

A HYPOPHYSIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID VIZSGÁLATA  
CARDIOVASCULARIS KÓRKÉPEKBEN

Ph.D. értekezés

Dr. Szabó Dóra

Témavezetők: Dr. Sárszegi Zsolt, egyetemi adjunktus, PTE KK Szívgyógyászati Klinika  
Dr. Tamás Andrea, egyetemi docens, PTE ÁOK Anatómiai Intézet

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola – iskolavezető: Prof. Dr. Bogár Lajos

B-2/2004 Cardiovascularis betegségek klinikai és molekuláris szintű új mechanizmusainak  
diagnosztikája és terápiája – programvezető: Prof. Dr. Szokodi István



Pécsi Tudományegyetem  
Klinikai Központ, Szívgyógyászati Klinika  
Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai Intézet

Pécs  
2022

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>7</b>
1.1. <i>Hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP).....</i>	7
1.1.1. <i>PACAP általános hatásai .....</i>	8
1.1.2. <i>PACAP hatásai a vascularis rendszerre .....</i>	9
1.1.3. <i>PACAP receptor expresszió a cardiovascularis rendszerben .....</i>	10
1.1.4. <i>PACAP kardioprotektív hatása az ischaemiás károsodással szemben.....</i>	12
1.1.5. <i>PACAP kardioprotektív hatása szívelégtelenségben .....</i>	14
1.2. <i>Az általunk vizsgált cardiovascularis kórképek.....</i>	15
1.2.1. <i>Akut myocardialis infarctus (AMI).....</i>	16
1.2.1.1. <i>Akut myocardialis infarctus jellemzői és biomarkerei.....</i>	16
1.2.1.2. <i>Akut myocardialis infarctus állatkísérletes modelljei.....</i>	17
1.2.2. <i>Szívelégtelenség – ischaemiás és nem-ischaemiás etiológiájú cardiomyopathia.....</i>	19
<b>2. Célkitűzés.....</b>	<b>23</b>
2.1. <i>Acut myocardialis infarctus vizsgálata.....</i>	23
2.1.1. <i>Szöveti PACAP-38 szintek vizsgálata akut myocardialis infarctus sertés modelljében .....</i>	23
2.1.2. <i>Plazma PACAP-38 szintek vizsgálata STEMI betegekben .....</i>	23
2.2. <i>Szívelégtelenség, ischaemiás (ICM) és nem-ischaemiás cardiomyopathia (NICM) vizsgálata.....</i>	24
2.2.1. <i>Szívelégtelen betegek vérmintáinak vizsgálata.....</i>	24
2.2.2. <i>Humán szívizomzat vizsgálata.....</i>	25
<b>3. Módszerek.....</b>	<b>26</b>
3.1. <i>Akut myocardialis infarctus vizsgálata.....</i>	26
3.1.1. <i>Szöveti PACAP-38 szintek vizsgálata akut myocardialis infarctus sertés modelljében .....</i>	26
3.1.2. <i>Myocardialis infarctus klinikai vizsgálatának menete .....</i>	28
3.1.3. <i>PACAP-38-szerű immunoreaktivitás (PACAP-38-LI) mérése ELISA módszerrel sertés szívmintákból és emberi plazma mintákból.....</i>	30
3.2. <i>Szívelégtelen betegek vizsgálata.....</i>	30
3.2.1. <i>Szívelégtelenség miatt kezelt betegek vérmintáinak vizsgálata .....</i>	30
3.2.1.1. <i>Különböző stádiumú DCM betegek plazma PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata.....</i>	30
3.2.1.2. <i>Akut, dekompenzált és krónikus kompenzált szívelégtelen ICM és NICM betegek, valamint nem-szívelégtelen kontroll csoport PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata .....</i>	31
3.2.1.3. <i>PACAP-38-szerű immunoreaktivitás meghatározása RIA módszerrel.....</i>	32

3.2.1.4.	PACAP-38 ELISA.....	33
3.2.1.5.	Pro- és antiinflammatorikus citokin szintek vizsgálata Luminex immunoassay segítségével.....	33
3.2.2.	Emberi szívizomminta vizsgálata .....	33
3.2.2.1.	Emberi szívizomminták szöveti PACAP-38 szintjének vizsgálata .....	34
3.2.2.2.	PAC1 receptor vizsgálata emberi szívizommintákban .....	34
3.3.	Statisztikai elemzések.....	35
<b>4.</b>	<b>Eredmények.....</b>	<b>36</b>
4.1.	Akut myocardialis infarctus vizsgálata.....	36
4.1.1.	Szöveti PACAP-38 szintek vizsgálata akut myocardialis infarctus sertés modelljében .....	36
4.1.2.	Plazma PACAP-38 szintek vizsgálata STEMI betegekben .....	39
4.2.	Szívelégtelenség, ischaemiás cardiomyopathia (ICM) és nem-ischaemiás cardiomyopathia (NICM) vizsgálata .....	47
4.2.1.	Szívelégtelen betegek vérmintáinak vizsgálata.....	47
4.2.1.1.	Különböző stádiumú szívelégtelen betegek plazma PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata .....	47
4.2.1.2.	Akut, dekompenzált és krónikus kompenzált szívelégtelen betegek, valamint nem-szívelégtelen kontroll csoport PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata .....	48
4.2.2.	Emberi szívizom vizsgálata.....	55
<b>5.</b>	<b>Diszkusszió.....</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>Konklúzió.....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>Új eredmények összefoglalása.....</b>	<b>73</b>
7.1.	Akut myocardialis infarctus vizsgálata során elért új eredményeink: .....	73
7.1.1.	Szöveti PACAP-38 szintek vizsgálata akut myocardialis infarctus sertés modelljében .....	73
7.1.2.	Plazma PACAP-38 szintek vizsgálata STEMI betegekben .....	73
7.2.	Szívelégtelenség vizsgálata során elért új eredményeink:.....	74
7.2.1.	Ischaemiás (ICM) és nem-ischaemiás etiológiájú cardiomyopathia (NICM) miatt gondozott betegek plazma és szérum vizsgálata.....	74
7.2.1.1.	Különböző stádiumú szívelégtelen betegek plazma PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata.....	74
7.2.1.2.	Akut, dekompenzált és krónikus, kompenzált szívelégtelen betegek, valamint nem szívelégtelen kontroll csoport PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata.....	74
7.2.2.	ICM vagy NICM miatt kezelt, végstádiumú szívelégtelen betegek szívizommintáinak vizsgálata.....	75
<b>8.</b>	<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>76</b>
<b>9.</b>	<b>Publikációk .....</b>	<b>89</b>
<b>10.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>92</b>

## Rövidítések jegyzéke

AC: adenilát-cikláz

ACE: angiotenzin-konvertáló enzim

Akt: jelátviteli protein, másnéven protein kináz B

AIF: apoptosis indukáló faktor

AMI: akut myocardialis infarctus

anti-ADCYAP1R1: ADCYAP gén I. típusú receptora elleni antitest

ARB: angiotenzin-II receptor blokkoló

ATP: adenzin-trifoszfát

AUC: area under the curve = görbe alatti terület

Bad: Bcl-2 asszociált sejthalál (apoptosis) promóter

Bax: Bcl-2 asszociált X, apoptosis regulátor

Bcl: B-sejtes lymphoma fehérje

BK: bal kamra

BK-EF: bal kamrai ejekciós frakció

BK-EDD: bal kamrai végdiastolés átmérő

BK-EDV: bal kamrai végdiastolés volumen

BK-ESV: bal kamrai végsystolés volumen

BNP: B-típusú natriuretikus peptid

BP: bal pitvar

BSA: bovin serum albumin = marha szérum albumin

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

COX: ciklooxigenáz

CRP: C-reaktív protein

CRT: krónikus reszinkronizációs terápia

Cx: arteria coronaria sinistra ramus circumflexus

DCM: dilatatív cardiomyopathia

ECM. extracelluláris mátrix

EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

EF: ejekciós frakció

ELISA: enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat

ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz

GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

GDF: növekedési-differenciálódási faktor

HbA1c: hemoglobin A1c

HDL: magas denzitású lipoprotein

HFmrEF: közepes ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség

HFpEF: megtartott ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség

HFrEF: csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenség

hs-cTn: magas szenzitivitású kardiális troponin

ICD: implantálható cardioverter defibrillátor

ICM: ischemiás cardiomyopathia

IFN- $\gamma$ : interferon-gamma

IL: interleukin

IPreC: ischemiás prekondicionálás

IPostC: ischemiás posztkondicionálás

I/R: ischaemia/ reperfüzió

ISZB: ischaemiás szívbetegség

iv.: intravénás

IVC: vena cava inferior

JK: jobb kamra

JK-EDD: jobb kamrai végdiastolés átmérő

JNK: c-Jun N-terminális kináz

JP: jobb pitvar

KO: „knock out” = transzgenikus, genetikailag módosított

LAD: left anterior descending coronaria = arteria coronaria sinistra ramus interventricularis anterior

LDL: alacsony denzitású lipoprotein

mRNS: messenger riblonukleinsav

MAPK: mitogén-aktivált protein kináz

MCP-1: monocita kemotaktikus protein

MI: myocardialis infarctus

MI-BK-I: myocardialis infarctuson átesett bal kamra ischaemiás régiója

MI-BK-NI: myocardialis infarctuson átesett bal kamra nem-ischaemiás régiója

MRA: mineralokortikoid-receptor antagonist

MR-proADM: középrégiós proatrialis natriuretikus peptid

NAD(P)H: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formája

NICM: nem-ischaemiás cardiomyopathia

NT-proBNP: N-terminális pro B-típusú natriuretikus peptid

NYHA st.: New York Heart Association= New York-i Kardiológus Társaság funkcionális klasszifikációja szívelégtelenségben

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: szuperoxid anion

PAC1 receptor: hypophysis adenilát-cikláz aktiváló peptid (PACAP) szelektív receptora

PACAP: hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid

PACAP-27: PACAP 27 aminosavból álló izoformája

PACAP-38: PACAP 38 aminosavból álló izoformája

PACAP-38-LI: PACAP-38-szerű immunoreaktivitás

PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat

PCI: perkután coronaria intervenció

PKA: protein kináz A

PLC: foszfolipáz C

PVDF: polivinilidén-difluorid

RCA: arteria coronaria dextra

RIC: ismételt ischaemiás kondicionálás

ROS: reaktív oxigén szabadgyök

SOD: szuperoxid-dismutáz

STEMI: ST-elevációval járó myocardialis infarctus

TG: triglicerid

TNF- $\alpha$ : tumor nekrosis faktor-alfa

VIP: vazóaktív intestinalis peptid

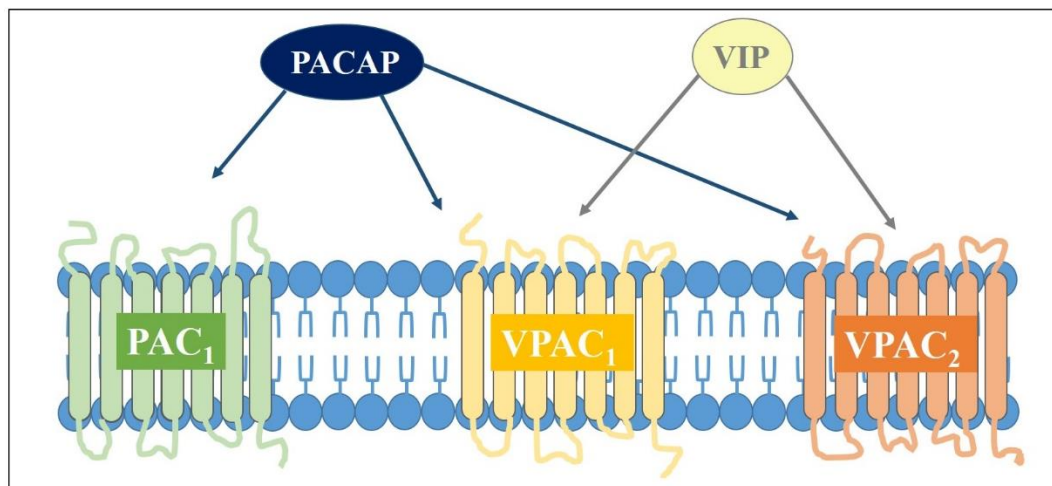
VPAC1, VPAC2 receptor: PACAP és VIP közös receptorai

WMSI: wall motion score index= szemikvantitatív falmozgás index

# 1. Bevezetés

## 1.1. Hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

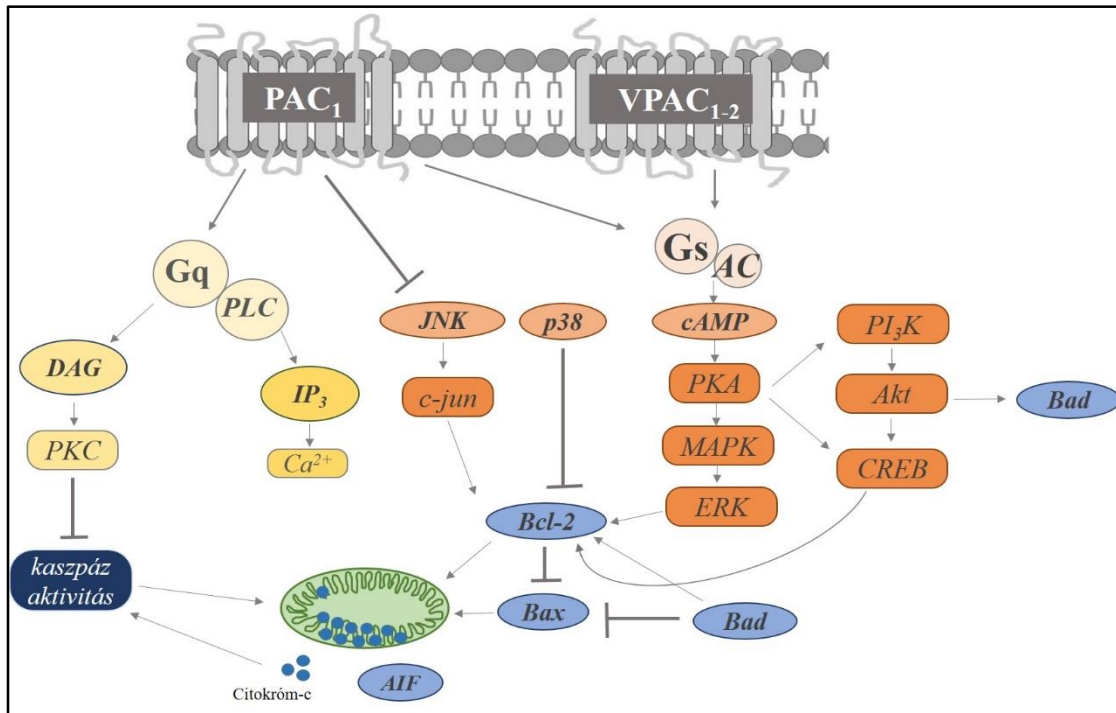
A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) egy multifunkcionális neuropeptid, melyet 1989-ben birka hypothalamusból izoláltak először a hypophysisben kifejtett adenilát-cikláz aktiváló hatása alapján (Miyata *et al.* 1989). A vazoaktív intestinalis peptid (VIP)/ szekretin/ glukagon peptidcsalád tagja, két aktív formája ismert, egy 27 (PACAP-27), és egy 38 (PACAP-38) aminosavból felépülő izoforma, melyek a szervezetben 10%/90%-os arányban fordulnak elő. A molekula szerkezete konzervált, az evolúciós fejlődés során csak 1-2 aminosav eltérés található a különböző fajok között (Vaudry *et al.* 2009). Három különböző G-protein kötött receptora ismert, a PACAP specifikus PAC1 receptor valamint a VIP-del közös VPAC1, és VPAC2 receptorok (Vaudry *et al.* 2009) (1. ábra).



1. ábra: PACAP receptorok: szelektív PAC1 receptor, és a VIP-del közös VPAC1 és VPAC2 receptorok. PACAP: hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, VIP: vazoaktív intestinalis peptid, PAC1: PACAP szelektív receptora, VPAC1-2: PACAP és VIP közös receptorai.

A PACAP több molekuláris biológiai úton képes hatást kifejteni. Az egyik ilyen útvonal az adenilát-cikláz (AC) – ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) – protein kináz A (PKA) és mitogén-aktivált protein kinázokon (MAPK) keresztüli hatás, mely során a PACAP gátolja a sejthalált. Ez a hatás egyrészt a proapoptotikus faktorok gátlásán keresztül történik, mint a c-Jun N-terminális kináz (JNK), az apoptózis indukáló faktor (AIF) és a p38 MAPK. Másrészt a PACAP csökkenti a Bcl családba tartozó Bad és Bax proapoptotikus faktorok aktivitását, és képes gátolni a

mitokondriumokban a citokróm c felszabadulását is. Más jelátviteli utakon keresztül pedig képes serkenteni több antiapoptotikus faktort, mint Bcl-2, extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK1/2) és Akt foszforilációját (2. ábra). Ezen útvonalak együttes működése áll a citoprotektív hatások hátterében (Vaudry et al. 2002, Somogyvári-Vigh és Reglődi 2004, Rácz et al. 2007).



2. ábra: A PACAP hatását közvetítő molekuláris jelátviteli útvonalak.

### 1.1.1. PACAP általános hatásai

A PACAP receptorain keresztül számos hatást képes kifejteni, mint a gyulladáscsökkentő, antiapoptotikus, antioxidáns, valamint az ezeken keresztül kifejtett neuroprotektív, neurotrofikus, általános citoprotektív hatások. Részt vesz emellett az anyagcsere és az endokrin rendszer szabályozásában is. Legnagyobb koncentrációban az idegrendszerben és az endokrin mirigyekben fordul elő, így elsőként ezen két rendszerben betöltött szerepét vizsgálták (Reglődi és Tamás 2016). Több eredmény született a különböző neurotoxikus károsodásokkal szemben kifejtett védő hatásával kapcsolatban (Reglődi et al. 2018a). Így felmerül klinikai alkalmazhatóságának lehetősége Alzheimer-kórban, Parkinson-kórban (Yang et al. 2015, Pham et al. 2022), stroke-on átesett és demenciában szenvedő betegek esetében is (Nonaka et al. 2020). Később azonban számos vizsgálat indult a különböző perifériás szervrendszerekre, így a cardiovascularis rendszerre kifejtett hatásainak



feltérképezésére, melyek igazolták, hogy a PACAP pozitív chronotrop, inotrop és dromotrop hatásokkal bír, mindemellett potens vazodilatátor (*Dvoráková 2005, Rácz et al. 2008, Farnham et al. 2011, Vámos et al. 2014*), felvetve ezzel annak lehetőségét, hogy a PACAP fontos szerepet tölthet be a különböző cardiovascularis kórképek kialakulásában és progressziójában. Továbbá több tanulmány igazolta a PACAP általános antiischaemiás hatását is az agyban (*Reglődi et al. 2000, Lazarovici et al. 2012, Reglődi et al. 2018b*), különböző retinát érintő betegségekben (*Atlasz et al. 2010, Dányádi et al. 2014*) és különböző perifériás szervekben, mint a vékonybél, vese és a máj (*Ferencz et al. 2009, Horváth et al. 2010, Ji et al. 2013, Reglődi et al. 2018b*), hangsúlyozva az általunk vizsgálat polipeptid jelentőségét az ischaemiás eredetű kórképekben.

### **1.1.2. PACAP hatásai a vascularis rendszerre**

A PACAP potenciálisan vazodilatátor funkcióját többféle állatkísérletes modellen vizsgálták. Tekintettel az idegrendszerben kimutatott magas PACAP koncentrációra kezdetben a cerebrovascularis rendszer került a kutatások középpontjába. Újszülött sertéseken kimutatták a pia materben futó arteriolák vazodilatációját PACAP-27 és 38 kezelést követően, mely hatást két különböző mechanizmussal képes kifejteni: egy ciklooxygenáz (COX) függő és egy COX független útvonalon keresztül (*Lenti et al. 2007*). Emellett patkány modellben is sikeresen kimutatták a PACAP vazodilatátor funkcióját cerebralis és meningealis artériákon egyaránt (*Boni et al. 2009, Syed et al. 2012*). Neuroprotektív hatását a cerebrovascularis erek tágításán keresztül is képes kifejteni, csökkentve ezzel az esetleges agyi ischaemia súlyos szövődményeit. Továbbá egészséges önkénteseknél alkalmazott intervénás (iv.) PACAP infúzió által okozott bőrreakciók vizsgálatakor markáns vazodilatációt, bőrpírt, ödémát és hypertermiát is detektáltak (*Seeliger et al. 2010*). A PACAP erős vazodilatátor tulajdonsága miatt szerepet játszhat a migrén indukciójában is. Szignifikánsan magasabb plazma PACAP szinteket mértek migrénes egyéneknél az iktális periódusban a rohammentes időszakhoz képest. Emellett negatív korrelációt találtak a migrénes roham időtartama és a plazma PACAP koncentráció között (*Tuka et al. 2013*), valamint migrénes pácienseknél sumatriptan infúziót követően jelentős PACAP szint csökkenés volt megfigyelhető (*Hansen et al. 2013, Zagami et al. 2014*). Mindezek alapján kifejlesztettek egy speciális PAC1 receptor antitestet (AMG 301), mint potenciális migrén ellenes gyógyszer, melyet egy 12 hetes kettős-vak fázis II. klinikai vizsgálatban tanulmányoztak, azonban nem találtak szignifikáns különbséget migrén profilaxis kapcsán a PAC1 receptor antitesttel és a placeboval kezelt csoport között (*Reglődi et al. 2018b, Rustichelli et al. 2020*).

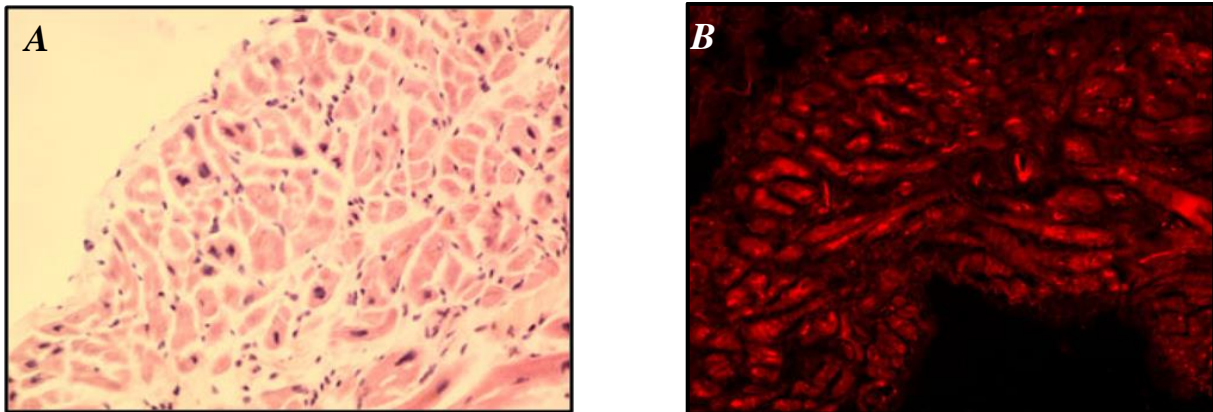
Nem csak a centrális, hanem a perifériás ereken is vizsgálták a PACAP vazodilatátor effektusát. Kutatócsoportunk korábban patkány carotis és basilaris érpreparátumok vizsgálata alapján megállapította, hogy a PACAP feltehetőleg nagyobb hatással bír a centrális artériákon a perifériásokhoz képest, továbbá ezen vazodilatátor hatása korfüggő és szövetspecifikus (Vámos *et al.* 2014). Ugyanakkor PACAP-deficiens egerek carotis és femoralis artériájában exogén PACAP és VIP indukálta relaxáció vizsgálata során a PACAP-deficiens egereknél szignifikánsan nagyobb mértékű relaxációt detektáltak myograph használatával a vad típushoz képest. Míg PACAP-antagonista adásakor teljesen megszűnt a relaxáció (Ivic *et al.* 2017). Mindezen eredmények alapján feltételezhető, hogy fontos fiziológiai szerepet játszik a vascularis tónus kialakításában.

Mind a centrális, mind a perifériás ereken kifejtett értágító hatás alapján felvetődött a kérdés, vajon coronariákon is képes-e a PACAP vazodilatátor hatást kifejteni. Coronariák falának simaizomzatában PACAP receptorok jelenléte igazolódott (Chan *et al.* 2011), valamint újszülött sertés szívekben intravénásan adott PACAP hatására coronaria vazodilatációt tapasztaltak (Ascuitto *et al.* 1996). Emellett humán coronaria simaizomsejteken is kimutatták a  $K^+$  (ATP) és  $K^+$  ( $Ca^{2+}$ ) csatornákon keresztül kifejtett PACAP-indukálta vazodilatációt (Bruch *et al.* 1997).

### ***1.1.3. PACAP receptor expresszió a cardiovascularis rendszerben***

Az a megfigyelés, hogy direkt PACAP-infúzió tachycardizáló hatással bír felvetette a kérdést, hogy képes-e ez a peptid közvetlen hatást kifejteni a cardiovascularis rendszerre (Somogyvári-Vigh és Reglődi 2004). Így számos kísérlet középpontjába a receptorkutatás került. Cardiomyocytá sejt kultúrában domináns PAC1 receptor expressziót mutattak ki (Sano *et al.* 2002). Tengerimalacban kimutatták a PACAP szelektív PAC1 receptorokat az intrakardiális neuronokban, később pedig izolált cardiomyocytákban is (Chang *et al.* 2005). Egér myocardiumban a PAC1 receptor molekuláris variánsainak kutatása során sikerült igazolni a PAC1 receptor jelenlétét, és vizsgálták receptor-mediálta hatásait (Ushiyama *et al.* 2006, Hoover *et al.* 2013). További patkányon végzett vizsgálatok igazolták, hogy a PACAP receptorok nem csak a pitvarban, hanem kamrai szívizomzatban is jelen vannak (Wei *et al.* 1996). Hoover és munkatársai kimutatták a PAC1 receptor messenger RNS-ét (mRNS) egér szívből, és nem találtak szignifikáns különbséget a receptor expresszióban a pitvari vagy kamrai, illetve bal vagy jobb szívfélből származó minták között. Ugyanezen vizsgálat bizonyította, hogy a receptorok expressziója független a nyomásviszonyok változásától (Hoover *et al.* 2013). Bár az előbb említett állatkísérletek eredményei támogatták azt a feltételezést, miszerint a PACAP képes közvetlen hatást kifejteni a cardiovascularis rendszerre, azonban napjainkban csak nagyon kevés humán adat áll a rendelkezésünkre a PACAP direkt kardiális hatásait illetően. Elsőként

izolált humán myocardialis trabekulákból sikerült kimutatni mindhárom PACAP receptor mRNS-ét. Nem csak pitvari, hanem bal kamrából származó mintákat is vizsgáltak, és mindkét esetben jelentős receptor-specifikus mRNS expressziót detektáltak (*Saetrum et al. 2001*). Molekuláris bizonyítékkal rendelkezünk már arról, hogy a cardiomyocyták expresszálják a PACAP receptorokat, azonban pontos elhelyezkedésükről keveset tudunk. A PAC1 receptor pontosabb feltérképezésére kutatócsoportunk egy korábbi vizsgálat során ischaemiás szívbetegség vagy billentyűbetegség miatt extracorporalis szívműtetre kerülő betegek szívizommintáját tanulmányozta. Az extracorporalis keringés elindításához szükséges jobb pitvari fülcsé kanülálása során szövetmintát vettünk, hematoxilín-eozin festett metszeteket készítettünk, továbbá ezekkel paralel metszetekből PAC1 receptor immunhisztokémiát végeztünk. Míg az immunfluoreszcens jelölés kimutatta a PAC1 receptor jelenlétét a szívizomsejteken, az endokardiális kötőszövetben nem találtunk PAC1 receptor expressziót (*Szántó et al. 2012*).

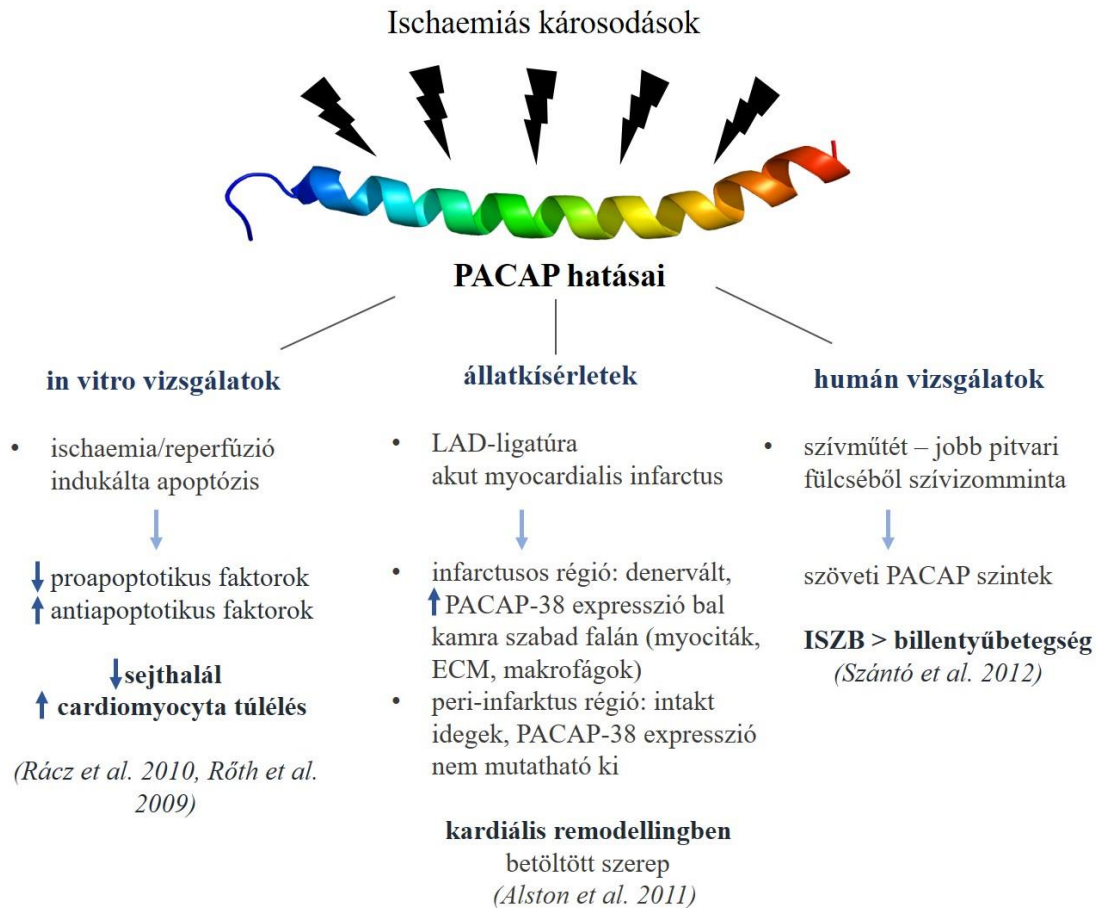


3. ábra: PAC1 receptor vizsgálata jobb pitvari fülcséből származó szívizommintából.  
A) hematoxilín-eozin festett metszett. B) PAC1 receptor immunhisztokémia képe (*Szántó et al. 2012*).

Mindezen eredmények igazolták, hogy a cardiomyocyták jelentős PAC1 receptor expressziót mutatnak, mely receptorokat a szívizomzatot innerváló idegvégződésekből felszabadult vagy az extrinsic forrásokból származó keringésben cirkuláló PACAP képes aktiválni (*Hoover et al. 2013*). A vérben keringő PACAP eredete pontosan nem ismert, azonban legvalószínűbb forrásnak az idegrendszert és az endokrin mirigyeket tekinthetjük, ahol a legmagasabb koncentrációban mutatták ki a PACAP jelenlétét (*Reglődi és Tamás 2016*).

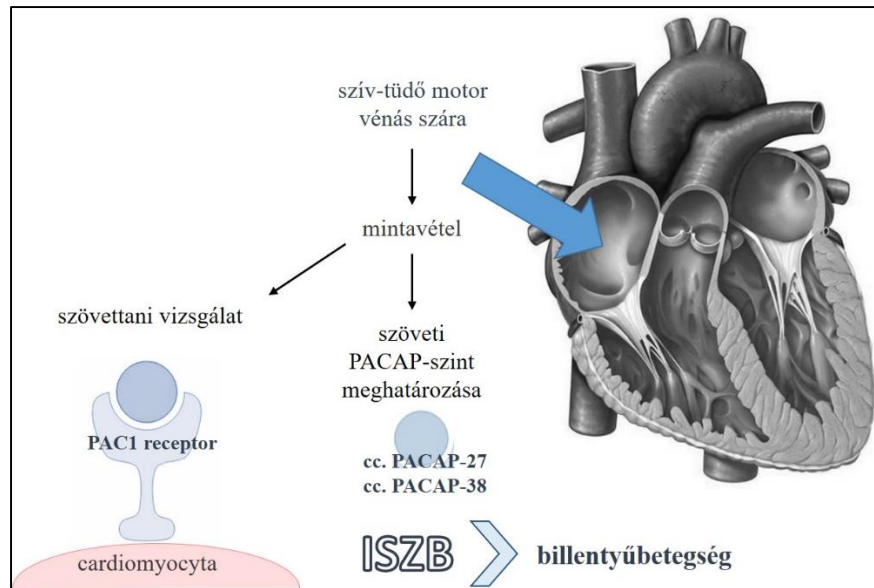
#### **1.1.4. PACAP kardioprotektív hatása az ischaemiás károsodással szemben**

A PACAP az ischaemiával és következményes oxidatív stresszel szemben antiapoptotikus és antioxidáns hatásain keresztül védő hatást fejt ki és kardioprotektív szerepe van (Rácz *et al.* 2008, Róth *et al.* 2009). Kutatócsoportunk izolált cardiomyocita sejt kultúráján ischaemia/reperfúziós károsodás okozta apoptosissal szembeni PACAP védőhatást mutatott ki. Hatvan perces ischaemia, majd 120 perces reperfúziót követően PACAP kezelés hatására csökkent sejthalált, fokozott cardiomyocita túlélést detektáltak. Mindezen hatását a különböző proapoptotikus útvonalak gátlása (Bad, caspase-3), illetve antiapoptotikus utak (Bcl-xL) aktiválása révén fejtette ki (Rácz *et al.* 2008). Egy másik kutatás a PACAP kezelés és a prekondicionálás védő hatását vizsgálta ischaemia/reperfúzió-indukálta cardiomyocita apoptosisban. Mindkét esetben szignifikánsan emelkedett sejttúlélést és jelentős kardioprotektív hatást tapasztaltak, azonban a két módszer hatása nem bizonyult additívnak (Róth *et al.* 2009). Alston és munkatársai egér modellben a bal coronaria elülső leszálló ágának (LAD) ligatúrájával létrehozott mesterséges akut myocardialis infarctus kapcsán vizsgálták a szimpatikus idegaktivitást és PACAP immunoreaktivitást. A bal kamra infarctusos régiójában teljes denervációt észleltek. Továbbá szignifikánsan magasabb PACAP immunoreaktivitást detektáltak a bal kamra szabad falán, a denervált infarctusos régióhoz lokalizálva. PACAP aktivitást igazoltak az extracelluláris mátrixban, myocytákban és a macrophagokban is. A bal kamra peri-infarctusos régiójában intakt idegeket és a Sham-operált állatokhoz hasonló szimpatikus aktivitást észleltek. Azonban ebben a régióban nem tudtak PACAP immunoreaktivitást kimutatni. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a PACAP fontos szerepet tölthet be a kardialis és neuronális remodellingben ischaemia/reperfúziós károsodást követően (Alston *et al.* 2011). Az *in vitro* és állatkísérletes eredmények alapján – melyek a PACAP ischaemiás károsodásokkal szemben kifejtett kardioprotektív hatását igazolták – felmerül a kérdés, hogy milyen szerepe lehet a PACAP-nak a humán cardiovascularis kórképekben (4. ábra).



4. ábra: A PACAP ischaemiás károsodásokkal szemben kifejtett védőhatásainak összefoglalása az eddigi irodalmi adatok alapján. LAD: arteria coronaria sinistra ramus interventricularis anterior, ECM: extracelluláris mátrix.

Kutatócsoportunk korábban humán pitvari fülcséből származó mintákban szignifikánsan magasabb PACAP-38 és PACAP-27 szinteket detektált az ischaemiás szívbetegéknél a billentyűbetegekhez képest (Szántó et al. 2012), mely eredmények szintén alátámasztják a PACAP ischaemiás károsodással szemben kifejtett védőhatásának elméletét (4, 5. ábra). Tekintettel arra, hogy mintáink a jobb pitvari fülcséből származtak, olyan betegeket válogattunk be korábbi vizsgálatunkba, akik ismert pitvari pathológiával (pl. pitvarfibrillatio) nem rendelkeztek, ezzel is kizárva az esetleges befolyásoló tényezőket. Számos állatkísérlet bizonyította, hogy a PAC1 receptor expressziója független a szívüregekben mérhető nyomásviszonyoktól, továbbá a pitvarok és kamrák és a jobb - bal szívfél között sem találtak érdemi különbséget (Wei et al. 1996, Hoover et al. 2013). Így feltételezhető, hogy a szöveti PACAP szinteket sem befolyásolják ezen tényezők.



5. ábra: Extracorporalis keringéses szívműtét során gyűjtött humán szívizomminták vizsgálatának összefoglaló ábrája. Szövettani vizsgálatok során kimutattuk a PAC1 receptorok jelenlétét a cardiomyocyták felszínén. Radioimmunoassay módszerrel meghatároztuk a szívizomminták szöveti PACAP-27 és PACAP-38 szintjét, melynek során ischaemiás szívbetegeknél (ISZB) szignifikánsan magasabb PACAP szinteket detektáltunk a billentyűbetegekhez képest (Szántó et al. 2012).

### 1.1.5. PACAP kardioprotektív hatása szívelégtelenségben

A PACAP kardioprotektív hatását először Sano és munkatársai 2002-ben vetették fel, amikor igazolták, hogy a PACAP fibroblastokban szelektíven gátolja a DNS és protein szintézist és ezáltal csökkenti a myocardialis fibrosist, ugyanakkor myocardialis sejteken ilyen hatást nem fejt ki (Sano et al. 2002). Korábbi tanulmányok eredményei alapján feltételezhető, hogy a PACAP elsősorban olyan cardiovascularis kórképek progressziójára képes hatást kifejteni, melyek kialakulásában az oxidatív stressz és az apoptosis fontos szerepet játszik, mint pl. a szívelégtelenség vagy az ischaemiás szívbetegség (Reglődi és Tamás 2016). Irodalmi adatok szerint a PACAP effektíven védi a cardiomyocitákat az oxidatív stressz által okozott apoptosistól. Ezen hatását izolált sejt kultúrán bizonyították, ahol PACAP kezelés hatására szignifikánsan alacsonyabb caspase-3 aktivitást, valamint szignifikánsan magasabb antiapoptotikus Bcl-2 és foszfo-Bad expressziót írtak le (Gasz et al. 2006a, 2006b). Ugyanezt az antiapoptotikus hatást endothelialis sejteken is kimutatták, ahol PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette a proapoptotikus JNK és p38 MAP-kináz aktivitását oxidatív stressz körülményei között (Rácz et al. 2007).

A doxorubicin által okozott kardiotoxicitás patofiziológiai alapja a mitokondriális antiapoptotikus útvonalak szupressziója és a proapoptotikus bax és caspase-3 útvonalak fokozott expressziója (*Mori et al. 2010*). A szívizomsejteken megtalálható PAC1 receptoron keresztül PACAP hatására a Bax és caspase-3 útvonalak inaktivációja következik be, mely végső soron kardioprotektív hatást eredményez a doxorubicin kardiotoxikus hatásával szemben.

A szívelégtelenség egyik klasszikus állatkísérletes modelljében, doxorubicinnel indukált cardiomyopathiában vizsgálták a PACAP hatását a betegség progressziójára. PACAP-deficiens (heterozigóta és homozigóta) egerekben a doxorubicin által indukált szívelégtelenség súlyosabb lefolyású volt, mint a vad típusban. A PACAP-deficiens egereknél echocardiographiával sokkal súlyosabb bal kamra dilatáció és szignifikánsan alacsonyabb systolés bal kamra funkció igazolódott, valamint mortalitásuk is jelentősen magasabbnak bizonyult a vad típusú egerekhez képest. PACAP hiányában szignifikánsan magasabb – a patofiziológiai folyamatban jelentős szerepet játszó – reaktív oxigén gyök szinteket, s ennek következtében sokkal súlyosabb DNS károsodást, illetve apoptotikus sejtkárosodást detektáltak. Ezek alapján feltételezhető, hogy az endogén PACAP-nak kardioprotektív hatása van a doxorubicin indukálta szívelégtelenségben. Ugyanebben a modellben intraperitoneálisan adott exogén PACAP a heterozigóta PACAP-deficiens egerekben csökkentette az elektronmikroszkóppal kimutatható myofibrillaris károsodást a placebo kezeléshez képest, bár az oxidatív stressz és túlélés tekintetében nem eredményezett szignifikáns javulást (*Mori et al. 2010*). Egy hasonló citosztatikummal végzett másik vizsgálatban igazolták, hogy a PACAP véd a mitoxandron kardiotoxikus hatásával szemben (*Subramaniam et al. 2017*). Otto és munkatársai PAC1 receptor-deficiens egerekben pulmonalis hypertóniát és jobb szívfél elégtelenséget találtak (*Otto et al. 2004*). Az in vitro és állatkísérletes eredmények alapján – melyek a PACAP kardioprotektív hatását igazolták – felmerül a kérdés, hogy milyen szerepe lehet az endogén PACAP-nak a humán akut myocardialis infarctus vagy a különböző etiológiájú szívelégtelenség lefolyásában?

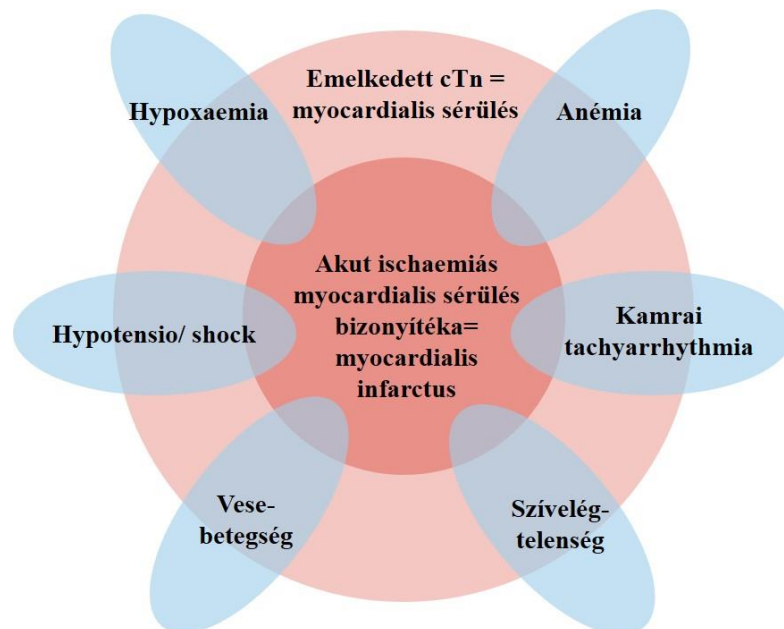
## **1.2. Az általunk vizsgált cardiovascularis kórképek**

Tekintettel a PACAP fent részletezett sokrétű potenciális kardioprotektív hatásaira kutatásunk középpontjába olyan cardiovascularis kórképek kerültek, melyek patomechanizmusában és prognózisában jelentős szereppel bírnak az ischaemiás és/vagy apoptotikus folyamatok, úgy mint az akut myocardialis infarctus (AMI) és a szívelégtelenség.

