fehérjék alacsony koncentrációját a kit már nem tudta detektálni, így természetesen a vizsgálati protokoll finomításával és további kiték alkalmazásával lehetséges, hogy pozitív eltéréseket is ki tudunk mutatni a jövőben.

Kalinec GM, Lomberk G, Urrutia RA, Kalinec F. Resolution of Cochlear Inflammation: Novel Target for Preventing or Ameliorating Drug-, Noise- and Age-related Hearing Loss. *Front Cell Neurosci.* 2017 Jul 7;11: 192. doi: 10.3389/fncel.2017.00192. PMID: 28736517; PMCID: PMC5500902.

Köles L, Szepesy J, Berekméri E, Zelles T. Purinergic Signaling and Cochlear Injury-Targeting the Immune System? *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 18;20(12): 2979. doi: 10.3390/ijms20122979. PMID: 31216722; PMCID: PMC6627352.

London NR, Gurgel RK. The role of vascular endothelial growth factor and vascular stability in diseases of the ear. *Laryngoscope.* 2014 Aug;124(8): E340-6. doi: 10.1002/lary.24564. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24347479.

**113. oldal: Hogyan értelmezi azt az eredményét, hogy az alaphelyzetben is magas kalciumkötő fehérje expresszió a homozigóta PACAP-génkiütött egerekben kanamicin kezelés hatására nem emelkedett tovább?**

Vizsgálataink során a PACAP-génkiütött egerekben jelentősen magasabb  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje expressziót találtunk, mint a vad típusú egerekben. Ez alapján arra következtethetünk, hogy az endogén PACAP hiányában a szőrsejtek  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázisa zavart szenvedhet, és a megnövekedett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció miatt a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje expressziója megnövekedett. Így feltételezhetjük, hogy az endogén PACAP fontos szerepet játszhat a szőrsejtek fiziológias működésének fenntartásában, és annak hiányában a szőrsejtek érzékenyebbek lehetnek a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázist is érintő ototoxikus károsodásokkal szemben. Az aminoglikozid antibiotikumok ototoxikus hatása is a szabadgyökök fokozott termelésére és az intrinsic apoptotikus útvonalak aktiválására vezethető vissza, ami intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedést eredményez jelezve, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjék fontos szerepet játszanak ezen folyamatokban (Orrenius et al., 1992; Trump és Berezsky, 1996). A vad típusú és heterozigóta PACAP-génkiütött egerekben a kezelés után szignifikánsan magasabb  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje expressziót mértünk a szőrsejtekben, míg a homozigóta PACAP-génkiütött egerekben az alaphelyzetben is emelkedett expresszió nem nőtt tovább. Ebből arra következtethetünk, hogy endogén PACAP hiányában a PACAP génkiütött egerekben a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjék expressziója már elérte azt a szintet, amely nem képes további upregulációra, ezért nem tudja kivédeni az ototoxikus hatásokat, és a szőrsejtek korai apoptózisa már normál körülmények között is elindul (Tombal et al., 2002). Az immunhisztológiai vizsgálat limitációja, hogy finomabb eltérések pontos kvantifikációjára nem minden esetben alkalmas. Ezzel szemben vannak finomabb elektromikroszkópos módszerek, amit a korábbi válaszomban említett Hackney és munkacsoportja (2005) is használt a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjék változásának detektálására, ahol szöveti immunogold jelöléssel pontos összehasonlító vizsgálatok végezhetők és kis eltérések is számszerűsíthetők. Lehetséges, hogy ezzel a pontosabb módszerrel tudtunk volna további emelkedést detektálni a KO egerekben is.

Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R. The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci.* 2005 Aug 24;25(34): 7867-75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1196-05.2005. PMID: 16120789; PMCID: PMC6725244.

Orrenius S, McCabe MJ Jr, Nicotera P.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett.* 1992 Dec;64-65 Spec No: 357-64. doi: 10.1016/0378-4274(92)90208-2. PMID: 1335178.

Tombal B, Denmeade SR, Gillis JM, Isaacs JT. A supramicromolar elevation of intracellular free calcium ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) is consistently required to induce the execution phase of apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002 May;9(5):561-73. doi: 10.1038/sj.cdd.4400999. PMID: 11973614.

Trump BF, Berezsky IK. The role of altered  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct 11;1313(3): 173-8. doi: 10.1016/0167-4889(96)00086-9. PMID: 8898851.

**116. oldal: Mi lehet az oka annak, hogy PACAP KO egerekben a zománc és a dentin szerves és szervetlen anyag változásai ellentétesen alakulnak?**

A zománc és a dentin szervetlen és szerves anyag összetételének vizsgálatát Raman spektroszkópiával végeztük. Öt napos PACAP KO és vad egerek fejlődő molaris fogait és 1 éves egerek metszőfogait hasonlítottuk össze.

A Raman mérések a dentin és a zománc organikus állományában is különbséget mutattak 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. A dentin fő organikus alkotóeleme az I-es típusú kollagén, de emellett más, nem kollagén típusú fehérjék is megtalálhatók benne, mint a kis integrin kötő N-glikolizált fehérjék (SIBLINGs) vagy a dentin mátrix protein-1 (DMP1) fehérje, amelyek fontos szerepet töltenek be a kristálynövekedés és a mineralizáció szabályozásában (Butler és Ritchie 1995; Qin et al. 2004; Orsini et al. 2008), valamint a hidroxipatithoz való kötődésben (Gericke et al. 2010). A PACAP-génkiütött egereknél kimutatott kisebb „random coil” diverzitás befolyásolhatja a fehérjék ásványi anyagokhoz, kollagénhez és a sejtfelszínhez való kötődését, és így szerkezeti eltérésekhez vezethet. A zománc organikus összetevőiben detektált különbségek a zománcfehérjék izoformái közötti eltérésre utalhatnak. A fehérjék másodlagos konformációváltozásában detektálható eltérések kimutathatók a zománc fejlődését is érintő betegségekben, mint például az amelogenesis imperfectában, aminek az amelogenin konformációs zavara áll a hátterében (Lakshminarayanan et al. 2010).

A dentin szervetlen komponenseinek vizsgálata során a PACAP KO egereknél mint a fejlődő molaris fogakban, mind a metszőfogakban a hidroxipatit kristályok magasabb fokú rendezetlenségét mutattuk ki. Eredményeink arra utalnak, hogy a PACAP-génkiütött állatok dentinje kevésbé kristályosodott, rendezetlenebb, kisebb krisztallit méretű bioapatit jellemzi, és fejlődésében is elmarad a vad egerekhez képest. A zománc szervetlen anyag összetételében nem tudunk kimutatni szignifikáns eltéréseket, ami a két szövet mineralizációs különbségeiből adódhat. A zománc és a dentin mineralizációjának szabályozásában is fontos szerepet töltenek be a különböző mátrix fehérjék (Moradian-Oldak és George 2021). A dentin mineralizációja során meghatározó szerepe van a kollagén rostoknak, melyek egy előre meghatározott vázként segítik a nem kollagén típusú fehérjék és a kristályok szabályos elrendeződését a rostok között. Ezzel szemben a zománcban az amelogeninben gazdag extracelluláris mátrix folyamatosan szekretálódik és a nem-amelogenin fehérjékkel és az ásványi anyaggal egy folyamatosan formálódó mátrixot eredményez, amely magyarázhatja a zománc és a dentin szervetlen állományának vizsgálata során detektált eltéréseket.

Butler WT, Ritchie H. *The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins.* *Int J Dev Biol.* 1995 Feb;39(1): 169-79. PMID: 7626404.

Gericke A, Qin C, Sun Y, Redfern R, Redfern D, Fujimoto Y, Taleb H, Butler WT, Boskey AL. *Different forms of DMP1 play distinct roles in mineralization.* *J Dent Res.* 2010 Apr;89(4): 355-9. doi: 10.1177/0022034510363250. Epub 2010 Mar 3. PMID: 20200415; PMCID: PMC2873044.

