



Dr. Kovács Krisztina
MTA doktora
Molekuláris Neuroendokrinológiai Kutatócsoport
HUN-REN Magyar Kutatási Hálózat

Pécs, 2025. március 4.

Válaszok Dr. Kovács Krisztina MTA Doktori Értekezés bírálatában megfogalmazott kérdésekre

Tisztelt Professor Asszony!

Mindenekelőtt szeretném megköszönni dolgozatom bírálatára fordított munkáját! Köszönöm elismerő szavait és építő kritikai megjegyzéseit, melyeket a jövőben szem előtt fogok tartani!

Először a bírálat elején tett megjegyzésekre szeretnék reflektálni, majd ezt követően a kérdésekre adott részletes válaszaim olvashatók.

Köszönöm elismerő szavait a publikációk mennyiségével és idegen citációk számával kapcsolatban. Az egyik legfontosabb törekvésünk a jövőben is az, hogy kutatómunkánkat továbbra is kiemelkedő szinten végezzük és publikációinkat vezető folyóiratokban jelentessük meg. A megjelent publikációink közül természetesen van számos könyvfejezet, valamint alacsonyabb besorolású közlemény is, de próbáltunk arra törekedni, hogy publikációink lehetőleg Q1-es rangú folyóiratokban jelenjenek meg (126 publikáció). Jelenleg ezek közül minden negyedik D1-es besorolású (28 publikáció), amelyek arányát a jövőben szeretnénk tovább növelni.

Publikációinkra mindeddig több, mint 3000 idegen citáció érkezett. A hasonlóan magas számú saját citáció magyarázata az, hogy a specifikus kutatási terület miatt viszonylag kevés munkacsoport foglalkozik a PACAP ilyen sokrétű kutatásával, valamint Professor Asszony által is nagyra értékelt szerteágazó kollaborációval. Több esetben az egyes témákkal kapcsolatos legelső irodalmi adatok a munkacsoportunk felfedezéseként jegyezhetők, ezért szükségesnek tartottuk ezek említését a citációk között.

Professor Asszony hiányolta a dolgozathoz a kitekintést a peptidcsalád más tagjaira, mint pl. a VIP-re (vasoactive intestinalis peptid). Bár korábban a VIP-vel és receptoraival kapcsolatban munkacsoportunk több vizsgálatot is végzett, és ezek fontos részét képezték a Ph.D. munkámnak (Tamás et al. 2002), azonban jelen dolgozatomban csak a PACAP-pal kapcsolatos kutatási eredményekre szerettem volna fókuszálni.

Tamás A, Reglődi D, Szántó Z, Borsiczky B, Németh J, Lengvári I. Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. Neuro Endocrinol Lett. 2002 Jun;23(3):249-54. PMID: 12080287.

Szintén hiányolta dolgozatomból a PACAP forrásának azonosítását az egyes klinikai kórképek vizsgálata során. A klinikai mintákban mérhető PACAP forrásának azonosítása jelenleg is az egyik legfontosabb célunk. A PACAP szinte minden szervben és szövetben megtalálható, és 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 transzkatéteres aorta billentyű beültetést követően a centrális vénás kanülből vett vérmintákban, ami bizonyíthatja a PACAP központi idegrendszeri eredetét.

A dolgozatban szereplő klinikai vizsgálatokat legtöbb esetben számos in vitro és in vivo kísérlet előzte meg. Mivel értekezésemben a klinikai vizsgálataink eredményeire szerettem volna fókuszálni, ezért sajnos ezen kísérletes vizsgálatok részletezésére csak a diszkusszióban volt lehetőségem, ami az olvasó számára úgy is értelmezhető, hogy munkacsoportunk nem folytatott ilyen jellegű kutatásokat. A dolgozat végén külön fejezetben tüntettem fel azt a 72 első- és társszerzős közleményt, amely témája szorosan kapcsolódik a dolgozathoz és a klinikai vizsgálatokat megelőző alapkutatási eredményeket foglalja össze.

Klinikai vizsgálataink legfontosabb célja a PACAP potenciális biomarker szerepének vizsgálata különböző akut és krónikus kórképekben. A PACAP önálló biomarkerként való alkalmazásával kapcsolatban azt a kiegészítést szeretném tenni, hogy 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 körben 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.

Végül szeretnék egy bővebb kitekintést adni a PACAP és analógjaink klinikai felhasználásáról, amivel a megbeszélés fejezetben csak érintőlegesen foglalkoztam. 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 terápiareszisztens 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).

Apostol CR, Bernard K, Tanguturi P, Molnar G, Bartlett MJ, Szabò 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/fdsv.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.

Cherai 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 cyclase-activating 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 PAC₁ 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>.

Alábbiakban az egyes fejezetek kapcsán feltett kérdésekre adott részletes válaszaim olvashatók:

1. Hallópálya

1.1. Csirke cochlearis sejtenyészetben igazolták, hogy a PACAP védő hatása a hidrogén peroxid indukálta sejtpusztulásra. Nem világos, hogy honnan jött a PACAP 100 nM dózisa? Volt-e dózis hatásvizsgálat? Hogyan viszonyul az alkalmazott PACAP dózis a fiziológiás szöveti PACAP mennyiséghez?

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 sejtenyészetben is tanulmányozta a PACAP citoprotektív hatását H₂O₂-indukálta oxidatív stresszel szemben, ahol szintén nM-os koncentrációban alkalmaztuk a PACAP-ot. Myocardialis és endothel sejtenyészetekben 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 sejtenyészetben is előteszteléseket végeztünk az optimális dózis meghatározása céljából.

Az egyik legelső publikációban Vaudry és munkacsoportja vizsgálta a PACAP koncentráció-függő védő hatását H₂O₂-indukálta oxidatív stressz károsodással szemben cerebellaris szemcsesejt kultúrában. Ebben a vizsgálatban a leghatékonyabb dózissnak a 10⁻⁷ M-os PACAP kezelés bizonyult, ezért alkalmaztunk mi is a 100 nM-os koncentrációt (Vaudry et al. 2002) a vizsgálataink során.

A belső fül sejtenyészetből nem tudtunk kvantitatív endogén PACAP szint vizsgálatokat végezni, de korábbi szöveti homogenizátumok radioimmuno-assay (RIA) elemzése során fmol-os koncentrációkat detektáltunk, ami nagyságrendekkel kisebb PACAP mennyiséget jelent, mint a kezeléseknél alkalmazott 100 nM-os koncentráció. ELISA méréseink során is alacsonyabb

koncentrációkat mértünk, ugyanis a testfolyadékokban pg/ml-es koncentrációs tartományban voltak a vizsgált minták endogén PACAP szintjei.

Gasz B, Rácz B, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserpes B, Lubics A, Gallyas Jr F, Tóth G, Lengvári I, Reglődi 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, Rácz 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)

Rácz B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Kiss P, Roth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglodi D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. Gen Comp Endocrinol. 2007 Aug-Sep;153(1-3): 115-23. doi: 10.1016/j.ygcen.2006.12.006. Epub 2006 Dec 27. PMID: 17270184.

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.

1.2.1. Milyen kompenzációs mechanizmusok ismertek PACAP KO egerekben, pl. hogyan változik a VIP expresszió?

Az azonos családba tartozó fehérjék esetében feltételezhető, hogy KO állatokban képesek kompenzálni a fehérjék hiányából adódó élettani eltéréseket. Mivel a PACAP és a VIP is nagyfokú homológiát mutat, Girard és munkatársai (2006) PACAP KO és VIP KO egerekben vizsgálták a PACAP, a VIP és receptoraik expressziójának változását a fejlődés során. Céljuk volt annak a feltérképezése, hogy ezen nagy homológiát mutató peptidek és nagy átfedést mutató receptoraik expressziója vajon kompenzációs módon változik-e az idegrendszer fejlődése során? Azt feltételezték, hogy ha a kompenzációs mechanizmusok aktiválódnak ezen KO állatok fejlődése során, akkor a válaszok várhatóan a vad típusú állatokban megfigyelt normál szinteket meghaladó peptid expresszióban nyilvánulnak meg. Mivel a peptidtermelésben bekövetkező változásokat gyakran az mRNA szintjének változásai is tükrözik, ezért Girard és munkatársai ugyanazon szövetmintákban mindkét paramétert mérték a postnatalis agyfejlődés során.

