



Prof. Dr. Antal Miklós
egyetemi tanár
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet
Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2025. március 4.

Válaszok Professor Antal Miklós 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. Természetesen egyetértek Professor Úrral azzal kapcsolatban, hogy egyes klinikai kórképek esetében vizsgálataink első fázisában tartunk csak, így a klinikai minták leíró elemzése mellett további vizsgálatokra lesz még szükség a „miért” kérdések megválaszolásához. Más klinikai témák kapcsán, mint a Parkinson-kór, a cardiovascularis kórképek, a várandósság vagy a laktáció, azonban több állatkísérletes és molekuláris biológiai vizsgálatot is végeztünk abból a célból, hogy részletekbe menően tárjuk fel a tapasztalt eltérések hátterében álló mechanizmusokat. Sajnos több fejezet kapcsán ezen eredmények részletezésére nem volt lehetőségem, így annak ellenére, hogy a témához szorosan kapcsolódnak, a feltételezett háttérmechanizmusokat csak a diszkusszió fejezetben részleteztem, és dolgozatomban csak a legújabb klinikai vizsgálatokra fókuszáltam. A továbbiakban a feltett kérdésekre adott részletes válaszaim során szeretném bemutatni azokat a legújabb eredményeinket, melyek a talált klinikai eltérések hátterében álló lehetséges patomechnizmusokra világítanak rá.

Professor Úr kérdéseire adott részletes válaszaim az alábbiakban olvashatók:

I. Általános bevezető

I., Pályázó a PACAP előfordulásával kapcsolatban megemlíti, hogy az „legnagyobb mennyiségben az idegrendszerben és az endokrin mirigyekben detektálható. Az azonban nem derül ki, hogy az idegrendszer milyen részeiről és milyen endokrin mirigyekről van szó.

A PACAP legnagyobb mennyiségben a központi és perifériás idegrendszerben és az endokrin mirigyekben detektálható. A PACAP Arimura és munkacsoportja által publikált 1989-es felfedezését követően, ami izolált birka hypothalamusból történt a molekula hypophysisben kifejtett adenilát-cikláz aktiváló hatása alapján (Miyata et al. 1989), széles körben vizsgálták a neuropeptid és receptorainak előfordulását, valamint mRNS-ének expresszióját immunhisztokémia, radioimmuno-assay (RIA) és ELISA vizsgálatok, in situ hibridizáció és PCR módszerek segítségével (Miyata et al. 1989). Számos összefoglaló közlemény is született ezzel kapcsolatban Professor Köves Katalin munkacsoportjától, akik kezdetek óta aktív szerepet vállaltak a PACAP pontos idegrendszeri lokalizációjának feltérképezésében és endokrin mirigyekben betöltött szerepének részletes leírásában (Köves et al. 2020).

Arimura és munkacsoportja az első vizsgálatokat patkány szöveteken végezte el, ahol RIA módszert alkalmaztak a központi és perifériás szövetek PACAP tartalmának meghatározására. A legnagyobb PACAP-38 koncentrációt a hypothalamusban mérték, de más agyi régiók is jelentős mennyiségű PACAP-38-at tartalmaztak. Ezen vizsgálatban a szervek közül a here nagy mennyiségben tartalmazott PACAP-38-at, és a PACAP teljes mennyisége mindkét herében meghaladta az egész agyban mért mennyiséget. Az endokrin szervek közül a mellékvese tartalmazta

a második legmagasabb PACAP koncentrációt. Kisebb mennyiségű PACAP detektálható volt az emésztőrendszerben és más perifériás szövetekben is. A PACAP-27 minden szövetben csak kisebb részét képviselte a teljes PACAP immunreaktivitásnak (Arimura et al. 1991).

Későbbiekben számos központi idegrendszeri struktúra és perifériás szövet analízise is megtörtént, ahol az extrahypothalamikus struktúrák közül főképp a limbikus rendszerben és a retinohypothalamikus traktusban találtak jelentős PACAP expressziót. Palkovits és munkatársai (1995) az emberi agy 79 különböző régiójában (corticalis területek, hypothalamus, diencephalon más magjai, telencephalon, agytörzs, cerebellum és gerincvelő) mérte RIA segítségével a PACAP mennyiséget. A különböző agyterületek részletes felsorolása az 1. táblázatban olvasható.

PACAP immunpozitív sejtek találhatók az agyidegekhez és a gerincvelői idegekhez tartozó szenzoros ganglionok pseudounipolaris sejtjeiben, a motoneuronokban és a vegetatív idegrendszerben, ahol PACAP pozitivitást találtak a preganglionalis neuronokban és avegetatív ganglionok sejtjeiben is. Az autonóm PACAP immunreaktív rostok az erek, a szív és a különböző zsigerik mirigyait és simaizomrétegeit innerválják.

Az endokrin funkcióval rendelkező sejtek közül a PACAP-ot az agyalapi mirigy gonadotrop sejtjei, a mellékvese kromaffin sejtjei, a Langerhans-szigetek α - és β -sejtjei, valamint a gyomor mirigyekben található parietális sejtek is expresszálják és szekretálják. A PACAP néhány hypophysiotrop neuronból is felszabadul a portális keringésbe, amely segítségével regulálni képes az agyalapi mirigy működését. Emellett az endokrin szervek innervációjában is fontos szerepet töltenek be a PACAP immunreaktív szenzoros és a paraszimpatikus rostok, amit a neuropeptid speciális receptorain keresztül fejt ki (Köves et al. 2020).

Table 1
Concentrations of immunoreactive PACAP38 in human brain nuclei

Regions	PACAP levels (pg/mg protein)	Number of samples
<i>Cerebral cortical areas</i>		
Prefrontal cortex	277 ± 50.2	6
Frontal cortex	284 ± 27.0	7
Somatomotor cortex	238 ± 28.1	7
Somatosensory cortex	361 ± 47.9	7
Temporal cortex	407 ± 57.4	7
Occipital cortex	211 ± 29.1	7
Insular cortex	632 ± 39.8	7
Pyriiform cortex	491 ± 56.3	4
Rostral cingulate cortex	660 ± 89.5	7
Caudal cingulate cortex	542 ± 29.7	6
Entorhinal cortex	541 ± 70.6	6
Hippocampus	360 ± 54.1	7
Parahippocampal cortex	392 ± 28.3	7
Cerebral white matter	51 ± 9.8	6
<i>Telencephalic nuclei</i>		
Caudate nucleus	399 ± 25.6	7
Putamen	473 ± 49.2	7
Nucleus accumbens	683 ± 63.8	7
Globus pallidus (internal)	103 ± 15.9	7
Globus pallidus (external)	72 ± 3.9	7
Substantia innominata	500 ± 54.6	4
Nucleus basalis	379 ± 82.8	7
Nucleus of the diagonal band	2411 ± 165.0	7
Septum	2931 ± 304.1	5
Bed nucleus of the stria terminalis	4769 ± 89.3	4
Clastrum	524 ± 101.5	7
Amygdala	1008 ± 104.1	6

Table 1 (continued)

Regions	PACAP levels (pg/mg protein)	Number of samples
<i>Pontine nuclei</i>		
Pontine nuclei	110 ± 14.8	7
Pontine tegmentum	1271 ± 132.0	5
Locus coeruleus	1172 ± 152.6	4
Reticular formation	1294 ± 86.8	6
<i>Cerebellum</i>		
Vermis	141 ± 17.1	6
Hemispheres	106 ± 20.3	7
Flocculo-nodular lobe	121 ± 11.8	7
Nuclei	92 ± 9.0	7
White matter	113 ± 19.6	7
<i>Medulla oblongata</i>		
Spinal trigeminal nucleus	3297 ± 474.8	5
Vestibular nuclei	1516 ± 244.8	6
Cochlear nuclei	647 ± 85.3	6
Motor facial nucleus	2650 ± 267.8	5
Reticular formation	2115 ± 204.2	7
Inferior olive	67 ± 12.7	7
Gracile nucleus	1359 ± 247.1	5
Cuneate nucleus	1116 ± 130.4	7
Dorsal vagal complex	8193 ± 804.4	5
Ventrolateral medulla	1915 ± 144.1	6
<i>Spinal cord</i>		
Dorsal horn	1328 ± 172.3	6
Ventral horn	684 ± 90.2	5
Central gray matter	2179 ± 299.9	7
White matter (funiculi)	226 ± 39.4	7

The values are the mean ± S.E.M. for the number of samples indicated.

Table 1
 Concentrations of immunoreactive PACAP38 in human brain nuclei

Regions	PACAP levels (pg/mg protein)	Number of samples
<i>Diencephalic nuclei</i>		
Preoptic area	2524 ± 431.1	5
Supraoptic nucleus	2820 ± 219.4	5
Paraventricular nucleus	4008 ± 961.9	4
Median eminence-pituitary stalk	3857 ± 306.3	7
Periventricular nucleus	5834 ± 693.3	5
Arcuate nucleus	1649 ± 438.7	7
Ventromedial nucleus	3136 ± 268.9	4
Dorsomedial nucleus	1199 ± 304.4	6
Lateral hypothalamic area	1867 ± 288.3	6
Mamillary body	577 ± 59.8	6
Anterior thalamic nucleus	205 ± 40.4	5
Ventral anterior thalamic nucleus	161 ± 24.0	6
Ventral posterolateral thalamic nucleus	242 ± 46.3	6
Dorsal medial thalamic nucleus	161 ± 20.3	7
Pulvinar thalami	111 ± 20.8	7
Lateral geniculate body	69 ± 5.5	7
Medial geniculate body	693 ± 55.7	7
Habenula	1339 ± 169.1	5
Zona incerta	1485 ± 167.9	6
Subthalamic nucleus	212 ± 19.8	6
<i>Midbrain nuclei</i>		
Superior colliculus	1265 ± 34.4	6
Inferior colliculus	1217 ± 118.5	6
Central gray matter (dorsal)	2350 ± 302.4	6
Central gray matter (ventral)	3017 ± 389.7	4
Substantia nigra	297 ± 30.7	6
Ventral tegmental area	528 ± 77.6	6
Red nucleus	175 ± 36.0	7
Interpeduncular nucleus	1634 ± 265.7	7
Reticular formation	1216 ± 154.3	7
Median raphe nucleus	1616 ± 191.3	3

1. táblázat: PACAP-38 immunoreaktivitás vizsgálata különböző idegrendszeri struktúrákban (Palkovits et al. 1995.)