Lakshminarayanan R, Bromley KM, Lei YP, Snead ml, Moradian-Oldak J. *Perturbed amelogenin secondary structure leads to uncontrolled aggregation in amelogenesis imperfecta mutant proteins.* *J Biol Chem.* 2010 Dec 24;285(52): 40593-603. doi: 10.1074/jbc.M110.131136. Epub 2010 Oct 7. PMID: 20929860; PMCID: PMC3003358.

Moradian-Oldak J, George A. *Biom mineralization of Enamel and Dentin Mediated by Matrix Proteins.* *J Dent Res.* 2021 Sep;100(10):1020-1029. doi: 10.1177/00220345211018405. Epub 2021 Jun 21. PMID: 34151644; PMCID: PMC8381691.

Orsini G, Ruggeri A, Mazzoni A, Nato F, Falconi M, Putignano A, Di Lenarda R, Nanci A, Breschi L. *Immunohistochemical localization of dentin matrix protein 1 in human dentin.* *Eur J Histochem.* 2008 Oct-Dec;52(4): 215-20. doi: 10.4081/1219. PMID: 19109095.



Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Jun 4;15(3): 126-36. doi: 10.1177/154411130401500302. PMID: 15187031.

**118. oldal: A Notch receptorokat vizsgálva a 2-es típus esetében talál különbséget PACAP KO állatokban a fogfejlődés folyamán. Különbözik valamiben/mi jellemzi a Notch2 receptor medialis jelátviteli útvonulatát a másik három típussal szemben? Le lehet vonni következtetést?**

A Notch jelátviteli útvonálnak fontos szerepe van a fogfejlődés szabályozásában, ugyanis befolyásolja a sejtek proliferációját, apoptózisát, elősegíti a differenciálódást és a különböző funkciójú leánysejtek, így a különböző rétegek kialakulását (Cai et al. 2011). A Notch jelátviteli útvonalon négy receptor molekula (Notch1, 2, 3, 4), valamint öt ligand (DLL1, 3, 4 és Jagged1, 2) vesz részt, amelyek I-es típusú transzmembrán fehérjék (Lindsell et al. 1995; Luo et al. 1997). A ligandok receptorhoz való kötésének hatására a TNF- $\alpha$  (tumor nekrozis faktor  $\alpha$ ) konvertáló enzim (TACE) levágja a Notch intracelluláris egységet (Notch intracelluláris domén, NICD) a receptorról, ami a sejtmagba kerül. Ott kötést hoz létre a CSL transzkripció faktorral (CBF1 humans/Su(H) Drosophila/LAG1 Caenorhabditis elegans) (Katoh és Katoh 2006).

Vizsgálataink során mind a négy Notch receptor expresszióját vizsgáltuk 5 napos vad, heterozigóta és homozigóta PACAP-génkiütött (KO) egerek fejlődő molaris fogain, és a korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan mi is detektálni tudtuk a Notch receptorok jelenlétét a fejlődő fogakban (Mitsiadis et al. 1995). A különböző gentotípusú egerek összehasonlítása során szignifikáns különbséget csak a Notch 2 receptor expresszió kapcsán találtunk az adamantoblastok rétegében. Korábban Mitsiadis és munkatársai (1999) is bizonyították a különböző receptorok eltérő expresszióját patkányokban, ugyanis a sérült fogakban fokozott Notch 2 expressziót írtak le. Ezt követően a Notch 2 expressziót emberi fogakban is feltérképezték normál körülmények között és sérülést követően (Mitsiadis et al. 2003). A fogfejlődés utolsó harang stádiumában, a mi vizsgálatainkhoz hasonlóan, Notch 2 expressziót írtak le az adamantoblastok rétegében, a reticulum stellatumban, a stratum intermedium területén és a sudodontoblasticus rétegben is. Bár a Notch 2 immunreaktivitás teljesen hiányzott az ép felnőtt fogakban, carries során fokozott expressziót figyeltek meg a carries közelében elhelyezkedő odontoblastokban és az erek falában, amiből arra következtettek, hogy a Notch 2-nek fontos szerepe lehet a regenerációs folyamatok szabályozásában. Emelett a Notch 2 aktiválódását leírták a sérüléstől távol elhelyezkedő pulpasejtekben is, amiből az feltételezték, hogy a Notch képes a sejtproliferáció mellett a sejtek migrációját is befolyásolni. Vizsgálataink során a PACAP KO egerekben mi is szignifikánsan magasabb Notch 2 aktivitást találtunk, amiből arra következtethetünk, hogy ezen útvonálnak kiemelt szerepe lehet a fogfejlődés során a sejtproliferáció, sejt differenciáció és apoptotikus folyamatok közötti egyensúly fenntartásában, amely könnyen sérülhet patológiás elváltozások során.

Cai X, Gong P, Huang Y, Lin Y. Notch signalling pathway in tooth development and adult dental cells. *Cell Prolif.* 2011 Dec;44(6):495-507. doi: 10.1111/j.1365-2184.2011.00780.x. Epub 2011 Oct 4. PMID: 21973022; PMCID: PMC6495681.

Katoh M, Katoh M. Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells. *Int J Mol Med.* 2006 Apr;17(4): 681-5. PMID: 16525728.

Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G. Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell.* 1995 Mar 24;80(6): 909-17. doi: 10.1016/0092-8674(95)90294-5. PMID: 7697721.

Luo B, Aster JC, Hasserjian RP, Kuo F, Sklar J. Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. *Mol Cell Biol.* 1997 Oct;17(10): 6057-67. doi: 10.1128/MCB.17.10.6057. PMID: 9315665; PMCID: PMC232455.

Mitsiadis TA, Lardelli M, Lendahl U, Thesleff I. Expression of Notch 1, 2 and 3 is regulated by

*epithelial-mesenchymal interactions and retinoic acid in the developing mouse tooth and associated with determination of ameloblast cell fate. J Cell Biol. 1995 Jul;130(2):407-18. doi: 10.1083/jcb.130.2.407. PMID: 7615640; PMCID: PMC2199945.*

*Mitsiadis TA, Fried K, Goridis C. Reactivation of Delta-Notch signaling after injury: complementary expression patterns of ligand and receptor in dental pulp. Exp Cell Res. 1999 Feb 1;246(2):312-8. doi: 10.1006/excr.1998.4285. PMID: 9925746.*

*Mitsiadis TA, Roméas A, Lendahl U, Sharpe PT, Farges JC. Notch2 protein distribution in human teeth under normal and pathological conditions. Exp Cell Res. 2003 Jan 15;282(2):101-9. doi: 10.1016/s0014-4827(02)00012-5. PMID: 12531696.*

### **128. oldal: Mi a jelentősége a méhlepényben és a magzati vérben található PACAP szint változásoknak?**

A várandósság és szülés során detektálható PACAP szint változások azt bizonyítják, hogy az endogén PACAP szintek érzékenyen reagálnak ezen élettani folyamatokat követő hormonális változásokra. Számos kutatási eredmény áll rendelkezésünkre a PACAP várandóssággal, termékenységgel, valamint a méh simaizomzatának összehúzódásával és az uteroplacentáris keringés regulációjában szerepet játszó női hormonok szabályozásával kapcsolatban. Bizonyítást nyert, hogy a PACAP szabályozza a fő gonadalis hormonok, a hypothalamusból felszabaduló gonadotrop-releasing hormon (GnRH), valamint a hypophysisben termelődő folliculus stimuláló hormon (FSH) és luteinizáló hormon (LH) termelését. PACAP kezelés hatására fokozódik a neurohypophysis oxitocin és vazopresszin termelése, valamint az adenohypophysisben az FSH-n és LH-n kívül a növekedési hormon (GH), adrenocorticotrop hormon (ACTH) és a prolaktin (PRL) szekréciója (Koppán et al. 2022). Ezen adatok alapján arra következtethetünk, hogy a várandósság neuroendokrin szabályozásában részt vevő központi idegrendszeri struktúrák és endokrin mirigyek sejtjei szerepet játszhatnak a PACAP szint emelkedésében, mely rendszerek érzékenyen követik a fiziológias folyamat alatt zajló hormonális változásokat a különböző stimuláló hormonok termelésének szabályozásával.