Vizsgálataik első lépéseként radioimmuno-assay és kvantitatív PCR mérésekkel vad egerekben feltérképezték a PACAP és VIP expressziójának változását az agyfejlődés során az első postnatalis időszakban. Eredményeik azt mutatták, hogy a PACAP és a VIP eltérő időbeli expressziós mintázattal rendelkezik: vad típusú állatokban a PACAP mRNA és peptid szintje is gyorsan, 2-5x-re nőtt 1 hetes korban, és hasonló szintet mutatott felnőtt korban is. A VIP mRNA és peptid szintek ezzel szemben 25-50x-re nőttek a 2 hetes postnatalis korra.

Ezt követően PACAP KO és VIP KO egerekben vizsgálták az mRNA szintek és a fehérjék expresszióját a postnatalis időszakban, de egyik peptid-hiányos állatnál sem voltak nyilvánvaló hosszú távú kompenzációs mechanizmusok. A PACAP KO egerekben sem a PACAP fehérjét, sem az mRNA-t nem tudták kimutatni. A VIP expressziójának változásában sem tudtak kimutatni szignifikáns eltérést a PACAP KO egerekben a vad egerekhez képest a postnatalis időszak első négy napjában. A 7. postnatalis napon a vad egerek VIP termelése felgyorsult, de a PACAP KO egerekben ez nem volt megfigyelhető, és a VIP tartalom csak kb. 70%-a volt a vad egerekhez képest. Ezzel párhuzamosan a VIP mRNA szint is 50%-os csökkenést mutatott a vad egerekhez képest. Ez az eredmény arra utal, hogy a PACAP KO egerekben a VIP termelés időleges késedelmet szenvedett a korai postnatalis fejlődési időszakban, de ezek az eltérések a 10. napra korrigálódtak. A vizsgált későbbi postnatalis életkorokban a PACAP KO állatok agyszövetének VIP tartalma és mRNA szintje kevesebb, mint 20%-kal tért el a kontroll vad típusú állatok

értékeitől.

A PACAP szintek változásai szintén nem tudták kompenzálni az endogén VIP hiányát VIP KO egerekben. A postnatalis első négy napon a PACAP expresszió mértéke hasonló volt a VIP KO egerekben a vad egerekhez képest, de a 7. napon, amikor a vad típusú állatok PACAP expressziója meredeken megnőtt, a VIP KO állatokban ez nem volt megfigyelhető, ugyanis a detektálható PACAP szintje csak 40%-át tette ki a vad típusú állatokban mért agyi fehérje szintnek, ezért a VIP KO állatokban fejlődési késés mutatkozott. Ezt követően a VIP KO állatok agyszövetében detektálható PACAP tartalom megnőtt, és a fennmaradó postnatalis időszakokban a vad típusú szintekhez hasonló volt. A peptid-tartalom változásainak tükrében a PACAP mRNS szintje a 7. napon a VIP KO állatok agyában 35%-kal csökkent a vad típusú állatokhoz képest. A PACAP KO egerek VIP expressziós mintázataitól eltérően azonban a VIP KO PACAP mRNS szintjének eltérései az idő múlásával nem mutattak gyors javulást. A PACAP mRNS szintek a normális postnatalis agyfejlődés során is csökkentek, de a VIP KO egerekben 30-40%-kal elmaradtak a felnőtt vad típusú egerekhez képest.

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 postnatalis 14. és 28. nap közötti időszakban 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, és az idősebb életkorban is 15-40%-kal volt kisebb, mint a vad egerekben. A KO egerekben detektálható különböző receptorális expressziós mintázatok feltételezett okai az endogén neuropeptid hiányából adódó elváltozások lehetnek.

Emellett a viselkedési és neurológiai tesztek is számos különbséget írtak le a KO genotípusok között, feltárva a két gén közötti funkcionális különbségeket. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a PACAP és a VIP különböző biológiai aktivitásokkal rendelkezik, és a KO egerek olyan deficiteket hordoznak, amelyek kompenzációjára sajnos nem alkalmas a nagy homológiát mutató rokon peptid.

Ogawa és munkatársai (2005) PACAP KO egerek idegrendszeri fejlődése során más monoaminerg rendszereket is vizsgáltak, de nem találtak különbséget a tirozin-hidroxiláz és a szerotonin expressziója között különböző agyterületek analizise során a vad állatokhoz viszonyítva.

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.

Ogawa T, Nakamachi T, Ohtaki H, Hashimoto H, N S, Baba A, Watanabe J, Kikuyama S, Shioda S. Monoaminergic neuronal development is not affected in PACAP-gene-deficient mice. Regul Pept. 2005 Mar 15;126(1-2):103-8. doi: 10.1016/j.regpep.2004.08.034. PMID: 15620422.

1.2.2. Lézetik-e PACAP overexpresszáló egérvonal, esetleg helyspecifikus KO vagy indukálható?

Több munkacsoport is foglalkozik PACAP overexpresszáló egérvonalakkal. Yamamoto és munkatársai (2003) olyan transzgenikus egereket hoztak létre, amelyek pancreas sejtjei fokozott PACAP expressziót mutattak. A PACAP overexpresszió kialakításához humán inzulin promótert alkalmaztak, majd Northern-blot és immunhisztokémiai elemzések segítségével igazolták a PACAP overexpressziót a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben, különösen a transzgenikus egerekben. Ugyan a plazma glükóz- és glükagon szintje glükóztolerancia teszt során nem különbözött a PACAP transzgenikus és a vad típusú egerek között, a transzgenikus egerek plazma inzulin szintje azonban magasabb volt glükózterhelést követően. A streptozotocin által kiváltott plazma glükóz

szint emelkedése is mérséklődött a transzgenikus egerekben a kontroll egerekhez képest. Egy másik kísérletben a pancreas β -sejtek PACAP overexpressziójának hatását egy elhízást és diabetest modellező transzgenetikusan állatmodellben vizsgálták, ahol az overexpresszió gátolta a hyperinsulinaemia kialakulását és a diabétesz során bekövetkező kóros szigetsejt-tömeg növekedést (Tomimoto et al. 2004).

Egy másik munkacsoport gondatoropin- α -subunit alegység promóterét használva hozott létre egy transzgenikus egérmodellt az hypophysis sejtek PACAP overexpressziójának előidézésére. PCR vizsgálattal jellemezték a PACAP, a follistatin, a gonadotropin-releasing hormon (GnRH)-receptor és a gonadotropin alegység mRNS szintjének változását különböző korú hím transzgenikus és vad típusú egerekben. A transzgenikus egerekben több mint 1000-szer magasabb volt az agyalapi mirigy PACAP mRNS szintje a kontrollokhoz képest; az immunitokémiai, Western blot és ELISA elemzések pedig megerősítették a magas peptidszintet. A folliculus stimuláló hormon (FSH), luteinizáló hormon (LH) és tesztoszteron szintek szignifikánsan csökkentek, és a pubertás is később következett be a PACAP transzgenikus egerekben. Mindemellett a gonadotropin alegység és a GnRH receptor mRNS szintje csökkent, az agyalapi mirigy follistatin expressziója pedig nőtt (Moore et al. 2012) ezekben az egerekben.

Moore JP Jr, Yang RQ, Winters SJ. Targeted pituitary overexpression of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide alters postnatal sexual maturation in male mice. Endocrinology. 2012 Mar;153(3):1421-34. doi: 10.1210/en.2011-1115. Epub 2012 Feb 7. PMID: 22315445; PMCID: PMC3281528.

Tomimoto S, Hashimoto H, Shintani N, Yamamoto K, Kawabata Y, Hamagami K, Yamagata K, Miyagawa J, Baba A. Overexpression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in islets inhibits hyperinsulinemia and islet hyperplasia in agouti yellow mice. J Pharmacol Exp Ther. 2004 May;309(2):796-803. doi: 10.1124/jpet.103.062919. Epub 2004 Jan 23. PMID: 14742740.

Yamamoto K, Hashimoto H, Tomimoto S, Shintani N, Miyazaki J, Tashiro F, Aihara H, Nammo T, Li M, Yamagata K, Miyagawa J, Matsuzawa Y, Kawabata Y, Fukuyama Y, Koga K, Mori W, Tanaka K, Matsuda T, Baba A. Overexpression of PACAP in transgenic mouse pancreatic beta-cells enhances insulin secretion and ameliorates streptozotocin-induced diabetes. Diabetes. 2003 May;52(5):1155-62. doi: 10.2337/diabetes.52.5.1155. PMID: 12716746.

