

# DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

---

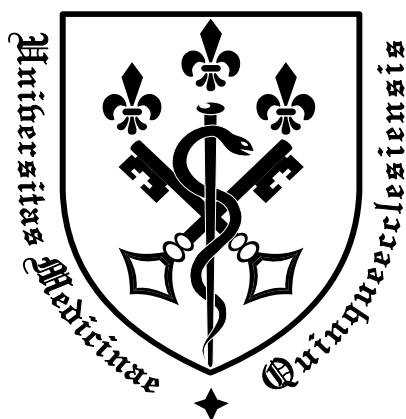
AZ ENDOGÉN HYPOPHYSIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP)

HIÁNYÁNAK VIZSGÁLATA GÉNKIÜTÖTT EGEREK

HALLÓRENDSZERÉBEN, ÉRRENDSZERÉBEN ÉS FOGFEJLŐDÉSE SORÁN

---

**Dr. Fülöp Balázs Dániel**



**Témavezető: Dr. Tamás Andrea, egyetemi docens**

**Programvezető: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár**

**Doktori iskola vezetője: Dr. Szekeres Júlia, egyetemi tanár**

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar**

**Anatómiai Intézet**

**2020**

## I. BEVEZETÉS

---

A Ph.D. értekezésem alapjául szolgáló kutatások során hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)-génkiütött egerekben vizsgáltuk, hogy az endogén PACAP hiánya milyen módon befolyásolja különböző szervrendszerek működését. Értekezésemben ezen vizsgálatok közül a hallórendszerrel, az érrendszerrel és a fogfejlődéssel kapcsolatos legújabb eredmények kerülnek leírásra.

### A PACAP ELŐFORDULÁSA ÉS HATÁSAI

---

A PACAP tagja a vazóaktív intestinalis polipeptid (VIP)/glükagon/szekretin peptidcsaládnak, szerkezete a VIP-vel 68%-os homológiát mutat. Legnagyobb mennyiségben az idegrendszerben és az endokrin szervekben fordul elő, legelőször neurotrof és neuroprotektív hatásait írták le. Protektív funkcióit antiapoptotikus, antiinflammatorikus és antioxidáns hatásainak köszönheti. Számos degeneratív idegrendszeri betegségben, cerebrális iszkémia modellben, a bélrendszerben, a vesében és a cardiovascularis rendszerben is citoprotektív funkciót lát el. A PACAP az érzékszervekben is protektív hatásokkal rendelkezik, az érzékszervek sejtjeinek a szaporodását is befolyásolja. Retinoprotektív hatásai jól ismertek, a retina különböző károsodása esetén a PACAP védő hatása mind morfológiai, mind funkcionális, mind pedig molekuláris szinten kimutatható. A védőhatás hátterében az antiapoptotikus jelátviteli utak aktiválása, az apoptotikus utak gátlása és antiinflammatorikus hatások állnak.

A PACAP citoprotektív hatásain túl neurotranszmitterként, neuromodulátorként mind a fejlődés során, mind alapvető fiziológiás folyamatok szabályozásában részt vesz. A peptid befolyásolja különböző neurotranszmitterek és hormonok termelését, a bélrendszer motilitását, az immunrendszert, a cirkadián ritmust, a test hőszabályozását, az ivarszervek és a placenta működését, a migrén és számos pszichiátriai kórkép kialakulását valamint a cardiovascularis rendszer működését. A PACAP részt vesz a szervezet kötő- és támasztószöveteinek fejlődésében és működésének szabályozásában is, beleértve a csontokat, porcokat és fogakat is.

### A PACAP IZOFORMÁI ÉS RECEPTORAI

---

A PACAP a természetben 38 aminosavas (PACAP1-38) és 27 aminosavas formában fordul elő (PACAP1-27). Receptorai G-protein kapcsolt receptorok, melyek közül a VPAC1 és VPAC2 (vazóaktív intestinalis peptid receptor 1 és 2) receptorok a PACAP-ot és a VIP-t egyforma affinitással kötik, míg a PAC1 receptor (PACAP receptor 1-es típus) a PACAP-ra specifikus. A receptorok nem szövetspecifikusak, a receptortípusok eloszlása egy adott szöveten belül is nagymértékű variabilitást mutat. Alternatív splicing során a PAC1 receptornak is számos variánsa kialakulhat, mely nagyban befolyásolja az intracelluláris jelátviteli utakat, vagy a receptor affinitását változtatja meg a PACAP különböző izoformái iránt.

## I. BEVEZETÉS

---

### A PACAP HATÁSÁT KÖZVETÍTŐ INTRACELLULÁRIS JELÁTVITELI UTAK

---

A PACAP kanonikus útvonala a PAC1 receptoron keresztül a ciklikus adenzin-monofoszfát – protein-kináz A (cAMP-PKA) útvonal aktiválása. Ez az extracelluláris szignál regulált kináz (ERK) foszforilációjához vezet, amely számos molekulán keresztül a sejtek túlélését segíti. A PKA-ERK gátolja a c-Jun N-terminális kinázt (JNK), ezen keresztül a c-Jun foszforilációját, és az apoptotikus útvonalakat. A PACAP cAMP-től függetlenül az Akt-on keresztül gátolja a proapoptotikus Bad és Bax molekulákat, így aktiválja az antiapoptotikus B-sejtes lymphoma protein 2 (Bcl-2) és a B-sejtes lymphoma protein - extra large (Bcl-xL) fehérjéket, ezzel megakadályozva a kaszpáz kiáramlást és a mitokondriális apoptózist. A PACAP szintén a cAMP-től függetlenül aktiválja a foszfolipáz C-t (PLC), ami ugyancsak csökkent kaszpáz-aktivációt okoz.

---

### A PACAP ELŐFORDULÁSA ÉS HATÁSAI A HALLÓRENDSZERBEN

---

Mind a PACAP-ot, mind a PAC1 receptort a belső fül és a hallópálya számos területén kimutatták. A belső fül területén PACAP-ot találtak a Corti-szervben, a ganglion spirale sejtjeinek többségében, és a stria vascularis marginalis sejtjeiben. A Corti-szervben PACAP immunpozitivitást találtak többek között a belső és külső szőrsejteken, PAC1 receptor pozitivitást a belső és külső szőrsejteken, és számos támasztósejten. A stria vascularisban többek között a marginalis sejtek bazális-lateralis felszínén találtak PACAP és PAC1 receptor jelölődést. A PACAP-nak és receptorának kolokalizációja egyazon sejten annak autocrin/intracrin szabályozására utalhat. Feltételezhetően a PACAP a tight junction integritásában és a K<sup>+</sup>-transzportban játszik fontos szerepet, amivel az endolymphá összetételére és a megfelelő ionkoncentráció fenntartására is hatással lehet. A kolokalizációs vizsgálatokból kiderült, hogy a PACAP többségében a belső fül efferens beidegzésében vesz részt. Az efferens neurotranszmitterek közül a kolin-acetiltranszferáz (ChAT) és a dopamin β-hydroxiláz (DBH) a PACAP-pal kolokalizációban jelent meg a Corti-szervben. A glutamát a cochlea elsődleges afferens neurotranszmittere, azonban akusztikus trauma vagy iszkémia esetén a túlzott glutamát kiválasztás sejtkárosító hatású. A glutamát receptor 2/3 (GluR2/3) a PAC1 receptorral együtt jelenik meg a külső és belső szőrsejteken és számos támasztósejten. A PACAP egyéb szervekben a glutamát okozta sejtkárosodást csökkenteni képes, ami alapján feltételezhető, hogy a belső fülben a PAC1 receptor és a Glu2/3 receptor kolokalizációja arra utal, hogy a PACAP a glutamát indukálta excitotoxicitás elleni védelemben szerepet játszhat.

A hallópályában PACAP jelölődést találtak a cochlearis magokban és a nervus cochlearisban. Az oliva superior (SOC) területén található idegsejtek mintegy 30%-ban, a corpus trapezoideum területén található cochlea efferens neuronok mintegy 40%-ban PACAP pozitívak. Feltételezhető, hogy a cochleában leírt PACAP-pozitív rostok perikarionjai itt találhatóak. Az olivocochlearis pályákat tekintve a PACAP a külső szőrsejteken végződő tractus olivocochlearis medialisban expresszáldott, ami tovább

## I. BEVEZETÉS

---

---

erősíti azon elméletet, miszerint a PACAP funkcionális regulációs szerepe a hallórendszerben leginkább a külső szőrsejtek efferens beidegzésében van. Emberi agymintákon mind a colliculus inferior (CI), mind pedig a corpus geniculatum mediale (CGM) területén is mutattak ki PACAP-ot.

### A PACAP HATÁSA A BELSŐ FÜL FEHÉRJEPROFILJÁRA

---

Az endolympha termelődésének fő helye a stria vascularis, megfelelő összetétele elengedhetetlen a belső fül működéséhez, elváltozásai a belső fül különböző patológiás folyamataihoz köthetőek. Feltételezhető, hogy az aminoglikozid antibiotikumok halláskárosító hatásának is egyik útja, hogy ezen antibiotikumok az endolymphán keresztül érik el a szőrsejteket.

Ismert, hogy számos neuropeptid befolyásolja az endolympha összetételét, úgymint a substance P, vazopresszin, szomatosztatin. Az endolympha ionkoncentrációja és elektromos potenciálja grádienset képez a bazálistól az apikális kanyarulat felé, csakúgy mint a PACAP és a PAC1 receptor a stria vascularisban, ami alapján feltételezhető, hogy a PACAP-nak hatása van az endolympha összetételére. Kutatócsoportunk korábban már vizsgálta a ductus cochlearisban található endolympha fehérjéinek változását intraperitonealis PACAP-kezelés hatására 1 napos csirkében. A kísérlet során számos fehérjecsúcsot találtunk a 14-80 kDa közötti tartományban, amely megfeleltethető az endolymphában előforduló főbb fehérjéknek (albumin,  $\alpha$ -kimotripszin,  $\alpha$ -antitripszin, transferrin, apolipoprotein D, apolipoprotein J, fetuin), a PACAP kezelésnek azonban nem volt hatása a fehérjék összetételére az általunk alkalmazott kísérleti elrendezésben.