Arimura A. et al. *Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes.* *Endocrinology.* 1991 Nov;129(5): 2787-9.

Köves K. et al. *Current State of Understanding of the Role of PACAP in the Hypothalamo-Hypophyseal Gonadotropin Functions of Mammals.* *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Mar 6;11:88.

Miyata A. et al. (1989) *Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells.* *Biochem Biophys Res Commun* 164:567–574.

Palkovits M. et al. *Concentrations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human brain nuclei.* *Brain Res.* 1995 Nov 13;699(1):116-20.

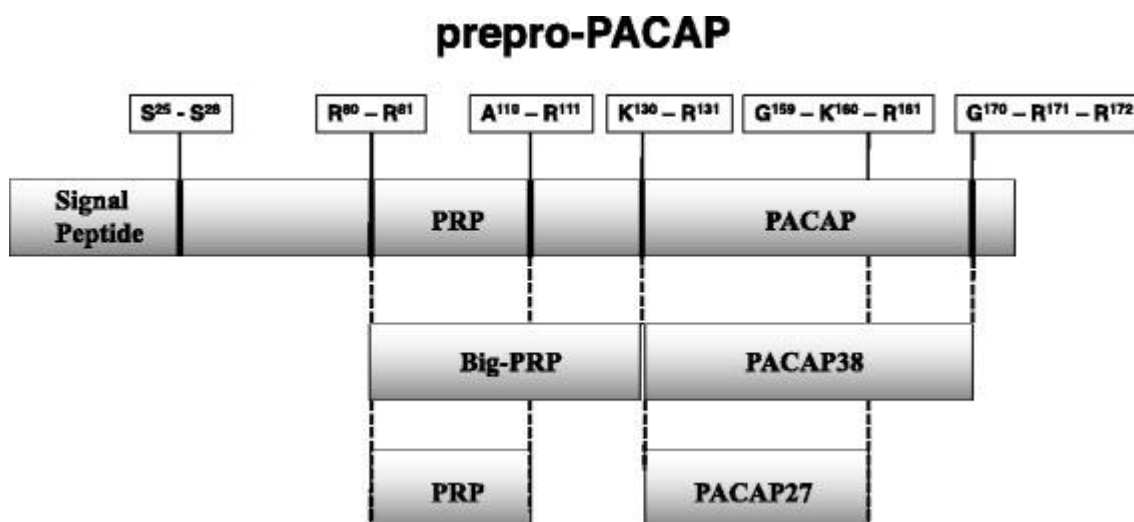
2., Nem derül ki a szövegből, hogy mi a viszony a PACAP két izoformájának (PACAP38 és PACAP27) a szintézise között. Két külön génről íródnak át, vagy csak egy PACAP gén létezik, amelyről a PACAP38 íródik át, és a PACAP 27 a PACAP38 poszttranszlációs módosításával keletkezik? Ezt azért lett volna jó az értekezésben tisztázni, hogy tudjuk, a PACAP génkiütött állatokban a PACAP mindkét izoformája, vagy csak az egyik hiányzik.

Miyata és munkacsoportja az általuk azonosított, 38 aminosavból álló peptidet PACAP-38-nak nevezte el, és mivel az N-terminális aminosav-szekvenciája (1-28 aminosavak) 68%-os homológiát mutatott a VIP-vel (vasoactive intestinalis polipeptid), ezért a molekulát a VIP/glükagon/szekretin családba sorolták. Egy évvel később izolálták a PACAP-27-et, a PACAP-38 N-terminális 27 aminosavból álló peptid-fragmensét. A rövidebb PACAP fragmensről is kimutatták, hogy a PACAP-38-hoz hasonló biológiai aktivitást mutat az adenilát-cikláz stimulálásában, a VIP-hez képest mintegy 1000-szer nagyobb mértékben (Miyata et al. 1990). A PACAP aminosav-szekvenciája minden emlősben csaknem azonos, és csak néhány aminosav eltérés igazolódott az alsóbbrendű állatokban. A PACAP evolucionálisan konzerválódott szerkezete az élettani funkciókban betöltött fontos szerepére utal.

Egy másik munkacsoport ezt követően a humán PACAP-38 prekurzorának és a humán PACAP-génnek a klónozásáról számolt be (Hirabayashi et al. 2018). Az előbbi cDNS-klón egy 176 aminosavból álló fehérjét kódol, amelyet „prepro-PACAP” néven ismerünk. A prepro-PACAP (1-176 aminosav) metabolizációja során egy szignálpeptid (1-25 aminosavak) és a pro-PACAP (26-176 aminosavak) jön létre. A proPACAP metabolizációja során egy kis fragmentum (26-79

aminosavak), egy nagy PACAP-hoz kapcsolódó peptid (PRP) (82-129 aminosavak) és C-terminális peptidek (132-170 aminosavak) keletkeznek. A C-terminális peptideket (132-170 és 132-159 aminosavak) a enzimek metabolizálják PACAP-38-cá, illetve PACAP-27-té, amelyeknek C-terminálisa amidált (1. ábra). A PACAP-27 esetében a humán PACAP genomiális szerkezetének elemzése kimutatta, hogy nem alternatív splicing mechanizmusok révén keletkezik, és a PACAP prekursor splice-variánsairól sem számoltak be.

Az endogén PACAP teljes vagy részleges hiányából adódó elváltozások tanulmányozását homo- és heterozigóta PACAP-génkiütött (KO) egereken végeztük el. Hashimoto és munkacsoportja a génmódosított egértörzs előállításához génkiütési technikát alkalmazott, amely során az 5. exonon olyan módosítás történt, ami megakadályozza a PACAP gén átíródását, ami a PACAP-38 és PACAP-27 kódolásáért is felelős, így mindkét fehérje hiányzik a KO egerekben (Hashimoto et al. 2001). A PACAP-38 expressziójának hiányát a PACAP^{-/-} egerek agyában (középgagy és diencephalon) RIA-val igazolták; emellett a PACAP-38 expressziójának jelentősen csökkenését írták le a heterozigóta (PACAP^{+/-}) egerekben a vad típusú egerekhez képest.



1. ábra. Az emberi prepro-PACAP szerkezete. A PACAP-38 és a PACAP-27 keletkezése a prepro-PACAP-nak nevezett PACAP prekurborból (Hirabayashi et al. 2018).

Miyata A. et al. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Jul 31;170(2): 643-8. doi: 10.1016/0006-291x(90)92140-u. PMID: 2383262.

Hashimoto H. et al. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 6;98(23): 13355-60.

Hirabayashi T. et al. Discovery of PACAP and its receptors in the brain. *J Headache Pain.* 2018 Apr 4;19(1):28.

3., Ahogyan az értekezésben olvasható a PACAP izoformák nagyfokú homológiát mutatnak a vasoactív intestinalis polipeptid (VIP) aminosav szekvenciájával. Ráadásul a PACAP 38 három receptora közül (PAC1, VPAC1 és VPAC2) kettő (VPAC1 és VPAC2) a VIP-et is köti.... Mindezeknek az ismeretében nem lett volna ajánlatos a PACAP-pal egyidejűleg a VIP koncentrációkat, és a VPAC1 és VPAC2 receptor expressziós mintázatokat is vizsgálni a különböző kísérletes modellekben, és különös tekintettel a PACAP génkiütött állatokban?

Természetesen egyetérték a Bírálóval, hogy a PACAP pontos hatásmechanizmusának teljeskörű feltérképezéséhez szükséges lett volna a PACAP VIP-vel közös receptorainak vizsgálata is. Mivel korábbi vizsgálatokban a PACAP neuroprotektív hatásának közvetítésében elsősorban a PAC1 receptor mediálta útvonalak szerepét igazolták, ezért mi is elsősorban erre összpontosítottunk. Bár az MTA Doktori értekezés alapjául szolgáló állatkísérletes vizsgálatokban nem került sor a VPAC receptorok mintázatának elemzésére, munkacsoportunk számos kutatásban

vizsgálta a PACAP-génkiütött egerek PACAP receptorainak (PAC1, VPAC1 és 2 receptorok) expresszióját. Ezek közül kiemelendők az érrendszerrel kapcsolatos kutatások, ahol azt tűztük ki célul, hogy vad típusú és PACAP KO egerekből izolált arteria carotis communis és arteria femoralis ereken megvizsgáljuk a PACAP-38, PACAP-27 és VIP vazorelaxációs hatásait, valamint feltérképezzük a PACAP receptorok eloszlását (Ivic et al. 2017; 2019).