1.2.3. Mi az endogén PACAP forrása a belső fülben, mi ennek a viszonya a Ca^{2+} -kötő fehérjéket expresszáló sejtekhez?

Vizsgálataink előtt a PACAP-ot és receptorait is kimutatták a hallópálya különböző részein. PACAP immunpozitív sejteket találtak az agytörzsi cochlearis magvakban és az oliva superiorban (Kausz et al. 1999; Hannibal 2002), ezen kívül kimutatták a PACAP-ot a ganglion spirale és a stria vascularis marginalis sejtjeiben is (Kawano et al. 2001). Más kutatások során a PACAP és PAC1 receptorának mRNS-ét írták le a stria vascularisban, a ganglion spiraleban, és az általunk is vizsgált Corti-szervet alkotó sejtekben, úgymint a belső és külső szőrsejtekben, pillérsejtekben és a támasztósejtekben (Abu-Hamdan et al. 2006). Bár a PACAP és a PAC1 receptor halló szervrendszerben betöltött szerepéről még keveset tudunk, úgy gondoljuk, hogy fontos szerepet játszanak a hallás afferenciájának modulálásában (Drescher et al. 2006). Az a tény, hogy a PACAP és a PAC1 a stria vascularisban, közvetlenül az endolymphatikus tér közelében található, arra utal, hogy a PACAP szerepet játszhat az endolympha termelésében, valamint potenciáljának és/vagy összetételének szabályozásában (Abu-Hamdan et al. 2006).

A szőrsejtek megfelelő működéséhez elengedhetetlen az endolympha megfelelő Ca^{2+} koncentrációja, amelyet a szőrsejtekben található Ca^{2+} -kötő fehérjék, például parvalbumin, calbindin és calretinin szabályoznak. Számos kutatás vizsgálta ezen Ca^{2+} -kötő fehérjék szerepét különböző fajok szőrsejtjeiben, például békákban, teknősökben és emlősök belső fülében (Soto-Prior et al. 1995; Baird et al. 1997; Hackney et al. 2003). Ezen kívül azt is megállapították, hogy ha

a labyrinthus vestibularis területén sérülés következik be, az endolympha Ca^{2+} koncentrációja megnövekszik, ami zavart okoz a cochlea működésében (Ikeda et al. 2010). Zajkárosodásnak kitett állatokban a külső szőrsejtekben a Ca^{2+} koncentráció emelkedése nemcsak rövid távon, hanem hosszú távon is magas szinten marad, ami káros hatással van a sejtekre (Fridberger et al. 1998). Hackney és munkatársai (2005) kísérleteik során azt feltételezték, hogy a Ca^{2+} koncentráció növekedéséből eredő káros hatások ellensúlyozására a szervezet védelmi mechanizmusokat alkalmaz. A patkányok cochlea sejtjeiben végzett kutatások alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a Ca^{2+} -kötő fehérjék magas koncentrációja megvédi a sejteket a zajártalom következtében fellépő intracelluláris Ca^{2+} szint növekedésétől, így fontos szerepük lehet az ototoxikus ágensek szőrsejtkárosító hatásának kivédésében.

Munkánk során a kanamicin ototoxikus hatását vizsgáltuk PACAP KO egerekben, amely a szisztémás kezelés során bejut az endolymphába, ahonnan endocitózissal vagy nem specifikus kation csatornákon keresztül behatol a szőrsejtek apikális részébe, ahol serkenti a reaktív oxigén gyökök termelését, és így növeli a sejt Ca^{2+} szintjét. Emellett más sejteken belüli jelátviteli folyamatokat is befolyásol (Kopke et al. 1997), ami végül a szőrsejtek károsodásához vezet. Ezért feltételezzük, hogy a PACAP-ot, PAC1 receptort és Ca^{2+} -kötő fehérjéket expresszáló szőrsejtek vizsgálata endogén PACAP hiányában lehetőséget nyújt a PACAP otoprotektív hatásának igazolására, de természetesen a pontos hatásmechanizmus feltérképezésére további kísérletekre is szükség lesz.

Abu-Hamdan MD, Drescher MJ, Ramakrishnan NA, Khan KM, Toma VS, Hatfield JS, Drescher DG. Pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) in the cochlea: evidence for specific transcript expression of PAC1-R splice variants in rat microdissected cochlear subfractions. Neuroscience. 2006 Jun 19;140(1): 147-61. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.01.019. Epub 2006 Apr 19. PMID: 16626868.

Baird RA, Steyger PS, Schuff NR. Intracellular distributions and putative functions of calcium-binding proteins in the bullfrog vestibular otolith organs. Hear Res. 1997 Jan;103(1-2): 85-100. doi: 10.1016/S0378-5955(96)00167-0. PMID: 9007577.

Drescher MJ, Drescher DG, Khan KM, Hatfield JS, Ramakrishnan NA, Abu-Hamdan MD, Lemonnier LA. Pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) are positioned to modulate afferent signaling in the cochlea. Neuroscience. 2006 Sep 29;142(1): 139-64. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.05.065. Epub 2006 Jul 31. PMID: 16876955.

Fridberger A, Flock A, Ulfendahl M, Flock B. Acoustic overstimulation increases outer hair cell 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.

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

Hackney CM, Mahendrasingam S, Jones EM, Fettiplace R. The distribution of calcium buffering proteins in the turtle cochlea. J Neurosci. 2003 Jun 1;23(11): 4577-89. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-11-04577.2003. PMID: 12805298; PMCID: PMC6740801

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. doi: 10.1002/cne.10418. PMID: 12389210.

Ikeda R, Nakaya K, Yamazaki M, Oshima T, Kawase T, Kobayashi T. Effect of vestibular labyrinth destruction on endocochlear potential and potassium concentration of the cochlea. Hear Res. 2010 Jun 14;265(1-2):90-5. doi: 10.1016/j.heares.2009.12.027. Epub 2010 Jan 5. PMID: 20045046.

Kawano H, Shimozono M, Tono T, Miyata A, Komune S. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide mRNA in the cochlea of rats. Brain Res Mol Brain Res. 2001 Oct 19;94(1-2): 200-3. doi: 10.1016/S0169-328X(01)00241-8. PMID: 11597781.

Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D, Garcia P, Steinman H, Malgrange B, Ruben RJ, Rybak L, Van de Water TR. Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol.* 1997 Sep;18(5): 559- 71. PMID: 9303151.

Kausz M, Murai Z, Arimura A, Köves K. Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) immunoreactive elements in the brain stem of rats studied by immunohistochemistry. *Neurobiology (Bp).* 1999;7(1): 19-31. PMID: 10746248.

Soto-Prior A, Cluzel M, Renard N, Ripoll C, Lavigne-Rebillard M, Eybalin M, Hamel CP. Molecular cloning and expression of alpha parvalbumin in the guinea pig cochlea. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995 Dec 28;34(2): 337-42. doi: 10.1016/0169-328x(95)00205-7. PMID: 8750839.

2. Fogfejlődés

2.2. Van-e humán relevanciája a PACAP fogfejlődésben betöltött szerepével kapcsolatban?

PACAP hiányában a dentinben tapasztalt eltérések alapján arra következtethetünk, hogy a PACAP a dentin-pulpa komplex funkciójára is hatással lehet. A fogak regeneratív, revitalizációs, illetve a pulpa gyulladásainak kezelési lehetőségei folyamatos kutatások célpontjában állnak. Fejlődő és érett fogakban is nagy számban található multipotens ectomesenchymalis sejtek. Ezek nagy potenciállal rendelkeznek a fogak regenerációjában. Célunk a pulpában a PACAP regeneratív, antiinflammatorikus lehetőségeit vizsgálni, ugyanis a jelenleg a klinikai gyakorlatban ezen sejtek differenciációs és regeneratív potenciálját használják fel a „regeneratív endodonciai” kezelések során. Ismerve a PACAP antiinflammatorikus, valamint az itt bemutatott protektív hatásait a fogak fejlődésére, felmerül a PACAP ilyen célú felhasználásának lehetősége. A paradontális ligamentum regeneratív kezeléseiben a növekedési faktorok és citokinek alkalmazásának irányába mozdultak a kutatások. Nonaka korábbi kutatásában kimutatta a paraodontium regenerációja során a PAC1 receptorok aktivációját, illetve a PACAP pozitív idegrostok számának emelkedését traumát követően (Nonaka et al. 2013). Leírták, hogy pakány első moláris fogának luxációs sérülését követően a ligamentum paradontaléban szignifikánsan emelkedik a PACAP immunpozitív idegrostok mennyisége az intakt fogakhoz képest. Emellett vizsgálták a regenerációs folyamatokban fontos szerepet betöltő sejteket közül az osteoclastokat és osteoblastokat is. Az osteoclastok jelöléséhez TRAP (tartrate-resitant 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 luxáció során kialakuló immunológiai és regenerációs folyamatok szabályozásában, de a pontos hatásmechanizmusra még nem találtak bizonyítékot.