### A PACAP HATÁSA BELSŐ FÜLBŐL KÉSZÜLT SEJTNYÉSZETEN

---

Az apoptózis a belső fül fiziológiás folyamataiban fontos szerepet játszik, aminek fontos tényezője az oxidatív stressz. Különböző károsító hatások a szőr- és/vagy idegsejtek túlzott mértékű apoptózisához, ennek következtében pedig halláscsökkenéshez vezethet. Ezek alapján azon molekulák, melyek antioxidáns és antiapoptotikus hatásokkal rendelkeznek, mint például a PACAP, a belső fül károsodások kivédésében fontos szerepet játszhatnak. Ezen jelátviteli utak vizsgálatára kutatócsoportunk napos csirkék belső füléből készített sejtenyészetet. MTT teszt során  $H_2O_2$  kezelés hatására a sejtek túlélése a felére csökkent, ami PACAP kezelés hatására szignifikánsan javult. További tesztekkel kimutattuk, hogy a PACAP az apoptózis mértékét tudta szignifikáns mértékben csökkenteni, csökkent a kaszpáz-3 apoptotikus fehérje aktivációja is. A lehetséges molekuláris jelátviteli utak között cAMP függő és független útvonalak is részt vesznek. Ez lehet a molekuláris magyarázata, hogy a PACAP miként képes a belső fülben védő hatást kifejteni különböző ototoxikus ágensek, öregedés, zaj túlingerlés vagy más károsító hatások esetén.

# I. BEVEZETÉS

---

---

## A PACAP SZEREPE A FOGFEJLŐDÉSBN

---

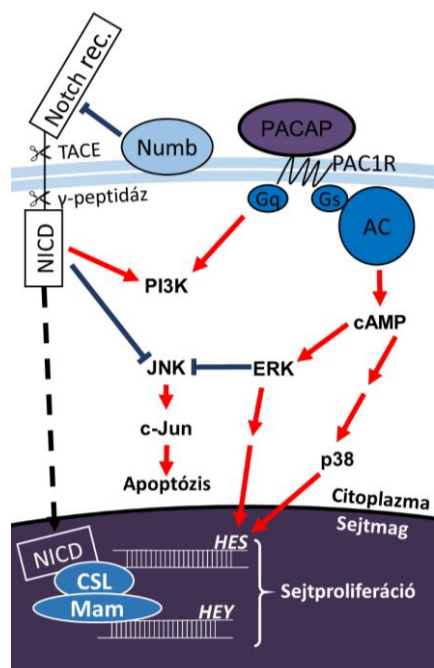
A fogak fejlődése a száj ektoderma és az alatta található ektomesenchyma folyamatos egymásra hatása révén alakul ki, aminek hatására az ektoderma benyomul az ektomesenchymába és kialakítja a lamina dentalist. Később ebből alakulnak ki a fogbimbók, melyekből a sapka és harang stádiumok jönnek létre. A késői harang stádiumban a belső zománcsejtek már zománctermelő ameloblastokká differenciálódtak, az általuk közrezárt térben elhelyezkedő ektomesenchymából pedig a dentin képzéséért felelős odontoblast sejtek rétege, az alattuk elhelyezkedő subodontoblast réteg, és a későbbi pulpakamra helyén megjelenő fogpapilla látható. A fogfejlődés befolyásolásában több, mint 300 faktort azonosítottak, melyek közül a csont morfogénikus protein (BMP), sonic hedgehog (SHH), wingless-related integration site (WNT), fibroblast növekedési faktor (FGF) és Notch jelátviteli utak a leggyakrabban vizsgált faktorok.

PACAP-ot találtak az odontoblast sejtekben és a subodontoblast rétegben, valamint a pulpa területén az erek körül. A fog luxációját követően mind a PAC1 receptor, mind a PACAP mennyisége megnő a ligamentum parodontale területén. A csont és fogfejlődésben fontos szerepet játszó molekulák közül a PACAP a PKA-n keresztül a Runx2-kapcsolt transzkripciós faktor (RUNX2) molekula aktivitását, és ezzel az *SHH* gén, valamint osteoblast sejt kultúrában a BMP-k és a Smad fehérjecsaldát expresszióját is befolyásolja.

A Notch jelátviteli útvonal egy evolúciós szinten nagy mértékben konzervált jelátviteli útvonal, amelynek számos szerv kialakulásában szerepe van, beleértve a fogak fejlődését is. Egymással szomszédos sejteken expresszálódó ligandjainak és receptorainak egymáshoz kötésével befolyásolja a sejtek proliferációját és/vagy apoptózisát. Aszimmetrikus sejtosztódást és különböző irányú sejt differenciációt indukál, így az egymás melletti azonos eredetű sejtekből különböző funkciójú leánysejtek létrejöttét és így különböző rétegek kialakulását segíti elő. A Notch jelátviteli útvonal részben a PACAP-pal átfedést mutat, így feltételeztük, hogy változásai PACAP-génkiütött egerekben annak hatásait pótolni hivatottak.

A Notch jelátviteli útvonalban négy receptor molekula (Notch1, 2, 3, 4), valamint öt ligand (DLL1, 3, 4 és Jagged1, 2) vesz részt. A ligandok receptorhoz való kötésének hatására a TNF- $\alpha$  konvertáló enzim (TACE) levágja a Notch intracelluláris egységet (Notch intracelluláris domén, NICD) a receptorról, ami a sejtmagba kerül. Ott kötést hoz létre a CSL transzkripciós faktorról. A Numb fehérje a Notch jelátviteli útvonalat gátolja (1. ábra).

## I. BEVEZETÉS



1. ábra: A PACAP és a Notch útvonalak közös célpontjai. Piros nyíl: aktiváció. Fekete tompa nyíl: gátlás. AC: adenilát-cikláz; cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát; CSL: CSL transzkripciós faktor; ERK: extracelluláris szignál regulált kináz; G<sub>s</sub> és G<sub>q</sub>: G<sub>s</sub> és G<sub>q</sub> protein; JNK: c-Jun N-terminális kináz; Mam: Mastermind; NICD: Notch intracelluláris domén; Numb: Numb fehérje; p38MAPK: p38 mitogén-aktivált protein-kináz; PAC1R: PACAP receptor 1-es típus; PI3K: foszfatidil-inozitol 3-kináz; TACE: TNF- $\alpha$  konvertáló enzim.

### A PACAP SZEREPE A CARDIOVASCULARIS RENDSZERBEN

A PACAP sokféle hatást fejt ki az szív- és érrendszerre. PACAP kezelés hatására vazodilatáció és szisztémás vérnyomás csökkenés alakul ki. Vazodilatációs hatását számos szervrendszer ereiben kimutatták különböző kísérleti állatokban és emberben is. Ezen hatásokat a PACAP mindhárom receptora közvetíti, melyek főként az artériák és arteriolák falában helyezkednek el. Jelenlétüket kimutatták többek között az aortában, a koronáriákban és az agy ereiben is. A PACAP egyértelmű vazodilatációs hatásait árnyalja, hogy a PACAP különböző katekolaminok elválasztásához, és ezen keresztül szisztémás vérnyomásemelkedéshez vezethet. Kutatócsoportunk a PACAP angiogenetikus hatásait mutatta ki az agy microvaszkuláris ereiből származó endothelsejteken. Egérből izolált endothel sejttenyészetben az ERK útvonal aktiválásával, így a JNK és p38MAPK útvonalak gátlásán keresztül a PACAP csökkentette az oxidatív stressz okozta apoptózist. Kutatócsoportunk a PACAP védő hatását igazolta cardiomyocytá sejttenyészetben oxidatív stressz és doxorubicin indukálta apoptózis, valamint iszkémia-reperfúzió okozta károsodás ellen, amelyet részben a Bad, Bcl-2, kaszpáz-3 mitokondriális útvonalon keresztül fejt ki. A szív- és érrendszer területén több klinikai kísérletet is végeztünk, amelyek kimutatták a PAC1 receptor mRNS-ét emberi myocardium mintákon, valamint a PACAP szintjének változását szöveti szinten myocardialis iszkémiában és a szérumban dilatatív cardiomyopathia esetén.

### A PACAP-GÉNKIÜTÖTT (KO) EGEREK VIZSGÁLATA

Az endogén PACAP hiányának vizsgálatára Hashimoto és munkatársai 2001-ben PACAP-génkiütött (KO) egértörzset hoztak létre. Ezen egerek makroszkóposan nem különböznek vad társaiktól, azonban a mikroszkópos morfológia és a funkcionális vizsgálatok eltéréseket mutatnak, valamint az egerek viselkedése is eltér vad társaikétól. A KO egerek szaporodási képessége csökkent, mortalitása emelkedett, metabolikus rendszerük károsodott. Az állatokra hiperaktivitás, csökkent félelemérzet és depressziós jelek jellemzőek, fájdalomra és stresszhatásra a vad típustól eltérő választ adnak. A PACAP

## I. BEVEZETÉS

---

---

KO állatokban a kisagy mikroszkópos felépítése eltér a vad egerektől, az idegsejtek abnormalis arborizációja és myelinizációs eltérések mutathatók ki.

A KO egerek különböző toxikus vagy károsító hatásokra a vad egereknél szignifikánsan nagyobb mértékű károsodással reagálnak. Ezt kimutatták iszkémiás és iszkémia-reperfúzió modellekben többek között az agy, a retina, a vese és a bél területén. Számos toxicitás modellben is a PACAP KO egerek megnövekedett érzékenységét detektálták, például retinakárosodásban, autoimmun encephalitis modellben, gerincvelő és perifériás ideg sérülése esetén, pancreas glucotoxicitás modellben és a szív doxorubicin okozta károsodásában. Arthritis modellben a PACAP KO egerek csont újdonszövődése is zavart mutatott.

### A HALLÓRENDSZER VIZSGÁLATA PACAP KO EGEREKBN

---

Kutatócsoportunk korábban heterozigóta és homozigóta PACAP-génkiütött egereken vizsgálta a cochlea felépítését és a PAC1 receptor jelenlétét. Mind a két csoportban PAC1 receptor immunpozitivitást tudtunk kimutatni a belső és külső szőrsejtek területén, a Deiters-sejtek és a pillér sejtek területén, azonban a PACAP KO állatok esetében minden területen a PAC1 receptor szignifikánsan alacsonyabb jelintenzitást mutatott, mint vad társaikban. Kutatócsoportunk az endogén PACAP hiányának hatását vizsgálta a  $Ca^{2+}$ -kötő fehérjék immunpozitivitására kontroll körülmények között, valamint kanamycin indukálta ototoxikus modellben vad és PACAP KO állatokon, melynek eredményeit a megbeszélésben diszkutálom.