Ezen vizsgálati modellekben, a belső fülben detektálható eltérésekhez hasonlóan igazoltuk, hogy a PACAP KO egerekben szignifikánsan alacsonyabb a PAC1 receptor expressziója a vad egerekhez képest, de szignifikáns eltéréseket detektáltunk a VPAC receptorok tekintetében, ami a PACAP KO egerek PACAP-27 és VIP kezelésre adott eltérő vazorelaxációs hatása mögött állhat (Ivic et al. 2017). Eredményeink azt is mutatták, hogy nőstény egerekben a PACAP által kiváltott vazorelaxációs válaszokat elsősorban a VPAC1 receptor közvetíti (Ivic et al. 2019). A PAC1 és VPAC receptorok expressziójának változását a csontfejlődés során is vizsgáltuk PACAP KO egerekben (Józsa et al. 2018), amely kutatások is igazolják a receptorok együttes vizsgálatának relevanciáját.

A jövőbeli állatkísérletes vizsgálataink tervezése során ezt szem előtt fogjuk tartani.

Ivic I et al. Backup Mechanisms Maintain PACAP/VIP-Induced Arterial Relaxations in Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide-Deficient Mice. J Vasc Res. 2017;54(3):180-192.

Ivic I. et al. VPAC1 receptors play a dominant role in PACAP-induced vasorelaxation in female mice. PLoS One. 2019 Jan 25;14(1):e0211433.

Józsa G. et al. Signalling Alterations in Bones of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Gene Deficient Mice. Int J Mol Sci. 2018 Aug 27;19(9):2538.

II. Hallórendszer

I., A hallórendszerre vonatkozó vizsgálatokat csirkéken és egereken végezték. Valami oknál fogva azonban a különböző vizsgálatokat különböző korú állatokon végezték el. ...

Mi indokolta az egyes vizsgálatok különböző korú állatokon való elvégzését? Másrészt, a különböző korú állatokon elvégzett kísérletekből kapott eredményeket hogyan lehetett egymással összevetni, és azokból valamilyen egységes következtetést levonni a PACAP-nak a hallórendszer működésében betöltött szerepét illetően?

A hallórendszerrel kapcsolatos kutatásaink esetén a vizsgálni kívánt állatok korát az in vitro és in vivo kísérletek során alkalmazott metodika határozta meg.

Az in vitro vizsgálataink során 1 napos csirkék belső füléből készült sejtenyészetet alkalmaztunk. A csirkék ductus cochlearisa egy enyhén hajlott csövet képez, és jóval rövidebb, mint az emlősöké, emellett az érzéksejtek sűrűsége is magasabb az emlősökéhez képest. Ebből fakadóan sokkal könnyebben preparálható, mint az emlősök ductus cochlearisa, ezért is választottuk ezt a modellt in vitro vizsgálataink kivitelezéséhez. Mivel egy sejtenyészet elkészítéséhez 40 csirkére volt szükségünk és az egy napos csirkékből már érett sejteket preparálhattunk, ezért 1 napos csirkék felhasználása mellett döntöttünk. Fontos kérdés, hogy a csirke cochlearis sejtjeiben talált eredmények hogyan kapcsolódhatnak az emlősök szőrsejtjeihez. A madarak belső fülének szőrsejtjei képesek regenerálódni a szőrsejtek károsodása vagy elhalása után, főként a sejtciklus újraindulása vagy a támogató sejtek transzdifferentiálódása révén. Ezzel szemben az emlősök kevesebb képességet mutatnak a belső fül sérülése után az érzékelő hámsejtek megújulására. A vizsgálatunk során alkalmazott oxidatív stresszel szemben elsősorban a szőrsejtek mutatnak szelektív érzékenységet, emiatt feltételeztük, hogy a modell jól alkalmazható a PACAP antiapoptotikus hatásának vizsgálatára. Emellett nem zárható ki, hogy a PACAP támasztósejtekre gyakorolt esetleges védőhatásának funkcionális jelentősége is lehet, ugyanis szerepet játszhat a támasztósejtek új szőrsejteké váló differentiálódásában (Rác et al. 2010).

A PAC1 receptor expressziót és a kanamicin ototoxikus hatását 5 napos egereken vizsgáltuk. Bár a legtöbb ototoxikus modellben felnőtt állatokat használnak, az újszülött állatok éretlen füle érzékenyebb az aminoglikozidok által kiváltott ototoxicitásra. Patkányokban és egerekben a hallás

érése a születés utáni időszakban fejeződik be, ezért ezek az állatok jó modellek a fejlődő fülre ható ototoxikus inzultusok patomechanizmusának vizsgálatára. Ezen megfontolásból a kanamicin okozta ototoxikus hatás vizsgálatához 5 napos állatokat kezeltünk egyszeri nagy dózisú kanamicinnel (1 mg/g testtömeg), amely a PACAP gén mRNS és/vagy fehérjeexpressziójában már változásokat okozhat. Emellett szintén fontos kiemelni, hogy az 5 napos állatok koponyája még kevésbé csontosodott, így decalcinálás nélkül nyílt lehetőségünk szövettani metszetek készítésére, ami nagymértékben segítette a belső fül struktúrájának megőrzését és a jó minőségű immunhisztológiai metszetek készítését (Tamás et al. 2012; Németh et al. 2014).

A funkcionális hallásvizsgálatokhoz, valamint a hallópálya különböző magjainak morfológiai vizsgálataihoz különböző korú felnőtt egereket használtunk. A kollaborációs munka keretében végzett funkcionális hallásvizsgálatok eredményei alapján terveztük meg a morfológiai vizsgálatokat. Mivel a hallásvizsgálat során a kor előrehaladtával a CD1 egerekre jellemző halláscsökkenés miatt csökkent a vad és KO egerek közötti különbség, ezért a morfológiai vizsgálatok során olyan fiatal felnőtt (1,5-6 hónapos) egereket használtunk, ahol a funkcionális vizsgálatok során a legnagyobb különbségeket detektáltuk a két csoport között. A funkcionális vizsgálatokat alapul véve ezen a csoporton belül nem tettünk további különbséget. A rendelkezésre álló egérállományból a korcsoporton belüli egerekkel dolgoztunk, ügyelve arra, hogy minden egyes vizsgálat során egymással azonos korú egereket használjunk az eredmények összehasonlíthatósága érdekében (Fülöp et al. 2019).

Vizsgálataink a hallórendszer tekintetében lefedték az élettartam nagy részét, az éretlen belső fülben végzett vizsgálatoktól az öregedő egerekig, aminek során összességében bizonyítani tudtuk a PACAP hallórendszerben betöltött védő szerepét exogén (H₂O₂, kanamicin) és endogén (öregedés) ágensekkel szemben. A vizsgálatok limitációja, hogy a három különböző állatmodellből származó eredmények elsősorban önmagukban külön-külön értelmezhetők.

Racz B. et al. PACAP ameliorates oxidative stress in the chicken inner ear: an in vitro study. Regul Pept. 2010 Feb 25;160(1-3): 91-8. doi: 10.1016/j.regpep.2009.12.003. Epub 2009 Dec 4. PMID: 19969027.

Tamas A. et al. Comparative examination of inner ear in wild type and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. Neurotox Res. 2012 May;21(4): 435-44.

Nemeth A. et al. Examination of calcium-binding protein expression in the inner ear of wild-type, heterozygous and homozygous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice in kanamycin-induced ototoxicity. Neurotox Res. 2014 Jan;25(1): 57-67.

Fulop DB. et al.. Hearing impairment and associated morphological changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. Sci Rep. 2019 Oct 10;9(1): 14598.

2., A 49. oldalon található immunhisztokémiai protokollal valami nincs rendben. Az értekezésben az olvasható, hogy „az alkalmazott primer antitestek: PAC1 receptor antitest (anti-nyúl), calretinin (anti-egér), calbindin (anti-egér), parvalbumin (anti-egér)”. Majd később: „másnap a metszeteket Alexa Fluor 568 és 488 másodlagos antitestekkel inkubáltuk”. Hogyan kell mindezt érteni?

Itt és máshol is számos primer antitestet használt a pályázó. Hogyan ellenőrizték az egyes primer antitestek specificitását a különböző kísérletes modellekben?

Elnézést kérek az immunhisztokémiai metodikai leírás pontatlanságáért! Az említett festés során nyúlban termelt PAC1 receptor ellenes primer antitestet használtunk, melyet minden esetben Alexa Fluor 568-cal konjugált nyúl ellenes másodlagos antitesttel jelöltünk, a Ca²⁺-kötő fehérjék esetében pedig primer antitestnek egérben termelt anti-calretinin, anti-calbindin és anti-parvalbumin antitesteket használtunk (külön metszeteken), melyeket minden esetben Alexa Fluor 488-cal jelölt egér ellenes másodlagos antitestekkel vizualizáltunk.

Az immunhisztológiai vizsgálatok kontroll festése során egyik alkalommal kihagytuk a primer, másik alkalommal a szekunder antitesteket, amely esetben specifikus festést nem detektáltunk. A szekunder egér antitest használata esetén sem detektáltunk vizsgálatunkat befolyásolható háttérfestődét.