Bár a PACAP humán fogfejlődésben betöltött pontos szerepe nem ismert, nemrégiben Gozes és munkacsoportja (2017) egy másik neuroprotektív fehérje defektusával járó ADNP (activity-dependent neuroprotective protein) szindrómában írták le a fogak idő előtti elötörését gyermekeknél. Mivel mi is hasonló tapasztaltunk PACAP KO egereknél (Farkas et al. 2017), ezért feltételezhetően ezen megfigyelésnek is lehet klinikai relevanciája a jövőben.

Farkas J, Sandor B, Tamas A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, Fulop BD, Juhasz T, Manavalan S, Reglodi D. Early Neurobehavioral Development of Mice Lacking Endogenous PACAP. *J Mol Neurosci.* 2017 Apr;61(4): 468-478. doi: 10.1007/s12031-017-0887-z. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28168413.

Gozes I, Van Dijck A, Hacoheh-Kleiman G, Grigg I, Karmon G, Giladi E, Eger M, Gabet Y, Pasmanik-Chor M, Cappuyens E, Elpeleg O, Kooy RF, Bedrosian-Sermone S. Premature primary tooth eruption in cognitive/motor-delayed ADNP-mutated children. *Transl Psychiatry.* 2017 Feb 21;7(2):e1043. doi: 10.1038/tp.2017.27. Erratum in: *Transl Psychiatry.* 2017 Jul 4;7(7):e1166. doi: 10.1038/tp.2017.128. PMID: 28221363; PMCID: PMC5438031.

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.

2. PACAP a plazmában a várandósság alatt és az anyatejben

3.3.1. Mennyire specifikus az alkalmazott RIA a PACAP-ra? Milyen kereszt reakciókat mutat a VIP/szekretin/ család többi tagjával?

Vizsgálataink során két specifikus RIA vizsgálatot végeztünk a PACAP-38 és a PACAP-27 szintek detektálására különböző biológiai mintákból. Ezeknek a metodikáknak a részletes leírása az alábbi közleményekben történt meg:

PACAP-38: Jakab B, Reglodi D, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Oroszi G, Szilvássy Z, Szolcsányi J, Németh J. Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Methods.* 2004 Oct 29;61(1-2): 189-98. doi: 10.1016/j.jbbm.2004.03.002. PMID: 15560935.

PACAP-27: Nemeth J, Jakab B, Jozsa R, Hollosy T, Tamas A, Lubics A, Lengvari I, Kiss P, Oberritter Zs, Horvath B, Szilvassy Z, Reglodi D (2007) PACAP-27 radioimmunoassay: Description and application of a novel method. *J Radioanal Nucl Chem.* 2007; 273: 327-332. doi: 10.1007/s10967-007-6862-3

A PACAP-38 RIA-hoz felhasznált „88111-3” jelzésű antiszérumot Arimura és munkacsoportja készítette, amelyhez nyulakat használtak fel. A PACAP-27 RIA-nál alkalmazott „88123-3” antiszérum szintén Arimura laborjában készült nyulak segítségével.

Mielőtt az antiszérumot RIA vizsgálat céljára használjuk, azt jellemezni kell, ami során meg kell határozni a titerét, a specifitását és az affinitását.

(1) A *titer*, az antiszérumban található, specifikus antitestek koncentrációjáról ad felvilágosítást. (2) A *specifitás*, az antigén és az antitest közötti kötés szelektivitásáról ad információt. (3) Az *affinitás* az antigén és az antitest közötti kötés erősségét jelzi.

Az antitestek specifitását az antigénnek azon molekulaszervezete határozza meg, amely az immunválasz kiváltásáért felelős. Ennek a tulajdonságnak a meghatározása azért is fontos, mert ez dönti el, hogy használható-e az antiszérum az adott antigén vizsgálatára, vagy sem. Mivel a peptidhormonok úgynevezett hormon-családokat alkotnak, és az egy családba tartozó anyagok felépítése és kémiai struktúrájuk nagyon hasonló lehet, így az ellenanyag nemcsak a target-antigénnel, hanem a rokon szerkezetű anyaggal is kötést képezhet. Meg kell tehát vizsgálni ezeket a kereszt kötődési lehetőségeket. Ez úgy történik, hogy mind az antigénnel, mind a rokon szerkezetű anyagokkal is kalibrációs görbét veszünk fel, majd a rokon szerkezetű anyaggal nyert kalibrációs görbék D₅₀ értékeit összehasonlítjuk a referens anyag kalibrációs görbéjének D₅₀ adatával. Ezeknek a keresztreakciós vizsgálatoknak az adatai (%-os formában) megtalálhatók mindkét említett publikációban (1. és 2. táblázat).

1. táblázat: “88111-3” PACAP-38 antiszérummal végzett keresztreakciós vizsgálatok

Peptid	Keresztreakció (%)
PACAP-38 (birka)	100,0
PACAP 24-38 (birka)	59,3
PACAP-27 (birka)	0,0
PHI-27 (sertés)	0,0
VIP (humán, sertés, patkány)	0,0
GRF 1-29 (humán)	0,0
GRF 1-40 (humán)	0,0
GRF 1-43 (patkány)	0,0
glucagon (humán, birka, sertés)	0,0
motilin (sertés)	0,0
secretin (sertés)	0,0

2. táblázat: “88123-3” PACAP-27 antiszérummal végzett keresztreakciós vizsgálatok

Peptid	Keresztreakció (%)
PACAP-27 (birka)	100,0
PACAP-38 (birka)	2,1
PACAP 24-38 (birka)	0,0
PHI-27 (sertés)	0,0
VIP (humán, sertés, patkány)	0,0
GRF 1-29 (humán)	0,0
GRF 1-40 (humán)	0,0
GRF 1-43 (patkány)	0,0
glucagon (humán, birka, sertés)	0,0
motilin (sertés)	0,0
secretin (sertés)	0,0

Amint az 1. táblázat adataiból látható, a PACAP-38 RIA-hoz felhasznált „88111-3” antiszérum csak a PACAP 24-38-cal, egy C-terminális peptiddel reagált. Ez egyben azt is jelenti, hogy az ellenanyag C-terminális érzékenységgű, vagyis a PACAP-38 ezen részét ismeri fel és ehhez kötődik. A hormonsalád többi tagja ezt az aminosav szekvenciát nem hordozza, vagy nem láncvégi pozícióban van, ezért más az adott peptid szerkezete, így nem is köti meg őket az ellenanyag. Elmondható tehát, hogy a különböző mintákban a PACAP-38 RIA-val mért értékek PACAP-38 koncentrációnak tekinthetők, a jelenlévő más rokon szerkezetű anyagok a pontos mérést nem befolyásolják.

A PACAP-27 RIA-nál alkalmazott „88123-3” antiszérumhoz tartozó 2. táblázat adataiból az látható, hogy az ellenanyag csak a PACAP-38-cal adott kismértékű keresztreakciót, a hormonsalád más tagjával nem reagált. (A PACAP-38 első 27 aminosav sorrendje azonos a PACAP-27-tel.) Mivel csak 2,1%-os a keresztreakció, ez azt jelenti, hogy az ebben a RIA-ban használt antiszérum szintén C-terminális érzékenységgű, vagyis a PACAP-27 peptid C-terminális részét köti meg. (Ha N-terminális érzékenységgű lenne, akkor a PACAP-38-cal is nagyobb mértékben reagálna.) Jelen esetben is elmondható, hogy a különböző mintákban a PACAP-27 RIA-val mért koncentrációk PACAP-27-nek tekinthetők, a biológiai mintákban jelenlévő más rokon anyagok a pontos mérést nem befolyásolják.