## 1.2.1. Akut myocardialis infarctus (AMI)

### 1.2.1.1. Akut myocardialis infarctus jellemzői és biomarkerei

Az AMI a legújabb, modern intervencionális technikák ellenére még mindig az egyik legnagyobb közegészségügyi probléma és az egyik vezető halálok a fejlett országokban (*Hartley et al. 2009*). A Nemzeti Infarctus Regiszter adatai alapján 2020-ban több mint 14.000 beteg került osztályos felvételre AMI diagnózisával Magyarországon (*Jánosi 2021*). Az utóbbi évtizedekben számos biomarkert vizsgáltak, melyek szerepet játszanak a diagnózis felállításában, valamint a betegség prognózisának meghatározásában. Ezek közül a magas szenzitivitású kardiális troponin (hs-cTn) alkalmazása terjedt el a legszélesebb körben, kiemelt szerepet betöltve az AMI diagnózisában. Azonban a mai napig nem áll rendelkezésünk gold standard biomarker ezen betegség prognózisának és lefolyásának megítélésére. Az Európai Kardiológiai Társaság legújabb ajánlásában az emelkedett hs-cTn szintet myocardialis sérülésként definiálták. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy az emelkedett troponin szint nem feltétlenül társul kardiális eredetűhez, számos szisztémás betegség (pl. hypoxaemia, anémia, vesebetegség) is eredményezheti (6. ábra). Az ajánlás részletesen kitér az emelkedett hs-cTn értékek mögött álló patológiák komplexitására, az ischaemiás és nem-ischaemiás kórképek elkülönítésének nehézségeire (*Thygesen et al. 2018*).



6. ábra: Emelkedett kardiális troponin érték mögött álló lehetséges kórképek – a myocardialis sérülés spektruma a sértetlen állapottól a myocardialis infarctusig. cTn: kardiális troponin. (*Thygesen et al. 2018 – Magyar Kardiológus Társaság által kiadott hivatalos fordítás*).



A mért értékek interpretációját tovább nehezíti a troponin magas biológiai és analitikai variabilitása és a labormedicinában használt kitek eltérő szenzitivitása (*Thygesen et al. 2018*). Éppen ezért az elmúlt években számos tanulmány foglalkozott potenciális új biomarkerek kutatásával, melyek a már meglévő rutin paramétereket kiegészítve, azok diagnosztikai és prognosztikai értékét erősítik. Puelacher kutatócsoportja a B-típusú natriuretikus peptid (BNP) és hs-cTn értékek együttes diagnosztikai pontosságát vizsgálta myocardialis infarctus miatt hospitalizált betegekben, azonban hs-cTn mellett alkalmazott BNP vizsgálat nem mutatott szignifikáns kiegészítő diagnosztikai előnyt (*Puelacher et al. 2018*). Egy másik kutatás során egy biomarker alapú rizikóstratifikáló pontrendszert hoztak létre C-reaktív protein (CRP), fibrindegradációs termékek, valamint stresszfehérjék szintjének együttes értékelése alapján, melynek célja a coronariabetegségben szenvedők kockázatának megbecslése az esetleges AMI vagy halálos kimenetelű események tekintetében (*Ghasemzadeh et al. 2017*).

#### *1.2.1.2. Akut myocardialis infarctus állatkísérletes modelljei*

Az utóbbi években számos transzlációs tanulmány indult az akut myocardialis infarctus részletes vizsgálatára különböző kísérletes állatmodellek alkalmazásával. Ezen preklinikai vizsgálatok óriási szerepet töltenek be a potenciális új diagnosztikai és terápiás lehetőségek feltérképezésében. Kísérletes MI modellekben leggyakrabban egereket tanulmányoznak a könnyebb hozzáférhetőség miatt, azonban tekintettel kisméretű szívükre jelentős anatómiai eltéréseket mutatnak az emberi coronariákhoz képest, továbbá esetükben a coronaria sclerosis indukció nehezebben kivitelezhető. Ischaemia modellezésére sebészi coronaria ligációt (leggyakrabban a bal elülső leszálló coronaria legkötését), kémiai módszereket (pl. isoproterenol adását) vagy genetikailag módosított (KO= „knock out” vagy transzgenikus) egereket alkalmaznak. Összességében elmondható, hogy a kisállat modellek ismert limitációi és számos erősségük ellenére a nagyállat (első sorban malac) modellek sokkal megbízhatóbbak, tekintettel arra, hogy nagyobb hasonlóságot mutatnak az emberi szív anatómiájához. Ezen modellekben elkülöníthetünk nyitott vagy zárt mellkassal járó beavatkozásokat. Az előbbi csoportba tartoznak a sebészeti műtétek, mint ligáció, constrictor vagy oclusios módszerek, míg zárt mellkas mellett intervencionális katéteres beavatkozásokat végeznek. Az elmúlt évtizedben ezen intervencionális kardiológiai technikák jelentős fejlődésen mentek át, melynek köszönhetően ma már az ischaemia indukciót követően reperfüzió is létrehozható, ezzel tökéletesen modellezve a valódi perkután coronaria intervenciót (PCI) (*Kumar et al. 2016, Baranyai et al. 2017*).

Továbbá malac modellek alkalmasak a különböző pre- és postkondicionálási technikák potenciális kardioprotektív hatásának vizsgálatára is. Az elmúlt évtizedekben számos tanulmány fókuszált a különböző ischaemiás kondicionálási technikákra, melyek ígéretes eredményekről számoltak be ezen módszerek myocardialis ischaemiával vagy reperfúziós károsodással szembeni védő hatásáról AMI után (*Hausenloy et al. 2017*). Az ischaemiás prekondicionálás (IPreC) bizonyítottan csökkenti a myocardialis károsodást. Ezzel szemben az ischaemiás postkondicionálással (IPostC) és ismételt ischaemiás kondicionálással (RIC) kapcsolatban kissé ellentmondásosak az irodalmi adatok (*Hahn et al. 2015, Heusch et al. 2015*). Egy releváns ischaemia/reperfúziós modellben tanulmányozták IPostC és RIC technikák potenciális kardioprotektív hatását in vivo szív MR és ex vivo szövettani vizsgálatokkal. Eredményeik alapján elmondható, hogy ezen kondicionálási technikák a myocardialis nekrosis csökkentése nélkül fejtenek ki protektív hatást a coronaria microvasculaturára (*Baranyai et al. 2017*).

Azonban mindezen kutatások ellenére sem áll rendelkezésünkre olyan biomarker, mely releváns kiegészítő diagnosztikai/ prognosztikai értékkel bír. Az intervencionális kardiológia fejlődésének és a zárt mellkasú malac modellek anatómiai hasonlóságának köszönhetően lehetőségünk nyílik a különböző biokémiai változások, esetleges új biomarkerek vizsgálatára akut myocardialis infarctusban és a reperfúziót követően is.

### 1.2.2. Szívelégtelenség – ischaemiás és nem-ischaemiás etiológiájú cardiomyopathia

A szívelégtelenség egy klinikai szindróma, mely a típusos tüneteivel jellemezhető (nehézlégzés, anasarca, nykturia, palpitáció, csökkent terhelhetőség, étvágytalanság). Ezen tünetek hátterében különböző strukturális és/vagy funkcionális kardiális eltérések állnak, melyek csökkent perctérfogathoz és/vagy emelkedett intrakardiális nyomáshoz vezetnek (*McDonagh et al. 2021*). A szívelégtelenség epidemiológiai jelentőségét az a tény adja, hogy a fejlődő, modern orvostudomány korszakában is egyre magasabb incidenciával, mortalitással és morbiditással bír (*Jameson et al. 2018*). A kórképet az ejekciós frakció (EF) alapján három fő csoportra oszthatjuk: EF<40% - csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenség (HFrEF); EF>50% - megtartott ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség (HFpEF); EF=40-50% - közepes ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség (HFmrEF) (*McDonagh et al. 2021*). A cardiomyopathiak hátterében nagy százalékban coronariabetegség áll, ilyenkor ischaemiás cardiomyopathiáról (ICM) beszélünk (*Sekulic et al. 2019*). Azonban az esetek majdnem felében teljesen ép coronaria-státusz kizárja az ischaemiás eredetet, ezen cardiomyopathiak hátterében számos egyéb kórkép vagy károsító tényező állhat, mint pl. toxémia, alkohol, különböző genetikai eltérések. Ezen szívizombetegségeket összefoglaló néven nem-ischaemiás cardiomyopathianak (NICM) nevezzük (*Cojan-Minzat et al. 2021*). Speciális formája a dilatatív cardiomyopathia (DCM), melynek során a szív valamennyi ürege kórosan kitágul, mely a szívizomrostok megnyúlását és a kamrafalak elvékonyodásához vezet (*McNally és Mestroni 2017*). ICM és NICM esetén is a külső károsító tényezők (ischaemiás vagy oxidatív stressz, cardiomyocita károsodás) és az adaptációs mechanizmusok (neurohumoralis egyensúly felborulása, fokozott szimpatikus aktivitás, apoptózis, fokozott citokin expresszió, különböző immunológiai és inflammatorikus változások) együttes hatására végül kardiális remodelling alakul ki, mely myociták hypertrophiájához, apoptosishoz valamint fokozott intersticiális fibrosishoz vezet (*Jameson et al. 2018*).

A kardiális remodelling hátterében álló egyik legfontosabb folyamat az oxidatív stressz. A reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) és a szuperoxid-dismutáz (SOD) myocita károsodáshoz, apoptosishoz vezetnek, míg a szuperoxid anion ( $O_2^-$ ) csökkenti a myocardium kontrakcióját. A túlzott ROS felszabaduláshoz négy fő ok vezethet: a leukocyták és citokinek interakciója, hypoxia esetén a myocytákban a mitokondriális légzési lánc nem megfelelő működése, a megnövekedett NAD(P)H (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formája) oxidáz reakcióképessége és a xantin-oxidáz fokozott aktivitása (*Tsutsui et al. 2011*). A ROS különböző jelátviteli utakon keresztül (MAP-ERK, PLC) myocita hypertrophiához, majd apoptosishoz vezet. A strukturális változások következtében, a szívizomsejtekben fokozódik a proapoptotikus faktorok expressziója (Bax, Bad),

melyet az antiapoptotikus mechanizmusok (csökkent Bcl-2 szint) nem képesek egyensúlyba hozni és programozott sejthalál következik be. Továbbá a halál receptorok jelátviteli útvonalán, a mitokondriumból felszabaduló citokróm c és az endoplazmatikus retikulumból kiáramló  $Ca^{2+}$  hatására aktiválódik a caspase út is, mely tovább serkenti az apoptózis folyamatát (Gill et al. 2002). Mindemellett bizonyos proinflammatorikus citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ ), chemokinek (monocita chemotacticus protein – MCP-1) és chemokin specifikus neutrofilek (CXC chemokinek) szintje is megemelkedet, mely jól korrelál a szívelégtelenség súlyosságával és prognózisával (Tentolouris et al. 2004, Dusi et al. 2016, Frangogiannis 2019). Mindezen folyamatokon keresztül kialakul a kardiális remodelling myocytá hypertrophiával, apoptosissal és fokozott intersticiális fibrosissal, mely jelentősen csökkent systolés bal kamra funkciót eredményez (Jameson et al. 2018).

A szívelégtelenség diagnózisában és prognózis becslésében nagyon fontos szerepet töltenek be a klinikai tünetek, valamint a különböző tünet orientált funkcionális klasszifikációk (McDonagh et al. 2021). A szívelégtelenség egyik legszélesebb körben elterjedt klasszifikációja a New York-i Kardiológus Társaság (New York Heart Association) által létrehozott funkcionális beosztás, mely nehézlégzést, fáradtságot, palpítációt mint vezető tüneteket veszi alapul (1. táblázat).

<b>Osztályozás</b>	<b>Tünetek</b>
<b>NYHA I.</b>	A fizikai aktivitás nem korlátozott
<b>NYHA II.</b>	A fizikai aktivitás enyhén korlátozott A beteg nyugalomban panaszmentes, de a szokásos fizikai aktivitás nehézlégzést, fáradtságot vagy palpítációt okoz
<b>NYHA III.</b>	A fizikai aktivitás jelentősen korlátozott A beteg nyugalomban panaszmentes, de a szokásosnál enyhébb fizikai aktivitás már tüneteket okoz
<b>NYHA IV.</b>	Bármilyen fizikai aktivitás panaszt okoz A tünetek nyugalomban is jelentkeznek

1. táblázat: A New York-i Kardiológus Társaság (New York Heart Association – NYHA) funkcionális klasszifikációja szívelégtelenségben.

A tünetek mellett a különböző képalkotóknak – különös tekintettel az echocardiographiás vizsgálatra – kiemelkedő fontosságúak a szívelégtelenség diagnosztikájában. A maximális gyógyszeres terápiára adott válasz és az akut kardiális dekompenzációk miatt történt hospitalizáció száma jelentős prognosztikai értékkel bír (McDonagh et al. 2021). Mindezeket egészíti ki a ma már rutin szerint alkalmazott N-terminális pro B-típusú natriuretikus peptid (NT-proBNP) szint

vizsgálata. NT-proBNP szintje nyomás- és volumenterhelés következtében kialakult pitvari és kamrai falfeszülés hatására emelkedik, azonban számos egyéb faktor (életkor, testsúly, pitvarfibrilláció, veseelégtelenség) befolyásolja a szintjét (*Maisel et al. 2008*). Erős negatív prediktív értékkel bír, így a szívelégtelenség kizárására alkalmas, azonban diagnosztikai értéke a súlyos befolyásoló tényezők miatt önmagában nem elég erős, a klinikai tünetekkel együtt értékelendő (*McDonagh et al. 2021*). Szenzitivitása HFpEF-ben kissé csökkent, azonban mindhárom szívelégtelenség csoportban (HFpEF, HFmrEF és HFrEF) alkalmazható (*Gaggin és Januzzi 2013*). Továbbá krónikus szívelégtelenségben megbízható prognosztikai értékkel bír az NT-proBNP mind akut hospitalizáció, mind morbiditás tekintetében (*Spinar et al. 2019*). Ezzel szemben akut dekompenzált szívelégtelenség esetén a magas diagnosztikai érték mellett prognosztikai értéke alacsonyabb, ugyanis a dekompenzációhoz társuló kifejezetten magas intrakardiális nyomások, falfeszülés kapcsán minden esetben magas értékek mérhetők, a hosszútávú kimenetellel ezen szintek nem feltétlenül korrelálnak (*Gaggin és Januzzi 2013*). A PRIMA-II vizsgálat azt is kimutatta, hogy az akut szívelégtelenségben NT-proBNP szint alapján alkalmazott terápia nem javította a 6 hónapos kimenetelt (*Stienen et al. 2018*). A BNP és az NT-proBNP mellett számos új, esetleges additív diagnosztikai vagy prognosztikai értékkel bíró potenciális biomarkerek vizsgálata indult az elmúlt években, mint a középrégiós proatriális natriuretikus peptid (MR-proADM), magas szenzitivitású kardiális troponin (hs-cTn), szolubilis ST2 (sST2), a növekedési-differenciálódási faktor (GDF)-15 és galectin-3 (*Gaggin és Januzzi 2013*). Közülük az sST2 emelendő ki, mely értékét nem befolyásolják olyan gyakori társbetegségek, mint a veseelégtelenség vagy a hypertonia. A legújabb kutatások ígéretes prognosztikai értékéről számolnak be, különös tekintettel HFrEF-ben, de hangsúlyozzák a natriuretikus peptidokkal történő együttes alkalmazását (*Lotierzo et al. 2020*). A klinikai rutinban történő alkalmazásához azonban további vizsgálatok szükségesek.

Számos tanulmány igazolta, hogy a myocardiumban fennálló perzisztáló gyulladás, a proinflammatorikus citokinek következményes upregulációja jelentős szereppel bírhat a szívelégtelenség patomechanizmusában és progressziójában. Az 1990-es évek óta vizsgálják az úgynevezett „citokin hipotézist”, mely alapján a szívelégtelen betegek plazmájában a cardiomyocyták, fibroblastok és endothelialis sejtek által termelt magasabb citokin (pl. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18) szintek mérhetőek. Az elmélet szerint ezen citokin szintek nem csak a szívelégtelenség súlyosságával, hanem a betegség prognózisával is jól korrelálhatnak (*Li et al. 2021*). Azonban a különböző citokinekre és antiinflammatorikus ágensekre fókuszáló klinikai vizsgálatok eredményei ellentmondásosak (*Levick és Goldspink 2014, Hanna és Frangogiannis 2020*). A hipotézist igazoló tanulmányok mellett sok esetben nem igazolódtott a citokinek megbízható

biomarker funkciója, sőt egyes antiinflammatorikus target terápiás kutatások a várt állapotjavulás helyett fokozott mortalitást és progressziót írtak le (*Chung et al. 2003*).

Az a klinikai megfigyelés, mely szerint HFrEF betegek hasonló paraméterek (NYHA stádium, EF és NT-proBNP szintek) ellenére a maximális gyógyszeres kezelésre eltérően reagálnak, felvetik potenciális új biomarkerek szükségességét a pontosabb prognosztikai becslések, s ezáltal személyre szabott, optimális kezelés beállítása érdekében.

## 2. Célkitűzés

Az alapkutatói eredmények alapján két olyan epidemiológiai szempontból releváns kardiológiai kórképet vizsgáltunk, az akut myocardialis infarktust és a csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégteliséget, melyekben a patomechanizmusuk alapján a PACAP-38 jelentős szereppel bírhat. Transzlációs vizsgálat keretein belül arra kerestük a választ, hogy ezekben a kórképekben kimutatható-e szignifikáns különbség a beteg és a kontroll csoportok plazma vagy szöveti PACAP-38 szintjei között. Továbbá kerestük az esetleges összefüggéseket PACAP-38 szintek és a jelenleg használt prognosztikai biomarkerek között.

### 2.1. Acut myocardialis infarctus vizsgálata

#### 2.1.1. Szöveti PACAP-38 szintek vizsgálata akut myocardialis infarctus sertés modelljében

Acut myocardialis infarctus tanulmányozására egy klinikailag releváns, zárt mellkasú malac AMI modelltől származó különböző myocardialis (bal kamrai, bal és jobb pitvari) szövetmintákat vizsgáltunk a következő kérdésekre keresve a választ:

- Detektálható-e szignifikáns különbség PACAP-38 szintekben a Sham operált állatok különböző szívterületekről vett (bal kamrai, bal és jobb pitvari) szívizommintái között?
- Mérhető-e szignifikáns különbség PACAP-38 szintben a Sham operált és a myocardialis infarctuson, majd reperfúzió után átesett állatok különböző szívizommintái között?
- Kimutatható-e szignifikáns különbség PACAP-38 szintben a myocardialis infarctuson átesett állatok különböző szívterületekről vett (bal kamrai, bal és jobb pitvari) szívizommintái között a reperfúziót követő 3 és 72 óra múlva?
- Van-e hatása a különböző pre- és postkondicionálási technikáknak a szöveti PACAP-38 szintre?

#### 2.1.2. Plazma PACAP-38 szintek vizsgálata STEMI betegekben

Az állatkísérletes eredmények alapján egy humán vizsgálatot indítottunk, melyben ST-elevációval járó myocardialis infarctus (STEMI) miatt hospitalizált betegek plazma PACAP-38 szintjét vizsgáltuk, a következő célkitűzésekkel:

- A betegek plazma PACAP-38 szintjének meghatározása a perkután coronaria intervenciót megelőzően, majd az azt követő 4, 24 és 48 órában.
- A betegek plazma PACAP-38 szintjének és plazma hs-cTn szintek közötti összefüggések vizsgálata.
- További korrelációs vizsgálatok végzése a PACAP-38 és számos rutin laborparaméter, echocardiographiás paraméter, társbetegségek és a STEMI előtt regulárisan szedett gyógyszerek között.

## **2.2. Szívelégtelenség, ischaemiás (ICM) és nem-ischaemiás cardiomyopathia (NICM) vizsgálata**

### **2.2.1. Szívelégtelen betegek vérmintáinak vizsgálata**

Vizsgálatunk másik célcsoportja a különböző etiológiájú cardiomyopathia miatt gondozásra járó krónikus szívelégtelenek (HFrEF), továbbá kardiális dekompenzáció miatt akut osztályos felvételt igénylő betegek voltak.

- Elsőként vizsgáltuk a PACAP-38 szintjét krónikus, kompenzált szívelégtelen betegekben, valamint azt, hogy mutat-e szignifikáns összefüggést a szívelégtelenség prognosztikai markerével az NT-proBNP szintekkel?
- Ezt követően egy nagyobb vizsgálat keretein belül akut és krónikus szívelégtelen betegek plazma PACAP-38 szintjét határoztuk meg.
  - Megvizsgáltuk, hogy van-e szignifikáns különbség az akut dekompenzált, a krónikus kompenzált betegek és egészséges kontrollok plazma PACAP-38 szintje között?
  - Az esetleges összefüggések kimutatása céljából korrelációs vizsgálatokat végeztünk a PACAP-38, NT-proBNP szintek, különböző laborparaméterek, echocardiographiás paraméterek, társbetegségek és az alkalmazott gyógyszeres terápia között.
  - Megvizsgáltuk mindhárom csoport (akut, krónikus szívelégtelen, egészséges kontroll) különböző citokin szintjét, és kerestük az esetleges összefüggés a citokin és PACAP-38 szintek között.



### 2.2.2. Humán szívizomzat vizsgálata

Végstádiumú szívelégtelenség miatt szívtranszplantáción átesett betegek és egészséges, balesetben elhunyt egyének szívizomzatából vett minta homogenizátumát vizsgáltuk. Arra kerestük a választ, hogy szívelégtelenségben szenvedők szöveti PACAP-38 szintje és PAC1 receptor expressziója szignifikánsan eltér-e az egészségesekétől?

- A rendelkezésre álló laboratóriumi paraméterekkel és társbetegségekkel kerestük a lehetséges összefüggéseket.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Akut myocardialis infarctus vizsgálata

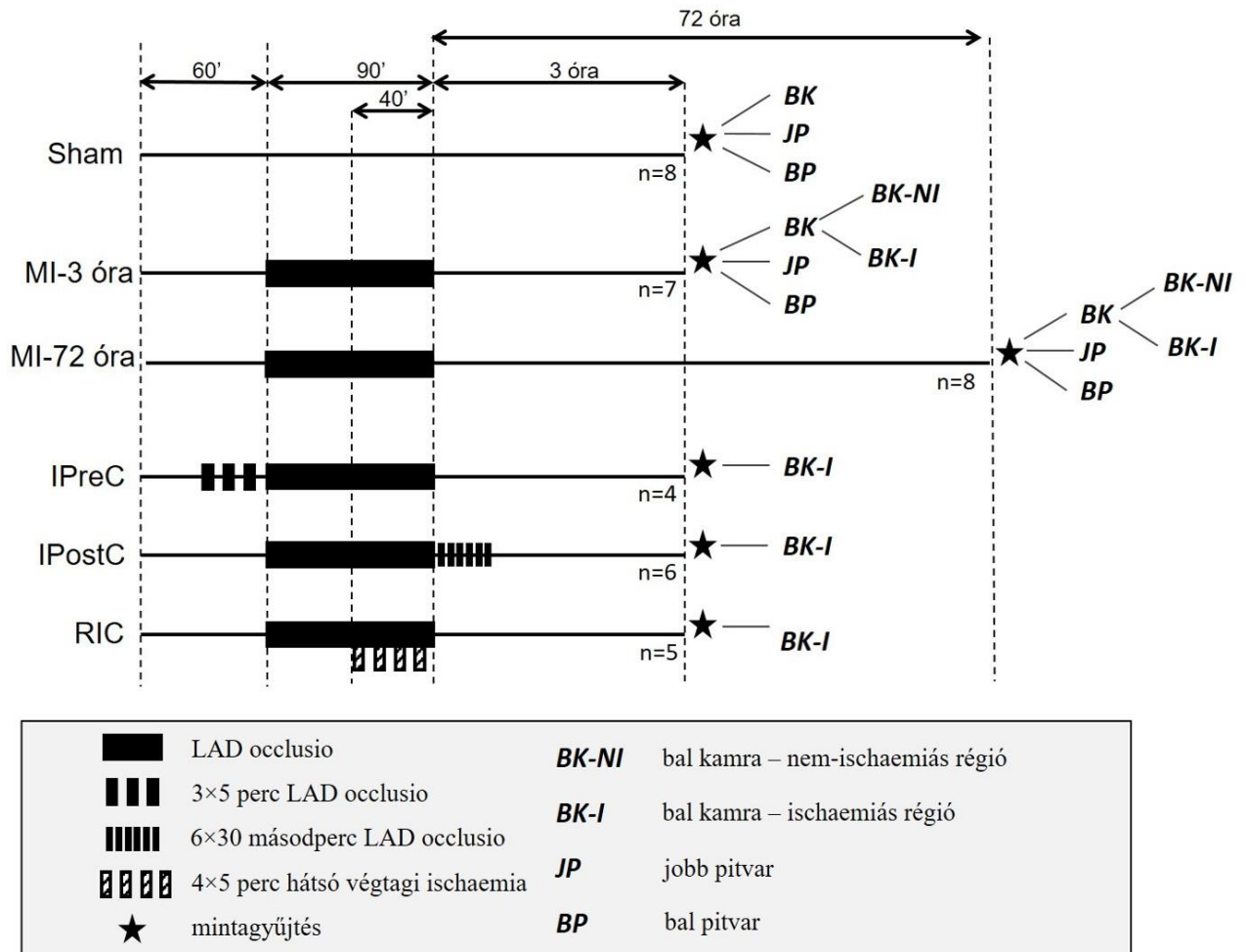
##### 3.1.1. Szöveti PACAP-38 szintek vizsgálata akut myocardialis infarctus sertés modelljében

Zárt mellkasú reperfúziós akut myocardialis infarctus sertés modellben 38 nőtény sertést vizsgáltunk kollaborációban a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetének munkatársaival. A vizsgált állatokat 5 csoportba osztottuk:

- Sham-operált csoport (Sham): egy ballon katétert helyeztünk az arteria coronaria sinistra ramus interventricularis anterior ágába (left anterior descending= LAD), de a ballont nem fűjtük fel, így myocardialis ischaemia nem alakult ki (n= 8).
- Myocardialis infarctus (MI) csoport: a LAD artéria elzárásával 90 perces ischaemiát indukáltunk, melyet három óra reperfúzió követett (n= 7).
- Ischaemiás prekondicionált csoport (IPreC): prekondicionálásként 3x5 perc ischaemiát hoztunk létre a ballonkatéter intermittáló felfújásával, majd a 90 perces LAD occlusiot végeztünk (n= 4).
- Ischaemiás postkondicionált csoport (IPostC): 90 perces LAD occlusiot követően a reperfúzió kezdetekor 6x30 másodpercig tartó intermittáló myocardialis ischaemiát indukáltunk (n= 6).
- Ismételt ischaemiás kondicionált csoport (remote ischemic condition= RIC): 4x5 perc intermittáló hátsó végtagi ischaemiát hoztunk létre a 90 perces LAD occlusio során. Az első ciklust 50 perccel a myocardialis ischaemia kezdetét követően indukáltuk (n= 5).

Az állatokat 3 órával a reperfúziót követően túlaltattuk, majd myocardialis szövetmintákat gyűjtöttünk a szív különböző részeiből. Minden állattól két bal kamrai (BK) mintát vizsgáltunk: az MI csoport esetében az egyik minta a bal kamra ischaemiás régiójából (MI-BK-I), a másik minta pedig a bal kamra nem-ischaemiás régiójából (MI-BK-NI) származott. A Sham csoportban szintén két BK mintát vizsgáltunk, mely minták az MI állatok BK-I és BK-NI mintáinak megfelelő régiókból származtak. Továbbá mind az ischaemiás, mind pedig a Sham állatokból a bal és jobb pitvarból is mintavétel történt (7. ábra).

Kísérletünk második részében a MI csoport állatait 72 óra reperfúzió után áldoztuk fel (n= 8), majd szövetmintákat gyűjtöttünk a bal kamra ischaemiás és nem-ischaemiás régióiból, valamint a bal és jobb pitvarból (7. ábra).



7. ábra: A zárt mellkasú reperfúziós akut myocardialis infarctus sertés modell kísérleti felosztása. Sham: Sham-operált állatok, MI-3 óra: myocardialis infarctus csoport 3 órás reperfúzióval, MI-72 óra: myocardialis infarctus csoport 72 órás reperfúzióval, IPreC: ischaemiás prekondicionált csoport, IPostC: ischaemiás postkondicionált csoport, RIC (remote ischemic conditioning): ismételt ischaemiás kondicionált csoport.

A szövetmintákat az eltávolítást követően folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk, porítottuk, majd további felhasználásig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on Eppendorf csövekben (AHN Biotechnologie, Nordhausen, Németország) tároltuk. A vizsgálatokhoz 30 mg fagyasztott szívizommintát használtunk, amihez 500  $\mu\text{L}$  jéghideg foszfáttal pufferolt sóoldatot (PBS) és 14  $\mu\text{g}$  proteáz inhibitor (aprotinint) tartalmazó oldatot mértünk, majd mintákat ultrahangos feltáró (szonikátor) segítségével

jégen homogenizáltuk. A szonikáláshoz Hielscher UP 200 H/S típusú homogenizátort (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Németország) használtunk, tekintettel arra, hogy az előtesztelés során ez bizonyult a leghatékonyabbnak a kézi homogenizáló Mini Potter-Elvehejm (VWR és Kartell, forgalmazó: VWR Internaitonal Kft. Budapest, Magyarország) és a Bead Mill homogenizáló (típus: MINILYS, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Franciaország) alkalmazásával szemben. A szövetek feltárása 3x30 másodpercig tartó, 30%-os amplitúdójú pulzáció leadásával történt. A szonikálást követően a homogenizátumot lecentrifugáltuk (10.000 rpm, 4 °C, 15 perc), majd a felülúszóból „szendvics”-típusú enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálattal (ELISA) határoztuk meg a szöveti PACAP-38 koncentrációt.

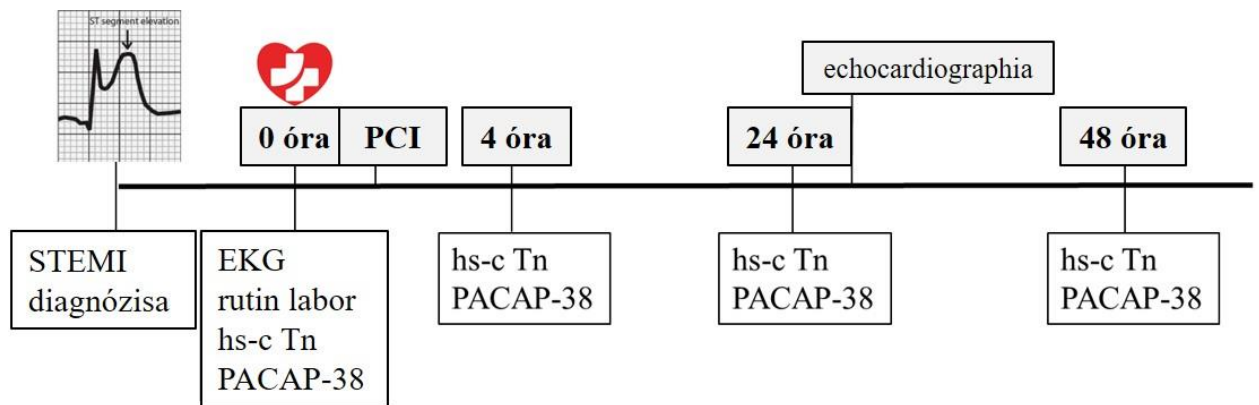
### **3.1.2. Myocardialis infarctus klinikai vizsgálatának menete**

Klinikai vizsgálatunkba 20 ST-elevációval járó myocardialis infarctus (STEMI) miatt hospitalizált beteget és 12 kontroll személyt vontunk be. A betegek a panaszok kezdetét követően átlagosan 4-6 órával kerültek klinikánkra STEMI diagnózisával. Osztályos felvételnél minden betegnél a 12-elvezetéses EKG elkészítését, a vérvételt és a rutin fizikális vizsgálatot követően azonnal coronarographia történt, mely során minden esetben sikeres perkután coronaria intervenciót (PCI) végeztünk egy vagy több gyógyszerkibocsátó stent beültetésével. A beavatkozást követően betegeink az intenzív osztályra kerültek további ellátás céljából. A vizsgálati protokollunk szerint minden betegről négy alkalommal történt vérvétel: először közvetlenül a PCI előtt (0. óra), majd 4, 24 és 48 órával PCI után. Az első vérvétel során 3x10 ml perifériás vérmintát gyűjtöttünk [natív, EDTA (etiléndiamin-tetraecetsav) és citrát-tartalmú csövekbe] a magas szenzitivitású cardialis troponin (hs-cTn) szint meghatározáshoz és a rutin laboratóriumi vizsgálatokhoz. A gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek (szérum C-reaktív protein [CRP] szint), vesefunkciós értéket (szérum kreatinin és kreatin-kináz), teljes vérkép és lipid szintek (szérum összkoleszterin, alacsony denzitású lipoprotein [LDL], magas denzitású lipoprotein [HDL] és triglicerid [TG]) vizsgálatát a Pécsi Tudományegyetem Laboratóriumi Medicina Intézete végezte.

A plazma PACAP-38 szintek meghatározásához egy további vérvétel történt, amihez 10 ml-es EDTA tartalmú vérvételi csöveket alkalmaztunk. A PACAP-38 polipeptid természete miatt ezen vérmintákhoz minden esetben proteáz inhibitor adtunk (200 µl 1,4 mg/mL koncentrációjú aprotinin törzsoldat 10 ml vérhez), majd a mintákat jégfürdőbe helyezve szállítottuk el a kutató laboratóriumba, hogy elkerüljük a neuropeptid degradációját. A vérvételt követően az EDTA-

csöveket azonnal lecentrifugáltuk (4000 rpm, 4°C, 15 perc), majd a plazmát tartalmazó felülúszót polipropilén csövekbe mértük (Sarstedt, Budapest) és -80°C-on tároltuk az ELISA mérésekig. A további három vérvétel (4, 24 és 48 órás) során egy natív és egy EDTA-csövet használtunk fel a troponin és a PACAP-38 szintek meghatározására. Huszonnégy órával a PCI után egy hordozható ultrahang géppel (Philips Cx50 – Philips, Amsterdam) echocardiographiás vizsgálatot végeztünk abból a célból, hogy meghatározzuk a bal kamra funkciót (ezáltal az infarctus súlyosságát) és kizárjuk az esetleges komplikációkat. A betegeknél rutin 2-dimenzionális (2D), M-mód, Doppler és szöveti Doppler vizsgálatokat is végeztünk. A bal kamrai systolés funkciót jellemző ejekciós frakció meghatározására a Simpson módszert alkalmaztuk (8. ábra).

A vizsgálatunkból összesen négy beteget zártunk ki: kettőnél malignus kamrai ritmuszavar miatti reanimáció, kettő esetben pedig súlyos pneumonia miatt. A kontroll csoportba olyan betegeket vontunk be, akik angina pectoris iránydiagnózissal kerültek klinikánkra elektív szívkátétrezésre, azonban az elvégzett coronarographia a coronaria lézió lehetőségét, így az ischaemiás szívbetegséget kizárta. A kontroll betegek vérvétele az infarctusos betegekhez hasonlóan történt. Indikáció hiányában ebben a csoportban nem mértünk hs-cTn szinteket, feltételezhetően ezen értékek alacsonyabbak voltak, mint 14 ng/mL. A humán minták gyűjtése a Regionális Kutatásetikai Bizottság engedélyével történt (PTE KK 6383). Minden résztvevő részletes tájékoztatást követően írásos beleegyező nyilatkozat aláírásával járult hozzá a vizsgálatok elvégzéséhez.



8. ábra: Myocardiális infarctus klinikai vizsgálatának protokollja. STEMI: ST-elevációval járó myocardiális infarctus, EKG: electrocardiographia, labor: laborvizsgálat, hs-cTn: magas szenzitivitású kardiális troponin.

### **3.1.3. PACAP-38-szerű immunoreaktivitás (PACAP-38-LI) mérése ELISA módszerrel sertés szívmintákból és emberi plazma mintákból**

A PACAP-38-LI meghatározása a sertés myocardialis szövet-homogenizátumokból és a humán plazma mintákból „szendvics”-típusú enzim immunoassay módszerrel történt (humán PACAP-38 ELISA kit, MyBiosource, Cat.No: MBS109020), a cég által részletesen leírt protokollnak megfelelően. Értekezésemben a PACAP-38-LI megfelel a PACAP-38 szintnek.

AZ ELISA vizsgálat során először 50 µL PACAP-38 standard oldatot, valamint 50 µL sertés szívsvövet-homogenizátumot, a MI betegek és kontrollok plazma mintáit mértük be duplikátumban a 96 lyukú, anti-PACAP-38 antitesttel érzékenyített mikrolemez megfelelő lyukaiba, majd 100 µL torma-peroxidázzal konjugáltatott anti-PACAP-38 detektáló reagenst adtunk a mintákhoz. A lemezt lefedtük és 60 percig 37°C-on inkubáltuk. Az inkubáció után a lemezt 4 alkalommal 200 µL/lyuk mosóoldattal átöblítettük. Ezt követően minden lyukba 50 µL kromogén oldat „A”-t és 50 µL kromogén oldat „B”-t pipettáztunk, majd a megfelelő színreakció kialakulásához a lemezt sötétbe helyezve, 37°C-on további 15 percig inkubáltuk. Ötven µL leállító (stop) oldat hozzáadásával az enzim-reakciót leállítottuk. A keletkező színes termék optikai denzitásának (OD) mérése SPECTROStar nano-spektrophotometer (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) segítségével történt 450 nm-es hullámhosszon. Mivel a detektált optikai denzitás arányos a vizsgált minták PACAP-38 szintjével, így azok koncentrációja a standard görbe OD értéke alapján meghatározható. A vizsgált plazmaminták PACAP-38 szintjét pg/mL mértékegységben adtuk meg. A malacok szöveti mintájának vizsgálata során relatív PACAP-38 szinteket határoztunk meg, amit a minták mért PACAP-38 koncentrációjának és a kontrollként használt, Sham operált állatok bal kamrájából származó átlagos PACAP-38 szintek hányadosából számoltuk. Ezen értékeket a kontroll csoport eredményeinek %-os arányában adtuk meg.

## **3.2. Szívelégtelen betegek vizsgálata**

### **3.2.1. Szívelégtelenség miatt kezelt betegek vérmintáinak vizsgálata**

#### **3.2.1.1. Különböző stádiumú DCM betegek plazma PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata**

DCM miatt kezelt betegek vizsgálata során elsőként krónikus, kompenzált szívelégtelen betegek plazma PACAP-38 szintjét mértük. Előzetes felmérésünkhöz 41 DCM miatt klinikánk ambulanciáján gondozott, 40% alatti ejekciós frakcióval bíró, krónikus szívelégtelen beteget

vizsgáltunk meg. Etiológia alapján primer (n= 9) és ischaemiás (n= 33) DCM csoportra osztottuk őket.

A rutin vérvétel során minden betegtől az általános laboratóriumi vizsgálatokhoz és az NT-proBNP szint meghatározásához három (két 10 ml-es és egy 5 ml-es) natív csőbe, továbbá a PACAP-38 szint meghatározásához egy 10 ml-es EDTA-t tartalmazó csőbe vettünk vért. Mivel a PACAP-38 polipeptid természetéből adódóan enzimatis degradációra érzékeny, ezért a proteázok gátlására minden esetben proteáz inhibitor alkalmaztunk (200 µl 1,4 mg/mL koncentrációjú aprotinin törzsoldat 10 ml vérhez). Az EDTA-s vérminták centrifugálását követően (4000 rpm, 20 °C, 15 min) a felülúszót polipropilén (Sarstedt, Hungary) csövekbe átmértük és további felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A plazmát tartalmazó felülúszók egyik részéből radioimmunoassay (RIA) módszerrel (*Jakab et al., 2004*) vizsgáltuk a PACAP-38-szerű immunoreaktivitást, a felülúszók másik részéből pedig a Laboratóriumi Medicina Intézet közreműködésével, kemilumineszcencia-módszerrel határoztuk meg az NT-proBNP szinteket.

### *3.2.1.2. Akut, dekompenzált és krónikus kompenzált szívelégtelen ICM és NICM betegek, valamint nem-szívelégtelen kontroll csoport PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata*

További, kibővített HFrEF vizsgálatunkba 13 akut dekompenzált (átlag életkor:  $66,5 \pm 3,7$  év, 33% nő, 77% férfi), 33 krónikus, kompenzált szívelégtelen beteg (átlag életkor:  $65,9 \pm 3,8$  év, 34,3% nő, 75,7% férfi) és 13 nemben és korban illesztett kontroll páciens (átlag életkor:  $65,8 \pm 4,0$  év, 31% nő, 69% férfi) került bevonásra. A csökkent systolés funkcióval járó szívelégtelenség definíciójának megfelelően betegeink ejekciós frakciója minden esetben 40% alatt volt. Az akut szívelégtelen csoportba olyan ICM vagy NICM miatt gondozás alatt álló betegeket válogattunk, akik akut kardiális dekompenzáció tünetei (nehézlégzés, csökkent fizikai terhelhetőség, NYHA III-IV stádium) miatt akut hospitalizációt igényeltek. Ezzel szemben a krónikus szívelégtelen betegcsoportba sorolt pácienseink reguláris kontroll vizsgálatra érkeztek ambulanciánkra, kardiális státuszuk kompenzált volt (NYHA I-II stádium). Kontroll csoportként olyan nemben és korban illesztett betegeket választottunk, akik hipertonia vagy atipikus mellkasi fájdalom miatti kivizsgálásra érkeztek klinikánkra. Ebben a csoportban az echocardiographiás vizsgálat sem strukturális, sem funkcionális szívbetegséget nem igazolt, az ejekciós frakció minden esetben 55% feletti értéket mutatott, továbbá a coronarographiás vagy coronaria CT vizsgálat az esetleges ischaemiás szívbetegség lehetőségét kizárta.

A laboratóriumi vizsgálatok során minden esetben 3 különböző csőbe (natív, citrátos és EDTA-tartalmú) gyűjtöttünk perifériás vért a gyulladási paraméterek (C-reaktív protein), vesefunkció (szérum kreatinin, karbamid), vérkép és lipid értékek (összkoleszterin, LDL, HDL és triglicerid) meghatározására. A betegcsoportokban további 1 natív cső vérvétel történt a plazma NT-proBNP szintek meghatározása céljából. Az összes laborvizsgálat a Pécsi Tudományegyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében történt.

A PACAP-38 szintek meghatározásához szükséges plazmák gyűjtését, feldolgozását és tárolását a korábbi leírásnak megfelelően végeztük el.

A mintavételek a Regionális Kutatásügyi Bizottság engedélyével történtek (PTE KK 6383), minden páciens a megfelelő tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozatot írt alá.