Emellett a fehérjekimerítéseket is elvégeztük a vizsgálatokat megelőzően. Ezeket a kontroll vizsgálatokat Saper és Sawchenko közleménye szerint (2003) tartottuk megfelelőnek a specificitás vizsgálatára, ugyanis a szerzők leírják, hogy ha Western-blot vagy a KO vizsgálatokra nincs lehetőség, akkor a fehérjekimerítés is alkalmazható módszer. A Western-blot vizsgálatot azért vetettük el, mert az jól ismert, hogy értékelhetőségét befolyásolhatja, ha egy fehérjének több splice variánsa is létezik, ami jelen esetben a Ca^{2+} -kötő fehérjék kapcsán is ismert (Schwaller et al. 1995). Bár az irodalomban ismertek Ca^{2+} -kötő fehérje KO egértörzsek, sajnos nekünk nem volt lehetőségünk ilyen egértörzsek beszerzésére. Emellett a KO egerek alkalmazásának is limitációját jelenti, hogy mivel nagy fehérjéről van szó, ezért nem ütjük ki a fehérjét kódoló teljes génszakaszt, hanem csak annak egy kisebb régióját, esetleg egy exonját, mely a funkcióhoz elengedhetetlen. A fehérje egy fragmense, gyakran annak nagyobb része, bár az funkcióképtelen, a KO állatban is kifejeződik, és az antitest számára is felismerhető marad. Amennyiben az antitest nem kizárólag a deletált szakaszból transzlálódó epitópokat ismer fel, a KO szövet nem alkalmas az antitest tesztelésére.

Saper CB. et al. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. J Comp Neurol. 2003 Oct 13;465(2):161-3.

Schwaller B. et al. Alternative splicing of calretinin mRNA leads to different forms of calretinin. Eur J Biochem. 1995 Jun 1;230(2):424-30.

3., Nincs leírás az értekezésben arra vonatkozólag, hogy az immunfestett metszeteken az immunfestés intenzitásának mérését hogyan standardizálták, és tették az egyes mérési adatokat összehasonlíthatóvá.... Biztos a pályázó abban, hogy az immunhisztokémiai reakciók intenzitásának mérési adatai objektívek, standardizáltak és összehasonlíthatóak egymással?

Az immunfluoreszcencia mértékét az ImageJ 1.440 programmal határoztuk meg. A mérések minden esetben az eredeti (nyers) képeken történtek. A dolgozatban említett kontrasztosítást, az egyenetlen megvilágítás korrigálását kizárólag a cikkekben és az értekezésben megjelenő reprezentatív képeken végeztük el, azonban ezen képek esetében is az immunfluoreszcencia intenzitásának mérése a nyers képeken történt. A mérések standardizálása érdekében a képek digitalizálása során a mikroszkóp és a képolvasó szoftver egyazon beállítását használtuk az összes kép felvételekor. A digitalizált képek feldolgozásakor a vizsgált területeken kívül mindig mérésre került egy indifferens, specifikus immunjelölődést nem mutató terület is, amelynek háttérintenzitására a vizsgált sejtekben mért jelintenzitást korrigáltuk. Azon metszetek kapcsán, ahol az immunhisztológiai jelölések összehasonlítását végeztük vad és KO egerekben, minden esetben törekedtünk arra, hogy a metszetek ugyanolyan vastagok legyenek és a festéseket egyszerre és ugyanolyan hosszú ideig alkalmazzuk, így ezen faktorokból adódó esetleges eltéréseket minimalizáljuk. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy mérési adataink standardizáltak voltak, azokat objektívnek és egymással összehasonlíthatóknak vélelmezzük.

4., Szerencsésebb lett volna, ha a pályázó a mért adatok ábrázolására konzekvensen a box-plot diagramm ábrázolási módot választja, amiben feltünteteti az eredeti mérési pontokat is. Sajnos a box-plot ábrázolási mód csak egy-két esetben jelenik meg az értekezésben.

Egyetértünk Professzor Úrral abban, hogy a box-plot diagrammok sokkal informatívabbak a kutatási eredmények demonstrálása szempontjából. Ezért a klinikai vizsgálati eredményeink publikációja során már ezen ábrázolási mód használatára törekedtünk.

5., A kalcium-kötő fehérjék immunhisztokémiai kimutatását jobb lett volna kihagyni az értekezésből. Ezek az adatok nem adnak semmi újat a PACAP és PAC1 expressziós vizsgálatokhoz, ráadásul az immunfestések meglehetősen aspecifikusoknak tűnnek. A sejtmentes membrana tectoria például sokkal erősebb festődést mutat, mint a Corti szerv sejtjei. Hogyan magyarázza ezt a pályázó?

A Ca^{2+} -kötő fehérjékkel kapcsolatos vizsgálatainkat azért végeztük el, mert ismert, hogy a belső fül és azon belül is a szőrsejtek fiziológiás működéséhez elengedhetetlen az endolympha Ca^{2+} koncentrációjának megfelelő szabályozása, melyben fontos szerepe van a Ca^{2+} -kötő fehérjéknek. Korábban több kutatásban is vizsgálták a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziójának változását a cochleában (pl. zajkárosodás kapcsán), ami alapján feltételezhető, hogy fontos szerepük lehet a különböző ototoxikus ágensek szőrsejtkárosító hatásának kivédésében (Hackney et al. 2005), melyek halláskárosodáshoz vezethetnek (Huang et al. 2000). Munkánk során kimutattuk a Ca^{2+} -kötő fehérjék fokozott expresszióját endogén PACAP hiányában PACAP-génkiütött egerekben és kanamicin-indukálta károsodások esetén és ez alapján feltételeztük, hogy az antiapoptotikus és antioxidáns hatásokkal rendelkező PACAP is szerepet játszhat a szőrsejtek védelmében többek között a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziójának szabályozásával. Vizsgálataink során így elsőként mutattuk ki az endogén PACAP hiányából adódó fokozott vulnerabilitást kanamicin-indukálta károsodással szemben, mellyel további bizonyítékul szolgáltunk a PACAP potenciális protektív hatására vonatkozóan. A hatásmechanizmus hátterében álló mechanizmusok pontos feltérképezéséhez további vizsgálatok szükségesek.

A membrana tectoria aspecifikus immunfluoreszcens festődésének legvalószínűbb oka annak magas kollagéntartalmában keresendő (Thalman et al. 1986). Számos nem-kollagén típusú glycoprotein mellett az emlős membrana tectoria felépítésében II-es, V-ös és IX-es típusú kollagén is részt vesz (Goodyear és Richardson 2002). A kollagén autofluoreszcens festődése az általunk használt hullámhosszokon irodalmi adatokból is jól ismert (Zhao et al. 2017), emellett más kutatócsoportok által készített immunhisztológiai felvételeken is a miénkhez hasonló pozitivitást mutat a membrana tectoria (Ju et al. 2017). Ezen autofluoreszcencia natív metszeteken és a legtöbb immunhisztokémiai felvételen detektálható, így más antitestek esetén is jelen van. A metszetek értékelésénél az egyes sejtek analízisére fókuszáltunk a jól definiált sejthatárok körberajzolásával, a membrana tectoria jelölődésének intenzitását nem vettük számításba.

Goodyear RJ. et al. Extracellular matrices associated with the apical surfaces of sensory epithelia in the inner ear: molecular and structural diversity. J Neurobiol. 2002 Nov 5;53(2):212-27.

Hackney CM. et al. The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. J Neurosci. 2005 Aug 24;25(34): 7867-75.

Huang T. et al. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. Int J Dev Neurosci. 2000 Apr-Jun;18(2-3): 259-70.

Ju HM. et al. Usefulness of Intravital Multiphoton Microscopy in Visualizing Study of Mouse Cochlea and Volume Changes in the Scala Media. Front Neurol. 2017 Jul 31;8:332.

Thalman I. et al. Collagen--the predominant protein of the tectorial membrane. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 1986;48(2):107-15.

Zhao HL. et al. Autofluorescence of collagen fibres in scar. Skin Res Technol. 2017 Nov;23(4):588-592.

6., A PAC1 receptor expresszióját vizsgálva a hallópálya különböző magvaiban, azt találták, hogy a PACAP KO egerekben a PAC1 receptor expressziója csökkent a nucleus cochleris dorsalisban és ventralisban, a többi magban az expressziós szint megegyezett a vad típusú állatok expressziós szintjével. Hogyan magyarázza ezt a pályázó? Miért nem tűnik el a PACAP specifikus receptora azokban az állatokban, amelyek nem termelnek PACAP-ot?

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).

Az egyes receptor altípusok vizsgálata során, csökkent receptor mRNS szintet találtak mindkét KO egértörzsben, amelyek eltérő expressziós mintázatot mutattak a különböző egértörzsek között. A PAC1 receptor mRNS szintje a KO egerekben körülbelül 50%-kal csökkent a vad egerekhez képest. A vad állatokban a VPAC2 receptor mRNS szintek emelkedését figyelték meg a 14. napot követően, ami a KO egerekben nem volt kimutatható. Ehhez hasonlóan az agyi VPAC1 receptor mRNS expressziójának növekedése is később jelentkezett a KO állatokban a vad egerekhez képest. A KO egerekben detektálható különböző receptorális expressziós mintázatok feltételezett okai az endogén neuropeptid hiányából adódó elváltozások lehetnek. Bár a PAC1 receptor 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). Feltételezhetően a PACAP KO egerekben a PAC1 receptorokhoz endogén ligandként a VIP is kötődhet, ezért is expresszálódhat a KO egerekben.

A három PACAP/VIP-receptor altípus expressziójának szabályozása a központi és a perifériás idegrendszerben még nem pontosan ismert, ezért kimerítő válaszokat csak olyan kísérletek segítségével adhatunk a jövőben, ahol a PACAP és VIP hatását, valamint receptoraik változását egyszerre vizsgáljuk.

