

NEUROPEPTIDEK (PACAP, VIP) ELŐFORDULÁSA ÉS SZEREPE MADARAK KÖZPONTI IDEGRENDSZERÉBEN

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Dr. Hollósy Tibor

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet**



Témavezető:

dr. Reglődi Dóra, dr. Józsa Rita

Programvezető:

dr. Csernus Valér

Pécs, 2013.

Tartalom

1. Bevezetés	4
1.1. A PACAP	4
1.2. A PACAP előfordulása emlős szervezetben.....	5
1.3. A PACAP előfordulása nem emlős (madár) szervezetben.....	8
1.4. PACAP-receptorok és előfordulásuk madarakban.....	9
1.5. A PACAP élettani hatásai.....	12
1.6. A VIP szerkezete, előfordulása madárfajokban és emlősökben.....	14
2. Célkitűzéseink	16
3. Módszerek	19
3.1. Kísérleti állatok	19
3.2. Kísérleti módszerek.....	19
3.2.1. Radioimmunoassay.....	19
3.2.2. A napi ritmus vizsgálata	20
3.2.3. Immunhisztokémia	20
3.2.4. Műtéti eljárás – pinealectomia.....	21
3.2.5. Az éhezés vizsgálata.....	21
3.2.6. In ovo kezelések	22
3.2.7. A szaglási memória vizsgálata.....	22
3.2.8. Viselkedésvizsgálatok.....	23
4. Eredmények	26
4.1. A PACAP és a VIP megoszlása csirkeagyban embrionális és felnőtt korban.....	26
4.2. A PACAP napi ritmusa	27
4.3. A PACAP-szintek változásának vizsgálata külső beavatkozások hatására: pinealectomia és éhezés.....	33
4.4. In ovo kezelés hatása a motoros és szociális viselkedésre	36
4.5. A PACAP szerepe a szaglási memória kialakulásában.....	39

5. Megbeszélés	43
5.1. <i>A PACAP és a VIP megoszlása csirkeagyban embrionális és felnőtt korban</i>	43
5.2. <i>A PACAP napi ritmusa</i>	44
5.3. <i>A PACAP-szintek változásának vizsgálata külső beavatkozások hatására: pinealectomia és éhezés</i>	45
5.4. <i>In ovo kezelés hatása a motoros és szociális viselkedésre</i>	47
5.5. <i>PACAP szerepe a szaglási memória kialakulásában</i>	49
6. Irodalomjegyzék	50
7. Az értekezéshez felhasznált saját közlemények	66
8. Köszönetnyilvánítás	68

1. Bevezetés

1.1. A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A 38 aminosavból álló peptidet 1989-ben izolálták először birka hypothalamusból, a hypohysisben kifejtett adenilát-cikláz aktiváló hatása alapján [Miyata és mtsai, 1989]. Egy évvel később egy aktív, de rövidebb fragmensét is azonosították, ez volt a PACAP27, mivel szerkezete 27 aminosavból áll [Miyata és mtsai, 1990]. Az emlősökben előforduló PACAP majdnem 90 %-át a PACAP38 (továbbiakban PACAP) teszi ki, rövidebb formája kisebb mennyiségben van jelen. A rövidebb fragmensek antagonistá hatással bírnak, ezek közül legáltalánosabban használt a PACAP6-38 [Bourgault és mtsai, 2008]. A PACAP tagja a vasoaktiv intesztinális polipeptid (VIP)/szekretin/glukagon peptidcsaládnak [Arimura, 1998, Mustafa és Eiden, 2006]. Szerkezete 67 %-ban megegyezik a VIP struktúrájával, de adenilát-cikláz hatása ezerszer-tízszerszer nagyobb a VIP-nél. A PACAP génje 2681 nukleotidból áll és a 18. kromoszómán helyezkedik el. A peptid szekvenciája minden emlősben azonos (birka, patkány és ember), a békában is csak egy aminosav eltérés található [Köves és Vincze, 2001]. Egyéb gerincesekben is csak egy-négy aminosav eltérés mutatható ki [Vincze és Köves, 2001, Vaudry és mtsai, 2009]. A PACAP megtalálható előgerinchúros állatokban és alacsonyabb rendű gerinctelenekben is, melyek bizonyítják, hogy a filogenetikai fejlődés során szinte változatlanul konzerválódott molekula alapvető élettani funkciókkal rendelkezik. A felfedezése óta eltelt közel húsz év alatt a peptidet – nevével ellentétben – gyakorlatilag mindenhol kimutatták és sok hatását leírták.

Az irodalomban található – leginkább emlősökre vonatkozó – adatok szerint a PACAP nemcsak a központi és perifériás idegrendszerben, hanem más szövetekben, többek között az endokrin mirigyekben és a gastrointestinális tractusban is megtalálható. Így – hasonlóan sok más peptid típusú hormonhoz – a neurointesztinalis (brain-gut) peptidek közé sorolható. Emlősökben a PACAP legnagyobb mennyiségben a hypothalamus területén mutatható ki, de más extrahypothalamicus helyen, pl. az agykéregben, mesencephalonban, medulla oblongatában, bazális ganglionokban,

amygdalában, thalamusban, hypophysisben, cerebellumban is kimutatható [Arimura, 1998; Köves és mtsai, 1990. 1991]. A perifériás idegrendszer területén elsősorban a ganglion spinaleban, valamint a pre- és postganglionaris neuronokban figyelhető meg a PACAP [Sundler és mtsai, 1996].

A PACAP-nak szerepe van az agy fejlődésében, a neuroblastok differenciálódásában, proliferációjában, az axonnövekedésben, és a velőcső tagozódásában [Erhardt és mtsai 2001]. Knockout egerekben, ahol a PACAP vagy annak receptora hiányzik, számos súlyos funkcionális rendellenességet észleltek, beleértve a memóriazavarokat [Roberto és Brunelli 2000, Otto és mtsai 2001, Matsuyama és mtsai 2003, Reglődi és mtsai 2009 és 2012a,b].

1.2. A PACAP előfordulása emlős szervezetben

A PACAP előfordulását emlősök központi idegrendszerében a 1. táblázat mutatja.

Nem idegi szöveteket vizsgálva a PACAP jelentős koncentrációban megtalálható a testisben, a mellékvese chromaffin sejtjeiben és a Langerhans-szigetek sejtjeiben. Egyéb szervekben (szív, tüdő, máj, vese, nyirokszervek) is detektálták, de valószínű, hogy az ott található PACAP idegi és/vagy endokrin eredetű [Arimura és mtsai 1991, Kántor és mtsai 2002, Köves és mtsai 1993].

1. táblázat. A PACAP előfordulása az emlősök központi idegrendszerében, in situ hibridizáció és immunreakció. [Vaudry és mtsai 2009]. +++ = nagy denzitás-jelölés, ++ = közepes denzitás-jelölés, + = alacsony denzitás-jelölés, - = nincs jelölés vagy immunreakció.

Struktúra	mRNS	Perikarion	Idegrostok
<i>Bulbus olfactorius</i> – nucleus olfactorius ant.	++		
<i>Cortex cerebri</i>			
gyrus cinguli	++	+/-	+
nucleus endopiriformis	-	+	-
entorhinalis cortex	-	+	+
frontalis cortex	+	-	+
area olfactoria		++	-
neocorticalis terület	-	++	
<i>Septum</i>			
nucleus septalis lat.	-	-	++
nucleus septofimbrialis	-	-	+
nucleus septohippocampalis	-	-	+
<i>Amygdala</i>	++		+
bed nucleus		-/+++	++/++++
nucleus amigdaloides centralis		-	++
<i>Hippocampus</i>			
CA1	+	-/+++	+
CA2	+	-/+++	+
CA3	+	-/+++	+
Gyrus dentatus	++	-/+++	+
Broca-féle diagonális köteg	-	++	++
<i>Lamina terminalis</i> – organum vasculosum	-	+	+
<i>Diencephalon – epithalamus</i>			
nucleus habenularis	+++	-	+
corpus pineale	-	-	++
<i>Diencephalon – thalamus</i>			
nucleus medialis centralis	-	-	++
nucleus dorsomedialis	++	-	++
nucleus paraventricularis	++	+	++
<i>Diencephalon – hypothalamus</i>			
commissura anterior	-	-	++
nucleus commissurae anterioris	-	++	-
area hypothalamica anterior	-	-/+	-/+++
nucleus arcuatus	++	-/+++	-/+++

nucleus dorsomedialis	-	++	-
nucleus intermedius	-	++	-
nucleus lateralis	-	++	-
area hypothalamica lateralis	-	-/+++	-/+
nucleus habenularis	++	++	-
area preoptica medialis	-	++	-
nucleus supramammillaris	-	++	-
nucleus ventromedialis	++	++	
<i>Ventricularis rendszer</i>			
subfornicalis szerv	-	+	-
eminentia mediana	-	-	++
nucleus paraventricularis	++	+ /+++	++
nucleus perifornicalis	-	+	+
tuber cinereum	-	++	++
nucleus ventromedialis	+++	++	+++
<i>Mesencephalon</i>			
substantia grisea centralis	-	-	+
periaqueductalis állomány	-	-	+
pretectum	-		+
<i>Cerebellum</i>			
stratum granulosum	-	-	-/+++
stratum moleculare	-	-	-/+++
stratum ganglionare	-/+	-/+++	-/+
nuclei cochleares	-	+	-
Plexus choroideus		+	
<i>Myelencephalon</i>			
locus ceruleus	-	+	-
nuclei pontis	+	+	-
nucleus parabrachialis lateralis	+	+	+
nucleus nervi vagi	+	+	-
nucleus ambiguus	-	++	-
area postrema	-	-	++
nuclei raphi	-	++	-
nucleus dorsalis nervi vagi	-	++	++
nucleus hypoglossi	-	+	+
tractus pyramidalis	-	+	-
nucleus tractus solitarii	-	++	++
nucleus tractus spinalis nervi trigemini	-	-	+++

1.3. A PACAP előfordulása nem emlős (madár) szervezetben

Az emlősben (emberben) és madárban található PACAP szerkezete egy aminosav eltérést mutat [Arimura 1998, Nowak és mtsai 2003]. Madárban a PACAP központi idegrendszeri előfordulása hasonló elrendeződést, megoszlást mutat, mint emlősökben [Peeters és mtsai 2000].

A PACAP előfordulását madarak központi idegrendszerében a 2. táblázat mutatja.

A telencephalon területén nagy denzitásban megtalálható a PACAP a hippocampusban, de ennél kisebb mértékben kimutatható a PACAP a hyperstriatum accessoriumban. A telencephalon ventrálisabb részein (neostriatum intermedium, nucleus basalis) szintén magas a PACAP-pozitív idegelemek száma. A telencephalon lobus parolfactorius területén – mely megfelel az emlősök putamenjének caudális részével – nem található PACAP. Ellenben nagyon nagy sűrűségben mutatható ki PACAP-tartalmú idegsejt és -rost a bulbus olfactoriusban. Kisebb mértékben az archistriatum valamennyi részén jelen van.

A diencephalonban a preopticus területen található nagyszámú PACAP-immunreaktív sejt és rost: a nucleus magnocellularis preopticusban, a nucleus supraopticusban, a nucleus suprachiasmaticusban valamint a tractus septomesencephalicusban [McGoogan és Cassone 1999, Yoshimura és mtsai 2000]. A thalamus és hypothalamus rostralis részén – nucleus anterior, medialis és lateralis thalami – és a nucleus paraventricularisban viszont csak kevés immunpozitív képlet mutatható ki. A commissura anterior szintjében lévő bed nucleus szintén gazdag PACAP-ban, hasonlóan a hypothalamus dorsalis részéhez (nucleus dorsolateralis anterior, nucleus ovoidalis, nucleus subrotundus, nucleus paramedianus internus). Nagyszámú PACAP-pozitív idegsejt található a nucleus spiriformis medialisban és a nucleus pretektalis medialisban.

A mesencephalonban a PACAP-tartalmú idegelemek eloszlása a tectum opticumban kifejezett. Az alábbi területeken csak kisszámú PACAP-tartalmú struktúra mutatható ki: nucleus intercollicularis, nucleus mesencephalicus lateralis, nucleus

tegmenti pedunculopontinus (ez utóbbi megfelel a substantia nigrának emlősökben), formatio reticularis mesencephali és nucleus Edinger-Westphal.

Az agytörzs (pons, medulla oblongata, cerebellum) területén nagyszámú PACAP-pozitív képlet található a nucleus lemnisci lateralis környékén, a nucleus parabrachialisban, nucleus subceruleus ventralisban és a locus ceruleusban. A PACAP kimutatható még néhány agyideg magjában is, úgymint nucleus motorius nervi facialis, nucleus nervi glossopharyngei, nucleus dorsalis nervi vagi, trigeminus magok, valamint a nucleus tractus solitarii területén. A kisagyi Purkinje-sejtekben szintén található PACAP.

1.4. PACAP-receptorok és előfordulásuk madarakban

A PACAP-receptorok előfordulását madarak központi idegrendszerében a 2. táblázat mutatja.

A PACAP hatását a szervezetben specifikus G-proteinhez kötődő receptorok közvetítik. A receptorok, mely a VIP-receptor családba tartoznak, hét transzmembrán kart és egy intracellulárisan G-proteint kötő domént tartalmaznak. A humán PAC1 receptort kódoló gén a hetedik kromoszómán található. A PAC1 receptor két-három nagyságrenddel nagyobb affinitást mutat a PACAP-hoz, mint a VIP-hez, míg a VPAC1- és VPAC2-receptorok a PACAP-ot és a VIP-et egyforma erősséggel kötik [Arimura 1998, Laburthe és mtsai 2007]. A PACAP-receptorok eloszlása függ a receptor típusától: PAC1-receptorok kimutathatók az agyban, a gerincvelőben, az adenohypophysisben, a mellékvesevelőben és a herében. VPAC1-receptor található a központi idegrendszer mellett a tüdőben, a májban, a lépben, a thymusban, az ovariumban és a gastrointestinalis tractusban [Hashimoto és mtsai 1996, Joo és mtsai 2004]. A PAC1-receptor nyolc splice variánsa ismert. A harmadik intracelluláris karon található „hip” és „hop” szekvenciákat tartalmazó variánsokat PAC1R-hip, -hop1, -hop2, -hip-hop1, -hip-hop2, míg az ezt nem tartalmazó variánst rövid („short”) variánsnak nevezték el [Arimura 1998]. A „very short” variáns esetében az N-terminális végén hiányzik az extracelluláris domén, míg a PAC1R TM4 variáns esetében a második és negyedik transzmembrán domén különbözik [Arimura 1998, Dickson és Finlayson 2009, Vaudry és mtsai 2000a].

A madárban található PAC1 megoszlása nagyon hasonló a PACAP megoszlásához. Nagy sűrűségben található ez a receptor a telencephalon dorsalis területében, neostriatumban, a bulbus olfactoriusban (annak belső granularis rétegében), a nucleus accumbensben és a ventralis paleostriatumban. Kisebb mennyiségben a PAC1 receptor kimutatható a preopticus területen (nucleus preopticus medialis, fasciculus diagonalis Brocae) és a supraopticus-paraventricularis területen. Nagyszámú PAC1-tartalmú sejt található a nucleus infundibularisban, nucleus mamillarisban. A thalamusban, a kisagy granularis rétegben, tectum opticumban hasonlóan nagy denzitásban mutatható ki a receptor [Peeters és mtsai, 2000].

2. táblázat. A PACAP és a PAC1 receptor mRNS előfordulása csirkeagyban (in situ hibridizáció). + = kevés jelölés, ++ = közepes jelölés, +++ = sok jelölés, - = nincs reakció [Peeters és mtsai, 2000]

Agyterület	PACAP mRNS	PAC1 mRNS
<i>Dorsalis telencephalon</i>		
hyperstriatum accessorium	++	+++
hippocampus	+++	-
hyperstriatum intercalatum supremum	+	-
hyperstriatum ventrale et dorsale	+	+++
<i>Ventralis telencephalon</i>		
neostriatum intermedium	+++	+++
nucleus basalis	+++	-
lobus parolfactorius	-	-
paleostriatum primitivum	+	+
<i>Ventrolateralis telencephalon</i>		
archistriatum anterior	+	-
archistriatum intermedium	+	-
archistriatum mediale	+	-
regio septalis	++	-
area corticoidea dorsolateralis	+	-
bulbus olfactorius	+++	+++
<i>Area preoptica</i>		
nucleus magnocellularis preopticus	++	++
nucleus supraopticus	++	++
<i>Rostralis hypothalamus</i>		
nucelus anterior medialis	++	++
nucelus lateralis	++	++

nucleus ventromedialis	++	-
nucleus inferior	++	-
<i>Commissura anterior szintje</i>		
bed nucleus	+++	
nucleus tractus septomesencephalicus	+++	+++
nucleus dorsolateralis anterior	+++	+++
nucleus ovoidalis	+++	+++
nucleus subrotundus	+++	-
nucleus paramedianusinternus	+++	-
<i>Area pretectalis</i>		
nucleus spirifomis medialis	+++	-
nucleus preectalis medialis	+++	-
<i>Mesencephalon</i>		
nucleus intercollicularis	+	-
nucleus mesencephalicus lateralis, pars dors.	+	-
area ventralis (Tsai)	+	-
nucleus tegmenti pedunculopontinus	+	-
formatio reticularis mesencephali	+	-
nucleus Edinger-Westphal	+	-
<i>Pons</i>		
nucleus lemnisci lateralis	++	-
nucleus parabrachialis	++	-
locus ceruleus	+++	-
nuclei pontis	++	-
nucleus olivaris superior	++	-
nucleus motorius nervi facialis	++	-
nucleus angularis	+	-
<i>Medulla oblongata</i>		
nucleus nervi glossopharyngei	+++	+
nucleus dorsalis nervi vagi	+++	+
nucleus tractus solitarii	+++	+
formatio reticularis	++	+
<i>Cerebellum</i>		
Purkinje sejtek	++	+

1.5. PACAP élettani hatásai

A PACAP számos élettani hatással rendelkezik a szervezetben. A hatásairól több tanulmány is megjelent, melyek főként emlős szervezetekre vonatkoznak [Arimura 1998, Vaudry és mtsai 2000a, Ganea és Delgado 2002, Mustafa és Eiden 2006, Counis és mtsai 2007, Sherwood és mtsai 2000 és 2007]. Elsőként a hypothalamusból izolálták, így kezdetben a centrális endokrin hatásai váltak ismertté [Köves és mtsai 1990, 1998a, Counis és mtsai 2007]. Elsőként leírt funkciója a hypophysis hormontermelésének szabályozása, az elülső és a hátsó lebenyben egyaránt [Chiodera és mtsai 1995, Rawlings és Hezareh 1996, Evans és mtsai 1999, Kántor és mtsai 2000, Vaudry és mtsai 2006, Okada és mtsai 2007]. A PACAP a hypophysisben is termelődik, és a mirigyben kifejtett szerepének köszönhetően ma már magyar egyetemi szövettan tankönyvben is szerepel a PACAP, mint hypophysis neurohormon [Röhlich 2002]. Egyéb endokrin hatásai is ismertek: szerepe van a pajzsmirigyműködés szabályozásában [Okada és mtsai 2007], a gonádok szteroidtermelésének szabályozásában [El-Gehani és mtsai 2000], a spermiogenezisben és az ovarialis follicularis fejlődésben [Csaba és mtsai 1997, Apa és mtsai 2002, Barberi és mtsai 2007, Gras és mtsai 2005, Koppán et al. 2012; Li és mtsai 2004; Reglödi és mtsai 2012a,b], stimulálja a mellékvese katekolamin szintézisét [Isobe és mtsai 2003], és a pancreas inzulintermelését [Winzell és Ahren 2007].