### 3.2.1.3. PACAP-38-szerű immunoreaktivitás meghatározása RIA módszerrel

A RIA vizsgálatokhoz használt PACAP-38 specifikus poliklonális antitestet Arimura és munkatársai állították elő nyulakban, karbodimiddel marha tireoglobulinhoz konjugált szintetikus peptid immunizálással („88111-3”-as számú antiszérum, munkahígítás: 1:10.000) (Arimura 1992). A mérésekhez standardként a PTE Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet által előállított <sup>125</sup>I izotóppal jelölt birka PACAP-38 antigént használtunk, 0-1000 fmol/mL tartományban. Assay pufferként 1 mL 0,05 mol/l koncentrációjú (pH=7,4) foszfát puffert alkalmaztunk. Az oldat összetevői az alábbiak voltak: 0,25 % (w/v) BSA (Bovine Serum Albumin – marha szérum albumin), 0,1 mol/l NaCl valamint 0,05 % (w/v) NaN<sub>3</sub>. Az inkubációs elegy 100 µL PACAP-38 standardot vagy a mérni kívánt mintát, 100 µL „88111-3” PACAP antiszérumot, 100 µL <sup>125</sup>I izotóppal jelölt PACAP 24-38 antigént és assay puffert tartalmazott, melyet 4°C-on 48-72 óráig inkubáltuk. Ezt követően 100 µL szeparáló oldattal (összetétele: 10 g mosott szén, 1 g dextrán, 0,5 g zsírmentes tejpor, 100 mL desztillált víz) az antitesthez kötött jelölt antigén frakciót elválasztottuk a szabad jelölt peptidektől, majd a csöveket lecentrifugáltuk (3000 rpm, 4°C, 15 min) és a felülúszót leöntöttük. A szénhez kötött szabad frakció radioaktivitását NZ310-típusú spektrométeren, gammaszámlálóval mértük, majd ebből kiszámoltuk az antiszérumhoz kötött radioaktivitást. A minták PACAP-38-szerű immunoreaktivitását a mérési adatokból kalkulált, antiszérumhoz kötött radioaktivitási adatok alapján, standard kalibrációs görbéről olvastuk le (Csanaky *et al.* 2012).



#### 3.2.1.4. PACAP-38 ELISA

A plazma PACAP-38 szintek meghatározása az akut myocardialis infarctuson átesett betegeknel részletezett módszerrel (3.1.3. PACAP-38-szerű immunoreaktivitás (PACAP-38-LI) mérése ELISA módszerrel) megegyező módon történt.

#### 3.2.1.5. Pro- és antiinflammatorikus citokin szintek vizsgálata Luminex immunoassay segítségével

Hét különböző pro- és antiinflammatorikus citokin (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) koncentrációját 9 egészséges kontroll és 31 szívelégtelen beteg (akut n= 12, krónikus n= 19) plazma mintájában vizsgáltuk. A citokoin koncentrációk meghatározása magas szenzitivitású Invitrogen™ ProcartaPlex™ Human 7-plex panel (Thermo Fisher Scientific, Bécs, Ausztria) Luminex kittel történt a cég által részletesen leírt protokollnak megfelelően. Minden mérést duplikátumban végeztünk el. Elsőként a kit komponenseit szobahőmérsékleten felmelegítettük, majd a felolvasztott plazma mintákból és a hígított citokin standard oldatokból 25  $\mu$ L-t pipettáztunk a 96-lyukú mikrolemezre, ami 25  $\mu$ L citokin-specifikus antitesttel bevont fluoreszcens gyöngyöt tartalmazott. A lemezt 2 óráig szobahőn inkubáltuk. Kétszeri öblítést követően 25  $\mu$ L biotinilált szekunder (detektáló) antitest oldatot pipettáztuk a lemezre, majd 30 percig szobahőn inkubáltuk. Ismételt mosási lépéseket követően 50  $\mu$ L streptavidin-PE oldatot adtunk a lemez lyukaihoz. 30 perces inkubálás után a lemezt ismét átmostuk. A végső mosás után 120  $\mu$ L detektáló puffert adtunk a mintahelyekhez, majd a lemezt Luminex MagPix array reader segítségével olvassuk le. Az egyes citokinekhez tartozó standard görbék felvétele 5-parameteres logisztikus (5-PL) regressziós görbe alapján történt. Az adatokat a Belysa 1.1.0. (Merck KGaA; Darmstadt, Németország) szoftver segítségével analizáltuk. A kalkulált citokin koncentrációkat pg/mL mértékegységben fejeztük ki.

#### 3.2.2. Emberi szívizomminta vizsgálata

Az emberi szívizomminták gyűjtése a varsói Cardinal Stefan Wyszyński Institute of Cardiology, Department of Heart Failure and Transplantology osztályon történt a korábban leírtaknak megfelelően (Varga *et al.* 2017). Kontroll csoportként olyan szervdonorokból gyűjtöttek egészséges szívizommintákat (n= 12) akiknél a szíveket technikai okokból (pl. donor/recipiens inkompatibilitás) nem tudták felhasználni. A szervdonorok nem rendelkeztek releváns kardiológiai előzménnyel, kóros EKG- vagy echocardiographiás eltéréssel (normál tartományon belüli bal kamrai paraméterek és kontraktilitás). A transzplantáció során eltávolításra került szívek ischaemiás (n= 12) vagy nem-

ischaemiás (n= 11) cardiomyopathia (ICM vagy NICM) talaján kialakult végstádiumú szívelégtelen betegetől származtak.

A myocardialis mintavétel az explantáció időpontjában történt a bal kamra szabad falából, kerülve a heges, fibrotikus területeket, zsírszöveteket, endocardiumot, epicardiumot vagy a coronariákat. A szövetmintákat sóoldatos öblítést követően folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztották és további felhasználásig -80 °C-on tárolták.

A vizsgálatokat az emberi kísérletekkel foglalkozó felelős intézeti és nemzeti bizottságok etikai normáinak megfelelően hajtották végre, a Helsinki Nyilatkozatban foglaltak betartásával (1975). Protokoll-szerűen, megfelelő tájékoztatást követően minden páciens beleegyező nyilatkozatot írt alá. A kutatásetikai protokollt a Cardinal Stefan Wyszyński Institute of Cardiology helyi Etikai Bizottsága engedélyezte (IK-NP-0021-24/1426/18).

#### *3.2.2.1. Emberi szívizomminták szöveti PACAP-38 szintjének vizsgálata*

A humán szívizommintákat a sertések mintáihoz hasonlóan, a 3.1.1-es pontban leírtaknak megfelelően készítettük elő, majd az így kapott szöveti homogenizátumok PACAP-38 szintjét a 3.1.3 pontban leírtakkal megegyező módon, „szendvics”-típusú ELISA módszerrel végeztük el.

#### *3.2.2.2. PAC1 receptor vizsgálata emberi szívizommintákban*

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a PAC1 receptor mennyiségének fehérje szintű változását, Western blot analízist végeztünk a korábban leírtaknak megfelelően (*Baranyai et al. 2015*). Ennek során a fagyasztott szívizommintákat radioimmunprecipitációs teszt pufferoldatában homogenizáltuk (RIPA; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US), amit HALT proteáz és foszfatáz inhibitoros oldattal egészítettünk ki (Thermo Scientific, Waltham, MA). Minden mintából azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó oldatot negyed annyi,  $\beta$ -merkaptoetanol tartalmú (Thermo Scientific, Waltham, MA) Laemmli puffer oldattal kevertünk össze. Az így kapott elegyből a fehérjék elválasztása 4-20%-os nátrium-dodecil-szulfátot tartalmazó grádiens poliakrilamid gélelektroforézissel történt (Bio-Rad, Hercules, CA, US), állandó feszültségen. Az elválasztott fehérjék polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra történő átvitelét Trans-Blot® Turbo™ Transfer rendszer (Bio-Rad, Hercules, CA, US) segítségével végeztük el. A membrán nem-specifikus kötőhelyeinek telítésére 5 %-os marha szérum albumint alkalmaztunk (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 0,05%-os Poliszorbát-20 tartalmú Tris pufferált sóoldatban (0,05% TBS-T; Sigma, St. Louis, MO, US) szobahőmérsékleten, 2 órán keresztül. Ezután a PVDF membránt PAC1-receptor ellenes primer antitesttel (anti-ADCYAP1R1/PAC1: 1:2500, cat. No: SAB2900695, Sigma, St. Louis, MO, US;

GAPDH: 1:10000, cat. No: 2118, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át. Háromszori 0,05%-os TBS-T oldatos öblítést követően a membránt HRP-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk (anti-rabbit: 1:5000, cat. No: 7074; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) két órán keresztül, majd ismételt TBS-T oldatos öblítést alkalmaztunk. Az antigén-antitest komplexek kimutatására Chemidoc XRS+ kemilumineszcencia kitérő (Bio-Rad, Hercules, CA, US) használtunk. A denzitometriás analízisek Image Lab™ program (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével történtek.

### 3.3. Statisztikai elemzések

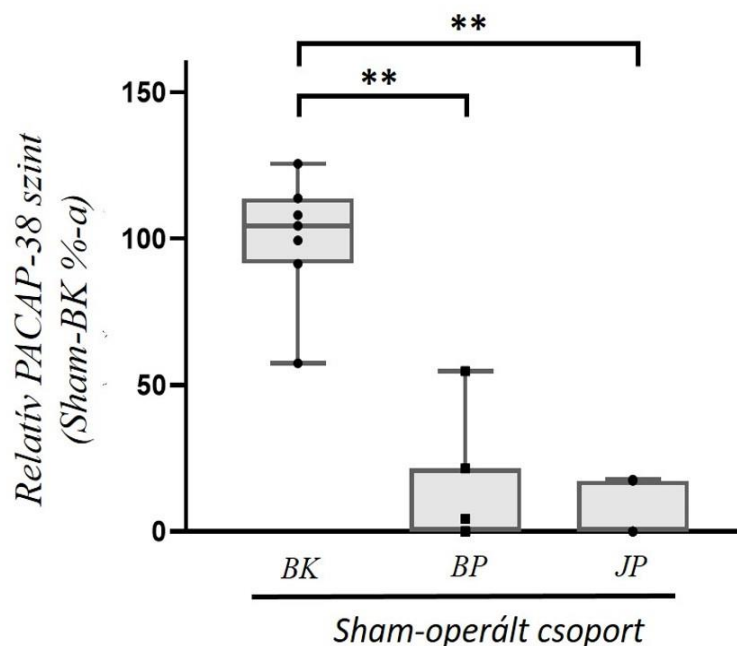
Statisztikai analíziseket az SPSS 22 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) programmal végeztük. Minden esetben először Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk normalitás tesztet végeztünk az adatok normál eloszlásának vizsgálatára. A csoportok közötti különbségek vizsgálatára (pl. különböző malac szívizomrészek között, akut vs. krónikus szívelégtelenség, ischaemiás vagy nem-ischaemiás cardiomyopathia vs. kontroll csoportok) egyutas ANOVA tesztet végeztünk esetszámtól függően Tukey vagy Bonferioni post-hoc teszttel kiegészítve. STEMI vizsgálatunk során a plazma PACAP-38 változásokat Friedman, majd Wilcoxon post-hoc teszttel igazoltuk. Szöveti PAC1 receptor intenzitásának meghatározásakor a különböző etiológiájú betegek (ICM – NICM) és az egészséges kontrollok közti különbséget Mann-Whitney teszttel vizsgáltuk. Kutatásunk során számos paraméter (PACAP-38, troponin, NT-proBNP, C-reaktív protein (CRP), rutin laborparaméterek, echocardiographiás paraméterek, társbetegségek, gyógyszeres és eszközös terápia) közötti interakciót vizsgáltunk Spearman-korrelációs teszt segítségével. A korrelációs koefficiens (r érték) alapján különböző erősségű pozitív ( $r = 0-1$ ) és negatív ( $r = -1-0$ ) korrelációt különítettünk el. Továbbá multivariancia analízist végeztünk a különböző befolyásoló tényezők esetleges additív hatásának vizsgálatára többszörös lineáris regresszió alkalmazásával. Minden esetben  $p < 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak. Sertésmodellek szöveti PACAP szintjének vizsgálatakor a malacokra jellemző, jelentős individuális PACAP szintbeli szórás kiküszöbölésére relatív PACAP értékekkel (%) számoltunk. Ezen értékek a mért szöveti PACAP-38 szintek kontroll minták (= a Sham-operált bal kamrai minták átlagának) PACAP-szintjéhez viszonyított százalékos aránya. Kutatásunk második felében, végstádiumú szívelégtelenség miatt transzplantáción átesett betegek szívizommintáinak vizsgálatakor a PAC1 receptor intenzitás meghatározásánál relatív PAC1 receptor intenzitással számoltunk, melyet a PAC1 receptor denzitási adatok gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) denzitásra történő normalizálással kaptuk meg.

## 4. Eredmények

### 4.1. Akut myocardialis infarctus vizsgálata

#### 4.1.1. Szöveti PACAP-38 szintek vizsgálata akut myocardialis infarctus sertés modelljében

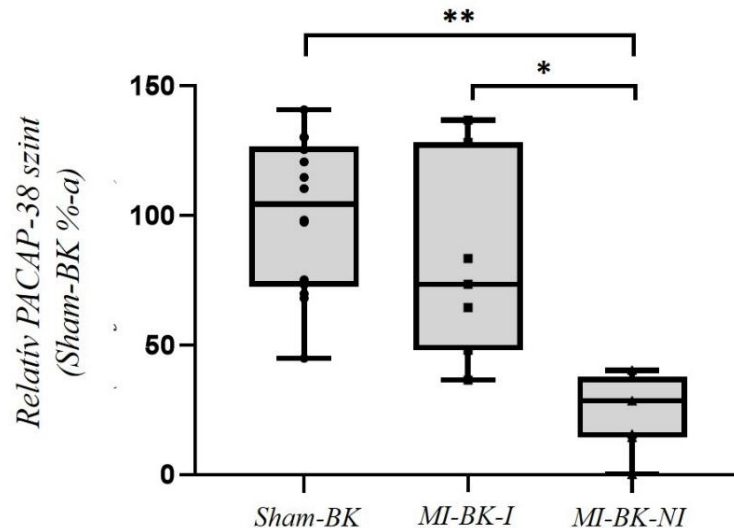
A szöveti PACAP-38 szintek detektálásra elsőként azon Sham-operált sertés szíveket vizsgáltuk, melyek nem esetek át myocardialis infarctuson (MI), összehasonlítva a bal kamrai (BK), jobb és bal pitvari (JP, BP) mintákat. Szignifikánsan magasabb ( $p < 0,001$ ) PACAP-38 szinteket mértünk a bal kamrában mindkét pitvarhoz képest (9. ábra).



9. ábra: PACAP-38 szintek a különböző szívüregekben. Egészséges, Sham-operált állatokban a szöveti PACAP-38 szint szignifikánsan magasabb volt a bal kamrában (BK), mint a bal (BP) vagy jobb pitvarban (JP). A „box plot” diagram az interkvartilis terjedelmet és a medián értékeket szemlélteti. Az individuális értékeket fekete pont vagy négyzet ábrázolja. Statisztikai analízis egyutas ANOVA, Tukey post-hoc teszt alkalmazásával történt. \*\*  $p < 0,001$  vs. Sham-operált csoport BK.  $n=7-8$ .

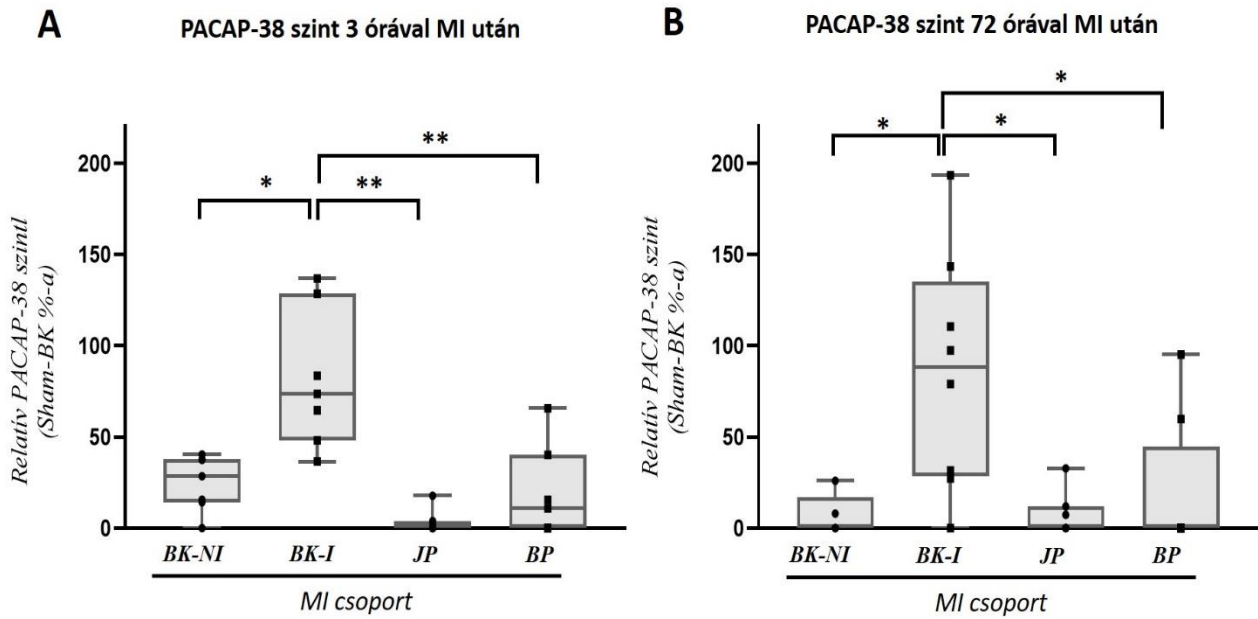
Ezt követően a bal kamra különböző régióiból származó bal kamrai szövetminták PACAP-38 szintjét határoztuk meg a Sham és MI csoportban is. Minden állattól két BK mintát vizsgáltunk: az MI csoport esetében az egyik minta a bal kamra ischaemiás régiójából (MI-BK-I), a másik minta a bal kamra nem-ischaemiás régiójából (MI-BK-NI) származott. A Sham csoportban szintén két BK mintát vizsgáltunk, mely minták az MI állatok BK-I és BK-NI mintáinak megfelelő régiókból

származtak. A Sham csoportban nem találtunk szignifikáns különbséget a két BK régióból vett minták között ( $p = 0,902$ ), így ezen mintákat egy csoportként kezeltük, mint Sham-BK csoport. Ugyan az ischaemiás BK (MI-BK-I) és a Sham-BK minták relatív PACAP-38 szintje között nem találtunk szignifikáns különbséget, a nem-ischaemiás BK (MI-BK-NI) minták PACAP-38 szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mind az ischaemiás régióhoz (MI-BK-I) ( $p = 0,040$ ), mind a kontroll állatok BK (Sham-BK) mintájához képest ( $p < 0,001$ ) (10. ábra).



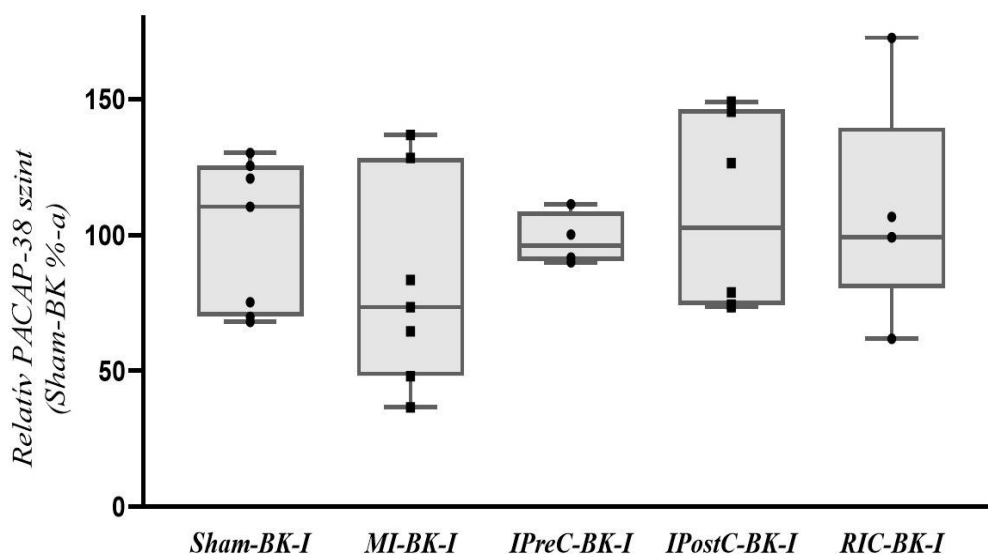
10. ábra: A szöveti PACAP-38 szintek közötti különbség a különböző bal kamrai minták között Sham-operált állatokban (Sham) és myocardialis infarctuson, majd 3 órás reperfúzió után átesett (MI) állatokban. Az adatokat a Sham-BK PACAP-38 szintjének százalékos értékeként tüntettük fel. A „box plot” diagram az interkvartilis terjedelmet és a medián értékeket szemlélteti. Az individuális értékeket fekete pont, négyzet vagy háromszög ábrázolja. Statisztikai analízis egyutas ANOVA, Tukey post-hoc teszt alkalmazásával történt. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  vs. Sham-BK csoport.  $n=7$ .

A myocardialis infarctuson átesett (MI) sertés csoportban összehasonlítottuk a különböző szívüregek és kamrafal részek PACAP-38 szintjeit. Bal kamrai ischaemiás (BK-I) és nem-ischaemiás (BK-NI), bal (BP) és jobb pitvari (JP) mintákat vizsgálatunk két modellben: a 90 perces ischaemiát követően 3 és 72 órás reperfúzió alkalmazásával. Szignifikánsan alacsonyabb ( $p < 0,001$ ) PACAP-38 szintet mértünk a nem-ischaemiás BK régióban (BK-NI) az ischaemiához (BK-I) képest a 3 órás reperfúziós csoportban (11.A. ábra). Továbbá mindkét pitvarban (BP, JP) mért PACAP-38 szint szignifikánsan alacsonyabb volt az ischaemiás BK mintákhoz (BK-I) képest ( $p < 0,001$ ). A 72 órás reperfúziós csoportban hasonló tendenciát figyeltünk meg: alacsonyabb BK-NI ( $p = 0,012$ ) és pitvari PACAP-38 szinteket (BP:  $p = 0,014$ ; JP:  $p = 0,025$ ) mértünk ebben a kísérletben is a BK-I mintákhoz képest (11.B. ábra).



11. ábra: Szöveti PACAP-38 szintek összehasonlítása a különböző szívüregekben és kamrai falrészletekben 3 órával (A) és 72 órával (B) a myocardialis infarctus (MI) után. A „box plot” diagram az interkvartilis terjedelmet és a medián értékeket szemlélteti. Az individuális értékeket fekete pont vagy négyzet ábrázolja. Statisztikai analízis egyutas ANOVA, Tukey post-hoc teszt alkalmazásával történt. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  vs. BK-I csoport.  $n=7-8$ .

A különböző ischaemiás kondicionálási technikák esetleges hatását is vizsgáltuk a szöveti PACAP-38 szintekre (12. ábra). Bal kamrai ischaemiás régióból származó mintákat vizsgáltunk myocardialis infarctuson átesett, pre- post- vagy ismételt ischaemiás kondicionálást alkalmazva. Nem volt szignifikáns különbség ( $p > 0,05$ ) a három különböző kondicionálási technika között (12. ábra).



12. ábra: Szöveti PACAP-38 szintek közötti különbségek Sham-operált (Sham), myocardialis infarctuson (MI) átesett állatok ischaemiás kondicionálási technikák alkalmazása nélkül (MI-BK-I) és ischaemiás prekondicionálás (IPreC), ischaemiás postkondicionálás (IPostC), ismételt ischaemiás kondicionálás (RIC) alkalmazásával. A különböző BK ischaemiás régióból származó minták között nem volt detektálható szignifikáns különbség. A „box plot” diagram az interkvartilis terjedelmet, medián értékeket és az extrém értékeket szemlélteti. Az individuális értékeket fekete pont vagy négyzet ábrázolja. Statisztikai analízis egyutas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt alkalmazásával történt.  $n=4-8$ .

#### 4.1.2. Plazma PACAP-38 szintek vizsgálata STEMI betegekben

Tizenhat STEMI diagnózissal klinikánkra felvett beteget (6 nő, 10 férfi, átlag életkor:  $60,3 \pm 2,96$  év) és 12 kontrollt (7 nő, 5 férfi, átlag életkor:  $48,2 \pm 5,34$  év) vontunk be a vizsgálatunkba. Betegeink rizikófaktorait, társbetegségeit, culprit coronaria léziót, a korábbi gyógyszeres terápiát és a legfontosabb echocardiographiás paramétereiket 2. táblázat foglalja össze.

betegszám	16
dohányzás	50% dohányzó, 12.5% korábban dohányzott
hypertonia	56,25%
diabetes mellitus	25%
hyperlipidemia	31,25%
obezitás	43,75%
ismert ischaemiás szívbetegség	12,5%
kulprit coronaria lézió	a. coronaria sinistra ramus interventricularis anterior ( <b>LAD</b> ) – 31.25% a. coronaria sinistra ramus circumflexus ( <b>Cx</b> ) – 12.5% a. coronaria dextra ( <b>RCA</b> ) – 56.25%
korábbi gyógyszeres terápia	ACE gátló/ ARB – 62.5 % β receptor blokkoló – 43.75% thrombocyta aggregáció gátló – 43.75% statin/ fibrát terápia – 43.75% antianginás kezelés – 18.75%
kardiális funkció (echocardiographiás paraméterek)	bal kamrai ejekciós frakció ( <b>BK-EF</b> ): 49,19% (±10,6) bal kamrai végdiastolés térfogat ( <b>BK-EDV</b> ): 135.12 mL (±33.8) bal kamrai végsystolés térfogat ( <b>BK-ESV</b> ): 71.81 mL (±25.8)

2. táblázat: STEMI-n átesett betegek legfőbb demográfiai és klinikai jellemzői (rizikófaktorok, társbetegségek, culprit coronaria lézió, korábbi gyógyszeres terápia, legfontosabb echocardiographiás paraméterek). (ACE=angiotenzin-konvertáló enzim, ARB: angiotenzin-II receptor blokkoló gyógyszer)

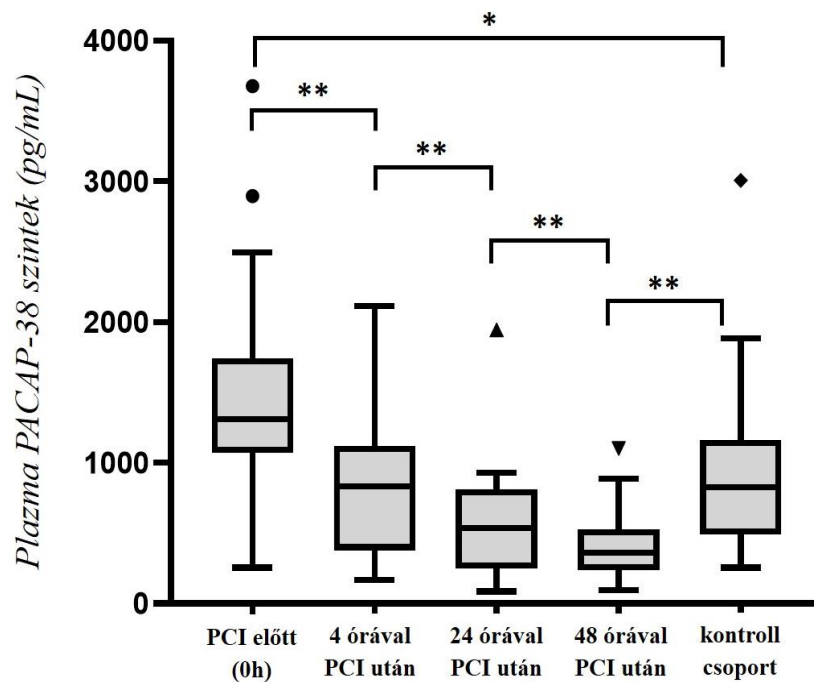
A kontroll csoportba olyan klinikánkon vizsgált betegeket vontunk be, akik típusos vagy atípusos mellkasi panasszal érkeztek, azonban az elvégzett coronarographiás vizsgálat ép coronariákat igazolt szűkület/ plakk nélkül. A mellkasi panasz hátterében 70%-nál muscolosceletalis betegség, 30%-nál pedig pszichoszomatikus betegség állt. A kontroll csoport legfőbb demográfiai és klinikai jellemzőit (rizikó faktorok, társbetegségek, korábbi gyógyszeres kezelés) a 3. táblázat foglalja össze.



betegszám	12
dohányzás	8,3% dohányzó
hypertonia	33,3%
diabetes mellitus	16,7%
hyperlipidemia	33,3%
obezitás	25,0%
korábbi gyógyszeres terápia	ACE-gátló/ARB — 25,0% β receptor blokkoló — 16,7% thrombozyta aggregáció gátló — 16,7% statin/fibrát terápia — 0% antianginás gyógyszerek — 0%

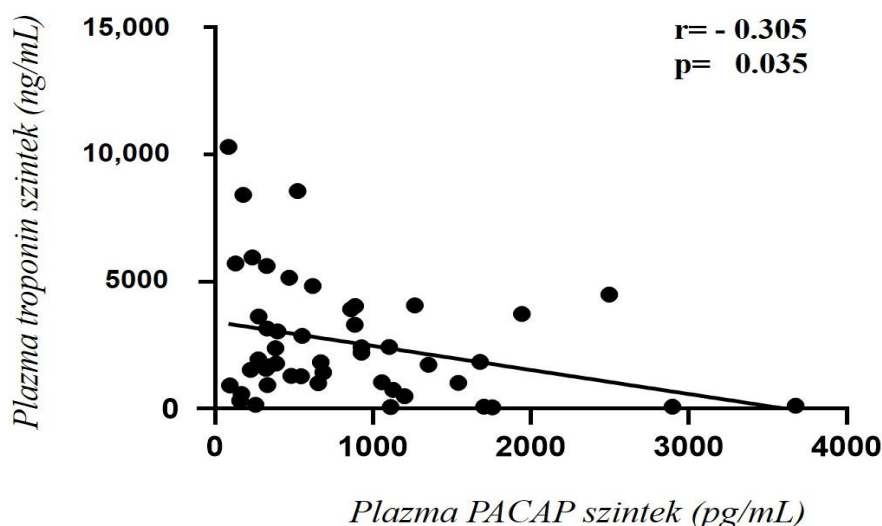
3. táblázat: A kontroll csoport legfőbb demográfiai és klinikai jellemzői (rizikó faktorok, társbetegségek, korábbi gyógyszeres kezelés). (ACE=angiotenzin-konvertáló enzim, ARB: angiotenzin-II receptor blokkoló gyógyszer)

A STEMI-n átesett betegek plazma PACAP-38 szintjének vizsgálatakor szignifikánsan magasabb értékeket mértünk az ischaemiás periódusban, a PCI előtt, majd ezt követően szignifikáns csökkenést figyeltünk meg. Szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szinteket mértünk 4 órával a PCI után a kiindulási értékekhez képest ( $p < 0,001$ ), majd a PACAP-38 szint folyamatosan csökkent a vizsgált periódusban: a 24 órás PACAP-38 szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a 4 órás értékekhez képest ( $p < 0,001$ ), valamint a 48 és 24 órás minták között is szignifikáns különbséget detektáltunk ( $p < 0,001$ ). A kontroll csoport plazma PACAP-38 szintjéhez viszonyítva is szignifikánsan magasabb szinteket mértünk a STEMI-n átesett betegek 0 órás plazma mintáiban ( $p = 0,037$ ). A 48 órás értékek azonban szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a kontroll csoportéhoz képest ( $p = 0,009$ ) (13. ábra).



13. ábra: Plazma PACAP-38 szintek változása STEMI-n átesett betegekben és kontroll csoportban. A „box plot” diagram az interkvartilis terjedelmet, medián értékeket és az extrém értékeket szemlélteti. A percentilisen kívül eső értékek fekete kör, háromszög vagy rombusz ábrázolja. Statisztikai analízis során Wilcoxon Rank-Sum tesztet valamint a kontroll csoporttal történő összehasonlítás esetén egyutas ANOVA, Tukey post-hoc tesztet alkalmaztunk.  $**p < 0,001$ ,  $*p < 0,05$ .

Szignifikáns ( $p = 0,035$ ) negatív korrelációt ( $r = - 0,305$ ) detektáltunk az összes plazma PACAP-38 és troponin szintek között a STEMI csoportban (14. ábra). Azonban, ha az időben illesztett értékeket külön-külön vizsgáltuk, nem találtunk szignifikáns összefüggést a PACAP-38 és troponin szintek között (0 óras értékek:  $r = - 0,191$ ,  $p = 0,478$ , 4 óras értékek:  $r = - 0,364$ ,  $p = 0,301$ , 24 óras értékek:  $r = - 0,185$ ,  $p = 0,492$ , 48 óras értékek:  $r = - 0,176$ ,  $p = 0,513$ ).



14. ábra: A plazma PACAP-38 és troponin szintek közötti korreláció STEMI-n átesett betegekben. Statisztikai analízist Spearman-féle korrelációs teszttel végeztük.  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak.

A myocardialis infarctussal összefüggő legfontosabb echocardiographiás paramétereket is vizsgáltuk, úgy mint a bal kamrai ejekciós frakció, a bal kamrai végdiastolés átmérő, a mitralis regurgitáció mértéke, a különböző falmozgászavarokat jellemző szemikvantitatív falmozgás index (WMSI: wall motion score index). Ezen echocardiographiás paraméterek és a kiindulási PACAP-38 szintek között nem találtunk szignifikáns összefüggést, továbbá multivariancia analízis sem mutatott additív hatást a különböző paraméterek és a PACAP-38 értékek között (4. táblázat).

Echocardiographiás paraméterek	Korrelációs koefficiens (r)	szignifikancia (p)
ejekciós frakció (EF - %)	$r = -0,059$	$p = 0,829$
BK-EDD (mm)	$r = 0,308$	$p = 0,246$
mitralis regurgitáció (I-IV fokú)	$r = -0,095$	$p = 0,726$
falmozgás index (WMSI)	$r = 0,250$	$p = 0,926$

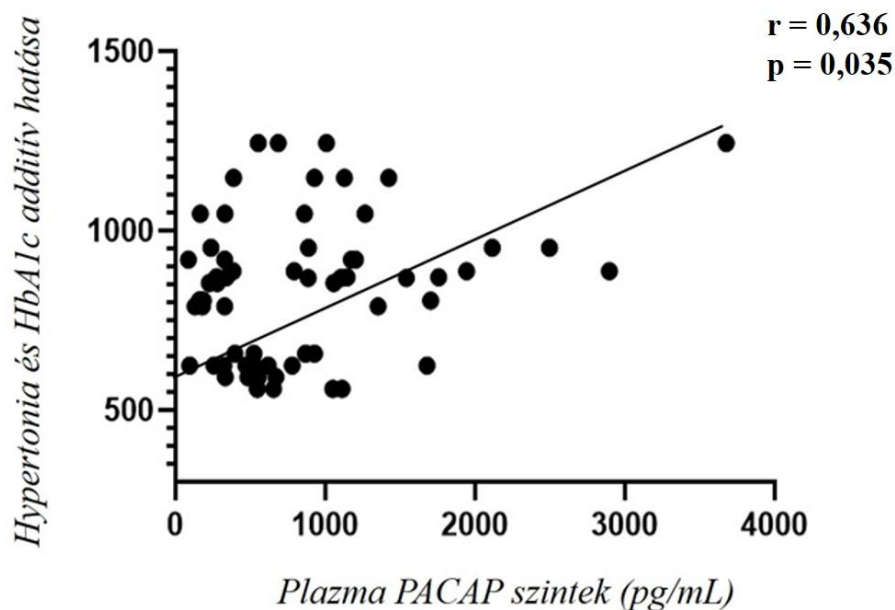
4. táblázat: Különböző echocardiographiás paraméterek és plazma PACAP-38 szintek közötti korreláció. Statisztikai analízist Spearman-féle korrelációs teszttel végeztük.  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak. BK-EDD: bal kamrai végdiastolés átmérő, WMSI: wall motion score index.

Megvizsgáltuk a STEMI fő rizikófaktorait (hypertonia, diabetes mellitus, hemoglobin A1c (HbA1c) szint és dohányzás) és a kiindulási PACAP-38 szintek közötti potenciális összefüggéseket is. Szignifikáns ( $p = 0,034$ ) pozitív korrelációt ( $r = 0,533$ ) detektáltunk a hypertonia és PACAP-38 szintek között. Ezzel szemben a többi vizsgált rizikófaktorral nem találtunk összefüggést (5. táblázat).

STEMI fő rizikófaktorai	Korrelációs koefficiens (r)	szignifikancia (p)
életkor	$r = 0,162$	$p = 0,368$
hypertonia	$r = 0,533 *$	$p = 0,034$
diabetes mellitus	$r = -0,157$	$p = 0,563$
hemoglobin A1c (HbA1c)	$r = 0,201$	$p = 0,456$
dohányzás	$r = -0,143$	$p = 0,598$

5. táblázat: STEMI főbb rizikófaktorai és a kiindulási PACAP-38 szintek közötti korreláció. Statisztikai analízist Spearman-féle korrelációs teszttel végeztük.  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak.

Multivariancia analízis vizsgálattal a különböző rizikófaktorok esetleges additív hatását elemeztük, melynek során hypertonia és magas HgbA1c érték együttes jelentős szignifikáns ( $p = 0,035$ ) pozitív korrelációja ( $r = 0,636$ ) igazolódott a plazma PACAP-38 szintekkel (15. ábra). Ezzel szemben a kontrol csoportban sem individuális, sem pedig additív effektus nem igazolódott ezen két rizikófaktor PACAP-38 szintekre gyakorolt hatására vonatkozóan.



15. ábra: Hypertonia és hemoglobin A1c (HbA1c) additív befolyásoló hatása és a plazma PACAP-38 szintek közötti összefüggés STEMI-n átesett betegekben. Statisztikai analízist Spearman-féle korrelációs teszttel végeztük.  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak.

A rutin laborparaméterek (vérzsírok: összkoleszterin, LDL, HDL és TG; CRP) és a plazma szintek közötti összefüggések vizsgálatakor nem találtunk szignifikáns korrelációt a vizsgált paraméterek között (6. táblázat). Multivariancia analízis sem mutatott additív hatást a különböző laborparaméterek PACAP-38-ra kifejtett esetleges befolyásoló effektusára vonatkozólag.

Rutin laborparaméterek	Korrelációs koefficiens (r)	Szignifikancia (p)
összkoleszterin	$r = -0.127$	$p = 0.640$
LDL	$r = -0.015$	$p = 0.957$
HDL	$r = 0.100$	$p = 0.712$
triglicerid	$r = -0.027$	$p = 0.922$
CRP	$r = 0.163$	$p = 0.546$

6. táblázat: Rutin laborparaméterek és plazma PACAP-38 szintek közötti összefüggések. LDL: alacsony denzitású lipoprotein, HDL: magas denzitású lipoprotein, CRP: C-rekativ protein. Statisztikai analízist Spearman-féle korrelációs teszttel végeztük.  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak.

Betegeink STEMI előtt, korábbi antiischaemiás gyógyszeres kezelésének esetleges PACAP-38-ra kifejtett hatását is vizsgáltuk, azonban nem találtunk szignifikáns korrelációt a különböző gyógyszerek és a kiindulási plazma PACAP-38 szintek között (7. táblázat). Multivariancia analízis nem igazolt additív hatást a gyógyszerek PACAP-38-ra kifejtett együttes effektusával kapcsolatban.

<b>Korábbi gyógyszeres terápia</b>	<b>Korrelációs koefficiens (r)</b>	<b>Szignifikancia (p)</b>
ACE gátló/ ARB	r = 0,252	p = 0,346
β-blokkoló	r = -0,254	p = 0,342
thrombocytá aggregáció gátló	r = -0,039	p = 0,130
statin/fibrát kezelés	r = -0,308	p = 0,246
antianginás gyógyszerek	r = 0,041	p = 0,880

7. táblázat: Betegeink korábbi antiischaemiás gyógyszeres kezelése és a kiindulási plazma PACAP-38 szintek közötti összefüggések. Statisztikai analízist Spearman-féle korrelációs teszttel végeztük.  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak. ACE: angiotenzin konvertáz enzim, ARB: aniotenzin-receptor blokkoló.

## 4.2. Szívelégtelenség, ischaemiás cardiomyopathia (ICM) és nem-ischaemiás cardiomyopathia (NICM) vizsgálata

### 4.2.1. Szívelégtelen betegek vérmintáinak vizsgálata

#### 4.2.1.1. Különböző stádiumú szívelégtelen betegek plazma PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata

PACAP-38 és a szívelégtelenség közötti összefüggések vizsgálatakor elsőként arra kerestük a választ, hogy kimutatható-e dilatatív cardiomyopathia miatt gondozott krónikus szívelégtelen betegek plazmájából a PACAP-38, és ha igen, ezen szintek mutatnak-e bármiféle korrelációt a DCM fontos markereivel, mint az NT-proBNP vagy az EF. Kezdeti vizsgálatunkba 42 DCM miatt gondozott beteget (átlagéletkor:  $64,4 \pm 5,7$  év, 83,3% férfi, 16,7% nő) vontunk be. Az ismert szívbetegség mellett betegeink 73,4%-a hypertonia, 40,5%-a diabetes mellitus miatt is kezelés alatt álltak. Azonban az elvégzett korrelációs analízis nem mutatott szignifikáns összefüggést ezen társbetegségek és a plazma PACAP-38 szintek között ( $p > 0,05$ ). Továbbá a nem, az életkor és számos rutin laborparaméterrel végzett vizsgálat sem igazolt szignifikáns korrelációt a PACAP-38 szintekkel (8. táblázat).

	<b>Korrelációs koefficiens (r)</b>	<b>Szignifikancia (p)</b>
életkor	$r = 0,015$	$p = 0,438$
nem	$r = 0,037$	$p = 0,101$
<b>Társbetegségek</b>		
hypertonia	$r = 0,020$	$p = 0,990$
diabetes mellitus	$r = 0,098$	$p = 0,373$
<b>Rutin laborparaméterek</b>		
összcholeszterin	$r = 0,024$	$p = 0,550$
LDL	$r = 0,107$	$p = 0,798$
HDL	$r = 0,067$	$p = 0,981$
triglicerid	$r = 0,022$	$p = 0,574$
karbamid	$r = 0,123$	$p = 0,881$
kreatinin	$r = 0,063$	$p = 0,437$

8. táblázat: PACAP-38 szintet potenciális befolyásoló tényezők vizsgálata. LDL: alacsony denzitású lipoprotein, HDL: magas denzitású lipoprotein, CRP: C-rekativ protein. Statisztikai analízist Spearman-féle korrelációs teszttel végeztük.  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak.

Etiológia alapján két csoportra bontottuk betegeinket: egy ischaemiás DCM csoportra (n= 9), amikor a szívelégtelenség háttérében egyértelmű coronariabetegség, pl. egy korábbi myocardialis infarctus állt fent, továbbá egy primer DCM csoportra (n=33), amikor a coronariabetegség, illetve más oki tényező – pl. mérgezés, alkohol – egyértelműen kizárható volt. PACAP-38 és NT-proBNP szintek közötti összefüggések vizsgálatakor a primer DCM betegcsoportban nem találtunk szignifikáns korrelációt ( $r = 0,19$ ,  $p = 0,06$ ). Ezzel szemben az ischaemiás DCM csoportban szignifikáns negatív korrelációt detektáltunk a két vizsgált marker között a különböző súlyossági csoportokban. Enyhe szívelégtelenség esetén (NT-proBNP < 500 pg/ml) szignifikáns erős negatív korreláció ( $r = - 0,834$ ,  $p = 0,039$ ), közepes súlyosságú szívelégtelenség esetén (NT-proBNP= 500-3000 pg/ml) közepesen erős negatív korreláció ( $r = - 0,573$ ,  $p = 0,021$ ), míg súlyos szívelégtelenségben (NT-proBNP > 3000 pg/ml) gyenge negatív korreláció ( $r = - 0,271$ ,  $p = 0,042$ ) igazolódott a PACAP-38 és NT-proBNP szintek között. Az ejekciós frakcióval történő vizsgálatok során EF és NT-proBNP szintek között szignifikáns negatív korrelációt detektáltunk ( $r = - 0,395$ ,  $p = 0,021$ ). Ezen összefüggésben nem igazolódott szignifikáns különbség a primer ( $r = - 0,410$ ,  $p = 0,019$ ) és ischaemiás ( $r = - 0,386$ ,  $p = 0,035$ ) DCM csoport között. Ezzel szemben a PACAP-38 és EF szintek között nem találtunk szignifikáns összefüggést.