Girard BA. et al. Noncompensation in peptide/receptor gene expression and distinct behavioral phenotypes in VIP- and PACAP-deficient mice. J Neurochem. 2006 Oct;99(2):499-513.

Vaudry D. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. Pharmacol Rev. 2009 Sep;61(3): 283-357.

III. Fogfejlődés

1., Mít gondol a pályázó, hogyan hathat a PACAP a dentin és a zománc képződésére, ha PAC1 receptorokat csak a pulpa subodontoblastikus sejtjein sikerült kimutatni?

Annak ellenére, hogy a fejlődő fogak morfológiai vizsgálata során PAC1 receptort csak a subodontoblastikus rétegben és a dentalis papillában tudtunk kimutatni, a fogfejlődésben fontos szerepet játszó jelátviteli útvonalak (SHH, PTCH1, Gli1, Notch) immunhisztokémiai vizsgálatával szignifikáns eltéréseket találtunk az ameloblastokban is a vad egerek és a PACAP KO egerek között. A PACAP KO egerekben fokozott SHH, PTCH1 és intracelluláris Gli1 expressziót találtunk az ameloblastokban a vad egerekhez képest. Emellett a Notch jelátviteli útvonal receptorai közül a Notch2 expressziójában találtunk szignifikáns emelkedést a zománc termeléséért felelős ameloblast sejtekben a PACAP KO állatokban. A Notch ligandok közül a DLL1 mutatott szignifikáns emelkedést az ameloblastok citoplazmájában. A Notch jelátvitelben részt vevő intracelluláris molekulák közül a CSL jelintenzitása nőtt meg az ameloblastokban a PACAP-génkiűtött csoportokban a vad típusú egerekhez képest. Az endogén PACAP hiányában az adamantoblastokban detektálható jelátviteli eltérések arra utalnak, hogy a PACAP-nak hatása lehet a zománc fejlődésre ezen útvonalak szabályozásán keresztül.

2., Valószínű, hogy az odontoblastokból és a subodontoblastikus mesenchymából felszabaduló PACAP a subodontoblastikusan expresszálódó PAC1 receptorokon keresztül befolyásolhatja a fogpulpa érését. Ezért az is valószínűsíthető, hogy a PACAP KO állatokban a fogpulpa beszűküléséhez a PACAP hiánya is hozzájárulhat. Ennek a jelenségnek a molekuláris hátterét jó lett volna jobban megvizsgálni az értekezésben.

A fogak előtörését követően a zománccal ellentétben a dentin folyamatosan termelődik, így fiziológiásan is a pulpaűr lassú szűküléséhez vezet. A dentin fejlődési rendellenességeiben, endokrinológiai eltérések során, valamint a pulpa alacsony intenzitású krónikus irritációjában ez a folyamat felgyorsul, fokozott reaktív dentin képződés zajlik a fokozott védekezési reakciók

következményeként. A dentin és a pulpa embrionálisan és funkcionálisan nem választható el egymástól, az irodalom sokszor nem is külön hanem dentin-pulpa komplexként utal rá. Ezért minden olyan útvonal, ami dentin termelés és a fogfejlődés szabályozásában részt vesz, szerepet játszhat a pulpa szűkülésének szabályozásában is.

A PACAP és a fogfejlődésben döntő fontosságú jelátviteli útvonalak (SHH, fibroblast növekedési faktor (FGF), Wnt, csont morfogenikus protein (BMP)) közötti további lehetséges keresztutak azonosítása érdekében tovább folytattuk azokat a kutatásainkat, ahol megvizsgáltuk a PACAP hatását a BMP útvonalak szabályozására a metszőfogak fejlődése során. A vizsgálat során fejlődő fogcsírákban PACAP kezelés hatására fokozott Ca^{2+} lerakódást detektáltunk a proliferációs részeknek megfelelően. Western-blot analízis segítségével kimutattuk, hogy a BMP4, csont morfogenikus protein receptor (BMPR), protein kináz A (PKA) és foszfo-PKA (p-PKA) fehérjeexpressziója csökkent a neuropeptid jelenlétében, míg a Smad1 expressziója nem változott szignifikánsan. A PACAP KO egerek metszőfogai emelkedett BMP4, BMPRI és Smad1 expressziót mutattak a heterozigóta és vad állatokhoz képest. Ezen útvonalak szabályozásában való részvétel szintén szerepet játszhat a pulpa szűkülésének szabályozásában.

IV. Várandósság, laktáció

1., Azt találták, hogy a terhesség alatt az anyai vér PACAP szintje nő, szüléskor leesik, majd újra visszaemelkedik a terhesség előtti szintre. Jelentős koncentrációban tudták kimutatni a PACAP-ot újszülöttek vérében is. Ugyanakkor a PACAP szintjét lényegesen alacsonyabbnak mérték az umbilicális erekben, mint az újszülöttek perifériás vérében. Mi okozza ezeket a változásokat a vérben mérhető PACAP koncentrációkban? Milyen sejtek ürítik a PACAP-ot a vérbe és ezekre hogyan hat a terhesség előmenetele, az anyában és a magzatban?

A várandósság és szülés során detektálható PACAP szint változások azt bizonyítják, hogy az endogén PACAP szintek érzékenyen reagálnak ezen élettani folyamatokat követő hormonális változásokra. A várandósság neuroendokrin szabályozásában részt vevő központi idegrendszeri struktúrák (hypothalamus, adenohypophysis, neurohypophysis) - mely rendszerek érzékenyen követik a fiziológiás folyamat alatt zajló hormonális változásokat a különböző stimuláló hormonok termelésének szabályozásával - és emellett más endokrin mirigyek sejtjei pl. az ovarium is szerepet játszhat a PACAP szint emelkedésében (Koppán et al. 2022).

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 abortuszról származó és terminusra született placentákból gyűjtöttük. Mintát vettünk a placenta foetalis felszínén elhelyezkedő chorinbolyhokból (trophoblast sejtekből) és 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. 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.

A magzatok PACAP szintjének változásáról a várandósság alatt sajnos nincsenek eredményeink, és más klinikai vizsgálatok sem ismertek ezzel kapcsolatban.

Brubel R. et al. 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.

Koppan M. et al. Female reproductive functions of the neuropeptide PACAP. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Sep 20;13:982551.

Steinstrup BR. et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): occurrence and vasodilatory effect in the human uteroplacental unit. *Regul Pept*. 1996 Mar 22;61(3):197-204.

2., Mi magyarázza azt, hogy az újszülöttek perifériás vérében lényegesen magasabb PACAP koncentrációt lehetett mérni, mint az umbilicalis erekben, különösen a vena umbilicalisban?

A köldökerekben mérhető PACAP forrása pontosan nem ismert. Az arteria umbilicalisban, amely a magzat vénás vérét szállítja a placentába, szignifikánsan magasabb PACAP szintet mérünk, 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). Úgy gondoljuk, hogy a magzat perifériás vérében detektálható magasabb PACAP szint arra utal, hogy a fehérje neurotrofikus faktorként kulcsfontosságú szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében, beleértve a neurogenesis, myelinizáció, neuronális differenciáció és migráció szabályozását (Watanabe et al. 2016). Emellett immunmoduláló hatásának köszönhetően a PACAP nélkülözhetetlen az újszülöttek immunrendszerének fejlődésében, valamint a különböző patogénekkal szembeni védekezésben (Delgado et al. 2016).

Vizsgálataink során az umbilicalis erekben mérhető PACAP koncentrációt 3 napos újszülöttekből vett perifériás vérmintákkal hasonlítottuk össze, így lehetséges, hogy az áll a különbségek hátterében, hogy a mintavétel nem ugyanazon időben történt. Pontosabb összefüggést akkor tudtunk volna leírni, ha a perifériás vért az újszülöttektől a szülés alatt gyűjtjük, de sajnos erre nem volt lehetőségünk.

Delgado M. et al. PACAP in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 May;992:141-57.

Reglodi D. et al. 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.

Watanabe J. et al. PACAP and neural development In: Reglodi D, Tamas A. (eds) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-PACAP*. Springer, Cham; 2016; pp. 65-82.

3., Milyen sejtek vannak az anyatejben, és azok közül melyek termelhetnek PACAP-ot? Mi az a mechanizmus, amelynek a segítségével az anyai vérben keringő PACAP az anyatejbe kerülhet?

Az anyatejben található sejtek közül az emlőmirigyből származó glandularis epithel sejtek, valamint a különböző immunológiai funkcióval rendelkező macrofágok, granulocyták és lymphocyták is szerepet játszhatnak a PACAP termelésében, ami által a PACAP fontos immunmodulátor szerepet is képes betölteni (Ganea et al. 2003).

Az anyatejben számos hormon, növekedési faktor és peptid jelenléte azonosítható. Ezek közül vannak olyan faktorok, amelyeknek a PACAP-hoz hasonlóan a tejben mérhető koncentrációja magasabb, mint a plazmában mérhető szint (pl.: az ösztrogén, a gonadotrop-releasing hormon (GnRH), a thyreotropin-releasing hormone (TRH), a VIP, a somatostatin (SOM), a növekedési hormon releasing hormon (GHRH), a bombesin, a neurotensin, az oxitocin, a PRL, és különböző növekedési faktorok és prosztaglandinok). Ezzel szemben például a glükokortikoidok, az androgének, a progeszteron, a pajzsmirigy stimuláló hormon (TSH) szintje alacsonyabb a tejben, mint a plazmában (Grosvenor és mtsai 1993). Az anyatejben azonosítható faktorok közül egyesek aktivitás és strukturális változás nélkül jutnak a vérből az anyatejbe (VIP, TRH, somatostatin), míg mások glikoziláción, foszforiláción és proteolízisen esnek át. A különböző anyagok paracellularis és transcellularis útvonalakon keresztül jutnak a vérből a tejbe. Az immunglobulinok, a transzferrin, különböző hormonok (pl.: prolactin, ösztrogén, inzulin), cytokinek, lipoproteinek és más makromolekulák vesicularis transcytosissal kerülnek a vérből az anyatejbe (Lyons et al. 2020).