A PACAP központi szerepet játszik a napi ritmus szabályozásában is [Köves és mtsai 2003, Hannibal és Fahrenkrug 2004, Hannibal 2006, Vereczki és mtsai 2006, Nagy és Csernus 2007,]. A PACAP a glutamát mellett a retinohypothalamicus pálya fő transzmittere, és számos folyamatot befolyásol a nucleus suprachiasmaticusban és a corpus pinealeban [Rékási és Czömpöly 2002, Hannibal 2006,]. A corpus pineale melatonin termelésére kifejtett hatását munkatársaink is vizsgálták. Kimutatták, hogy a PACAP fokozza a melatonin termelést a tobozmirigyben, mely már korai embrionális korban is megfigyelhető, azonban a melatonin cirkadián ritmusát nem befolyásolja [Csernus és mtsai 2004, Faluhelyi és mtsai 2004, 2005]. A PACAP szabályozza a migrációs viselkedést is. Több vándorló madárban kimutatták a ADCYAP1 gén variációit a migráció során. Ez az a gén, mely kódolja a PACAP-ot [Mueller és mtsai 2011].

A PACAP-ról kimutatták, hogy részt vesz az alvásszabályozásban [Murck és mtsai 2007], a centrális sympathicus neuronális aktivitás szabályozásában [Farnham és mtsai

2008], a hőszabályozásban [Pataki és mtsai 2002] és befolyásolja a kemorecepciót a glomus caroticumban [Xu és mtsai 2008]. A PACAP serkenti a memóriefolyamatokat, amit a PACAP valamint a PACAP-receptor knock-out (KO) egerek memóriazavara is mutat [Roberto és Brunelli 2000, Otto és mtsai 2001, Matsuyama és mtsai 2003]. A PACAP számos viselkedésre gyakorolt hatását is leírták. Befolyásolja többek között a szteroid-indukálta reprodukciós viselkedést patkányban és egérben [Apostolakis és mtsai 2004], növeli a lokomotoros aktivitást patkányban és egérben [Masuo és mtsai 1995, Adamik és Telegdy 2004], részt vesz a stressz adaptációs magatartás szabályozásában [Agarwal és mtsai 2005, Légrádi és mtsai 2007; Gaszner et al. 2012] és antidepresszáns hatásai is vannak [Reichenstein és mtsai 2008].

Az egyéb perifériás hatások közül kiemelendő, hogy a peptid befolyásolja a gastrointestinalis traktusban és légzőapparátusban a motilitást és szekréciót [Köves és mtsai 1993, Foda és mtsai 1995, Barthó és mtsai 2000, Lázár és mtsai 2001, Tornoe és mtsai 2001, Oh és mtsai 2005], az excitabilitást és a hormonszekréciót a szívben [Hardwick és mtsai 2006], a húgyúti szervekben hat a vizeletürítési reflexre és az érzőbeidegzésre [Fahrenkrug és Hannibal 1998, Braas és mtsai 2006], valamint simaizom relaxáns hatása van az erekben [Lenti és mtsai 2007]. A PACAP stimulálja a kalcium felszabadulást a herében és fokozza a DNS-szintézist is [Doan és mtsai 2012]. Hatással van a fájdalomérzés szabályozására a központi és perifériás idegrendszerben egyaránt. Az érzőidegvégződéseknél fájdalom hatására felszabaduló szenzoros neuropeptid szekrécióra kifejtett hatását munkatársaink is vizsgálták [Németh és mtsai 2006, Helyes és mtsai 2007, Davis-Taber és mtsai 2008, Sándor és mtsai 2008, 2010, Markovics és mtsai 2012].

A PACAP neurotrophicus és neuroprotektív hatásait felfedezése óta számos, főként in vitro kísérlet bizonyította. A neuroprotektív hatás szorosan összefügg a PACAP-nak az idegrendszer fejlődésében betöltött szerepével, mely közelebb vihet a neuroprotektív hatás megértéséhez; a trophicus aktivitása fontos a kisagy fejlődésében is [Aubert és mtsai 2007]. Minél jobban megismerjük a PACAP egyedfejlődésben betöltött szerepét, annál inkább valószínűsíthető az, hogy az embrionális fejlődésben szerepet játszó mechanizmusok újra fokozottabban aktiválódnak akkor, ha az idegrendszert károsító hatások érik [Waschek 2002]. Az idegrendszerben a PACAP és receptorai igen korán megjelennek, és kimutatottan nagy szerepet játszanak a neurogenesisben, a

neuronális differenciációban, a gliasejtek fejlődésében, valamint az idegrendszeri mintázat kialakításában is [Waschek 2002]. Az idegrendszert ért sérülések után a PACAP upregulációját már több munkacsoport leírta, és endogén neuroprotektív szerepe is ismert a PACAP KO egerek tanulmányozása, illetve a PACAP endogén antagonizálása révén [Waschek 2002, Somogyvári-Vigh és Reglődi 2004.].

Intézetünkben mutatták ki a PACAP neuroprotektív hatásait számos agyi károsodásban, mint pl. Parkinson kór, Huntington chorea, traumás agykárosodás és agyi ischemia patkány modelljeiben [Reglődi és mtsai 2004a,b 2011, Tamás és mtsai 2002, 2006a,b; 2012].

1.6. A VIP szerkezete, előfordulása emlősökben és madarakban

A VIP abba a peptidcsaládba tartozik, ahová a szekretin, glukagon és a PACAP. A VIP és a PACAP szerkezete a filogenezis során jól konzerválódott: az aminosav sorrendjeik majdnem azonosak az emlősökben [Arimura és mtsai 1998, Sherwood és mtsai 2000]. E nagyfokú szerkezeti hasonlóság valószínűsíti a fontos élettani szerepüket.

A VIP szerkezetéről a nem emlős gerincesekben – alligátor, béka és néhány halfaj kivételével – kevés ismerettel rendelkezünk [Nilsson 1975, Wang és mtsai 1993, Chartel és mtsai 1995, Sherwood és mtsai 2000]. A legtöbb állatfajban a VIP szerkezete csak néhány aminosavban különbözik. A VIP idegrendszeri eloszlását számos fajban már leírták, bár a korai tanulmányok csak a bélben történő előfordulására koncentráltak [Said és mtsai 1972, Buchan és mtsai 1981, Holmgren és mtsai 1985]. A VIP-receptort is kimutatták már számos emlős és egyéb gerinces fajokban is [Alexandre és mtsai 1999].

A madárban – elsősorban a csirkében – található VIP szekvenciája csak négy aminosavban különbözik az emlősökben található VIP-től. A VIP-tartalmú neuronok megoszlása, elhelyezkedése és a génexpresszió feltérképezése csirkében megtörtént [Wayne és mtsai 1993, Kuenzel és mtsai 1997] (3. táblázat). Szintén ismert, hogy csirkeembriók idegrendszerében a VIP megtalálható a gerincvelőben, szimpatikus dúcokban, a plexus submucosusban továbbá az embrionális 15. naptól a hypophysisben [Epstein és mtsai 1983, New és mtsai 1986, Du és mtsai 1988, Woods és mtsai 1998].

Azonban továbbra is kevés ismerettel rendelkezünk a VIP megoszlásáról és szerepéről az embrionális csirkeagyban.

3. táblázat. A VIP megoszlása madár központi idegrendszerében, immunreakció [Wayne és mtsai 1993].

Agyterület	VIP immunoreaktív perikarionok helye
<i>Telencephalon</i> area septalis	organum septi laterale, pars medialis
<i>Diencephalon</i> elülső és középső hypothalamicus terület mediobasalis hypothalamus	regio lateralis hypothalami, nucleus anterior medialis, nucleus ventromedialis, nucleus paraventricularis magnocellularis nucleus infundibuli, nucleus inferior
<i>Mesencephalon</i> lobus opticus dorsalis középagy centralis középagy ventralis középagy	stratum griseum et fibrosum superficiale substantia grisea centralis, nucleus intercollicularis nucleus tegmenti pedunculo-pontinus pars compacta, locus ceruleus area ventralis (Tsai)
<i>Myelencephalon</i> medulla oblongata	nucleus reticularis paragigantocellularis lateralis

2. Célkitűzések

Az irodalomból eddig megismert adatok alapján részletes információk állnak rendelkezésünkre a PACAP, a VIP és receptorainak előfordulási helyéről és megoszlásáról az emlősök idegrendszerében és egyéb más szervrendszerében. Évről évre egyre több adat jelenik meg a közleményekben ezen peptidek lehetséges élettani szerepéről, különféle protektív hatásairól, napi ritmust mutató változásairól és az ezeket befolyásoló tényezőkről, hatásokról. Az irodalomban viszont csak kevés adat áll rendelkezésre a PACAP és receptorainak megoszlásáról, előfordulási helyéről a madarak szervezetében, különösen a központi idegrendszerben. A ritmikus változásokról, az ezt befolyásoló szabályozó tényezőkről, valamint a PACAP lehetséges szerepéről az emlősöktől lényegesen eltérő egyedfejlődés során alig van adat, ezért jelen munkánkban vizsgálni kívántuk:

1. a PACAP- és a VIP-tartalmú struktúrák megoszlását csirkeagyban.

Tekintettel arra, hogy a megoszlásról inkább csak felnőtt állatokban vannak ismertek, így az embrionális idegrendszerben található PACAP megoszlását tanulmányozó kísérletekre helyeztük a hangsúlyt azért, hogy többet tudjunk meg a PACAP lehetséges szerepéről a neuronális differenciáció során, mely közelebb vihet az idegi regeneráció mechanizmusainak jobb megértéséhez is.

2. a PACAP napi ritmusát és előfordulását a corpus pinealeban.

Ismert, hogy emlősökben a PACAP a retino-hypothalamicus pálya egyik fő transzmittereként (a glutamát mellett) részt vesz a cirkadián ritmus szabályozásában. Emlősben több agyterületen – elsősorban a nucleus suprachiasmaticusban – kimutatták a PACAP cirkadián ritmusát. Tekintettel arra, hogy emlősök és madarak napi ritmusának szabályozása eltérő, (immunhisztokémiai módszerrel) vizsgálni kívántuk a PACAP előfordulását a csirke állatmodellen a corpus pinealeban. Radioimmunoassay módszerrel a

különböző agyterületekben követték a PACAP mennyiségének napi változásait.

3. *a pinealectomia és éhezés hatását a PACAP-szintekre és a napi ritmusra.*

Feltételezhetjük, hogy amennyiben madarakban is létezik a PACAP-nak cirkadián ritmusa, akkor ezen ritmus fenntartása és szabályozása a corpus pineale feladata. Irodalmi adatok bizonyítják, hogy emlősökben létezik PACAP cirkadián ritmus. Azonban az emlősök ritmikus szabályozásának központja nem a corpus pineale, hanem – többek között – a nucleus suprachiasmaticus. Ezért a PACAP-pal kapcsolatos további vizsgálatokhoz nagyon fontos annak ritmikus szabályozásának megértése. Felmerült a kérdés, hogy a tobozmirigy műtéti eltávolítása miként befolyásolja PACAP napi ritmusát.

A PACAP kimutatható azokban az agyterületben is, melyek a táplálékfelvételt szabályozzák. Több tanulmány foglalkozott azzal, hogy a PACAP-nak szerepe van a táplálkozást szabályozó mechanizmusokban [Köver és mtsai 1991, Peeters és mtsai 1998, Zhou és mtsai 2002, Nowak és mtsai 2003, Tachibana és mtsai 2003]. A táplálkozási magatartásokban viszont a hypothalamuson kívül a telencephalon és az agytörzs is részt vesz [Grill és mtsai 2002], és a táplálkozás napi ritmusa nappali, illetve éjszakai életet élő állatoknál napszaki eltérést is mutat. Az idegrendszer fejlődését károsan befolyásoló tényezők között az alutápláltság az egyik kiemelkedően fontos károsodást okozó faktor. Felvetődik a kérdés, hogy a táplálékfelvétel zavara miként befolyásolja a fenti agyterületekben a PACAP-tartalmú struktúrákat.

4. *az in ovo PACAP kezelés hatását a motoros és szociális viselkedésre.*

Emlős állatokban a PACAP-nak – számos egyéb hatása mellett – szerepe van a viselkedési mintázatok kialakulásában. Felmerül a kérdés, vajon madarakban szintén van-e ilyen szerep, és ha igen, hogyan történhet ez a szabályozás. Csirkeembriók egyedfejlődése jelentősen eltér az emlősök fejlődésétől (anyai hatástól független), jól ismertek a fejlettségi stádiumok, lehetőség van kikelés

utáni motoros és szociális viselkedés nyomon követésére a változások függvényében.

5. *a PACAP szerepét a szaglási memória kialakulásában.*

Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a PACAP-nak szerepe van az idegrendszer fejlődésében, de ezek az adatok emlősökre vonatkoznak [*Waschek és mtsai 2002, Somogyvári és mtsai 2004*]. Szintén számos tanulmány foglalkozott a tanulásban és a memóriában betöltött szerepével, hiszen a hippocampusban nagy számban található PACAP-tartalmú sejtek [*D'Agata és mtsai 1996, Arimura 1998, Ciranna és mtsai 2003*]. A prenatális kemoszenzoros és olfactorikus tanulást számos állatfajban leírták [*Kandel és mtsai 1995, Feany és mtsai 1995, DeZazzo és mtsai 1999, Hashimoto és mtsai 2002, Keene és mtsai 2004*]. Az embrionális szaglási memória kialakulásáról és az ezt szabályozó tényezőkről nincsenek ismereteink, annak ellenére, hogy a PACAP számos fontos feladattal bír az idegrendszer fejlődésében. Csirkékben vannak adatok kemoszenzoros és akusztikus tanulásra [*Lickliter és Stoumbos 1992, Sneddon és mtsa 1998*]. Kísérleti munkánk ezen részének célja azt vizsgálni, hogy a PACAP játszik-e valamilyen szerepet a szaglási memória kialakulásában csirkében, in ovo PACAP-antagonista kezelést (PACAP6-38) követően.

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez Hubbard Flex húshibrid tojásokat, illetve ugyanilyen típusú állatokat (*Gallus domesticus*) használtunk [Bóly Rt. Mohácsi Húshibrid Keltető]. A keltetés minden esetben az előírásoknak megfelelően történt: 37,5 °C-on, 65-85 %-os páratartalom mellett, a kísérlettől függő környezeti fényviszonyok mellett (pl. 14 óra világos, 10 óra sötét, vagy teljes sötétben). Kikelés után szobahőmérsékleten tartottuk az állatokat, a fényviszonyok ismét a kísérlet függvényében változtak. Táplálék és víz felvétele *ad libitum* volt lehetséges (kivéve az éhezéssel vizsgálatoknál). Az állatok elhelyezése, gondozása és felhasználása a Pécsi Tudományegyetem ellenőrzött protokollja szerint (BA02-2000-31/2001), az intézeti ajánlások figyelembevételével történt.

3.2. Kísérleti módszerek

3.2.1. Radioimmunoassay

Az eltávolított szöveteket tömegmérés után homogenizáltuk és centrifugáltuk (12000 rpm, 4 °C -on, 30 percig). A szupernatánsokat használtuk a RIA mérésekhez.

A PACAP38 mérésekhez a „88111-3” számú antiszérumot használtuk, melyet nyúlban állítottak elő. Birka PACAP24-28 C-terminális fragmentet jódoltuk (125 I) és a reakciókeveréket reverse HPLC oszlopon választottuk el. Birka PACAP38-at használtunk standardként (0-1000 fmol/ml).

A VIP mérésekhez „85/24”-es, nyúlban előállított, glutáraldehiddel fixált sertés VIP és madár thyreoglobulin konjugált antiszérumot használtunk. A sertés VIP-et, mint RIA-standardet használtuk 0 és 100 fmol/ml közötti koncentrációban.

A PACAP38 mérésénél a RIA assay-hez alkalmazott 1 ml PBS tartalmazott (0,05 mol/l, pH: 7,4) 0,1 mol/l NaCl-ot, 0,05% NaN₃-t és 0,25% BSA-t (bovine serum

albumine). A pufferbe 100 µl antiszérumot (munkahígítás: 1:100000), 100 µl RIA tracer-t (5000 cpm/cső) és 100 µl standardot vagy ismeretlen mintát mértünk.

A VIP esetén a RIA assay-hez alkalmazott 1 ml PBS (0,02 mol/l, pH: 6,5) oldat tartalmazott 0,05 % Na-azidot, 0,1 % EDTA-t, 0,05 % polybrene-t és 0,25% BSA-t. A pufferbe 100 µl antiszérumot (munkahígítás: 1:210000), 100 µl RIA tracer-t (5000 cpm/cső) és 100 µl standardot vagy ismeretlen mintát mértünk.

48-72 óra inkubációt követően (4 °C), az antitesthez kötött peptidet elválasztottuk 100 µl szeparációs oldat segítségével (10 g szén, 1 g dextrans, 0,5 g sovány tejpor 100 ml desztillált vízben). Centrifugálás után (3000 rpm, 15 min, 4 °C) gamma counterben mértük a radioaktivitást. A minták PACAP38 és VIP tartalmát kalibrációs görbéről olvastuk le, és fmol/mg nedves súlyra adtuk meg.

A peptid koncentrációkat ANOVA teszttel analizáltuk, ahol a szignifikancia mértéke $p < 0,05$.

3.2.2. A napi ritmus vizsgálata

A kísérlethez az állatokat (n=128) négy csoportra osztottuk: **LD** (light/dark) csoportot 14 órán át világosban és 10 órán át sötétben tartottuk (reggel 6 órától világos, este 8 órától sötét volt). A **DL** (dark/light) csoportot fordított fényviszonyok között tartottuk: 10 óra világos, 14 óra sötét (reggel 6-tól sötét, délután 4-től világos volt). Az **LL** (light/light) csoport állatai folyamatos megvilágításban, míg a **DD** (dark/dark) csoport állatai folyamatos sötétben voltak. Három óránként minden csoportból négy állatot dekaptáltunk, és eltávolítottuk az agyat és a retinákat. Szétválasztottuk a diencephalont, agytörzset (pons és medulla oblongata), tectumot, corpus pinealét, a hypophysist, a telencephalon elülső részét, a cerebellumot és a retinát. RIA módszer után COSINOR analízissel állapítottuk meg a ritmikus folyamat meglétét vagy hiányát.