A késői terhességben talált magasabb plazma PACAP szint azt mutatja, hogy a központi idegrendszeren és az endokrin mirigyeken kívül, a placenta is részt vehet a PACAP termelésben. Ez összhangban van azzal a vizsgálatunkkal, amely szerint a placenta PACAP tartalma nő a terhesség során. Vizsgálataink során az emberi placentamintákat abortusból származó (9 hetes, n = 7) és terminusra született placentákból (n = 6) gyűjtöttük. Mintát vettünk a placenta foetalis felszínén elhelyezkedő chorionbolyhokból (trophoblast sejtekből) és az anyai oldalon található decidua sejtekből. RIA módszer segítségével mindegyik placentamintában igazolni tudtuk a PACAP-27 és PACAP-38 jelenlétét. A placentamintákban szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintet mértünk a PACAP-27 szintekhez viszonyítva. A PACAP-38 szintje szignifikáns emelkedést mutatott a placenta érése során mind az anyai, mind a magzati részből származó mintákban, ezzel szemben a PACAP-27 elemzése során csak az anyai oldalon mutattunk ki szignifikáns emelkedést (Brubel et al. 2010).

Több kutatási eredmény is azt mutatja, hogy a PACAP valóban fontos szabályozó tényezőként működik a terhesség alatt. Például a PACAP-génkiütött egerek csökkent termékenységet mutatnak, főként a nem megfelelő decidualizáció miatt (Lajko et al. 2018). Egy másik tanulmány szintén kimutatta a PACAP potenciális jelentőségét az anyai fetoplacentáris keringés szabályozásában. Kimutatták, hogy a peptid mindkét formája (PACAP-38 és 27) relaxációt okoz a villusartériákon és a myometriális artériákon (Streenstrup et al. 1996). Így a PACAP-nak az uteroplacentáris egységben betöltött vazoregulációs szerepe feltételezhető, ami magyarázatot adhat a szülés során megfigyelt hirtelen PACAP csökkenésre. Emellett a PACAP neurotrofikus faktor, amely nagyon fontos szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében. Az immunrendszer éréseben való részvételéről is beszámoltak, valamint fontos szerepe lehet a stresszfolyamatok szabályozásában is, ez is magyarázhatja a várandósság alatt detektálható emelkedett PACAP szintet (Waschek et al. 2002; Delgado et al. 2003; Gaszner et al. 2012).

A köldökerekben mérhető PACAP forrása pontosan nem ismert. 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 (Reglodi et al. 2010). Az umbilicalis erekben detektálható alacsonyabb PACAP koncentráció háttérben több mechanizmus is feltételezhető. Szerepet játszhat benne a placentalis barrier, amely megakadályozza a PACAP transzportját az anyai vérből a magzati vérbe, emellett a köldökzsinór és a placenta keringése speciális hormonális és vascularis szabályozás alatt áll, amely különbözik a perifériás vérkeringés szabályozásától, ezért is lehetséges, hogy a PACAP koncentrációja különbözhet a köldökzsinór ereiben és a perifériás mintákban.

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.

Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Leceta J, Ganea D, Gomariz RP. PACAP in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 May;992:141-57. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03145.x. PMID: 12794054.

Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z. The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience.* 2012 Jan 27;202:283-99. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.046. Epub 2011 Dec 9. PMID: 22178610.

Lajko A, Meggyes M, Fulop BD, Gede N, Reglodi D, Szereday L. Comparative analysis of decidual and peripheral immune cells and immune-checkpoint molecules during pregnancy in wild-type and PACAP-deficient mice. *Am J Reprod Immunol.* 2018 Oct;80(4):e13035. doi: 10.1111/aji.13035. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30091267.

Koppan M, Nagy Z, Bosnyak I, Reglodi D. Female reproductive functions of the neuropeptide PACAP. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Sep 20;13:982551. doi: 10.3389/fendo.2022.982551. PMID: 36204113; PMCID: PMC9531758.

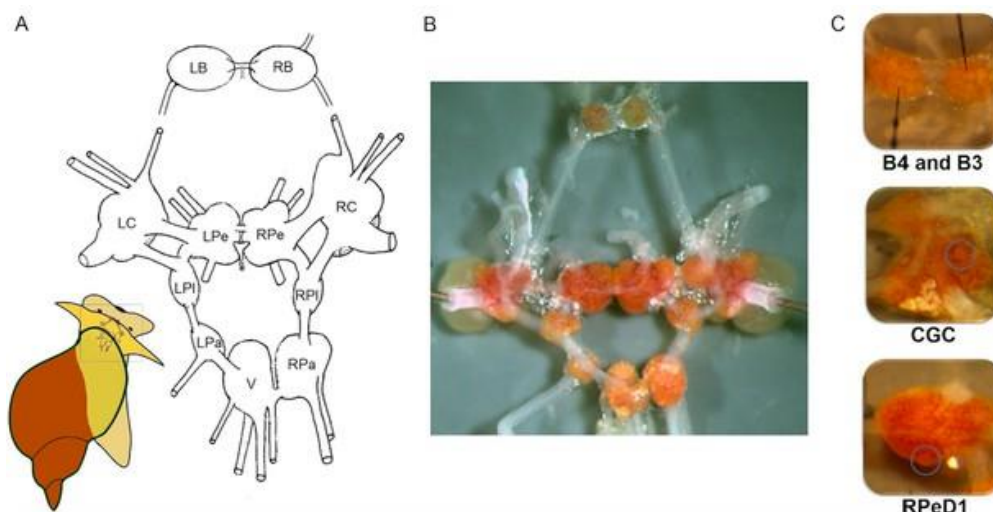
Reglodi D, Gyarmati J, Ertl T, Borzsei R, Bodis J, Tamas A, Kiss P, Csanaky K, Banki E, Bay C, Nemeth J, Helyes Z. Alterations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *J Endocrinol Invest.* 2010 Jul-Aug;33(7): 443-5. doi: 10.1007/BF03346621. PMID: 20671407.

Steenstrup BR, Jørgensen JC, Alm P, Hannibal J, Junge J, Fahrenkrug J, Ottesen B. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): occurrence and vasodilatory effect in the human uteroplacental unit. *Regul Pept.* 1996 Mar 22;61(3):197-204. doi: 10.1016/0167-0115(95)00156-5. PMID: 8701036.

Waschek JA. Multiple actions of pituitary adenylate cyclase activating peptide in nervous system development and regeneration. *Dev Neurosci.* 2002;24(1): 14-23. doi: 10.1159/000064942. Erratum in: *Dev Neurosci.* 2003 Nov-Dec;25(6): 393. PMID: 12145407.