Egyes hormonok, növekedési faktorok és bioaktív anyagok nem csak a véráramból kerülhetnek a tejbe, hanem közvetlenül az emlőmirigyben is szintetizálódnak (parathormon related protein (PTHrP), GnRH, PRL, inzulinszerű növekedési faktor (IGF), epidermális növekedési faktor (EGF), laktoferrin, transferrin és kazomorfin) (Grosvenor és mtsai 1993). Ezen mechanizmusok feltételezhetően szerepet játszanak a folyamatban, de a mechanizmus pontos feltérképezése jövőbeli céljaink közé tartozik.

Ganea D. et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: players in innate and adaptive immunity. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2003 Mar;49(2):127-42.

Grosvenor CE. et al. Hormones and growth factors in milk. Endocr Rev. 1993 Dec;14(6):710-28.

Lyons KE. et al. Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. Nutrients. 2020 Apr 9;12(4):1039.

4., Ahogyan a pályázó írja az értekezésben a PACAP féléletideje a vérben néhány perc. Mennyi a PACAP féléletideje az anyatejben? Az újszülött emésztő rendszerébe kerülő PACAP-nak körülbelül hány százaléka szívódik fel, és mennyi a PACAP féléletideje az újszülöttek vérében?

Ahogy az a kérdésben is olvasható a PACAP vérben mérhető féléletideje csak pár perc a DPP-IV (dipeptidil-peptidáz-IV) enzim aktivitásának köszönhetően (Zhu et al. 2003). Újszülöttek kapcsán ilyen vizsgálatokat nem végeztek, de feltételezhetően ugyanazon testfolyadékban hasonló értékekkel számolhatunk. A tejben mérhető féléletideje pontosan nem ismert, de 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 kapcsolatosan 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 mucosális 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 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 DPP-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. Azzal kapcsolatban nincsenek pontos adatok, hogy a tejben található PACAP hány százaléka szívódik fel és kerül az újszülött vérébe, de bárányok plazmamintájának vizsgálatával 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. et al. Examination of PACAP38-like immunoreactivity in different milk and infant formula samples. Acta Physiol Hung. 2013 Mar;100(1): 28-36.

Pohóczky K. et al. 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.

Zhu L. et al. 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.

V. Parkinson-kór

1., Elsődleges kérdésként merül fel ezzel a kísérlet sorozattal kapcsolatban az, hogy a rotenon kezelés tekinthető-e a gerinctelenek Parkinson-kór modelljének?

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 μM) akut és krónikus rotenon kezelésnek vetették alá, amely progresszív és irreverzibilis viselkedési zavarokat okozott az állatoknál. Az általunk is alkalmazott subletális dózisú 0,5 μM 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 RPeD1 (Right Pedal Dorsal 1; RPeD1) neuron által kiváltott posztszínaptikus 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 gyorsan kialakuló és könnyen nyomon követhető motoros deficitek alakulnak 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 nagyméretű dopaminerg neuronok (RPeD1) könnyen azonosíthatók, így segítik az elektrofiziológiai vizsgálatokat, a szövettani elemzéseket és megkönnyítik 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.

Fodor I. et al. The unlimited potential of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Elife*. 2020 Jun 16;9:e56962. doi: 10.7554/eLife.56962.

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.

Vehovszky A. et al. 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.

2., A substantia nigra szövetmintákban mérték a szerotonin koncentrációját is. Azt találták, hogy a szerotonin szint is jelentősen csökkent, de a szerotonin szint csökkenését nem mérsékelte a 6-OHDA kezelés előtt alkalmazott PACAP injekció. Hogyan magyarázza pályázó ezt a jelenséget? Mi okozta a 6-OHDA kezelés utáni szerotonin szint csökkenést a substantia nigra-ban, és ezt a csökkenést miért nem mérsékelte a PACAP?

Számos vizsgálat igazolta, hogy a szerotonin szintje csökken a striatumban és az extrastriatalis szövetekben Parkinson-kór kapcsán, ami bizonyítja szerepét a betegség patológiájában (Politis és Niccolini 2015). A szerotoninerg rendszer fő központja az agytörzs raphe magjai, ahonnan cranialis és caudalis irányban is indulnak szerotoninerg pályák. A rostralis kisugárzás fő projekciója a hypothalamus, a bazális ganglionok, az amygdala, a cingulum, és a hippocampus, míg a caudalis projekció az agytörzs caudalis részébe és a gerincvelő felé irányul. A megváltozott szerotoninerg neurotranszmisszió hozzájárulhat a Parkinson-kórra jellemző motoros és nem motoros tünetek kialakulásához.

A Parkinson-kór korai stádiumában megfigyelhető a Lewy-testek lerakódása az agytörzs szerotoninerg neuronjait tartalmazó raphe magokban, amely adatok arra utalnak, hogy a caudalis agytörzs szerotoninerg neuronjai előbb lesznek érintettek a betegség progressziója során, mint a dopaminerg közepagyti neuronok.

Hozzánk hasonlóan több munkacsoport is leírta már, hogy féloldali 6-OHDA kezelést követően csökken a szerotonin szint a striatumban, a prefrontalis kéregben, a hippocampusban, az agytörzsben és a substantia nigra területén is (Andrzejewski et al. 2017; Kamińska et al. 2017). A PACAP szerotoninerg neuronokra kifejtett hatását is vizsgálták már, többek között intézetünkben Gaszner Balázs munkacsoportja is leírta, hogy endogén PACAP hiányában a PACAP KO egerek nucleus raphe dorsalisában emelkedik a szerotonin szint, amiből azt a következtetést vonták le, hogy a PACAP szerepet játszhat a szerotoninerg funkció szabályozásában (Kormos et al. 2016).

A PACAP kezelést követően nem tapasztaltunk szerotonin szint emelkedést a substantia nigra területén, ennek hátterében feltételezhetően az állhat, hogy a substantia nigrába injektált PACAP az agytörzsben elhelyezkedő szerotoninerg neuronok működését nem tudta befolyásolni, így protektív hatását szelektíven a substantia nigrában található dopaminerg sejteken vagy nigrostriatalis rendszerek aktivitásán keresztül fejti ki.

Andrzejewski K. et al. Serotonergic system in hypoxic ventilatory response in unilateral rat model of Parkinson's disease. *J Biomed Sci*. 2017 Mar 27;24(1):24.

Kamińska K. et al. Depressive-like neurochemical and behavioral markers of Parkinson's disease after 6-OHDA administered unilaterally to the rat medial forebrain bundle. *Pharmacol Rep*. 2017 Oct;69(5):985-994.

Kormos V. et al.. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience*. 2016 Aug 25;330:335-58.

Politis M, Niccolini F. Serotonin in Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2015 Jan 15;277:136-45. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.037. Epub 2014 Jul 31.

3., A 6-OHDA kezelést elvégezték olyan állatokon is, amelyeket ingergazdag környezetben neveltek fel. Miután mérték az állatok különböző mozgási mintázatait arra a következtetésre jutottak, hogy az ingergazdag környezet protektív hatású a Parkinson-kór motoros tünetei kialakulásának a tekintetében. Mivel magyarázza pályázó ezt a protektív hatást?

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. Ezen első megállapítások óta számos tanulmány írta le a környezeti tényezők fontosságát. Az ingergazdag környezet képes befolyásolni az idegrendszer fejlődését, növelni a gliogenezist az agykérgi régiókban és az oligodendrocyták számát; emellett fokozza 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 (Kiss et al. 2011, 2013; Szabadfi et al. 2009). A Parkinson-kór modellezése során igazolódott védőhatások háttérében 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 és Hannan 2006). Ingergazdag környezetben nevelkedett állatok kevésbé érzékenyek az MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) károsító hatására, amely háttérében 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. et al. 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.

Bezard E. et al. 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.

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

Kleim JA. et al. 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.

Kiss P. et al. Comparison between PACAP- and enriched environment-induced retinal protection in MSG-treated newborn rats. Neurosci Lett. 2011 Jan 10;487(3): 400- 5.

Kiss P. et al. 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.

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

Szabadfi K. et al. Early postnatal enriched environment decreases retinal degeneration induced by monosodium glutamate treatment in rats. Brain Res. 2009 Mar 9;1259: 107-12.

4., Milyen következtetéseket lehet levonni ezekből a vizsgálatokból a PACAP vérben mért koncentrációja és a Parkinson-kór kialakulása és progressiója között?

Vizsgálatainkban szignifikánsan csökkent PACAP-38 szintekről számoltunk be Parkinson-kóros (PD) betegeknél. A PD-hez hasonlóan csökkent PACAP-38 szinteket találunk Alzheimer-kórban és szklerózis multiplexben is, ami kizárja a PACAP-38 betegség-specifikus diagnosztikai markerként való használatát, de jelezheti a krónikus neuropatológiai állapotok kialakulását, különösen az idős populációban.