#### *4.2.1.2. Akut, dekompenzált és krónikus kompenzált szívelégtelen betegek, valamint nem-szívelégtelen kontroll csoport PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata*

Tizenhárom akut szívelégtelenség miatt hospitalizált (átlagéletkor:  $66,5 \pm 3,7$  év), 33 krónikus szívelégtelenség miatt gondozott (átlagéletkor:  $65,9 \pm 3,8$  év) beteget és 13 nembet és korban illesztett kontrollt (átlagéletkor:  $65,8 \pm 4,0$  év) vontunk be vizsgálatunkba. Akut szívelégtelenség csoportunkba, olyan ICM vagy NICM miatt gondozott betegeket soroltunk, akik a csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség (HFrEF) definíciójának megfelelően 40% alatti ejekciós frakcióval rendelkeznek, és akut kardiális dekompenzáció (jelentősen csökkent terhelhetőség, nyugalmi panaszok, NYHA III-IV st.) miatt osztályos felvételt igényeltek. Ezzel szemben krónikus szívelégtelen betegcsoportunkba olyan ICM/NICM-es betegek tartoznak, akik ismert, gondozott HFrEF betegek, azonban jelenleg kompenzáltak, terhelhetőségük betegségüknek megfelelően elfogadható (NYHA II st.), és reguláris kontroll vizsgálatra érkeztek ambulanciánkra. A nembet és korban illesztett kontroll csoportba olyan atípusos mellkasi panasz/ hypertonia miatt klinikánkon megfordult betegeket vontunk be, akiknél az echocardiographiás vizsgálat kizárta bármely strukturális szívbetegség lehetőségét ( $EF > 55\%$ ), valamint coronarographia vagy coronaria CT



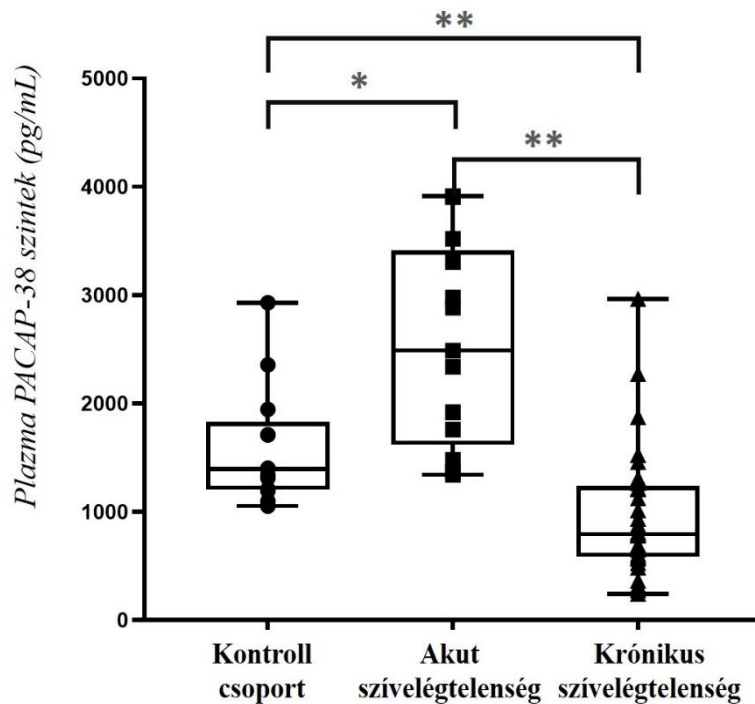
vizsgálat ép koszorúér rendszert igazolt. Vizsgált betegeink és a kontroll csoport legfontosabb demográfiai és klinikai paramétereit a 9. táblázat tartalmazza.

	<b>Akut szívelégtelenség</b> (n=13)	<b>Krónikus szívelégtelenség</b> (n= 33)	<b>Kontroll csoport</b> (n= 13)
átlagéletkor (év)	66,5 ± 3,7	65,9 ± 3,8	65,8 ±4,0
nem	33% nő 67% férfi	34,3% nő 65,7 % férfi	31% nő 69% férfi
ejekciós frakció (%)	<40 %	<40 %	>55 %
NYHA stádium	III-IV. st.	II. st.	I. st.
Kardiális státusz	dekompenzált	kompenzált	nem szívelégtelen
<b>Társbetegségek</b>			
hypertonia	69,2 %	87,9 %	46,1 %
diabetes mellitus	46,2 %	42,4 %	15,4 %
pitvarfibrilláció	53,8 %	36,4 %	7,7 %
<b>Gyógyszeres terápia</b>			
ACE gátló/ ARB	100 %	100 %	38,5 %
β-blokkoló	100%	100 %	38,5 %
MRA	76,9 %	81,8 %	0 %
diuretikum	92,3 %	84,8 %	15,4 %
ivabradin	23,1 %	9,0 %	0 %
digoxin	15,4 %	15,2 %	0 %
<b>Eszközös terápia</b>			
CRT	46,15 %	33,33 %	0 %
ICD	38,46 %	36,36 %	0 %

9. táblázat: A vizsgált betegek (akut és krónikus szívelégtelenség) és a kontroll csoport főbb demográfiai és klinikai paramétereit. NYHA: New York-i Kardiológus társaság funkcionális beosztása, ACE: angiotenzin-konvertáz enzim, ARB: angiotenzin-II receptor blokkoló, MRA: mineralokortikoid receptor antagonist, CRT: krónikus reszinkronizációs terápia, ICD: implantált cardioverter defibrillátor.

Elsőként a különböző csoportok plazma PACAP-38 szintjét vizsgáltuk. Akut szívelégtelenség esetén szignifikánsan magasabb plazma PACAP-38 szinteket detektáltunk a krónikus szívelégtelen betegcsoporthoz ( $p < 0,001$ ) és a kontroll csoporthoz képest ( $p < 0,001$ ) is. A

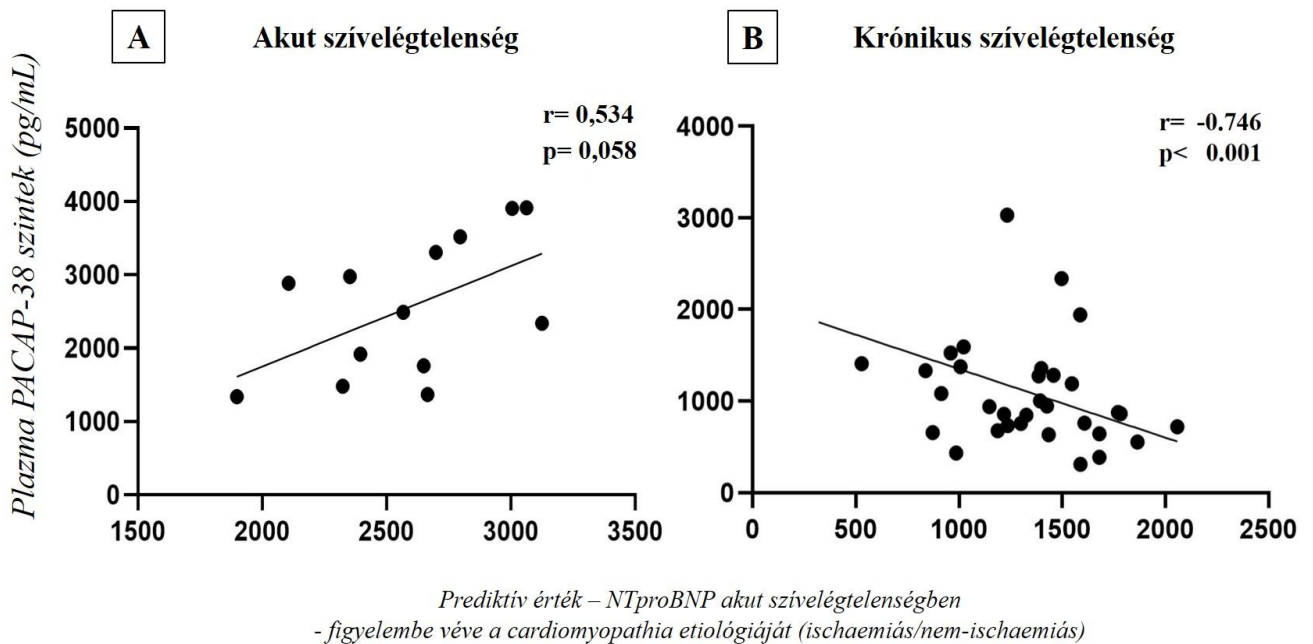
krónikus szívelégtelen betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb plazma PACAP-38 értékeket detektáltunk nem csak akut betegcsoporthoz képest ( $p < 0,001$ ), hanem a szívelégtelenség szempontjából egészséges kontroll csoporthoz képest ( $p = 0,001$ ) is (16. ábra).



16. ábra: Plazma PACAP-38 szintek akut, dekompenzált ( $n=13$ ) és krónikus, kompenzált szívelégtelen ( $n=33$ ) betegekben és a kontroll csoportban ( $n=13$ ). A „box plot” diagram az interkvartilis terjedelmet, medián értékeket és az extrém értékeket szemlélteti. Az individuális értékeket fekete pont, négyzet vagy háromszög ábrázolja. Statisztikai analízis egyutas ANOVA, Tukey post-hoc teszt alkalmazásával történt. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ .

A szívelégtelenség széleskörben alkalmazott prognosztikai markere, az NT-proBNP és a PACAP-38 szintek közötti összefüggéseket is tanulmányoztuk. Akut szívelégtelen betegcsoportnál nem találtunk szignifikáns korrelációt ( $r = - 0,307$ ,  $p = 0,09$ ) a két vizsgált marker között, míg krónikus betegeinknél egy enyhe negatív korrelációt ( $r = - 0,349$ ,  $p = 0,049$ ) detektáltunk. Multivariancia analízis elvégzésével azonban figyelembe véve a DCM etiológiáját (primer vagy ischaemiás) az akut szívelégtelenség miatt hospitalizált betegeknél egy pozitív összefüggés volt

megfigyelhető a PACAP-38 és NT-proBNP szintek között (17.A ábra), bár szignifikáns korrelációról ebben az esetben sem beszélhetünk. Ezzel szemben a krónikus szívelégtelen betegcsoportban multivariancia analízissel szignifikáns ( $p < 0,001$ ) jelentős negatív korrelációt ( $r = - 0,746$ ) detektáltunk (17.B ábra).



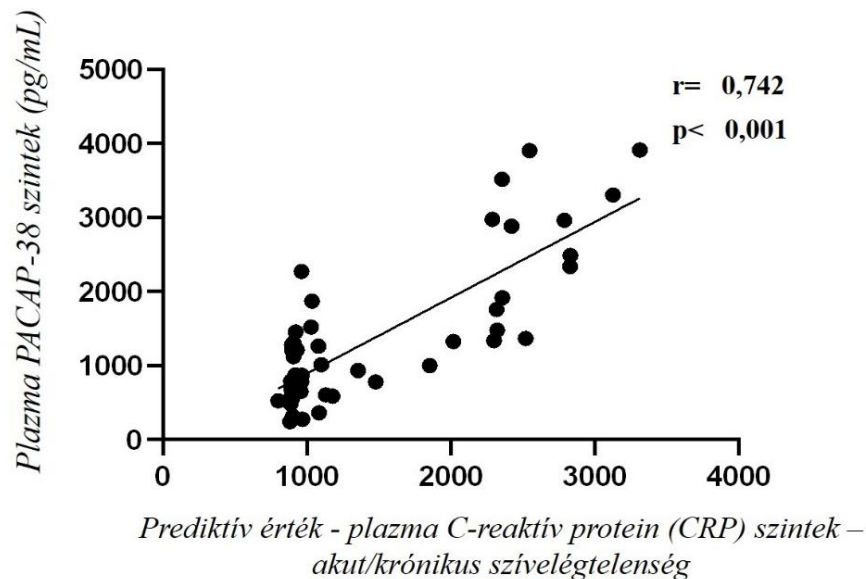
17. ábra: Összefüggés NT-proBNP és plazma PACAP-38 szintek között akut (A) és krónikus szívelégtelenségben (B). Multivariancia analízis, mely figyelembe veszi a szívelégtelenség etiológiáját (ischaemiás vagy nem-ischaemiás cardiomyopathia ICM – NICM).  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak.

A plazma PACAP-38 szint esetleges befolyásoló tényezők – társbetegségek, különböző gyógyszeres és eszközös terápiás lehetőségek, echocardiographiás paraméterek és rutin laborparaméterek – vizsgálatára korrelációs vizsgálatokat és multivariancia analízist végeztünk. Ezen vizsgálatok nem igazoltak szignifikáns individuális vagy additív hatást a PACAP-38 szintre (10. táblázat).

	<b>Korrelációs koefficiens (r)</b>	<b>Szignifikancia (p)</b>
<b>Társbetegségek</b>		
hypertonia	r = - 0,095	p = 0,532
diabetes mellitus	r = 0,003	p = 0,983
pitvarfibrilláció	r = 0,064	p = 0,671
<b>Terápia</b>		
ACE gátló/ ARB	-	-
β-blokkoló	-	-
MRA	r = 0,031	p = 0,178
diuretikum	r = 0,081	p = 0,708
ivabradin	r = 0,206	p = 0,326
digoxin	r = 0,048	p = 0,822
CRT	r = 0,005	p = 0,973
ICD	r = 0,067	p = 0,659
<b>Echocardiographiás paraméterek</b>		
EF (%)	r = 0,113	p = 0,456
BK-EDD (mm)	r = 0,063	p = 0,689
JK-EDD (mm)	r = - 0,012	p = 0,938
Mitralis regurgitáció	r = 0,045	p = 0,776
Tricuspidalis regurgitáció	r = 0,034	p = 0,827
IVC (mm)	r = 0,067	p = 0,671
<b>Rutin laborparaméterek</b>		
összekoleszterin	r = 0,043	p = 0,736
LDL	r = 0,183	p = 0,474
HDL	r = 0,041	p = 0,826
triglicerid	r = 0,033	p = 0,354
karbamid	r = 0,010	p = 0,946
kreatinin	r = 0,100	p = 0,514

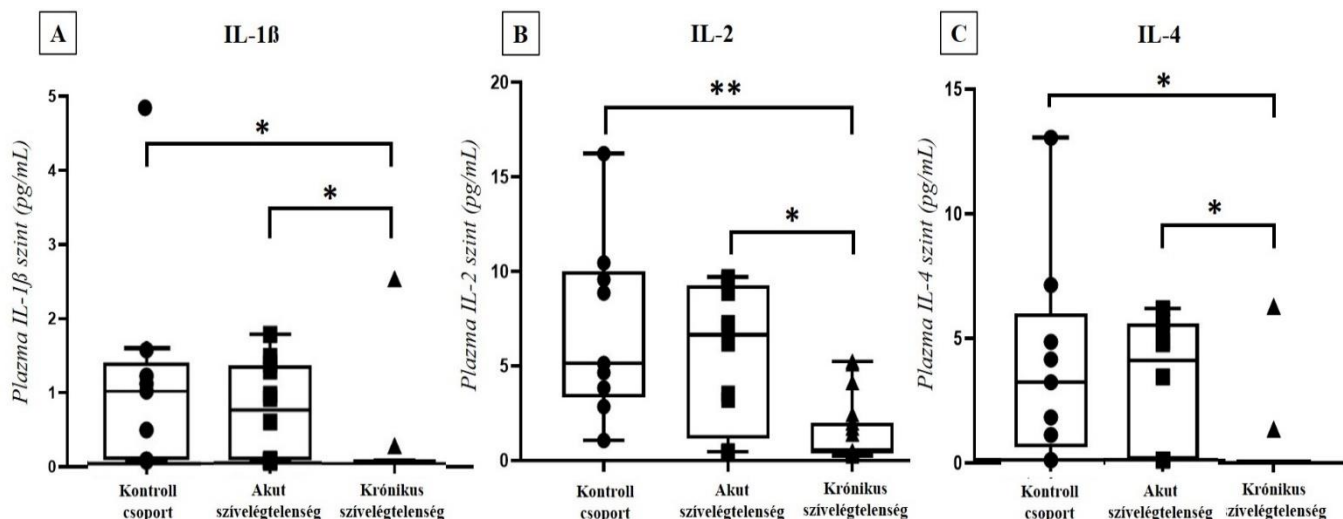
10. táblázat: PACAP-38 szintet potenciális befolyásoló tényezők vizsgálata. ACE: angiotenzin-konvertáz enzim, ARB: angiotenzin-II receptor blokkoló, MRA: mineralokortikoid receptor antagonist, CRT: krónikus reszinkronizációs terápia, ICD: implantált cardioverter defibrillátor, EF: ejekciós frakció, BK-EDD: bal kamrai végdiastolés átmérő, JK-EDD: jobb kamrai végdiastolés átmérő, IVC: vena cava inferior, LDL: alacsony denzitású lipoprotein, HDL: magas denzitású lipoprotein. Statisztikai analízist Spearman-féle korrelációs teszttel végeztük.  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak.

Ezzel szemben a C-reaktív protein (CRP) és PACAP-38 szintek közötti összefüggések vizsgálatakor az összes beteg vonatkozásában gyenge pozitív korrelációt ( $r = 0,385$ ,  $p = 0,001$ ) detektáltunk. Multivariancia vizsgálat figyelembe véve a szívelégtelenség típusát (akut vagy krónikus DCM) a plazma PACAP-38 és CRP szintek között jelentős pozitív korrelációt ( $r = 0,742$ ,  $p < 0,001$ ) igazolt (18. ábra).



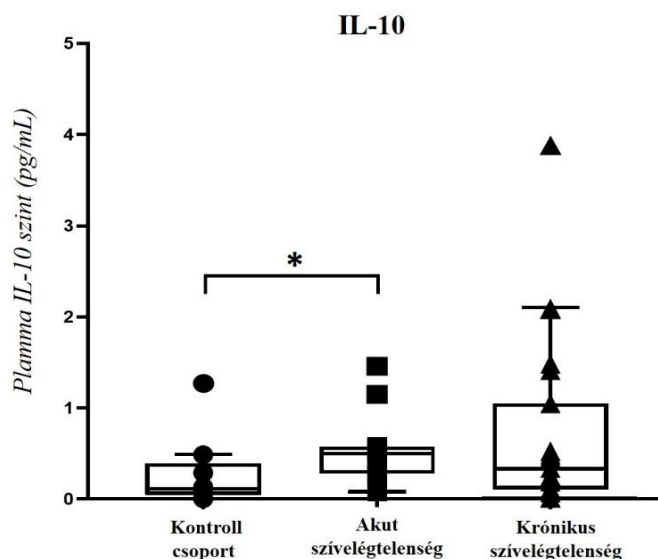
18. ábra: Összefüggés plazma C-reaktív protein (CRP) és PACAP-38 szintek között. Multivariancia analízis, mely figyelembe veszi a szívelégtelenség típusát is (akut vagy krónikus szívelégtelenség).  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak.

Az eddigi beteganyagból 31 szívelégtelen (12 akut, 19 krónikus) beteg és 9 fő kontroll esetében citokin (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) vizsgálatokat is végeztünk. A krónikus szívelégtelen betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb citokin szinteket detektáltunk mind az akut szívelégtelen, mind pedig a kontroll csoporthoz képest IL-1 $\beta$  (akut:  $p = 0,011$ , kontroll:  $p = 0,002$ ), IL-2 (akut:  $p = 0,002$ , kontroll:  $p < 0,001$ ) és IL-4 ( $p = 0,025$ , kontroll:  $p = 0,004$ ) mérések során a (19. ábra).



19. ábra: IL-1 $\beta$  (A), IL-2 (B) és IL-4 (C) szintek akut ( $n=12$ ), krónikus szívelégtelenségben ( $n=19$ ) és a kontroll csoportban ( $n=9$ ). A „box plot” diagram az interkvartilis terjedelmet, medián értékeket és az extrém értékeket szemlélteti. Az individuális értékeket fekete pont, négyzet vagy háromszög ábrázolja. Statisztikai analízis egyutas ANOVA, Tukey post-hoc teszt alkalmazásával történt. \* $p < 0,050$ , \*\* $p < 0,001$ .

IL-10 citokin esetében az akut szívelégtelen betegekénél mértünk szignifikánsan ( $p=0,023$ ) magasabb értékeket a kontroll csoporthoz képest (20. ábra).



20. ábra: IL-10 szintek akut ( $n=12$ ), krónikus szívelégtelenségben ( $n=19$ ) és a kontroll csoportban ( $n=9$ ). A „box plot” diagram az interkvartilis terjedelmet, medián értékeket és az extrém értékeket szemlélteti. Az individuális értékeket fekete pont, négyzet vagy háromszög ábrázolja. Statisztikai analízis egyutas ANOVA, Tukey post-hoc teszt alkalmazásával történt. \* $p < 0,05$ .

Ezzel szemben IL-6, TNF- $\alpha$  és IFN- $\gamma$  szintek között nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző alcsoportokban. A különböző citokin szintek és a plazma PACAP-38 szintek között végzett korrelációs vizsgálatok során IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 és IL-10 citokinekkal szignifikáns pozitív korreláció igazolódott. Multivariancia analízis elvégzésével, mely figyelembe vette a szívelégtelenség típusát (akut/ krónikus) ezen korrelációs együtthatók még szorosabb pozitív összefüggést igazoltak a vizsgált citokinek és a plazma PACAP-38 szintek között (11. táblázat).

Citokinek	Korrelációs vizsgálat		Multivariancia analízis (+ akut/ krónikus szívelégtelenség)	
	Korrelációs koefficiens (r)	Szignifikancia (p)	Korrelációs koefficiens (r)	Szignifikancia (p)
IL-1 $\beta$	r = 0,539	p = 0,002	r = 0,780	p < 0,001
IL-2	r = 0,494	p = 0,005	r = 0,812	p < 0,001
IL-4	r = 0,481	p = 0,006	r = 0,800	p < 0,001
IL-10	r = 0,367	p = 0,042	r = 0,799	p < 0,001

11. táblázat: Különböző citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 és IL-10) és PACAP-38 szintet közötti korreláció Spearman-féle korrelációs teszt alkalmazásával, valamint a szívelégtelenség típusát (akut vagy krónikus típus) is figyelembe vevő multivariancia analízissel.  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak.

#### 4.2.2. Emberi szívizom vizsgálata

Szívelégtelenségre vonatkozó vizsgálatunk harmadik felében olyan súlyos, végstádiumú szívelégtelenség miatt gondozott betegek szívizomzatát vizsgáltuk, akik szívtranszplantáción estek át. Összesen 23 szívelégtelen beteg közül 11 NICM (47,8 %) és 12 ICM (52,2 %) miatt került a szívtranszplantációs listára. A vizsgált betegek legfontosabb antropometriai és hemodinamikai paramétereit a 12. táblázat foglalja össze.

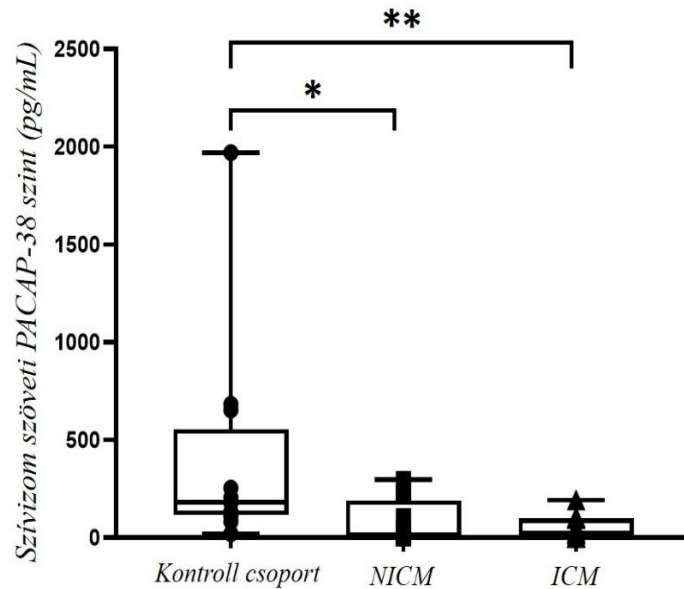
	<b>NICM</b> (n= 11)	<b>ICM</b> (n= 12)
átlagéletkor (év)	39,18 ± 3,4	59,42 ± 3,8
nem	90,9 % férfi 9,1 % nő	91,7 % férfi 8,3 % nő
<b>Echocaridographiás paraméterek</b>		
BK-EDD (mm)	75,45 ± 3,1	72,92 ± 1,9
BK-ESD (mm)	67,34 ± 2,9	65,75 ± 1,8
EF (%)	17,09 ± 1,4	21,92 ± 2,3
<b>Hemodinamikai paraméterek</b>		
perctérfogat (L/perc)	4,03 ± 0,22	4,28 ± 0,56
átlagos szívfrekvencia (ütés/perc)	104,5 ± 3,1	74,33 ± 4,9
átlagos systolés vérnyomás (Hgmm)	99,56 ± 3,4	107,17 ± 4,9
átlagos diastolés vérnyomás (Hgmm)	62,89 ± 4,1	56,58 ± 4,6

12. táblázat: Az általunk vizsgált ischaemiás (ICM) és nem-ischaemiás cardiomyopathia (NICM) miatt szívtranszplantációra került betegek legfontosabb antropometriai, echocardiographiás és hemodinamikai paraméterei. BK-EDD: bal kamrai végdiastolés átmérő, BK-ESD: bal kamrai végsystolés átmérő, EF: ejekciós frakció.

A 23 szívelégtelen beteg mellett kontroll csoportként 12 egészséges, balesetben elhunyt személy (átlagéletkor: 31,11 ± 3,1, 50% férfi, 50% nő) szívizomzatát vizsgáltuk.

Szívizomzat homogenizátumból végzett vizsgálatok során szöveti PACAP-38 szinteket határoztuk meg a különböző csoportokban. Szignifikánsan magasabb szöveti PACAP-38 szinteket mértünk az egészséges kontroll csoport szívizomzatában mind a NICM (p= 0,007), mind pedig az ICM (p< 0,001) betegcsoporthoz képest. A különböző etiológiájú cardiomyopathias betegcsoportok között (NICM és ICM) nem találtuk szignifikáns különbséget (21. ábra).





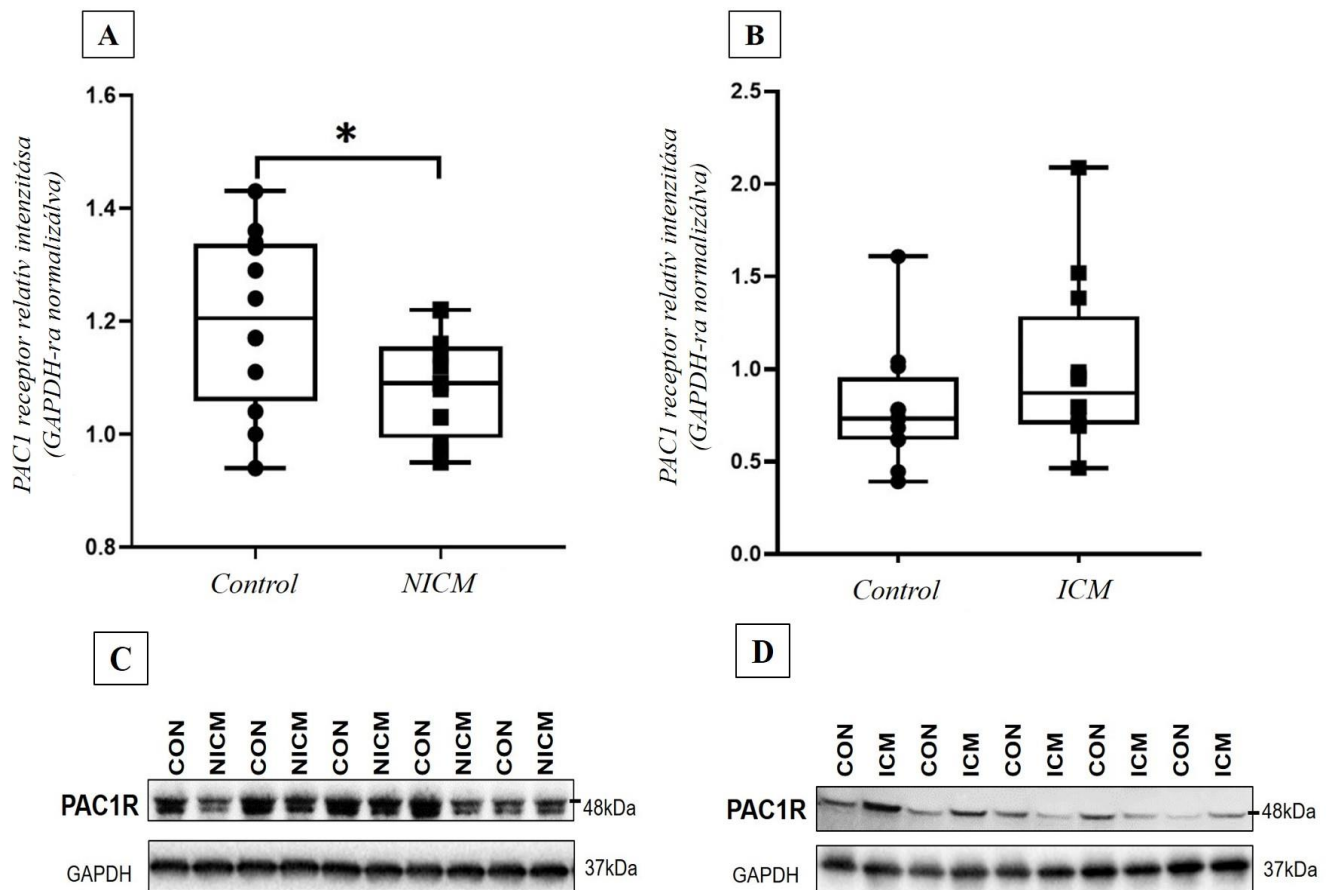
21. ábra: Szöveti PACAP-38 szintek nem-ischaeiás cardiomyopathia (NICM,  $n= 11$ ), ischaemiás cardiomyopathia (ICM,  $n= 12$ ) és egészséges kontroll egyének ( $n= 12$ ) szívizomzatából. A „box plot” diagram az interkvartilis terjedelmet, medián értékeket és az extrém értékeket szemlélteti. Az individuális értékeket fekete pont, négyzet vagy háromszög ábrázolja. Statisztikai analízis egyutas ANOVA, Tukey post-hoc teszt alkalmazásával történt. \*  $p < 0,050$ , \*\*  $p < 0,001$  vs. kontroll csoport.

A betegek esetében korrelációs vizsgálatokat végeztünk NT-proBNP szintekkel, különböző echocardiographiás paraméterekkel, továbbá számos rutin laborparaméterrel. Ezen korrelációs vizsgálatok azonban egyik esetben sem igazoltak szignifikáns összefüggést a vizsgálat potenciális befolyásoló faktorok és a szöveti PACAP-38 szintek között (13. táblázat).

	<b>Korrelációs koefficiens (r)</b>	<b>Szignifikancia (p)</b>
<b>NT-proBNP (pg/mL)</b>		
összes beteg	r= - 0.167	p= 0.435
NICM	r= - 0.041	p = 0,899
ICM	r= - 0.254	p = 0,425
multivariancia analízis	r= - 0.187	p = 0,688
<b>Echocardiographiás paraméterek</b>		
EF (%)	r = 0,146	p = 0,494
BK-EDD (mm)	r = 0,167	p = 0,369
JK-EDD (mm)	r = - 0,177	p = 0,407
hátsó fal vastagsága (mm)	r = 0,240	p = 0,451
septum vastagsága (mm)	r = 0,197	p = 0,540
<b>Rutin laborparaméterek</b>		
összekoleszterin	r = 0,068	p = 0,751
LDL	r = 0,089	p = 0,693
HDL	r = 0,057	p = 0,766
triglicerid	r = 0,129	p = 0,567
karbamid	r = - 0,031	p = 0,887
kreatinin	r = - 0,122	p = 0,578
nátrium	r = - 0,280	p = 0,196
kálium	r = - 0,307	p = 0,154

13. táblázat: A szöveti PACAP-38 szintet potenciálisan befolyásoló tényezők vizsgálata. NT-proBNP, különböző echocardiographiás és laborparaméterek valamint a szöveti PACAP-38 szintet közötti korreláció Spearman-féle korrlációs teszt alkalmazásával és a szívelégtelenség etiológiáját (ischaemiás vagy nem-ischaemiás cardiomyopathia – ICM vagy NICM) is figyelembe vevő multivariancia analízissel. NICM: nem-ischaemiás cardiomyopathia, ICM: ischaemiás cardiomyopathia, EF: ejekciós frakció, BK-EDD: bal kamrai végdiastolés átmérő, JK-EDD: jobb kamrai végdiastolés átmérő, LDL: alacsony denzitású lipoprotein, HDL: magas denzitású lipoprotein.  $p < 0,05$  értéket tekintettünk szignifikánsnak.

A szöveti PACAP-38 szintek mellett PAC1 receptorok relatív intenzitását is vizsgálatuk a rendelkezésre álló szívizommintákból. NICM betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb PAC1 receptor intenzitást detektáltunk az egészséges kontrollokhoz képest ( $p = 0,045$ ). Ezzel szemben az ICM betegcsoportban nem találtunk szignifikáns különbséget a PAC1 receptor intenzitásában a kontroll csoporttal összevetve ( $p = 0,145$ ) (22. ábra).



22. ábra: PAC1 receptor relatív intenzitás nem-*ischaemiás cardiomyopathia* (A) (NICM,  $n=11$ ) és *ischaemiás cardiomyopathia* (B) (ICM,  $n=12$ ) miatt kezelt betegek vs. kontroll csoport ( $n=12$ ). (C) és (D) ábrák a szkennelt, reprezentatív Western blot képeket mutatják. PAC1 receptor szintek GAPDH-ra normalizált értékek. A „box plot” diagram az interkvartilis terjedelmet, medián értékeket és az extrém értékeket szemlélteti. Az individuális értékeket fekete pontok és négyzetek ábrázolják. Statisztikai analízis Mann-Whitney teszt alkalmazásával történt. \*  $p < 0,05$  vs. kontroll csoport.

## 5. Diszkusszió

A PACAP kardioprotektív szerepét az elmúlt évtizedekben elvégzett számos in vitro és állatkísérletes vizsgálat bizonyította, azonban nagyon kevés klinikai adat áll rendelkezésünkre ezen hatásával kapcsolatban (*Sano et al. 2002, Gasz et al. 2006a, 2006b, Rácz et al. 2007, 2008, Róth et al. 2009, Alston et al. 2011, Reglődi és Tamás 2016, Reglődi et al. 2016*). Vizsgálatainkban éppen ezért olyan kardiológiai kórképekre fókuszáltunk, mely betegségek etiológiájában, progressziójában a PACAP az eddigi kísérletes eredmények alapján feltehetőleg fontos szerepet tölthet be. Elsőként vizsgáltuk a különböző PACAP szinteket akut myocardialis infarctusban egy zárt mellkasú reperfüziós myocardialis infarctus kísérletes sertés modellben, továbbá klinikai vizsgálatokat végeztünk STEMI miatt hospitalizált betegeken és nemben, korban hozzájuk illesztett kontroll egyéneken. A kísérletes eredmények alapján egy másik klinikai szempontból releváns kórkép, a szívelégtelenség és a PACAP közötti összefüggéseket is vizsgáltuk (*Otto et al. 2004, Gasz et al. 2006a, 2006b, Rácz et al. 2007, Mori et al. 2010, Subramaniam et al. 2017*). Különböző stádiumú szívelégtelen betegek, majd később akut és krónikus szívelégtelenség miatt kezelt ICM és NICM betegek és a hozzájuk illesztett kontroll csoport összehasonlító vizsgálatát is elvégeztük.

Kutatásunk az első transzlációs tanulmány, melyben akut myocardialis infarctus és reperfüziós sertés modell és STEMI betegek vizsgálata során tanulmányoztuk mind a szöveti mind a plazma PACAP-38 szinteket és ezek összefüggéseit a myocardialis infarctus lefolyását befolyásoló egyéb paraméterekkel. Elsőként Sham-operált, kontroll sertés szíveket vizsgáltuk meg, hogy összehasonlítsuk a különböző szívéregek szöveti PACAP-38 szintjét. Hoover és munkatársai korábban kimutatták egér szívben a PAC1 receptor mRNS-ét, és nem találtak szignifikáns regionális különbséget a különböző pitvarok és kamrák között (*Hoover et al. 2013*). Ezzel szemben nem állt rendelkezésünkre hasonló kísérletes eredmény a szöveti PACAP szintekre vonatkozóan. Szignifikánsan magasabb PACAP-38 értékeket mértünk a bal kamrai mintákban (Sham-BK) a pitvarból származó mintákhoz (Sham-BP, Sham-JP) képest, mely felveti PACAP-38 bal kamrai specifikus akkumulációjának és/vagy lokális expressziójának lehetőségét. Ezen eredmények alapján további vizsgálataink során a bal kamrára fókuszáltunk.

A Sham-operált és infarctuson átesett MI sertés szívek vizsgálatakor szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szinteket mértünk az infarctuson átesett nem-ischaemiás BK-i szívizommintákban (MI-NI-BK) az ischaemiás régiókhöz képest (MI-I-BK), míg az ischaemiás régiók nem mutattak szignifikáns különbséget a Sham-BK mintáihoz képest. Feltételezzük, hogy a két különböző bal kamrai régió (MI-BK-NI és MI-BK-I) funkcionálisan nem függetlenek egymástól,

mert a myocardialis infarctus által okozott extenzív szisztémás hatások (emelkedett bal kamrai töltőnyomás, szimpatikus aktivitás – emelkedett katecholamin kiáramlás, a nem-ischemiás régiók kompenzáló hyperkinesise, gyulladáshoz és extracelluláris mátrix folyamatok aktiválódása) az egész bal kamrát érintik (*Schomig 1990, Fang et al. 2015, Lindsey et al. 2018*). Ennek megfelelően a különböző bal kamrai régiókban (MI-BK-NI és MI-BK-I) bekövetkezett változások erős összefüggésben állnak egymással.

A szöveti minták egyik legfőbb PACAP-38 forrása a myociták közti idegrostok (*Reglődi et al. 2016, Tóth et al. 2020*). Alston kimutatta, hogy a myocardialis infarctuson átesett bal kamra (MI-BK) ischaemiás régiójában csökkent a szimpatikus beidegzés denzitása a peri-infarctusos, nem-ischemiás régiókhoz és a Sham kontroll szívekhez képest is. Azonban nem detektáltak PACAP-38 immunpozitív rostokat a peri-infarctusos régióban (*Alston et al. 2011*). Ezen eredmények alátámasztják vizsgálatunkat, melyben szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szinteket mértünk a nem-ischemiás BK területekben. Habár az idegrostok károsodnak az ischaemiás régióban, mi nem detektáltunk szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szinteket az infarctusos bal kamra ischaemiás régiójában (MI-BK-I) a Sham mintákhoz képest. Szemben az idegrostokban leírt változásokkal Alston kutatócsoportja emelkedett PACAP immunreaktivitást mért az egerek bal kamrájának infarctusos régiójában az extracelluláris mátrixban, myocytákban és a macrophagokban is (*Alston et al. 2011*). Mindezek alapján feltételezzük, hogy az idegkárosodás által okozott PACAP szint csökkenést a sejtekből és az extracelluláris mátrixból származó PACAP immunreaktivitás képes kompenzálni. Mindemellett jól ismert a PACAP immunmodulátor hatása is, így az immunstátustól, az adott betegségtől és az életkortól függően képes gyulladáscsökkentő hatást kifejteni a különböző pathológiás állapotokban (*Dénes et al. 2019*). Az akut myocardialis infarctus kezdetben egy szisztémás pro-inflammatorikus választ indít, majd később egy antiinflammatorikus válasz következik, mely a gyógyulásért, hegképződésért és a regenerálódási folyamatokért felelős (*Ong et al. 2018*). Így az sem kizárható, hogy ezen folyamatokon keresztül az ischaemiás/reperfúziós károsodás képes triggerelni egy lokális PACAP expressziót vagy az endogén PACAP redistribúcióját. A pro- és antiinflammatorikus fázisok közti átmenetet a cardiomyocyták, endothelialis sejtek, fibroblastok és a veleszületett és szerzett immunrendszer közti interakciók szabályozzák. Állatkísérletünkben homogenizált szív mintákat vizsgálatunk, melyek feltehetőleg az összes PACAP-38 forrást tartalmazták (macrophagok, myocyták és idegelemek), így a fent említett kompenzáló mechanizmusok miatt nem találtunk szignifikáns különbséget az infarctusos bal kamra ischaemiás régiója (MI-BK-I) és a Sham bal kamrai minták között.

Az elmúlt évtizedekben számos preklinikai vizsgálat fókuszált a különböző ischaemiás kondicionálási technikákra, ígéretes eredményeket publikálva ezen technikák myocardialis

ischaemiás vagy reperfüziós károsodást redukáló hatásáról (*Hausenloy et al. 2017*). Saját kutatásunkban meghatároztuk az infarctuson átesett sertések ischaemiás bal kamrájának szöveti PACAP-38 szintjeit különböző ischaemiás kondicionálási technikát követően. Az általunk alkalmazott modellben az ischaemiás pre- és postkondicionálási eljárások nem befolyásolták a szöveti PACAP-38 szintet szignifikáns módon. Azonban tekintettel a különböző csoportok alacsony esetszámaira, ezen eredmények korlátozottan értékelhetőek. A kérdés tisztázása céljából további vizsgálatokat tartunk szükségesnek.

Ezen állatkísérletes eredmények alapján indítottuk klinikai vizsgálatunkat akut STEMI miatt hospitalizált betegek bevonásával. Jelenleg csupán kevés klinikai adat áll rendelkezésünkre a PACAP szintekkel kapcsolatban kardiológiai betegek vonatkozásában. Egy korábbi klinikai vizsgálatunkban szignifikánsan magasabb jobb fülcse szöveti PACAP-38 szinteket mértünk krónikus ischaemiás szívbetegségben a billentyűbetegséghez képest (*Szántó et al. 2012*). Azonban eddig nem volt információnk emberi plazma PACAP szintekről akut myocardialis infarctusban.

STEMI betegekben szignifikánsan magasabb kezdeti plazma PACAP-38 szinteket mértünk a PCI-t megelőzően az egészséges kontrollokhoz képest, majd PCI-t követően ezen értékek szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető. Ezzel szemben a 48 órával PCI után levett minták szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattak a kontroll csoport értékeihez képest. Az infarctuson átesett betegek kezdeti, kontrollokhoz képest szignifikánsan magasabb PACAP-38 szintje felveti annak lehetőségét, hogy a PACAP-38 esetlegesen fontos szerepet tölthet be az ischaemiás myocardialis léziók patomechanizmusában, és ezáltal potenciális prognosztikai biomarkerré válhat akut myocardialis infarctusban.

Jelen klinikai eredményeink alapján feltételezzük, hogy a PACAP fő forrása azon szervek, melyek igazolt módon a legmagasabb PACAP koncentrációval bírnak, mint az agy és az endokrin mirigyek. Myocardialis infarctus esetében az emelkedett plazma és szöveti PACAP szintek az idegrostokból, cardiomyocytákból és macrophagokból származhatnak (*Alston et al. 2011, Reglödi et al. 2016, Tóth et al. 2020*). Továbbá az is lehetséges, hogy az akut myocardialis infarctust az atheroscleroticus coronariák talaján számos korábbi ischaemiás epizód előzte meg, s így a prekondicionálás részeként növelhette a plazma PACAP-38 szintet. Valamint a 48 órával PCI-t követően detektált jelentősen csökkent plazma PACAP-38 koncentráció a vizsgálat neuropeptid basalis szintjét reprezentálhatja, hangsúlyozva az alacsony plazma PACAP-38 szint prediktív értékét akut myocardialis infarctusban.