3.2.3. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai metszetek készítéséhez csirkéből távolítottuk el a szöveteket. Az állatokat mély altatásban (Pentobarbital i.v.) az arteria carotis interna ereken keresztül perfundáltuk először 100 ml 4 °C-os foszfátbuffer sóoldattal (PBS, pH

7,4), amihez heparint (15000 IU/l) adtunk. Ezt követően 4 %-os paraformaldehiddel (foszfátpufferben [pH 7,4]) történt a fixálás. A fixálás után eltávolítottuk a szerveket és egy éjszakán keresztül 4 %-os paraformaldehidben tovább fixáltuk. A szövetekből 15-50 µm-es metszeteket (frontalis, saggitalis) készítettünk kriosztáttal és/vagy vibratómmal. A PACAP38-immunreaktív képleteket a standard ABC módszerrel azonosítottuk [Biomarker] [Köves és mtsai 1990]. Kontroll vizsgálatokat végeztünk olyan metszetekkel, amelyeknél különböző higítású antitesteket használtunk (szérumspecifitási próba), illetve a primer antitestet kihagyva végeztük el az immunfestést (módszerspecifitási próba).

3.2.4. Műtéti eljárás – pinealectomia

A műtéthez három és hét hetes kor közötti csirkéket használtunk. A megfelelő altatás után egy rövid metszést végeztünk a fejtetőn cranio-caudális irányban, majd a koponyán is. A csontdarab levétele után láthatóvá vált a dura mater és a sinus sagittalis superior. A durán kis nyílást vágunk és felhajtva alatta helyezkedett el a corpus pineale. A corpus pinealet megfogtuk és óvatosan kiemeltük úgy, hogy a nyele is épségben maradjon. Ezután kis darab vérzéscsillapító szivacsot (Spongostan) helyeztünk az eltávolított corpus pineale területére amíg a vérzés meg nem szűnt, majd a bőrt folyamatos öltésekkel zártuk. A sebbe kis mennyiségű antibiotikumot helyeztünk. A sebészeti beavatkozás mortalitása kevesebb, mint 10 % volt. Hasonló eljárást alkalmaztunk az „álműtött” állatoknál is, azzal a kivétellel, hogy a corpus pinealet nem távolítottuk el. A pinealectomia után az állatok a saját ketrecükbe kerültek egy hétig ugyanolyan körülmények közé, mint az operáció előtt. A műtét utáni mortalitás alacsony volt, csak három pinealectomizált állat pusztult el. Egy héttel az operáció után az állatokat dekapitáltuk, az agyat eltávolítottuk, majd a következő agyrészeket vizsgáltuk tovább: agytörzs (pons és medulla oblongata), diencephalon és a telencephalon frontális része, majd RIA módszerrel határoztuk meg a PACAP38 szinteket.

3.2.5. Az éhezés vizsgálata

A kísérlethez használt csirkék (broiler) takarmánymegvonása este nyolc órakor kezdődött (víz ad libitum elérhető volt), az állatok agyát 12, 36 és 48 óra múlva

távolítottuk el (n=6 állat minden csoportban). A kontroll állatok agyát is ugyanebben az időpontban távolítottuk el (n=6). A hypothalamust, agytörzset, telencephalont elkülönítettük, megmértük, majd PACAP38- és VIP-RIA analízis történt. A statisztikai elemzéseket ANOVA teszttel végeztük.

Miután erre vonatkozó emlős adatok sem állnak rendelkezésre, ezért összehasonlításképpen ugyanezt a kísérletet felnőtt hím Wistar patkányokon (250-300 g) is elvégeztük.

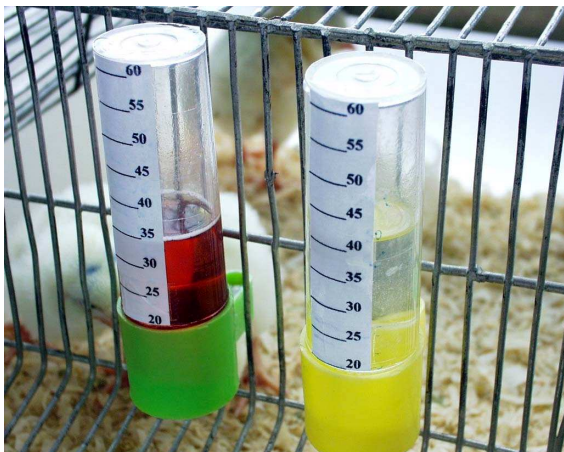
3.2.6. In ovo kezelések

A fertilizált tojásokat saját keltetőgépünkben (Brinsea Products, Standfordt, England) inkubáltuk 37,5 °C-on és 60 %-os relatív páratartalom mellett. A tojások forgatását a gép automatikusan végezte óránként. A csirkeembriók kezelését az első és második embrionális életszakaszban (nyolcadik [E8] és tizenhatodik [E16] napon) végeztük. A fertilizált tojásokra jellemző levegőbuborékot átvilágítással kerestük meg. Ezt a tojáshéjterületet 96 %-os alkohollal fertőtlenítettük. Steril tűvel kis ablakot vágunk a tojáshéjon. A bejuttatandó anyagot Hamilton fecskendővel injektáltuk a chorioallantois membránon keresztül [Bronson et mstai, 1994]. A csirkeembriókba 20 µg PACAP6-38-at adtunk 25 µl fiziológiás sóoldatban feloldva (E8: n = 46, E16: n = 10). A PACAP6-38 mennyiségét korábbi kísérletek alapján számítottuk ki [Arimura et mtsai, 1994]. A kontroll tojásokba ugyanezzel az eljárással ugyanekkora volumenű sóoldatot injektáltunk (E8: n = 22, E16: n = 10). Az injekció után a kivágott tojáshéjdarabot visszahelyeztük és leragasztottuk.

3.2.7. A szaglási memória vizsgálata

Csirkeembriókba 20 µl PACAP6-38-at injektáltunk (n = 15). A kontroll állatok (n = 15) fiziológiás sóoldat kezelést kaptak. A tizenötödiktől a huszadik embrionális napig a tojáshéjakat 300 µl eperkivonattal bekentük (Imitation Strawberry Extract, McCormick & Co., Hunt Valley, USA), mind a PACAP6-38 kezelt, mind a sókezelt tojásoknál (kisebb gézdarabra csepegtettünk eperkivonatot illetve sóoldatot, majd a gézdarabot ráragasztottuk a tojáshéjra). A kezeletlen kontroll csirkék nem kaptak eperkezelést, ezeket elkülönítve is

keltették (n = 20). A kikelés után minden állatketrecbe két üvegpalackot tettünk, az egyik eperaromával kevert vizet tartalmazott. Az illataromával kevert és nem kevert víz fogyasztását naponta mértük a kikelést követő hatodik napig (1. és 2. kép).



1. kép. A két féle víz fogyasztásának mérése.



2. kép. Az állatok ivása a két féle vízből.

3.2.8. Viselkedésvizsgálatok

Open field teszt

Az általános exploratórikus („felderítő”) és a lokomotoros aktivitást az open field berendezésben vizsgáltuk [Hocking és mtsai 2001, Schrott és mtsai 1998, Lowdnes és mtsai 1996]. Ez egy 45x45 cm-es négyzet alakú doboz (teljes oldalhosszúsága 50 cm), melyet 64 kis négyzetre osztottunk fel. A tesztet két napos (P2) és két hetes (P14) korban végeztük el. Az állatot a doboz közepére helyeztük. Minden teszt öt perig tartott és videóra rögzítettük, majd a következő viselkedési paramétereket vizsgáltuk: (1) az első lépésig eltelt idő, (2) az első csipogásig eltelt idő, (3) a lépések száma, (4) adott mezőkben tartózkodás ideje, (5) megiramodások (futások) száma, (6) menekülési kísérletek száma, (7) csipegetések száma, (8) tollcsipkedések száma, (9) szárnycsapkodások száma, a fej (10) előre-hátra és (11) oldalra fordításának száma, (12) székletürítések száma, (13) fal melletti futás-tartózkodás ideje (mely a félelmet jelenti), (14) átlósan futások száma és az (15) ugrások száma. A teszt parametrikus adatait Student's t-teszttel, míg a nem parametrikus adatokat Man-Whitney teszttel értékeltük ki. A szignifikancia: $P < 0,05$.

Általános magatartás (general behavior) teszt

Az állatokat saját ketrecükben, saját környezetükben vizsgáltuk (3. kép). A teszt alatt 15 számolás történt, egy számolás egy percre tartott és minden számolás között egy perc szünetet tartottunk [Hocking és mtsai 2001]. Egy ketrecben nyolc állatot tartottunk. A tesztet 21 napos korig naponta elvégeztük, egyszer a délelőtti órákban (8 és 9 óra között), és egyszer a délutáni időszakban (14 és 15 óra között). A következő paramétereket vizsgáltuk: (1) evés, (2) ivás, (3) állás, (4) ülés, (5) mozgás (sétálás és futás), (6) tollázkodás, (7) csipegetés, (8) agresszíven másik állat csípése, (9) saját maga csípése. A mérési eredményeket százalékban fejeztük ki. Az eredményeket Student's t-teszttel értékeltük ki. A szignifikancia értéke $P < 0,05$.



3. kép. Az állatok elhelyezése a teszt előtt.

Szocializációs teszt – runway test

A runway teszttel az állatok szociális viselkedését lehet vizsgálni [Hocking és mtsai 2001]. A futófolyosó két méter hosszú, egy végén egy doboz található („start box”), a másik végén pedig két, azonos ketrecből származó állat egy ketrecben („goal box”). A teszt akklimatizációval kezdődött, a start boxban az állat két percet töltött, miközben végig láthatta a másik két állatot. Két perc eltelté után a start box ajtaját kinyitottuk és mértük az időt, amíg az állat a futófolyosóra lép (4. kép). A goal box előtti 20 cm-es szakaszba való

belépést már pozitívnak értékeltük. Majd mértük az időt, amit az állat a goal box előtti területen töltött (5. kép). A teszt tíz percig tartott, melyet az állatok négy (P4) és tizennégy (P14) napos korában végeztünk. Az eredmények összehasonlítását Student's t-teszttel végeztük. A szignifikancia értéke $P < 0,05$.



4. kép. A runway-teszt futófolyosója.



5. kép. A runway-teszt futófolyosója és a "goal-box".

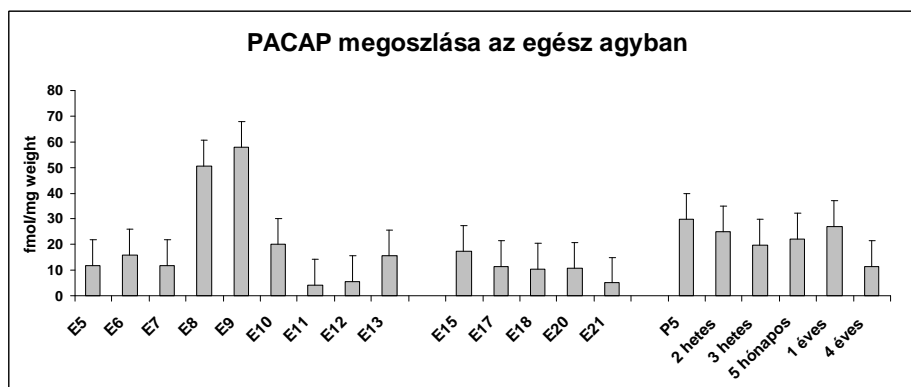
4. Eredmények

4.1. PACAP és a VIP megoszlása csirkeagyban embrionális és felnőtt korban

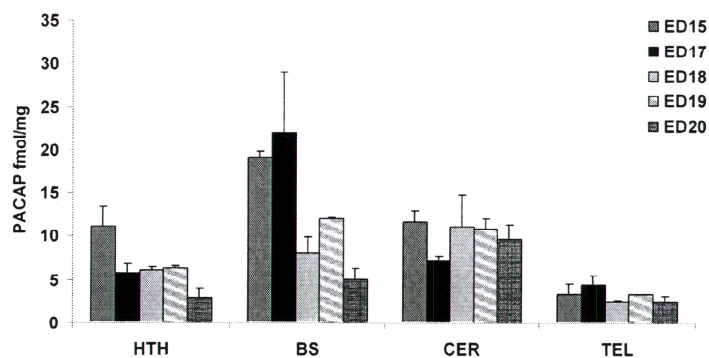
A RIA mérések eredményeképpen kapott adatok azt mutatják, hogy a PACAP és a VIP nagy koncentrációban jelen van az embrionális fejlődés második felében. A PACAP38 szintje minden vizsgált agyterületen szignifikánsan magasabb volt, mint a VIP (1. ábra). A legmagasabb PACAP koncentrációt az agytörzsben mértük, majd csökkenő sorrendben a hypothalamusban, kisagyban, míg a telencephalonban volt a legalacsonyabb a koncentráció. Ezek a koncentrációk csökkenő tendenciát mutattak az embrionális kor második felében valamennyi vizsgált agyterületen. Szignifikáns különbséget az agytörzsben és a hypothalamusban találtunk a 15. és a 20. nap között.

A PACAP koncentrációjának változása az embrionális korban, majd a kikelés utáni és a későbbi felnőttkorban a következő megoszlást mutatta: az embrionális kor első felében érte el a peptid a maximumát (E8 és E9 napokon), és ezek a csúcsok szignifikánsan különböztek az összes többi értéktől. Ezután a PACAP-értékek a csúcs előtti szintre csökkentek. Az embrionális kor második felében a szintek nem különböztek a embrionális kor első felében tapasztalt szintektől (2. ábra). A kikelés előtt és a kikelés napján további csökkenést láttunk. A kikelés utáni és a későbbi felnőttkorban szignifikáns változásokat nem tapasztaltunk (1. ábra).

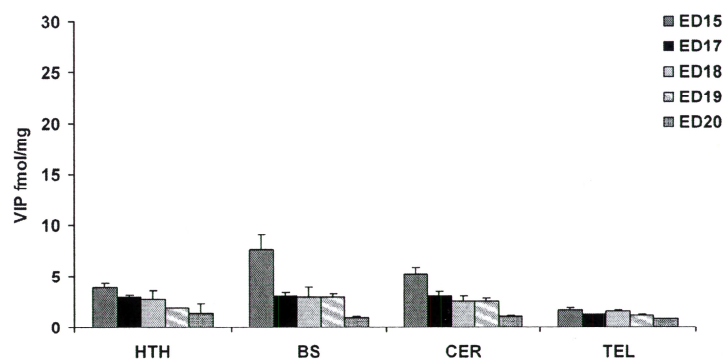
A VIP-szintek is csökkenést mutattak a fejlődés során, ez az agytörzsben bizonyult szignifikánsnak. Összehasonlítva a PACAP38-cal, a VIP-szintek szignifikánsan mindig alacsonyabb értéket mutattak az összes vizsgált agyterületen (3. ábra).



1. ábra. A PACAP megoszlása az agyban.



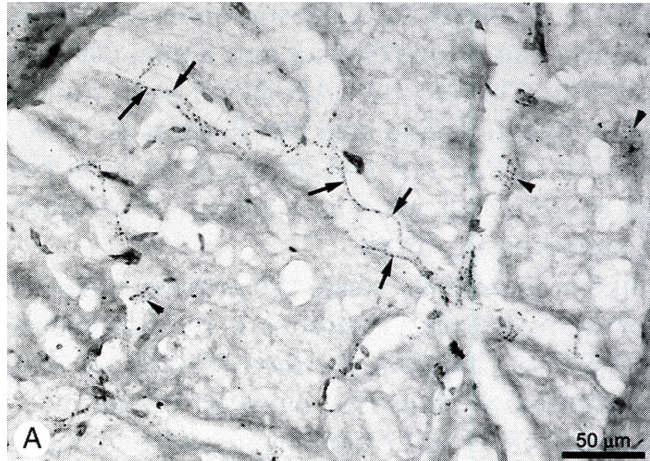
2. ábra. A PACAP koncentrációk a hypothalamusban (HTH), agyrörzsben (BS), a kisagyban (CER) és a telencephalonban (TEL).



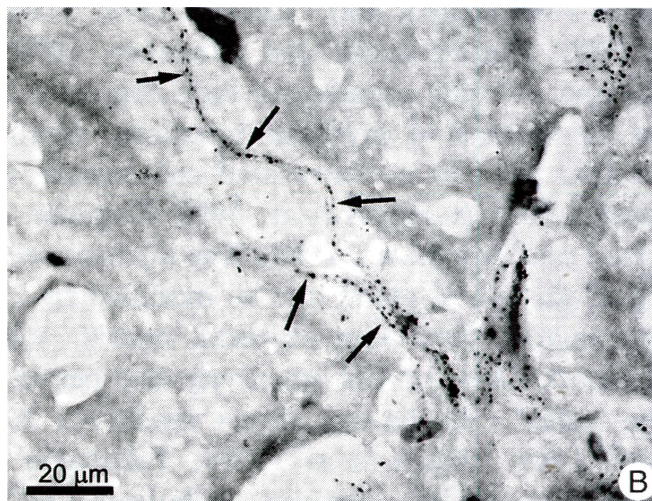
3. ábra. A VIP koncentrációk a hypothalamusban (HTH), agyrörzsben (BS), a kisagyban (CER) és a telencephalonban (TEL).

4.2. A PACAP napi ritmusa

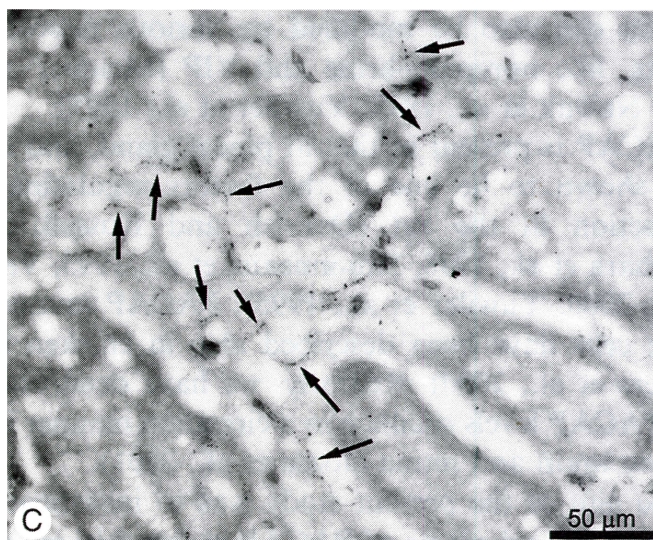
A szakirodalomban nem találtunk olyan adatokat, amelyek bizonyítják, hogy a PACAP-nak van-e napi ritmusa madarakban. A madarak napi ritmikus folyamatainak szabályozása oszcillátorok által történik, melyek a retinában, corpus pinealeban és a nucleus suprachiasmaticusban található. Közülük az egyik legfontosabb és – elsősorban elhelyezkedése miatt – viszonylag könnyen vizsgálható a corpus pineale. PACAP immunfestéssel kimutattuk a PACAP-tartalmú rostok jelenlétét a corpus pinealeban (4., 5. és 6. ábra).



4. ábra. PACAP immunhiszokémia csirke corpus pinealeban (hét hetes állat). PACAP-immunreaktív idegrostok láthatók az erek körül (nyílak). PACAP tartalmú rostok a jelöletlen pinealociták körül (nyílhegyek).



5. ábra. A 4-es ábra nagyobb nagyítással.



6. ábra. PACAP-immunpozitív rostok a pinealociták körül.