Azonban továbbra is nyitott a kérdés, hogy a detektálható PACAP szint változások a betegség következményei vagy a csökkent PACAP szint vezet az egyes kórképek kialakulásához. Ezen kérdés megválaszolására egy olyan széleskörű és hosszútávú vizsgálatra lenne szükség, ahol a populáció PACAP szintjének folyamatosan monitorozásával követnénk nyomon az egyes betegségek kialakulása és a PACAP szint változása közötti összefüggéseket. Klinikai vizsgálataink limitációját az jelenti, hogy a betegek PACAP szintjeit csak az egészséges kontrollok eredményeihez tudjuk hasonlítani, mert nem állt rendelkezésünkre olyan minta, amit az adott páciensről gyűjtöttünk a betegség kialakulása előtt.

A jövőben a Parkinson-kóros betegekkel kapcsolatban olyan hosszútávú kutatásokat tervezünk, ahol egy páciensről több alkalommal is mintát szeretnénk gyűjteni. Az első tünetek megjelenésétől kezdve, a betegség progrediációja során, a mély agyi stimuláció előtt és azt követően, mellyel pontosabb képet kaphatunk a PACAP klinikai monitorozásra való alkalmazhatóságával kapcsolatban.

Mivel a plazma PACAP-38 szintje jelentősen csökkent a Hoehn-Yahr-skála 3. és 4. stádiumában, valamint az akinetikus-merev 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 nyomonkövetését. 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 gliaktivációban, 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.

Mivel a pontos összefüggések feltérképezésére még további vizsgálatok szükségesek ezért még csak remélhetjük, 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.

VI. Politraumatizált betegek

A PACAP mennyiségében enyhe emelkedést találtak az idő előrehaladásával, amely enyhe korrelációt mutatott a C-reaktív protein és a leukociták antiszedimentációs rátájával. Ebből arra következtek, hogy a PACAP szerepet játszhat a politraumatizált betegekben kialakuló gyulladós folyamatok szabályozásában, mivel irodalmi adatok azt mutatják, hogy számos immunszervben található PACAP immunpozitív sejtek. Következik ebből az is, hogy a vérben mérhető PACAP szint emelkedik más gyulladós betegségeknél is?

Jól ismert, hogy a PACAP gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkezik azáltal, hogy szabályozza a pro- és az anti-inflammatorikus mediátorok termelését. Abad és munkatársai kimutatták, hogy a PACAP gátolni képes az arthritis során aktiválódó gyulladós és autoimmun faktorok expresszióját (Abad et al. 2001). Emellett PACAP immunreaktív sejteket mutattak ki különböző immunszervekben, és fontos szerepe van az az immunsejtek működésének szabályozásában (Delgado et al. 2003). Ezen alapvető adatok alapján feltételezhető, hogy a PACAP szerepet játszhat számos akut és krónikus gyulladós állapot és autoimmun kórkép patomechanizmusában, azonban mennyisége nem minden gyulladós betegség esetében mutat emelkedést.

Több musculosceletalis rendszert érintő gyulladós folyamatban is vizsgálták a PACAP jelenlétét különböző testfolyadékokban. Primer térd osteoarthritisben szenvedő betegek synovialis folyadékában (SF) szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szintet mértek, mint a kontrolloknál, azonban a vizsgált személyek szérumban PACAP-38 szintje között nem volt szignifikáns különbség (Sun ZP et al. 2019).

Alacsonyabb SF PACAP-38 koncentrációt találtak az elülső keresztszalag-sérülést követő poszttraumás térdízületi osteoarthritisben szenvedő betegeknél is, míg a szérumban PACAP-38 szintek nem különböztek jelentősen a vizsgált csoportokban (Sun BY et al. 2019).

Primer Raynaud-szindrómában szenvedő serdülőkben a PACAP-38 plazmaszintje egyik vizsgált csoportban sem változott jelentős mértékben (Mosdósi et al. 2018).

Lamivudin-terápia alatt álló krónikus hepatitis B vírus (HBV) fertőzött betegeknél kezdetben a plazma PACAP-38 szintje magasabb volt az egészséges kontrolloknál, mint a HBV betegeknél, de az antivirális terápia befejezése után jelentősen emelkedett PACAP szinteket mértek (Elefsiniotis et al. 2003).

Korábbi kutatások nem találtak szignifikáns PACAP szint eltérést SARS-CoV2 fertőzés során (Temerozo et al. 2022), amit jelenleg zajló vizsgálati eredményeink megcáfolnak, ugyanis munkacsoportunk szignifikáns emelkedést mutatott ki súlyos állapotban lévő COVID-19 betegek plazmájában a kontroll és az enyhe tünetekkel rendelkező betegekhez képest. Ezen vizsgálati eredményeink elemzése jelenleg is tartanak.

Abad C. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits collagen-induced arthritis: an experimental immunomodulatory therapy. J Immunol. 2001 Sep 15;167(6):3182-9.

Delgado M. et al. PACAP in immunity and inflammation. Ann N Y Acad Sci. 2003 May;992:141-57.

Elefsiniotis IS. et al. Plasma pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) levels in chronic hepatitis B patients under lamivudine treatment. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003 Nov;15(11): 1209-16.

Mosdósi B. et al. Impairment of microcirculation and vascular responsiveness in adolescents with primary Raynaud phenomenon. Pediatr Rheumatol Online J. 2018 Mar 23;16(1):20.

Sun BY. et al. Decreased synovial fluid pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) levels may reflect disease severity in post-traumatic knee osteoarthritis after anterior cruciate ligament injury. Peptides. 2019 Jun;116: 22-29.

Sun ZP. et al. The synovial fluid neuropeptide PACAP may act as a protective factor during disease progression of primary knee osteoarthritis and is increased following hyaluronic acid injection. Innate Immun. 2019 May;25(4): 255-264.

Temerozo JR. et al. VIP plasma levels associate with survival in severe COVID-19 patients, correlating with protective effects in SARS-CoV-2-infected cells. J Leukoc Biol. 2022 May;111(5): 1107-1121.

VII. Cardiovascularis kórképek:

1., Azt találták, hogy a bal kamra ischemias területén 3 és 72 órás reperfüziót követően a PACAP koncentrációja nem különbözött a kontroll értékektől, ugyanakkor a bal kamra nem ischemias területein a PACAP szint csökkent. Hogyan magyarázza pályázó ezt az eredményt?

A szívizomszövetben található endogén PACAP forrását elsősorban a myocyták között elhelyezkedő idegrostok jelenthetik. Korábban Alston és kutatócsoportja (2011) is kimutatta a PACAP-38 pozitív idegrostok csökkenését az infarktus körüli szövetekben, mely adatok összhangban állnak a mi eredményeinkkel, mivel a nem ischaemiás mintákban mi is szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szintet mértünk. Ezzel szemben, az ischaemiás mintákban nem találtunk eltérést a PACAP-38 szintben a sham-operált állatokhoz képest. Alston és munkatársai (2011) leírták, hogy a myocardialis infarctus területén az idegrostok károsodásával egyidőben az extracelluláris mátrixban, a myocytákban és makrofágokban fokozódik a PACAP expresszió. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy infarctusos szövethomogenizátumban azért nem találtunk változást a sham-operált csoporthoz képest, mert az extracelluláris mátrixban, myocytákban és makrofágokban detektálható fokozott PACAP expresszió kompenzálta az idegrostok sérüléséből adódó PACAP szint csökkenést.

Alston EN. et al. Cardiac ischemia-reperfusion regulates sympathetic neuropeptide expression through gp130-dependent and independent mechanisms. Neuropeptides. 2011 Feb;45(1): 33-42.

2., Vizsgálták továbbá acut myocardialis infarctuson átesett betegekben a vér PACAP koncentrációját az infarctust és sikeres coronaria intervenciót követően 2 napon keresztül. Azt találták, hogy az infarctust követően a PACAP koncentráció emelkedett a betegek vérében, majd a sikeres coronaria intervenciót követően a PACAP szint fokozatosan csökkent úgy, hogy a 2. nap végére alacsonyabbá vált a kontroll értékeknél. Hogyan magyarázza ezt a jelenséget a pályázó? Hogyan indukálhatja az acut myocardialis infarctus a PACAP gyors felszabadulását az agyból vagy az endokrin mirigyekből, ahogyan azt pályázó írja a diszkusszióban? Az agy milyen területei és milyen endokrin mirigyek vehetnek részt ebben a reakcióban? A reperfüzió milyen mechanizmus segítségével állíthatja le ezt a fokozott PACAP felszabadulást?

A myocardialis infarctust követően tapasztalt szisztémás PACAP szint emelkedés pontos forrása még nem teljesen ismert. Úgy gondoljuk, hogy a szisztémás PACAP szint emelkedés hátterében azok a szervek állhatnak, amelyek nagy mennyiségben tartalmaznak PACAP-ot, így az agy és különböző endokrin szervek, és ezek közül is azok, amelyeknek szerepük van az akut myocardialis infarctus során kialakuló stresszadaptációs folyamatokban. A PACAP-ot számos olyan előagyi területen is kimutatták, ami fontos a stressz adaptációba. Ilyen területek a septum laterale, a nucleus centralis amygdalea, a nucleus basolateralis amygdalea és a nucleus interstitialis stria terminalis (Hannibal 2002). A hypothalamus magok közül a nucleus paraventricularisban PACAPerg innerváció detektálható amivel a mag corticotrop-releasing hormont (CRH) termelő neuronjai is kapcsolatban állnak (Das et al. 2007), így a PACAP szabályozni képes CRH expresszióját (Agarwal et al. 2005). Emellett a PACAP-ot különböző agytörzsi területeken is kimutatták, amelyek a vegetatív szenzoros és motoros rendszer részei, és itt is számos olyan mag detektálható, ahol PACAPerg rostok végződnek, mint a nucleus raphe dorsalis, a centrális projekciójú Edinger-Westphal mag, a ventral tegmental area és a locus coeruleus (Hannibal 2002; Vaudry et al. 2009). A központi idegrendszeren kívül a mellékvesében is nagy koncentrációban detektáltak PACAP-ot. Ezen struktúrák mind szerepet játszhatnak a PACAP szint emelkedésében.