A PACAP-38 és PACAP-27 pontos aminosav sorrendje a következő:

PACAP-38

H-His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH₂

PACAP-27

H-His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂

3.3.2. Mi lehet a terhességben emelkedett plazma PACAP forrása, az emelkedés oka?

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 szabályozásában betöltött szerepével kapcsolatban. Bizonyítást nyert, hogy szabályozza a fő gonadális 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 adenohipophysisben 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 sejtszerepet 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 abortuszról származó (9 hetes, n = 7) és terminusra született placentákból (n = 6) gyűjtöttük. Mintát vettünk a placenta foetalis felszínén elhelyezkedő chorionbolyhokból (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. 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. Igazolták, 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 vasoregulációs szerepe feltételezhető, ami magyarázatot adhat a szülés során megfigyelt hirtelen PACAP szint csökkenésre. Emellett a PACAP neurotrofikus faktor, amely kiemelt szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében, az immunrendszer érésében és 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).

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.

Spencer F, Chi L, Zhu M. Temporal relationships among uterine pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, decidual prolactin-related protein and progesterone receptor mRNAs expressions during decidualization and gestation in rats. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2001 May;129(1): 25-34. doi: 10.1016/s1532-0456(01)00177-6. PMID: 11369298.

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.

3.3.3. Hogyan viszonyul a PACAP emelkedés más peptidekhez (VIP)-hez a plazmában és az anyatejben?

Több, mint 10 évvel a PACAP felfedezése előtt Fahrenkrug és munkatársai (1977) radioimmuno-assay segítségével kimutatták a VIP-t emberi plazma mintákban. Ezt követően Werner és munkatársai (1985) az anyatejben is megvizsgálták a VIP jelenlétét, és a plazma mintákhoz viszonyítva 2-3x-os mennyiséget detektáltak. A VIP-hez és a PACAP-hoz hasonlóan

számos más neuropeptid is magasabb koncentrációban mérhető az anyatejben, mint a plazmában, ilyen az LHRH (LH releasing hormon), TRH (thyrotropin-releasing hormon), szomatosztatin, bombezín és a neurotensin is. Munkacsoportunk juhokban vizsgálta a VIP és PACAP mennyiségének paralel változását laktáció során, és az emberi eredményekhez hasonlóan a tejmintákban magasabb PACAP és VIP koncentrációt mértünk, mint a plazma mintákban (Pohóczky et al. 2020). A birkákban szopást követően megemelkedett a plazma PACAP szintje, azonban VIP esetén nem detektáltunk ilyen változást. Megvizsgáltuk a plazma szinteket különböző korú állatokban is, de nem találtunk szignifikáns különbséget a bányók (3 hónapos), az érett fiatal (3 éves) és az idős felnőtt (10 éves) anyajuhok között. Az emlőmirigy minták vizsgálata során tendenciózus PACAP szint emelkedést találtunk a 3 éves anyajuhok mintáiban a 3 hónapos birkákhoz képest. Ezzel szemben, a korábban patkányokban végzett vizsgálatokhoz hasonlóan (Koch et al. 1991.), VIP mRNS-t nem tudtuk kimutatni az emlőmirigy mintákból, ami alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a tej VIP tartalma nem az emlőmirigyből, hanem az anyai keringésből származik (Pohóczky et al. 2020).

Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckadell OV. Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in plasma. J Lab Clin Med. 1977 Jun;89(6):1379-88. PMID: 325156.

Koch Y, Werner H, Fridkin M. Hypothalamic hormones in milk. Endocr Regul. 1991 Jun;25(1-2):128-33. PMID: 1683587.

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.

Werner H, Koch Y, Fridkin M, Fahrenkrug J, Gozes I. High levels of vasoactive intestinal peptide in human milk. Biochem Biophys Res Commun. 1985 Nov 27;133(1):228-32. doi: 10.1016/0006-291x(85)91865-0. PMID: 4074363.

3.3.4. Mi lehet a PACAP funkciója a laktáló emlőmirigyben, és mi a hatása a csecsemőre?

A PACAP anyatejben betöltött pontos szerepe még nem teljesen tisztázott. Feltételezhető, hogy neurotróf, immunmoduláló, gyulladáscsökkentő és antiapoptotikus hatásainak köszönhetően fontos szerepet játszhat az újszülöttek növekedésének, valamint az immunrendszer működésének szabályozásában, a gastrointestinalis rendszer fejlődésében, emellett az emlőmirigy fejlődésében, valamint a laktáció folyamatának szabályozásában (Tamás et al. 2016).

Antiapoptotikus tulajdonsága révén a PACAP szerepet játszhat az emlőmirigy növekedésében és a tejelválasztás szabályozásában. A szoptatás során számos antiapoptotikus faktor expressziója fokozódik a tejben lévő bioaktív molekulák hatására. Ismert, hogy a PACAP képes befolyásolni számos, a laktáció szabályozásában kulcsszerepet játszó citokin, chemokin, angiogenetikus faktor és hormon (pl. ösztrogén, progeszteron, prolaktin, oxitocin) szekrécióját (Khaled et al. 2007; Watson et al. 2011). Neurotrofikus faktorként a PACAP kulcsfontosságú szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében, beleértve a neurogenesis, myelinizáció, neuronális differenciáció és migráció szabályozását. Emiatt feltételezhető, hogy az anyatejben lévő magas PACAP koncentráció hozzájárulhat az újszülöttek idegrendszeri fejlődésének szabályozásához (Watanabe et al. 2016). Immunmoduláló hatásának köszönhetően a PACAP nélkülözhetetlen az újszülöttek immunrendszerének fejlődésében, valamint a különböző patogénekkal szembeni védekezésben és a gastrointestinalis rendszer immunológiai mikrokozmoszának kialakításában (Delgado et al. 2016).

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

Khaled WT, Read EK, Nicholson SE, Baxter FO, Brennan AJ, Came PJ, Sprigg N, McKenzie AN, Watson CJ. The IL-4/IL-13/Stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development. *Development*. 2007 Aug;134(15): 2739-50. doi: 10.1242/dev.003194. Epub 2007 Jul 4. PMID: 17611223.

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

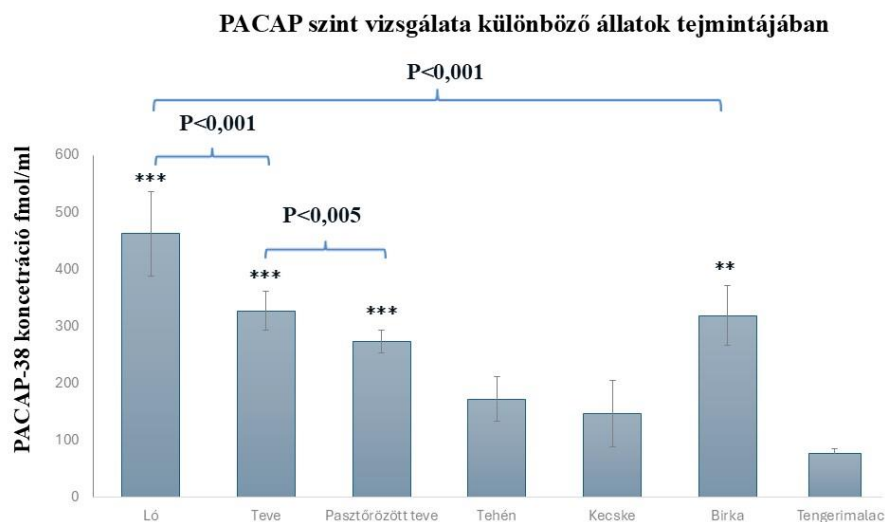
Watanabe J, Seki T, Shioda S. PACAP and neural development In: Reglodi D, Tamas A. (eds) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-PACAP*. Springer, Cham; 2016; pp. 65-82. https://doi.org/10.1007/978-3 319-35135-3_6

Watson CJ, Oliver CH, Khaled WT. Cytokine signalling in mammary gland development. *J Reprod Immunol*. 2011 Mar;88(2): 124-9. doi: 10.1016/j.jri.2010.11.006. Epub 2011 Jan 20. PMID: 21255846.