### A PACAP-GÉNKIÜTÖTT EGEREK FOGFEJLŐDÉSE

---

Hét napos egerek molaris fogainak vizsgálata során korábban azt találtuk, hogy a PACAP KO egerek esetében a vad egerekhez képest a dentin vékonyabb, kristályszerkezete rendezetlenebb, a zománc fehérjeprofilja csökkent variabilitást mutat. A jelátviteli útvonalakat tekintve az SHH, GLI1 (glioma-associated oncogene 1) és a PTCH1 (protein patched homolog 1 protein) immunpozitivitása emelkedett szintet mutat a PACAP KO egerekben a vad állatokhoz képest. A metszőfogak PACAP KO egerekben 2 nappal előbb törnek át, mint a vad egerekben. Felnőtt egerekben a PACAP KO egerek metszőfogainak mérete kisebb, pulpakamrája szűkebb, és szintén rendezetlenebb kristályszerkezet jellemzi a dentin állományát.

### A PACAP-GÉNKIÜTÖTT EGEREK CARDIOVASCULARIS RENDSZERE

---

A PACAP KO egerekben a cardiovascularis rendszer is változásokat mutat a vad típusú egerekhez képest. Doxorubicin kezelést követően az egerek echocardiographia segítségével mért szívfunkciói csökkentek, balkamra dilatáció alakult ki, a szívben megnövekedett fibrózist és szívizomsejt-degenerációt írtak le. A KO egerek meningeális ereinek vazodilatációs képessége szintén csökkent.

## I. BEVEZETÉS – II. CÉLKITÚZÉS

---

### A PACAP ÉS AZ ÖREGEDÉS

---

Egyre több kutatási adat utal arra, hogy a PACAP antiapoptotikus és antiinflammatorikus hatásának fontos szerepe van az öregedési folyamatok lassításában és szabályozásában. Feltételezhető, hogy a PACAP KO egerekben ezen hatások hiányában az öregedési folyamatok felgyorsulnak, ugyanis a KO egerek számos szervrendszere sokkal fiatalabb korban mutatja az öregedés jeleit, mint vad társaik szervei. Emellett a fokozott apoptózis, oxidatív stressz és gyulladás mind alátámasztják ezen elméletet. Számos öregedéssel járó folyamat a KO egerekben előbb és/vagy kifejezettebben jelenik meg. A PACAP KO egerek retinájának morfológiája, a ganglionsejtek számának csökkenése, a Müller-glia sejtek fehérjeprofiljának változása a retina korai öregedésére utalnak. Kutatócsoportunk a KO egerek szinte minden szervrendszerében szisztémás amiloidózist mutatott ki, amely súlyosabb volt, és korábban jelent meg, mint vad társaikban.

---

### II. CÉLKITÚZÉS

---

Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy a PACAP-génkiütött egerek különböző szervrendszereiben felderítsük a PACAP hiányából adódó elváltozásokat.

- I. A hallórendszer vizsgálata során célul tűztük ki a PACAP KO egerek hallásának vizsgálatát valamint a belső fül és a hallópálya eltéréseinek kimutatását, ezért az alábbi vizsgálatokat végeztük el:
  1. A PACAP KO egerek hallását agytörzsi kiváltott válasz módszerrel (auditory brainstem respons = ABR) vizsgáltuk kollaborációs partnereinkkel, mely eredmények nem képezik a dolgozat részét, de szorosan összefüggnek az alábbi morfológiai vizsgálatainkkal.
  2. A hallópálya magjaiban a hanginger hatására létrejövő idegsejt aktivációt vizsgáltuk c-Fos immunfestéssel.
  3. Annak céljából, hogy különbséget tehesünk az össz sejtszám és az aktivált sejtek száma között, a cochlearis magokban Nissl-festést végeztünk.
  4. A cochlearis magokban PAC1 receptor immunfestést végeztünk.
  5. A halláscsökkenés okának felderítése céljából belső fülből származó ductus cochlearisok lizátumának fehérjeprofil analízisét végeztük el.
- II. Fogfejlődéses vizsgálataink során a KO egerekben a Notch jelátviteli útvonal megváltozását vizsgáltuk immunfluoreszcens festés segítségével 5 napos egerek molaris fogain.
- III. Az érrendszer vizsgálatakor célul tűztük ki vad típusú és PACAP KO egerekből izolált arteria carotis communis és arteria femoralis ereken a PACAP1-38, PACAP1-27 és VIP vazorelaxációs hatásának vizsgálatát, valamint a PACAP receptorok eloszlásának leírását.



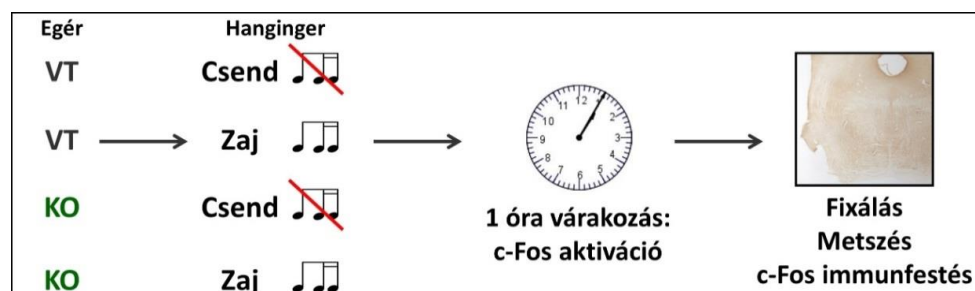
### III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### KÍSÉRLETI ÁLLATOK

Kísérleteinket CD1-es alapon tenyésztett vad és PACAP KO (heterozigóta és homozigóta) állatokon végeztük. Etikai engedélyek száma: BA02/2000-24/2011, XIV-I-001/1028-4/2012; PE/EA/1912-7/2017.

#### IDEGSEJTAKTIVÁCIÓ MÉRÉSE A HALLÓPÁLYA MAGJAIBAN – C-FOS IMMUNFESTÉS

A c-Fos immunfestést 1,5 hónapos hím egereken végeztük (n=9-8) (2. ábra). A hangingerrel kezelt csoportok 100 dB-es 4 és 20 kHz közötti fehér zajt kaptak 30 percig. Ezután 1 órát vártunk, hogy a sejtekben megtörténjen a c-Fos transzkripciója, translációja, és sejtmagba történő transzlokációja. Fixálás után az agyak hallópályát tartalmazó részeiből 30 µm-es frontális metszeteket készítettünk. Szabadon úszó metszeteken a primer c-Fos ellenes antitestet biotinilált nyúl ellenes szekunder antitesttel kötöttük és DAB-bal hívtuk elő.



2. ábra: Kísérleti protokoll: a hallópályában található idegsejtek aktivációjának mérése c-Fos immunfestéssel.

#### IDEGSEJT SZÁMOLÁS A COCHLEARIS MAGOK TERÜLETÉN – NISSL-FESTÉS

Négy hónapos vad és KO hím egerek (n=3-3) agyát dolgoztuk fel a c-Fos festésnél leírtakkal megegyezően, majd a cochlearis magok területén az idegsejtek számának meghatározására Nissl-festést végeztünk.

#### PAC1 RECEPTOR IMMUNFESTÉS A HALLÓPÁLYA MAGJAIBAN

A hallópálya magjaiban PAC1 receptor festést végeztünk 2 hónapos vad és KO hím egerekben (n=4-4). A metszet elkészítése a c-Fos immunfestésnél leírtaknak megfelelően történt. A metszeteket nyúl PAC1 receptor ellenes antitesttel inkubáltuk, majd biotinilált nyúl ellenes szekunder antitesttel kötöttük, és Cy3 konjugált streptavidinnel jelöltük.

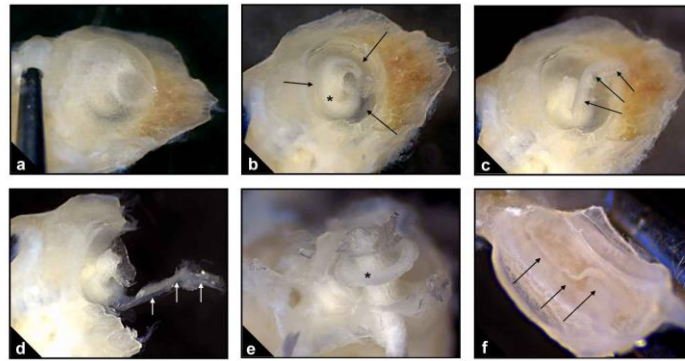
#### FEHÉRJEPROFIL ANALÍZIS DUCTUS COCHLEARISBÓL

A fehérjeprofil analízist 3-6 hónapos vad és KO hím egerek belső füléből preparált ductus cochlearisokból végeztük (n=20-20). Az egerek dekapitációját követően a csontos cochleát perilympha oldatba helyeztük, majd a ductus cochlearis kipreparálása történt operációs mikroszkóp alatt (3. ábra). A kipreparált ductus cochlearisokat homogenizáltuk, szonikáltuk, centrifugáltuk. Méréseinkhez az R&D Systems fehérjeprofil analízisre alkalmas egér „Cytokine Array Panel A” és egér „Angiogenesis Array Kit”-eket használtuk. A kiteket a gyártó utasításainak megfelelően használtuk.

#### NOTCH JELÁTVITELI ÚT ELEMEINEK VIZSGÁLATA MOLARIS FOGAKON

A Notch jelátviteli út molekuláinak immunfestését 5 napos vad, PACAP heterozigóta (HZ) és homozigóta KO egerek molaris fogain végeztük (n=3-3-3). Dekapitációt követően az egerek fejét Saint-Marie fixálóba helyeztük, majd 5 µm-es sagittalis szeleteket készítettünk. A metszeteket nyúlban termelt primer antitestekkel (Notch1,2,3,4, DLL1,3,4, Jagged1,2, CSL, TACE, Numb) inkubáltuk, majd Alexa555-el konjugált nyúl ellenes antitesttel jelöltük. A fedőanyag DAPI-t tartalmazott.

### III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK



3. ábra: A cochlea operációs mikroszkóp alatt történő boncolásának lépései. a) Az ép csontos cochlea. Az apex jobbra-felfelé tekint, a kanyarulatok áttűnnek a csonton. b) Az apikális kanyarulat a csontos fal részleges eltávolítása után. Nyilak: ductus cochlearis. \*: lamina spiralis ossea. c) A ductus cochlearis apikális részének eltávolítása. Nyilak: ductus cochlearis. Ezután a cochleát a modiolus mellett két darabra törtük, hogy a ductus cochlearis bazális-középső részéhez is hozzáférjünk.

d) A cochlea modiolust tartalmazó darabja. Nyilak: a ductus cochlearis bazális-középső része. e) A modiolust tartalmazó darab a ductus cochlearis teljes eltávolítása után. \*: lamina spiralis ossea.

f) A modiolust nem tartalmazó darab a ductus cochlearissal (nyilak).