**130. oldal: Mitől pusztultak el a rotenonnal kezelt csigák? Hogyan akadályozta ezt meg a PACAP kezelés?**

A vizsgálataink során alkalmazott rotenon csiga modellt Vehovszky és munkatársai (2007) által elvégzett kísérletek alapján választottuk, akik különböző dózisú rotenon kezelés hatását vizsgálták *Lymnea stagnalis*-okban. A csigákat különböző koncentrációjú (0,1-5  $\mu\text{M}$ ) akut és krónikus rotenon kezelésnek vetették alá, amely progresszív és irreverzibilis viselkedési zavarokat okozott az állatoknál. Az általunk is alkalmazott subletális dózisú 0,5  $\mu\text{M}$  rotenonnal való krónikus expozíció a spontán mozgás és a táplálkozási magatartás fokozatos csökkenéséhez vezetett, ami a rotenon kezelés 7. napjára komplettálódott. A kezelés 7. napján készített központi idegrendszeri preparátumban az azonosított dopaminerg neuron (Right Pedal Dorsal 1; RPeD1) által kiváltott poszt-szinaptikus potenciálok eltűntek, míg az RPeD1 által egy peptiderg neuronból (Visceral Dorsal 4; VD4) kapott szinaptikus bemenetek még működőképesek voltak bizonyítva a dopamin (DA) sejtek szelektív károsodását. Immunhisztokémiával igazolták, hogy a tirozin-hidroxiláz immunreaktivitás a kimutatható szint alá csökkent mind az RPeD1 neuronok sejttestében, mind azok axonjában. Végül a HPLC vizsgálat a rotenon kezelés 7. napjára a DA szint jelentős (25%-os) csökkenését igazolta a neuronokban. Ezen eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a *Lymnaea stagnalis* megfelelő gerinctelen modell a Parkinson-kór tanulmányozására, mivel lehetővé teszi a dopaminerg rendszerek rotenonra adott válaszána közvetlen elemzését az idegrendszerben viselkedési és sejt szinten egyaránt. Ezen modell alkalmazhatóságát támasztja alá az, hogy a rotenon kezelés könnyen kivitelezhető, ugyanis vízben oldva felszívódik a testfelszínen, vagy lenyeli az állat a táplálkozás során. Emellett a kezelés hatására gyorsan kialakuló és könnyen nyomon követhető motoros deficit alakul ki, ami mozgási, táplálkozási, keringési és légzési zavarokkal is társul, végül az állat halálához vezet. Ennek hátterében elsősorban a nagyméretű dopaminerg RPeD1 neuron károsodása áll, amely alapvetően a mozgás koordinálásáért felelős jobb oldali lábdúcban (ganglion pedale) helyezkedik, de befolyásolja a táplálkozás szabályozásában szerepet játszó neuronok működését a pofadúcban (ganglion buccale), valamint ezen felül alapvető szerepe van a keringési és légzési rendszereket működtető központi mintázatgenerátorok (central pattern generator; CPG) szabályozásában is (Syed és Winlow 1991; Fodor et al. 2020). A *L. stagnalis* központi idegrendszerének sémás rajza a 2. ábrán tekinthető meg. Az RPeD1 neuron könnyen azonosítható elhelyezkedése és nagy mérete (80-120  $\mu\text{m}$ ) okán a jobb oldali pedális ganglionban a statociszta mellett, így segíti az elektrofiziológiai vizsgálatokat, a szövettani elemzéseket és megkönnyíti a dopaminerg mechanizmusok közvetlen vizsgálatát is. A rotenon kezelés során igazolt DA szint csökkenés, a tirozin-hidroxiláz (TH) immunreaktivitás hiánya és a dopaminerg sejtek szelektív károsodása szintén a modell alkalmazhatóságát igazolja a Parkinson-kór preklinikai vizsgálata során.



**2. ábra: A *L. stagnalis* központi idegrendszere és neuronjai.**

(A) Az izolált teljes központi idegrendszer sematikus ábrája (dorsalis nézet), amely a páros (bal és jobb) buccalis (LB, RB), agyi (LC, RC), pedalis (LPe, RPe), pleuralis (LPI, RPI), parietalis (LPa, RPa) és nem párosított zsigeri (V) ganglionokból áll. (B) Izolált központi idegrendszer, amely a 11 egymással összekapcsolt ganglion elrendeződését mutatja. A ganglionok felszínén élénk narancssárga színű, pigmentált idegsejtek találhatók. (C) Azonosított egyes neuronok: B4 (balra), B3 (jobbra; a táplálkozás végrehajtásáért felelős motoros neuronok), CGC (a táplálkozást és a tanulást moduláló interneuron az agyi ganglionokban) és RPeD1 (a légzést és a szívverést szabályozó interneuron a pedalis ganglionban).

A PACAP Parkinson-kór modellekben bizonyított neuroprotektív hatásának hátterében álló lehetséges mechanizmusokat korábban már részleteztem. Számos in vitro és in vivo Parkinson-kór modellben bizonyították védő hatását a dopaminerg sejteket érő károsodással szemben. A korábban részletezett vizsgálatokon kívül halakban és gerinctelenekben is bizonyították a PACAP védő hatását. MPTP-vel kezelés hatására zebradánió embriókban csökken a TH-pozitív neuronok száma a diencephalonban és a DA szint a telencephalon területén, amely károsodással szemben a PACAP kezelés neuroprotektívnek bizonyult (Poujol de Molliens et al. 2019). Ecetmuslicákon (*Drosophila melanogaster*) végzett vizsgálatok során a paraquat által kiváltott toxicitást a PACAP-kezelés javította, míg a PACAP antagonistá PACAP6-38 csökkentette a legyek paraquattal szembeni ellenálló képességét, amely védő hatást a caspase aktiváció és a reaktív oxigén gyökök felszabadulásának gátlásán keresztül ért el (Hajji et al. 2019). Ezek az eredmények megerősítik a PACAP evolúciósan konzervált védő hatását ezen neurodegeneratív kórképben.

Fodor I, Hussein AA, Benjamin PR, Koene JM, Pirger Z. The unlimited potential of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Elife*. 2020 Jun 16;9:e56962. doi: 10.7554/eLife.56962. PMID: 32539932; PMCID: PMC7297532.

Hajji K, Mteyrek A, Sun J, Cassar M, Mezghani S, Leprince J, Vaudry D, Masmoudi-Kouki O, Birman S. Neuroprotective effects of PACAP against paraquat-induced oxidative stress in the *Drosophila* central nervous system. *Hum Mol Genet*. 2019 Jun 1;28(11):1905-1918. doi: 10.1093/hmg/ddz031. PMID: 30715303.

Poujol de Molliens M, Jamadagni P, Létourneau M, Devost D, Hébert TE, Patten SA, Fournier A, Chatenet D. Design and biological assessment of membrane-tethering neuroprotective peptides derived from the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019 Nov;1863(11):129398. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.07.007. Epub 2019 Jul 12. PMID: 31306709.

Syed NI, Winlow W. Coordination of locomotor and cardiorespiratory networks of *Lymnaea stagnalis* by a pair of identified interneurons. *J Exp Biol*. 1991 Jul;158:37-62. doi: 10.1242/jeb.158.1.37. PMID: 1919413.

*Vehovszky A, Szabó H, Hiripi L, Elliott CJ, Hernádi L. Behavioural and neural deficits induced by rotenone in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. A possible model for Parkinson's disease in an invertebrate. Eur J Neurosci. 2007 Apr;25(7):2123-30. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05467.x. PMID: 17439496.*

**134. oldal: Mit jelent, mi a következménye annak, hogy a rotenon kezelés okozta dopamin és szerotonin szint változásokat a PACAP eltérő módon befolyásolja? Miért történik ez a kettősség?**

A *L. stagnalis* központi idegrendszerében a DA mellett nagy mennyiségben detektálhatók szerotoninerg neuronok is (Tuchina et al. 2012). Szerotonin immunpozitív neuronok találhatóak az agyi ganglionban és a buccalis ganglionokban, melyek fontos szerepet töltenek be a táplálkozás szabályozásában. A DA tartalmú sejtek mellett szerotoninerg neuronok találhatóak a mozgás szabályozásáért felelős pedális ganglionban is. Vizsgálatunk során rotenon kezelés hatására a DA szint mellett a szerotonin szint is csökkent, ami feltételezhetően annak a következménye, hogy a toxin hatására ezen sejtek is károsodást szenvedtek, melyek hozzájárulhatnak a motoros és táplálkozási deficit kialakulásához és az állatok korai halálához. A PACAP kezelést követően a szerotonin szint kapcsán nem találtunk hasonló emelkedést, mint a DA szint vizsgálata során, amiből arra következtethetünk, hogy a PACAP kezelés protektív hatása szelektíven csak az óriás RPeD1 dopaminerg sejteken érvényesül. Ezen feltételezés bizonyítására további vizsgálatok szükségesek.