Az immunhisztokémia után RIA módszerrel valamennyi vizsgált agyterületen a PACAP szintje magas koncentrációt mutatott. Legmagasabb a diencephalonban és az agytörzsben volt (7-19 ng/mg fehérje). A telencephalonban, tectumban és a cerebellumban a PACAP szintje 2,5-7 ng/mg fehérje között volt. Legalacsonyabb szint a retinában és a hypohysisben volt mérhető. Azonban a PACAP ritmikus változását csak az agytörzsben, diencephalonban, telencephalonban és a retinában találtuk (4. táblázat).

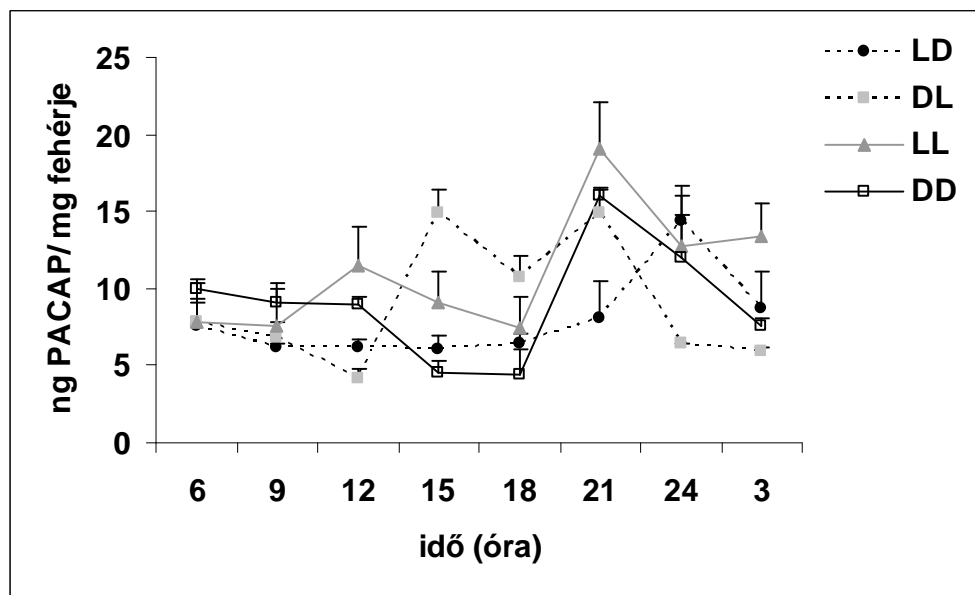
4. táblázat. A PACAP cirkadián ritmusának COSINOR analízise.

Agyrész	Csoport	MESOR ng	Amplitude ng	Acrophase degree	F	p
<i>Agytörzs</i>	<i>LD</i>	8,11	3,02	-5,22	7,28	0,022
	<i>DL</i>	8,52	4,27	-283,84	3,98	0,039
	<i>LL</i>	10,92	2,66	-339,97	1,45	0,253
	<i>DD</i>	8,58	2,41	-21,48	2,73	0,087
<i>Hypothalamus</i>	<i>LD</i>	9,8	2,13	-32,9	3,25	0,049
	<i>DL</i>	8,47	3,57	-274,07	6,06	0,011
	<i>LL</i>	9,95	2,41	-34,11	4,53	0,021
	<i>DD</i>	8,63	2,12	-24,32	3,5	0,047
<i>Telencephalon</i>	<i>LD</i>	4,68	1,3	-95,02	3,83	0,031
	<i>DL</i>	8,28	3,27	-276,24	10,89	0,577
	<i>LL</i>	10,11	2,22	-29	2,4	0,004
	<i>DD</i>	8,56	2,18	-16,96	4,38	<0,001
<i>Retina</i>	<i>LD</i>	0,7	0,3	-14,14	13,21	<0,001
	<i>DL</i>	0,79	0,23	-16,46	3,57	0,049
	<i>LL</i>	0,62	0,19	-35,67	8,08	0,002
	<i>DD</i>	0,55	0,31	-77,24	15,56	0,007

Agytörzs:

A PACAP38 napi ritmusa az *LD*, *LL* és *DD* csoportban egyaránt észlelhető volt (7. ábra). A szubjektív világos órák alatt nem volt szignifikáns különbség a csoportok között, az értékek 4-10 ng/mg fehérje között ingadoztak. A szubjektív sötét órák alatt a PACAP szintje 12-19 ng/mg fehérje szintre emelkedett. A PACAP átlagos szintje a szubjektív sötét órák alatt szignifikánsan magasabb volt ebben a három csoportban, mint a szubjektív világos órák alatt mérhető szint. Az *LD* (14 óra világos/10 óra sötét) csoportban egy magas csúcs volt észlelhető éjfélkor, mely különbözött az összes többi időpontban mérhető értéktől. Az *LL* (állandó világos) csoportban a csúcserték 21 órakor volt mérhető,

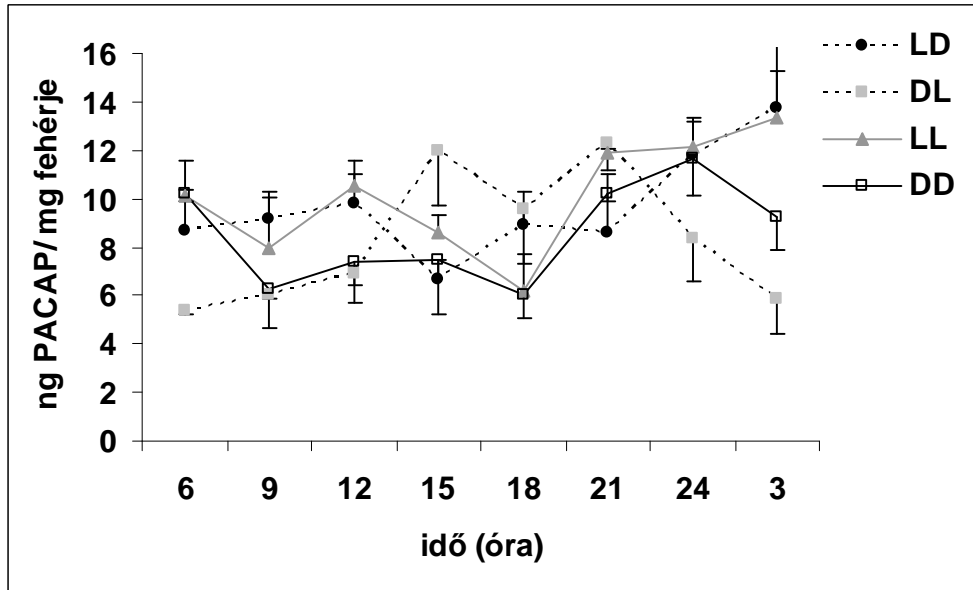
szintén szignifikánsan különbözött a többi értéktől. A *DD* (állandó sötét) csoportban is 21 órakor volt a csúc, és ez is különbözött az alacsonyabb értékektől (15, 18 és 3 órakor). A legalacsonyabb koncentráció 15 és 18 órakor volt, és ezek az értékek szignifikánsan különböztek az összes előző nappali értéktől. A *DL* (10 óra sötét/14 óra világos, fordítva, mint az *LD*-ben) csoportban két csúc volt mérhető 15 és 21 óra között, szignifikánsan eltértek az összes korábbi és későbbi időpontban mérhető értékektől. A Cosinor analízis szerint az *LD* és *DL* csoport mutatott cirkadián ritmus, míg az *LL* és *DD* csoport nem.



7. ábra. A PACAP szintek és a napi ritmusok az agytörzsben.

Diencephalon:

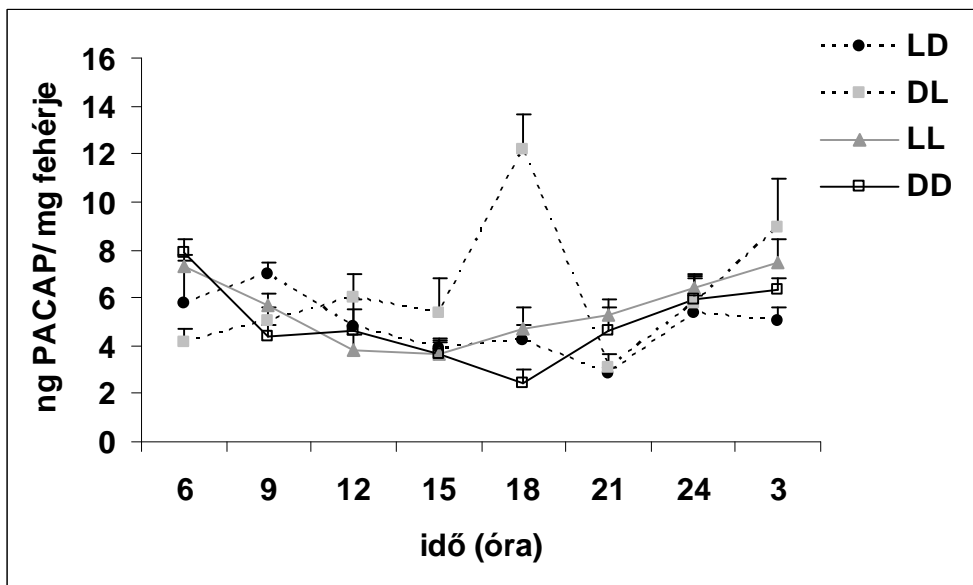
A PACAP38 napi eloszlása a diencephalonban hasonló volt, mint az agytörzsben (8. ábra). Az *LD*, *LL* és *DD* csoportban a PACAP 6-10 ng/mg fehérje között volt a szubjektív világos órák alatt. A szubjektív sötét órák alatt ebben a három csoportban a szint emelkedett (11-14 ng/mg fehérje), legmagasabb 21 órakor volt az *LL* és *DD* csoportban, és 24 órakor az *LD* csoportban. A szubjektív sötét órák alatt mérhető átlagos PACAP-értékek nem különböztek szignifikánsan egymástól, de különböztek a szubjektív világos órák alatt mérhető értékektől, tekintet nélkül a fényviszonyokra. A *DL* csoport értékei is hasonlóak, mint az agytörzs esetén: legmagasabb érték a sötét periódus végén, és a világos kezdetén (15-21 óra között) volt. A Cosinor analízis mindegyik csoportban szignifikáns napi ritmust mutatott ki.



8. ábra. A PACAP szintek és a napi ritmusok a diencephalonban.

Telencephalon:

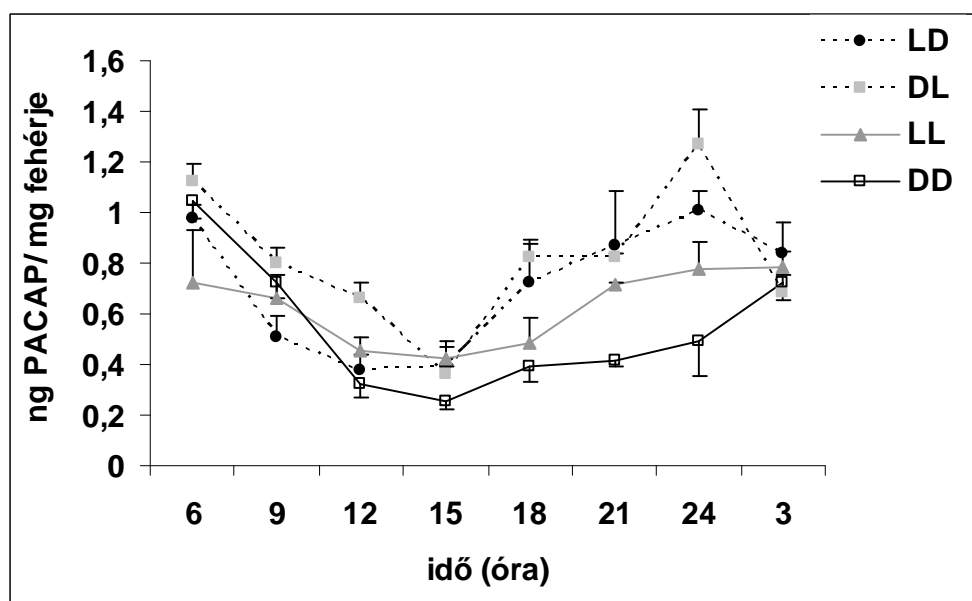
Az LD, LL és DD csoport adatai hasonló napi változást mutatnak (9. ábra). A szubjektív világos órák alatt csökkenő mintázatot mutatnak 12-21 óra között, legalacsonyabb érték 21 órakor, 12-15 óra között és 18 órakor volt mérhető ezekben a csoportokban. Az alacsony és magas értékek szignifikánsan különböztek egymástól. A DL csoportban két csúcs látható: 18 és 3 órakor (körülbelül a világos szakasz kezdetén és végén). A DL csoport kivételével a többiben ritmikus folyamatot találtunk.



9. ábra. A PACAP szintek és a napi ritmusok a telencephalonban.

Retina:

A négy csoport hasonló változásokat mutatott (10. ábra): 6 óra után az értékek csökkenni kezdtek, a legalacsonyabb érték 12-15 óra között volt mérhető. A szubjektív sötét periódus kezdetére az értékek az eredeti szintre emelkedtek, függetlenül a megvilágítási feltételektől. A különbség a legalacsonyabb és legmagasabb érték között szignifikáns volt mindegyik csoportban. Az *LD* csoportban magas értékek mutathatók ki 3, 6, 21 és 24 órákor, alacsony értékek 9, 12 és 15 órákor. Hasonló mintázat látható a *LL* csoportban, de az *LL* értékek mindig alacsonyabbak voltak, mint az *LD* értékek. A *DL* csoportban magas értékek mérhetők 6 és 24 órákor. A *DD* csoportban a legmagasabb értékek 3 és 6 órákor láthatók. Az *LD* és *LL* csoport átlagos (szubjektív sötét és világos) értékei között szignifikáns különbség van. A cosinor analízis mindegyik csoportban kimutatta a napi ritmust.



10. ábra. A PACAP szintek és a napi ritmusok a retinában.

Tectum, cerebellum, hypophysis, corpus pineale:

Ezekben az agyterületekben nem találtunk napi ritmikus változásokat egyik statisztikai teszttel sem. A tectumban és a kisagyban a PACAP koncentrációja 4-5,5 és 2-3,3 ng/mg fehérje között változott. A *DL* csoportban – bár nem szignifikáns – emelkedés tapasztalható a szubjektív világos órák alatt a tectumban és a szubjektív sötét órák alatt a kisagyban. A corpus pinealeban szignifikáns emelkedés volt látható, de csak a *DL*

csoportban a sötét órák alatt. A hypohysis esetén az LD és DD csoportban enyhe – nem szignifikáns – emelkedés mérhető a szubjektív sötét órák alatt.

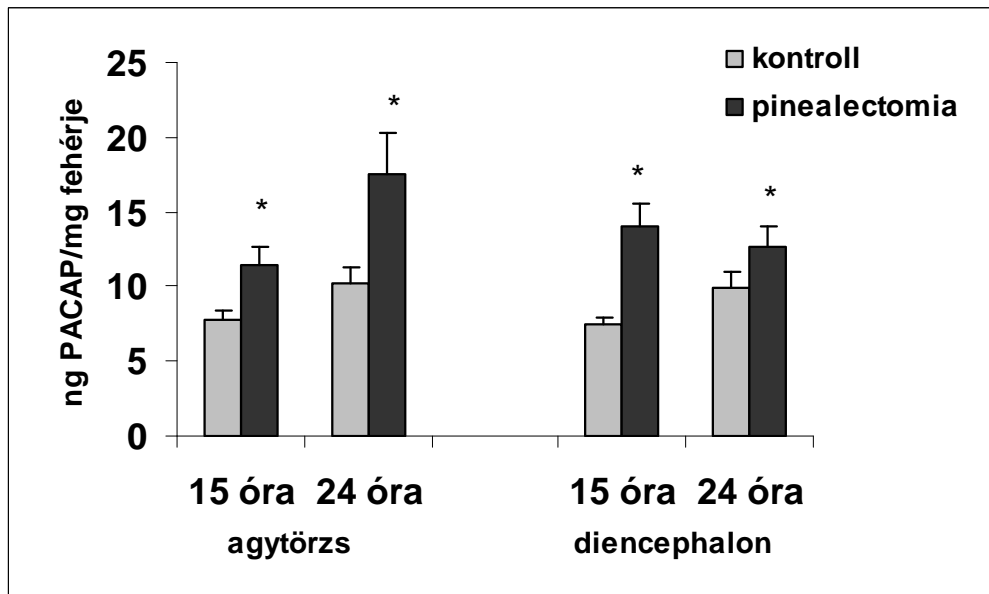
4.3. A PACAP-szintek változásának vizsgálata külső beavatkozások hatására: pinealectomia és éhezés

Pinealectomia:

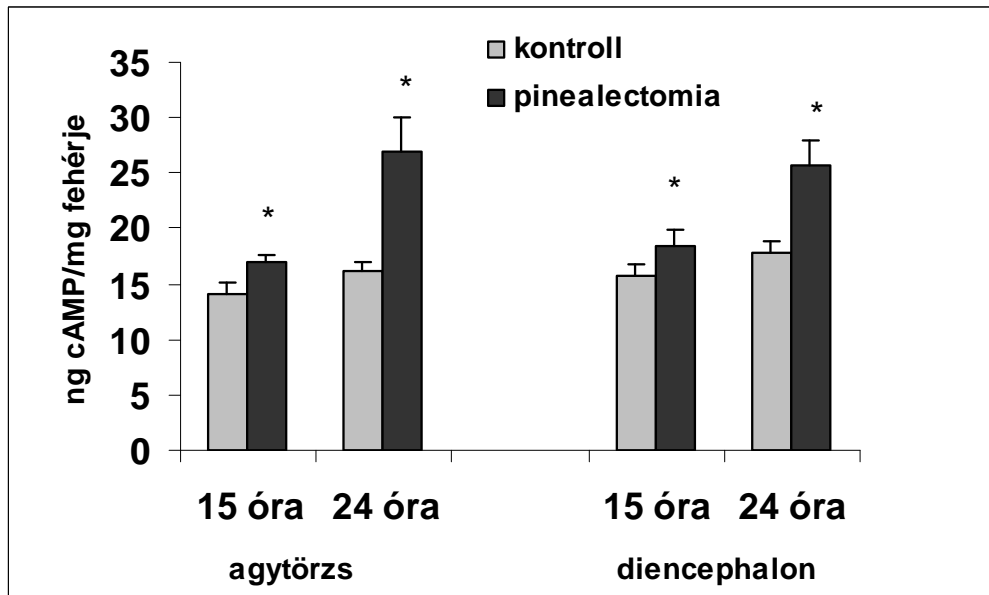
Előző vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a PACAP szintje szignifikáns napszaki eltérést mutat a csirke központi idegrendszerében és a retinában is. Ezen napi változásokat szabályozó mechanizmusok viszont nem teljesen ismertek. Jelen vizsgálatainkban azt tanulmányoztuk, hogy a pinealectomia milyen hatással van a PACAP és a cAMP nappali-éjszakai szintjére 14 óra világos és 10 óra sötét körülmények között tartott madarak különböző agyterületein. Előző tanulmányunkban magas PACAP szintet és napi eltérést tapasztaltunk az agytörzsben és a diencephalonban. Ezeken a területeken a PACAP-szint 15 és 18 óra között alacsony volt, de 21 és hajnali 3 óra között magasnak bizonyult. Jelen kísérletünkben egy lehetséges összefüggést találtunk a tobozmirigy és a PACAP különböző agyterületeken mért koncentrációja között. A PACAP szintjét különböző agyterületeken vizsgáltuk fiatal és prepubertás állatokban. A PACAP szintje szignifikánsan magasabb az agytörzsben és a diencephalonban pinealectomizált állatokban. Az agytörzsben 31 és 130 %-os emelkedést találtunk 15 és 24 órakor. A diencephalonban a PACAP szintek 89 és 27%-kal emelkedtek 15 és 24 órakor. Ezek az emelkedések minden csoportban statisztikailag szignifikánsak voltak.