#### A PACAP1-38, PACAP1-27, VIP VAZORELAXÁCIÓS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Ezen kísérlethez 8-12 hetes hím vad és PACAP KO egereket használtunk (n=6-6). Az egereket túlaltattuk, majd az arteria carotis communis (CA), és az arteria femoralis (FA) proximális részét távolítottuk el. Az izolált erek 2 mm-es darabjait DMT 610 M Wire Myograph segítségével vizsgáltuk. Az elérhető maximális kontrakciót 60 mM KCl-dal váltottuk ki, ezután az erek relaxációs válaszát vizsgáltuk PACAP1-38, PACAP1-27 és VIP kumulatív dózisára,  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M koncentrációban.

#### A PAC1, VPAC1, VPAC2 RECEPTOROK MRNS-ÉNEK KIMUTATÁSA

A PACAP receptorainak előfordulását az arteria carotis communis és arteria femoralis erekből RT-PCR segítségével mutattuk ki. A reverz transzkripciót követően a PCR munkaoldat 0,4  $\mu$ M sense és antisense primert, 200  $\mu$ M dNTP-t és 5 egység Promega GoTaq<sup>®</sup> DNS-polimerázt tartalmazott. A kezdeti denaturálást 35 ciklus követte, majd lezárásként DNS-szintézis történt. A PCR reakció termékeit etídium-bromidot tartalmazó agaróz-gélben futtattuk, belső kontrollnak aktint használtunk.

#### A PAC1, VPAC1, VPAC2 RECEPTORFEHÉRJÉK WESTERN-BLOT ANALÍZISE

A vizsgálatot arteria carotis communis és arteria femoralis erekből végeztük csoportonként 3 állattal. Radioimmunoprecipitációs pufferben mechanikus aprítás, majd szonikálás következett. Laemmli elektroforézis pufferrel a minták fehérje-koncentrációját kiegyenlítettük, majd mintáinkat 10 percig forraltuk. Mintánként 20  $\mu$ g fehérjét szeparáltunk SDS-PAGE gélen, melyet nitrocellulóz membránra transzferáltunk. Ezután nyúlban termelt PAC1 receptor, VPAC1 és VPAC2 receptor ellenes primer antitestet, majd nyúl ellenes szekunder antitestet használtunk. A hívást chemilumineszcens hívófolyadékkal végeztük. Belső kontrollnak aktint használtunk.

#### STATISZTIKA

A minták számának és eloszlásának megfelelően kétutas ANOVA-t (Bonferroni-féle, Fisher-féle és Tukey-féle post-hoc analízissel), egyutas ANOVA-t, illetve kétmintás t-próbát végeztünk. A szignifikancia szint 0,05 volt.

## IV. EREDMÉNYEK

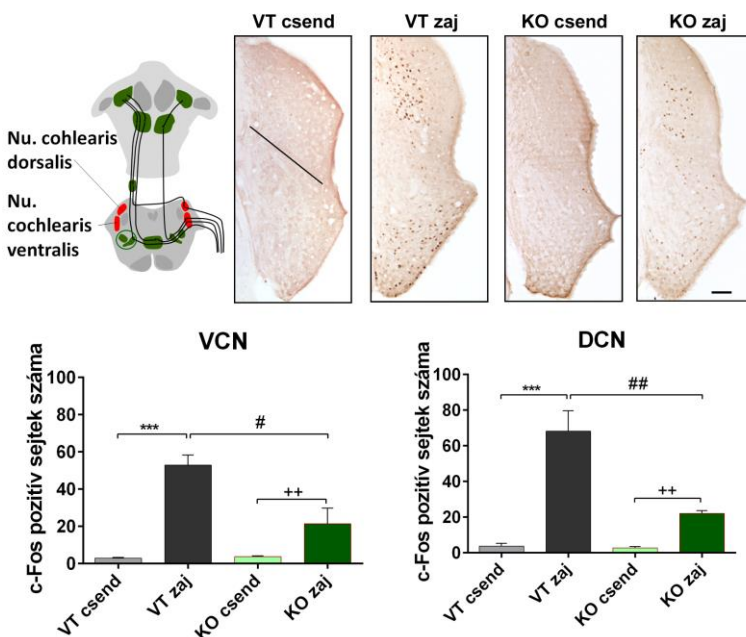
### IDEGSEJTAKTIVÁCIÓ MÉRÉSE A HALLÓPÁLYA MAGJAIBAN – C-FOS IMMUNFESTÉS

#### Cochlearis magok

Mind a vad, mind pedig a KO csendben tartott állatok („csend”) esetében a nucleus cochlearis ventralis és dorsalis területén elvéve találtunk c-Fos expresszáló sejteket. A fehér zajnak kitett állatok („zaj”) esetében szignifikánsan emelkedett a c-Fos pozitív sejtek száma, mindkét csoportban. Az emelkedés szignifikánsan kisebb mértékű volt a KO állatokban, mint a vad állatok esetében (4. ábra).

#### A hallópálya centrális átkapcsoló állomásai

A c-Fos immunfestés során az oliva superior (SOC), a nuclei lemnisci lateralis (NLL) és a colliculus inferior (CI) területén azt találtuk, hogy ezekben a magokban már a csendben tartott állatok esetében is láthatunk c-Fos pozitív sejteket, genotípustól függetlenül. Ezen sejtek száma szignifikánsan megemelkedik zaj hatására, azonban a zajjal kezelt vad és KO egerek között nincs különbség. A primér hallókéreg területén nagymértékű sejtaktivációt találtunk a csend csoportban, amely zaj hatására tovább nőtt, azonban nem szignifikáns mértékben. Ezen a területen sem volt különbség a vad és KO egerek között.



4. ábra: A cochlearis magokban található c-Fos pozitív sejtek száma csendben tartott (csend), és fél óras zajnak kitett (zaj) vad (VT) és KO egerekben. Bal oldalon a hallópálya sémás ábrája, a VCN-t és DCN-t pirossal jelöltük. Jobb oldalt reprezentatív képek, a ferde vonal a VCN (balra lent) és DCN (jobbra fent) közötti határ. Aránymérték: 100  $\mu$ m. Átlag  $\pm$  SEM. Kétutas ANOVA, Bonferroni post-hoc analízis, \*\*\* $p < 0,0001$  vs. VT csend, ++ $p < 0,001$  vs. KO csend, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  vs. VT zaj. VCN: nucleus cochlearis ventralis; DCN: nucleus cochlearis dorsalis.

### IDEGSEJT SZÁMOLÁS A COCHLEARIS MAGOK TERÜLETÉN – NISSL-FESTÉS

A ventralis és dorsalis cochlearis magok (VCN, DCN) területén talált eltérő c-Fos immunpozitivitás hátterében az idegsejtek pusztulása vagy pedig a csökkent aktivációja is állhat. Ennek vizsgálatára Nissl-festéssel meghatároztuk az idegsejtek számát. Az eltérő sejtaktivációs mintázattal szemben nem volt különbség a VCN-DCN területén található idegsejtek számában a vad típusú és KO egerek között.

## IV. EREDMÉNYEK

---

### PAC1 RECEPTOR IMMUNFESTÉS A HALLÓPÁLYA MAGJAIBAN

---

A cochlearis magvakban a PAC1 receptor immunfestését is elvégeztük. A VCN és a DCN között elhelyezkedő stratum granulosum területén a KO egerekben a PAC1 receptort expresszáló sejtek száma csökken vad társaikhoz képest. A cochlearis magok többi almagjában, illetve a hallópálya centrálisabb magjaiban (SOC, NLL, IC) nem találtunk különbséget a vad és KO egerek között. A sejtek denzitásában egyik magban sem volt különbség a két csoport között.

---

### FEHÉRJEPROFIL ANALÍZIS BELSŐ FÜL DUCTUS COCHLEARISÁBÓL

---

A funkcionális és morfológiai elváltozások molekuláris mechanizmusainak tisztázására vad típusú és KO egerek belső füléből izoláltuk a ductus cochlearist, és ennek lizátumából fehérjeprofil analízist végeztünk az R&D Systems citokin és angiogenesis array kitjeinek felhasználásával. Méréseink során az endostatin, a savas FGF, az osteopontin, a BLC, a CD54, a PF4, a TF, a DPPIV, az IGFBP-2, a Serpin F1 és a CXCL12 fehérjék jelenlétét mutattuk ki. Egyik fehérje esetében sem találtunk szignifikáns különbséget a vad és KO csoport között.

---

### A NOTCH JELÁTVITELI ÚTVONAL VÁLTOZÁSAI PACAP KO EGEREK FOGAIBAN

---

#### *Notch receptorok*

A Notch receptorok közül (Notch1, 2, 3, 4) a Notch2 immunpozitivitása a zománcot termelő ameloblast sejtekben mind a HZ, mind pedig a KO állatokban szignifikánsan emelkedett a vad egerekhez képest, míg az odontoblastok területén nem találtunk szignifikáns különbséget. Hasonló tendenciát találtunk a többi receptor esetében is, azonban a különbség nem volt szignifikáns (5. ábra).

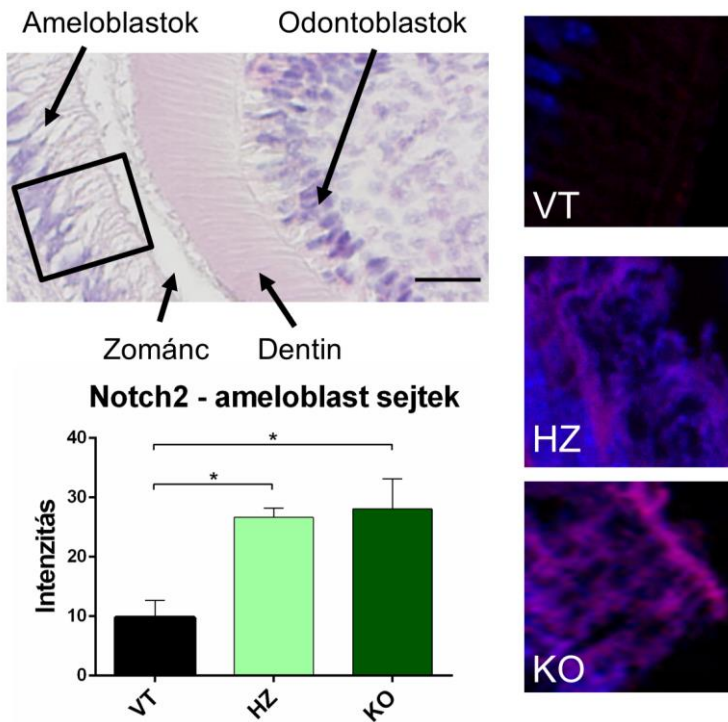
#### *Notch ligandok*

A Notch ligandok (DLL1, 3, 4 és Jagged1, 2) immunpozitivitása az alábbiak szerint változott PACAP hiányában. Az ameloblastok citoplazmájában a DLL1 szintje a HZ állatokban szignifikánsan megemelkedett a vad állatokhoz képest, a KO állatokban pedig további jelintenzitás-növekedést találtunk. A Jagged1 jelölődése, ami a vad egerekben is magas az odontoblast sejtekben, PACAP KO állatokban még tovább emelkedett. A többi ligand esetében szignifikáns különbséget nem találtunk.