*Tuchina OP, Zhukov VV, Meyer-Rochow VB. Distribution of serotonin and FMRF-amide in the brain of *Lymnaea stagnalis* with respect to the visual system. Dongwuxue Yanjiu. 2012 Jun;33(E1-2):e1-12. doi: 10.3724/SP.J.1141.2012.01-02e1. PMID: 22653864.*

**136. oldal: A IV.4.2.2. ábra üzenete, hogy a 6-OHDA kezelt oldali sejtszámcsökkenést az ingergazdag környezet megmenteni képes. A meglévő statisztikai különbség mögött csekély abszolútérték különbség van; mennyire lehet jelentős ez biológiailag? Akár a kevesebb sejt is lehet hatásosabb, ha a szinaptikus működése fokozódik a célterületen. Vannak (akár mástól korábbi) eredmények ezzel kapcsolatban?**

Ebben a kísérletben a korai ingergazdag környezet protektív hatását Parkinson-kór állatkísérletes modelljében vizsgáltuk. Az immunhisztológiai vizsgálat során szignifikánsan nagyobb sejtpusztulást találtunk a substantia nigra pars compactájában a 6-OHDA-nal kezelt standard ketrecben tartott állatokban a kontroll, fiziológiás sóoldattal kezelt állatokhoz képest. Ezzel ellentétben az ingergazdag környezetben tartott állatok esetében a 6-OHDA kezelés nem okozott szignifikáns sejt-károsodást a kontroll csoporthoz viszonyítva. A standard ketrecben tartott állatoknál a dopaminerg sejtek közel 24%-a károsodott, míg az ingergazdag környezetben tartott állatoknál a sejtpusztulás mértéke csaknem a fele (kb. 15%-os) volt az előző értéknek. Sajnos ez az arány a IV.4.2.2. ábráról nem olvasható le pontosan, mivel az y tengely jelölése során a 100%-os értéket 1,0-nak jelöltük, így a 15%-os különbség, csak 0,15%-os eltérésként értelmezhető. A szövettani vizsgálattal kimutatott szignifikáns eltérést a motoros tünetek vizsgálata során is igazolni tudtuk, ugyanis az ingergazdag környezetben tartott állatok itt is jobban teljesítettek az ágaskodások számában és a mozgással töltött idő tekintetében, ami az abszolútértékben kis mértékű sejtszám csökkenés jelentős biológiai szerepére utal.

Az ingergazdag környezet neuroprotektív hatását számos neurológiai kórkép állatkísérletes modelljében bebizonyították már, ennek kedvező hatásait először Donald O. Hebb írta le (1947), amikor megfigyelte, hogy a háziállatként tartott patkányok jobban teljesítettek problémamegoldó, memória- és tanulási feladatokban, mint az ingerszegény környezetben tartott állatok. Ezen első megállapítások óta számos tanulmány írta le a környezeti tényezők fontosságát és protektív hatását, amit a substantia nigra dopaminerg sejtjeinek védelme mellett más útvonalakon keresztül is képes

kifejteni.

Az ingergazdag környezet képes befolyásolni az idegrendszer fejlődését, növelni a gliogenezist az agykérgi régiókban és fokozni az oligodendrocyták számát; emellett elősegíti a szinapszisok kialakulását, valamint növeli az angiogenezist és a kéreg vastagságát (Kleim et al. 1996). Az ingergazdag környezet védő hatását kutatócsoportunk is kimutatta többféle károsító hatással szemben, mint például a postnatalis monosodium-glutamát toxicitás, és különböző újszülöttkori és felnőttkori retinakárosodások kapcsán (Kiss et al. 2011, 2013; Szabadfi et al. 2009). Számos vizsgálat bizonyítja, hogy az ingergazdag környezet az ischaemias és traumás sérülések által okozott idegi sérülésekkel szemben is védő hatással bír. Emellett kiemelkedő eredményeket értek el ingergazdag környezet alkalmazásával más neurodegeneratív betegségekben is, mint például a Huntington-kór, az Alzheimer-kór és az amyotrophias lateralsclerosis. A védőhatások hátterében álló mechanizmusok közé sorolható többféle neurotrofikus és neuroprotektív faktor, például az agyból származó neurotrofikus faktor (BDNF), az idegnövekedési faktor (NGF) és a gliasejtekből származó neurotrofikus faktor (GDNF) szintjének növekedése (Nithianantharajah et al. 2006). Ingergazdag környezetben nevelkedett állatok kevésbé érzékenyek az MPTP károsító hatására is, amely hátterében a striatumban detektálható emelkedett GDNF és BDNF expresszió, valamint a dopamin transzporter (DAT) csökkent szintje feltételezhető, melyek elősegítik a dopaminerg sejtek túlélését a károsító hatással szemben (Bezard et al. 2003). Továbbá leírták, hogy az ingergazdag körülmények között tartott patkányok jelentősen jobb motoros teljesítményt mutatnak 6-OHDA-indukálta károsítással szemben, ami a dopaminerg neuronok, a dopamin és metabolitjainak csökkent veszteségével társult a striatumban (Anastasia et al. 2009). Emellett GFAP-pozitív (gliális fibrilláris savas fehérje) sejtek megnövekedett számát is leírták ingergazdag környezetben nevelkedett állatokban. Ezen hatások mind hozzájárulhatnak az ingergazdag környezet neuroprotektív hatásához.

Anastasia A, Torre L, de Erausquin GA, Mascó DH. Enriched environment protects the nigrostriatal dopaminergic system and induces astroglial reaction in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2009 May;109(3): 755-65. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06001.x. Epub 2009 Feb 20. PMID: 19245661; PMCID: PMC3575174.

Bezard E, Dovero S, Belin D, Duconger S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Piazza PV, Gross CE, Jaber M. Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J Neurosci.* 2003 Dec 3;23(35): 10999-1007. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-35-10999.2003. PMID: 14657156; PMCID: PMC6741042.

Hebb D. The effects of early experience on problem solving at maturity. *Am. Psychol.* 1947;2:306–307.

Kleim JA, Lussnig E, Schwarz ER, Comery TA, Greenough WT. Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning. *J Neurosci.* 1996 Jul 15;16(14):4529-35. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-14-04529.1996. PMID: 8699262; PMCID: PMC6578852.

Kiss P, Atlasz T, Szabadfi K, Horvath G, Griecs M, Farkas J, Matkovits A, Toth G, Lubics A, Tamas A, Gabriel R, Reglodi D. Comparison between PACAP- and enriched environment-induced retinal protection in MSG-treated newborn rats. *Neurosci Lett.* 2011 Jan 10;487(3): 400- 5. doi: 10.1016/j.neulet.2010.10.065. Epub 2010 Nov 2. PMID: 21050880

Kiss P, Szabadfi K, Horvath G, Tamas A, Farkas J, Gabriel R, Reglodi D. Gender-dependent effects of enriched environment and social isolation in ischemic retinal lesion in adult rats. *Int J Mol Sci.* 2013 Aug 5;14(8): 16111-23. doi: 10.3390/ijms140816111. PMID: 23921682; PMCID: PMC3759902.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Sep;7(9): 697-709. doi: 10.1038/nrn1970. PMID: 16924259.

Szabadfi K, Atlasz T, Horváth G, Kiss P, Hamza L, Farkas J, Tamás A, Lubics A, Gábel R, Reglodi D. Early postnatal enriched environment decreases retinal degeneration induced by monosodium glutamate treatment in rats. *Brain Res.* 2009 Mar 9;1259: 107-12. doi: 10.1016/j.brainres.2009.01.004. Epub 2009 Jan 10. PMID: 19171125.