A PACAP szintje egyformán növekedett az agytörzsben, és a diencephalonban (11. ábra). Az agytörzsben 68 és 41 %-os volt az emelkedés 15 és 24 órakor, és ez szignifikánsnak bizonyult. A diencephalonban a változás tendenciája hasonló volt: a PACAP szintjének emelkedése pinealectomia után 21 és 28 %-os volt 15 és 24 órakor. Összehasonlítva az álműtött állatokkal a 15. és 24. órás adatokat azt találtuk, hogy a nappali értékek szignifikánsan magasabbak voltak az éjszakai értékeknél a pinealectomizált és az álműtött állatoknál egyaránt, mindkét agyterületen. A telencephalonban a PACAP szintje szignifikánsan magasabb 15 órakor, de nem találtunk szignifikáns különbséget a pinealectomizált és az álműtött állatok között egyik időpontban sem.

A cAMP koncentrációja is magasabb volt 21 %-kal (15 óra), és 68 %-kal (24 óra) az agytörzsben, valamint 17 %-kal (15 óra) és 44 %-kal (24 óra) a diencephalonban (12. ábra). Összehasonlítva az adatokat az álműtöttekkel: 15 és 24 órakor: nem volt szignifikáns különbség a PACAP szintje és a cAMP szintje között sem az agytörzsben, sem a diencephalonban, egyik időpontban sem.



11. ábra. A pinealectomia hatása a PACAP koncentrációkra.



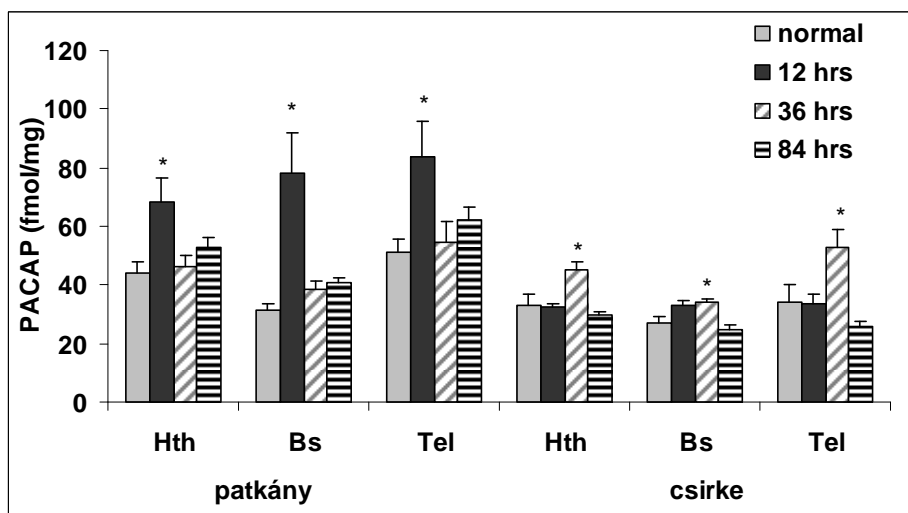
12. ábra. A pinealectomia hatása a cAMP koncentrációkra.

Éhezés:

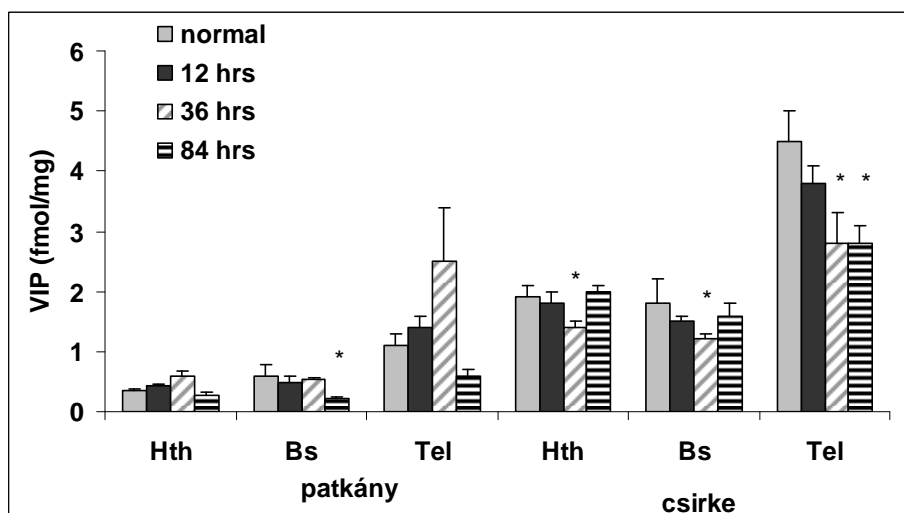
A PACAP szignifikáns emelkedése látható az éhezés kezdete után 36 órával a hypothalamusban, agytörzsben és a telencephalonban. A későbbi időpontokban az értékek visszatértek a kontroll csoport értékeihez. A grafikonokon a kísérletben résztvevő patkányok adatai is láthatók (13. ábra).

A VIP szintek csirkékben a következő változást mutattak: az értékek egyenletesen csökkentek mindhárom vizsgált agyterületen, de szignifikáns különbség a 36 órás időpontban látható. 84 óra múlva a koncentrációk – a telencephalon kivételével – a normál értékhez közelítettek (14. ábra.).

Az ábrán láthatók az összehasonlítás célját szolgáló patkányok adatai is. A PACAP szignifikánsan emelkedett az éhezés után, már a 12. órában a hypothalamusban, agytörzsben és a telencephalonban. Ezután az értékek visszatértek a normál kontroll állatok értékeihez (13. ábra). A VIP esetén a koncentrációk folyamatosan emelkedtek a hypothalamusban és a telencephalonban, majd az értékek csökkentek. Az agytörzsben azonban az éhezés utáni 84. órában mértünk magas koncentrációt (14. ábra).



13. ábra. PACAP koncentrációk a hypothalamusban (Hth), agytörzsben (Bs), telencephalonban (Tel) patkánynál és csirkénél az éhezés kezdete utáni különböző időpontokban. Átlag±SEM. * P<0,05.



14. ábra. VIP koncentrációk a hypothalamusban (Hth), agytörzsben (Bs), telencephalonban (Tel) patkánynál és csirkénél az éhezés kezdete utáni különböző időpontokban. Átlag \pm SEM. * P<0,05.

4.4. In ovo kezelés hatása a motoros és szociális viselkedésre

A 16. napon kezelt kontroll csoportban valamennyi csirke kikelt, míg a 8. napon kezelt csoportban két csirke elpusztult. Az antagonistával rendelkező PACAP6-38-cal kezelt tojások mindegyike sikeresen kikelt (E16-os csoport), azonban a 8. napon kezelt csoportban 15 elpusztult a kikelésig, öt csirke a kikelés alatt, további négy állat a kikelés utáni néhány napon belül pusztult el. Az átlagos testtömegük a hetedik napon (P7) $77,3 \pm 3,8$ g volt a kontroll csoportban, míg a PACAP6-38-cal kezelt csoportban $75,8 \pm 3,8$ g volt. A 14. napon (P14) a testtömegek $138,8 \pm 6,7$ g, illetve $132,5 \pm 8,8$ g volt, szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk.

Általános viselkedés:

Az állatokat saját ketrecükben teszteltük a 21. napig két alkalommal naponta: reggel és délután. Egy tesztelés 15 percig tartott. Az általános viselkedésre vonatkozó tulajdonságok átlagos értéket a 5. táblázat mutatja.

5. táblázat. Általános aktivitás a kikelés után 21 napig tartó megfigyelés alatt. Az adatokat az adott aktivitási jelet mutató állatok %-ában adtuk meg (\pm SEM), reggel, délután és összesítve.* $P < 0,05$ vs kontroll csoport (de = délelőtt, du = délután).

		állatok %-a \pm SEM				állatok %-a \pm SEM	
		kontroll	PACAP 6-38			kontroll	PACAP 6-38
Állás	De.	87,5 \pm 7,0	88,6 \pm 2,7	Tollász-kodás	De.	6,4 \pm 1,3	9,1 \pm 0,9
	Du.	91,2 \pm 3,4	86,6 \pm 2,0		Du.	7,4 \pm 0,9	10,2 \pm 1,7
	Össz.	89,6 \pm 3,5	87,5 \pm 1,6		Össz.	6,9 \pm 0,7	9,7 \pm 1,0*
Evés	De.	32,4 \pm 8,5	26,5 \pm 5,1	Csipkedés	De.	12,4 \pm 1,4	20,2 \pm 2,5*
	Du.	25,1 \pm 6,4	30,4 \pm 4,2		Du.	12,7 \pm 1,6	14,4 \pm 1,1
	Össz.	28,3 \pm 5,0	28,7 \pm 3,2		Össz.	12,6 \pm 1,1	16,9 \pm 1,4*
Ivás	De.	4,0 \pm 1,2	4,8 \pm 1,9	Tollcsipkedés	De.	5,7 \pm 1,2	6,7 \pm 1,1
	Du.	3,1 \pm 0,5	5,4 \pm 0,6*		Du.	5,1 \pm 1,1	4,8 \pm 1,3
	Össz.	3,5 \pm 0,5	5,2 \pm 0,9		Össz.	5,3 \pm 0,8	5,7 \pm 0,8
Futás	De.	9,7 \pm 1,6	16,2 \pm 1,6*	Összes csipkedés	De.	18,1 \pm 1,8	26,9 \pm 2,8*
	Du.	14,2 \pm 2,1	15,1 \pm 1,7		Du.	17,8 \pm 1,1	19,3 \pm 2,2
	Össz.	12,2 \pm 1,5	15,5 \pm 1,2		Össz.	17,9 \pm 0,9	22,9 \pm 1,9*

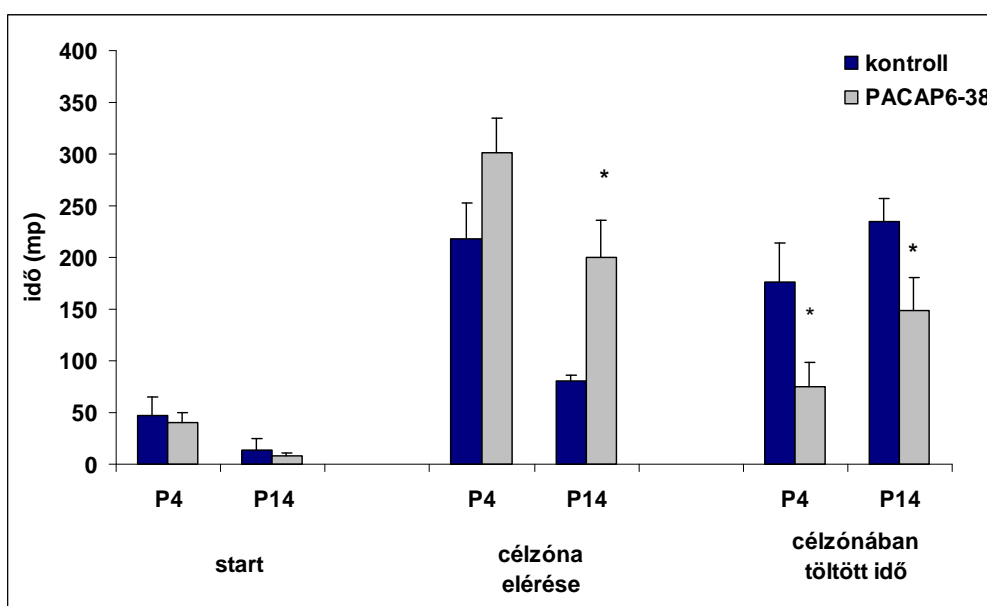
Az E8 napos korban kezelt állatok általános magatartása azt mutatta, hogy az antagonistával kezelt csoport a megszokott környezetben aktívabb volt, az állatok szignifikánsan többet futottak, tollászkodtak, csipkedtek. Az embrionális kor második felében kezelt állatoknál semmilyen különbséget nem figyeltünk meg.

Az E8 korban PACAP6-38-cal kezelt állatok a két napos korban végzett open-field tesztben is aktívabbak voltak, majd ez a különbség megszűnt két hetes korra (6. táblázat).

6. táblázat. Open-field teszt aktivitás két napos és két hetes korban a kikelés után. Átlag \pm SEM.* $P < 0,05$ vs kontroll csoport (mp = másodperc).

	Második nap		Második hét	
	kontroll	PACAP6-38	kontroll	PACAP6-38
Lépések száma	121,1 \pm 22,6	189,1 \pm 25,8*	127,1 \pm 13,7	120,7 \pm 13,5
Érintett zónák száma	43,5 \pm 8,5	63,4 \pm 7,9 *	58,8 \pm 6,9	60,7 \pm 5,8
Inaktivitási idő (mp)	203,6 \pm 17,7	167,9 \pm 15,7*	162,5 \pm 15,2	163,4 \pm 12,7
Fal mellett töltött idő (mp)	181,6 \pm 16,9	162,3 \pm 21,2	193,8 \pm 12,5	147,1 \pm 11,6*
Első lépés (mp)	23,1 \pm 11,7	20,9 \pm 9,7	6,5 \pm 2,4	5,0 \pm 1,9
Első vokalizáció (mp)	7,3 \pm 1,5	13,6 \pm 5,2	4,4 \pm 1,1	6,6 \pm 1,5
Futások száma	5,3 \pm 2,1	8,1 \pm 1,8	1,2 \pm 0,4	1,8 \pm 1,0
Ugrások száma	1,6 \pm 0,9	8,9 \pm 3,1 *	10,3 \pm 1,7	10,3 \pm 2,1
Fejmozgatások száma	12,1 \pm 1,4	9,7 \pm 2,0	17,9 \pm 2,3	20,5 \pm 3,0

A szociális magatartás vizsgálatánál lényegesen nagyobb változást tapasztaltuk. A startbox elhagyási idejében nem volt különbség, de a PACAP6-38-cal kezelt állatok 50%-a nem érte el a célzónát négy napos korban, szemben a kontroll csoportban mért 25%-kal. Tizennégy napos korban már a legtöbb állat elérte a célzónát, bár ez még mindig kisebb arány volt a PACAP6-38-cal kezelt csirkéknél. Az az idő, ami alatt elérték az állatok a célzónát, szignifikánsan magasabb volt a PACAP antagonistával kezelt csoportban. Ezenfelül a célzónában töltött idő lényegesen kevesebb volt, mint a kontroll állatoknál. Az E16 napos korban kezelt állatoknál már ilyen különbséget nem tapasztaltunk (15. ábra).



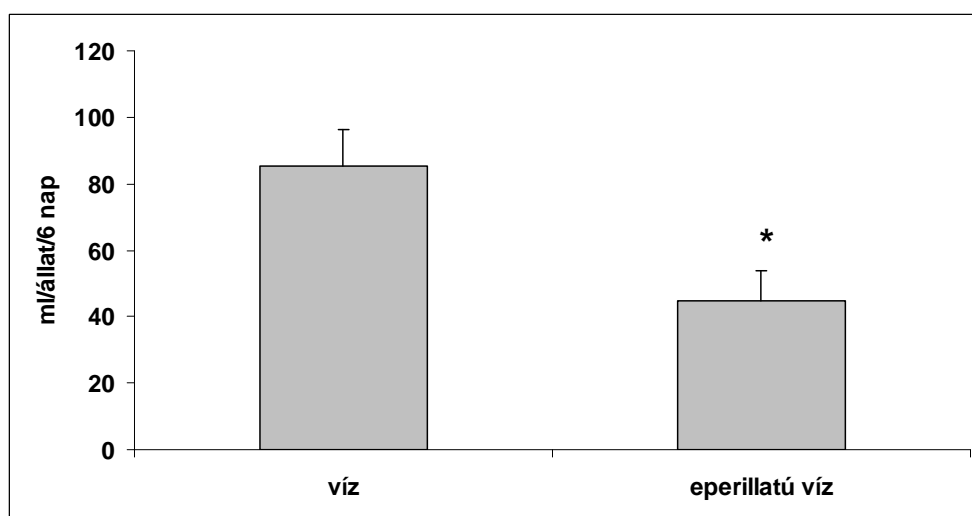
15. ábra. Runway teszt négy és tizennégy napos korban (P4, P14) az E8 kontroll és PACAP6-38-cal kezelt csoportokban. Az ábra a startbox elhagyási idejét, a célzóna elérését és a célzónában töltött időt mutatja. Átlag±SEM.*P<0,05 vs kontroll csoport.

4.5. PACAP szerepe a szaglási memória kialakulásában

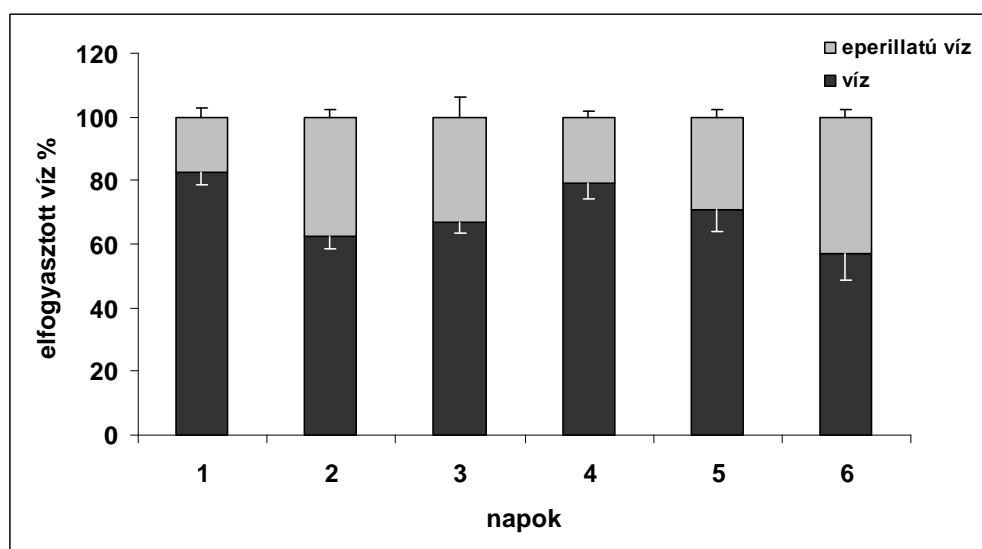
A memória kialakulásának mechanizmusa az egyedfejlődés során régóta vita tárgya. Az embrionális memória létezését már számos állatkísérleten alapuló tanulmány megállapította, pl. rovarokban [*Caubet és mtsa 1992*], békákban [*Hepper 1992*], és emlősökben, beleértve az emberi magzatot [*Hepper 1995, 1996*] is. Patkányokon végzett kísérletek kimutatták, hogy az embrionális életben alkalmazott szagexpoziációt követően neonatalis korban az adott stimulust preferálják az állatok [*Smotherman és Robinson 1985, Hepper 1996*].