Az jól ismert, hogy a PACAP védő hatással bír az oxidatív stressz indukálta apoptosissal szemben mind neuronális és nem-neuronális sejtek esetében (*Gasz et al. 2006a, 2006b, Mori et al.*

2010, Fábrián et al. 2012, Horváth et al. 2019, Tóth et al. 2020). Munkacsoportunk korábbi kísérletében neonatalis patkány cardiomyocytá sejt kultúráján vizsgálta a PACAP kezelés hatásait ischaemia/reperfúzió (I/R) által indukált apoptózisban. PACAP kezelés hatására szignifikánsan megnőtt a cardiomyocyták viabilitása és csökkent az apoptózis a PKA-Bad-14-3-3 és az Akt-Bad-14-33-33 jelátviteli utakon keresztül (Rácz et al. 2008). Ezen eredményeket igazolták Róth és munkatársai vizsgálatai is, melyben a PACAP védőhatását igazolták I/R indukálta károsodással szemben caspase-3 út gátlása és foszfo-Bad és – Bcl utak aktiválása által létrehozott antiapoptotikus hatásokon keresztül (Róth et al. 2009).

A PACAP-38 és troponin szintek közti összefüggések vizsgálatakor az összes érték között együttesen szignifikáns negatív korreláció igazolódott, míg az időben illesztett (0, 4, 24 és 48 óras) szintek között nem volt szignifikáns összefüggés. Azonban ezen összefüggés több okból korlátozottan értékelhető. PCI-t követően a revascularisációnak köszönhetően a szérumban troponin szintek csökkenése várható. Bár a szérumban troponin értékek kinetikájában nagy variabilitás látható a különböző fiziológiai (nem, életkor, rassz) és patológiai (veseelégtelenség, tüdőbetegség, strukturális szívbetegség) tényezők miatt. Mindemellett a coronaria lézió kiterjedtsége (teljesen vagy átmenetileg elzárt coronaria – „slow flow” vagy „no flow” fenomenon jelenség) és a panaszok kezdetétől a revaszkularizációig eltelt idő is jelentős mértékben képes befolyásolni a troponin szinteket (Korley és Jaffe 2013, Fröhlich és Leistner 2017, Weil et al. 2018). Korábbi tanulmányok bizonyították, hogy az infarctus méretének megállapítására a troponin szintek pontos, görbe alatti terület (AUC: area under the curve) meghatározás módszerével történő meghatározása alkalmas lehet. Ezen módszer során legalább 6-8 alkalommal történő troponin mérés szükséges (Thygesen et al. 2018). A legújabb terápiás MI ajánlásnak megfelelően az általunk vizsgált betegek 48 óra után aktív rehabilitációra kerültek, így a 48 óras troponin mérések utáni további mérésekre technikailag nem volt lehetőségünk, mely vizsgálatunk egyik fő limitációját jelenti (Ibanez et al. 2017). Úgy gondoljuk, hogy a szérumban troponin szintek nagy egyéni variabilitása és az AUC kalkuláció hiánya magyarázza az általunk mért gyenge összefüggést a troponin és PACAP-38 szintek között.

A myocardialis infarctus különböző rizikófaktorainak PACAP szintre kifejtett potenciális befolyásoló hatását vizsgálva nem találtunk szignifikáns összefüggést a diabetes mellitus, a dohányzás, az emelkedett lipid szintek és a vizsgált polipeptid szintek között. Korábbi vizsgálatok eredményének megfelelően az életkorral sem találtunk szignifikáns összefüggést, mely alapján elmondható, hogy az életkor nem befolyásolja a plazma PACAP szinteket. Azonban szignifikáns pozitív korreláció igazolódott a kezdeti PACAP-38 szintek és a hipertónia között, mely eredmény felhívja a figyelmünket az összefüggésre a PACAP-38 és a STEMI egyik legfontosabb rizikófaktor között. Korábbi in vitro és állatkísérletes eredmények kissé ellentmondásosak a PACAP és a

hypertonia közötti összefüggések tekintetében. A PACAP és PAC1 receptorok bizonyítottan jelen vannak a cardiorespiratoricus szimpatikus hálózatban, mely tény alátámasztja a vizsgált peptid fontosságát a vérnyomás szabályzásában (*Farnham és Pilowsky 2010, Farnham et al. 2012*). Továbbá, multivariancia analízissel szignifikáns jelentős pozitív korrelációt igazoltunk a hypertoniás és hemoglobin A1c (HbA1c) értékek additív hatása és a PACAP-38 szintek között. Ezek alapján felmerül, hogy a hypertoniás és a kezeletlen diabetes mellitus együttesen – magas rizikót képviselve STEMI kialakulására és kiterjedésének mértékére – szoros kapcsolatban állnak a magas PACAP szintekkel. Diabetes mellitus szintén a myocardialis infarctus fő rizikó tényezői közé tartozik, korábbi adatok alapján szintén izgalmas összefüggéseket mutatva a PACAP polipeptiddel. Számos vizsgálat igazolta a PACAP antidiabetikus hatását a glükóz-indukálta inzulinszekréció, a pancreas szigetsejtjeinek proliferációjának befolyásolásán, valamint az inzulin-indukálta hypoglycaemiára adott fokozott glükagon válaszon keresztül (*Persson és Ahren 2002, Yamamoto et al. 2003, Sakurai et al. 2011*). Ezenfelül, különböző állatkísérletekben bizonyították a PACAP fontos protektív szerepét diabeteses nephropathia, retionpathia és a különböző vascularis komplikációk esetében (*Bánki et al. 2014, Szabadfi et al. 2016, Solymár et al. 2018*). A HbA1c diabetes mellitusban széles körben alkalmazott marker a glikémiás kontroll, s ezáltal a terápia effektivitásának monitorozására. Annak ellenére, hogy a hypertonia és a HbA1c jelentős pozitív additív hatása igazolódott a PACAP-38 szintek vonatkozásában, nem találtunk szignifikáns korrelációt a diabetes mellitus vagy a HbA1c szintek és a plazma PACAP-38 szintek között a STEMI miatt kezelt betegeknél. További klinikai vizsgálatok szükségesek a myocardialis infarctus különböző rizikófaktorai által a plazma PACAP szintre kifejtett hatások pontos mechanizmusainak feltérképezésére.

Minden STEMI-n átesett betegnél felvételének második napján részletes szívultrahangos vizsgálatot végeztünk a legújabb echocardiographiás ajánlásoknak megfelelően (*Writing Group Member et al. 2019*). Nem találtunk szignifikáns összefüggést a különböző echocardiographiás paraméterek, úgy mint a bal kamrai ejekciós frakció (BK-EF), a különböző falmozgászavarokat jellemző szemikvantitatív falmozgás index (WMSI: wall motion score index), és a kezdeti plazma PACAP-38 szintek között. Fontos megemlíteni, hogy a korai echocardiographiás mérések infarctust követően reperfúzió (sikeres PCI-n) átesett betegeknél félrevezetőek lehetnek, ugyanis a systolés bal kamra funkció (így az azt reprezentáló EF) jelentős javulást mutathat a reperfúziót követő első 14 napban (*Solomon et al. 2001, Serrao et al. 2018*). Az életképes, azonban átmenetileg „bódult”, un. „stunned” myocardium teljes felépülése akár 4-6 hétig is eltarthat (*Kloner 2020*), így az infarctus utáni valódi „maradék bal kamra funkció” meghatározása 6 hét után lehetséges.

Klinikai STEMI vizsgálatunkba bevont betegek több, mint 50 %-a myocardialis infarctusa előtt is szedett legalább egy antiischaemiás vagy antianginás gyógyszer, így jogosan merült fel a kérdés,



vajon ezen gyógyszerek alkalmazása bír-e bármiféle befolyásoló hatással az általunk mért plazma PACAP-38 szintekre. Azonban korrelációs analízisek elvégzésével nem detektáltunk szignifikáns összefüggést a korábban szedett gyógyszerek és a kezdeti plazma PACAP-38 koncentrációk között, így feltételezzük, hogy ezek a gyógyszerek nem befolyásolják az infarctus során kialakult plazma PACAP-38 szinteket. Azonban sem klinikai, sem kísérletes adat nem áll rendelkezésünkre a leggyakrabban alkalmazott gyógyszeres kezelések és a PACAP-38 szintek közötti esetleges interakciókról, így ennek a kérdésnek a tisztázására a későbbiekben nagy esetszámú klinikai vizsgálatok szükségesek.

Az ischaemiás etiológiájú szívbetegségek mellett a PACAP, mint antiapoptotikus, antioxidáns, gyulladáscsökkentő, immunmodulátor multifunkcionális neuropeptid feltehetőleg a csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenség (HFrEF) patomechanizmusára, prognózisára is hatással lehet (*McDonagh et al. 2021*). Ezen kérdés tisztázására különböző etiológiájú (ischaemiás és nem-ischaemiás) cardiomyopathia miatt gondozott betegeket vizsgáltunk. Elsőként mutattuk ki ezen betegek plazma mintájából a PACAP-38 aktivitást, továbbá szignifikáns negatív korreláció igazolódott a különböző PACAP-38 és NT-proBNP szintek között, mely eredmények felvetették a PACAP-38 esetleges prognosztikai szerepének lehetőségét szívelégtelenségben. Az elmúlt évtizedek során megfigyelhető intenzív biomarker kutatás háttérében az a tény áll, hogy a ma rutinszerűen, széles körben alkalmazott szívelégtelenség prognosztikai markere, az NT-proBNP önmagában nem elég szenzitív és specifikus, számos társbetegség (pl. veseelégtelenség, szisztémás gyulladással járó kórképek, idősebb életkor) és akár gyógyszerek (pl. digitalis, aspirin, kalcium csatorna blokkolók, metoprolol) is befolyásolhatják a szintjét (*Davis et al. 2006, Troughton és Richards 2009, Rørth et al. 2020, Han et al. 2020, McDonagh et al. 2021*). Számos prognosztikai faktor, így az NT-proBNP esetén is jelentős különbségeket mérhetünk akut, dekompenzált és krónikus, kompenzált szívelégtelenség esetén. Így további vizsgálataink során ezen alcsoportokra is fókuszáltunk, szignifikáns különbségeket igazolva az akut és krónikus szívelégtelen betegek és egészséges kontroll egyének plazma PACAP-38 szintjei között. Mindemellett vizsgáltuk azon faktorokat, melyek esetleges befolyásolják ezen plazma PACAP-38 szinteket.

Eredményeink alapján egyértelműen látszik, hogy a plazma PACAP-38 szintek érzékenyen jelzik a krónikus, kompenzált szívelégtelenség akut dekompenzációja során bekövetkező hemodinamikai és pathophysiologiai változásokat. Szignifikánsan magasabb plazma PACAP-38 szinteket igazoltunk az akut, dekompenzált szívelégtelenség miatt hospitalizált betegek esetében a krónikus, kompenzált betegek és az egészséges kontroll csoport értékeihez képest is. Az akut szívelégtelenségben mért magasabb PACAP-38 szint része lehet az akut „stressz reakciónak (=

response to injury)” , mely a hirtelen romló bal kamrai ejekciós frakció következtében alakul ki (Njoroge és Teerlink 2021). Feltételezésünk szerint ez a reaktív jelenség egy szisztémás protektív válasz része lehet, melynek célja a cardiomyocita károsodás csökkentése. Perna és munkatársai 115 HFrEF miatt hospitalizált beteget vizsgálata során a páciensek több mint felénél súlyos cardiomyocita károsodást igazoltak. A cardiomyocita károsodás mértéke szoros korrelációt mutatott a szívelégtelenség progressziójával (Perna et al. 2004). A myocita károsodás hátterében az oxidatív stressz, apoptózis és nekroptózis állhatnak. A PACAP effektív védőhatással bír cardiomyocita sejt kultúrában az oxidatív stressz-indukált apoptosissal szemben. PACAP kezelés hatására szignifikánsan csökkent caspase-3 aktivitás és szignifikánsan magasabb antiapoptotikus Bcl-2 és phospho-Bad expresszió igazolódott (Gasz et al. 2006, Rácz et al. 2008). A PACAP kezelés képes gátolni az oxidatív stressz indukálta proapoptotikus hatásokat a JNK és p38-MAP kináz útvonalakon keresztül endothel sejtekben (Rácz et al. 2007). Akut szívelégtelenséghez hasonlóan jelentős PACAP-38 felszabadulást igazoltunk a korábban részletezett STEMI miatt kezelt betegeknél, ahol a PCI előtti mérések mutatták a legmagasabb PACAP-38 szinteket a 4, 24. 48 órás mintákhoz és a kontroll csoporthoz képest is. Mindemellett számos egyéb nem cardiovascularis rendszert érintő akut vagy életet veszélyeztető kórképben igazoltak emelkedett PACAP szinteket az egészséges kontrollokhoz képest, mint pl. különböző intracerebrális vérzésekben. Ezen betegeknél a PACAP koncentráció szoros asszociációt mutatott az intracerebrális vérzés súlyosságával (Ma et al. 2014, Jiang et al. 2016). Szignifikánsan magasabb PACAP szinteket mértek akut traumás agykárosodott betegek plazma és gerincvelői folyadékmintáiban (Bukovics et al. 2014, Tóth et al. 2020). Mindezen eredmények alapján felmerül annak lehetősége, hogy a PACAP-38 egy általános biomarker funkcióval bírhat, melynek szintje a károsodás súlyosságával arányosan változik, mint egy protektív markerként antioxidáns, antiapoptotikus és antiinflammatorikus válaszreakciókat beindítva az akut sejt károsodás következményeképpen.

Ezzel szemben a krónikus, kompenzált szívelégtelen betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb plazma PACAP szinteket mértünk nem csak a már említett akut dekompenzált csoporthoz, de az egészséges kontrollokhoz képest is. Ez az inverz összefüggés arra utalhat, hogy az alacsony plazma PACAP szint a szívelégtelenség prognózisa szempontjából egy negatív prediktív marker lehet. Az alacsonyabb PACAP-38 szintek feltehetőleg gyengítik a kardioprotektív mechanizmusokat, ezáltal a betegek hajlamosabbá válnál a szívelégtelenség gyors, további progressziójára. Mori és munkatársai doxorubicin indukálta cardiomyopathia egérmodelljében vizsgálták a PACAP esetleges hatását a szívelégtelenség progressziójára. A PACAP-deficiens homozigóta és heterozigóta egereknél egyaránt szignifikánsan alacsonyabb systolés bal kamra funkciót, tágabb bal kamra átmérőket, ezáltal sokkal rosszabb prognózist, szignifikánsan magasabb

mortalitási rátát igazoltak a vad típushoz képest. Eredményeik alapján az endogén PACAP fontos szerepet tölthet be a cardiomyocita védelemben, hiánya pedig rosszabb prognózisú szívelégtelenséghez vezethet (*Mori et al. 2010*). Egy másik, kardiotoxikus ágensként mitoxandront alkalmazó in vitro modellben PACAP kezelés hatására szignifikánsan jobb – kevésbé károsodott – systolés bal kamra funkciót igazoltak a kezelésben nem részesülő csoporthoz képest, ezzel alátámasztva a PACAP potenciális kardioprotektív hatását (*Subramaniam et al. 2017*). Azonban ezen kardioprotektív hatások és a PACAP esetleges prognosztikai szerepének pontosabb tisztázására egy longitudinális, utánkövetéses vizsgálat lenne szükséges csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelen betegek bevonásával.

PACAP-38 és az NT-proBNP közötti összefüggések vizsgálata során enyhe negatív korrelációt detektáltunk a két marker plazmaszintje között a krónikus szívelégtelen betegcsoportban. Azonban multivariancia analízissel, a cardiomyopathia etiológiát is (ICM vagy NICM) figyelembe véve jelentős negatív korreláció igazolódott, mely eredmény felhívja a figyelmet a PACAP-38 és a cardiomyopathia etiológiája közötti potenciális összefüggésekre. Továbbá ezen eredményeinket alátámasztja első szívelégtelenségre fókuszáló vizsgálatunk is, melynek során az ischaemiás etiológiájú szívelégtelen betegcsoportban szignifikáns negatív korrelációt igazoltunk a PACAP és NT-proBNP szintek között. Ezen eredmények alátámasztják feltételezésünket, mely szerint krónikus szívelégtelenségben mért alacsonyabb PACAP szint a rosszabb prognózis markere lehet a magas NT-proBNP sinthez hasonlóan. Akut, dekompenzált szívelégtelenségben azonban – ellentétben a krónikus csoporttal – a két vizsgálat paraméterek között pozitív tendencia volt megfigyelhető. Akut dekompenzáció esetén a plazma NT-proBNP szintek a volumen- és nyomásterhelés következtében kialakult fokozott pitvari falfeszülés miatt jellemzően megemelkednek (*Mueller et al. 2019*). Ebből adódóan a prognosztikai értéke alacsonyabb a terápiaiv akut, dekompenzált periódusban a kompenzált, stabil szívelégtelenséghez képest (*Mueller et al. 2019*). Egyre több klinikai tanulmány veti fel annak a lehetőségét, hogy a PACAP különböző kórképek diagnosztikai vagy akár prognosztikai markere lehet, bár az a kérdés, hogy az aktuálisan mért plazma PACAP szintek a betegség lefolyása következtében alakulnak ki, vagy épp hozzájárulnak a betegség lefolyásához egyelőre még tisztázatlan.

A PACAP-38 és CRP szintek között igazolt pozitív korreláció szintén megerősíti a PACAP-38 potenciális biomarker szerepének lehetőségét szívelégtelenségben. Korábbi vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy az infekcióval nem összefüggő CRP szintemelkedés szisztémás kardiális stressz válasz részjelensége lehet, ezáltal prognosztikai szereppel bírhat szívelégtelenségben (*Castelli et al. 2004*). Vizsgálatunk során beválogatott betegeknél minden esetben kizárásra került az esetleges akut infekció lehetősége. PACAP és CRP szintek között, akut dekompenzált betegeiknél detektált

szignifikáns, erős pozitív korreláció összhangban áll korábbi vizsgálatunk eredményeivel is, ahol polytrauma akut fázisában hasonló pozitív összefüggéseket találtunk a két paraméter között (*Tamás et al. 2021*). Multivariancia analízissel azonban a teljes (akut és krónikus szívelégtelen) beteg populáció esetében igazolódott a szignifikáns pozitív korreláció PACAP és CRP között, tovább erősítvén a PACAP fontosságát szívelégtelenségben. Egy korábbi vizsgálatunkban szintén szignifikáns pozitív korrelációt igazoltunk a PACAP és CRP szintek között politraumás betegek akut fázisában (*Tamás et al. 2021*). Fontos megemlíteni, hogy a cirkuláló PACAP-38 szintjének meghatározás önmagában nem biztos, hogy megfelelően szenzitív a szívelégtelenség progressziójának vagy a terápiára adott válasz megítélésére, így a jövőben egyéb kardiális biomarkerekkel (pl. NT-proBNP, CRP) együttes mérése és értékelése lenne szükséges.

Szívelégtelenség különböző alcsoportjai végzett pro- és antiinflammatorikus citokin vizsgálok során változó eredményeket kaptunk. IL-1 $\beta$ , IL-2 és IL-4 esetén szignifikánsan alacsonyabb citokin szinteket mértünk a krónikus szívelégtelen csoportban mind az akut, mind pedig a kontroll csoporthoz viszonyítva. Számos korábbi kutatás igazolta már, hogy a szívelégtelenség bázis terápiájának (ACE-gátló,  $\beta$ -blokkoló, MRA) hatására a szérumban citokin szintek jelentősen csökkennek (*Zhang et al. 2017, Gage et al. 2004, Lappegård et al. 2015*). Mindemellett ezen gyulladásos markerek szintjét a CRT-terápia – különös tekintettel a responder egyénekre – is jelentős mértékben befolyásolhatja (*Lappegård et al. 2015*). Jelen vizsgálatunkban betegeink az optimális maximális tolerálható dózisú terápiaiban részesültek, mely 80% feletti maximális bázis terápiát jelent. Minden betegünk részesült ACE-gátló és  $\beta$ -blokkoló kezelésben, 81,8%-uk pedig MRA kezelést is kapott. Számos korábbi vizsgálat foglalkozott már a különböző pro- és antiinflammatorikus citokinek esetleges szerepével szívelégtelenségben, azonban a kapott eredmények ellentmondásosak (*Bartekova et al. 2018, Hanna és Frangogiannis 2020*). Habár néhány cikk magasabb citokin értékekről számolt be szívelégtelen betegeknél, azonban mi feltételezzük, hogy az általunk mért alacsonyabb citokin szintek háttérében a bázis terápiát maximálisan részesülő betegek extrém magas aránya állhat. Továbbá néhány kutatás különböző citokin szintbeli eltéréseket mutatott ki a szívelégtelenség súlyossága és a NYHA státusz vonatkozásában (*Zhang et al. 2017, Ji et al. 2018*). Szignifikánsan magasabb citokin szinteket találtak a súlyosabb, NYHA klasszifikáció szerint III-IV. stádiumú szívelégtelen betegek esetén. Az általunk vizsgálat krónikus szívelégtelen betegek mind kompenzált kardiális státusszal bírtak, NYHA I-II stádiumba tartoztak, mely szintén magyarázhatja az általunk mért alacsonyabb citokin szinteket.

Az antiinflammatorikus IL-10 esetében szignifikánsan magasabb citokin szinteket mértünk akut szívelégtelen betegeknél a kontroll csoporthoz képest, valamint az IL-10 és plazma PACAP-38 szintek között szignifikáns pozitív korreláció igazolódott, különösen abban az esetben, ha multivariancia analízissel a szívelégtelenség típusát (akut/krónikus) is figyelembe vettük. Az IL-10

és szívelégtelenség potenciális összefüggéseit széles körben vizsgálták már mind kísérletes körülmények között, mind klinikai tanulmányok során. Antiinflammatorikus citokinként az IL-10 számos pro-inflammatorikus citokin szintézisét, szekrécióját gátolja, így fokozza az myocardialis remodellinget. Azonban ROS-gátláson keresztül képes a citokin indukált oxidatív stressz csökkentésére is (Kaur et al. 2009). Egy szívelégtelenséget vizsgáló egér-modellben rekombináns human IL-10 adását követően jobb túlélést igazoltak a kontroll csoporthoz képest (Lacraz et al. 1995). Egy másik vizsgálatban szoros összefüggést találtak IL-10 és TNF- $\alpha$  szintek között, mely egyensúly inflammatorikus válaszreakción keresztül fontos szerepet tölthet be a szívelégtelenség progressziójában (Kaur et al. 2009). Szívelégtelen betegekben szignifikánsan magasabb IL-10-szekretáló B-sejt szinteket detektáltak, mely felveti az IL-10 esetleges protektív szerepét akut, dekompenzált szívelégtelenségben (Guo et al. 2015).

Nem találtunk szignifikáns különbséget az IL-6, IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  szintek között akut és krónikus szívelégtelenség, valamint a kontroll csoport összehasonlítása során, habár számos vizsgálat számolt már be ezen citokinek jelentősen emelkedett plazmaszintjéről akut, dekompenzált szívelégtelenségben (Lappegård et al. 2015, Hanna és Frangogiannis 2020). Néhány klinikai vizsgálat fokozott IL-6 szintézist/ expressziót mutatott szívelégtelen betegeknél, másoknál azonban ez az eredmény nem igazolódott (Hanna és Frangogiannis 2020). Ezen ellentmondásos adatok háttérben feltehetőleg a különböző etiológiájú és stádiumú szívelégtelenség mellett az eltérő terápiás stratégiák állhatnak (Hanna és Frangogiannis 2020). Az IFN- $\gamma$  pontos szerepe a szívelégtelenség patomechanizmusában és progressziójában még mindig tisztázatlan, ugyanis a limitált számú állatkísérletes és klinikai vizsgálatok eredményei is ellentmondásosak (Levick és Goldspink 2014). IFN- $\gamma$  overexpresszió esetén egérmodellben fokozott pro-inflammatorikus citokin és chemokinválasz alakul ki, mely szívelégtelenség kialakulásához vezet. Másrészt képes ROS gátláson keresztül direkt antioxidáns hatást is kifejteni, így nem egyértelmű, hogy az IFN- $\gamma$  a szívelégtelenség kialakulásában determináns vagy protektív szerepet tölt be (Levick és Goldspink 2014). Krónikus szívelégtelen betegekben magasabb IFN- $\gamma$  expressziót igazoltak a kontroll csoporthoz képest, felvetve a kérdést, hogy a gátlása talán terápiás előnnyel járhatna (Fukunaga et al. 2007). Azonban direkt antioxidáns hatása miatt felmerült annak a lehetősége is, hogy önmagában az IFN- $\gamma$ -t potenciális citokin terápiaként alkalmazzák (Levick és Goldspink 2014). A legszélesebb körben vizsgált, a szívelégtelenség és kardiális remodelling területén legígéretesebb eredményeket mutató inflammatorikus citokin a TNF- $\alpha$ . Számos kutatás igazolt magasabb TNF- $\alpha$  plazma szinteket HFrEF betegekben, szignifikáns korrelációt mutatva a betegség prognózisával és a magasabb mortalitással. Meglepő módon azonban az esetleges terápiás TNF- $\alpha$ -gátlókkal végzett vizsgálatok növekvő öszmortalitást és kardiális hospitalizációs rátát igazoltak (Chung et al. 2003). Fontos

kiemelni azonban, hogy a szívelégtelenség optimális bázisterápiája a különböző pro- és antiinflammatorikus citokinek szintjére is jelentős befolyásoló hatással bírhat.  $\beta$ -blokkoló kezelés után szignifikánsan alacsonyabb IL-6 szinteket mértek szívelégtelen betegeknél (*Matsumura et al. 2002*). Továbbá ACE-gátló és  $\beta$ -blokkoló kezelések alkalmazása során alacsonyabb IFN- $\gamma$  és IL-6 szinteket detektáltak a terápianaiiv betegekhez képest (*Gage et al. 2004*). Mindezen tényezők (különböző etiológia, stádium, bázis terápia) jelentős befolyásoló hatással bírnak a pro- és antiinflammatorikus citokinek szintjére, mely magyarázatot adhat az eltérő eredményekre.

Szívelégtelenséggel foglalkozó tanulmányunk második felében szívtranszplantáción átesett betegek szívizom mintáit vizsgáltuk. Korábban már vizsgáltuk szívizomminták szöveti PACAP-38 és PACAP-27 szintjeit, minden esetben szignifikánsan magasabb PACAP-38 szinteket mértünk a 27 aminosavból álló PACAP formához képest. Mindkét forma esetén szignifikánsan magasabb szöveti PACAP szinteket detektáltunk az ischaemiás etiológiájú betegeknél a billentyűbetegekhez képest (*Szántó et al. 2012*). ICM és NICM miatt kezelt, végstádiumú szívelégtelen betegek szöveti PACAP-38 szintjei között nem találtunk szignifikáns különbséget, azonban mindkét csoportban jelentősen alacsonyabbak voltak ezen értékek az egészséges kontroll egyénékéhez képest. Korábban diszkutáltaknak megfelelően ezen eredmények háttérében is az állhat, hogy az intracellularis PACAP-38 felhalmozódás leginkább az élő, érintetlen sejtekhez kapcsolható (*Reglódi et al. 2016; Szántó et al. 2021*), mely sejtek száma a végstádiumú szívelégtelenségben jelentősen lecsökkent. A plazmamérésekkel ellentétben a szöveti PACAP-38 és plazma NT-proBNP szintek, valamint a különböző echocardiographiás paraméterek között nem találtunk szignifikáns összefüggést. Bár a PACAP-38 pontos forrása nem ismert, azonban legmagasabb koncentrációban az idegekben, myocytákban, extracelluláris mátrixban és az infiltráló macrophagok citoplazmájában mutatták ki (*Alston et al. 2011*). Ezen információk alapján úgy gondoljuk, hogy a károsodott cardiomyocyták vagy a „kimerülő” kompenzáló mechanizmusok következménye az alacsonyabb szöveti PACAP-38 szint. Mindezt alátámasztják azon irodalmi adatok, melyek a fentiekhez hasonlóan végstádiumú szívelégtelenségben a „kimerülő” neurohormonalis rendszer következtében extrém alacsony nátriuretikus peptid szinteket detektáltak (*Miller et al. 2004*). Ezen befolyásoló tényezők pedig még összetettebbé teszik az esetleges korrelációs vizsgálatok eredményeinek interpretálását. A szöveti PACAP szinteket esetlegesen befolyásoló tényezők kiszűrésére különböző korrelációs vizsgálatokat végeztünk, melynek során nem igazoltunk szignifikáns összefüggést a PACAP és számos klinikai, rutin laboratóriumi és myocardium funkcióját jellemző paraméter között. Tehát az eddigi humán vizsgálataink eredményeivel összhangban elmondhatjuk, hogy ezen tényezők nem befolyásolják az általunk mért PACAP szinteket.

Korábban már kimutattuk immunhisztokémiai módszerekkel a PAC1 receptor jelenlétét ischaemiás szívbetegség vagy billentyűbetegség miatt extracorporalis keringéses szívűtéten átesett betegek jobb pitvari szívizommintájában, a szívizomsejtekben, azonban az endocardialis kötőszövetben nem ábrázolódott PAC1 receptor expresszió (Szántó *et al.* 2012). Felmerült annak a lehetősége, hogy a szívelégtelenség etiológiája is esetlegesen befolyásolhatja a PAC1 receptor expresszióját, így jelen tanulmányunkban ischaemiás és nem-ischaemiás cardiomyopathia miatt gondozott, végstádiumú, szívtranszplantációra szoruló betegek szívizommintáit vizsgáltuk, és összehasonlítottuk egészséges szívizommintákkal. A nem-ischaemiás etiológiájú szívelégtelen betegeknel szignifikánsan alacsonyabb PAC1 receptor intenzitást igazoltunk Western blot vizsgálattal az egészséges kontrollokhoz képest, míg az ischaemiás csoportban nem volt szignifikáns különbség. Feltehetőleg ennek háttérében az eltérő etiológia és pathophysiologia állhat. NICM esetén a szívelégtelenség patomechanizmusában az apoptózis, myocardialis fibrosis és a következményes kardiális remodelling áll (Dadson *et al.* 2017). Azt feltételezzük, hogy ezen betegeknel a fokozott cardiomyocita apoptózis és a komplex gyógyszeres kezelés együttesen vezetnek az alacsonyabb PAC1 receptor intenzitáshoz. Ezzel szemben ICM-ben a fent említett mechanizmusok mellett az ismétlődő ischaemiás epizódok és a prekondicionálás jelentős szerepet tölt be a szívelégtelenség patomechanizmusában. Az ischaemiás prekondicionálás számos előnyös, ischaemiával szemben protektív folyamatokat indít el, számos faktor termelésén keresztül (pl. adenozin, bradykinin, opiátok) (Tomai *et al.* 1999). Korábban részletezett akut myocardialis infarctus és reperfüziós sertés modellünkben nem találtunk szignifikáns összefüggést a különböző ischaemiás kondicionáló technikák és a plazma PACAP-38 szintek között. Bár arról nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat, hogy bármiféle összefüggés lenne a különböző ischaemiás kondicionálási technikák és PAC1 receptorok expressziója között, a rendelkezésünkre álló állatkísérletes és klinikai vizsgálatok eredményei alapján feltételezzük, hogy az ICM betegeknel detektált magasabb PAC1 receptor intenzitás az ischaemiás prekondicionálás potenciális következménye lehet. A myocardiumban igazolt PAC1 receptorok jelenléte felveti későbbiekben a PACAP esetleges endogén/exogén terápiás alkalmazásának lehetőségét kihasználva az által kifejtett antiapoptotikus, antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásokat.

A vizsgálataink korlátait képzik az egyes csoportok alacsonyabb esetszáma, így a PACAP pontosabb potenciális biomarker funkciójának tisztázására egy prospektív, nagyetszámú, akár multicentrikus vizsgálat tervezésére van szükség.

## 6. Konklúzió

A PACAP egy multifunkcionális neuropeptid, mely számos kedvező (antiapoptotikus, antioxidáns, gyulladáscsökkentő) hatásán keresztül fontos szerepet tölthet be a kardioprotekcióban. Az ígéretes eredményekkel bíró kísérletes modellek ellenére azonban kevés klinikai vizsgálat történt, melyek a különböző cardiovascularis kórképekre fókuszálnának.

Elsőként számoltunk be a szöveti PACAP-38 szintek változásáról egy releváns, nagy állat MI modellben. Az infarctuson átesett állatok bal kamrájában mért alacsonyabb PACAP-38 szint az infarctus miatt bekövetkezett cardiomyocita károsodással magyarázható. Bár a bal kamrai ischaemiás régiójában magasabb PACAP-38 szinteket mértünk a többi szívüreghez képest, mely felveti a PACAP-38 infarctusos régióhoz lokalizált akkumulációjának és/vagy kamraspecifikus overexpressziójának lehetőségét, egy lokális kardioprotektív hatás részeként. Vizsgálatunk az első STEMI betegekkel foglalkozó klinikai PACAP-38 tanulmány, mely magasabb kezdeti plazma PACAP-38 szinteket igazolt az akut infarctusos betegekben a kontroll csoporthoz képest, hangsúlyozva a PACAP-38 potenciális akut protektív szerepét az ischaemiás károsodással szemben. Mindemellett a sikeres revascularizációt követően detektált szignifikáns PACAP-38 szint csökkenés alátámasztja ezt az elméletet. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az általunk vizsgált peptid az antiischaemiás és kardioprotektív hatásain keresztül fontos protektív szerepet játszhat AMI-ban.

Kutatásunk második felében különböző stádiumú és etiológiájú szívelégtelen betegek plazma és szöveti PACAP38 szintjeit, valamint PAC1 receptor expresszióját vizsgáltuk. Szignifikánsan magasabb plazma PACAP-38 szinteket mértünk akut, dekompenzált szívelégtelenségben és alacsonyabb szinteket detektáltunk krónikus, kompenzált szívelégtelen betegekben az egészséges kontrollokhoz képest. PACAP-38 erős korrelációt mutatott a szívelégtelenség fontos biomarkereivel, mint az NT-proBNP és a CRP. Továbbá szignifikáns összefüggéseket igazoltunk a plazma PACAP-38 szintek és különböző pro- és antiinflammatorikus citokinek között. Szöveti PACAP-38 mérések során magasabb PACAP szinteket mértünk az egészséges szívizmómintákban mind az ischaemiás, mind a nem-ischaemiás cardiomyopathia miatt kezelt betegek mintáihoz képest. Mindemellett szignifikánsan alacsonyabb PAC1 receptor intenzitást igazoltunk NICM esetén az egészséges kontrollokhoz képest, míg ICM betegcsoportunknak nem találtunk különbséget.

Eredményeink hangsúlyozzák a PACAP-38 potenciális szerepét a különböző cardiovascularis kórképekben, de további utánkövetéses, akár multicentrikus vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy válhat-e a későbbiekben a PACAP-38-ból egy potenciális, új kardiális prognosztikai biomarker.



## **7. Új eredmények összefoglalása**

Kutatásunk során a PACAP-38 plazma és szöveti szintjeit vizsgáltuk különböző kardiológiai kórképekben, melynek során számos szignifikáns eltérést detektáltunk.

### **7.1. Akut myocardialis infarctus vizsgálata során elért új eredményeink:**

#### **7.1.1. Szöveti PACAP-38 szintek vizsgálata akut myocardialis infarctus sertés modelljében**

- Alacsonyabb szöveti PACAP-38 szinteket találtunk a nem-ischaemiás bal kamra területén az ischaemiás régióhoz és a Sham-operált állatok bal kamrájához képest.
- Alacsonyabb szöveti PACAP-38 szinteket találtunk a nem-ischaemiás bal kamra területén az ischaemiás régióhoz és a Sham-operált állatok bal kamrájához képest is.
- Az infarctuson átesett állatok különböző szívüregekben és bal kamrai falrészleteinek összehasonlító vizsgálatakor magasabb PACAP-38 szinteket mértünk az ischaemiás bal kamra területén mind a jobb és bal pitvarhoz és a nem-ischaemiás bal kamrához képest is.
- Különböző ischaemiás kondicionálási technikák alkalmazása során nem detektáltunk szignifikáns szöveti PACAP-38 szintbeli különbséget.

#### **7.1.2. Plazma PACAP-38 szintek vizsgálata STEMI betegekben**

- STEMI miatt hospitalizált betegeket érintő klinikai vizsgálatunk során a betegeknél a revascularisatiót megelőző (0 órás) mintavétel során magasabb plazma PACAP-38 szintet detektáltunk az egészséges coronariával rendelkező kontroll csoporthoz képest.
- 4 órával a revascularisatiót követően szignifikánsan alacsonyabb plazma PACAP-38 szinteket mértünk a kiindulási értékekhez képest, mely csökkenés a további 24, majd 48 óras mintáknál is megfigyelhető volt.
- A 48 órás plazma PACAP-38 szintek azonban az egészséges kontroll csoporthoz képest is szignifikánsan alacsonyabb értékeket mutattak.
- Szignifikáns negatív korreláció igazolódott a plazma PACAP-38 és szérum troponin értékek között a vizsgált betegcsoportban.

- Multivariancia analízis szignifikáns, erős pozitív korrelációt igazolt a plazma PACAP-38 szintek és a STEMI két legfontosabb rizikófaktora (hypertonia és kezeletlen diabetes mellitus – magas HbA1c érték) additív hatása között.
- Rutin laborparaméterek, korábban alkalmazott antiischaemiás/ antianginás gyógyszerek nem befolyásolták a plazma PACAP-38 szintet.

## **7.2. Szívelégtelenség vizsgálata során elért új eredményeink:**

### **7.2.1. Ischaemiás (ICM) és nem-ischaemiás etiológiájú cardiomyopathia (NICM) miatt gondozott betegek plazma és szérum vizsgálata**

#### **7.2.1.1. Különböző stádiumú szívelégtelen betegek plazma PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata**

- Szignifikáns negatív korrelációt detektáltunk a plazma PACAP-38 és NT-proBNP szintek között. NT-proBNP alapján történő súlyossági csoportbeosztás alapján az enyhébb prognózisú szívelégtelen betegeknél szorosabb korrelációt igazoltunk.
- PACAP-38 és ejekciós frakció között nem találtunk szignifikáns összefüggést.
- A különböző potenciális befolyásoló tényezői (nem, életkor, társbetegségek, rutin laborparaméterek) és a plazma PACAP-38 szintek között nem találtunk szignifikáns összefüggést.

#### **7.2.1.2. Akut, dekompenzált és krónikus, kompenzált szívelégtelen betegek, valamint nem szívelégtelen kontroll csoport PACAP-38 szintjének összehasonlító vizsgálata**

- Szignifikánsan magasabb plazma PACAP-38 szinteket mértünk akut, dekompenzált szívelégtelenségben, valamint szignifikánsan alacsonyabb PACAP értékeket detektáltunk krónikus, kompenzált szívelégtelenségben a kontroll csoporthoz képest.
- PACAP-38 és az NT-proBNP szintek közötti korrelációs vizsgálatok során akut szívelégtelenségben egy pozitív tendencia volt megfigyelhető, míg a krónikus betegeknél szignifikáns negatív korrelációt igazoltunk. Multivariancia analízissel figyelembe véve a szívelégtelenség etiológiáját (ischaemiás vagy nem-ischaemiás) ezen korreláció még erősebb összefüggést mutatott.

- A társbetegségekkel, gyógyszeres és eszközös terápiával, echocardiographiás és rutin labor paraméterekkel nem találtunk szignifikáns összefüggést a plazma PACAP-38 szintek vonatkozásában, így ezen tényezők nem befolyásolták az általunk mért PACAP értékeket.
- PACAP-38 és CRP szintek között szignifikáns pozitív korreláció igazolódott. Multivariancia analízissel a szívelégtelenség típusát is figyelembe véve (akut/krónikus) ezen korreláció még erősebb összefüggést mutatott.
- A különböző pro- és antiinflammatorikus citokinek vizsgálatakor szignifikánsan alacsonyabb citokin szinteket mértünk krónikus szívelégtelenségben mind az akut esetekhez, mind pedig a kontroll csoporthoz képest IL-1 $\beta$ , IL-2 és IL-4 citokinek esetén. IL-10 szintek vizsgálatakor akut szívelégtelenségben mértünk szignifikánsan magasabb citokin szinteket a másik két vizsgált csoporthoz képest. IL-6, IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  esetében azonban nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között.
- A plazma PACAP-38 és citokinek közötti összefüggések vizsgálatakor szignifikáns pozitív korrelációt detektáltunk IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 és IL-10 citokinek esetén.

#### **7.2.2. ICM vagy NICM miatt kezelt, végstádiumú szívelégtelen betegek szívizommintáinak vizsgálata**

- Szignifikánsan magasabb szöveti PACAP-38 szintet mértünk az egészséges, kontroll egyének szívizommintáiban mind az ischaemiás, mind pedig a nem-ischaemiás cardiomyopathia miatt szívtranszplantációra került szívelégtelen betegekhez képest.
- Nem találtunk szignifikáns összefüggést a szöveti PACAP-38 szintek és az NT-proBNP szintek, különböző echocardiographiás és rutin laborparaméterek között.
- PAC1 receptor intenzitás vizsgálatakor a nem-ischaemiás cardiomyopathia miatt kezelt betegeknél szignifikánsan alacsonyabb PAC1 receptor intenzitást detektáltunk az egészséges kontroll csoporthoz képest. Míg az ischaemiás etiológiájú csoportban nem találtunk szignifikáns különbséget.

## 8. Irodalomjegyzék

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

**Arimura** A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery and current status of research. *Regul Pept*. **1992**; 37(3):287-303. PMID: 1313597.

**Ascuitto** RJ, Ross-Ascuitto NT, Waddell AE, Kadowitz PJ. Contractile and coronary vascular effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in neonatal pig hearts. *Cardiovasc Res*. **1996**; Spec No:E153-9. PMID: 8681340.

**Atlasz** T, Szabadfi K, Kiss P, Rác B, Gallyas F, Tamás A, Gaál V, Márton Zs, Gábel R, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retina: focus on the retinoprotective effects. *Ann N Y Acad Sci*. **2010**; 1200(1):128-139. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05512.x. PMID: 20633141.

**Bánki** E, Kovács K, Nagy D, Juhász T, Degrell P, Csanaky K, Kiss P, Jancsó G, Tóth G, Tamás A, Reglődi D. Molecular mechanisms underlying the nephroprotective effects of PACAP-38 in diabetes. *J Mol Neurosci*. **2014**; 54(3):300-309. doi:10.1007/s12031-014-0249-z. PMID: 24535559.

**Baranyai** T, Herczeg K, Onódi Z, Voszka I, Módos K, Marton N, Nagy G, Mäger I, Wood MJ, Andaloussi SE, Pálinkás Z, Kumar V, Nagy P, Kittel Á, Buzás EI, Ferdinandy P, Giricz Z. Isolation of exosomes from blood plasma: qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS One*. **2015**; 10(12):e0145686. doi: 10.1371/journal.pone.0145686. PMID: 26690353.

**Baranyai** T, Giricz Z, Varga ZV, Koncsos G, Lukovic D, Makkos A, Sárközy M, Pávó N, Jakab A, Czibalmos C, Vágó H, Ruzsa Z, Tóth L, Garamvölgyi R, Merkely B, Schulz R, Gyöngyösi M, Ferdinandy P. In vivo MRI and ex vivo histological assessment of the cardioprotection induced by ischemic preconditioning, postconditioning and remote conditioning in a closed-chest porcine model of reperfused acute myocardial infarction: Importance of microvasculature. *J Transl Med*. **2017**; 15(1):67-80. doi:10.1186/s12967-017-1166-z. PMID: 28364777.