3.3.5. Mérték-e laktáló egereken a peptid szintjét a tejben?

Sajnálatos módon egerekből nem tudtunk megfelelő mennyiségű tejmintát gyűjteni a radioimmuno-assay vizsgálatokhoz, de munkánk során számos más állatfaj tejmintájának vizsgálatát elvégeztük. A kis rágcsálók közül a tengerimalac tejminták gyűjtésére volt lehetőségünk, amiben a tehéntejhez képest kisebb PACAP koncentrációt találtunk. A tehén- és kecsketejben hasonló PACAP értékeket mértünk. Ezen mintákhoz képest magasabb mennyiségű PACAP-ot találtunk a teve-, ló- és juhtejmintákban. A legmagasabb PACAP szintet a lótejben találtuk, és a friss tevetejben is magasabb szintet mértünk a pasztörözött tevetejhez képest. Ezen eredményeinket még nem publikáltuk, de több konferencián is bemutattuk (1. ábra).

Tamás A, Vass R. A, Helyes Zs, Bagoly T, Nagy P, Juhász J, Sótonyi P, Horváth G, Nikli B, Tarcai I, Reglodi D. Examination of PACAP in different milk samples 12th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, 2015. szeptember 21-26., Cappadocia, Törökország



1. ábra. PACAP-38 szint meghatározása radioimmuno-assay módszerrel különböző állatok tejmintáiból. ** P<0,01; *** P<0,001 vs tehén- és kecsketej

4. PACAP szerepe a Parkinson-kórban

4.2.1. Hogyan változik az endogén PACAP szint ingergazdagítás hatására?

Munkacsoportunk az ingergazdag környezet endogén PACAP szintre gyakorolt hatását a dolgozatban is felvázolt modell segítségével vizsgálta patkányokban (Horváth et al. 2015). Wistar patkányokat felnőtt korban 3 hétig ingergazdag környezetben tartottunk, majd ezt követően különböző agyterületekből (agytörzs, kisagy, diencephalon és telencephalon) homogenizátumot készítettünk és RIA módszerrel mértük a szövetek PACAP-27 és PACAP-38 szintjét. Azt találtuk, hogy mind a PACAP-27-, mind a PACAP-38-szerű immunreaktivitás szintje szignifikáns növekedést mutatott a legtöbb agyterületen azoknál az állatoknál, melyek 3 hétig ingergazdag környezetben voltak. Azt feltételezzük, hogy felnőttkorban az ingergazdag környezet védő hatásának kialakításában szerepe lehet a megnövekedett PACAP expressziónak, hasonlóan a már bizonyított NGF (idegi növekedési faktor), BDNF (agyi eredetű növekedési faktor) és NT-3 (neurotrofin-3) faktoroknak, amik a neurotrofin család tagjai, és hosszútávú ingergazdagság hatására emelkedett szintet mutatnak.

Horvath G, Kiss P, Nemeth J, Lelesz B, Tamas A, Reglodi D. Environmental enrichment increases PACAP levels in the CNS of adult rats. Neuro Endocrinol Lett. 2015;36(2):143-7. PMID: 26071583.

4.2.2. Mivel magyarázható az, hogy a 6-OHDA + PACAP kezelt csoportban a PARK expresszió 150%-ra emelkedik az ép oldalhoz viszonyítva?

Mind a standard, mind az ingergazdag környezetben tartott állatok esetében a léziót követő PACAP kezelés után a PARK7 fehérje szintje meghaladta a kezeletlen oldalon detektált fehérje szintet, ami arra utal, hogy a PACAP kezelés hatására más kompenzációs folyamatok is aktivizálódhatnak. Az jól ismert, hogy a PACAP és PARK7 fehérje által modulált hatások több közös útvonallal is rendelkeznek, melyen keresztül képesek megvédeni a dopamin sejteket a károsító hatásokkal szemben. A PACAP a PARK7-hez hasonlóan aktiválja a PI3K/PKB útvonalat, ami a neuronok túlélésének növekedéséhez vezet (Bhave et al. 2004; Kim et al. 2009; May et al. 2010). Egy másik közös pont az antiapoptotikus hatásuk a Bcl-2, Bcl-xL fehérjéken keresztül, amely a citokróm c release gátlásával fejt ki protektív hatását (Ráczi et al. 2008; Lee et al. 2018). Emellett mindkét fehérje képes a tirozin-hidroxiláz aktivitásának fokozására, így képes a dopamin szint emelésére (Moser et al. 1999; Ischikawa et al. 2009). Mindezen mechanizmusok hozzájárulhatnak a PARK7 fehérje kontroll szintet is meghaladó, fokozott expressziójához PACAP kezelés hatására.

Bhave SV, Hoffman PL. Phosphatidylinositol 3'-OH kinase and protein kinase A pathways mediate the anti-apoptotic effect of pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide in cultured cerebellar granule neurons: modulation by ethanol. J Neurochem. 2004 Jan;88(2): 359-69. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02167.x. PMID: 14690524.

Kim YC, Kitaura H, Taira T, Iguchi-Arigo SM, Ariga H. Oxidation of DJ-1-dependent cell transformation through direct binding of DJ-1 to PTEN. Int J Oncol. 2009 Dec;35(6): 1331-41. PMID: 19885556.

May V, Lutz E, MacKenzie C, Schutz KC, Dozark K, Braas KM. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PAC1HOP1 receptor activation coordinates multiple neurotrophic signaling pathways: Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase gamma and vesicle endocytosis for neuronal survival. J Biol Chem. 2010 Mar 26;285(13): 9749-9761. doi: 10.1074/jbc.M109.043117. Epub 2010 Jan 21. PMID: 20093365; PMCID: PMC2843224.

Ráczi B, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Szántó Z, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Roth E, Reglodi D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. Regul Pept. 2008 Jan 10;145(1-3): 105-15. doi: 10.1016/j.regpep.2007.09.015. Epub 2007 Sep 18. PMID: 17981349.

Lee MK, Lee MS, Bae DW, Lee DH, Cha SS, Chi SW. Structural basis for the interaction between DJ-1 and Bcl-XL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jan 1;495(1): 1067-1073. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.129. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29175327.

Moser A, Scholz J, Gänsele 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.

Ishikawa S, Taira T, Niki T, Takahashi-Niki K, Maita C, Maita H, Ariga H, Iguchi-Ariga SM. Oxidative status of DJ-1-dependent activation of dopamine synthesis through interaction of tyrosine hydroxylase and 4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) decarboxylase with DJ-1. *J Biol Chem.* 2009 Oct 16;284(42): 28832-44. doi: 10.1074/jbc.M109.019950. Epub 2009 Aug 24. PMID: 19703902; PMCID: PMC2781429.

4.3. Van-e jelentősége a PACAP és PAC1 génpolimorfizmusnak a Parkinson-kór vonatkozásában?

Jelenlegi ismereteink szerint a Parkinson-kór vonatkozásában eddig nem végeztek ilyen vizsgálatokat, azonban számos más neurológiai kórkép esetén találtak összefüggést a PACAP és receptorait kódoló gén egyes variánsai között. Hashimoto és munkacsoportja schizopheniában szenvedő betegekben vizsgálta a PACAP-ot és receptorait kódoló gén polimorfizmusait. Számos SNP (egy pontos nucleotidpolimorfizmus) variáns vizsgálatára került sor, melyek közül a PACAP gén variációi közül az SNP3 (rs1893154) és SNP5 (rs2856966), míg a PAC1 receptort kódoló gén variánsai közül az SNP2 (rs2302475) esetén találtak szignifikáns összefüggést a betegséggel, emellett ezen schizophren betegekben kisebb hippocampus volument és károsodott memória funkciót is leírtak (Hashimoto et al. 2007).

Egy másik vizsgálatban poszttraumás stressz szindrómában (PTSD) szenvedő nőkben írtak le az rs2267735 SNP variánssal kapcsolatban fokozott kockázatot (Ressler et al. 2011; Lind et al. 2017). Kimutatták a PAC1 gén rs2302475 polimorfizmusa és a problémás alkoholfogyasztás közötti kapcsolatot fiatal nők körében (Dragan et al. 2017). A PACAP génvariánsok hatását generalizált szorongásos zavarban is vizsgálták, ahol a venlafaxin XR kezelésre adott válasz a Asp54Gly (rs2856966) variáns esetében jobb kezelési eredménnyel járt (Cooper et al. 2013). Emellett más neurológiai kórképeket is vizsgáltak, de nem találtak genetikai összefüggést cluster fejfájás kapcsán (Ran et al. 2017) és bipoláris betegségben sem (Lohoff et al. 2008).