Csirkékben is vannak adatok kemoszenzoros és akusztikus tanulásra [*Lickliter és Stoumbos 1992*]. Kimutatták, hogy a csirkeembriókat kiteve bizonyos szagexpoziciónak, az állatok nem mutatnak averzív viselkedést ezen szagok iránt a kikelés után. Egyik tanulmány szerint az eperillattal kezelt csirkeembrió az eperillatú folyadékából többet ivott kikelés után, mint azok a csirkék, ahol nem volt kezelés az embrionális fejlődés alatt [*Sneddon és mtsa 1998*].

A normál kontroll állatok – melyeket nem kezeltünk az embrionális fejlődés alatt – az epres vízből szignifikánsan kevesebbet ittak (kb. 50 %-kal), mint a tiszta vízből (16. ábra). Napokra lebontva az eredményeket azonban azt látjuk, hogy szignifikáns különbség van a kétféle víz fogyasztása között (17. ábra).

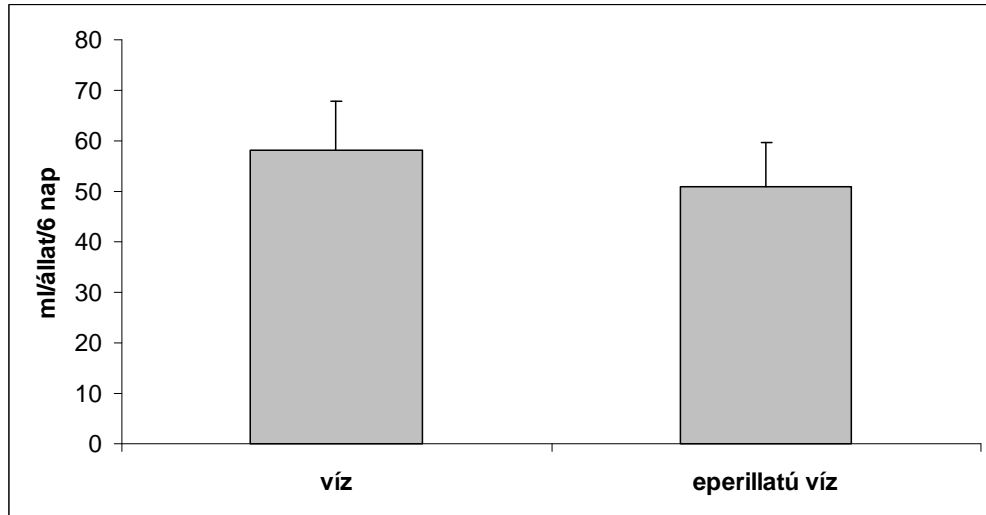


16. ábra. A normál állatok folyadékfogyasztása.

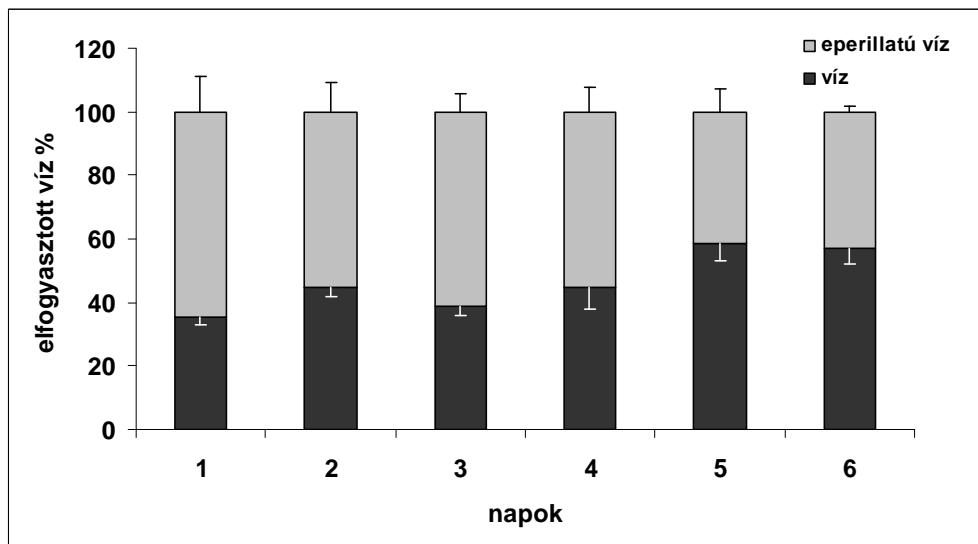


17. ábra. A víz és az eperillatú víz fogyasztásának százaléka a vizsgált hat napon keresztül a kezeletlen, normál állatoknál.

A két különböző víz fogyasztása között nem volt szignifikáns különbség azoknál az állatoknál, melyeket in ovo eperrel kezeltünk, szemben a normál kontroll állatokkal (18. ábra). A kikelés utáni egy-két napban az eperillatú vízből többet fogyasztottak mint a normál vízből (19. ábra).

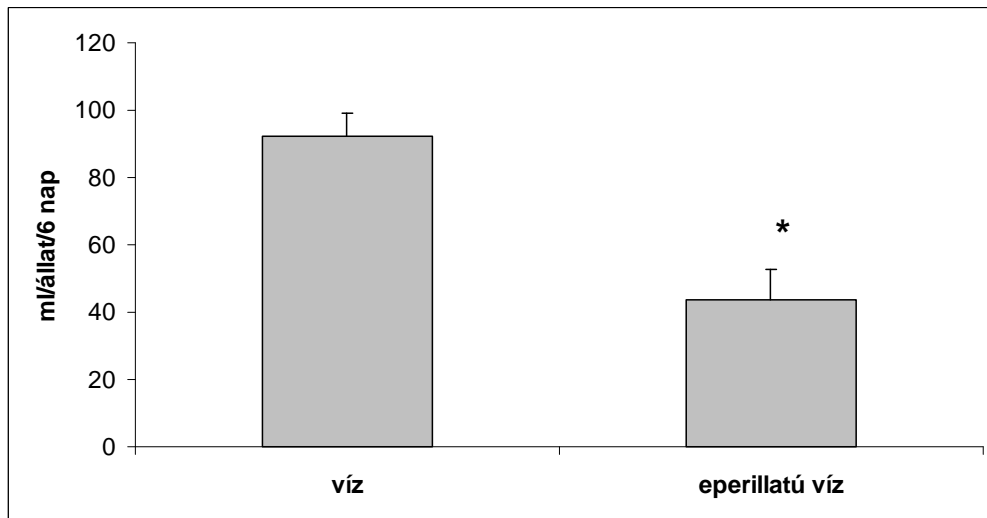


18. ábra. Az eperaromával kezelt, kontroll állatok folyadékfogyasztása.

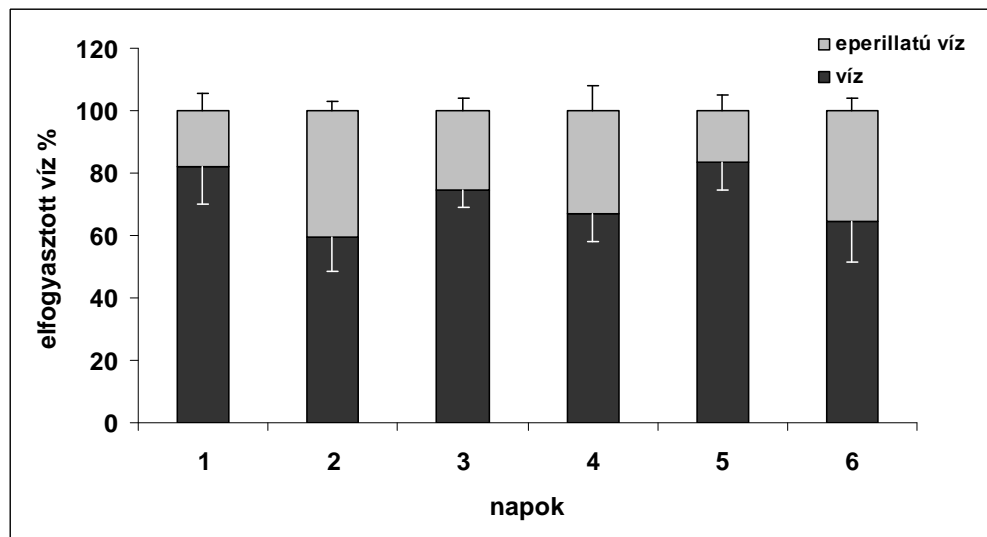


19. ábra. A víz és az eperillatú víz fogyasztásának százaléka a vizsgált hat napon keresztül az in ovo eperaromával kezelt állatoknál.

A PACAP6-38-cal kezelt csirkék szignifikánsan kevesebbet ittak az epres vízből, mint a tiszta vízből, hasonlóan azokhoz a normál kontroll csirkékhez, melyek nem kaptak eperkezelést az embrionális fejlődés alatt. Az eperillatú vízből több mint 50 %-kal kevesebbet fogyasztottak, mint a tiszta vízből (20. ábra). A vizsgált hat nap alatt szignifikáns különbséget találtunk a vízfogyasztások között (21. ábra).



20. ábra. Az eperaromával- és PACAP6-38-kezelt állatok folyadékfogyasztása.



21. ábra. A víz és az eperillatú víz fogyasztásának százaléka a vizsgált hat napon keresztül az in ovo eperaromával és PACAP6-38-cal kezelt állatoknál.

5. Megbeszélés

5.1. PACAP és a VIP megoszlása csirkeagyban embrionális és felnőtt korban

A madarakban előforduló PACAP egy aminosavban tér el az emlős PACAP-tól [Arimura et mtsai 1198, Nowak et mtsai 2003]. A PACAP és receptorainak előfordulása és megoszlása, valamint ezek genetikai háttere és a jelátviteli folyamatok mechanizmusa jól ismert [Nowak et mtsai 2003 és 2005, Zawliska et mtsai 2003]. Azonban keveset tudunk a PACAP előfordulásáról és feladatáról a csirkeagyban. In vitro a PACAP kimutatható három-öt napos csirkeembriók neuroblast sejteiben [Erhardt et mtsai 2001], míg négy-öt napos embriókban a bélcső idegelemeiben is megtalálható [Salvi et mtsai 2000]. Ismert, hogy a PACAP elég korán expresszálódik egyéb állatfajokban, így fontos szerepe lehet az idegrendszer fejlődésében, ezt számos in vitro és in vivo tanulmány bizonyítja [Washek és mtsai 2002, Somogyvári-Vigh és mtsai 2004]. A különböző életkorban elvégzett vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az embrionális és posztembrionális szakaszokban szignifikáns különbség látható a PACAP-szintek között.

A PACAP-hoz szerkezetileg közel álló VIP négy aminosavban különbözik az emósokétól. A VIP-tartalmú neuronok megoszlása és génexpressziója csirkében szintén ismert [Kuenzel és mtsai 1997]. Hypophysis sejtekben a 15. embrionális korban már megtalálható. Hasonlóan a PACAP-hoz, a VIP embrionális megoszlásáról sincsenek irodalmi adatok madarakban.

A RIA mérések eredménye szerint az embrionális fejlődés második szakaszában mind a PACAP, mind a VIP magas koncentrációban kimutatható. A PACAP-szintek szignifikánsan magasabb értékeket mutattak, mint a VIP-szintek minden vizsgált agyterületen. Legmagasabb PACAP-szintet az agytörzsben mértünk, ezt követte a hypothalamus és a kisagy, legkisebb koncentráció a telencephalonban volt mérhető. Mindkét peptidszint később csökkenő koncentrációt mutatott. A VIP-értékek alacsonyabb szintje arra enged következtetni, hogy a PACAP-nak dominánsabb hatása van a szabályozó mechanizmusokban az embrionális életkor második felében. Az, hogy a PACAP-nak magas, míg a VIP-nek alacsonyabb koncentrációja mutatható ki ebben a

fejlődési időszakban valószínűsíti, hogy mindkét peptidnek fontos életkor- és régióspecifikus szerepe van.

5.2. A PACAP napi ritmusa

Eredményeink szerint a legmagasabb PACAP-szintet a diencephalonban és az agytörzsben találtuk, majd ezeket követte az agykéregben, tectumban és kisagyban mért PACAP-koncentrációk. A legalacsonyabb értékek a hypophysisben, corpus pinealeban és a retinában voltak mérhetőek. Irodalmi adatokból ismert, hogy a PACAP stimulálja a cAMP kialakulását a csirkeagy különböző területein. A legerősebb ilyen stimulációt a hypothalamusban mutatták ki, kisebb mértékben pedig az agykéreg területén és az optikus rendszer bizonyos részein (lobus opticus, retina) [Nowak és mtsai 2002]. A vizsgálatainkban kimutatott PACAP-megoszlás megegyezett a PACAP-stimulálta cAMP területi megoszlásával. Adataink egyezést mutatnak olyan irodalmi adatokkal is [Peters és mtsai 1998, 2000], amelyek a PACAP és PAC1 mRNS magas expresszióját mutatták ki a telencephalonban, a hypothalamus, thalamus, agytörzs magjaiban, valamint a tectumban és a kisagyban.

A PACAP-szintek napi változása hasonló a diencephalonban és az agytörzsben. Az LD, DD és LL csoportoknál a PACAP emelkedett a sötét periódus alatt. Az LD csoport adatai nagyfokú egyezést mutatnak patkány agytörzsben mért adatokkal, ahol a PACAP, VIP és számos más hormon magas koncentrációban mutatható ki az éjszakai órák alatt. A fordított megvilágításban tartott csoport (DL) PACAP-értékei nem követték a másik három csoportnál tapasztalt ritmust.

A PACAP napi változásai a telencephalonban az LD, DD és LL csoportnál figyelhetőek meg, ellentétben a patkánynál, ahol nincs változás a PACAP és PAC1 receptor mRNS szintekben.

A PACAP és a cAMP szintje emelkedett pinealectomiát követően, mely arra utal, hogy a tobozmirigynek (ill. a melatoninnak) jelentős szabályozó szerepe lehet a PACAP-neuronrendszer napi működésében. A PACAP cirkadián ritmusának kialakításában a corpus pineale (ill. a melatonin) moduláló szerepet játszik ugyan, de nem ez az elsődleges szabályozója. Erre utal az is, hogy a sötét periódusban jóval magasabb értékeket találtunk. A PACAP szintje szignifikánsan magasabb volt a világos periódusban dekapitált

pinealectomizált állatokban a diencephalonban és az agytörzsben, mint az álműtött kontroll állatokban. A sötét periódusban az emelkedés nagyobb mértékűnek bizonyult, elsősorban az agytörzsben. A PACAP szint napi változása az agytörzsben és a diencephalonban különbséget mutatott fiatal és idősebb csirkékben.

5.3. A PACAP-szintek változásának vizsgálata külső beavatkozások hatására: pinealectomia és éhezés

Kísérleteinkben sikerült kimutatnunk, hogy pinealectomia után a PACAP- és cAMP-szintek emelkedtek az agytörzsben és a diencephalonban. Az adatokból arra következtetünk, hogy a corpus pinealnak egyfajta gátló hatása lehet a PACAP által szabályozott hatásokra. Az általunk kapott adatok egyeznek más tanulmányok adataival, miszerint a corpus pineale és hormonja, a melatonin gátolja a PACAP és vele rokon fehérjék hatásait [Vanecek és mtsai 1998, Watanabe és mtsai 1998, Novak és mtsai 2001]. Ugyanez a gátló hatás elmondható a VIP-ről is, mely a legszorosabb szerkezeti rokonságban van a PACAP-pal. A melatonin gátolja a VIP-szintézist és a VIP-indukálta vasopressin szintézist is [Novak és mtsai 2001, Vanecek és mtsai 1998, Watanabe és mtsai 1998]. Hasonlóan, a melatonin gátolja a PACAP-indukálta cAMP szintézist csirke hypothalamusban [Nowak és mtsai 1999]. A cAMP foszforilációjához szükséges transzkripció faktorra (CREB-re) kifejtett PACAP hatást is csökkenti a melatonin [Kopp és mtsai 1999, Slanar és mtsai 2000, Von Gall és mtsai 1998 és 2000]. Ezen tanulmányok és eredmények szerint a hypothalamus lehet az egyik fontos “összekötő kapocs” a PACAP és a melatonin között [Vaudry és mtsai 2000].

Eredményeink igazolják, hogy a corpus pineale gátolja a PACAP és a cAMP kialakulását a diencephalonban és az agytörzsben, és a gátlás hiánya a PACAP- és cAMP-szintek emelkedését okozta egy héttel a pinealectomia után.

A három hetes korú kontroll állatokban mért PACAP- és cAMP-szintek szignifikánsan magasabb értéket mutattak éjszaka mint a nappali órákban a diencephalonban és az agytörzsben. Pinealectomia után csak az agytörzsben találtunk emelkedett PACAP-szinteket az éjszakai órákban, a diencephalonban nem. Az agytörzsben a pinealectomizált állatokban a PACAP-szint drámai emelkedését

tapasztaltuk a 15 órai időpontban, de további emelkedést nem észleltünk. Ezzel ellentétben a pinealectomizált állatokban a cAMP nappali órákban kimutatható emelkedése még a 24. órában is szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll állatokban. Az adatok szerint a corpus pineale felelős a diencephalon PACAP-szintjének szabályozásáért, és indirekt módon azokért a szabályozó mechanizmusokért, melyek eredménye az éjszakai cAMP emelkedése a diencephalonban pinealectomia után. Azonban valószínűsíthető, hogy a corpus pineale nem az elsődleges szabályozó faktor az agytörzsi PACAP-szintek napi ritmikus változásában. A pinealectomia befolyásolja bizonyos hormonok napi ritmusát, míg más hormok szintjét nem érinti [Scanes és mtsai 1980, Cassone és mtsai 1983, Sharp és mtsai 1984, Siuciak és mtsai 1993]. Ezen korábbi tanulmányok szerint csirkében a corpus pineale az elsődleges pacemakere a hormonok és neuropeptidok napi ritmikus változásainak. A jelenlegi adatok arra mutatnak rá, hogy csak bizonyos élettani modalitásokért felelős a corpus pineale és a melatonin.

Az éhezéssel kapcsolatos tanulmányok eredményei szerint a vizsgált agyterületeken a PACAP- és VIP-szintek alakulása azt mutatja, hogy a PACAP-szintek emelkedtek a táplálékmegegyezés utáni 24. órától. Ugyanakkor a VIP-szintek megoszlása összetett mintázatot mutattak: patkányok esetén a hypothalamusban, telencephalonban emelkedtek, és az agytörzsben csökkentek. Csirkékben szignifikánsan csökkentek a VIP-szintek minden agyterületen 36 órával a éhezés kezdete után.