#### *Notch intracelluláris elemek*

A Notch jelátvitelben részt vevő intracelluláris molekulák közül (CSL, Numb, TACE) a CSL jelintenzitása szignifikánsan megnőtt HZ és KO állatokban a vad kontrollokhoz képest mind az ameloblast, mind az odontoblast sejtekben. Kísérletünkben a TACE és a Numb fehérjék mennyisége nem mutatott változást PACAP hiányában.

## IV. EREDMÉNYEK



5. ábra: A *Notch2* receptor immunhisztokémiai jelölése ameloblast sejteken Alexa Fluor555-el (piros) 5 napos vad (VT), PACAP HZ és PACAP KO egerek molaris fogaiban. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). A HE festett ábrán a vizsgált területet fekete téglalappal jelöltük. Aránymérték: 20  $\mu$ m. A *Notch2* receptor immunpozitivitása a PACAP HZ és KO egerek ameloblast sejteiben szignifikánsan emelkedett volt a vad típusú egerekhez képest. Átlag  $\pm$  SEM. Egyutas ANOVA, Fisher-féle post-hoc analízissel,  $*p < 0,05$  vs. VT.

### A PACAP1-38, PACAP1-27, VIP VAZORELAXÁCIÓS HATÁSA VAD ÉS KO EGEREKBEN

A KCl-dal kiváltott maximális kontrakciót a PACAP1-38, PACAP1-27 és a VIP a vad és KO állatok ereiben eltérő módon befolyásolta. A PACAP1-38 a vad egerekben mind az arteria carotis communisban, mind pedig az arteria femoralisban szignifikánsan nagyobb kontrakciót váltott ki, mint a KO állatokban. Ezzel szemben a PACAP1-27 és a VIP a KO állatokban váltott ki a vad egerekénél nagyobb kontrakciót, mindkét érben. Vad egerek esetében a CA területén a PACAP1-38 nagyobb relaxációt okozott, mint a PACAP1-27 és a VIP. Ezzel szemben a KO egerekben pont fordítva, mindkét ér vizsgálatánál azt találtuk, hogy a PACAP1-27 és a VIP a PACAP1-38-nál nagyobb relaxációt eredményezett.

### PAC1, VPAC1 ÉS VPAC2 RECEPTOR MRNS ÉS FEHÉRJE VIZSGÁLATA AZ ÉRRENDSZERBEN

Vad típusú és KO egerek arteria carotis communis és arteria femoralisból származó mintáiban megmértük a PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorok mRNS-ét RT-PCR segítségével és fehérje-szintjét Western-blot analízissel. A PAC1 receptor mRNS expressziója és fehérje mennyisége is alacsonyabb volt a KO állatok ereiben a vad egerekhez képest. A VPAC1 receptor mRNS és fehérje kimutatható volt mindkét érben, mindkét genotípus esetében, a genotípus-csoportok között nem volt különbség. Ezzel szemben a VPAC2 egyik genotípus esetében sem volt kimutatható sem a CA sem az FA területén, sem RT-PCR, sem Western-blot vizsgálattal.

## V. MEGBESZÉLÉS

---

---

Kutatásaink során PACAP KO egerekben vizsgáltuk a PACAP hiányának következményeit a hallórendszerben, a fogfejlődés kapcsán és az érrendszerben.

### A PACAP KO EGEREK HALLÓRENDSZERÉNEK VIZSGÁLATA

---

A hallórendszer vizsgálatokor a PACAP KO egerek hallópályájában csökkent neuronaktivitást és a PAC1 receptor megváltozott immunreaktivitását találtuk, a belső fülben pedig a vadhoz képest változatlan fehérjeprofil.

A halláskárosodás mintegy 500 millió embert érint világszerte. Fontos azon molekulák felderítése, melyek a hallórendszerben lehetséges védő szerepet tölthetnek be. Miután a PACAP-nak általános neuroprotektív és citoprotektív hatásai ismertek, célunk volt a belső fülben és a hallópályában kifejtett hatásait vizsgálni. A PACAP jelenlétét és a PAC1 receptor mRNS-ét a belső fülben és a hallópálya magjaiban már korábban kimutatták, vélhetően a cochlea efferens beidegzésében van fontosabb szerepe.

Jelen kísérletünkben kollaborációban elsőként az egerek hallását vizsgáltuk ABR segítségével. Ezen kollaborációban elvégzett vizsgálatokat Humli Viktória társelsőszerző végezte dr. Zelles Tibor halláslaborjában, így azok metodikájának és eredményeinek részletes tárgyalása nem képezi jelen dolgozat részét. Az eredmények azonban elengedhetetlenek a morfológiai vizsgálatok értelmezéséhez, ezért azokat röviden ismertetem. Alacsony frekvenciájú inger alkalmazása esetében a PACAP KO egerek hallásküszöbe szignifikánsan magasabb volt 1,5, 4 és 8 hónapos egerekben, mint vad társaik esetében. A CD1 egértörzsnél ismert az öregkori halláscsökkenés, a kor előrehaladtával mind a vad, mind a KO egerekben a hallás romlását tapasztaltuk. Ez lehet a magyarázata annak, hogy a 8,2 kHz-nél mért különbség a 8 hónapos egerek esetében eltűnt. A magasabb frekvenciákat vizsgálva finomabb elemzéssel az amplitúdó és latencia eredményekben találtunk eltérést a két csoport között. A csökkent amplitúdó és latencia értékek feltehetően a KO állatok hallórendszerében a sérüléseknek olyan markerei, amelyek a megőrzött hallásküszöb ellenére is jelzik a halláskárosodást.

A funkcionális vizsgálatokkal egy időben morfológiai vizsgálatokat is végeztünk, mely saját munkám volt, ezen eredmények a jelen értekezés alapját képezik. Hanginger adását követően a hallópálya magjaiban a sejtek aktiválódását c-Fos immunhisztokémiával mutattuk ki. A VCN és DCN területén a csendben tartott állatok esetében mindkét csoportban csak kis számú c-Fos pozitív sejtet találtunk. A hangingernek kitett csoportokban mindkét genotípus esetén emelkedett az aktiválódott sejtek száma, de ez az emelkedés a KO egerekben szignifikánsan kisebb volt. Ezen eredmények egybevágnak a funkcionális ABR vizsgálatok eredményeivel, miszerint a KO állatok halláskárosodása nemcsak a hallásküszöb emelkedésében, hanem a hallópályában aktiválódó kevesebb számú neuronban is kimutatható. Nissl-festésünk eredményeképpen elmondhatjuk, hogy a VCN-DCN területén az idegsejtek számában a KO állatokban nem tapasztaltunk csökkenést. Tehát a csökkent számú c-Fos pozitív sejt oka nem a sejtek



## V. MEGBESZÉLÉS

---

---

csökkent számában, hanem csökkent aktivációjában keresendő. A cochlearis magokban a PAC1 receptor immunpozitivitását is megvizsgáltuk. A korábbi irodalommal megegyezően kísérletünk folyamán a PAC1 receptor jelenlétét vad egerekben a cochlearis magokban kimutattuk, ehhez képest a KO egerekben ezen magok stratum granulosumának területén kevesebb sejtben találtunk PAC1 receptort. Ezen eredmények összevágának azzal, hogy kutatócsoportunk korábban a KO egerekben belső fülében, és jelen kísérleteinkben az ereken szintén a PAC1 receptor csökkenését mutatta ki a vad egerekhez képest.

A hallópálya centrálisabb magjaiban azt találtuk, hogy az összes többi vizsgált területen (SOC, NLL, IC, AU1) már a csendben tartott állatok esetében is van egy alapszintű sejtaktiváció. Hanginger adására az SOC, NLL, IC területén szignifikánsan emelkedett az aktiválódott sejtek száma mindkét genotípusban, a két genotípus között azonban ezen magok vizsgálatakor nem találtunk különbséget. Ezek a központok nemcsak a hallópálya egyszerű átkapcsoló állomásai, hanem komplex szerepet töltenek be az információ feldolgozásában. Az agy számos más területéről is kapnak beidegzést, így ide számos idegsejt-típus különböző neurotranszmitterei választódnak ki. Feltételezzük, hogy a komplexebb afferenciációval járó összetettebb rendszerekben nagyobb lehetőség van a PACAP hiányának kompenzálására, ami így nemcsak a csendben tartott állatokban tapasztalt emelkedett c-Fos szintet magyarázza meg, hanem azt is, hogy ezen területeken miért tűnt el a vad és PACAP KO egerek közötti különbség. Az, hogy pontosan melyik jelátviteli utak pótolhatják a PACAP szerepét, egyelőre nem ismert, de úgy tűnik, hogy nem egyetlen rendszer veszi át a PACAP hiányának pótlását.

A halláskárosodás okának pontosabb felderítése érdekében tovább folytattuk vizsgálatainkat a belső fül területén is, ahol vad és PACAP KO egerek belső fülének a ductus cochlearisából készült lizátumából végeztünk fehérjeprofil analízist. A bevezetőben ismertetett vizsgálatok eredmények arra utalnak, hogy a PACAP az endolympha megfelelő elválasztásában és a cochlea efferens beidegzésében vesz részt. Kimutatták, hogy a PACAP képes a dopamin elválasztás serkentésére, ami védő hatású lehet az I-es típusú afferens sejtek excitotoxicitása ellen a ganglion spiraleban. A hippocampusban pedig glutamát indukálta kóros  $Ca^{2+}$ -koncentráció emelkedés ellen véd, feltételezhető, hogy a PACAP-nak a belső fülben a túlzott glutamát excitotoxicitás elleni védelemben is szerepe lehet.