**Bartekova** M, Radosinska J, Jelemensky M, Dhalla NS. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. *Heart Fail Rev*. **2018**; 23(5):733-758. doi: 10.1007/s10741-018-9716-x. PMID: 29862462.

**Boni** LJ, Ploug KB, Olesen J, Jansen-Olesen I, Gupta S. The in vivo effect of VIP, PACAP-38 and PACAP-27 and mRNA expression of their receptors in rat middle meningeal artery. *Cephalalgia*. **2009**; 29(8):837-847. doi: 10.1111/j.1468-2982.2008.01807.x. PMID: 19220306.

**Bruch** I, Bychkov R, Kästner A, Bülow T, Ried C, Gollasch M, Baumann G, Luft FC, Haller H. Pituitary adenylate-cyclase-activating peptides relax human coronary arteries by activating K(ATP)

and K(Ca) channels in smooth muscle cells. *J Vasc Res.* **1997**; 34(1):11-28. doi: 10.1159/000159197. PMID: 9075821.

**Bukovics P**, Czeiter E, Amrein K, Kovács N, Pál J, Tamás A, Bagoly T, Helyes Z, Büki A, Reglődi D. Changes of PACAP level in cerebrospinal fluid and plasma of patients with severe traumatic brain injury. *Peptides.* **2014**; 60:18-22. doi: 10.1016/j.peptides.2014.07.001. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25017241.

**Castelli GP**, Pognani C, Meisner M, Stuani A, Bellomi D, Sgarbi L. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Critical care (London, England).* **2004**; 8(4), R234-R242. doi:10.1186/cc2877. PMID: 15312223.

**Chan KY**, Baun M, de Vries R, van den Bogaerdt AJ, Driven CMF, Danser AHJ, Jansen-Olesen I, Olesen J, Villalón CM, MaassenVanDenBrink A, Gupta S. Pharmacological characterization of VIP and PACAP-38 receptors in the human meningeal and coronary artery. *Cephalalgia.* **2011**; 31(2):181-189. doi: 10.1177/0333102410375624. PMID: 20974589.

**Chang Y**, Lawson LJ, Hancock JC, Hoover DB. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: localization and differential influence on isolated hearts from rats and guinea pigs. *Regul Pept.* **2005**; 129(1-3):139-146. doi: 10.1016/j.regpep.2005.02.012. PMID: 15927709.

**Chung ES**, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT, Anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure Investigators. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the Anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation.* **2003**; 107(25):3133-140. doi: 10.1161/01.CIR.0000077913.60364.D2. PMID: 12796126.

**Cojan-Minzat BO**, Zlibut A, Agoston-Coldea L. Non-ischemic dilated cardiomyopathy and cardiac fibrosis. *Heart fail rev.* **2021**; 26(5), 1081-1101. doi:10.1007/s10741-020-09940-0. PMID: 32170530.

**Csanaky K**, Bánki E, Szabadfi K, Reglődi D, Tarcai I, Czeglédi L, Helyes Z, Tibor E, Gyarmati J, Szántó Z, Zapf I, Sipos E, Shioda S, Tamás A. Changes in PACAP immunoreactivity in human milk and presence of PAC1 receptor in mammary gland during lactation. *J Mol Neurosci.* **2012**; 48(3):631-637. doi: 10.1007/s12031-012-9779-4. PMID: 22539193.

**Dadson K**, Hauck L, Billia F. Molecular mechanisms in cardiomyopathy. *Clin Sci (Lond).* **2017**; 131(13):1375-1392. doi: 10.1042/CS20160170. PMID: 28645928.

**Dányádi B**, Szabadfi K, Reglődi D, Mihalik A, Dányádi T, Kovács Z, Bátaí I, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gábríel R. PACAP-38 application improves functional outcome of chronic retinal ischemic injury in rats - evidence from electroretinographic measurements. *J Mol Neurosci.* **2014**; 54(3):293-299. doi:10.1007/s12031-014-0296-5. PMID: 24723665.

**Davis ME**, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Frampton CM, Troughton RW. Introduction of metoprolol increases plasma B-type cardiac natriuretic peptides in mild, stable heart failure.

*Circulation*. **2006**; 21;113(7):977-985. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.567727. PMID: 16476851.

**Dénes V**, Geck P, Mester A, Gabriel R. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: 30 years in research spotlight and 600 million years in service. *J Clin Med*. **2019**; 8(9):1488. doi:10.3390/jcm8091488. PMID: 31540472.

**Dusi V**, Ghidoni A, Ravera A, De Ferrari GM, Calvillo L. Chemokines and heart disease: a network connecting cardiovascular biology to immune and autonomic nervous systems. *Mediators Inflamm*. **2016**; 2016:5902947. doi:10.1155/2016/5902947. PMID: 27242392.

**Dvoráková MC**. Cardioprotective role of the VIP signaling system. *Drug News Perspect*. **2005**; 18(6), 387-391. doi:10.1358/dnp.2005.18.6.927930.

**Fábián E**, Reglődi D, Mester L, Szabó A, Szabadfi K, Tamás A, Tóth G, Kovács K. Effects of PACAP-38 on intracellular signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *J Mol Neurosci*. **2012**; 48(3):493-500. doi: 10.1007/s12031-012-9812-7. PMID: 22644900.

**Fang L**, Moore XL, Dart AM, Wang LM. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *J Geriatr Cardiol*. **2015**; 12(3):305-312. doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2015.03.020. PMID: 26089856.

**Frangogiannis NG**. Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med*. **2019**; 65:70-99. doi: 10.1016/j.mam.2018.07.001. PMID: 30056242.

**Farnham MM**, Pilowsky PM. The role of PACAP-38 in central cardiorespiratory regulation. *Respir Physiol Neurobiol*. **2010**; 174(1-2):65-75. doi:10.1016/j.resp.2010.05.004. PMID: 20470908.

**Farnham MM**, Inglott MA, Pilowsky PM. Intrathecal PACAP-38 causes increases in sympathetic nerve activity and heart rate but not blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2011**; 300(1):214-222. doi: 10.1152/ajpheart.00662.2010. PMID: 20952662.

**Farnham MM**, Lung MS, Tallapragada VJ, Pilowsky PM. PACAP-38 causes PAC1/VPAC2 receptor mediated hypertension and sympathoexcitation in normal and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2012**; 303(7):H910-H917. doi:10.1152/ajpheart.00464.2012. PMID: 22886412.

**Ferencz A**, Rácz B, Tamás A, Reglődi D, Lubics A, Németh J, Nedvig K, Kalmár-Nagy K, Horváth OP, Weber G, Róth E. Influence of PACAP-38 on oxidative stress and tissue injury following small bowel autotransplantation. *J Mol Neurosci*. **2009**; 37(2):168-176. doi:10.1007/s12031-008-9132-0.

**Fröhlich GM**, Leistner DM. The relevance of periprocedural troponin rise: The never ending story! *Open Heart* **2017**; 4(2):e000590. doi:10.1136/openhrt-2017-000590. PMID: 28766585.

**Fukunaga T**, Soejima H, Irie A, Sugamura K, Oe Y, Tanaka T, Kojima S, Sakamoto T, Yoshimura M, Nishimura Y, Ogawa H. Expression of interferon-gamma and interleukin-4 production in CD4+

T cells in patients with chronic heart failure. *Heart Vessels*. **2007**; 22(3):178-83. doi: 10.1007/s00380-006-0955-8. PMID: 17533522.

**Gage JR**, Fonarow G, Hamilton M, Widawski M, Martínez-Maza O, Vredevoe DL. Beta blocker and angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy is associated with decreased Th1/Th2 cytokine ratios and inflammatory cytokine production in patients with chronic heart failure. *Neuroimmunomodulation*. **2004**; 11(3), 173-180. doi:10.1159/000076766. PMID: 15067208.

**Gaggin HK**, Januzzi JL Jr. Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochim Biophys Acta*. **2013**; 1832(12):2442-50. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.12.014. PMID: 23313577.

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

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

**Ghasemzadeh N**, Brooks MM, Vlachos H, Hardison R, Sikora S, Sperling L, Quyyumi AA, Epstein SE. An aggregate biomarker risk score predicts high risk of near term myocardial infarction and death: Findings from BARI 2D (Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes). *J Am Heart Assoc*. **2017**; 6(7):e003587. doi:10.1161/JAHA.116.003587. PMID: 28673897.

**Gill C.**, Mestri R., Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease - a novel therapeutic target? *FASEB J*. **2002**; 16(2):135-146. doi: 10.1096/fj.01-0629com. PMID: 11818361.

**Guo Y**, Cen Z, Wei B, Wu W, Zhou Q. Increased circulating interleukin 10-secreting B cells in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Clin Exp Pathol*. **2015**; 8(7):8107-8114. PMID: 26339378.

**Hahn JY**, Yu CW, Park HS, Song YB, Kim EK, Lee HJ, Bae J W, Chung WY, Choi SH, Choi JH, Bae JH, An KJ, Park JS, Oh JH, Kim SW, Hwang JY, Ryu JK, Lim DS, Gwon HC. Long-term effects of ischemic postconditioning on clinical outcomes: 1-year follow-up of the POST randomized trial. *Am Heart J*. **2015**; 169(5):639-646. doi: 10.1016/j.ahj.2015.01.015. PMID: 25965711.

**Han X**, Zhang S, Chen Z, Adhikari BK, Zhang Y, Zhang J, Sun J, Wang Y. Cardiac biomarkers of heart failure in chronic kidney disease. *Clin Chim Acta*. **2020**; 510:298-310. doi: 10.1016/j.cca.2020.07.040. PMID: 32710942.

**Hanna A**, Frangogiannis NG. Inflammatory cytokines and chemokines as therapeutic targets in heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther*. **2020**; 34(6):849-863. doi: 10.1007/s10557-020-07071-0. PMID: 32902739; PMCID: PMC7479403.

**Hansen JM**, Fahrenkrung J, Petersen J, Wienecke T, Olsen KS, Ashina M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP-38) in the circulation

after sumatriptan. *Scand J Pain*. **2013**; 4(4):211-216. doi: 10.1016/j.sjpain.2013.04.002. PMID: 29913626.

**Hartley A**, Marshall DC, Saliccioli JD, Sikkell MB, Maruthappu M, Shalhoub J. Trends in mortality from ischemic heart disease and cerebrovascular disease in Europe: 1980 to 2009. *Circulation*. **2009**; 133(20):1916-1926. doi:10.1161/circulationaha.115.018931. PMID: 27006480.

**Hausenloy D. J**, Garcia-Dorado D, Bøtker HE, Davidson S. M, Downey J, Engel F. B, Jennings R, Lecour S, Leor J, Madonna R, Ovzie M, Cinzia P, Prunier F, Schulz R, Sluijter JPG, Laake LWV, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Ytrehus K, Heusch G, Ferdinandy P. Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position paper of the European Society of Cardiology working group on cellular biology of the heart. *Cardiovasc Res*. **2017**; 113(6):564-585. doi:10.1093/cvr/cvx049. PMID: 28453734.

**Heusch G**, Botker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol*. **2015**; 65(2):177-195. doi: 10.1016/j.jacc.2014.10.031. PMID: 25593060.

**Hoover DB**, Girard BM, Hoover JL, Parsons RL. PAC1 receptors mediate positive chronotropic responses to PACAP-27 and VIP in isolated mouse atria. *Eur J Pharmacol*. **2013**; 713(1-3):25-30. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.04.037. PMID: 23665113.

**Horváth G**, Rácz B, Reglődi D, Lubics A, Németh J, Nedvig K, Kalmár-Nagy K, Horváth OP, Wéber G, Róth E. Effects of PACAP-38 on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia-reperfusion. *J Mol Neurosci*. **2010**; 42(2):411-418. doi:10.1007/s12031-008-9132-0. PMID: 18651248.

**Horváth G**, Opper B, Reglődi D. The neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) is protective in inflammation and oxidative stress-induced damage in the kidney. *Int J Mol Sci*. **2019**; 20(19):4944. doi: 10.3390/ijms20194944. PMID: 31591326.

**Ibanez B**, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P, ESC Scientific Document Group. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. **2017**; 39(2):119-177. doi: 10.1093/eurheartj/ehx393. PMID: 28886621.

**Ivic I**, Fülöp BD, Juhász T, Reglődi D, Tóth G, Hashimoto H, Tamás A, Koller A. Backup mechanisms maintain PACAP-38/VIP-induced arterial relaxations in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-deficient mice. *J Vasc Res*. **2017**; 54(3):180-192. doi: 10.1159/000457798. PMID: 28490016.

**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 Methods*. **2004**; 61(1-2):18-198. doi: 10.1016/j.jbbm.2004.03.002. PMID: 15560935.



**Jameson J**, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Disorders of the Cardiovascular System. Part 10. 20th e. McGraw-Hill, New York. **2018**.

**Jánosi A**. A szívinfartus miatt kezelt betegek ellátásának és prognózisának fontosabb adatai. Nemzeti Szívinfartus Regiszter 2020. *Card Hung*. **2021**; 51: 254-260. doi: 10.26430/CHUNGARICA.2021.51.4.254.

**Ji H**, Zhang Y, Shen XD, Gao F, Huang CY, Abad C, Busuttill RW, Waschek JA, Kupiec-Weglinski JW. Neuropeptide PACAP-38 in mouse liver ischemia and reperfusion injury: Immunomodulation by the cAMP-PKA pathway. *Hepatology*. **2013**; 57(3):1225-1237. doi:10.1002/hep.25802. PMID: 22532103.

**Ji Y**, Ge J, Li X. Association of IL-1 $\beta$  polymorphisms and plasma levels with chronic heart failure: A case-control study in Chinese patients. *Eur J Inflam*. **2018**; 16:1-7. doi:10.1177/2058739218818686.

**Jiang L**, Wang WH, Dong XQ, Yu WH, Du Q, Yang DB, Wang H, Shen YF. The change of plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide levels after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol Scand*. **2016**; 134(2):131–139. doi: 10.1111/ane.12522. PMID: 26471292.

**Kaur K**, Dhingra S, Slezak J, Sharma AK, Bajaj A, Singal PK. Biology of TNF $\alpha$  and IL-10, and their imbalance in heart failure. *Heart Fail Rev*. **2009**; 14(2):113-123. doi: 10.1007/s10741-008-9104-z. PMID: 18712475.

**Kloner R**. Stunned and hibernating myocardium: where are we nearly 4 decades later? *J Am Heart Assoc*. **2020**; 9(3):e015502. doi:10.1161/JAHA.119.015502. PMID: 32013699.

**Korley FK**, Jaffe AS. Preparing the United States for high-sensitivity cardiac troponin assays. *J Am Coll Cardiol*. **2013**; 61(17):1753-1758. doi:10.1016/j.jacc.2012.09.069. PMID: 23395074.

**Kumar M**, Kasala RE, Bodduluru LN, Dahiya V, Sharma D, Kumar V, Lahkar M. Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation. *Regul Toxicol Pharmacol*. **2016**; 76(1):221-230. doi:10.1016/j.yrtph. PMID: 26988997.

**Lacraz S**, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest*. **1995**; 96(5):2304-2310. doi: 10.1172/JCI118286. PMID: 7593617.

**Lappegård KT**, Bjørnstad H, Mollnes TE, Hovland A. Effect of cardiac resynchronization therapy on inflammation in congestive heart failure: A Review. *Scand J Immunol*. **2015**; 82(3):191-198. doi: 10.1111/sji.12328. PMID: 26099323.

**Lazarovici P**, Cohen G, Arien-Zakay H, Chen J, Zhang C, Chopp M, Jiang H. Multimodal neuroprotection induced by PACAP-38 in oxygen-glucose deprivation and middle cerebral artery occlusion stroke models. *J Mol Neurosci*. **2012**; 48(3):526–540. doi:10.1007/s12031-012-9818-1. PMID: 22678884.

**Lenti L**, Domoki F, Kis D, Hegyi O, Tóth GK, Busija DW, Bari F. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces pial arteriolar vasodilatation through cyclooxygenase-dependent and

independent mechanisms in newborn pigs. *Brain Res.* **2007**; 1165 (1):81-88. doi: 10.1016/j.brainres.2007.06.032. PMID: 17658492.

**Levick SP**, Goldspink PH. Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Heart Fail Rev.* **2014**; 19(2):227-236. doi: 10.1007/s10741-013-9393-8. PMID: 23589353.

**Li H**, Chen C, Wang DW. Inflammatory cytokines, immune cells and organ interactions in heart failure. *Front Physiol.* **2021**; 12:695047. doi: 10.3389/fphys.2021.695047. PMID: 34276413.

**Lindsey ML**, Bolli R, Canty JM, Du XJ, Frangogiannis NG, Frantz S, Gourdie RG, Holmes JW, Jones SJ, Kloner RA, Lefer DJ, Liao R, Murphy E, Ping P, Przyklenk K, Recchia FA, Longacre LS, Ripplinger CM, Eyk JEV, Heusch G. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2018**; 314(4):H812–H838. doi:10.1152/ajpheart.00335.2017. PMID: 29351451.

**Lotierzo M**, Dupuy AM, Kalmanovich E, Roubille F, Cristol JP. sST2 as a value-added biomarker in heart failure. *Clin Chim Acta.* **2020**; 501(1):120-130. doi: 10.1016/j.cca.2019.10.029. PMID: 31678574.

**Ma BQ**, Zhang M, Ba L. Plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide concentrations and motrality after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Clin Chim Acta.* **2015**; 439(1):102-106. doi:10.1016/j.cca.2014.10.010. PMID: 25314937.

**Maisel A**, Mueller C, Adams K Jr, Anker SD, Aspromonte N, Cleland JGF, Cohen-Solal A, Dahlstrom U, DeMaria A, Somma SD, Filippatos GS, Fonarow GC, Jourdain P, Komajda M, Liu PP, McDonagh T, McDonald K, Mebazaa A, Nieminen MS, Peacock WF, Tubaro M, Valle R, Vanderhyden M, Yancy CW, Zannad F, Braunwald E. State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail.* **2008**; 10(9):824-839. doi: 10.1016/j.ejheart.2008.07.014. PMID: 18760965.

**Matsumura T**, Tsushima K, Ohtaki E, Misu K, Tohbaru T, Asano R, Nagayama M, Kitahara K, Umemura J, Sumiyoshi T, Hosoda S. Effects of carvedilol on plasma levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in nine patients with dilated cardiomyopathy. *J Cardiol.* **2002**; 39(5):253-257. PMID: 12048901.

**McDonagh AT**, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJV, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Piepoli MF, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Skibelund AK, ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* **2021**; 42(36):3599-3726. doi:10.1093/eurheartj/ehab368.

**McNally ME**, Mestroni L. Dilated cardiomyopathy. Genetic determinants and mechanisms. *Circ Res.* **2017**; 121(7):731-748. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309396. PMID: 28912180.

**Miller** WL, Hartman AK, Burritt MF, Burnett Jr JC, Jaffe AS. Mortality in end stage heart failure is associated with paradoxically low NT-pro BNP and BNP levels: “natriuretic peptide exhaustion”? *J Card Fail.* **2004**; 10, s45. doi: 10.1016/j.cardfail.2004.06.095.

**Miyata** A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **1989**; 164(1):567-574. doi: 10.1016/0006-291x(89)91757-9. PMID: 2803320.

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

**Mueller** C, McDonald K, de Boer RA, Maisel A, Clelang JGF, Kozhuharov N, Coats AJS, Metra M, Mebazaa A, Ruschitzka F, Lianscak M, Filippatos G, Seferovic PM, Meijers WC, Bayes-Genis A, Mueller T, Richards M, Januzzi Jr JL, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. Heart Failure Association of the European Society of Cardiology practical guidance on the use of natriuretic peptide concentrations. *Eur J Heart Fail.* **2019**; 21(6):715-731. doi: 10.1002/ejhf.1494. PMID: 31222929.

**Njoroge** JN, Teerlink JR. Pathophysiology and therapeutic approaches to acute decompensated heart failure. *Circ Res.* **2021**; 128(10), 1468–1486. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318186. PMID: 33983837.

**Nonaka** N, Banks WA, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: Protective effects in stroke and dementia. *Peptides.* **2020**; 130(1):170332. doi: 10.1016/j.peptides.2020.170332. PMID: 32445876.

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

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

**Perna** ER, Macin SM, Canella JP, Augier N, Stival JL, Cialzeta JR, Pitzus AE, Garcia EH, Obregon R, Brizuela M, Barbagelata A. Ongoing myocardial injury in stable severe heart failure: Value of cardiac troponin T monitoring for high-risk patient identification. *Circulation.* **2004**, 110(16), 2376-2382. doi.org/10.1161/01.CIR.0000145158.33801.F3. PMID: 15477403.

- Persson K**, Ahren B. The neuropeptide PACAP-38 contributes to the glucagon response to insulin-induced hypoglycaemia in mice. *Acta Physiol Scand.* **2002**; 175(1):25-28. doi:10.1046/j.1365-201X.2002.00977.x. PMID: 11982501.
- Pham D**, Polgár B, Tóth T, Jüngling A, Kovács N, Balás I, Pál E, Szabó D, Fülöp BD, Reglődi D, Szántó Z, Herczeg R, Gyenesei A, Tamás A. Examination of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in Parkinson's disease focusing on correlations with motor symptoms. *Geroscience.* **2022**; 44(2): 785-803. doi: 10.1007/s11357-022-00530-6. Epub ahead of print. PMID: 35220508.
- Puelacher C**, Wagener M, Honegger U, Assadian M, Schaerli N, Mueller D, Strebel I, Twerenbold R, Boeddinghaus J, Nestelberger T, Wildi K, Sabti Z, Szgary L, Badertscher P, du Fay de Lavallaz J, Marbot S, Kaiser C, Wild D, Zellweger MJ, Reichlin T, Mueller C. Combining high-sensitivity cardiac troponin and B-type natriuretic peptide in the detection of inducible myocardial ischemia. *Clin Biochem.* **2018**; 52(1):33-40. doi:10.1016/j.clinbiochem.2017.10.014. PMID: 29107010.
- Rác B**, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas Jr F, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Kiss P, Róth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittman I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol.* **2007**; 153(1-3):115-123. doi: 10.1016/j.ygcen.2006.12.006. PMID: 17270184.
- Rác B**, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Szántó Z, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Róth E, Reglődi D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP-38 against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul Pept.* **2008**; 145(1-3):105-15. doi: 10.1016/j.regpep.2007.09.015. PMID: 17981349.
- Reglődi D**, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Maderdrut JL, Arimura A. Neuroprotective effects of PACAP-38 in a rat model of transient focal ischemia under various experimental conditions. *Ann N Y Acad Sci.* **2000**; 921(1):119-128. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06958.x. PMID: 11193815.
- Reglődi D**, Tamás A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide - PACAP. 1<sup>st</sup> ed. Switzerland: *Springer.* **2016**.
- Reglődi D**, Helyes Z, Németh J, Vass RA, Tamás A. PACAP as a potential biomarker: alterations of PACAP levels in human physiological and pathological conditions. In: Reglődi D, Tamás A, editors. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-PACAP. *Springer*, Cham; **2016**. pp. 815-832. doi:10.1007/978-3-319-35135-3\_48
- Reglődi D**, Tamás A, Jüngling A, Váczy A, Rivnyak A, Fülöp BD, Szabó E, Lubics A, Atlasz T. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide against neurotoxic agents. *Neurotoxicology.* **2018a**; 66(1):185-194. doi: 10.1016/j.neuro.2018.03.010. PMID: 29604313.
- Reglődi D**, Váczy A, Rubio-Beltran E, MaassenVanDenBrink A. Protective effects of PACAP-38 in ischemia. *J Headache Pain.* **2018b**; 19(1):19. doi: 10.1186/s10194-018-0845-3. PMID: 29500688.
- Rørth R**, Jørgensen PG, Andersen HU, Christoffersen C, Gøtze JP, Køber L, Rossing P, Jensen MT. Cardiovascular prognostic value of echocardiography and N terminal pro B-type natriuretic peptide

in type 1 diabetes: the Thousand & 1 Study. *Eur J Endocrinol.* **2020**; 182(5):481-488. doi: 10.1530/EJE-19-1015. PMID: 32209724.

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

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

**Saetrum O**, Knutsson M, De Vries R, Tom B, Saxena PR, Edvinsson L. Vasoactive intestinal peptide has a direct positive inotropic effect on isolated human myocardial trabeculae. *Clin Sci.* **2001**; 101(6):637-643. doi: 10.1042/cs20010076. PMID: 11724651.

**Sakurai Y**, Shintani N, Hayata A, Hashimoto H, Baba A. Trophic effects of PACAP-38 on pancreatic islets: A mini-review. *J Mol Neurosci.* **2011**; 43(1):3-7. doi:10.1007/s12031-010-9424-z. PMID: 20645023.

**Sano H**, Miyata A, Horio T, Nishikimi T, Matsuo H, Kangawa K. The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cultured rat cardiocytes as a cardioprotective factor. *Regul Pept.* **2002**; 109(1-3):107-113. doi: 10.1016/s0167-0115(02)00193-3. PMID: 12409222.

**Schomig A**. Catecholamines in myocardial ischemia. Systemic and cardiac release. *Circulation.* **1990**; 82(3):13-22. PMID: 2203558.

**Seeliger S**, Buddenkotte J, Schmidt-Choudhury A, Rosignoli C, Shpacovitch V, von Arnim U, Metzger D, Rukwied R, Schmelz M, Paus R, Voegel JJ, Schmidt WE, Steinhoff M. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: an important vascular regulator in human skin in vivo. *Am J Pathol.* **2010**; 177(5):2563-2575. doi:10.2353/ajpath.2010.090941. PMID: 20889562.

**Sekulic M**, Zacharias M, Medalion B. Ischemic cardiomyopathy and heart failure. *Circ Heart Fail.* **2019**, 12(6), e006006. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006006. PMID: 31113224.

**Serrao GW**, Lansky AJ, Mehran R, Stone GW. Predictors of left ventricular ejection fraction improvement after primary stenting in ST-segment elevation myocardial infarction (from the Harmonizing Outcomes With revascularization and Stents in Acute Myocardial Infarction Trial – HORIZONS-AMI). *Am J Cardiol.* **2018**; 121(6):678-683. doi: 10.1016/j.amjcard.2017.12.004. PMID: 29394998.

**Solomon SD**, Glynn RJ, Greaves S, Ajani U, Rouleau JL, Menapace F, Arnold JM, Hennekens C, Pfeffer MA. Recovery of ventricular function after myocardial infarction in the reperfusion era: The healing and early afterload reducing therapy study. *Ann Intern Med.* **2001**; 134(6):451-458. doi:10.7326/0003-4819-134-6-200103200-00009. PMID: 11255520.

**Solymár M**, Ivic, I, Balaskó M, Fülöp BD, Tóth G, Tamás A, Reman G, Koller A, Reglódi D. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates vascular dysfunction induced by hyperglycaemia. *Diabetes Vasc Dis Res.* **2018**; 15(4):277-285. doi:10.1177/1479164118757922. PMID: 29466879.

**Somogyvári-Vigh A**, Reglódi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr Pharm Des.* **2004**; 10(23):2861-89. doi: 10.2174/1381612043383548. PMID: 15379674.

**Spinar J**, Spinarova L, Malek F, Ludka O, Krejci J, Ostadal P, Vondrakova D, Labr K, Spinarova M, Goldbergova MP, Benesova K, Jarakovsky J, Parenica J. Prognostic value of NT-proBNP added to clinical parameters to predict two-year prognosis of chronic heart failure patients with mid-range and reduced ejection fraction - A report from FAR NHL prospective registry. *PLoS One.* **2019**; 14(3):e0214363. doi: 10.1371/journal.pone.0214363. PMID: 30913251.

**Stienen S**, Salah K, Moons AH, Bakx AL, van Pol P, Kortz RAM, Ferreira JP, Marques I, Schroeder-Tanka JM, Keijer JT, Bayés-Genis A, Tijssen JGP, Pinto YM, Kok WE. NT-proBNP (N-Terminal pro-B-Type Natriuretic Peptide)-guided therapy in acute decompensated heart failure: PRIMA II randomized controlled trial (can NT-proBNP-guided therapy during hospital admission for acute decompensated heart failure reduce mortality and readmissions?). *Circulation.* **2018**; 137(16):1671-1683. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029882. PMID: 29242350.

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

**Syed AU**, Koide M, Braas KM, May V, Wellman GC. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) potently dilates middle meningeal arteries: implications for migraine. *J Mol Neurosci.* **2012**; 48(3):574-583. doi: 10.1007/s12031-012-9851-0. PMID: 22766684; PMCID: PMC3581331

**Szabadfi K**, Reglódi D, Szabó A, Szalontai B, Valasek A, Setalo Jr G, Kiss P, Tamás A, Wilhelm M, Gabriel R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, a potential therapeutic agent for diabetic retinopathy in rats: focus on the vertical information processing pathway. *Neurotox Res.* **2016**; 29(3):432-446. doi:10.1007/s12640-015-9593-1. PMID: 26739825.

**Szántó Z**, Sárszegi Z, Reglódi D, Németh J, Szabadfi K, Kiss P, Varga A, Bánki E, Csanaky K, Gaszner B, Pinter O, Szalai Z, Tamás A. PACAP-38 immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J Mol Neurosci.* **2012**; 48(3):667-673. doi: 10.1007/s12031-012-9815-4. PMID: 22648511.

**Tajti J**, Tuka B, Botz B, Helyes Z, Vecsei L. Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in nociception and migraine. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* **2015**; 14(4):540-553. doi: 10.2174/1871527314666150429114234. PMID: 25921738.

**Tamás A**, Tóth D, Pham D, Loibl C, Rendeki S, Csontos C, Rozanovic M, Bogár L, Polgár B, Németh J, Gyenesei A, Herczeg R, Szántó Z, Reglódi D. Changes of pituitary adenylate cyclase activating

polypeptide (PACAP) level in polytrauma patients in the early post-traumatic period. *Peptides*. **2021**; 146:170645. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170645. PMID: 34478801.

**Tentolouris C**, Tousoulis D, Antoniadis C, Bosinakou E, Kotsopoulou M, Trikas A, Toutouzas P, Stefanadis C. Endothelial function and proinflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease and dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. **2004**; 94(2-3):301-305. doi: 10.1016/j.ijcard.2003.08.002. PMID: 15093997.

**Thygesen K**, Alpert SJ, Chatima RB, Jaffe AS, Bax JJ, Morrow DA, White HD. Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. (2018) Fourth universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. **2018**; 72(18):2231-2264. doi:10.1016/j.jacc.2018.08.1038. PMID: 30153967.

**Tomai F**, Crea F, Chiariello L, Giofrè PA. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circulation*. **1999**; 100(5):559-563. doi: 10.1161/01.cir.100.5.559. PMID: 10430772.

**Tóth D**, Szabó E, Tamás A, Juhász T, Horváth G, Fabian E, Opper B, Szabó D, Maugeri G, D'Amico AG, D'Agata V, Vicena V, Reglődi D. Protective effects of PACAP-38 in peripheral organs. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **2020**; 11(1):377. doi: 10.3389/fendo.2020.00377. PMID: 32765418.

**Troughton RW**, Richards AM. B-type natriuretic peptides and echocardiographic measures of cardiac structure and function. *JACC Cardiovasc Imaging*. **2009**; 2(2):216-225. doi: 10.1016/j.jcmg.2008.12.006. PMID: 19356559.

**Tsutsui H**, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2011**; 301(6):H2181-H2190. doi: 10.1152/ajpheart.00554.2011. PMID: 21949114.

**Tuka B**, Helyes Z, Markovics A, Bagoly T, Szolcsányi J, Szabó N, Tóth E, Kincses ZT, Vécsei L, Tajti J. Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalgia*. **2013**; 33(13):1085-1095. doi: 10.1177/0333102413483931. PMID: 23598374.

**Ushiyama M**, Sugawara H, Inoue K, Kangawa K, Yamada K, Miyata A. Characterization of the PAC1 variants expressed in the mouse heart. *Ann N Y Acad Sci*. **2006**; 1070(1):586-590. doi: 10.1196/annals.1317.086. PMID: 16888230.

**Vámos Z**, Ivic I, Cséplő P, Tóth G, Tamás A, Reglődi D, Koller A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) induces relaxations of peripheral and cerebral arteries, which are differentially impaired by aging. *J Mol Neurosci*. **2014**; 54(3):535-542. doi: 10.1007/s12031-014-0349-9. PMID: 24939249.

**Varga Z. V**, Pipicz M, Baán JA, Baranyai T, Koncsos G, Leszek P, Kuśmierczyk M, Sánchez-Cabo F, García-Pavía P, Brenner GJ, Giricz Z, Csont T, Mendler L, Lara-Pezzi E, Pacher P, Ferdinandy P. Alternative splicing of NOX4 in the failing human heart. *Front Physiol*. **2017**; 8(1):935. doi: 10.3389/fphys.2017.00935. PMID: 29204124.

**Vaudry D**, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ. PACAP-38 protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur J Neurosci*. **2002**; 15(9):1451-1460. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.01981.x. PMID: 12028355.

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

**Wei Y**, Mojsov S. Multiple human receptors for pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide are expressed in a tissue-specific manner. *Ann N Y Acad Sci*. **1996**; 805(1):624-627. doi: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb17531.x. PMID: 8993451.

**Weil BR**, Suzuki G, Young RF, Iyer V, Canty Jr JM. Troponin release and reversible left ventricular dysfunction after transient pressure overload. *J Am Coll Cardiol*. **2018**; 71(25):2906-2916. doi: 10.1016/j.jacc.2018.04.029. PMID: 29929614.

**Writing Group Members**, Doherty JU, Kort S, Mehran R, Schoenhagen P, Soman P, Rating Panel Members; Dehmer GJ, DohertyJU, Schoenhagen P, Bashore TM, Bhave NM, Calnon DA, Carabello B, Conte J, Dickfeld T, Edmundowicz D, Ferrari VA, Hall ME, Ghoshhajra B, Mehrotra P, Zaqui TZ, Reece TB, Starling RC, Szerlip M, Tzou WS, Wong JB, Appropriate Use Criteria Task Force; Doherty JU, Dehmer GJ, Bailey SR, Bhave NM, Brown AS, Daugherty SL, Dean LS, Desai MY, Duvernoy CS, Gillam LD, Hendel RC, Kramer CM, Lindsay BD, Manning WJ, Patel MR, Sachdeva R, Wann LS, Winchester DE, Wolk MJ. Appropriate use criteria for multimodality imaging in the assessment of cardiac structure and function in nonvalvular heart disease: A report of the American College of Cardiology Appropriate Use Criteria Task Force, American Association for Thoracic Surgery, American Heart Association, American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Rhythm Society, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Cardiovascular Computed Tomography, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, and the Society of Thoracic Surgeons. *J Am Soc Echocardiogr*. **2019**; 32(5):553-579. doi:10.1016/j.echo-2019.01.008. PMID: 30744922.

**Yamamoto K**, Hashimoto H, Tomimoto S, Shintani N, Miyazaki J. I, TashiroF, Aihara H, Nammo T, Li M, Yamagata K, Miyagawa J. I, Matsuzawa Y, Kawabata Y, Fukuyama Y, Koga K, Mori W, Tanaka K, Matsuda T, Baba A. Overexpression of PACAP-38 in transgenic mouse pancreatic beta-cells enhances insulin secretion and ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* **2003**; 52(5):1155-1162. doi:10.2337/diabetes.52.5.1155. PMID: 12716746.

**Yang R**, Jiang X, Ji R, Meng L, Liu F, Chen X, Xin Y. Therapeutic potential of PACAP-38 for neurodegenerative diseases. *Cell Mol Biol Lett*. **2015**; 20(2):265-278. doi: 10.1515/cmbl-2015-0008. PMID: 26204407.

**Zagami AS**, Edvinsson L, Goadshy PJ. Pituitary cyclase activating polypeptide and migraine. *Ann Clin Transl Neurol*. **2014**; 1(12):1036-1040. doi: 10.1002/acn3.113. PMID: 25574477.

**Zhang Y**, Bauersachs J, Langer HF. Immune mechanisms in heart failure. *Eur J Heart Fail*. **2017**; 19(11):1379-1389. doi: 10.1002/ejhf.942. PMID: 28891154.



## 9. Publikációk

### 9.1. A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

- Szabó D, Sárszegi Zs, Polgár B, Sággy É, Németh Á, Reglődi D, Makkos A, Görbe A, Helyes Z, Ferdinandy P, Herczeg R, Gyenesei A, Cziráki A, Tamás A. PACAP-38 in acute ST-segment elevation myocardial infarction in humans and pigs: a translational study. *Int J Molec Sci.* **2021**, 22(6), 2883. doi: 10.3390/ijms22062883. IF: 5,924, Q1
- Szabó D\*, Sárszegi Zs\*, Polgár B, Sággy É, Reglődi D, Tóth T, Onódi Z, Leszek P, Varga VZ, Helyes Z, Kemény Á, Ferdinandy P, Tamás A. PACAP-38 and PAC1 receptor alterations in plasma and cardiac tissue samples of heart failure patients. *Int J Molec Sci.* **2022**, 23(7), 3715. doi: 10.3390/ijms23073715. IF: 5,924, Q1 (\*megosztott első szerzős közlemény)
- Sárszegi Zs, Szabó D, Gaszner B, Kónyi A, Reglődi D, Németh J, Lelesz B, Polgár B, Jüngling A, Tamás A. Examination of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a potential biomarker in heart failure patients. *J Mol Neurosci.* **2019**, 68(3), 368-376. doi:10.1007/s12031-017-1025-7. IF: 2,678, Q1.
- Szabó D, Szántó Z, Jüngling A, Polgár B, Reglődi D, Cziráki A, Tamás A, Sárszegi Zs. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the cardiovascular system. *Card Hung.* **2018**, 48; 129-135. doi:10.26430/CHUNGARICA.2018.48.2.129. - Review

Ezen közlemények összesített impakt faktora: 14,526

### 9.2. Egyéb közlemények

- Tóth D, Szabó E, Tamás A, Juhász T, Horváth G, Fábrián E, Opper B, Szabó D, Maugeri G, D'Amico A. G, D'Agata V, Vicena V, Reglődi D. Protective effects of PACAP in peripheral organs. *Front Endocrinol (Lausanne).* **2020**; 11:377. doi:10.3389/fendo.2020.00377. IF: 5,55, Q1.

- Pham D, Polgár B, Tóth T, Jüngling A, Kovács N, Balas I, Pál E, **Szabó D**, Fülöp D. B, Reglődi D, Szántó Z, Herczeg R, Gyenesei A, Tamás A. Examination of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in Parkinson's disease focusing on correlations with motor symptoms. *GeroScience*. **2021**; Published: 26 February 2022. doi:10.1007/s11357-022-00530-6. IF:7,71, Q1.
- **Szabó D**, Nagy D, Melczer Cs, Ács P, Rátgéber L, Szokodi I, Tóth M, Cziráki A, Eklies K, Sárszegi Zs. Influencing factors of cardiac adaptation in adolescent athletes. *Int J Sports Medicine*. **2021**; 42(13):1029-1221. doi:10.1055/a-1386-4805. IF: 3,12, Q1.

*A szerző kumulatív impakt faktora: 30,906*

### **9.3. A dolgozat témájához kapcsolódó absztraktok**

- **Szabó D**, Sárszegi Zs, Tamás A, Reglődi D, Cziráki A. PACAP szöveti és szérum szintjének vizsgálata ischaemiás szívbetegségben, billentyűbetegekben és szívelégtelenségben. *Card Hung*. **2017**. Suppl.
- **Szabó D**, Reglődi D, Németh J, Lelesz B, Cziráki A, Tamás A, Sárszegi Zs. PACAP szérum szintjének vizsgálata különböző kardiovaszkuláris kórképekben. *DKK17-Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban absztraktkötet*. **2017**. 89 p.p.16, 1p.
- **Szabó D**, Tamás A, Varjas N, Polgár B, Reglődi D, Cziráki A, Sárszegi Zs. A hipofízis adenliát cikáz aktiváló polipeptid potenciális kardioprotektív szerepe szívelégtelen betegekben. *Card Hung*. **2020**. Suppl. D162.
- **Szabó D**, Varjas N, Polgár B, Sárszegi Zs, Tamás A. Potential cardioprotective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in heart failure. 17<sup>th</sup> International Medical Postgradual Conference. **2020**. - Charles University Faculty of Medicine in Hradec Králové. [https://www.lfhk.cuni.cz/getattachment/Veda,-zahranici/Vedecka-setkani/Mezinarodni-konference-studentu-DSP/Archiv-mezinarodnich-konferenci-studentu-DSP/Navrh-SBORNIK-2020\\_FINAL2.pdf.aspx/?lang=en-GB](https://www.lfhk.cuni.cz/getattachment/Veda,-zahranici/Vedecka-setkani/Mezinarodni-konference-studentu-DSP/Archiv-mezinarodnich-konferenci-studentu-DSP/Navrh-SBORNIK-2020_FINAL2.pdf.aspx/?lang=en-GB).

- **Dóra Szabó**, Zsolt Sárszegi, Norbert Varjas, Beáta Polgár, Attila Cziráki, Dóra Reglődi, Andrea Tamás. Potential cardioprotective role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in heart failure patients. *Eur J Heart Failure*. **2020**; 22(Suppl. S1):270. doi: 10.1002/ejhf.1963.

#### 9.4. Egyéb absztraktok

- **Szabó D**, Sárszegi Zs, Gaszner B, Goják I, Bertalan A, Szabados S, Cziráki A. Tricuspidalis billentyű endocarditis sikeres kezelése 18 hetes gravida esetében. *Card Hung*. **2018**. Suppl. C73.
- **Szabó D**, Nagy D, Melczer Cs, Ács P, Cziráki A, Sárszegi Zs. Effects of endurance training on the left ventricular diastolic function and right ventricular parameters in peripubertic athletes. *Eur J Prev Card*. **2019**. 26(Suppl1):S30-31. doi:10.1177/2047487319860046.
- **Szabó D**, Horányi A, Nagy D, Melczer Cs, Ács P, Cziráki A, Sárszegi Zs. Az állóképességi sportok hatásai a bal kamrai diasztolés funkcióra és a jobb kamrai paraméterekre peripubertás korú sportolóknál. *Card Hung*. **2019**. Suppl. B58.
- Sárszegi Zs, **Szabó D**, Szokodi I, Nagy D, Melczer Cs, Ács P, Cziráki A. A kardiális adaptációt befolyásoló tényezők hatásai a bal kamrai diasztolés, valamint a jobb kamrai szisztolés és diasztolés funkcióra peripubertás korú sportolóknál. *Card Hung*. **2019**. Suppl. D145.
- **Szabó D**, Horányi A, Nagy D, Melczer Cs, Ács P, Szokodi I, Cziráki A, Sárszegi Zs. The main influencing factors of cardiac adaptation affecting the diastolic and right ventricular function in peripubertic athletes. *Eur Heart J – Cardiovasc Imaging*. **2020**. 21(Suppl.1): jez319.411. doi:10.1093/ehjci/jez319.411.
- **Szabó D**, Melczer Cs, Ács P, Cziráki A, Tóth M, Szokodi I, Sárszegi Zs. Terhelés indukálta bal kamra hipertrófia új klasszifikációjának alkalmazása peripubertás korú sportolóknál. *Card Hung*. **2021**. 51:1.