Ismert tény, hogy számos neuropeptid (cholecytokinin [CCK], neuropeptid Y [NPY]) összehangolt szabályozó tevékenysége szükséges a táplálékfelvétel és táplálkozási magatartási folyamatokhoz. Sok adat azt sugallja, hogy mind a PACAP, mind a VIP ezekben a mechanizmusokban jelen van emlősökben, madarakban és halakban egyaránt [Morley és mtsai 1992; Chance és mtsai 1995, Tachibana és mtsai 2003, Lugo és mtsai 2010; Resch és mtsai 2011]. Csirkében mindkét peptid intracerebroventricularis adása után gátolta a táplálkozást [Tachibana és mtsai 2003, 2004].

A PACAP és VIP hatásainak pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert, de eredményeink további bizonyítékot szolgáltatnak, hogy mindkét peptidnek hatása van ezen szabályozó folyamatokban, és a peptidok szintje befolyásolja a táplálkozási állapotot.

5.4. In ovo kezelés hatása a motoros és szociális viselkedésre

A legújabb kutatási eredmények megerősítik, hogy a PACAP fontos szerepet játszik a lokomotoros aktivitás, szociális viselkedés és a memória-tanulás folyamatainak szabályozásában [Hattori és mtsai 2012]. PACAP knockout egerekben pszichomotoros abnormalitásokat és memóriazavarokat figyeltek meg [Ago és mtsai 2013]. Más tanulmányok azt valószínűsítik, hogy a PACAP-nak a memória és tanulási folyamatokban kifejtett szerepe nem csak a gerincesekben, hanem gerinctelen állatokban is fontos: a cAMP-függő jelátviteli utak jelentősége a hosszú távú memória kialakulásában már csigákban is ismert [Pirger és mtsai 2010]. Idősebb patkányokban, különösen az agykéregben, amygdalában és a hippocampusban a PAC1-receptor és VIP-receptor csökkent immunreaktivitása figyelhető meg [Joo és mtsai 2005].

Egyszeri PACAP6-38 adása az embrionális élet első felében átmeneti változásokat okozott az általános és a motoros viselkedésben összehasonlítva a kontroll állatok viselkedésével. A viselkedésbeli változások többsége a kikelés utáni 14. napon megszűnt. Az embrionális élet második felében adott kezelés nem okozott változásokat a viselkedési mintázatokban. Az embrionális 8. napon (E8) kezelt állatok különböző agyterületein végzett vizsgálatokban a PACAP-szintek csökkentek, de nem volt különbség a PACAP-szinteknél a kontroll és PACAP6-38 kezelt állatok között.

Az E8 napon PACAP6-38-cal kezelt állatok között nagy volt a mortalitás. A többség már a tojásban elpusztult, mások elkezdték a kikelést, de a kikelés alatt pusztultak el. Több állat az első néhány napban pusztult el. Egereken végzett hasonló vizsgálatokban hasonlóan magas mortalitásról számoltak be [Gray és mtsai 2001, Hashimoto és mtsai 2001, Cummings és mtsai 2004]. A magas mortalitás pontos okai nem ismertek: a szomatikus fejlődésben nem voltak különbségek a kikelt csirkék között. PACAP génhíányos egerek tanulmányozásából nyert adatok alapján a PACAP szerepet játszik az agytörzsi légzőközpont szabályozásában, melynek elégtelen fejlettsége magyarázhatja részben a magasabb mortalitást [Cummings és mtsai 2004] Az, hogy vajon ez csirkében is ezen mechanizmus alapján történik, további vizsgálatokat igényel.

Az állatok általános viselkedésének napi vizsgálata kimutatta, hogy a PACAP6-38 kezelt állatok sokkal aktívabbak voltak minden vizsgált viselkedésformában a saját familiáris kertecükben. Szignifikáns különbség volt a futásban, csipkedésben és

tollászkodásban. Ezek az adatok korrelálnak a PACAP vagy PAC1 receptor knockout egerekben nyert adatokkal [Hashimoto és mtsai 2001, Otto és mtsai 2001]. Az aktivitásbeli különbség a második hétre eltűnt, és a két hetes állatok kevésbé voltak szorongóbbak, amit jól mutat az, hogy kevesebb időt töltöttek a fal közelében az open-field dobozban, valamint többször tettek kísérletet a menekülésre (ugrások száma és a tollcsapokásaok száma fokozódott). A locomotoros viselkedésváltozások átmeneti jellege az érzékeny embrionális periódusban adott egyszeri injekciónak köszönhető.

A PACAP6-38 hatása sokkal feltűnőbb volt a szociális viselkedésre mint a motoros viselkedésre. Az embrionális fejlődés első felében kezelt csirkék lassabban közelítették meg a „célzónát” (goalzone-t) és szignifikánsan kevesebb időt töltöttek társaik közelében. Ez a fajta viselkedés a 14. napon volt legjobban látható, ellentétben más viselkedésmintázatokkal, amik erre az időre már eltűntek. A kezelt csirkék később érték el a goalzone-t mint a kontroll állatok, ami azért érdekes, mert ezek a kezelt állatok többet mozogtak az open-field tesztekben. Eszerint tehát nem a motoros zavar volt a szociális magatartásbeli eltérés oka.

A PACAP hatása a szociális viselkedés fejlődésére csak részben ismert. Egerekben, ahol gátolták a VIP-et az embrionális fejlődés alatt, hosszú időre megbomlott a szociális viselkedés [Hill és mtsai 2003]. A VIP-ről ismert, hogy a szociális viselkedés számos formájára hatással van madarakban, pl. a hangokra, éneklésre, amik jól asszociálnak a szociális viselkedéssel [Goodson és mtsai 1998].

Eredményeink kimutatták, hogy a PACAP-tartalom szignifikánsan csökkent a fejlődés alatt minden vizsgált agyterületen. Ezek az adatok megegyeznek a patkány cerebellumban mért adatokkal, ahol postnatalisan csökkent a PACAP [Nielsen és mtsai 1998, Basille és mtsai 1994]. Ezek az adatok aláhúzzák a PACAP jelentőségét a viselkedési mintázatok fejlődésében. A PACAP6-38 kezelés nincs hatással a PACAP-tartalomra, nem volt szignifikáns különbség egyik időpontban sem. Egyszeri PACAP6-38 injekció az érzékeny periódus alatt csekély, jelentéktelen viselkedésbeli változásokat okozott. Azonban, mint az a PACAP knockout egerek tanulmányozásából jól ismert, a PACAP hiánya más károsító tényezőkkel együtt már komoly változásokat tud okozni különböző stresszhelyzetekben [Gaszner és mtsai 2012; Reglödi és mtsai 2012a,b].

5.5. PACAP szerepe a szaglási memória kialakulásában

Ebben a kísérletsorozatban a PACAP6-38 egyszeri injekciójának hatását vizsgáltuk a szaglási memória kialakulására. Az in ovo eperaromával kezelt állatok a kikelés után nem válogattak az ízes és ízetlen vízből, ellentétben a kontroll állatokkal. Azok az állatok, melyeket in ovo eperaromával valamint PACAP6-38-cal is kezeltünk, a tiszta vizet preferálták, hasonlóan a kontroll állatokhoz.

Az első tanulmányok a kemosensoros tanulásról csirkeembriókban arról számolnak be, hogy az eperaromának kitett csirkeembriók a kikelés után többet ittak az eperízített vízből, és több időt töltöttek az eperillatú területen mint azok a csirkék, amelyeket nem kezelték [Sneddeon és mtsai 1998]. Saját kísérleteink jól korrelálnak a korábbi tanulmányokkal. Továbbá az eperaromával és a PACAP antagonistával kezelt csirkék a tiszta, nem ízesített vízből ittak többet, hasonlóan az eperaromával nem kezelt kontroll állatokhoz. Az eredmények szerint a PACAP-nak szerepe van a szaglási memória kialakulásában.

Az PACAP előző hatásaihoz hasonlóan a PACAP ezen mechanizmusa sem teljesen ismert, viszont nagyon jól ismert a PACAP és receptorainak előfordulása és megoszlása. Knockout egerekben, ahol hiányzik a PACAP vagy a PAC1 receptor, a tanulási mechanizmusok illetve az ezzel kapcsolatos tanulási faktorok működése hiányosak voltak. [Hashimoto és mtsai 2002, Matsuyama és mtsai 2003]. A VIP, hasonlóan a PACAP-hoz, kimutatható a memória folyamatokért felelős struktúrákban [Gozes és mtsai 1996, 1997, 1998]. Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a PACAP-nak hatása van az idegrendszer fejlődésében, és az embrionális memória kialakulásában.

6. Irodalomjegyzék

Ago Y., Hiramatsu N., Ishihama T., Hazama K., Hayata-Takano A., Shibasaki Y., Shintani N., Hashimoto H., Kawasaki T., Onoe H., Chaki S., Nakazato A., Baba A., Takuma K., Matsuda T.: The selective metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist MGS0028 reverses psychomotor abnormalities and recognition memory deficits in mice lacking the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Behav. Pharmacol.* 2013; 24(1):74-7.

Alexandre A., Anouar Y., Jegou S., Fournier A., Vaudry H.: A cloned frog VIP/PACAP receptor exhibits pharmacological and tissue distribution characteristics of both VPAC1 and VPAC2 receptors in mammals. *Endocrinology* 1999; 140:1285-93.

Apa R., Lanzone A., Miceli F., Vaccari S., Macchione E., Stefanini M., Canipari R.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide modulates plasminogen activator expression in rat granulosa cells. *Biol. Reprod.* 2002; 66:830-835.

Arimura A., Somogyvári-Vigh A., Miyata A., Mizuno K., Coy DH., Kitada C.: Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 1991; 129:2787-2789.

Arimura A., Somogyvári-Vigh A., Weill C., Fiore RC., Tatsuno I., Bay V., Brenneman DE.: PACAP functions as a neurotrophic factor. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1994; 739:228-243.

Arimura A.: Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn. J. Physiol.* 1998; 48:301-331.

Arimura A.: Perspectives on the development of a neuroprotective drug based on PACAP. *Regul. Pept.* 2003; 115:40.

Arimura A., Li M., Batuman V.: Potential protective action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP38) on in vitro and in vivo models of myeloma kidney injury. *Blood* 2006; 107:661-668.

Arimura A.: PACAP: the road to discovery. *Peptides* 2007; 28:1617-1619.

Aubert N., Basille M., Falluel-Morel A., Vaudry D., Bucharles C., Jolivel V., Fisch C., De Jouffrey S., Le Bigot JF., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez BJ.: Molecular, cellular, and functional characterizations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors in the cerebellum of New and Old World monkeys. *J Comp Neurol.* 2007; 504(4):427-39.

Barberi M., Muciaccia B., Morelli MB., Stefanini M., Cecconi S., Canipari R.: Expression localization and functional activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, vasoactive intestinal polypeptide and their receptors in mouse ovary. *Reproduction* 2007; 134:281-292.

Basille M., Gonzalez BJ., Fournier A., Vaudry H.: Ontogeny of PACAP receptors in the rat cerebellum: a quantitative autoradiographic study. *Dev. Brain Res.* 1994; 82:81-9.

Bourgault S., Vaudry D., Botia B., Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 2008a; 29:919-932.

Bourgault S., Vaudry D., Guilhaudis L., Raoult E., Couvineau A., Laburthe M., Ségalas-Milazzo I., Vaudry H., Fournier A.: Biological and structural analysis of truncated analogs of PACAP27. *J. Mol. Neurosci.* 2008b; 36:260-269.

Bronson ME., Jiang W., Clark CR., DeRuiter J.: Effects of desinger drugs on the chicken embryo and 1-day-old chicken. *Brain Res. Bull.* 1994; 34:143-50.

Buchan AMJ., Polak JM., Bryant MG., Blomm SR., Pearse AGE.: VIP-like immunoreactivity in anuran intestine. *Cell Tissue Res.* 1981; 216:413-422.

Cassone VM., Lane RF., Menaker M.: Daily rhythms of serotonin metabolism in the medial hypothalamus of the chicken: effects of pinealectomy and exogenous melatonin. *Brain Res.* 1983;289: 129-34.

Caubet Y., Jaisson P., Lenior A.. Preimaginal induction of adult behavior in insects. *Q. J. Exp. Psychol.* 1992; 44B:165-178.

Chance WT. et al.: Anorectic and neurochemical effects of PACAP in rats. *Peptides* 1995;16: 1511-16.

Chartel N., Wang Y., Fournier A., Vaudry H., Colon J.M.: Frog VIP and galanin: primary structures and effects on pituitary adenylate cyclase. *Endocrinol.* 1995; 136:3079-86.

Chiodera P., Volpi R., Capretti L., Coiro V.: Effects of intravenously infused pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on arginine vasopressin and oxytocin secretion in man. *Neuroreport* 1995; 6:1490-1492.

Ciranna L., Cavallaro S.: Opposing effects by PACAP and VIP on hippocampal synaptic transmission. *Exp. Neurol.* 2003; 184:778-84.

Counis R., Laverrière JN., Garrel-Lazayres G., Cohen-Tannoudji J., Larivière S., Bleux C., Magre S.: What is the role of PACAP in gonadotrope function? *Peptides* 2007; 28:1797-1804.

Cummings KJ., Pendlebury JD., Sherwood NM. et al.: Sudden neonatal death in PACAP-deficient mice is associated with reduced respiratory chemoresponse and susceptibility to apnea. *J. Physiol.* 2004; 555:15-26.

Csaba Zs., Csernus V., Gerendai I.: Local effect of PACAP and VIP on testicular function in immature and adult rats. *Peptides* 1997; 18:1561-1567.

Csernus V., Schally AV.: The dispersed cell superfusion system. In: Greestain, B.D. (Ed.), *Neuroendocrine Research Methods*. Harwood Academic Publishers, London, 1991. pp. 71-109.

D'Agata V., Cavallaro S., Stivala F., Canonico PL.: Tissue-specific and developmental expression of PACAP receptors in rat brain. *Eur. J. neurosci.* 1996; 8:310-8.

DeZazzo J., Xia S., Christensen J., Velinzon K., Tully T.: Developmental expression of an amn transgene rescues the mutant memory defect of amnesiac adults. *J. Neurosci.* 1999; 19:8740-6.

Dickson L., Finlayson K.: VPAC and PAC receptors: from ligands to functions. *Pharmacol. Ther.* 2009; 121:294-316.

Doan ND., Chatenet D., Létourneau M., Vaudry H., Vaudry D., Fournier A.: Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1823(4):940-9.

Du F., Chayvialle AW., Dubois P.: Distribution and development of VIP immunoreactive neurons in the spinal cord of the embryonic and newly hatched chick. *J. Comp. Neurol.* 1998; 298:600-314.

Ganea D., Delgado M.: Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002; 13:229-237.

Epstein ML., Hudis J., Dahl JL.: the development of peptidergic neurons in the foregut of the chick. *J. Neurosci.* 1983; 3:2431-2447.

Erhardt NM. et al: Early expression of PACAP and activation of its receptor in chick neuroblast. *Endocrinology* 2001; 142:1616-1625.

Evans JJ.: Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endocr. Rev.* 1999; 20:46-67.

El-Gehani F., Tena-Sempere M., Huhtaniemi I.: Evidence that pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent regulator of fetal rat testicular steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 2000; 63:1482-1489.

Feany MB., Quinn WG.: A neuropeptide gene defined by the *Drosophila* memory mutant amnesiac. *Science* 1995; 268:869-73.

Gaszner B., Kormos V., Kozicz T., Hashimoto H., Reglodi D., Helyes Zs.: 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; 202: 283-299.

Goodson JL.: Territorial aggression and dawn song modulated by septal vasotocin and VIP in male field sparrows. *Horm. Behav.* 1998; 34:67-77.

Gozes I., Bardea A et al.: Neuroprotection strategy for Alzheimer disease: intranasal administration of a fatty neuropeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 96:427-32.

Gozes I., Bardea A et al.: Protection against developmental retardation in apolipoprotein E-deficient mice by a fatty neuropeptide: implications for early treatment of Alzheimer disease. *J. Neurobiol.* 1997; 33:329-42.

Gozes I., Bardea A et al.: Protection against developmental deficiencies by a lipophilic VIP analogue. *Neurochem. Res.* 1998; 23:689-93.

Gras S., Host E., Fahrenkrug J.: Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the cyclic recruitment of immature follicles in the rat ovary. *Regul. Pept.* 2005; 128:69-74.

Gray SL., Cumming KJ., Jirik FR., Sherwood NM.: Targeted disruption of PACAP gene results in early postnatal death associated with dysfunction of lipid and carbohydrate metabolism. *Mol. Endocrinol.* 2001; 15:1739-47.

Grill HJ., Kaplan JM.: The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front. Neuroendocrinol.* 2002; 23:2-40.

Hashimoto H., Nogi H., Mori K., Ohishi H., Shigemoto R., Yamamoto K., Matsuda T., Mizuno N., Nagata S., Baba A.: Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 1996; 371:567-577.

Hashimoto H., Shintani N., Tanaka K., et al.: Altered psychomotor behaviors in mice lacking PACAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98:13355-60.

Hashimoto H., Shintani N., Baba A.: Higher brain functions of PACAP and homologous *Drosophila* memory gene amnesiac: insights from knockouts and mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 297:427-32.

Hattori S., Takao K., Tanda K., Toyama K., Shintani N., Baba A., Hashimoto H., Miyakawa T.: Comprehensive behavioral analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice. *Front. Behav. Neurosci.* 2012; 6:58.

Hepper PG.: Embryonic olfactory learning in frogs. *Q. J. Exp. Psychol.* 1992; 44B:179-197.

Hepper PG.: Human olfactory learning. *Int. J. Prenat. Perinat. Psychol. Med.* 1995; 7:147-151.

Hepper PG.: Fetal memory: does it exist? What does it do? *Acta Paediatr. Suppl.* 1996; 416:16-20.

Hill JM., Powell LR., Flores SY. et al.: Neonatal and adult mouse social behaviors disrupted by blockage of VIP during embryogenesis. *Regul. Pept.* 2003; 115:47.

Hocking PM., Channing CE., Waddington D., Jones RB.: Age-related changes in fear, sociality and pecking behaviors in two strains of laying hen. *Br. Poultry Sci.* 2001; 42:414-23.

Holmgren S., Jensen S., Johnsson AC., Lundin K., Nilsson K.: Neuropeptides in the gastrointestinal canal of *Necturus maculosus*. Distribution and effects on mobility. *Cell Tissue Res.* 1985; 241:565-80.

Isobe K., Tatsuno I., Yashiro T., Nanmoku T., Takekoshi K., Kawakami Y., Nakai T.: Expression of mRNA for PACAP and its receptors in intra- and extra-adrenal human pheochromocytomas and their relationship to catecholamine synthesis. *Regul. Pept.* 2003; 110:213-217.

Jakab B., Reglődi 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. Meth.* 2004; 61:189-198.

Józsa R., Somogyvári-Vigh A., Reglődi D., Hollósy T., Arimura A.: Distribution and daily variations of PACAP in the chicken brain. *Peptides* 2001; 22:1371-1377.

Joo KM., Chung YH., Lim HC., Lee KH., Cha CI.: Reduced immunoreactivities of a vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor (VPAC1 receptor) in the cerebral cortex, hippocampal region, and amygdala of aged rats. *Brain. Res.* 2005; 1064(1-2):166-72.

Joo KM., Chung YH., Kim MK., Nam RH., Lee BL., Lee KH., Cha CI.: Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 2004; 476:388-413.