**141-144. oldal: Mit okoz vagy tükröz a PACAP szintjének csökkenése? Milyen sejtekben, milyen jelátviteli folyamatokban milyen működéseket befolyásolhat? Állnak eredmények vagy más adatok rendelkezésre (saját vagy más munkacsoport)?**

Egyre több tanulmány utal a PACAP mint diagnosztikai és prognosztikai biomarker lehetséges klinikai alkalmazására különböző kóros állapotokban. Az Alzheimer-kór, a migrén, a traumás agysérülés, a sclerosis multiplex és az agyvérzés mellett több más kórkép is a PACAP-szintek megváltozásával jár, azonban továbbra is nyitott a kérdés, hogy a PACAP-változások a betegség következményei vagy hozzájáruló tényezői lehetnek? Parkinson-kóros (PD) betegeknél szignifikánsan csökkent PACAP-38-szintekről számoltunk be. A PD-hez hasonlóan csökkent PACAP-38-szinteket találunk Alzheimer-kórban és sclerosis multiplexben is, ami kizárja a PACAP-38 betegség-specifikus diagnosztikai markerként való használatát, de jelezheti a krónikus neuropatológiai állapotok kialakulását, különösen az idős populációban. Mivel a plazma PACAP-38 szintje jelentősen csökkent a Hoehn-Yahr-skála 3. és 4. stádiumában, valamint az akinetikus-rigid altípusban, eredményeink felvetették annak lehetőségét, hogy a PACAP-38 ígéretes jelölt lehet a dopaminvesztés előrejelzésére. A plazma PACAP szintjének változása különböző betegség-alcsoportokat tükrözhet, és elősegítheti a betegség progressziójának nyomon követését. Bár a Parkinson-kór patogenezise nem egyértelmű, a plazma PACAP-38 szintjének mély agyi stimulációt (DBS) követő emelkedése rávilágít a PACAP-38 gyulladáscsökkentő szerepére a Parkinson-kórhoz kapcsolódó neuroinflammációban és glia-aktivációban, amelyet a betegség progressziójának kulcsfontosságú tényezőjeként azonosítottak. Ez az emelkedés pozitív terápiás választ jelezhet, amely egy egyszerű, nem-invazív laboratóriumi módszerrel számszerűsíthető és nyomon követhető. Reméljük, hogy a PD betegeknél a plazma PACAP-38 változásainak követése javíthatja a személyre szabott terápiás beavatkozások stratégiai tervezését, és segíthet a betegség jövőbeli kilátásait illetően világosabb prognózist adni.

**149. oldal: Mi a funkcionális és diagnosztikai jelentősége annak, hogy politraumatizált betegekben a PACAP/CRP és PACAP/LAR szintjei szimultán változnak?**

Klinikai kutatásaink során elsőként vizsgáltuk a PACAP-38 plazmaszintjének változását a politraumatizált betegekben a traumát követő 5 napon keresztül, és korreláltattuk a megfigyelt változásokat a CRP (C-reaktív protein), PCT (procalcitonin) és LAR (antiszedimentációs ráta) értékekkel. Mivel a betegek PACAP-38 szintjének analízise önmagában nem mutatott szignifikáns eltéréseket, ezért azt feltételeztük, hogy a mért PACAP szintek klinikai gyakorlatban is alkalmazott laboratóriumi markerekkel való összevetése hozzájárulhat a betegség hátterében zajló patomechanizmusok pontos feltérképezéséhez, a betegek immunológiai státuszának és prognosztikai mutatóinak megítéléséhez, és a megfelelő terápia kiválasztásához.

A klinikai gyakorlatban gyulladáshoz markerként alkalmazott CRP estén sem találtunk önmagában szignifikáns eltérést a vizsgált mintákban, azonban a PACAP-38 és CRP szintek között szignifikáns pozitív korrelációt találtunk. Így a PACAP-38 és a CRP szintek együttes elemzése alapján megerősítettük azt a feltételezést, hogy az antiinflammatorikus hatással rendelkező PACAP-nak (Delgado et al. 2003) és a CRP-nek is fontos szerepe lehet a trauma következtében aktiválódott endogén szisztémás gyulladáshoz válaszreakció (SIRS) kialakulásában, így a két marker együttes vizsgálata segítséget nyújthat a különböző inflammatorikus válaszreakciók klinikai monitorozására.

A CRP-hez hasonlóan a LAR esetében sem találtunk szignifikáns különbséget a különböző időpontokban gyűjtött minták elemzése során, annak ellenére, hogy korábban kimutatták, hogy a magas LAR értékekkel rendelkező intenzív terápiás osztályon kezelt páciensek jobb prognózissal rendelkeznek (Bogár et al. 2006). A teljes vizsgálati periódus analízise során szignifikáns összefüggést találtunk a PACAP-38 és a LAR értékek között, ugyanis mindkét faktor szintje emelkedő tendenciát mutatott a vizsgálat során, így a PACAP-38 szintek analízisével



megerősítettük a LAR prognosztikai markerként való alkalmazhatóságát politraumatizált betegek esetében.

*Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz mg, Leceta J, Ganea D, Gomariz RP. PACAP in immunity and inflammation. Ann N Y Acad Sci. 2003 May;992: 141-57. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03145.x. PMID: 12794054.*

*Bogar L, Molnar Z, Kenyeres P, Tarsoly P. Sedimentation characteristics of leucocytes can predict bacteraemia in critical care patients. J Clin Pathol. 2006 May;59(5): 523-5. doi: 10.1136/jcp.2005.033035. Epub 2006 Mar 13. PMID: 16533954; PMCID: PMC1860278.*

**151. oldal: Miért csökken a PACAP szint a nem ischaemias infarktus szövetében (miközben az ischaemias területen nem változik), mit jelent ez az elváltozás?**

A szívizomszövetben található endogén PACAP forrását elsősorban a myocyták között elhelyezkedő idegrostok jelenthetik. Alston és kutatócsoportja (2011) megfigyelte, hogy a szimpatikus rostok denzitása csökkent az infarctus területén, összehasonlítva az infarctus körüli és az egészséges szövetekkel, ugyanakkor PACAP-38 pozitív idegrostokat nem találtak az infarctus körüli szövetekben. Ezen megfigyelések összhangban állnak a mi eredményeinkkel, mivel a nem ischaemiás mintákban mi is szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szintet mértünk. Ezzel szemben, az ischaemiás mintákban - bár az idegrostok károsodása észlelhető volt - nem figyeltünk meg eltérést a PACAP-38 szintben a sham-operált állatokhoz képest. Eredményeinket megerősítik Alston és munkatársainak (2011) megfigyelései, akik a szövetekben - különösen az extracelluláris mátrixban, myocytákban és makrofágokban - fokozott PACAP immunreaktivitást észleltek a myocardialis infarctus (MI) egérmódeljében (még az idegrostok károsodása mellett is), ami azt sugallja, hogy az idegkárosodás következményeként fellépő csökkent PACAP szint kompenzációját segíthetik elő ezek a sejtek. Az akut myocardialis infarctus által kiváltott gyulladásos folyamatok gátlása elengedhetetlen a szövetek regenerálódásához (Ong et al. 2018), ami hozzájárulhat az antiinflammatorikus hatású endogén PACAP szöveti szintjének változásaihoz az infarctus területén (Delgado et al. 2016). Vizsgálataink alapján nem találtunk szignifikáns különbséget az ischaemiás területek és a sham-operált állatok szívizommintáiban mérhető PACAP szintek között, ami valószínűleg annak volt köszönhető, hogy a szöveti homogenizátumok nemcsak a cardiomyocytákat és idegelemeket, hanem egyéb sejteket (pl. makrofágok, immunsejtek) is tartalmazhattak, amelyek képesek voltak kompenzálni az idegrostok károsodása miatt bekövetkező PACAP szint csökkenést.