## 10. Köszönetnyilvánítás

Először szeretném megköszönni klinikai Témavezetőmnek Dr. Sárszegi Zsoltnak szakmai iránymutatását és támogatását klinikai munkásságom legelső pillanatától, mindent megadva ahhoz és arra ösztönözve, hogy a lehető legjobb kardiológus lehessen. Legalább ugyanakkora köszönet jár alapkutató Témavezetőmnek, Dr. Tamás Andreának, aki bevezetett az alap kutatás rejtelmeibe és rengeteg segítséget és támogatást nyújtott az egész Ph.D. képzésem során. Két Témavezetőm nélkül nem jöhetett volna létre ez a munka.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Polgár Beátának, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának, akik szakmai profizmusukkal és maximalizmusukkal mindig hozzá tudtak tenni és javítani tudtak a munkáimon. Köszönet illeti Prof. Dr. Reglődi Dórát és Prof. Dr. Cziráki Attilát, akik lehetővé tették, hogy Intézeteikben folytathassam kutatásaim. Szeretném megköszönni az Anatómiai Intézet és a Szívgyógyászati Klinika minden kedves munkatársának a rengeteg segítséget és szeretetet, amit az évek alatt tőlük kaptam. Köszönettel tartozom még Prof. Dr. Ferdinandy Péternek, a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet Kardiometabolikus Kutatócsoportjának tagjainak, valamint Przemyslaw Leszek Professzor Úrnak és a lengyel Cardinal Stefan Wyszyński National Institute of Cardiology munkatársaink a kollaborációs munkáért.

Óriási köszönet kollégáimnak és barátaimnak, Dr. Meiszterics Zsófiának és Dr. Porpáczy Adélnak, akik a legelső pillanattól kezdve mind szakmailag, mind lelkileg támogattak. Végül nagyon köszönöm kis családomnak és szerelmemnek azt a feltétel nélküli szeretetet, támogatás és olykor az akut krízis menedzsmentet, nélkülük nem ment volna.

A dolgozat a következő támogatásokkal készült:

NKFIH K119759, K129190 és K135457, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS”, Magyar Tudományos Akadémia MTA-TKI-14016, Tématerületi Kiválósági Program 2021 Egészség alprogram „Az agy működésének és betegségeinek vizsgálata multidiszciplináris megközelítéssel” TKP2021-EGA-16, EFOP 3.6.1-16.2016.00004.



Article

# PACAP-38 in Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction in Humans and Pigs: A Translational Study

Dora Szabo <sup>1,2</sup>, Zsolt Sarszegi <sup>1</sup>, Beata Polgar <sup>3</sup>, Eva Saghy <sup>4</sup>, Adam Nemeth <sup>1</sup>, Dora Reglodi <sup>2</sup>, Andras Makkos <sup>4</sup> , Aniko Gorbe <sup>4,5</sup>, Zsuzsanna Helyes <sup>6,7,8</sup>, Peter Ferdinandy <sup>4,5</sup>, Robert Herczeg <sup>7</sup>, Attila Gyenesei <sup>7</sup>, Attila Cziraki <sup>1</sup> and Andrea Tamas <sup>2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Heart Institute, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary; dora0szabo@gmail.com (D.S.); sarszegizsolt@gmail.com (Z.S.); nemeth.adam@pte.hu (A.N.); cziraki.attila@pte.hu (A.C.)
- <sup>2</sup> Department of Anatomy, MTA-PTE PACAP Research Team, Centre for Neuroscience, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary; dora.reglodi@aok.pte.hu
- <sup>3</sup> Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary; polgar.beata@pte.hu
- <sup>4</sup> MTA-SE System Pharmacology Research Group and Cardiovascular and Metabolic Research Group, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Semmelweis University, 1089 Budapest, Hungary; saghy.eva@med.semmelweis-univ.hu (E.S.); makkos.andras@med.semmelweis-univ.hu (A.M.); gorbe.aniko@med.semmelweis-univ.hu (A.G.); peter.ferdinandy@pharmahungary.com (P.F.)
- <sup>5</sup> Pharmahungary Group, 6722 Szeged, Hungary
- <sup>6</sup> Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary; zsuzsanna.helyes@aok.pte.hu
- <sup>7</sup> Szentagotai Research Centre, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary; herczeg.robert@pte.hu (R.H.); gyenesei.attila@pte.hu (A.G.)
- <sup>8</sup> PharmInVivo Ltd., 7629 Pecs, Hungary
- \* Correspondence: andreatamassz@gmail.com or TAAFAAO.PTE@pte.hu; Tel.: +36-72-536-001 (ext. 36421)



**Citation:** Szabo, D.; Sarszegi, Z.; Polgar, B.; Saghy, E.; Nemeth, A.; Reglodi, D.; Makkos, A.; Gorbe, A.; Helyes, Z.; Ferdinandy, P.; et al. PACAP-38 in Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction in Humans and Pigs: A Translational Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2883. <https://doi.org/10.3390/ijms22062883>

Academic Editor:  
Joan Roselló-Catafau

Received: 1 February 2021  
Accepted: 6 March 2021  
Published: 12 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Acute myocardial infarction (MI) is one of the most common causes of death worldwide. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is a cardioprotective neuropeptide expressing its receptors in the cardiovascular system. The aim of our study was to examine tissue PACAP-38 in a translational porcine MI model and plasma PACAP-38 levels in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI). Significantly lower PACAP-38 levels were detected in the non-ischemic region of the left ventricle (LV) in MI heart compared to the ischemic region of MI-LV and also to the Sham-operated LV in porcine MI model. In STEMI patients, plasma PACAP-38 level was significantly higher before percutaneous coronary intervention (PCI) compared to controls, and decreased after PCI. Significant negative correlation was found between plasma PACAP-38 and troponin levels. Furthermore, a significant effect was revealed between plasma PACAP-38, hypertension and HbA1c levels. This was the first study showing significant changes in cardiac tissue PACAP levels in a porcine MI model and plasma PACAP levels in STEMI patients. These results suggest that PACAP, due to its cardioprotective effects, may play a regulatory role in MI and could be a potential biomarker or drug target in MI.

**Keywords:** pituitary adenylate cyclase activating polypeptide; acute myocardial infarction; ELISA; closed-chest myocardial infarction model; STEMI; cardioprotection; prognostic factor

## 1. Introduction

Despite modern interventional therapeutic options, acute myocardial infarction (MI) is still one of the most common causes of cardiovascular mortality and morbidity [1]. Cardiac biomarkers play an important role in the diagnosis of MI. Based on the latest recommendation of the European Society of Cardiology, the elevated high-sensitive cardiac troponin (hs-cTn) level prove the presence of myocardial injury, even though the elevated values do not represent the underlying cardiac or systemic pathologies [2]. The guideline

highlights the complexity of the clinical circumstances making the differentiation difficult between ischemic and non-ischemic conditions associated with increased cTn levels [2]. Therefore, the latest studies have focused on the detection of potential new biomarkers having additional diagnostic or prognostic values to the routine parameters. Puelacher and co-workers tested the diagnostic accuracy of the combination of brain natriuretic peptide (BNP) and hs-cTn in patients with inducible myocardial ischemia and they did not certify any supplementary value of BNP in addition to hs-cTn [3]. In another study a biomarker risk score was defined with measurement of C-reactive protein, fibrin-degradation products and heat shock protein-70 in coronary artery disease patients to assess the risk of myocardial infarction or death [3,4].

To study the different underlying molecular processes of MI, several animal models are used for research. These preclinical studies—working with small or large animal MI models—have an important role in the development of potential new diagnostic and therapeutic approaches [5,6]. All these animal models have strengths and limitations. Large animal models have high translational value, as they show similarity in size, anatomy and physiology to human heart. In the last decade the catheter based closed-chest myocardial infarction large animal models have shown remarkable improvements in translational research, using clinically relevant interventional techniques and protocols [7]. In these models, reperfusion is performed after ischemia induction to examine the different biochemical changes after percutaneous coronary intervention, as MI treatment [8]. Moreover, different pre- and post- and remote conditioning manoeuvres were also studied to test their potential cardioprotective effects in pig [9,10] model.

Hypophysis adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), as a member of the vasoactive intestinal polypeptide (VIP)/secretin/glucagon family, is a ubiquitous, multi-functional neuropeptide [11]. PACAP acts on three different G protein-coupled receptors: the PAC1, VPAC1 and VPAC2 receptors, involving the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)—and protein kinase A (PKA)-dependent signalling pathways [12]. PACAP exists in two biologically active forms, PACAP-38 and PACAP-27, containing 38 or 27 amino acids. PACAP-38 is the dominant form in mammals. In the last three decades numerous studies have examined the protective effect of PACAP in several ischemic diseases based on its antiapoptotic, anti-inflammatory and general cytoprotective effects [12–14], suggesting the applicability of PACAP as a potential cardiac biomarker, especially in pathologies with ischemic etiology [15–18]. Moreover, a general anti-ischemic effect of PACAP was also proved in the brain [19–21], in retinal diseases [22,23] and in different peripheral organs, like small intestine, kidney and liver [21,24–26]. Furthermore, PACAP type I receptor (PAC1 receptor) expression has already been confirmed in cultured cardiomyocytes, in mouse myocardium and also in human cardiac tissue [16,17,27–29]. Numerous in vitro studies have proven the cardioprotective effects of PACAP against ischemia and oxidative stress induced lesions [30,31]. Alston and co-workers examined sympathetic nerve fibers density and PACAP immunoreactivity in myocardial infarction mouse model. They found complete denervation in the infarcted region of the left ventricle. Moreover, they also detected significant elevated PACAP-38 immunoreactivity in the left ventricle free wall localized to the denervated infarct region. They found PACAP-38 immunoreactivity in extracellular matrix, myocytes and also in macrophages [32]. Furthermore, our research group established significant differences between the tissue or plasma PACAP levels of patients with different ischemic or non-ischemic cardiovascular diseases [29,33]. Based on all these results a general anti-ischemic protective role of this neuropeptide is presumable. Although the protective effect of PACAP against ischemic injuries is well known, there are no large animal models or human data available about plasma and tissue levels of PACAP in acute myocardial damages.

Therefore, our first goal was to examine tissue PACAP-38-like immunoreactivity (LI) in different myocardial (left ventricular, left and right atrial) tissue samples after three-hour or 72-h reperfusion in a clinically relevant, close-chest porcine model of reperfused MI. We compared the tissue PACAP levels of separate myocardial regions after MI and Sham

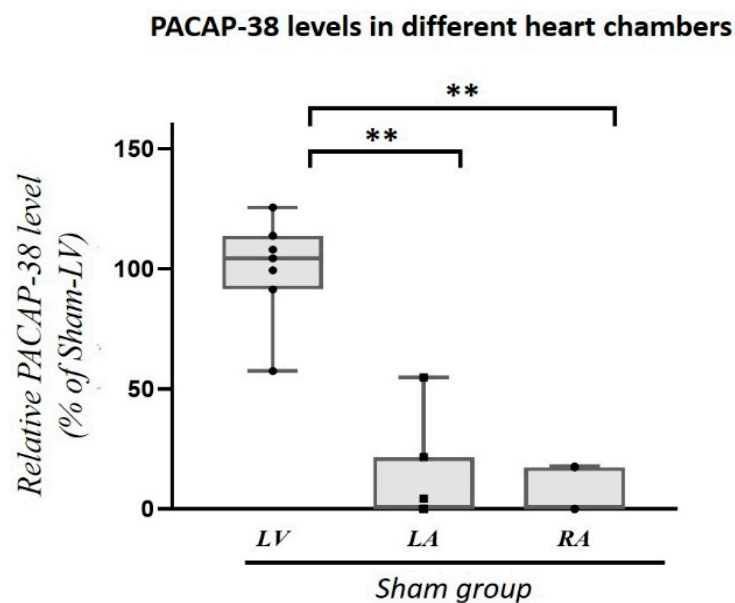
operation and determined the effects of special pre- and postconditioning paradigms on tissue PACAP-38-LI alterations.

Our human study focused on determining plasma PACAP-38-LI in ST-segment elevation myocardial infarction patients before and after percutaneous coronary intervention (PCI) inducing revascularisation in comparison with controls. Correlation and multivariate analysis were performed with routine laboratory parameters, different drugs and echocardiographic dimensions to obtain more information about the potential cardioprotective effects of PACAP against ischemic injury.

## 2. Results

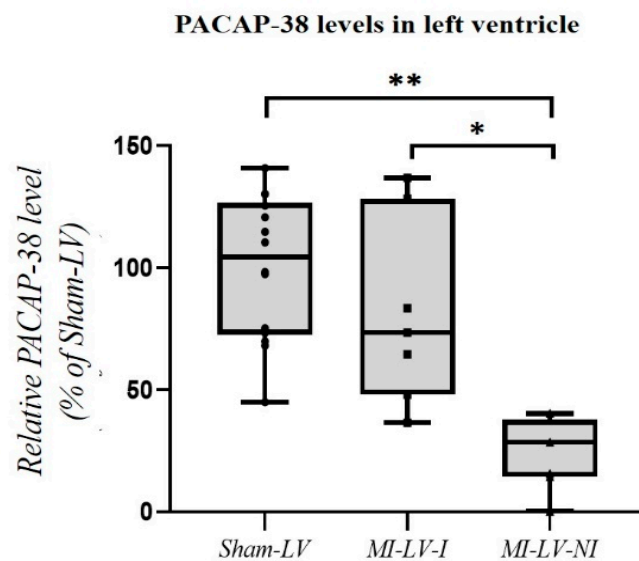
### 2.1. Changes of Tissue PACAP-38 Levels in Porcine Model of Acute Myocardial Infarction

To detect tissue level of PACAP-38, we examined the Sham-operated pig hearts without myocardial infarction (MI) in the left ventricle (LV) and left and right atrium (LA, RA). Significantly ( $p < 0.001$ ) higher tissue PACAP-38 levels were detected in the left ventricle compared to both atria (Figure 1).



**Figure 1.** PACAP-38 levels of the different heart chambers (LV: left ventricle, LA: left atrium, RA: right atrium). In healthy, Sham-operated animals PACAP-38 level of the left ventricle (LV) was significantly higher than in left (LA) or in right atrium (RA). Data are expressed in ratio of Sham-LV PACAP-38 levels. The boxes show the interquartile ranges, and the whiskers indicate the most extreme observations. The middle line within the boxes represents the median value. Individual values are presented as black dots and squares. One-way ANOVA with Tukey post-hoc, \*\*  $p < 0.001$  vs. Sham-LV group.  $n = 7-8$ .

PACAP-38 level was measured in samples originated from different left ventricular (LV) regions in Sham and MI groups. Two samples from each animal were utilized, in case of MI group one of the samples was obtained from the ischemic region (MI-LV-I), while the other from the non-ischemic LV region (MI-LV-NI). In case of Sham group, we also collected two different samples from regions equivalent to the LV-I and LV-NI regions in MI hearts. We did not find significant differences between the two regions of the Sham-operated hearts ( $p = 0.902$ ), thus, we did not separate them and we used one Sham group which contained all of the samples from the Sham heart. Although there was no significant difference between the relative PACAP levels in the ischemic LV samples (MI-LV-I) and the Sham hearts, the PACAP-38 level was significantly lower in the non-ischemic left ventricular samples of MI hearts (MI-LV-NI) compared to ischemic LV samples ( $p = 0.04$ ) and also to the Sham hearts ( $p < 0.001$ ) (Figure 2).

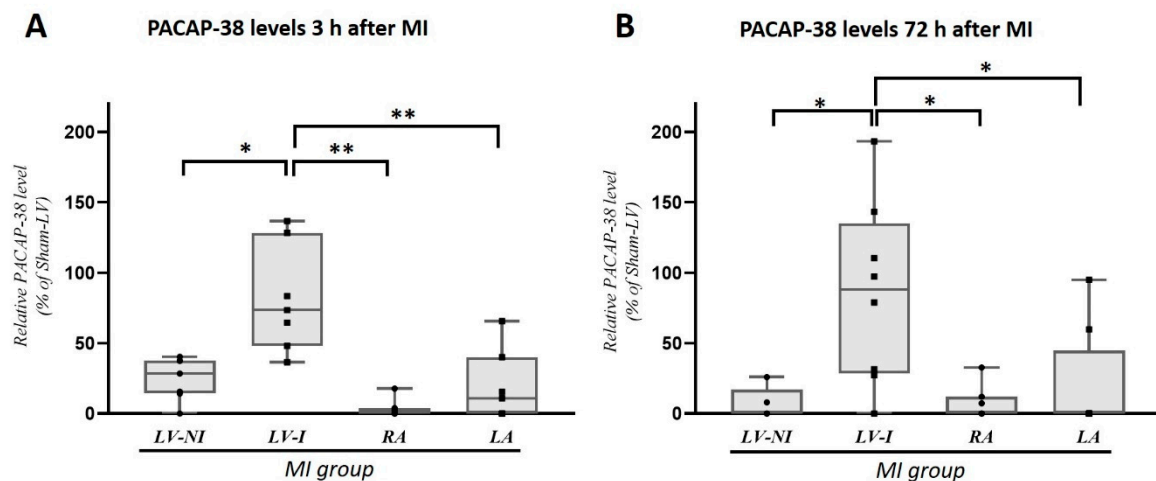


**Figure 2.** Differences between the tissue PACAP-38 levels in left ventricle in Sham-operated animals (Sham) and after myocardial infarction (MI) with time matched three-hour reperfusion. PACAP-38 level was significantly reduced in the non-ischemic left ventricular samples of MI hearts compared to the ischemic LV samples and also to the Sham hearts. Data are expressed in ratio of Sham-LV PACAP-38 level. The boxes show the interquartile ranges, and the whiskers indicate the most extreme observations. The middle line within the boxes represents the median values. Individual values are presented as black dots and squares. One-way ANOVA with Tukey's post hoc test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  vs. Sham group.  $n = 7$  (From each animal, two determinations were performed from 2 different region of the left ventricle (in case MI-LV: ischemic (MI-LV-I) and non-ischemic region (MI-LV-NI)/heart, in case Sham-LV: 2 regions equivalent to the MI-LV-I and MI-LV-NI regions/heart).

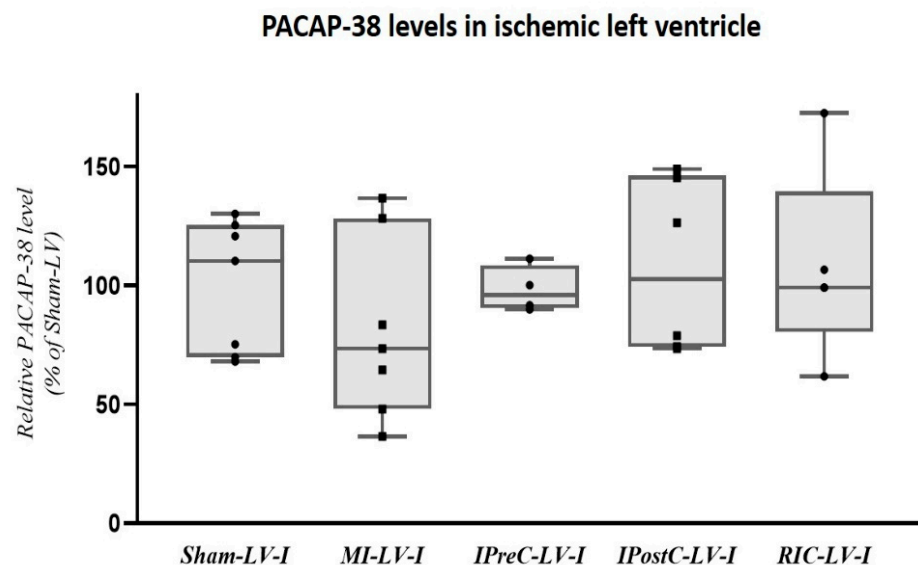
In the MI porcine group PACAP-38 level was compared between different heart chambers and regions. Ischemic (LV-I) and non-ischemic (LV-NI) left ventricular samples and atria samples (RA, LA) were utilized after 3 h and after 72 h of reperfusion. Significantly lower tissue PACAP-38 levels were detected in the non-ischemic left ventricle (LV-NI) compared to the ischemic region (LV-I) after 3-h reperfusion (Figure 3A). PACAP-38 levels in both atria (RA, LA) were also significantly lower than in the ischemic left ventricular samples (LV-I). Similar expression pattern was found after 72-h reperfusion with lower values in LV-NI group and atrial tissues compared to LV-I samples (Figure 3B).

The impact of ischemic conditionings, which are cardioprotective manoeuvres, on the PACAP-38 level were also investigated (Figure 4). Left ventricular samples from the ischemic region were applied from MI and ischemic pre-, post- and remote conditioned animals. There were no significant differences between the 3 different conditioning methods (Figure 4).





**Figure 3.** Comparison of the tissue PACAP-38 levels between different heart chambers and regions 3 h (A) or 72 h (B) after myocardial infarction (MI). PACAP-38 level was decreased in the non-ischemic region of the left ventricle (LV-NI) compared to the left ventricle ischemic region (LV-I) at 3 h after myocardial infarction (A). Significantly lower PACAP-38 levels were detected both in right atrium (RA) and left atrium (LA) compared to the ischemic LV region. Similar expression pattern was detected 72 h after myocardial infarction (B). The boxes show the interquartile ranges, and the whiskers indicate the most extreme observations. The middle line within the boxes represents the median values. Individual values are presented as black dots and squares. One-way ANOVA with Tukey post-hoc, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  versus LV-I groups.  $n = 7-8$ .



**Figure 4.** Differences between the tissue PACAP-38 levels of the Sham-operated (Sham), myocardial infarction (MI) alone and combined with ischemic conditioning methods: ischemic preconditioning (IPreC); ischemic postconditioning (IPostC); remote ischemic conditioning (RIC). There was no significant difference in PACAP-38 level in the ischemic zone of left ventricle between groups. The boxes show the interquartile ranges, and the whiskers indicate the most extreme observations. The middle line within the boxes represents the median values. Individual values are presented as black dots and squares. One-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test.  $n = 4-8$ .

## 2.2. Changes of Plasma PACAP-38 Levels in STEMI Patients

Sixteen STEMI patients (6 women, 10 men, mean age:  $60.3 \pm 2.96$  years) and 12 controls (7 women, 5 men, mean age:  $48.2 \pm 5.34$  years) were included in our human study. The main characteristics of the patients—risk factors, comorbidity, culprit coronary lesion,

important echocardiographic parameters and the previous medication—are presented in Table 1.

**Table 1.** Main demographic and clinical characteristics of the patients.

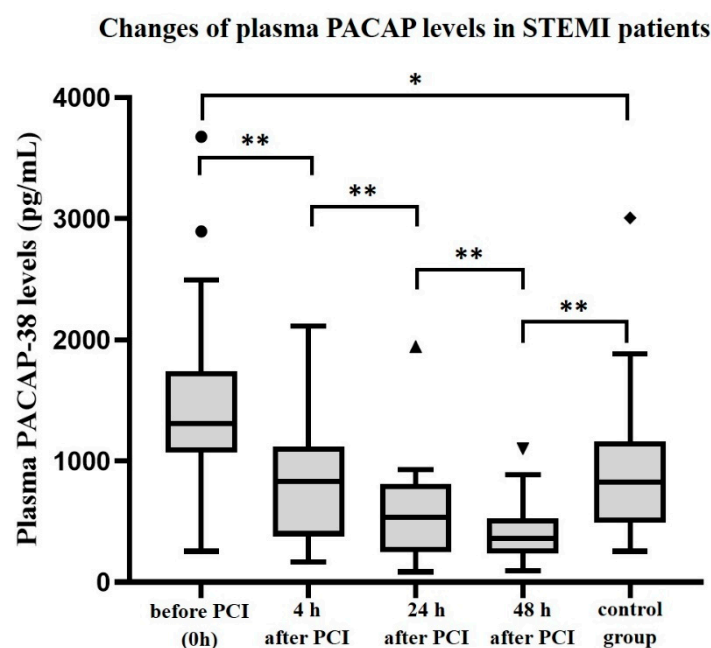
Number of patients	16
Smoking	50% smoker, 12.5% former smoker
Hypertension	56.25%
Diabetes mellitus	25%
Hyperlipidemia	31.25%
Obesity	43.75%
Known ischemic heart disease	12.5%
Culprit coronary lesion	left anterior descending artery (LAD)—31.25%
	circumflex coronary (Cx)—12.5%
	right coronary artery (RCA)—56.25%
Previous medication therapy	ACE inhibitor/ARB—62.5%
	β receptor blockers—43.75%
	platelet aggregation inhibitors—43.75%
	statin/fibrate therapy—43.75%
	antianginal medications—18.75%
Cardiac function (echocardiographic parameters)	left ventricular ejection fraction (LVEF): 46.19% (±10.6)
	left ventricular end-diastolic volume (LVEDV): 135.12 mL (±33.8)
	left ventricular end-systolic volume (LVESV): 71.81 mL (±25.8)

In the control group we included patients with the symptoms of typical or atypical chest pain without any coronary lesion. The controls underwent elective coronarography examination showing healthy coronary without any significant stenosis or plaques. Seventy percent of these controls had musculoskeletal disorders and thirty percent of those had psychosomatic symptoms as underlying cause of the chest pain. The main characteristics of the patients, risk factors, comorbidity, and the previous medication are presented in Table 2.

**Table 2.** Main demographic and clinical characteristics of the controls.

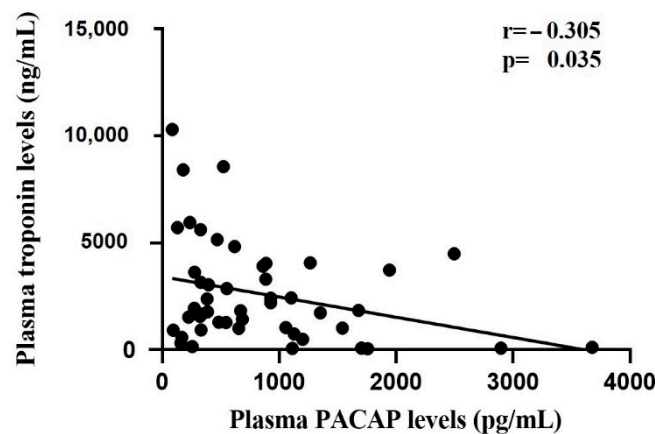
Number of controls	12
Smoking	8.3% smoker, 0% former smoker
Hypertension	33.3%
Diabetes mellitus	16.7%
Hyperlipidemia	33.3%
Obesity	25.0%
Previous medication therapy	ACE inhibitor/ARB—25.0%
	β receptor blockers—16.7%
	platelet aggregation inhibitors—16.7%
	statin/fibrate therapy—0%
	antianginal medications—0%

Examining the plasma PACAP levels of the STEMI patients we found significantly higher levels before PCI, during the ischemic period, and a significant decrease of the plasma PACAP levels were detected right after PCI. Significantly ( $p < 0.001$ ) lower PACAP levels were measured 4 h after PCI compared to the baseline values. The decline of PACAP levels was continuous during the examined period: We found significantly ( $p < 0.001$ ) lower values 24 h after PCI compared to the 4 h samples. Moreover, there was a significant ( $p < 0.001$ ) difference even between levels measured after 24 and 48 h (Figure 5). Differences between the plasma PACAP levels of the STEMI patients and the controls were also examined. We found significantly ( $p = 0.037$ ) higher PACAP levels in 0 h samples of the STEMI patients compared to those of the controls (Figure 5). Furthermore, significantly ( $p = 0.009$ ) higher plasma PACAP levels were detected in the control group compared to STEMI patients 48 h after PCI (Figure 5).



**Figure 5.** Changes of plasma PACAP levels in STEMI patient after PCI and in healthy control group. The solid bars represent medians of 16 patients and 12 controls. The boxes show the interquartile ranges, and the whiskers indicate the 10th and 90th percentile, outliers are also plotted with dots, rhombus and triangles. The middle line within the boxes represents the mean values. Wilcoxon Rank-Sum Test was used, statistically significant differences with  $p$ -values of  $** < 0.001$  and  $* < 0.05$  are indicated.

We found a significant ( $p = 0.035$ ) weak negative correlation ( $r = -0.305$ ) between all the time-matched plasma PACAP and troponin levels in the STEMI patient group (Figure 6). However, examining the time-matched PACAP and troponin levels separately (0, 4, 24, 48 h samples) there were no significant correlations (0 h:  $r = -0.191$ ,  $p = 0.478$ ; 4 h:  $r = -0.364$ ,  $p = 0.301$ ; 24 h:  $r = -0.185$ ,  $p = 0.492$ , 48 h:  $r = -0.176$ ,  $p = 0.513$ ).



**Figure 6.** Correlation between PACAP and troponin levels in STEMI patients.

We also examined the different echocardiographic parameters related to the MI: ejection fraction, left ventricular end-diastolic diameter, the grade of mitral insufficiency and the number of the affected segments. There was no correlation between the echocardiographic parameters and the initial plasma PACAP levels, moreover, multivariate analysis did not detect any additive effects of the different parameters on the correlation with PACAP levels (Table 3).

**Table 3.** Correlation between the different echocardiographic parameters and the plasma PACAP levels.

Echocardiographic Parameters	Correlation Coefficient (r Value)	Significance (p Value)
ejection fraction (EF—%)	$r = -0.059$	$p = 0.829$
LV-EDD (mm)	$r = 0.308$	$p = 0.246$
mitral insufficiency (I-IV grade)	$r = -0.095$	$p = 0.726$
wall motion score index (WMSI)	$r = 0.250$	$p = 0.926$

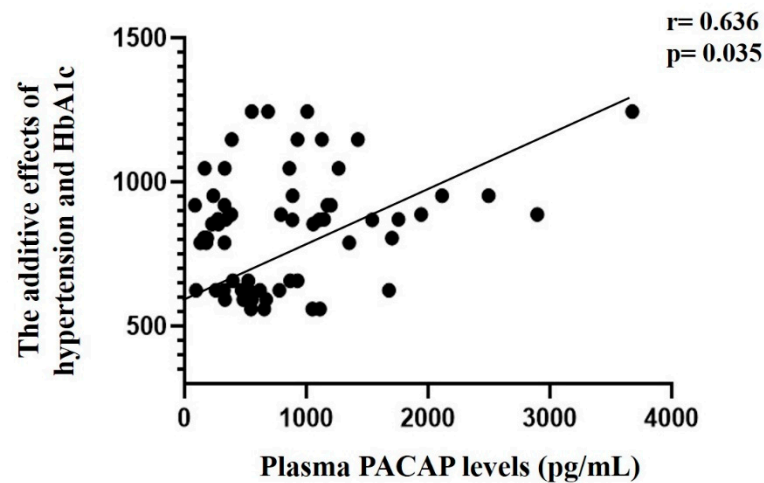
Examining the connection between the main risk factors of STEMI (hypertension, diabetes mellitus, haemoglobin A1c (HbA1c) levels and smoking) and the initial PACAP levels, we found a significant ( $p = 0.034$ ) positive correlation ( $r = 0.533$ ) between hypertension and PACAP levels. However, there was no connection between the individual effect of the other risk factors and the examined polypeptide (Table 4).

**Table 4.** Correlation between the main risk factors of STEMI and the plasma PACAP levels.

The Main Risk Factors of STEMI	Correlation Coefficient (r Value)	Significance (p Value)
hypertension	$r = 0.533^*$	$p = 0.034$
diabetes mellitus	$r = -0.157$	$p = 0.563$
haemoglobin A1c (HbA1c)	$r = 0.201$	$p = 0.456$
smoking	$r = -0.143$	$p = 0.598$

\* statistically significant,  $p < 0.05$ .

Multivariate analysis showed a remarkable significant ( $p = 0.035$ ) additive influencing effect ( $r = 0.636$ ) of hypertension and HbA1c on the PACAP levels in MI patients (Figure 7). In contrast there were no individual or additive effects of hypertension and HbA1c on the correlation with plasma PACAP levels in the control group.



**Figure 7.** Connection between the additive impacting effect of hypertension and HbA1c and PACAP levels in MI patients.

Examining the potential connection between the routine laboratory parameters (blood lipids: total cholesterol, low-density lipoprotein [LDL], high-density lipoprotein [HDL] and triglycerides [TG], C-reactive protein [CRP]) no significant correlation was found (Table 5) between the examined parameters and the initial plasma PACAP levels. Furthermore, multivariate analysis showed no additive effects of the laboratory parameters on the correlation with PACAP levels.

**Table 5.** Correlation between the routine laboratory parameters and the PACAP levels.

The Routine Laboratory Parameters	Correlation Coefficient (r Value)	Significance (p Value)
Total cholesterol	$r = -0.127$	$p = 0.640$
LDL	$r = -0.015$	$p = 0.957$
HDL	$r = 0.100$	$p = 0.712$
TG	$r = -0.027$	$p = 0.922$
CRP	$r = 0.163$	$p = 0.546$

We also examined the previous anti-ischemic medication therapy of our patients. The correlation analysis detected no significant connection between these drugs and the initial PACAP levels (Table 6). Furthermore, multivariate analysis ruled out the potential additive effects of the different drugs on the PACAP levels.

**Table 6.** Correlation between the previous medication therapy and the PACAP levels.

Previous Medication Therapy	Correlation Coefficient (r Value)	Significance (p Value)
ACE inhibitor/ARB	$r = 0.252$	$p = 0.346$
$\beta$ -blockers	$r = -0.254$	$p = 0.342$
Platelets aggregation inhibitor	$r = -0.039$	$p = 0.130$
Statin/fibrate therapy	$r = -0.308$	$p = 0.246$
Antianginal medications	$r = 0.041$	$p = 0.880$

### 3. Discussion

This study is the first translational demonstration of PACAP-38 level alterations after acute myocardial infarction and reperfusion in a porcine model and patients with STEMI.

Significantly, lower PACAP levels were detected in the non-ischemic region of the left ventricle in MI heart compared to the ischemic region and also to the Sham-operated

left ventricle in porcine MI model. In STEMI patients, we found initially a significantly elevated PACAP-38 level in plasma samples before reperfusion. This significantly elevated PACAP level suggests a potential biomarker value of PACAP in case of acute ischemic myocardial lesions, similarly to other acute disorders or injuries, e.g., aneurysmal subarachnoid hemorrhage, spontaneous basal ganglionic hemorrhage and traumatic brain injury [13,34,35], where the authors also found significantly elevated PACAP levels after the lesions.

Hoover et al. detected the mRNA of PAC1 receptor in mouse heart, showing no significant regional differences between both atria and ventricles [27]. In contrast there are no experimental data about the potential differences of tissue PACAP-38 levels between the heart chambers. To answer this question, we examined first Sham-operated pig hearts without myocardial infarction. We detected significantly higher values in the left ventricle compared to the atrial tissues suggesting a LV-specific accumulation and/or local expression of PACAP-38. Based on these results, we focused on the left ventricle.

Examining the PACAP-38 level in the left ventricle of Sham and MI hearts significantly lower PACAP levels were detected in the non-ischemic regions of MI hearts, while the ischemic regions did not show significant differences from the Sham-LV samples. We assume that the two different MI-LV regions are not functionally independent, because of the extensive systemic effects of myocardial infarction (increased left ventricle filling pressure, sympathetic activation—increased catecholamine release, compensatory hyperkinesis of the non-ischemic regions, inflammatory and extracellular matrix processes) affecting the whole left ventricle [36–38]. Therefore, the changes in the different regions (LV-I and LV-NI) are strongly related to each other. One of the main sources of PACAP-38 in the tissue samples are the nerve fibers located between the myocytes [13]. Alston et al. showed that the sympathetic innervation density is decreased in the ischemic regions of MI-LV, compared to the peri-infarct region and Sham control hearts, on the other hand, they did not detect PACAP-38 immunopositive fibers in the peri-infarct region [32]. These data confirm our experiment, where we showed significantly decreased PACAP-38 level in the tissue samples of non-ischemic LV region. Although the nerve fibers are damaged in the ischemic region, we did not measure significantly lower level of PACAP-38 in the ischemic region of MI-LV compared to Sham samples. In contrast to the changes of nerve fibers, Alston et al. detected increased PACAP immunoreactivity in the extracellular matrix, myocytes and macrophages in the infarct region of mouse heart [32]. Based on these results we suppose that this increased PACAP immunoreactivity in the cells and the extracellular matrix could compensate the decreased PACAP level, caused by the nerve injury. In addition, PACAP is a well-established modulator of the immune system and depending on the immune status, disease and age, it may exert an anti-inflammatory role in different pathological conditions [39]. As acute myocardial ischemia induces an initial pro-inflammatory response that is followed by an anti-inflammatory phase to aid wound healing, scar formation and regeneration processes [40], we cannot exclude that ischemia/reperfusion induced injury might also trigger the local expression or deliberation/re-distribution of endogenous PACAP-38 and its receptors within the infarcted area. The transition between these two phases is orchestrated by finely regulated interactions between cardiomyocytes, endothelial cells, fibroblasts, and the interstitium as well as different players of both the innate and adaptive immune system. In our experiment, we examined homogenized heart tissue samples containing all the potential PACAP sources (macrophages, myocytes and nerve fibers), and because of the abovementioned compensatory mechanism, we did not find significant differences between the ischemic region of MI-LV compared to the Sham-LV heart samples.

In the last decades several preclinical studies have focused on different ischemic conditioning techniques with promising results for reducing myocardial ischemia or reperfusion injury after MI [41]. We measured tissue PACAP-38 levels of ischemic left ventricle after different ischemic conditioning approaches. There were no significant differences between the tested groups, which suggests that ischemic conditionings do not interfere with the

PACAP-38 level in the infarcted myocardium in this porcine model. However, these results have a limited relevance due to the low case number in the different examined groups. Based on these animal experimental results we also performed a human study. There is only limited information about human PACAP levels in patients with heart diseases. In our earlier human study in patients with chronic heart diseases, significantly higher right auricle tissue PACAP-38 and PACAP-27 levels were detected compared to valvular diseases [29]. Moreover, earlier we found a significant negative correlation between plasma PACAP levels, and as a reliable prognostic marker of heart failure, an N-terminal pro B-type natriuretic peptide levels in chronic heart failure patients with dilated cardiomyopathy [33]. However, there were no data about the human plasma PACAP levels in MI.

In STEMI patients, plasma PACAP levels before PCI were remarkably higher compared to the healthy control group and significantly decreased after PCI. In contrast, the values 48 h after PCI were significantly lower than those of the controls. The significantly higher plasma PACAP levels in STEMI patients compared to the controls suggest that PACAP may have an important role in the pathomechanism of ischemic myocardial lesion and could be a potential biomarker in acute MI.

It is well-established that PACAP has a protective effect against oxidative stress-induced programmed cell death both in neuronal and non-neuronal cells. Earlier we examined the effects of PACAP treatment in neonatal rat cardiomyocyte cultures against ischemia/reperfusion(I/R)-induced apoptosis. PACAP treatment significantly increased cardiomyocyte viability and decreased apoptosis via the activation of PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signalling pathways [30]. These results were also proved by Roth et al. who found that PACAP is protective against I/R injury involving inhibition of apoptosis signal-regulation, as well as caspase-3 activation and activation of phospho-Bad and Bcl-2 [31]. Based on the present clinical data we suppose that the main sources of PACAP are apparently the tissues known to contain the highest level of PACAP, such as brain and endocrine glands. In case of myocardial infarction, the increased PACAP level in the plasma and tissue samples additionally could originate from the nerve fibers, cardiomyocytes and macrophages [13,32]. It is also possible that the acute MI was preceded by several different ischemic attacks due to the atherosclerotic coronary arteries increasing the plasma PACAP level as the part of preconditioning. Furthermore, the remarkably decreased PACAP concentration after 48 h may represent the basal level of this neuropeptide suggesting that the lower basal PACAP level may be a predictive factor for acute myocardial infarction.

Examining the correlation between all the time-matched plasma PACAP and troponin levels revealed a significant weak negative correlation, although we did not find any significant connection between the time-related levels separately (0, 4, 24, 48 h). After PCI, a decrease of troponin levels is expected due to the revascularization. However, there is a high variability of serum troponin kinetics due to the different physiological (gender, age, race) and pathological (renal failure, pulmonary disorders, structural heart abnormalities) influencing factors, and the extent of the coronary occlusion (totally or intermittent occluded coronary artery—slow flow or no reflow phenomenon) [42–44]. Earlier studies proved that area under the curve (AUC) for elevated troponin is a useful method in the estimation of infarct size. It would require measurements of troponin level at six-to-eight different points in time at least. Since based on the latest therapeutic guidelines of MI, our patients were sent to an early active rehabilitation after 48 h of MI, the troponin measurement after 48 h was not feasible technically that resulted in the major limitation of our study. We believe that the high variability of serum troponin levels and the lack of the AUC calculation may explain the weak correlation between PACAP and troponin levels in our patients.

Examining the potential influencing effect of the different risk factors of MI on the plasma PACAP levels revealed no correlation between the presence of diabetes mellitus, smoking, elevated lipid levels and the examined polypeptide. However, a significant positive correlation was found between the initial PACAP levels and hypertension indicating that there may be an association between PACAP and one of the most important risk

factors of STEMI. The results of the different *in vivo* animal experiments are conflicting about the connection between hypertension and PACAP. The presence of PACAP and PAC1 receptor in the cardiorespiratory sympathetic circuit suggests that this peptide may play an important role in blood pressure regulation [45,46]. Moreover, multivariate analysis showed a remarkably significant positive correlation between the additive effects of hypertension and HbA1c and the PACAP levels. This result suggests that hypertension and untreated diabetes mellitus together—representing a high risk for STEMI—are related to elevated PACAP levels. Diabetes mellitus is another main risk factor of MI, showing also interesting connection with PACAP. Several studies have explored the antidiabetic potential of PACAP due to the modulation of glucose-induced insulin secretion, the proliferation of islet cell mass, and increased glucagon response to insulin-induced hypoglycemia [47–49]. Moreover, several different *in vivo* animal experiments have already proved the important protective role of PACAP in diabetic nephropathy, retinopathy and vascular complication [50–52]. HbA1c is the most widely accepted marker for evaluating glycemic control thereby the therapeutic efficiency in diabetes mellitus. Despite of the positive additive effect of hypertension and HbA1c on the PACAP levels, we did not find any significant correlation between the individual effect of diabetes mellitus or HbA1c levels and the plasma PACAP levels in STEMI patients. Further human studies are needed to clear the exact influencing mechanisms of the different risk factors of MI on the plasma PACAP levels.

All of our STEMI patients had an echocardiographic examination on the second day according to the latest echocardiographic guidelines [53]. We did not find any significant correlation between the different echocardiographic parameters (LVEF, wall motion score index) and the initial PACAP levels. However, the early echocardiographic measurements can be misleading in reperfused patients due to the improvement of the left ventricular systolic function during the first 14 days [54,55]. Moreover, the recovery from stunned myocardium can be even more prolonged requiring four-to-six weeks [56].