Kandel E., Abel T.: Neuropeptides, adenylyl cyclase, and memory storage. *Science* 1995;268:825-6.

Kántor O., Molnár J., Arimura A., Köves K.: PACAP38 and PACAP27 administered intracerebroventricularly have an opposite effect on LH secretion. *Peptides* 2000; 21:817-820.

Keene AC., Stratmann M., Keller A., Perrat PN., Vosshall LB., Waddell S.: Diverse odor-conditioned memories require uniquely timed dorsal parietal medial neuron output. *Neuron*. 2004; 44:512-33.

Kopp MDA., Schomerus C., Dehghani F., Korf HW., Meissl H.: PACAP and melatonin in the suprachiasmatic nucleus; effects on the calcium signal transduction cascade. *J. Neurosci.* 1999;19: 206-19.

Koppan M., Varnagy A., Reglodi D., Brubel R., Nemeth J., Tamas A., Mark L., Bodis J.: Correlation between oocyte number and follicular fluid concentration of pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) in women after superovulation treatment. *J. Mol. Neurosci.* 2012; 48:612-627.

Köves K., Arimura A., Somogyvári-Vigh A., Vigh S., Miller J.: Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylyl-cyclase activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 1990; 127:264-71.

Köves K., Arimura A., Görös T., Somogyvári-Vigh A.: Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylyl-cyclase activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 1991; 54:159-69.

Köves K., Arimura A., Vigh S., Somogyvári-Vigh A., Miller J.: Immunohistochemical localization of PACAP on the ovine digestive system. *Peptides* 1993; 14:449-455.

Köves K., Kántor O., Scammell JG., Arimura A.: PACAP colocalizes with luteinizing and follicle-stimulating hormone immunoreactivities in the anterior lobe of the pituitary gland. *Peptides* 1998a; 19:1069-1072.

Köves K., Molnár J., Kántor O., Lakatos A., Fógel K., Kausz M., Vandermeers-Piret MC., Somogyvári-Vigh A., Arimura A.: Role of PACAP in the regulation of gonadotroph hormone secretion during ontogenesis: a single neonatal injection of PACAP delays puberty and its intracerebroventricular administration before the critical period of proestrous stage blocks ovulation in adulthood. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1998b; 865:590-594.

Köves K., Vincze E.: A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerkezete, előfordulása és szerepe az élettani működésekben. *Orvosi Hetilap* 2001; 142:491-96.

Kuenzel W. et al: Sites of gene expression for vasoactive intestinal polypeptide throughout the brain of the chick (*Gallus domesticus*). *J. Comp. Neurol.* 1997; 381:101-118.

Laburthe M., Couvineau A., Tan V.: Class II G protein/coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 2007; 28:1631-1639.

Li M., Funahashi H., Mbikay M., Shioda S., Arimura A.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-mediated intracrine signaling in the testicular germ cells. *Endocrine* 2004; 23:59-75.

Lickliter R., Stoumbos J.: Modification of prenatal auditory experience alters postnatal auditory preferences of bobwhite quail chicks. *Q. J. Exp. Psychol.* 1992; 44B:199-214.

Lowndes M., Davies DC.: The effect of archistriatal lesions on "open-field" and fear-avoidance behavior in the domestic chick. *Behav. Brain Res.* 1996; 72:25-32.

Lugo JM., Oliva A., Morales A., Reyes O., Garay HE., Herrera F., Cabrales A., Pérez E., Estrada MP.: The biological role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in growth and feeding behavior in juvenile fish. *J. Pept. Sci.* 2010; 16(11):633-43.

Markovics A., Kormos V., Gaszner B., Lashgarara A., Szoke E., Sandor K., Tuka B., Szolcsanyi J., Hashimoto H., Tajti J., Reglodi D., Helyes Zs.: Pituitary adenylate cyclase-

activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol. Dis.* 2012; 45:633-644.

Matsuyama S., Matsumoto A., Hashimoto H. et al.: Impaired long-term potentiation in vivo in the dentate gyrus of PACAP or PAC1 receptor-mutant mice. *NeuroReport* 2003; 14:2095-8.

McGoogan JM., Cassone VM.: Circadian regulation of chick electroretinogram: effects of pinealectomy and exogenous melatonin. *Am. J. Physiol.* 1999; 277:206-219.

Miyata A., Arimura A., Dahl RR., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler MD., Coy DH.: Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1989; 164:567-574.

Miyata A., Jiang L., Dahl RR., Kitada C., Kubo K., Fujino M., Minamino N., Arimura A.: Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the PACAP with 38 residues (PACAP38). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 170:643-648.

Morley JE. et al.: PACAP reduces food intake in mice. *Peptides* 1992; 13:1133-35.

Mueller JC., Pulido F., Kempnaers B.: Identification of a gene associated with avian migratory behaviour. *Proc. Biol. Sci.* 2011; 22;278(1719):2848-56.

Mustafa T., Eiden LE.: Secretin superfamily: PACAP, VIP and related peptides. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Ed: Lajtha Springer. 2008: 463-500.

New HV., Mudge AW.: Distribution and ontogeny of SP, CGRP, SOM and VIP in chick sensory and sympathetic ganglia. *Dev. Biol.* 1986; 116:337-346.

Nielsen HS., Hannibal J., Fahrenkrug J.: Expression of PACAP in the postnatal and adult rat cerebellar cortex. *NeuroReport*. 1998; 9:2639-42.

Nilsson A.: Structures of VIP octacosapeptide from chicken intestine. The amino acids sequence. FEBS Letter 1975; 60:322-326.

Nowak JZ., Kuba K., Zawliska JB.: PACAP-induced formation of cyclic-AMP in chicken brain: regional variations and the effect of melatonin. Brain Res. 1999; 830:195-199.

Nowak JZ., Kuba K., Zawliska JB.: Stimulatory effect of PACAP on cyclic-AMP formation in the hypothalamus and cerebral cortex of four avians and rat. Pol. J. Pharmacol. 1999;51: 87-91.

Nowak JZ., Kuba K.: VIP-stimulated adenosine 3',5'-cyclic monophosphate formation in cerebral cortex and hypothalamus of chick and rat: comparison of the chicken and mammalian peptide. Neurosci. Lett. 2001; 297:93-96.

Nowak JZ et al.: Stimulatory effects of PACAP on inositol phosphates accumulation in avian cerebral cortex and hypothalamus. Neurosci. Lett. 2002; 323:179-182.

Nowak JZ., JB. Zawliska: PAPAN in avians; origin, occurrence, and receptors – pharmacological and functional considerations. Curr. Pharm. Des. 2003; 9:467-481.

Nowak JZ., Jozwiak-Bebenista M., Bednarek K.: Effects of PACAP and VIP on cyclic AMP formation in rat neuronal and astrocyte cultures under normoxic and hypoxic condition. Peptides 2007; 28:1706-1712.

Okada R., Yamamoto K., Ito YM., Mochida H., Tonon MC., Fournier A., Leprince J., Vaudry H., Kikuyama S.: VIP and PACAP stimulate TSH release from the bullfrog pituitary. Peptides 2007; 28:1784-1789.

Peeters K., Bergham LR., Vandesande F.: Comparative distribution of PACAP and VIP immunoreactivity in the chicken forebrain. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998; 839:417-419.

Peeters K., Helga H.J., Lutgarde A., Frans V.: Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor mRNA in the chicken brain. *The J. Comp. Neurology*. 2000; 423:66-82.

Pirger Z., László Z., Kemenes I., Tóth G., Reglődi D., Kemenes G.: A homolog of the vertebrate pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is both necessary and instructive for the rapid formation of associative memory in an invertebrate. *J. Neurosci*. 2010; 30(41):13766-73.

Rawlings SR., Hezareh M.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endocr. Rev.* 1996; 17:4-29.

Reglődi D.: A PACAP neuro- és általános citoprotektív hatásainak vizsgálata. MTA doktori értekezés, PTE-ÁOK, 2009.

Reglődi D., Tamás A., Koppán M., Szőgyi D., Welke L.: Role of PACAP in female fertility and reproduction at gonadal level – recent advances. *Front. Endocrinol.* 2012; 3: 155.

Reglődi D., Kiss P., Szabadfi K., Atlasz T., Gabriel R., Horvath G., Szakaly P., Sandor B., Lubics A., Laszlo E., Farkas J., Matkovits A., Brubel R., Hashimoto H., Ferencz A., Vincze A., Helyes Zs., Welke L., Lakatos A., Tamas A.: PACAP is an endogenous protective factor – insights from PACAP deficient mice. *J. Mol. Neurosci.* 2012; 48: 482-492.

Resch JM., Boisvert JP., Hourigan AE., Mueller CR., Yi SS., Choi S.: Stimulation of the hypothalamic ventromedial nuclei by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces hypophagia and thermogenesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011; 301:1625-34.

Röhlich P.: Szövektan. Semmelweis Egyetem, Budapest, 2002; 396. és 439. oldal.

Said S.I., Mutt V.: Isolation from porcine intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and glucagon. *Eur. J. Biochem.* 1972; 28:199-204.

Salvi EP., Vaccaro R., Renda TG.: Ontogeny of PACAP immunoreactivity in extrinsic and intrinsic innervation of chicken guts. *Peptides* 2000; 21:1703-1709.

Scanes CG., Harvey S., Chadwick A., Gales L., Newcomer WS.: Diurnal variations in serum luteinizing hormone, growth hormone and prolactin concentrations in intact and pinealectomized chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1980;41: 266-9.

Scharp PJ., Klandorf H., Lea RW.: Influence of lighting cycles on daily rhythms in concentrations of plasma tri-iodothyronine and thyroxine in intact and pinealectomized immature broiler hens. *J. Endocrinol.* 1984;104: 337-45.

Schrott LM., Getty ME., Wacnik PW., Sparber SB.: Open-field and LPS-induced sickness behavior in young chickens: effects of embryonic cocaine and/or ritanserin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998; 61:9-17.

Sherwood NM., Krueckl SL., McRory JE.: The origin and function of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr. Rev.* 2000; 21:619-670.

Sherwood NM., Adams BA., Isaac ER., Wu S., Fradinger EA.: Knocked down and out: PACAP in development, reproduction and feeding. *Peptides* 2007; 28:1680-1687.

Siuciak JA., Dubocovich ML.: Effect of pinealectomy and the light/dark cycle on 2-[125I] iodomelatonin binding in the chick optic tectum. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1993;13: 193-202.

Slanar O., Pelisek V., Vanecek J.: Melatonin inhibits PACAP-induced increase of cyclic-AMP accumulation and $[Ca^{2+}]_i$ in cultured cells of neonatal rat pituitary. *Neurochem. Int.* 2000;36: 213-9.

Smotherman WP., Robinson SR.: The rat fetus in its environment: behavioral adjustments to novel, familiar, aversive, and conditioned stimuli presented in utero. *Behav. Neurosci.* 1985; 99:521-530.

Sneddon H., Hadden R., Hepper PG.: Chemosensory learning in the chicken embryo. *Physiol. Behav.* 1998; 64:133-139.

Somogyvari-Vigh A., Reglodi D.: PACAP: a potential neuroprotective peptide. Review *Curr. Pharm. Des.* 2004; 10:2861-89.

Sundler F., Ekblad E., Hannibal J., Moller K., Zhang YZ., Mulder H., Elsas T., Grunditz T., Danielsen N., Fahrenkrug J., Uddman R.: Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide in sensory and autonomic ganglia: localization and regulation. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1996; 805:410-28.

Tachibana T. et al.: Intracerebroventricular injection of VIP and PACAP inhibits feeding in chicks. *Neurosci. Lett.* 2003; 339:203-206.

Tachibana T. et al.: PACAP and VIP inhibit feeding in the chicken brain by different mechanisms. *Neurosci.* 2003; 348:25-28.

Tachibana T. et al.: Anorexigen effects of PACAP and VIP in the chick brain are mediated by corticotrophin-releasing factor. *Regul. Pept.* 2004; 120:99-105.

Tamas A., Reglodi D., Farkas O., Kovcsdi E., Pal J., Povlishock J.T., Schwarcz A., Czeiter E., Szanto Z., Doczi T., Buki A., Bukovics P.: Effects of PACAP in central and peripheral nerve injuries. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13:8430-848.

Vanecek J., Watanabe K.: Melatonin inhibits the increase of cyclic-AMP in rat suprachiasmatic neurons induced by VIP. *Neurosci. Lett.* 1998; 252:21-24.

Watanabe K., Yamaoka S., Vanecek J.: Melatonin inhibits spontaneous and VIP-induced vasopressin release from suprachiasmatic neurons. *Brain Res.* 1998; 801:216-219.

Vaudry D., Gonzalez BJ., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H.: PACAP and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 2000a; 52:269-324.

Vaudry D., Gonzalez BJ., Basille M., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H.: The neuroprotective effect of PACAP on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-3/CPP32. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000b; 97:13390-13395.

Vaudry D., Chen Y., Ravni A., Hamelink C., Elkahoul AG., Eiden LE.: Analysis of the PC12 cell transcriptome after differentiation with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *J. Neurochem.* 2002a; 83:1272-1284.

Vaudry D., Ravni A., Wurtz O., Benard M., Botia B., Jolivel V., Fournier A., Gonzalez B., Vaudry H.: Effects of PACAP in the local regulation of endocrine glands. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*. Ed.: Kastin AJ., Academic Press, London, 2006; pp:867-874.

Von Gall C., Duffied GE., Hastings MH. et al.: CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access. *J. Neurosci.* 1998;18: 1803-7.

Von Gall C., Weaver DR., Chadwick A. et al.: Melatonin limits transcriptional impact of phosphoCREB in the mouse SCN via the Mel 1a receptor. *NeuroReport* 2000;11:803-7.

Wang Y., Conlon J.M.: Neuroendocrine peptides (NPY, GRP, VIP, Somatostatin) from the brain and stomach of the alligator. *Peptides* 1993; 14:573-579.

Waschek JA.: Multiple actions of PACAP in nervous system development and regeneration. *Dev. Neurosci.* 2002; 24:14-23.

Wayne JK., Sabine B.: VIP-containing neurons: distribution throughout the brain of the chick (*Gallus domesticus*) with focus upon the lateral septal organ. *Cell Tissue Res.* 1994; 275:91-107.

Winzell MS., Ahren B.: Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides* 2007; 28:1805-1813.

Woods KL., Porter TE.: ontogeny of prolactin-secreting cells during chick embryonic development: effect of VIP. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1998; 112:240-246.

Zawliska JB., Niewiadomski P., Nowak JZ.: Characterization of VIP/PACAP receptors in chick cerebral cortex. *J. Mol. Neurosci.* 2003; 20:153-162.

Zhou CJ. et al.: PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 2002; 3:423-439.

Yoshimura T., Suzuki Y., Makino E., Suzuki T., Kuroiwa A., Matsuda Y et al: Molecular analysis of avian circadian clock genes. *Mol. Brain Res.* 2007; 78:207-15.

7. Az értekezéshez felhasznált közlemények

1. **Hollósy T.**, Józsa R., Jakab B., Németh J., Lengvári I., Reglődi D.: Effects of in ovo treatment with PACAP antagonist on general activity, motor and social behavior of chickens. Regul. Pept. 2004; 123:99-106. (IF: 2,531)
2. Jakab B., Reglődi 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. Meth. 2004; 61:189-198. (IF: 1,302)
3. Józsa R., Somogyvári-Vigh A., Reglődi D., **Hollósy T.**, Arimura A.: Distribution and daily variations of PACAP in the chicken brain. Peptides 2001; 22:1371-1377. (IF: 2,137)
4. Józsa R., **Hollósy T.**, Tamás A., Tóth G., Lengvári I., Reglődi D.: PACAP plays a role in olfactory memory formation in chicken. Peptides 2005; 26:2344-2350. (IF: 2,231)
5. Józsa R., **Hollósy T.**, Németh J., Tamás A., Lubics A., Jakab B., Olah A., Arimura A., Reglődi D.: Presence of PACAP and VIP in embrionic chicken brain. Ann. NY. Acad. Sci. 2006; 1070: 348-353. (IF: 1,9)
6. Józsa R., Németh J., Tamás A., **Hollósy T.**, Lubics A., Jakab B., Oláh A., Lengvári I., Arimura A., Reglődi D.: Short-term fasting differentially alters PACAP and VIP levels in the brain of rat and chicken. Ann. NY. Acad. Sci. 2006; 1070:354-358. (IF: 1,93)
7. Németh J., Jakab B., Reglődi D., Lubics A., Józsa R., **Hollósy T.**, Tamás A., Lengvári I., Görcs T., Szolcsány J.: Comperative distriburion of VIP in the central nervous system of various species measured by a new radioimmunoassay. Regul. Pept., 2002; 109:3-7. (IF: 3,205)

8. Somogyvári-Vígh A., Józsa R., Reglódi D., **Hollósy T.**, Meggyesi R., Lengvári I., Arimura A.: Influence of pinealectomy on levels of PACAP and cAMP in the chicken brain. Regul. Peptides 2002; 109:9-13. (IF: 3,205)

9. Németh J., Jakab B., Józsa R., **Hollósy T.**, Tamás A., Lubics A., Lengvári I., Kiss P., Oberritter Zs., Horváth B., Szilvássy Z., Reglódi D.: PACAP-27 radioimmunoassay: Description and application of a novel method. J. Radioanal. Nucl. Chem., 2007; 273:327-332. (IF: 0,499)

10. Csernus V., Józsa R., Reglódi D., **Hollósy T.**, Somogyvári-Vígh A., Arimura A.: The effect of PACAP on rhythmic melatonin release of avian pineals. Gen. Comp. Endocrinol. 2004; 135:62-69. (IF: 1,751)

Összesített impakt faktor: 20,757.

8. Köszönetnyilvánítás

PhD munkám során a legnagyobb türelemmel témavezetőim voltak irántam, a leghálásabb köszönettel nekik tartozom. Reglődi Dórával és Józsa Ritával végeztük a sokszor éjszakába nyúló ritmikus kísérleteinket. Külön is köszönetet szeretnék mondani Józsa Ritának, aki gyakorlatvezetőm volt (és akinél örömmel tanultam az anatómiát), akivel már elsőéves hallgató korom óta együtt dolgoztunk a mediastinum boncolásától kezdve a bonyolultabb kísérletekig. Az ő segítségével lettem gyakorlatvezető, az első csoportot vele közösen tanítottam, a mai napig kérek tőle tanácsokat. És ő tanította meg a perfúziót, az immunhisztológiát és még sok mindent. Nagy-nagy köszönet illeti Reglődi Dórát, akitől a tanulással és memóriával kapcsolatos vizsgálatokat tanultam meg, valamint a tudományos cikkek, poszterek és absztraktok megírásának titkait, és aki – mindig jószándékkal és joggal – sürgette a PhD dolgozat megírását.

Köszönet illeti dr. Csernus Valért, aki gyakorlati jellegű tanácsaival segítette nem csak a tudományos, hanem az oktatási-tanítási munkámat is.

Köszönöm a segítségét azoknak a munkatársaknak is, akik nélkül nem lettek volna eredmények: dr. Németh József, Önböli Dóra, Nagy Enikő, Dittrich Erzsébet.