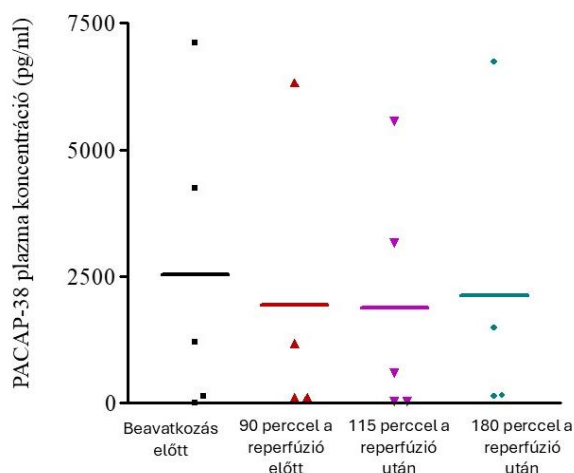
*Alston EN, Parrish DC, Hasan W, Tharp K, Pahlmeyer L, Habecker BA. Cardiac ischemia-reperfusion regulates sympathetic neuropeptide expression through gp130-dependent and independent mechanisms. Neuropeptides. 2011 Feb;45(1): 33-42. doi: 10.1016/j.npep.2010.10.002. Epub 2010 Oct 28. PMID: 21035185; PMCID: PMC3053070.*

*Delgado M. Immunobiology of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide In: Reglodi D, Tamas A. (eds) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-PACAP. Springer, Cham; 2016; pp. 691-708. doi: 10.1007/978-3-319-35135-3\_40*

*Ong SB, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE, Mukhametshina RT, Kwek XY, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. Pharmacol Ther. 2018; 186(1): 73-87. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.01.001. PMID: 29330085.*

**150-151. oldal: Sertésben szívüregi, emberben vénás vérben mér eltérő PACAP szint változásokat. Mennyire összevethetők ezek az eredmények?**

Vizsgálataink során PACAP méréseket a sertések plazma mintájából is elvégeztük, de a mérések során - korábbi neuropeptid vizsgálatokhoz hasonlóan - nagyfokú individuális különbségeket detektáltunk. A nagy szórás és az alacsony elemszám miatt sajnos nem tudtunk statisztikailag szignifikáns különbségeket kimutatni a vizsgált mintacsoportok között. A mérési eredményeink a csatolt ábrán láthatók (3. ábra). Emiatt sajnálatos módon a plazma szintek összehasonlítását nem tudtuk elvégezni, így a sertés modell kapcsán csak a szívizom mintákból készült szöveti homogenizátumokból tudtunk PACAP szinteket elemezni.



3. ábra: PACAP-38 plazma koncentrációjának mérése ELISA módszerrel sertés myocardialis infarctus modellben.

**120-150. oldal: A számtalan különböző kísérletben, ahol plazma PACAP szintet mér, mi lehet a PACAP forrása? A megbetegedett szerv, vagy valamilyen központi aktiválódott (idegrendszeri vagy immunrendszeri) mechanizmus felelős a különböző előjelű változásokért?**

A klinikai mintákban mérhető PACAP forrásának azonosítása jelenleg is az egyik legfontosabb célunk. Mivel a PACAP szinte minden szervben és szövetben megtalálható, így nagy mennyiségben detektálható a központi és perifériás idegrendszerben és az endokrin szövetekben. A különböző immunhisztológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok mellett, amit az anyatej esetében az emlőmirigy mintákon és sejtenyészeteken végeztünk el, jelenleg olyan vérminták gyűjtését kezdtük el, ahol különböző cardiovascularis beavatkozások során lehetőségünk nyílik a szisztémás keringés specifikusabb területeiről mintát gyűjteni. Így mintát gyűjtünk a pitvarokból, a kamrákból, az aortából és a jugularis internából is. Az a célunk, hogy pontosan feltérképezzük a szisztémás PACAP szint emelkedésének valódi forrását. A legújabb vizsgálataink során szignifikánsan magasabb PACAP szintet tudtunk kimutatni a pitvarokban és a kamrákban a perifériás vérmintákhoz képest, ami a PACAP lokális felszabadulására utal. Emellett emelkedett szintet mértünk transzkatóteres aorta billentyű beültetést követően a centrális vénás kanülből vett vérmintákban, ami bizonyíthatja a PACAP központi idegrendszeri eredetét.

**183. oldal: „Ismert, hogy a PACAP képes indukálni saját receptorának expresszióját, és feltételezhető, hogy az endogén PACAP hiányából adódóan a PAC1 receptor-mediálta útvonalak is háttérbe szorulhatnak.” Ismert a PAC1 receptornak más endogén ligandja? Ez befolyásolhatja az expressziót és jelátvitelt PACAP hiánya esetén is.**

A PACAP receptorai a G-proteinhez kapcsolt receptorok családjába sorolhatók. A PAC1 receptor (PACAP 1-es típusú receptora, PAC1R) specifikus endogén ligandjai a PACAP-27 és a PACAP38, melyekhez nagy affinitással kötődik, de ezek mellett a VIP is kapcsolódhat a receptorhoz. A PAC1 receptor specificitása disszociációs konstanssal ( $K_d$ ) igazolható, mely PACAP esetén  $K_d \approx 0,5$  nM, míg VIP esetén  $K_d > 500$  nM (Vaudry et al. 2009). A PAC1 receptorok nagyfokú heterogenitást mutatnak a különböző szövetekben, ahol kétféle PAC1 receptor típust azonosítottak: az I.A típusú receptorokat, amelyek mind a PACAP-27, mind a PACAP-38 iránt nagy affinitással rendelkeznek; és I.B típusú receptorokat, amelyek a PACAP-38 iránt nagy, de a PACAP-27 iránt alacsony affinitással rendelkeznek (Hamar et al. 2012). A sokrétű biológia hatás háttérében a különböző jelátviteli útvonalak és az alternatív splicing során kialakuló számos PAC1 receptor variáns is állhat (Blechman és Levkowitz 2013).

A PAC1 receptorok legszelektívebb agonistája a maxadilan, a homoki légy (*Lutzomyia longipalpis*) nyálmirigyéből izolált peptid, amelynek nem mutat szekvencia homológiát sem a PACAP-pal sem a VIP-vel (Moro és Lerner, 1997). A Max.d.4 (maxadilan  $\Delta 24-42$ ) és az M65 (maxadilan  $\Delta 25-41$ ; Uchida et al. 1998) a maxadilan szintetikus változatai pedig PAC1 receptoron antagonistá hatást fejtenek ki.

Girard és munkatársai PACAP KO és VIP KO egerekben vizsgálták a PACAP receptorok expressziójának változását a fejlődés során abból a célból, hogy feltérképezzék azt, hogy ezen nagy homológiát mutató peptidek és nagy átfedést mutató receptoraik expressziója kompenzációs módon változik-e az idegrendszer fejlődése során (Girard et al. 2006).

A három PACAP/VIP-receptor (PAC1, VPAC1 és 2) altípus expressziójának szabályozása a központi és a perifériás idegrendszerben még nem pontosan ismert. Számos fiziológiai helyzetben a peptidek és receptoraik expressziója ellentétes módon változik (Moller et al. 1997; Zhang et al. 1998; Zhou et al. 1999). Erre egy példa lehet, hogy idegi sérüléssel indukált PACAP és/vagy a PACAP mRNS expresszió a nervus facialis motoros neuronjaiban a PAC1 receptor mRNS csökkent expressziójával járt, ami arra utal, hogy a fokozott PACAP jelátvitel downregulációs hatással van a PAC1 receptor expressziójára (Moller et al. 1997; Zhou et al. 1999). Ennek megfelelően nem teljesen egyértelmű, hogy a peptid hiányában hogyan változik az adott receptor expressziója KO egerekben. Előfordulhat, hogy a különböző PACAP és VIP receptorok expressziója a peptidszintektől függetlenül szabályozódik, így a KO állatokban nem változik az expressziója a vad egerekhez képest az azonos fejlődési korú vad típusú kontrollokhoz viszonyítva. Emellett az is lehetséges, hogy a specifikus PACAP/VIP receptor altípusok expressziója a peptid-deleció következményeként fokozódik, vagy ahogy Girard és munkatársai is kimutatták hozzánk hasonlóan, a receptorok expressziója csökken a PACAP és VIP KO állatokban a vad típusú társaikhoz képest (Girard et al. 2006). A PAC1 receptor mRNS szintje a KO egerekben körülbelül 50%-kal csökkent a postnatalis 14. és 28. nap közötti időszakban a vad egerekhez képest.