A belső fület ért különböző károsító hatásokra az endolympha és a szőrsejtek  $Ca^{2+}$  szintje megemelkedik, ami káros a szőrsejtekre, az apoptózis végrehajtásához is elengedhetetlenül szükséges. A  $Ca^{2+}$ -kötő fehérjék fontos szerepet játszanak a nagy mennyiségű  $Ca^{2+}$ -ionok megkötésében, ezzel védve őket a magas  $Ca^{2+}$  szint okozta károsodásoktól, azonban  $Ca^{2+}$ -kötő képességük véges. A belső fülben kutatócsoportunk korábban a  $Ca^{2+}$ -kötő fehérjék immunpozitivitását vizsgálta. Azt találtuk, hogy vad egerekben kezelés nélkül alacsony ezen fehérjék mennyisége, azonban ototoxikus kanamycin-kezelés hatására emelkedett immunpozitivitást találtunk. A PACAP KO egerekben már kezelés nélkül is magas

## V. MEGBESZÉLÉS

---

---

volt a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjék jelölődése, ez azonban kanamycin-kezelés hatására nem emelkedett tovább. Feltételezzük, hogy a PACAP-génkiütött egerekben a PACAP védőhatásai hiányoznak, és így azon belső fület érő hatások, melyek vad egerekben nem okoznak sejtkárosodást, a KO egerek esetében apoptotikus útvonalak aktiválódásához, az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  emelkedéshez, és ennek kivédésére emelkedett  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje szinthez vezetnek. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjék védő hatása azonban véges mértékben tud védő hatást biztosítani, erre utal, hogy a KO egerekben kanamycin-kezelés hatására sem növekszik tovább ezen fehérjék mennyisége.

Különböző gyulladással járó elváltozások és az érrendszer elváltozásai fontos szerepet játszanak az idegi típusú halláskárosodás különböző fajtáiban. Jelen kutatásunkban ezért a gyulladással járó elváltozások markereiként szolgáló citokinek, és az érrendszeri elváltozásokkal kapcsolatban kifejeződő angiogenetikus fehérjéket vizsgáltuk vad és PACAP KO egerek ductus cochlearisában. A fehérjeprofil analízis folyamán számos olyan molekulát azonosítottunk mind a vad, mind a PACAP KO egerekben, amelyek részt vesznek angiogenetikus folyamatokban (FGF, CXCL12), antiangiogenetikus folyamatokban (endostatin, Serpin F1), kemotaktikus hatással bírnak (BLC, PF4, CXCL12) vagy a koagulációban vesznek részt (PF4, TF). Kimutattuk továbbá az ubikviter sejt felszíni DPPIV-et, az antiapoptotikus osteopontint és a sejt közötti adhéziós molekula CD54-et is. A vad és PACAP KO egerek között azonban nem volt szignifikáns különbség ezen fehérjék tekintetében. Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a PACAP KO egerekben található halláscsökkenés feltételezhetően nem a belső fül gyulladással, vagy angiogenetikus eredetű elváltozásaiból ered, mivel ezen fehérjék mennyisége a vizsgált körülmények között nem változott meg számottevően a PACAP KO állatok esetében.

Eddigi kísérleteink alapján nem állapítható meg egyértelműen, hogy a hallásbeli funkcióvesztést a belső fül, vagy pedig a hallópálya károsodása, esetlegesen a kettő együtt okozza-e. Ismert, hogy a belső fül izolált léziója önmagában is a hallópálya komplex változásaihoz vezethet. Ezek alapján elképzelhető, hogy az általunk talált elváltozások a belső fül károsodása miatt jelentkeznek, amit szintén megerősítenek a Nissl-festéses vizsgálataink, miszerint a cochlearis magokban a neuronok száma nem, csak az aktivációjuk változott meg a PACAP KO állatokban. A PACAP KO egerek halláscsökkenésének általunk feltételezett mechanizmusa a következő. Kimutatták, hogy a vad CD1 egerekben a kor előrehaladtával halláscsökkenés következik be. Ez a folyamat a külső és belső szőrsejtek pusztulásával jár. Ismert, hogy a PACAP KO állatok szervezetében az öregedési folyamatok felgyorsulnak, ami a különböző érzékszerveket is érinti. Feltételezzük, hogy ugyanez a folyamat játszódik le a PACAP KO egerek hallórendszerében is, a normálisan is végbemenő öregedési folyamatok a KO egerekben korábban következnek be. A szőrsejtek pusztulása felgyorsul, és a hallás a vad egerekhez képest gyorsabb ütemben romlik. Ezen elméletet alátámasztják a funkcionális vizsgálataink eredményei. A CD1-es típusú vad



## V. MEGBESZÉLÉS

---

---

állatokban a kor előrehaladtával történő szőrsejtpusztulást kimutatták már, jelen pillanatban folynak azon kísérleteink, melyek a KO állatokban történő szőrsejtpusztulás mértékét hivatottak meghatározni. Mivel a KO és vad állatokban hasonló folyamatok zajlanak csak eltérő mértékben, feltételezzük, hogy emiatt nem találtunk különbséget a két csoport fehérjeprofil analízise során. Kísérleteink hosszú távú célja megvizsgálni, hogy az exogén PACAP-nak, vagy valamely PACAP-agonistáknak lehet-e hallásvédő szerepe a különböző, öregedés okozta, vagy más ototoxikus hang/gyógyszer által indukált hallásvesztésben, mint ahogyan ezt már sikerült más érzékszervek esetén kimutatni.

### A PACAP KO EGEREK FOGFEJLŐDÉSE

---

Az egerek hallásának vizsgálata mellett kutatócsoportunk a PACAP fogfejlődésben betöltött szerepét is kutatta. A fogfejlődés során PACAP KO állatokban a Notch2 receptor, a DLL1 és Jagged1 ligandok és a CSL intracelluláris jelátviteli molekula fokozott immunpozitivitását mutattuk ki ameloblast és odontoblast sejtekben.

Korábbi kísérleteink számos morfológiai eltérést mutattak ki a PACAP KO egerek fogaiban a vad egerekhez képest. Az 5 napos egerekből származó fog dentin rétege vékonyabb a vad egerekénél, a dentinben a hidroxilapatit kristályok nagyobb rendezetlenségűek, a metszőfogak átlagosan 2 nappal korábban törnek elő, a metszőfogak kisebbek. A PACAP KO egerekben az SHH, annak PTCH1 receptora és GLI1 intracelluláris célpontja emelkedett immunpozitivitást mutat a szekretoros ameloblastok területén.

Korábbi kísérleteink alapján célunk volt a Notch jelátviteli út molekuláinak változásait feltérképezni a PACAP-génkiütött egerekben. A Notch receptorokat expresszáló sejtek a sejtosztódás fázisában maradnak, míg annak gátlása (például a Numb fehérje által), vagy a receptorok downregulációja a sejteket a differenciáció irányába mozdítja el. A Notch elengedhetetlen a szájüregi ektoderma és az ektomesenchyma közötti megfelelő kommunikációhoz, amely a normális fogfejlődés feltétele. Kísérletünkhöz 5 napos vad, PACAP HZ és PACAP KO egerek molaris fogaiból készült metszeteken vizsgáltuk a Notch jelátviteli útvonal molekuláinak kifejeződését az ameloblast és odontoblast sejtekben.

A Notch receptorainak vizsgálata során azt találtuk az odontoblast és ameloblast sejtekben, hogy vad egerekben immunpozitivitásuk alacsony. Ehhez képest PACAP KO egerekben a Notch2 receptor mennyisége szignifikánsan megnőtt az ameloblast sejtekben mind a HZ, mind a KO állatokban. A további Notch receptorok vizsgálatával azt találtuk, hogy szintjük tendenciózusan magasabb volt a PACAP KO egerekben. A Notch receptorok downregulációja az ameloblast és odontoblast sejtekben ezen sejteket a differenciáció irányába tolja el, és hozzájárul, hogy dentint és zománcot termelő sejtekké alakuljanak át. Ezen finom egyensúlyhoz járul hozzá, hogy az ameloblastokban és odontoblastokban Notch ligandok

## V. MEGBESZÉLÉS

---

---

expresszálódnak (DLL1, Jagged1, 2), amelyek a szomszédos stratum intermedium és subodontoblastikus réteg sejteire laterális gátlást fejtenek ki, és a Notch receptoraikon keresztül ezeket a sejteket a proliferációs fázisban tartják. Kutatásunkban a vad egerekben magas Jagged1 ligand szintet detektáltunk az odontoblast sejtekben, míg alacsony DLL1 pozitivitást az ameloblast sejtekben, ami szintén új eredménynek tekinthető. Mindkét ligandot a PACAP KO egerekben is megvizsgáltuk, ahol a vad típushoz képest magasabb szintet detektáltunk.

A kísérlet folyamán a Notch jelátviteli útvonal intracelluláris elemeit is megvizsgáltuk. A Notch-receptorokról a ligandkötés következtében a TACE hatására a NICD disszociál, a sejtmagba diszlokálódik és a CSL-hez, a Notch kanonikus intracelluláris útvonalának fő eleméhez kötődik. Ennek hatására a Notch jelátviteli útvonal célgénjei, a *Hes* és *Hey* géncsalád tagjainak átírása történik, melyeknek a sejtproliferációban van szerepük, a Numb pedig ezeknek gátlásával irányítja a sejteket a proliferáció helyett a sejt differenciáció irányába. Kísérletünkben a TACE és Numb fehérjék esetében nem találtunk különbséget a vad és PACAP KO egerek között, azonban a CSL mind az ameloblast, mind pedig az odontoblast sejtekben emelkedett volt a PACAP HZ és KO egerekben a vad társaikhoz képest. Feltételezzük, hogy a CSL mennyisége a Notch receptorok növekedésének köszönhetően emelkedett.