A neurológiai kórképek mellett a hirtelen csecsemőhalál szindróma (SIDS) kapcsán is vizsgálták a PACAP génpolimorfizmust. Kaukázusi pácienseknél nem találtak szignifikáns összefüggést a PACAP és a SIDS között. Ezzel szemben az afroamerikai populációban a PACAP 2. exonján belül az rs2856966 SNP variáns szignifikáns összefüggést mutatott az kórképpel (Cummings et al. 2009). A PAC1 receptort kódoló gén rs2267735 SNP variánsa szignifikáns összefüggést mutatott puerto ricoi asztmás gyerekek estén (Chen et al. 2013).

A PACAP receptorok allélvariánsainak vizsgálatával munkacsoportunk is foglalkozott a PTE ÁOK Orvosi Népegészségtani Intézetével folytatott kollaborációban a NKFIC K119759 számú pályázat keretében. A PACAP receptorok különböző allélváltozatainak eloszlását vizsgáltuk roma és nem roma általános populációkban (214 roma és 198 nem roma minta). A PAC1 (ADCYAP1R1) receptor gén rs2267735 és rs2302475 polimorfizmusainak genotipizálását 120-120 mintán végeztük el a módszertan tesztelése és a várható közelítő alléleloszlások megállapítása érdekében. Ezen vizsgálatok még nem zárultak le.

Chen W, Boutaoui N, Brehm JM, Han YY, Schmitz C, Cressley A, Acosta-Pérez E, Alvarez M, Colón-Semidey A, Baccarelli AA, Weeks DE, Kolls JK, Canino G, Celedón JC. *ADCYAP1R1 and asthma in Puerto Rican children.* *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Mar 15;187(6):584-8. doi: 10.1164/rccm.201210-1789OC. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23328528; PMCID: PMC3733434.

Cooper AJ, Narasimhan S, Rickels K, Lohoff FW. *Genetic polymorphisms in the PACAP and PAC1*

receptor genes and treatment response to venlafaxine XR in generalized anxiety disorder. *Psychiatry Res.* 2013 Dec 30;210(3):1299-300. doi: 10.1016/j.psychres.2013.07.038. Epub 2013 Aug 22. PMID: 23972788.

Cummings KJ, Klotz C, Liu WQ, Weese-Mayer DE, Marazita ML, Cooper ME, Berry-Kravis EM, Tobias R, Goldie C, Bech-Hansen NT, Wilson RJ. Sudden infant death syndrome (SIDS) in African Americans: polymorphisms in the gene encoding the stress peptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Acta Paediatr.* 2009 Mar;98(3):482-9. doi: 10.1111/j.1651-2227.2008.01131.x. Epub 2008 Dec 17. PMID: 19120039.

Dragan WL, Czerski PM, Dragan M. PAC1 receptor (ADCYAP1R1) genotype and problematic alcohol use in a sample of young women. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017 Jun 8;13:1483-1489. doi: 10.2147/NDT.S137331. PMID: 28652748; PMCID: PMC5473483.

Hashimoto R, Hashimoto H, Shintani N, Chiba S, Hattori S, Okada T, Nakajima M, Tanaka K, Kawagishi N, Nemoto K, Mori T, Ohnishi T, Noguchi H, Hori H, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Nakabayashi T, Saitoh O, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Weinberger DR, Kunugi H, Baba A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2007 Nov;12(11):1026-32. doi: 10.1038/sj.mp.4001982. Epub 2007 Mar 27. PMID: 17387318.

Lind MJ, Marraccini ME, Sheerin CM, Bountress K, Bacanu SA, Amstadter AB, Nugent NR. Association of Posttraumatic Stress Disorder With rs2267735 in the ADCYAP1R1 Gene: A Meta-Analysis. *J Trauma Stress.* 2017 Aug;30(4):389-398. doi: 10.1002/jts.22211. Epub 2017 Jul 26. PMID: 28746747; PMCID: PMC5706560.

Lohoff FW, Bloch PJ, Weller AE, Ferraro TN, Berrettini WH. Association analysis of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP/ADCYAP1) gene in bipolar disorder. *Psychiatr Genet.* 2008 Apr;18(2):53-8. doi: 10.1097/YPG.0b013e3282f60320. PMID: 18349695.

Ran C, Fourier C, Michalska JM, Steinberg A, Sjöstrand C, Waldenlind E, Belin AC. Screening of genetic variants in ADCYAP1R1, MME and 14q21 in a Swedish cluster headache cohort. *J Headache Pain.* 2017 Aug 22;18(1):88. doi: 10.1186/s10194-017-0798-y. PMID: 28831700; PMCID: PMC5567453.

Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, Norrholm SD, Kilaru V, Smith AK, Myers AJ, Ramirez M, Engel A, Hammack SE, Toufexis D, Braas KM, Binder EB, May V. Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature.* 2011 Feb 24;470(7335):492-7. doi: 10.1038/nature09856. Erratum in: *Nature.* 2011 Sep 1;477(7362):120. PMID: 21350482; PMCID: PMC3046811.

5. PACAP politraumatizált betegeken

5.1. Mivel ad többet a PACAP, mint az eddig alkalmazott biomarkerek?

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 asszociált 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 asszociált 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.

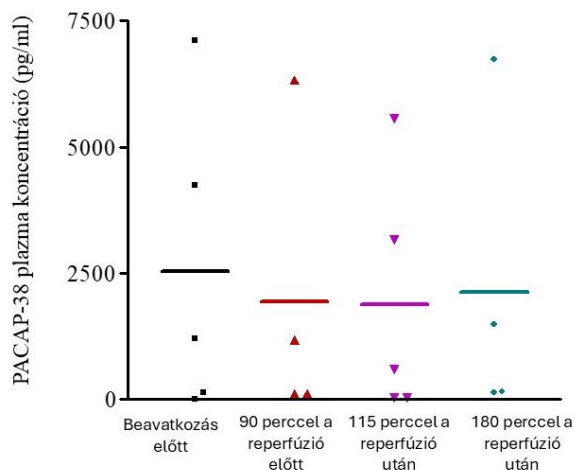
Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz mg, Leceta J, Ganea D, Gomariz RP. PACAP in immunity and inflammation. Ann N Y Acad Sci. 2003 May;992: 141-57. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03145.x. PMID: 12794054.

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.

6. Cardiovascularis kórképek

6.1. Sajnálatos azonban, hogy a sertés infarctus modellben nem történtek plazma PACAP mérések...

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 (2. ábra).



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

6.2.1. Mi lehet az a mechanizmus, ami a cardiovascularis kórképekben a kezdeti megnövekedett (és protektív hatású) PACAP szintet lecsökkenti?

Dolgozatomban részletesen bemutattam a PACAP kardioprotektív hatásának háttérben álló lehetséges mechanizmusokat, amelyek elősegítik a peptid antioxidáns és antiapoptotikus hatását ischaemiás és oxidatív stressz-indukálta károsodások esetén cardiomyocytákon (Rácz et al. 2008; Róth et al. 2009). Az in vitro kardioprotektív hatást munkacsoportunk is igazolta izolált cardiomyocytákon ischaemia/reperfúzió és oxidatív stressz-indukálta károsodás kapcsán, ahol protektív hatását a különböző proapoptotikus útvonalak gátlásával (Bad, caspase-3) és

antiapoptotikus útvonalak (Bcl-xL, Bcl-2, foszfo-Bad) aktiválásával fejt ki (Gasz et al. 2006a, b; Rácz et al. 2008; Róth et al. 2009). Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a PACAP egy olyan általános biomarker, amely antioxidáns, antiapoptotikus és gyulladáscsökkentő hatásainak köszönhetően az akut sejtkárosodásra adott válaszreakció részeként, a károsodás mértékével összhangban, jelentős változásokat mutat.

Ezzel szemben a krónikus, kompenzált szívelégtelen betegek esetében az akut, dekompenzált betegekhez és a kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb PACAP szintet mértünk. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy az alacsonyabb endogén PACAP-38 szint a gyengült kardioprotektív funkció következményeként hozzájárulhat az elváltozások gyorsabb progressziójához, és így a szívbetegségek prognózisában akár negatív prediktív faktor lehet.