Legújabb kutatásunk során különböző kardiológiai beavatkozások alatt a szisztémás keringés különböző területeiről gyűjtünk vérmintákat, mint a vena jugularis interna vagy az aorta, így lehetőségünk nyílik a szisztémás PACAP emelkedés forrásának pontosabb feltérképezésére. Transzkatéteres aorta billentyű beültetést követően a centrális vénás kanülből vett vérmintákban találtunk szignifikáns emelkedést, ami bizonyíthatja a PACAP központi idegrendszeri eredetét.

A PACAP lokális cardialis felszabadulását is bizonyítják azon legújabb eredményeink, ahol pitvarfibrilláció miatt katéteres abláción átesett betegek pitvarából gyűjtött mintáiban találtunk magasabb PACAP szintet a periférián mérhető értékekhez képest.

Dolgozatomban részletesen bemutattam a PACAP kardioprotektív hatásának hátterében álló lehetséges mechanizmusokat, amelyek elősegítik a neuropeptid antioxidáns és antiapoptotikus hatását ischaemiás és oxidatív stressz-indukálta károsodások esetén cardiomyocytákon (Gasz et al. 2006a, b; Rácz et al. 2008; Róth et al. 2009). Azt, hogy a reperfüziót követően milyen mechanizmus csökkenti az infarctus során detektálható emelkedett PACAP szintet pontosan még nem ismert, ehhez további vizsgálatokat tervezünk.

Agarwal A. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. Brain Res Mol Brain Res. 2005 Jul 29;138(1):45-57.

Das M. et al. Hypothalamic and brainstem sources of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide nerve fibers innervating the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. J Comp Neurol. 2007 Feb 1;500(4):761-76.

Gasz B. et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. Peptides. 2006; 27(1): 87-94.

Gasz B. et al. PACAP-38 inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. Ann NY Acad Sci. 2006; 1070(1): 293-7.

Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. J Comp Neurol. 2002 Nov 25;453(4):389-417.

Rácz B. et al. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul Pept.* 2008 Jan 10;145(1-3): 105-15.

Roth E. et al. Effects of PACAP and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Apr;1163:512-6.

Vaudry D. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev.* 2009 Sep;61(3):283-357.

3., Mérték a vér PACAP koncentrációját különböző típusú és súlyosságú szívelégtelenségben szenvedő betegekben és vizsgálták, hogy a PACAP koncentráció milyen korrelációt mutat más klinikailag fontos markerek vérben mérhető szintjével. ... Mi az a legfontosabb következtetés, amit ezekből a vizsgálatokból levonhatunk?

A cardiovascularis betegek vizsgálata során leírt szignifikáns korrelációk közül azokat tartom a legfontosabb összefüggéseknek, melyek a klinikai gyakorlatban már régóta alkalmazott biomarkerekkel való összefüggést mutatják.

A szívelégtelen betegek különböző csoportaiban szignifikáns korrelációt találtunk a PACAP-38 szintek és az N-terminális pro B-típusú natriuretikus peptiddel (NT-proBNP) és a CRP-vel összefüggésben. Myocardialis infarctus esetén pedig a PACAP-38 szintek a troponin értékekkel, a hipertóniával és a hemoglobin A1c értékekkel mutattak szignifikáns korrelációt. A rutin klinikai diagnosztikában használt markerekkel mutatott szignifikáns korrelációk ígéretes adatok lehetnek a PACAP szint mérés klinikai gyakorlatban való alkalmazásához, de ehhez még további vizsgálatok szükségesek.

4., Transzplantáció során végstádiumú ischemias és nem-ischemias cardiomyopathia miatt eltávolított és valamilyen ok miatt fel nem használt egészséges donor szívekből vett szövetminta homogenizátumokban mérték a PACAP és a PAC1 receptor koncentrációját. ... Mi a klinikai jelentősége ezeknek az eredményeknek?

Kardiológiai klinikai vizsgálataink kezdetén számos állatkísérletes modellben vizsgálták a PACAP és receptorainak előfordulását a cardiovascularis rendszer különböző területén, de emberi vizsgálatokkal kapcsolatban csak kevés klinikai eredmény állt a rendelkezésünkre. Munkacsoportunkkal elsőként analizáltunk szívműtétek során eltávolított emberi pitvarmintákat, ahol kimutattuk a PAC1 receptor expresszióját a szívizomsejteken, és RIA módszerrel szignifikánsan magasabb PACAP-38 és PACAP-27 szinteket mértünk az ischaemiás betegekben a billentyűbetegségben szenvedő páciensek mintáihoz képest. Ezt követően egy lengyel kollaboráció segítségével (varsói Cardinal Stefan Wyszyński Institute of Cardiology, Department of Heart Failure and Transplantology) szívtranszplantáción átesett páciensek szívizommintáit is lehetőségünk nyílt megvizsgálni. Kutatásunk klinikai jelentőségét igazolja, hogy elsőként írtuk le a PAC1 receptor változását és a PACAP szint csökkenését a cardiomyopathiában szenvedő emberek kamrai mintáiban, ami összhangban van azokkal a kutatásokkal, amelyek a végstádiumú szívelégtelenségben szenvedő páciensek neurohormonális zavarait és a natriureticus peptid szintek csökkenését írták le (Miller et al. 2004). Klinikai vizsgálataink jelen fázisában a PACAP szint változásokat detektáltuk, mely adatok remélhetőleg a jövőben hozzájárulhatnak a PACAP pontos klinikai jelentőségének feltérképezéséhez.

Miller WL. et al. Mortality in end stage heart failure is associated with paradoxically low NT-pro BNP and BNP levels: "natriuretic peptide exhaustion"? *J Card Fail.* 2004; 10, s45.

Saetrum O. et al. Vasoactive intestinal peptide has a direct positive inotropic effect on isolated human myocardial trabeculae. *Clin Sci.* 2001; 101(6): 637-643.

Tomai F. et al. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circulation.* 1999; 100(5): 559-563.

VIII. Myeloma multiplex

Erős pozitív korrelációt találtak az újonnan diagnosztizált és kezelésben még nem részesült betegek vérében mérhető PACAP koncentráció és a betegek túlélési ideje között. Ezzel kapcsolatban kérdezem, mit gondol a pályázó, melyek azok a sejttrendszerek, amelyek fokozott aktivitása és PACAP termelése javítja a myeloma multiplex-ben szenvedő betegek túlélési kilátásait?

A klinikai vizsgálataink jelen fázisában nem tudjuk még pontosan, hogy melyek azok a sejttrendszerek, melyek fokozott aktivitása és PACAP termelése javítja a myeloma multiplex-ben szenvedő betegek túlélési kilátásait.

Korábbi kutatási eredmények azt igazolják, hogy a myelomás betegek túlélését elsősorban a betegség okozta vesekárosodás súlyossága határozza meg, ezért is feltételezhető, hogy a PACAP renoprotektív és osteolysist gátló hatásai révén befolyásolhatja a betegséggel összefüggő szervkárosodások kialakulását és a magasabb PACAP szint jobb prognózist jelenthet.

A myelomás betegek prognózisát azonban nem csupán a betegség által okozott célszervkárosodások súlyossága befolyásolja, hanem a myelomás sejtek genetikai eltérései és a csontvelőben kialakuló gyulladáscsökkentő mikrokörnyezet is meghatározhatja. A PACAP a csontvelői mikrokörnyezet faktorainak expresszióját módosítva közvetve is hatást gyakorolhat a plazmasejtekre azok működésének gátlásával. (Li et al. 2006; Lalayanni et al. 2017). Emellett a PACAP antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásai révén is hozzájárulhat a kedvezőbb mikrokörnyezeti állapot kialakulásához, ezért feltételezzük, hogy a peptid plazmaszintje a csontvelőben fennálló gyulladáscsökkentő folyamatok mértékét is tükrözi. Azonban a pontos mechanizmusok nem ismertek, de feltételezhető, hogy a myeloma kialakulása során megváltozó tumorsejt-mikrokörnyezet közvetlenül befolyásolja a PACAP termelést (Xu et al. 2016).

Lalayanni C. et al. Prognostic Value of Diagnostic Bone Marrow Plasma Cell percentage in Multiple Myeloma. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2017; 17: e43.

Li M. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent inhibitor of the growth of light chain-secreting human multiple myeloma cells. Cancer Res. 2006 Sep 1;66(17): 8796-803.

Xu Z. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to the proliferation of hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow via PACAP-specific receptor. Sci Rep. 2016 Feb 29;6: 22373.

Bízva válaszaim pozitív elbírálásában maradok tisztelettel:

Dr. Tamás Andrea

Dr. Tamás Andrea
egyetemi docens
PTE ÁOK Anatómiai Intézet