A PACAP-génkiütött egerek a PACAP funkcióinak hiányában is életképesek, amiből arra következtethetünk, hogy lennie kell olyan kompenzációs jelátviteli útvonalaknak, amelyek PACAP hiányában annak funkcióit legalább részben átveszik. Számos elmélet felmerült, miszerint a VIP vagy monoaminerg jelátviteli útvonalak pótolhatják a PACAP hiányát, azonban egyik sem igazolódott be teljes mértékben. Kísérletünkben kimutattuk, hogy a Notch jelátviteli útvonal elemei a PACAP-génkiütött egerekben upregulálódnak, ami egy lehetséges alternatíva lehet a PACAP hatásainak pótlására. Ugyanakkor a PACAP és Notch jelátviteli útvonalak direkt összeköttetése nem ismert. Mindkét jelátviteli útvonalnak antiapoptotikus és sejtproliferációs hatásai vannak, és közösek a célpontjaik (1. ábra). Mind a PACAP, mind a Notch aktiválja a PI3K/Akt útvonalat és gátolja a JNK-t, és ezen keresztül a c-Jun-t. Mindkettőnek célpontja a *Hes* géncsalád. Ezen közös célpontok adhatják meg a lehetőségét annak, hogy a Notch jelátviteli útvonal átvegye a PACAP szerepét a PACAP KO egerekben. Ugyanakkor a Notch jelátviteli útvonal upregulációjának pontos mechanizmusa a PACAP KO egerekben nem ismert. Feltételezésünk szerint egy komplex regulációs folyamat áll a változások hátterében, amely az általunk detektált változásokat magyarázhatja. A korábban leírt SHH útvonal emelkedése közvetetten a Jagged1 emelkedéséhez vezethet. A PACAP-génkiütött állatokban a PAC1 receptor PACAP-tól független dimerizációja figyelhető meg, ami a WNT/ $\beta$ -katenin útvonal aktivációjához vezet, ami egyrészt közvetlenül emeli a *Jagged1* gén transzkripcióját, valamint az FGF10-lunatic fringe (LF) útvonalon át emelheti a Notch2 receptor szintet.

## V. MEGBESZÉLÉS

---

---

Összességében elmondhatjuk, hogy kísérleteinkben a PACAP KO egerekben a Notch jelátviteli útvonal különböző elemeinek az immunreaktivitása növekedett, és diszkrétultuk azokat a lehetséges molekuláris jelátviteli útvonalakat, ami ennek a változásnak a hátterében állhat. Feltételezzük, hogy az emelkedett Notch aktivitás a finoman szabályozott fogfejlődés esetén zavart okoz, de egyelőre nem ismert, hogy ezek a változások pontosan hogyan járulnak hozzá azokhoz a morfológiai különbségekhez, amiket a PACAP KO egerek fogaiban korábban találtunk. A Notch jelátviteli útvonal számos elemének változása vagy a PACAP hiányának kiváltására hivatott, vagy pedig a normálisan PACAP reguláció alatt álló Notch útvonal felszabadulásának köszönhető. A két útvonal közötti kapcsolat pontos felderítése a fogfejlődésben, és más szervek fejlődésében még további kutatásokat igényel.

### A PACAP KO EGEREK ÉRRENDSZERE

---

Az erek vizsgálatokor PACAP KO állatokban a PACAP1-27-re és a VIP-re adott fokozott, PACAP1-38-ra adott csökkent vazorelaxációs készséget, a receptorok közül pedig a PAC1 receptor downregulációját találtuk.

A PACAP-nak számos cardiovascularis hatása ismert. Vazodilatációt és ennek megfelelően szisztémás vérnyomáscsökkenést okoz, valamint angiogenetikus hatásai is ismertek. Endothel sejtenyészetben növeli a kapillárisformáló képességet és csökkenti az apoptózist, és cardiomyocita sejtenyészetben véd az oxidatív stressz ellen. Kutatócsoportunk a PACAP-ot emberi vérmintákon is vizsgálja, mint a szívelégtelenség lehetséges biomarkerét.

A PACAP1-38, PACAP1-27 és a VIP vazorelaxációs hatásait már számos érben kimutatták, többek között patkány arteria carotis communisban, arteria mesenterica superiorban, sertés koszorúsereken, és arteria cerebri mediában is. A PACAP hatása nagyban faj és régió specifikus, patkány arteria mesenterica superiorjában a PACAP1-38, míg sertés koszorúsereken a PACAP1-27 és a VIP váltott ki nagyobb mértékű relaxációt. Egy szervben belül is eltérő a PACAP relaxációs hatása. Az agy területén eltérő hatást fejt ki a makroszkópos és mikroszkópos méretű erekre. Számos kutatás vizsgálja a PACAP migrénben betöltött szerepét, amiben többek között a PACAP vazodilatációs hatása is szerepet játszhat. Az eltérő hatás oka lehet a különböző régiókban az eltérő receptor splice variánsok jelenléte, melynek hátterében állhat, hogy azonos stimulusokra a különböző szerveknek eltérő vazomotoros választ kell adniuk. Ezen ismeretek birtokában a vad állatokban leírt hatásokat is új eredményeknek definiálhatjuk, mert a PACAP hatásait egér arteria carotis communis és arteria femoralis erekben korábban nem vizsgálták.

Kutatócsoportunk vazorelaxációt detektált mindegyik molekula jelenlétében. A CA területén vad állatokban a PACAP1-38 szignifikánsan nagyobb relaxációt váltott ki, mint a PACAP1-27 vagy a VIP. Ez egybevág Huang és munkatársainak a patkányban leírt eredményeivel. A KO egerekben azt találtuk, hogy a vad típusú állatokkal szemben a KO állatokban a PACAP1-27 és a VIP váltott ki a PACAP1-38-

## V. MEGBESZÉLÉS

---

---

nál nagyobb mértékű vazorelaxációt. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a PACAP KO egerekben megváltozik a válaszkészség a szekretin/glükagon/VIP peptidcsalád tagjaira, és a PACAP helyett a VIP vált ki nagyobb mértékű vazorelaxációt. Feltételezzük, hogy ezzel a váltással a VIP-re való érzékenység megnövekszik a PACAP KO állatok ereiben, feltételezhetően a PACAP kiesett funkcióinak pótlására.

A PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorok nagy mértékben kifejeződnek az ereiben, amit patkány és emberi mintákban kimutattak, azonban eloszlásuk a vazodilatációs hatásokkal egybevégezően nagy mértékben szervfüggő. Számos kutatás bizonyította, hogy az erek fala nagy mennyiségben tartalmaz PACAP-tartalmú rostokat, azonban a vad és PACAP KO egerek ereiben a PACAP receptorok eloszlása nem ismert. Ezért kutatócsoportunk megvizsgálta ezen receptorok mRNS és fehérje mennyiségét a CA és FA területén. A KO állatokban a PAC1 receptor mRNS és fehérje szintje csökkent, ami egybevégező korábbi eredményeinkkel a belső fül területén, ahol KO állatokban szintén a PAC1 receptor csökkenését mutattuk ki a szőr- és támasztősejteken. A megváltozott receptor-mennyiség magyarázhatja azon eredményeinket is, hogy a KO állatokban a PACAP1-27 és a VIP nagyobb választ váltott ki, mint a vad állatokban.

### KONKLÚZIÓ

---

A PACAP hiánya az öregedési folyamatok felgyorsulásával jár, amelyet kutatócsoportunk többek között izolált endothel sejtenyészeten és a PACAP KO állatok szervrendszereiben is kimutatott. A hallórendszer vizsgálata folyamán is azt feltételezzük, hogy a PACAP KO egerekben az öregedési folyamatok felgyorsulnak, korábban és nagyobb mértékben alakul ki a kor előrehaladtával járó halláscsökkenés, mint vad egerekben. Vizsgálataink megerősítik a korábban leírtakat, miszerint a PACAP KO állatok a hallórendszerben is a korai öregedési jeleket mutatják, valamint értekezésünkben a lehetséges kompenzációs mechanizmusokat is tárgyaljuk. A PACAP KO egerek fogfejlődésének vizsgálatakor a Notch jelátviteli útvonal elemei, melyeknek target génjei a PACAP-pal részlegesen átfednek, megnövekedett immunpozitivitást mutattak. Az érrendszer vizsgálatakor kimutattuk, hogy PACAP KO egerekben a PAC1 receptor expressziója az erek falában lecsökken. Az erek PACAP1-38-ra adott relaxációs válaszkészsége csökkent, a PACAP 1-27-re és a VIP-re adott válaszkészség nőtt. Ezen változások feltételezhetően a PACAP hiányát ellensúlyozva részben a felgyorsult öregedési folyamatokat próbálják gátolni, azonban nem képesek azt teljes mértékben kompenzálni. A PACAP öregedési folyamatokban betöltött pontos szerepének vizsgálatát a jövőben is folytatni kívánjuk különböző fiziológiai és patológiai folyamatok modellezésével.

## V. MEGBESZÉLÉS

---

---

### ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

---

Kísérleteink során a PACAP-génkiütött és vad egerek különböző szervrendszereinek összehasonlításával számos eltérést detektáltunk.

I. A hallórendszer vizsgálata során elért új eredményeink:

1. A hallópályában hangingeret követően a cochlearis magok (VCN, DCN) területén c-Fos immunfestéssel az idegsejtek csökkent aktivációját mutattuk ki KO egerekben a vad típushoz képest. A hallópálya centrálisabb magjaiban sejtaktivációban nem volt különbség a két genotípus között.
2. A cochlearis magokban Nissl-festéssel a vad típus és a PACAP KO egerek esetében azonos neuronszámot találtunk. Az alacsonyabb c-Fos jelölődés az idegsejtek csökkent aktivációjából, és nem a csökkent sejtszámból ered.
3. A cochlearis magokban PAC1 receptor immunfestést végeztünk. A VCN és DCN közötti stratum granulosum területén a PACAP KO egerekben kevesebb sejt jelölődött, mint vad társaikban.
4. A belső fül ductus cochlearisából fehérjeprofílnálizist végeztünk, ami során számos fehérjét kimutattunk vad és KO egerekben. A két genotípus között nem találtunk különbséget.

II. Fogfejlődés vizsgálata során a KO egerekben a Notch útvonal molekulái közül emelkedett Notch2, Jagged1, DLL1 és CSL immunpozitivitást találtunk a vad típushoz képest. A Notch a PACAP hiányának kompenzációjában vehet részt, vagy pedig a normálisan PACAP reguláció alatt álló Notch útvonal felszabadulhat a PACAP gátlása alól. Vad egerekben alacsony DLL1 és magas Jagged1 immunreaktivitást írtunk le.

III. Arteria carotis cummunis és arteria femoralis vizsgálatakor PACAP KO egerekben a PAC1 receptor mRNS és fehérje szintje csökkent a vad egerekhez képest. A VPAC1 receptort mindkét genotípusban, a VPAC2 receptort egyikben sem tudtuk kimutatni. A vad egerekben a PACAP1-38 váltott ki a KO-nál nagyobb mértékű relaxációt, míg a PACAP1-27 és a VIP a KO állatokban okozott nagyobb vazorelaxációt a vad egerekhez képest. Ezen eredmények az érrendszerben a PACAP hiányából eredő receptorprofil változásra, és a KO egerekben eltérő vazorelaxációs mechanizmusokra utalnak.

## VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

---

---

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek dr. Tamás Andrea egyetemi docensnek és prof. dr. Reglődi Dórának, a PTE ÁOK Anatómiai Intézet vezetőjének. Útmutatásul szolgáltak az élet minden területén. Köszönettel tartozom dr. Gaszner Balázs egyetemi docensnek az immunhisztokémia kifinomult alkalmazásának megtanításáért. Eredményeim nem jöhettek volna létre kutatótársam dr. Németh Adrienn, dr. Juhász Tamás és dr. Sándor Balázs egyetemi adjunktusok, és dr. Ivan Ivič tudományos munkatárs nélkül. Szeretettel emlékezem a tragikus hirtelenséggel elhunyt dr. Szabadfi Krisztinára, aki hallgató koromban szintén témavezetőm volt. A hallásvizsgálatokat a Semmelweis Egyetemmel kollaborációban végeztük, itt dr. Zelles Tibor egyetemi docensnek, Humli Viktória és Szepesy Judit Ph.D. hallgatóknak szeretném megköszönni a közös munkát. Intézetünkben elsősorban Kiss Anikónak, Mercz Tündének és Godáné Brumán Beatrixnek tartozom hálával, ugyanakkor meg szeretném köszönni az intézet minden munkatársának és valamennyi szerzőtársamnak az évek során nyújtott segítségüket. A dolgozat megszületéséhez elengedhetetlen volt a családom türelme és feleségem aktív támogatása, amiért nagyon hálás vagyok.

## VII. A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓI

### *Az értekezés alapjául szolgáló közlemények*

1. **Fülöp DB**, Humli V, Szepesy J, Ott V, Reglődi D, Gaszner B, Németh A, Szirmai A, Tamás L, Hashimoto H, Zelles T, Tamás A (2019) Hearing impairment and associated morphological changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *Sci Rep* 9:14598. (megosztott elsőszerezős cikk. IF: 4,116/2=2,058; Q1 in Multidisciplinary)
2. **Fülöp BD**, Sándor B, Szentlélek E, Karanyicz E, Reglődi D, Gaszner B, Zákány R, Hashimoto H, Juhász T, Tamás A (2019) Altered Notch signaling in developing molar teeth of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *J Mol Neurosci* 68(3):377-388 (IF: 2,544; Q1 in Medicine miscellaneous)
3. Ivic I, **Fülöp BD**, Juhász T, Reglődi D, Tóth G, Hashimoto H, Tamás A, Koller Á (2017) Backup mechanisms maintain PACAP/VIP-induced arterial relaxations in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-deficient mice. *J Vasc Res* 54(3):180-192. (IF: 2,404; Q1 in Cardiology and Cardiovascular Medicine)
4. **Fülöp BD**, Reglődi D, Németh A, Tamás A (2016) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the auditory system. In: *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP* (Reglődi D, Tamás A, eds), pp 529–549. New York: Springer, Cham. (könyvfejezet)

*Ezen közlemények összesített impakt faktora 9,064,  
a társ-elsőszerzős közlemény megosztása után: 7,006.*

### *A szerző további társszerzős közleményei*

1. Tamás A, Szabadfi K, Németh A, **Fülöp B**, Kiss P, Atlasz T, Gábrriel R, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Helyes Z, Reglődi D (2012) Comparative examination of inner ear in wild type and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *Neurotox Res* 21:435–444. (IF: 3,251)
2. Németh A, Szabadfi K, **Fülöp B**, Reglődi D, Kiss P, Farkas J, Szalontai B, Gábrriel R, Hashimoto H, Tamás A (2014) 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* 25(1):57–67. (IF: 4,181)
3. Sándor B, Fintor K, Felszeghy S, Juhász T, Reglődi D, Márk L, Kiss P, Jüngling A, **Fülöp BD**, Nagy AD, Hashimoto H, Zákány R, Nagy A, Tamás A (2014) Structural and morphometric comparison of the molar teeth in pre-eruptive developmental stage of PACAP-deficient and wild-type mice. *J Mol Neurosci* 54(3):331–341. (IF: 2,531)
4. László E, Varga A, Kovács K, Jancsó G, Kiss P, Tamás A, Szakály P, **Fülöp B**, Reglődi D (2015) Ischemia/reperfusion-induced kidney injury in heterozygous PACAP-deficient mice. *Transplant Proc.* 47(7):2210–2215. (IF: 1,036)
5. Tamás A, Jávornágyi A, Reglődi D, Sarlós DP, Bányai D, Semjén D, Németh J, Lelesz B, **Fülöp DB**, Szántó Z (2016) Examination of PACAP-like immunoreactivity in urogenital tumor samples. *J Mol Neurosci* 59(2):177–183. (IF: 2,281)
6. Sándor B, Fintor K, Reglődi D, **Fülöp DB**, Helyes Z, Szántó I, Nagy P, Hashimoto H, Tamás A (2016) Structural and morphometric comparison of lower incisors in PACAP-deficient and wild-type mice. *J Mol Neurosci* 59(2):300–308. (IF: 2,281)
7. Egri P, Fekete C, Dénes A, Reglődi D, Hashimoto H, **Fülöp BD**, Gereben B (2016) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) regulates the hypothalamo-pituitary-thyroid (HPT) axis via type 2 deiodinase in male mice. *Endocrinology* 157(6):2356–2366. (IF: 4,286)
8. Farkas J, Sándor B, Tamás A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, **Fülöp BD**, Juhász T, Manavalan S, Reglődi D (2017) Early neurobehavioral development of mice lacking endogenous PACAP. *J Mol Neurosci* 61(4):468–478. (IF: 2,637)
9. Ivic I, Solymár M, **Fülöp BD**, Hashimoto H, Tóth G, Tamás A, Juhász T, Koller Á, Reglődi D (2017) Aging-induced modulation of pituitary adenylate cyclase-activating peptide- and vasoactive intestinal peptide-induced vasomotor responses in the arteries of mice. *J Vasc Res* 54(6):359–366. (IF: 2,404)
10. Heimesaat MM, Reifenberger G, Vicena V, Illés A, Horváth G, Tamás A, **Fülöp BD**, Bereswill S, Reglődi D (2017) Intestinal microbiota changes in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) - bifidobacteria make the difference. *Eur J Microbiol Immunol* 7(3):187–199.

## VII. A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓI

11. Váczy A, Kóvári P, Kovács K, Farkas K, Szabó E, Kvárik T, Kocsis B, **Fülöp B**, Atlasz T, Reglődi D (2018) Protective role of endogenous PACAP in inflammation-induced retinal degeneration. *Curr Pharm Des* 24(30):3534–3542. (IF: 2,425)
12. Török D, Somoskői B, Reglődi D, Tamás A, **Fülöp B**, Cseh S (2018) Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása nőstény egerek ciklusára és az embriófejlődésre - Előzetes eredmények Magyar Állatorvosok Lapja 140:(3):181–187. (IF: 0,143)
13. Solymár M, Ivic I, Balaskó M, **Fülöp BD**, Tóth G, Tamás A, Reman G, Koller Á, Reglődi D (2018) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates vascular dysfunction induced by hyperglycaemia. *Diab Vasc Dis Res* 15:(4):277–285. (IF: 2,252)
14. Reglődi D, Cseh S, Somoskői B, **Fülöp B**, Szentlélek E, Szegeczki V, Kovács A, Varga A, Kiss P, Hashimoto H, Tamás A, Bárdosi A, Manavalan S, Bakó E, Zákány R, Juhász T (2018) Disturbed spermatogenic signaling in PACAP deficient mice. *Reproduction* 155:(2):127–137. (IF: 3,151)
15. Reglődi D, Tamás A, Jüngling A, Váczy A, Rivnyák A, **Fülöp BD**, Szabó E, Lubics A, Atlasz T (2018) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide against neurotoxic agents. *Neurotoxicology* 66:185–194. (IF: 3,203)
16. Reglődi D, Jüngling A, Longuespee R, Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann M, Juhász T, Bárdosi S, Tamás A, **Fülöp BD**, Kovács K, Nagy Z, Sparks J, Miseta A, Mazzucchelli G, Hashimoto H, Bárdosi A (2018) Accelerated pre-senile systemic amyloidosis in PACAP knockout mice - a protective role of PACAP in age-related degenerative processes. *J Pathol* 245:(4) pp. 478–490. (IF: 5,781)
17. Lajkó A, Meggyes M, **Fülöp BD**, Gede N, Reglődi D, Szereday L (2018) 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* 80:(4):e13035. (IF: 3,172)
18. Józsa G, Szegeczki V, Pálfi A, Kiss T, Helyes Zs, **Fülöp B**, Cserhádi Cs, Daróczi L, Tamás A, Zákány R, Reglődi D, Juhász T (2018) Signalling alterations in bones of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene deficient mice. *Int J Mol Sci* 19:(9):e2538. (IF: 4,207)
19. Reglődi D, Atlasz T, Szabó E, Jüngling A, Tamás A, Juhász T, **Fülöp BD**, Bárdosi A (2018) PACAP deficiency as a model of aging. *Geroscience* 40(5-6):437-452. Review.
20. Szegeczki V, Bauer B, Jüngling A, **Fülöp BD**, Vágó J, Perényi H, Tarantini S, Tamás A, Zákány R, Reglődi D, Juhász T (2019) Age-related alterations of articular cartilage in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene-deficient mice *Geroscience* 41:6:775–793. (IF: 4,361)
21. Ivic I, Balaskó M, **Fülöp BD**, Hashimoto H, Tóth G, Tamás A, Juhász T, Koller Á, Reglődi D, Solymár M (2019) VPAC1 receptors play a dominant role in PACAP-induced vasorelaxation in female mice *PLoS One* 14(1):e0211433. (IF: 2,875)
22. Meggyes M, Lajkó A, **Fülöp BD**, Reglődi D, Szereday L (2019) Phenotypic characterization of testicular immune cells expressing immune checkpoint molecules in wild-type and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-deficient mice. *Am J Reprod Immunol*. 22:e13212. (IF: 3,172)
23. Józsa G, **Fülöp B**, Kovács L, Czibere B, Szegeczki V, Kiss T, Hajdú T, Tamás A, Helyes Zs, Zákány R, Reglődi D, Juhász T (2020) Lack of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) disturbs callus formation. *J Mol Neurosci* doi: 10.1007/s12031-019-01448-z. [Epub ahead of print] (IF: 2,544)

*A szerző kumulatív impakt faktora: 71,24*

*A szerző társszerzős könyvfejezete*

1. Horváth G, Illés A, Heimesaat M, Bárdosi A, Bárdosi S, Tamás A, **Fülöp BD**, Opper B, Nemeth J, Ferencz A, Reglődi D (2016) Protective intestinal effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. In: *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Springer International Publishing, pp. 271–288. ISBN: 978-3-319-35133-9.