A myocardialis infarctuson átesett betegeknél a reperfúziót követően feltételezésünk szerint a sejtek megfelelő vérellátása miatt már nem szükséges a sejtvédő folyamatokban részt vevő útvonalak fokozott aktivitása, ami csökkenti azt az ischaemiás stresszt, amely korábban a fokozott PACAP felszabadulást okozhatta, így az oxigénellátás helyreállását követően a felszabaduló PACAP mennyisége is csökkenhet. Emellett a reperfúzió során a gyulladáscsökkentő válaszok mérséklődhetnek, így csökkentve a gyulladáscsökkentő sejtek (például macrofágok, lymphocyták) aktiválódását és a sejtekből PACAP felszabadulását. Végül, a megfelelő oxigénellátás következtében a sejtek fokozott neuropeptid termelése is a normál fiziológiás szintre térhet vissza.

Gasz B, Rácz B, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserpes B, Lubics A, Gallyas Jr F, Tóth G, Lengvári I, Reglődi 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, Rácz 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)

Rácz B, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Szántó Z, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Roth E, Reglődi D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. Regul Pept. 2008 Jan 10;145(1-3): 105-15. doi: 10.1016/j.regpep.2007.09.015. Epub 2007 Sep 18. PMID: 17981349.

Róth E, Wéber G, Kiss P, Horváth G, Tóth G, Gasz B, Ferencz A, Gallyas Jr F, Reglődi D, Rácz B. Effects of PACAP-38 and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. Ann N Y Acad Sci. 2009; 1163(1): 512-516. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03635.x. PMID: 19456402.

6.2.2. Történeke-e vizsgálatok potenciális PACAP analógokkal cardiovascularis kórképekben?

Az egyik legszélesebb körű vizsgálatot a különböző PACAP analógokkal kapcsolatban Ramos-Álvarez és munkacsoportja végezte (2015), akik negyvenhat különböző PACAP-analógot szintetizáltak a PACAP molekula különböző pozíciókban (1-4, 14-17, 20-22, 28, 34, 38 aminosav) történő szubsztitúciójával, majd megvizsgálták az egyes analógok receptor szelektivitását és affinitását. A 46 PACAP analógból tizenöt 6-78-szor nagyobb affinitással rendelkezett a PAC1 receptorhoz, mint a VPAC1 receptorhoz, és 13 analóg agonista hatású volt. Bár a kötődési affinitások szignifikánsan korreláltak az agonista hatásossal, a különböző PACAP analógok esetében a receptor-érzékenység mértéke jelentősen különbözött, ami a PAC1 receptor aktiválásának 0-103-szoros szelektív hatásosságát eredményezte a VPAC1 receptorral szemben. Ezenkívül számos olyan PACAP analógot azonosítottak, amelyek a PAC1 receptorra nagy szelektivitást mutattak a VPAC2 receptorral szemben. Olyan PACAP-analógot is találtak, amelyek terápiás szempontból hasznosabbnak bizonyulhatnak a felezési idejüket meghosszabbító ismert szubsztitúciók miatt.

Korábban már említést tettem arról, hogy a fázis II. klinikai vizsgálati stádiumba eddig csak a migrénnel kapcsolatos kutatások jutottak, ahol PAC1 receptort gátló monoklonális antitestek hatékonyságát vizsgálták, azonban állatkísérletes vizsgálatban számos új analóg hatékonyságát tesztelték különböző betegségek kapcsán. Lamine és munkacsoportja (2015) bizonyította az Ac-[Phe(pI)6, Nle17]PACAP(1-27) hatékonyságát in vitro és in vivo Parkinson-kór modellekben, ahol a hasonló protektív hatás mellett csökkent cardiovascularis mellékhatás tapasztaltak az analóg kezelést követően. Dejda és munkacsoportjának (2011) eredményei pedig azt mutatták, hogy a PACAP38 metabolikusan stabil analógja, az acetyl-[Ala15, Ala20]PACAP38-propilamid már pikomoláris dózisokban is jelentősen csökkenti az infarctus nagyságát és javítja a neurológiai tüneteket patkányban a cerebri media elzáródása esetén. Emellett szintén említettem már korábban, hogy a PACAP glikozilálásával növelhető a vér-agy gáton való átjutás és protektív hatású a Parkinson-kór modellben és traumás agysérülés során (Apostol et al. 2022).

Munkacsoportunk számos PACAP fragmens (PACAP 4-13, 4-22, 6-10, 6-15, 11-15 és 20-31) hatását is vizsgálta retinális hipoperfúziós modellben, de a PACAP-38-cal ellentétben a fragmensek retinoprotektív hatását nem tudtuk kimutatni (Werling et al. 2014).

Apostol CR, Bernard K, Tanguturi P, Molnar G, Bartlett MJ, Szabò 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.

Dejda A, Seaborn T, Bourgault S, Touzani O, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D. PACAP and a novel stable analog protect rat brain from ischemia: Insight into the mechanisms of action. Peptides. 2011 Jun;32(6):1207-16. doi: 10.1016/j.peptides.2011.04.003. Epub 2011 Apr 14. PMID: 21514338.

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

Ramos-Álvarez I, Mantey SA, Nakamura T, Nuche-Berenguer B, Moreno P, Moody TW, Maderdrut JL, Coy DH, Jensen RT. A structure-function study of PACAP using conformationally restricted analogs: Identification of PAC1 receptor-selective PACAP agonists. Peptides. 2015 Apr;66:26-42. doi: 10.1016/j.peptides.2015.01.009. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25698233; PMCID: PMC4420714.

Werling D, Reglodi D, Kiss P, Toth G, Szabadfi K, Tamas A, Biro Z, Atlasz T. Investigation of PACAP Fragments and Related Peptides in Chronic Retinal Hypoperfusion. J Ophthalmol. 2014;2014:563812. doi: 10.1155/2014/563812. Epub 2014 May 12. PMID: 24900914; PMCID: PMC4036611.

6.2.3. Végeztek-e vizsgálatokat MI modellben PACAP-KO egerekben?

PACAP KO egerekben tudomásunk szerint még nem végeztek ilyen vizsgálatokat, de akut myocardialis infarctus egér modelljében, ahol az ischaemiát a bal coronaria elülső leszálló ágának ligatúrájával hozták létre, szignifikánsan magasabb PACAP immunreaktivitást igazoltak a bal kamrában az érelzárást követően a sham-operált csoporthoz képest (Alston et al. 2011). Emellett PACAP KO egerekben doxorubicin-indukálta szívelégtelenségben is vizsgálták a PACAP szerepét, és kimutatták, hogy a Bax és caspase-3 útvonalak gátlásával kardioprotektív hatással bír, emellett PACAP-génkiütött egerekben a doxorubicin kezelés súlyosabb szívelégtelenséget hozott létre és ezek az egerek magasabb mortalitást is mutattak, mint vad társaik (Mori et al. 2010). Egy másik kardiotoxikus citosztatikum, a mitoxandron kezelés esetén is bizonyították a PACAP protektív hatását (Subramaniam et al. 2017). Korábbi kutatások PAC1 receptor-deficiens egerekben pulmonalis hipertóniát és jobb szívfél elégtelenséget találtak (Otto et al. 2004).

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.

Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A, Endo K, Iso Y, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S. Cardioprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. Circ J. 2010; 74(6): 1183-1190. doi: 10.1253/circj.cj-09-1024. PMID: 20378996.

Otto C, Hein L, Brede M, Jahns R, Engelhardt S, Gröne HJ, Schütz G. Pulmonary hypertension and right heart failure in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. Circulation. 2004; 110(20): 3245-51. doi: 10.1161/01.CIR.0000147235.53360.59. PMID: 15520307.

Subramaniam V, Chuang G, Xia H, Burn B, Bradley J, Maderdrut JL, Coy DH, Varner KJ. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects against mitoxantrone-induced cardiac injury in mice. Peptides. 2017; 95(1): 25-32. doi: 10.1016/j.peptides.2017.07.007. PMID: 28720396.

Bízva válaszaim pozitív elbírálásában maradok tisztelettel:

Dr. Tamás Andrea

Dr. Tamás Andrea
egyetemi docens
PTE ÁOK Anatómiai Intézet