Ebben az esetben az feltételezhető, hogy a PAC1 receptor jelenléte és expressziója független a PACAP jelenlététől. A PAC1 receptort kódoló gén transzkripciójához nem feltétlenül szükséges a PACAP jelenléte, ettől függetlenül más folyamatok is részt vehetnek az expresszió szabályozásában. Továbbá, az endogén PACAP hiányából adódó kompenzációs folyamatok során lehetséges, hogy más ligandok, mint a VIP is indukálhatják a receptor további expresszióját.

*Blechman J, Levkowitz G. Alternative Splicing of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptor PAC1: Mechanisms of Fine Tuning of Brain Activity. Front Endocrinol (Lausanne). 2013 May 21;4: 55. doi: 10.3389/fendo.2013.00055. PMID: 23734144; PMCID: PMC3659299.*

Girard BA, Lelievre V, Braas KM, Razinia T, Vizzard MA, Ioffe Y, El Meskini R, Ronnett GV, Waschek JA, May V. Noncompensation in peptide/receptor gene expression and distinct behavioral phenotypes in VIP- and PACAP-deficient mice. *J Neurochem.* 2006 Oct;99(2):499-513. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04112.x. PMID: 17029602.

Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR, Vaudry D, Vaudry H, Waschek JA, Said SI. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. *Br J Pharmacol.* 2012 May;166(1):4-17. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01871.x. PMID: 22289055; PMCID: PMC3415633.

Moller K, Reimer M, Ekblad E, Hannibal J, Fahrenkrug J, Kanje M, Sundler F. The effects of axotomy and preganglionic denervation on the expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP), galanin and PACAP type 1 receptors in the rat superior cervical ganglion. *Brain Res.* 1997 Nov 14;775(1-2):166-82. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00923-2. PMID: 9439840.

Moro O, Lerner EA. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem.* 1997 Jan 10;272(2):966-70. doi: 10.1074/jbc.272.2.966. PMID: 8995389.

Uchida D, Tatsuno I, Tanaka T, Hirai A, Saito Y, Moro O, Tajima M. Maxadilan is a specific agonist and its deleted peptide (M65) is a specific antagonist for PACAP type I receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Dec 11;865:253-8. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb11185.x. PMID: 9928019.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev.* 2009 Sep;61(3): 283-357. doi: 10.1124/pr.109.001370. PMID: 19805477.

Zhang X, Xu ZO, Shi TJ, Landry M, Holmberg K, Ju G, Tong YG, Bao L, Cheng XP, Wiesenfeld-Hallin Z, Lozano A, Dostrovsky J, Hökfelt T. Regulation of expression of galanin and galanin receptors in dorsal root ganglia and spinal cord after axotomy and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Dec 21;863:402-13. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10710.x. PMID: 9928186.

Zhou X, Rodriguez WI, Casillas RA, Ma V, Tam J, Hu Z, Lelievre V, Chao A, Waschek JA. Axotomy-induced changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP receptor gene expression in the adult rat facial motor nucleus. *J Neurosci Res.* 1999 Sep 15;57(6):953-61. PMID: 10467267.

**198. oldal: „Az emberi tejminták mellett széles körben vizsgálják a különböző növekedési faktorok és hormonok jelenlétét háziállatok (sertés, szarvasmarha, kecske, birka) tejmintáiban is, ugyanis ezen eredmények mind táplálkozástudományi, mind agrártudományi szempontból nagy jelentőséggel bírnak.” Mi történik a PACAP-bal a bélben, miután a tejet elfogyasztjuk? Mint egész peptid felvételre kerül? Emésztési folyamatokat irányít a chymusban? Túléli a gyomor pepsin emésztését?**

Az jól ismert, hogy a PACAP vérben mérhető féléletideje csak pár perc a DPP-IV enzim aktivitásának köszönhetően (Zhu et al. 2003). Ezzel szemben saját vizsgálataink során azt figyeltük meg, hogy a tejminták esetében nem volt szükség olyan proteináz inhibitor előkezelésre, mint a vérminták kapcsán, ahol a vérvétel során a mintákhoz minden esetben aprotinint adtunk (200 µl 1,4 mg/ml koncentrációjú aprotinin törzsoldat 10 ml vérhez), mivel a -20 °C-on tartott, szobahőre felolvasztott tejmintákban több héttel a mintagyűjtést követően is hasonló mennyiségű PACAP-ot tudtunk detektálni, mint a friss mintákban. Feltételezhető, hogy a PACAP az anyatejben valamilyen hordozó molekulához (pl. ceruloplazminhoz), vagy membrán vezikulumokhoz (exosomákhoz) kötötten található. Ezt igazolják azok az eredményeink, ahol a hipoallergén tápszerekben magasabb PACAP koncentrációt mértünk, mint a nem hidrolizált mintákban. A hipoallergén tápszerek extenzívebb hidrolitikus folyamatai valószínűleg hozzájárulhatnak ahhoz, hogy több kötött PACAP válhat szabaddá a kezelések hatására (Csanaky et al. 2013).

Jelenleg is folyamatosan zajlanak azon kísérleteink, ahol az anyatejmintákban mérhető PACAP exosoma frakciókban való jelenlétét vizsgáljuk. Elsődleges eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a tej vizes fázisában detektálható PACAP nagy része valószínűleg exosomákhoz kapcsoltnan fordul elő. A PACAP amfipatikus fehérjeként az exosoma membránjába is integrálódhat, és egy kisebb része az exosoma belsejébe zárva szállítható. Mivel az exosoma membrán - a sejtmembránhoz hasonlóan – egy lipid bilayer, így képes megvédeni a becsomagolt és a membránba integrálódott fehérjéket a cirkuláló, vagy szekretált peptidázokkal szemben. Mivel a PACAP az exosomák felszínén és azok belsejében is jelen lehet, így protektív hatását feltételezhetően receptorális úton (membránhoz kötött PACAP) és az exosoma-sejtmembrán fúziója után intracellulárisan is képes lehet kifejteni.

Mivel a szolubilis PACAP-ot az emésztőenzimek viszonylag gyorsan lebontják, így a vizes fázisban levő szolubilis PACAP biológiai hatását leginkább az emlőszöveten és a mucosalis felszíneken felszívódva az újszülött szájüregében és a tápcsatorna felső részén fejt ki. Ezzel szemben a zsíros fázisban és az exosomákban levő PACAP védve van az enzimek (pl.: pepsin) káros hatásával szemben, így a peptid a tápcsatorna alsó részébe eljutva direkt módon befolyásolhatja az enterocyták, az immunrendszer és a bél-mikrobiota érését, valamint a bél-agy tengely révén indirekten szabályozhatja az idegrendszer fejlődését.

Az jól ismert, hogy az emlőmirigy termel különböző proteáz inhibitorokat a tejben található bioaktív fehérjék védelmében, az újszülöttek DDP-IV aktivitása alacsonyabb, valamint az intestinalis epithelialis sejtek permeabilitása is nagyobb a makromolekulákkal szemben, mint a felnőtteké. Ezen hatások alapján feltételezhető a tejben detektálható PACAP hasznosulása a szoptatás során. Ennek pontos százalékáról nincs adatunk, de bárányok plazmamintájának vizsgálatával is bizonyítottuk effektív hasznosulását, ahol a bárányok plazma PACAP szintje kétszeresére emelkedett 1 órával a szoptatást követően és visszatért a kiinduló plazmaszintre 2 órával a szoptatás után (Pohóczky et al. 2020).

*Csanaky K, Reglődi D, Bánki E, Tarcai I, Márk L, Helyes Z, Ertl T, Gyarmati J, Horváth K, Sántik L, Tamás 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.*

*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.*

*Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE, Schmidt K, Bagchi A, Griffin PR, Thornberry NA, Sinha Roy R. The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). J Biol Chem. 2003 Jun 20;278(25):22418-23. doi: 10.1074/jbc.M212355200. Epub 2003 Apr 10. PMID: 12690116.*

Bízva válaszaim pozitív elbírálásában maradok tisztelettel:

*Dr. Tamás Andrea*

Dr. Tamás Andrea  
egyetemi docens  
PTE ÁOK Anatómiai Intézet