We also examined the potential influencing effect of the different previous anti-ischemic medical therapies on the initial PACAP levels. More than 50% of our examined patients have already taken at least one anti-ischemic agent, though no significant correlation was detected suggesting that these drugs have no influencing effect on the plasma PACAP level. There are neither human nor experimental data about the different interaction between routinely used medical treatment and PACAP, further studies with large number of cases are needed to explore this question.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Animal Model

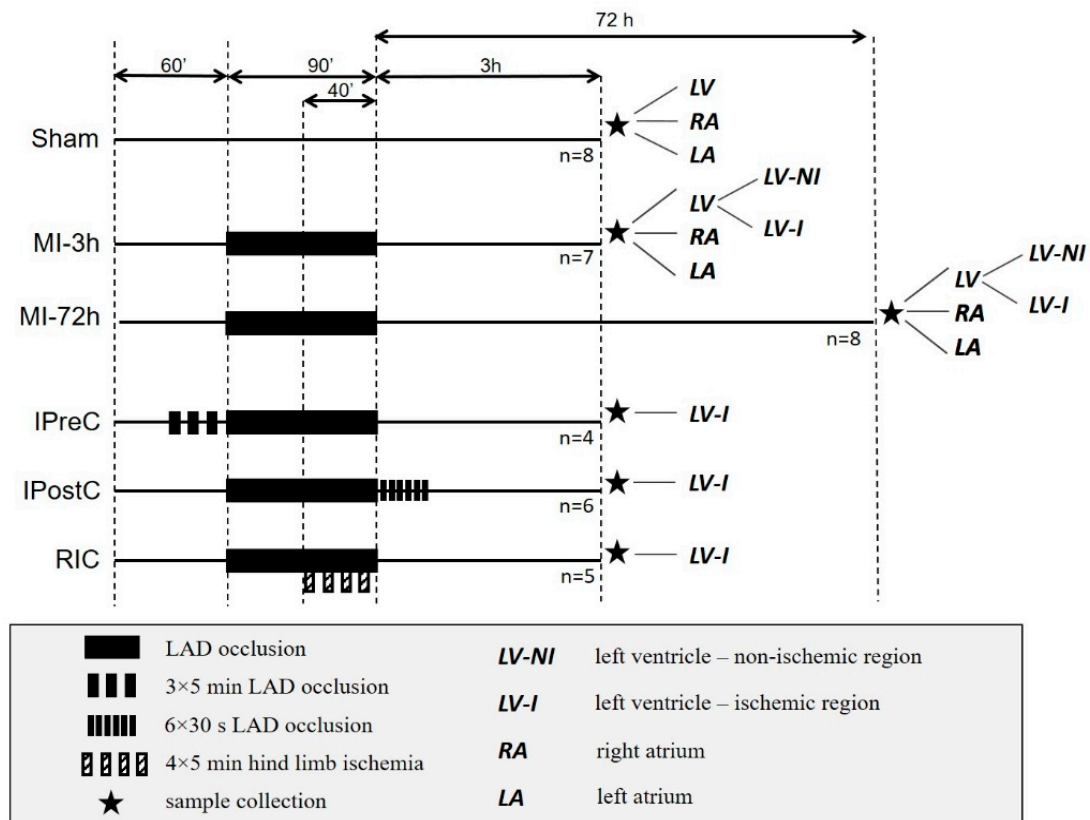
A closed-chest porcine model of reperfused acute myocardial infarction has been studied including 38 female pigs [9]. The following groups were applied:

- Sham-operated group (Sham): A balloon catheter was inserted in the left anterior descending (LAD) artery, but not inflated. Myocardial ischemia was not applied ( $n = 8$ ).
- Myocardial infarction (MI) group: 90 min myocardial ischemia was induced with the occlusion of the LAD artery and followed by 3 h reperfusion ( $n = 7$ ).
- Ischemic preconditioning group (IPreC):  $3 \times 5$  min myocardial ischemia was applied before the 90 min LAD occlusion ( $n = 4$ ).
- Ischemic postconditioning group (IPostC):  $6 \times 30$  s myocardial ischemia was applied after the 90 min LAD occlusion, at the start of the reperfusion ( $n = 6$ ).
- Remote ischemic conditioning group (RIC):  $4 \times 5$  min hind limb ischemia was applied under the 90 min LAD occlusion; first cycle was applied 50 min after the beginning of the myocardial ischemia ( $n = 5$ ).

Animals of each group were sacrificed after three hours of reperfusion and myocardial tissue samples were collected from ischemic and non-ischemic regions of the left ventricle (LV). The LV samples from the Sham hearts were collected from regions equivalent to the LV-NI and LV-I regions of MI hearts. The left and right atria (LA, RA) were also collected



from Sham and MI group animals (Figure 8). In another series, MI group animals were sacrificed after 72 h ( $n = 8$ ) and samples were collected from ischemic and non-ischemic region of the left ventricle, left and right atria (Figure 8).



**Figure 8.** Groups of our clinically relevant, closed-chest porcine model of reperfused acute myocardial infarction. Sham: Sham-operated group; MI-3 h: myocardial infarction group with 3-h reperfusion; MI-72 h: myocardial infarction group with 72-h reperfusion; IPreC: ischemic preconditioning group; IPostC: ischemic postconditioning group; RIC: remote ischemic conditioning group.

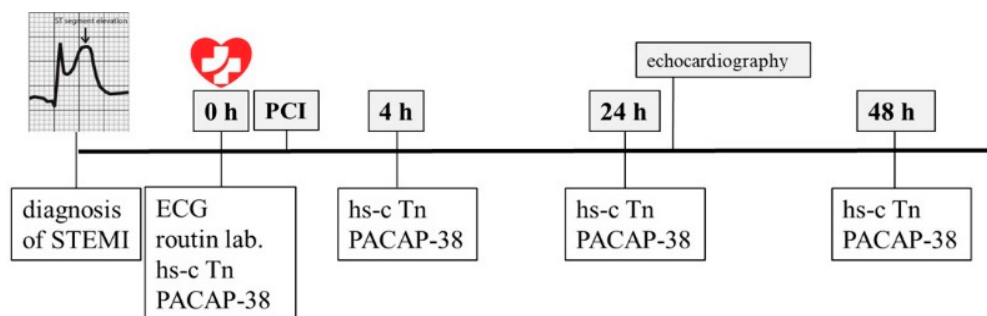
The collected tissue samples were snap-frozen immediately after removal in liquid nitrogen, then ground and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for cryopreservation until further use. Next, a total of 30 mg frozen cardiac samples were measured and sonicated on ice in 500  $\mu\text{L}$  of ice-cold phosphate buffered saline (PBS) containing 14  $\mu\text{g}$  of aprotinin as a protease inhibitor. A Hielscher UP 200 H/S homogenizer was used for sonication (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany) with  $3 \times 30\text{ s}$  bursts and an amplitude of 30%. Then, the homogenates were centrifuged (10,000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 min) and the collected supernatants were further processed for PACAP-38 specific sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

#### 4.2. Human Study

Twenty patients with the diagnosis of ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) and 12 controls were enrolled into the present study. Patients were admitted to our clinic with the diagnosis of acute ST-elevation myocardial infarction on average 4–6 h after the beginning of the symptoms. At the hospital admission of the patients a 12-lead ECG and blood collection were executed and after routine physical examination coronary angiography was performed immediately. All patients had successful PCI with implantation of one or more drug eluting stents in one session. After the procedure, our patients were observed in the intensive care unit. According to our protocol every patient had blood collection four times during the examination period: first before the PCI (0 h), then 4, 24, and 48 h after PCI.

During the first blood collection, three tubes [native, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and citrate tubes] were taken for hs-cTn and general laboratory testing. Inflammatory parameters (serum C-reactive protein level), kidney function parameters (serum creatinine and urea levels), complete blood count and lipid parameters (serum total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, and levels of triglycerides) were measured by the Department of Laboratory Medicine, University of Pecs.

For PACAP-38 determination, other 10 mL tubes of blood including EDTA were also taken. Because of the polypeptide nature of PACAP, a protease inhibitor (200  $\mu$ L aprotinin (stock 1.4 mg/mL) into 10 mL blood) was added to the blood samples and an ice water bath was used for storing the tubes to avoid peptide degradation. The EDTA-tubes were centrifuged immediately after the collection (4000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 15 min), then the supernatant was collected and stored in polypropylene tubes (Sarstedt, Budapest, Hungary) at  $-80^{\circ}$ C until ELISA analysis. During the further three blood collections (4, 24, and 48 h after PCI) one native and one EDTA-tubes were taken for the determination of human hs-cTn and plasma PACAP levels. Echocardiographic examination was performed 24 h after the PCI to evaluate the left ventricular (LV) function, consequently the severity of the sustained MI and the additional MI complications using a high-quality portable echocardiograph (Philips Cx50—Philips, Amsterdam, The Netherlands). Routine two-dimensional (2D), M-mode, Doppler and Tissue Doppler measurements were performed. To define the LV ejection fraction (EF), the main characterized parameter of the LV systolic function the Simpson method was used (Figure 9).



**Figure 9.** Human study protocol. STEMI: ST-elevation myocardial infarction, ECG: electrocardiography, lab.: laboratory examinations, hs-cTn: hypersensitive cardiac troponin.

Four patients were excluded from the study due to malignant ventricular arrhythmia followed by reanimation in two patients and pneumonia in further two patients. In the control group we included patients with the symptoms of chest pain without any coronary lesion. We collected blood samples from the control group similarly to the first blood test of the patient group: for routine laboratory examination and for PACAP detection. Without indication, we did not measure the high-sensitive troponin (hs-cTn) levels of our control group, presumably these values are lower than 14 ng/mL.

All human sample collections were carried out according to a protocol approved by the Institutional Ethic Committee (PTE KK 6383). In all cases, we obtained informed consent of the volunteers.

#### 4.3. Measurement of PACAP-38-Like Immunoreactivity with ELISA Method

For determination of PACAP-38-like immunoreactivity (LI) in cardiac tissue homogenates and plasma samples sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (human PACAP-38 ELISA kit, MyBiosource, Cat.No: MBS109020) was used according to the protocol provided by the manufacturer. PACAP-38-LI is referred to as PACAP-38 level in the manuscript.

Briefly, 50  $\mu$ L of PACAP-38 standards, tissue homogenates and plasma of myocardial infarction patients and healthy controls were pipetted to the appropriate wells of the

anti-PACAP-38 antibody-precoated microwells in duplicate. Then 100 µL of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated reagent was added to each well, covered with closure plate, and incubated for 60 min at 37 °C. The plate was washed 4 times with 200 µL/well of 1× Wash buffer. Next 50 µL of Chromogen Solution A and 50 µL of Chromogen Solution B was added to each well and incubated for 15 min at 37 °C in dark. The developing colour reaction was stopped by adding 50 µL of Stop solution to every well. The SPECTROStar nano-spectrophotometer (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) was used to measure the optical density (OD) of the test-wells at a wavelength of 450 nm. Since the obtained OD values were proportional to the level of PACAP-38 in the test samples, their concentrations were calculated by comparing the OD values of the sample wells to the ODs of the standard curve. All measured plasma PACAP-38 levels were demonstrated in pg/mL. Finally by the tissue samples the relative PACAP-38 levels were calculated by dividing the calculated PACAP-38 concentrations with the average PACAP level of the Sham-LV samples as control. The results were presented as % of control.

#### 4.4. Statistical Analysis

For statistical analysis SPSS 21 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) Program was used. In the first part of our study relative PACAP values (%) were used to eliminate the remarkable individual dispersion of porcine tissue PACAP levels. These values represented the percentage of the measured tissue PACAP-38 levels compared to the control sample (=the mean of the tissue PACAP-38 values in the Sham-operated LV samples). Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk normality test were performed showing normally distributed data. To detect the potential differences between the examined groups One-way ANOVA with Tukey or Bonferroni's post hoc tests were used. In our human study after Kolmogorov-Smirnov normality test Friedman and post-hoc test were performed to detect the changes of plasma PACAP levels after PCI in STEMI patients. To examine the differences between plasma PACAP levels of STEMI patients and controls Wilcoxon Rank-Sum Test was used. The interaction between PACAP and hs-cTn, EF and other potential impacting factors were tested with Spearman's correlation. Based on the correlation coefficient (the  $r$  value) we could define positive ( $r = 0-1$ ) and negative ( $r = -1-0$ ) correlation including subgroups with different strength. Multivariate regression analysis was performed to examine the additive effects of the main influencing factors. In all cases  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 5. Conclusions

This study first reports about the tissue PACAP-38 levels in a relevant, large animal MI model. Its significantly lower levels in the non-ischemic region of the left ventricle in MI animals can be explained by the lack of PACAP-38 immunopositive nerve fibres. Although the nerve fibers are damaged in the ischemic region, we detected similar PACAP-38 levels in the ischemic region of MI-LV compared to the Sham-LV heart samples, because the increased PACAP immunoreactivity in the myocytes, macrophages and the extracellular matrix could compensate the decreased PACAP level caused by the nerve injury. The first human study showed—in agreement with earlier results—elevated initial plasma PACAP levels in STEMI patients compared to the healthy controls assuming an acute protective role of the peptide against ischemia. Furthermore, the significant decrease in plasma PACAP levels after successful revascularisation also confirms this theory, since after the termination of acute ischemia, there is no more need for acute cardioprotective factors. Summarizing the significant changes in plasma PACAP levels we suggest that this peptide, due to its anti-ischemic and cardioprotective effects, plays an important protective role in acute myocardial infarction. Further examinations are necessary to ascertain whether PACAP might be a potential prognostic biomarker of MI in the future.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.S., Z.S., D.R., Z.H., P.F. and A.T.; methodology, D.S., B.P., E.S., A.M., A.G. (Aniko Gorbe), and A.N.; investigation, D.S., B.P., E.S., and A.N.; resources, D.R., P.F., A.T.; data curation D.S., B.P., R.H. and A.G. (Attila Gyenesei); writing—original draft preparation, D.S. and A.T.; writing—review and editing, D.S., Z.S., B.P., E.S., D.R., A.M., A.G. (Aniko Gorbe), Z.H., P.F., A.C. and A.T.; visualization, D.S., A.M., A.G. (Aniko Gorbe); supervision, Z.S. and A.T.; project administration, A.T.; funding acquisition, D.R., P.F., A.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was funded by the Hungarian Scientific Research Fund K119759, K129190 and K135457, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS”, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-15 2017-00008, Hungarian Brain Research Program 2017-1.2.1-NKP-2017-00002, EFOP-3.6.2-16-2017-00008 “The role of neuro-inflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics”, Hungarian Academy of Sciences MTA-TKI-14016, Higher Education Institutional Excellence Program of the Ministry of Human Capacities in Hungary FIKP II, Higher Education Institutional Excellence Program of the Ministry of Human Capacities in Hungary FIKP III (2020-4.1.1-TKP2020), University of Pecs Medical School KA Research Grant, KA-2019-30, EFOP 3.6.1-16.2016.00004 “Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pecs”, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, New National Excellence Program, and National Brain Project, Hungary (No. 2017-1.2.1-NKP-2017-00002), National Research, Development and Innovation Office of Hungary (NKFI; NVKP-16-1-2016-0017 National Heart Program), Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities in Hungary, with in the frame work of the Therapeutic Development thematic programme of the Semmelweis University. R.H. and A.Gy. were supported by the grants GINOP-2.3.4-15-2020-00010, GINOP-2.3.1-20-2020-00001 and ERASMUS+-2019-0-HU01-KA203-061251. The research was performed in collaboration with the Genomics and Bioinformatics Core Facility at the Szentagothai Research Centre of the University of Pecs. Bioinformatics infrastructure was supported by ELIXIR Hungary (<http://elixir-hungary.org>, accessed on 1 February 2021). E.S. were supported by the Janos Bolyai Research Scholarships of the Hungarian Academy of Sciences and by the UNKP-19-4 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethical Committee of University of Pecs, Medical School (PTE KK 6383).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in the article, there is no supplementary data.

**Acknowledgments:** The graphical abstract is created by Tunde Toth.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Hartley, A.; Marshall, D.C.; Saliccioli, J.D.; Sikkil, M.B.; Maruthappu, M.; Shalhoub, J. Trends in mortality from ischemic heart disease and cerebrovascular disease in Europe: 1980 to 2009. *Circulation* **2009**, *133*, 1916–1926. [[CrossRef](#)]
2. Thygesen, K.; Alpert, S.J.; Chatima, R.B.; Bax, J.J.; Morrow, D.A.; White, H.D. Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. (2018) Fourth universal definition of myocardial infarction. *Circulation* **2018**, *72*, 2231–2264. [[CrossRef](#)]
3. Puelacher, C.; Wagener, M.; Honegger, U.; Assadian, M.; Schaerli, N.; Mueller, D.; Strebel, I.; Twerenbold, R.; Boeddinghaus, J.; Nestelberger, T.; et al. Combining high-sensitivity cardiac troponin and B-type natriuretic peptide in the detection of inducible myocardial ischemia. *Clin. Biochem.* **2018**, *52*, 33–40. [[CrossRef](#)]
4. Ghasemzadeh, N.; Brooks, M.M.; Vlachos, H.; Hardison, R.; Sikora, S.; Sperling, L.; Quyyumi, A.A.; Epstein, S.E. An aggregate biomarker risk score predicts high risk of near term myocardial infarction and death: Findings from BARI 2D (Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes). *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Cesarovic, N.; Lipiski, M.; Falk, V.; Emmert, M.Y. Animals in cardiovascular research. *Eur. Heart J.* **2020**, *41*, 200–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Andreadou, I.; Schulz, R.; Badimon, L.; Adamova, A.; Kleibongard, P.; Lecour, S.; Nikolaou, P.E.; Falcao-Pires, I.; Vilahur, G.; Woudberg, N.; et al. Hyperlipidaemia and cardioprotection: Animal models for translational studies. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 5287–5311. [[CrossRef](#)]

7. McCall, F.C.; Telukuntula, K.S.; Karantalis, V.; Suncion, V.Y.; Heldman, A.W.; Mushtaq, M.; Williams, A.R.; Hare, J.M. Myocardial infarction and intramyocardial injection models in swine. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1479–1496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Kumar, M.; Kasala, R.E.; Bodduluru, L.N.; Dahiya, V.; Sharma, D.; Kumar, V.; Lakhar, M. Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *76*, 221–230. [[CrossRef](#)]
9. Baranyai, T.; Giricz, Z.; Varga, Z.V.; Koncsos, G.; Lukovic, D.; Makkos, A.; Sarkozy, M.; Pavo, N.; Jakab, A.; Czimbalmos, C.; et al. In vivo MRI and ex vivo histological assessment of the cardioprotection induced by ischemic preconditioning, postconditioning and remote conditioning in a closed-chest porcine model of reperfused acute myocardial infarction: Importance of microvasculature. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 67–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Skyschally, A.; Hagelschuer, H.; Kleinbongard, P.; Heusch, G. Larger infarct size but equal protection by ischemic conditioning in septum and anterior free wall of pigs with LAD occlusion. *Physiol. Rep.* **2019**, *7*, e14236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Miyata, A.; Arimura, A.; Dahl, R.R.; Minamino, N.; Uehara, A.; Jiang, L.; Culler, M.D.; Coy, D.H. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *164*, 567–574. [[CrossRef](#)]
12. Vaudry, D.; Falluel-Morel, A.; Bourgault, S.; Basille, M.; Burel, D.; Wurtz, O.; Fournier, A.; Chow, B.K.; Hashimoto, H.; Galas, L.; et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* **2009**, *61*, 283–357. [[CrossRef](#)]
13. Reglodi, D.; Tamas, A. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP*, 1st ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; ISBN 978-3-319-35135-3.
14. Toth, D.; Szabo, E.; Tamas, A.; Juhasz, T.; Horvath, G.; Fabian, E.; Opper, B.; Szabo, D.; Maugeri, G.; D’Amico, A.G.; et al. Protective effects of PACAP in peripheral organs. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Farnham, M.M.; Inglott, M.A.; Pilowsky, P.M. Intrathecal PACAP-38 causes increases in sympathetic nerve activity and heart rate but not blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2011**, *300*, H214–H222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sano, H.; Miyata, A.; Horio, T.; Nishikimi, T.; Matsuo, H.; Kangawa, K. The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cultured rat cardiocytes as a cardioprotective factor. *Regul. Pept.* **2002**, *109*, 107–113. [[CrossRef](#)]
17. Chang, Y.; Lawson, L.J.; Hancock, J.C.; Hoover, D.B. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: Localization and differential influence on isolated hearts from rats and guinea pigs. *Regul. Pept.* **2005**, *129*, 139–146. [[CrossRef](#)]
18. Ushiyama, M.; Sugawara, H.; Inoue, K.; Kangawa, K.; Yamada, K.; Miyata, A. Characterization of the PAC1 variants expressed in the mouse heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1070*, 586–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Reglodi, D.; Somogyvari-Vigh, A.; Vigh, S.; Maderdrut, J.L.; Arimura, A. Neuroprotective effects of PACAP38 in a rat model of transient focal ischemia under various experimental conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, *921*, 119–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lazarovici, P.; Cohen, G.; Arien-Zakay, H.; Chen, J.; Zhang, C.; Chopp, M.; Jiang, H. Multimodal neuroprotection induced by PACAP38 in oxygen–glucose deprivation and middle cerebral artery occlusion stroke models. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *48*, 526–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Reglodi, D.; Vaczy, A.; Rubio-Beltran, E.; MaassenVanDenBrink, A. Protective effects of PACAP in ischemia. *J. Headache Pain* **2018**, *19*, 19–28. [[CrossRef](#)]
22. Atlasz, T.; Szabadfi, K.; Kiss, P.; Racz, B.; Gallyas, F.; Tamas, A.; Gaal, V.; Marton, Z.; Gabriel, R.; Reglodi, D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in reitna: Focus on the retinoprotective effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1200*, 128–139. [[CrossRef](#)]
23. Danyadi, B.; Szabadfi, K.; Reglodi, D.; Mihalik, A.; Danyadi, T.; Kovacs, Z.; Batai, I.; Tamas, A.; Kiss, P.; Toth, G.; et al. PACAP application improves functional outcome of chronic retinal ischemic injury in rats—Evidence from electretinographic measurements. *J. Mol. Neurosci.* **2014**, *54*, 293–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ferencz, A.; Racz, B.; Tamas, A.; Reglodi, D.; Lubics, A.; Nemeth, J.; Nedvig, K.; Kalmar-Nagy, K.; Horvath, O.P.; Weber, G.; et al. Influence of PACAP on oxidative stress and tissue injury following small bowel autotransplantation. *J. Mol. Neurosci.* **2009**, *37*, 168–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Horvath, G.; Racz, B.; Reglodi, D.; Kovacs, K.; Kiss, P.; Gallyas, F., Jr.; Bogнар, Z.; Szabo, A.; Magyarlaki, T.; Laszlo, E.; et al. Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia-reperfusion. *J. Mol. Neurosci.* **2010**, *42*, 411–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ji, H.; Zhang, Y.; Shen, X.D.; Gao, F.; Huang, C.Y.; Abad, C.; Busuttill, R.W.; Waschek, J.A.; Kupiec-Weglinski, J.W. Neuropeptide PACAP in mouse liver ischemia and reperfusion injury: Immunomodulation by the cAMP-PKA pathway. *Hepatology* **2013**, *57*, 1225–1237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hoover, D.B.; Girard, B.M.; Hoover, J.L.; Parsons, R.L. PAC<sub>1</sub> receptors mediate positive chronotropic responses to PACAP-27 and VIP in isolated mouse atria. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *713*, 25–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wei, Y.; Mojsov, S. Multiple human receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide are expressed in a tissue-specific manner. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, *805*, 624–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Szanto, Z.; Sarszegi, Z.; Reglodi, D.; Nemeth, J.; Szabadfi, K.; Kiss, P.; Varga, A.; Banki, E.; Csanaky, K.; Gaszner, B.; et al. PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *48*, 667–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

30. Racz, B.; Gasz, B.; Gallyas, F., Jr.; Kiss, P.; Tamas, A.; Szanto, Z.; Lubics, A.; Lengvari, I.; Toth, G.; Hegyi, O.; et al. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul. Pept.* **2008**, *145*, 105–115. [[CrossRef](#)]
31. Roth, E.; Weber, G.; Kiss, P.; Horvath, G.; Toth, G.; Gasz, B.; Ferencz, A.; Gallyas, F.; Reglodi, D.; Racz, B. Effects of PACAP and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1163*, 512–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Alston, E.N.; Parrish, D.C.; Hasan, W.; Tharp, K.; Pahlmeyer, L.; Habecker, B.A. Cardiac ischemia-reperfusion regulates sympathetic neuropeptide expression through gp130-dependent and independent mechanisms. *Neuropeptides* **2011**, *45*, 33–42. [[CrossRef](#)]
33. Sarszegi, Z.; Szabo, D.; Gaszner, B.; Konyi, A.; Reglodi, D.; Nemeth, J.; Lelesz, B.; Polgar, B.; Jungling, A.; Tamas, A. Examination of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) as a potential biomarker in heart failure. *J. Mol. Neurosci.* **2019**, *68*, 368–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ma, B.Q.; Zhang, M.; Ba, L. Plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide concentrations and motrality after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Clin. Chim. Acta* **2015**, *439*, 102–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Jiang, L.; Wang, W.H.; Dong, X.Q.; Du, Q.; Yang, D.B.; Wang, H.; Shen, Y.F. The change of plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide levels after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol. Scand.* **2016**, *134*, 131–139. [[CrossRef](#)]
36. Schomig, A. Catecholamines in myocardial ischemia. Systemic and cardiac release. *Circulation* **1990**, *82*, 13–22.
37. Fang, L.; Moore, X.L.; Dart, A.M.; Wang, L.M. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *J. Geriatr. Cardiol.* **2015**, *12*, 305–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lindsey, M.L.; Bolli, R.; Canty, J.M., Jr.; Du, X.J.; Frangogiannis, N.G.; Frantz, S.; Gourdie, R.G.; Holmes, J.W.; Jones, S.P.; Kloner, R.A.; et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *314*, H812–H838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Denes, V.; Geck, P.; Mester, A.; Gabriel, R. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: 30 years in research spotlight and 600 million years in service. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ong, S.B.; Hernandez-Resendiz, S.; Crespo-Avilan, G.E.; Mukhametshina, R.T.; Kwek, X.Y.; Cabrera-Fuentes, H.A.; Hausenloy, D.J. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *186*, 73–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Hausenloy, D.J.; Garcia-Dorado, D.; Bøtker, H.E.; Davidson, S.M.; Downey, J.; Engel, F.B.; Jennings, R.; Lecour, S.; Leor, J.; Madonna, R.; et al. Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position paper of the European Society of Cardiology working group on cellular biology of the heart. *Cardiovasc. Res.* **2017**, *113*, 564–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Weil, B.R.; Suzuki, G.; Young, R.F.; Iyer, V.; Canty, J.M., Jr. Troponin release and reversible left ventricular dysfunction after transient pressure overload. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *71*, 2906–2916. [[CrossRef](#)]
43. Korley, F.K.; Jaffe, A.S. Preparing the United States for high-sensitivity cardiac troponin assays. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2013**, *61*, 1753–1758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Frohlich, G.M.; Leistner, D.M. The relevance of periprocedural troponin rise: The never ending story! *Open Heart* **2017**, *4*, e000590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Farnham, M.M.; Lung, M.S.; Tallapragada, V.J.; Pilowsky, P.M. PACAP causes PAC1/VPAC2 receptor mediated hypertension and sympathoexcitation in normal and hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *303*, H910–H917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Farnham, M.M.; Pilowsky, P.M. The role of PACAP in central cardiorespiratory regulation. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2010**, *174*, 65–75. [[CrossRef](#)]
47. Sakurai, Y.; Shintani, N.; Hayata, A.; Hashimoto, H.; Baba, A. Trophic effects of PACAP on pancreatic islets: A mini-review. *J. Mol. Neurosci.* **2011**, *43*, 3–7. [[CrossRef](#)]
48. Yamamoto, K.; Hashimoto, H.; Tomimoto, S.; Shintani, N.; Miyazaki, J.; Tashiro, F.; Aihara, H.; Nammo, T.; Li, M.; Yamagata, K.; et al. Overexpression of PACAP in transgenic mouse pancreatic beta-cells enhances insulin secretion and ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* **2003**, *52*, 1155–1162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Persson, K.; Ahren, B. The neuropeptide PACAP contributes to the glucagon response to insulin-induced hypoglycaemia in mice. *Acta Physiol. Scand.* **2002**, *175*, 25–28. [[CrossRef](#)]
50. Banki, E.; Kovacs, K.; Nagy, D.; Juhasz, T.; Degrell, P.; Csanaky, K.; Kiss, P.; Jancso, G.; Toth, G.; Tamas, A.; et al. Molecular mechanisms underlying the nephroprotective effects of PACAP in diabetes. *J. Mol. Neurosci.* **2014**, *54*, 300–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Szabadfi, K.; Reglodi, D.; Szabo, A.; Szalontai, B.; Valasek, A.; Setalo, G., Jr.; Kiss, P.; Tamas, A.; Wilhelm, M.; Gabriel, R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, a potential therapeutic agent for diabetic retinopathy in rats: Focus on the vertical information processing pathway. *Neurotox. Res.* **2016**, *29*, 432–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Solymar, M.; Ivic, I.; Balasko, M.; Fulop, B.D.; Toth, G.; Tamas, A.; Reman, G.; Koller, A.; Reglodi, D. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates vascular dysfunction induced by hyperglycaemia. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2018**, *15*, 277–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Ghazal, S.; Qaddoura, F.; Kinsara, A.; Omran, A.; Atiyah, M.; Al Refae, M.; Dalak, F.; Al Ahmari, S.; Al Sehly, A.; Sahal, N.; et al. Saudi Arabian Society of Echocardiography Recommendations for Echocardiography Service during Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **2019**, *32*, 553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Solomon, S.D.; Glynn, R.J.; Greaves, S.; Ajani, U.; Rouleau, J.L.; Menapace, F.; Arnold, J.M.; Hennekens, C.; Pfeffer, M.A. Recovery of ventricular function after myocardial infarction in the reperfusion era: The healing and early afterload reducing therapy study. *Ann. Intern. Med.* **2001**, *134*, 451–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Serrao, G.W.; Lansky, A.J.; Mehran, R.; Stone, G.W. Predictors of left ventricular ejection fraction improvement after primary stenting in ST-segment elevation myocardial infarction (from the Harmonizing Outcomes with Revascularization and Stents in Acute Myocardial Infarction Trial). *Am. J. Cardiol.* **2018**, *121*, 678–683. [[CrossRef](#)]
56. Kloner, R. Stunned and hibernating myocardium: Where are we nearly 4 decades later? *J. Am. Heart Assoc.* **2020**, *4*, e015502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

# PACAP-38 and PAC1 Receptor Alterations in Plasma and Cardiac Tissue Samples of Heart Failure Patients

Dóra Szabó <sup>1,2,3,†</sup>, Zsolt Sárszegi <sup>1,†</sup>, Beáta Polgár <sup>4</sup>, Éva Sághy <sup>5</sup>, Dóra Reglódi <sup>2,3</sup>, Tünde Tóth <sup>2,3</sup>, Zsófia Onódi <sup>5,6</sup> , Przemyslaw Leszek <sup>7</sup> , Zoltán V. Varga <sup>5,6</sup> , Zsuzsanna Helyes <sup>3,8</sup>, Ágnes Kemény <sup>3,8,9</sup>, Péter Ferdinandy <sup>5,10</sup> and Andrea Tamás <sup>2,3,\*</sup>

- <sup>1</sup> Heart Institute, Clinical Centre, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary; dora0szabo@gmail.com (D.S.); sarszegizsolt@gmail.com (Z.S.)
- <sup>2</sup> Department of Anatomy, MTA-PTE PACAP Research Team, Centre for Neuroscience, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary; dora.reglodi@aok.pte.hu (D.R.); toth.tundi206@gmail.com (T.T.)
- <sup>3</sup> Szentagotthai Research Centre, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary; zsuzsanna.helyes@aok.pte.hu (Z.H.); kemeny.agnes@pte.hu (Á.K.)
- <sup>4</sup> Department of Medical Microbiology and Immunology, Clinical Centre, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary; beata.polgar@aok.pte.hu
- <sup>5</sup> Cardiometabolic Research Group, MTA-SE System Pharmacology Research Group, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Semmelweis University, 1089 Budapest, Hungary; saghy.eva@med.semmelweis-univ.hu (É.S.); onodi.zsofia@med.semmelweis-univ.hu (Z.O.); varga.zoltan@med.semmelweis-univ.hu (Z.V.V.); peter.ferdinandy@pharmahungary.com (P.F.)
- <sup>6</sup> HCEMM-SU Cardiometabolic Immunology Research Group, Semmelweis University, 1089 Budapest, Hungary
- <sup>7</sup> Department of Heart Failure and Transplantology, Cardinal Stefan Wyszyński National Institute of Cardiology, 04-628 Warszawa, Poland; p.leszek@ikard.pl
- <sup>8</sup> Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary
- <sup>9</sup> Department of Medical Biology, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary
- <sup>10</sup> Pharmahungary Group, 6720 Szeged, Hungary
- \* Correspondence: andreatamassz@gmail.com or taafaao.pte@pte.hu; Tel.: +36-72-536-001 (ext. 36421)
- † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Szabó, D.; Sárszegi, Z.; Polgár, B.; Sághy, É.; Reglódi, D.; Tóth, T.; Onódi, Z.; Leszek, P.; Varga, Z.V.; Helyes, Z.; et al. PACAP-38 and PAC1 Receptor Alterations in Plasma and Cardiac Tissue Samples of Heart Failure Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3715. <https://doi.org/10.3390/ijms23073715>

Academic Editor:  
Massimo Iacoviello

Received: 15 February 2022

Accepted: 24 March 2022

Published: 28 March 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 (PACAP-38) is a multifunctional neuropeptide, which may play a role in cardioprotection. However, little is known about the presence of PACAP-38 in heart failure (HF) patients. The aim of our study was to measure the alterations of PACAP-38 like immunoreactivity (LI) in acute ( $n = 13$ ) and chronic HF ( $n = 33$ ) and to examine potential correlations between PACAP-38 and HF predictors (cytokines, NT-proBNP). Tissue PACAP-38 LI and PAC1 receptor levels were also investigated in heart tissue samples of patients with HF. Significantly higher plasma PACAP-38 LI was detected in patients with acute HF, while in chronic HF patients, a lower level of immunoreactivity was observed compared to healthy controls ( $n = 13$ ). Strong negative correlation was identified between plasma PACAP-38 and NT-proBNP levels in chronic HF, as opposed to the positive connection seen in the acute HF group. Plasma IL-1  $\beta$ , IL-2 and IL-4 levels were significantly lower in chronic HF, and IL-10 was significantly higher in patients with acute HF. PACAP-38 levels of myocardial tissues were lower in all end-stage HF patients and lower PAC1 receptor levels were detected in the primary dilated cardiomyopathy group compared to the controls. We conclude that PACAP-38 and PAC1 expression correlates with some biomarkers of acute and chronic HF; therefore, further studies are necessary to explore whether PACAP could be a suitable prognostic biomarker in HF patients.

**Keywords:** pituitary adenylate cyclase activating polypeptide; heart failure; ischemic/non-ischemic cardiomyopathy; NT-proBNP; cytokines



## 1. Introduction

Heart failure (HF) is the most common cause of cardiac death, despite several novel diagnostic and therapeutic opportunities. The most common clinically relevant parameters for the evaluation of the severity of HF with reduced ejection fraction (HFrEF) are the (i) left ventricular ejection fraction (EF), (ii) plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) level and (iii) functionally, the New York Heart Association (NYHA) classification [1,2]. However, EF or NT-proBNP may change during treatment and do not always predict prognosis correctly. Therefore, new factors are being investigated in order to serve as predictive biomarkers for HF prognosis [3].

Several factors, such as oxidative stress, cardiomyocyte necrosis, apoptosis and a range of adaptive mechanisms, including neurohumoral imbalance, increased sympathetic activation, increased cytokine release and different pro- and anti-inflammatory factors, play important roles in the pathophysiology and progression of the disease. Earlier studies showed that levels of various pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ ), chemokines (e.g., monocyte chemoattractant protein—MCP-1) and neutrophil-specific chemokines (different CXC chemokines) are altered, which is often strongly correlated with the severity of HFrEF. These factors promote the development of myocardial remodelling with cardiomyocyte apoptosis and enhanced interstitial fibrosis, eventually exacerbating the impairment of left ventricular systolic function [4,5].

Among several cardioprotective factors, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its specific PAC1 receptor are widely investigated in different models of HF. There are two biologically active forms of PACAP containing 27 (PACAP-27) or 38 amino acids (PACAP-38). More than 90% of the endogenous PACAP exists as PACAP-38 [6]. Anti-apoptotic, anti-ischemic and anti-inflammatory effects of PACAP-38 are well known [7–12]. Sano and co-workers were the first to demonstrate the cardioprotective effect of PACAP in 2002 revealing the ability of PACAP to diminish myocardial fibrosis [13]. Based on earlier results, PACAP seems to ameliorate the prognosis primarily in cardiovascular diseases (such as HF and ischemic heart disease), which are propelled by oxidative stress and/or apoptosis [8,9,11,14]. PACAP effectively promotes defense mechanisms in cardiomyocytes against oxidative stress-induced or ischemia/reperfusion-induced apoptosis in cell culture [9,11,14].

Besides cardiac remodeling, neurohormonal activation and necrosis, apoptosis is also involved in the pathomechanism of HF [15–17]. The cardioprotective effect of PACAP was proved in several in vitro and animal cardiotoxicity models, which is carried out by different antiapoptotic mechanisms [18–20]. Despite these promising experimental data on the protective effects of PACAP in HF, little is known about its alterations and potential relevance in humans. In one of our previous studies conducted on patients with acute ST segment elevation myocardial infarction, we detected significantly higher plasma PACAP-38 levels before the revascularisation compared to the plasma samples collected from patients 4, 24 and 48 h after coronary intervention, as well as samples from healthy controls [21]. Based on these findings, the question arises whether plasma PACAP-38 levels correlate with other well-known HF predictors, such as cytokines or NT-proBNP, which may indicate the severity of HF or the efficacy of therapeutic interventions adequately.

Therefore, the aim of our study was to measure the alterations of plasma PACAP-38 like immunoreactivity (PACAP-38 LI) in acute and chronic HF caused by ischemic or non-ischemic cardiomyopathy compared to age-matched healthy controls. We also examined the potential correlation between PACAP-38 and other HF predictors, such as NT-proBNP, routine laboratory parameters and different cytokines (IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) measured with Luminex array. Moreover, tissue PACAP-38 LI was also investigated with PACAP-38 ELISA, and PAC1 receptor levels were examined with Western blot techniques in heart tissue samples of patients with end-stage cardiomyopathy compared to healthy controls.

## 2. Results

### 2.1. Comparison of Plasma PACAP-38 Levels in HF Patients and Healthy Control Individuals

The main demographic and clinical parameters of the examined patients and controls are presented in Table 1.

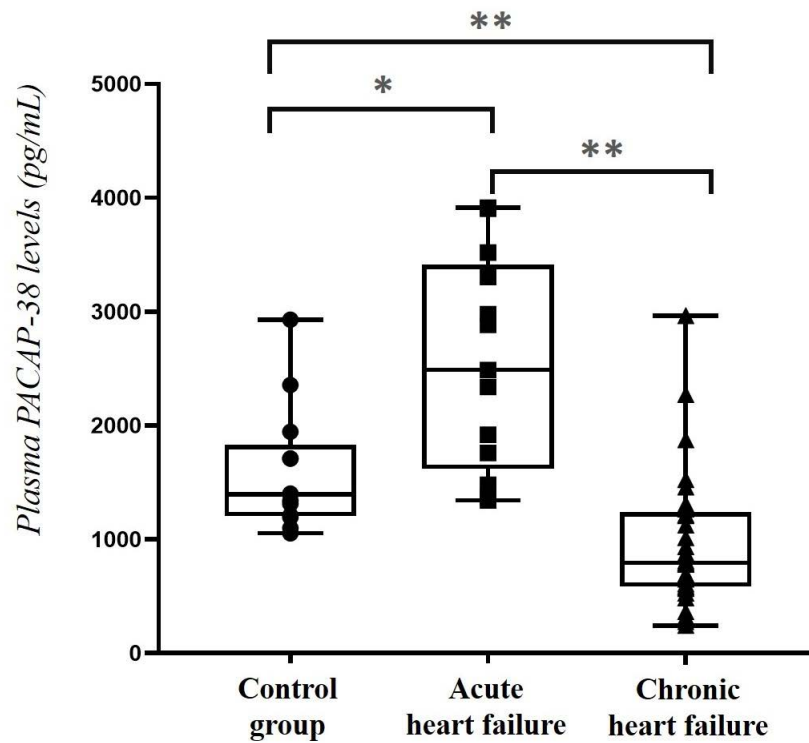
**Table 1.** The most important demographic and clinical parameters of the examined patients with acute, chronic heart failure (HF) and the control group. NYHA: New York Heart Association Classification, ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitor, ARB: angiotensin-II receptor blocker, MRA: mineralocorticoid receptor antagonist.

	Acute HF (n = 13)	Chronic HF (n = 33)	Control Group (n = 13)
Mean age (year)	66.5 ± 3.7	65.9 ± 3.8	65.8 ± 4.0
Gender	33% women 67% men	34.3% women 65.7% men	31% women 69% men
Mean ejection fraction (%)	33.1%	30.3%	38.5%
NYHA stage	III–IV. st.	II. st.	I. st.
Cardiovascular status	decompensated	compensated	no heart failure
Comorbidities			
Hypertension	69.2%	87.9%	46.1%
Diabetes mellitus	46.2%	42.4%	15.4%
Atrial fibrillation	53.8%	36.4%	7.7%
Medical therapy			
ACEI/ARB	100%	100%	38.5%
β-blocker	100%	100%	38.5%
MRA	76.9%	81.8%	0%
Diuretics	92.3%	84.8%	15.4%
Ivabradine	23.1%	9.0%	0%
Digoxin	15.4%	15.2%	0%

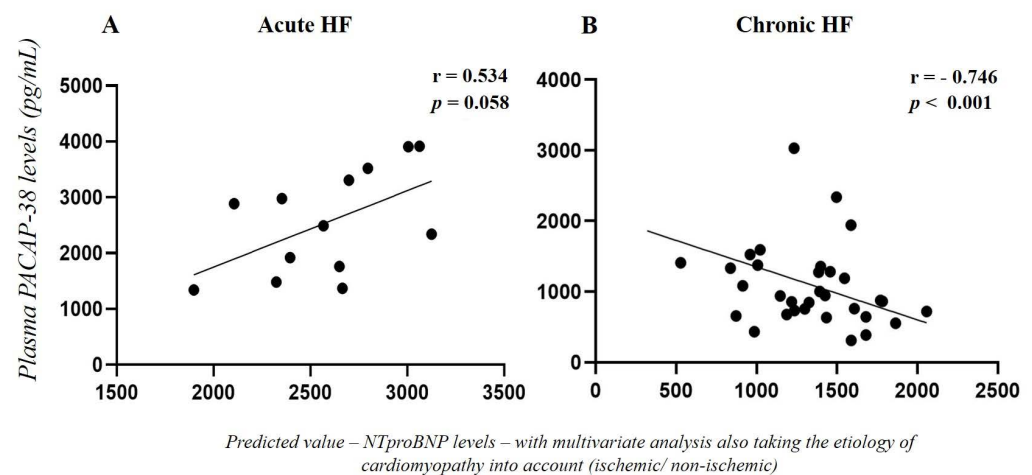
First, we examined the plasma PACAP-38 levels of the different groups. Significantly higher plasma PACAP-38 levels were detected in acute HF patients compared to the chronic HF patients ( $p < 0.001$ ) and also to the control group ( $p < 0.05$ ). Furthermore, we detected significantly lower plasma PACAP-38 levels in the chronic HF patients compared to both acute HF group ( $p < 0.001$ ) and the control group ( $p = 0.001$ ) (Figure 1).

### 2.2. Correlation of Plasma PACAP-38 Levels with NT-proBNP Levels in HF Patients

We examined the correlation between NT-proBNP, the most important prognostic marker of HF, and PACAP-38 levels. In acute HF, we did not find any significant connection between the two examined markers ( $p = 0.090$ ,  $r = -0.307$ ). On the other hand, a weak significant negative correlation was detected in the chronic HF patients ( $p = 0.049$ ,  $r = -0.349$ ). Multivariate analysis was performed also taking the etiology of the cardiomyopathy into account (ischemic or non-ischemic) showing a positive connection ( $p = 0.058$ ,  $r = 0.534$ ) between PACAP-38 and NT-proBNP in acute HF group (Figure 2A). Moreover, in chronic HF patients significantly strong negative correlation ( $p < 0.001$ ,  $r = -0.746$ ) was detected between two examined factors with multivariate analysis (Figure 2B).



**Figure 1.** Plasma PACAP-38 levels in acute (decompensated) ( $n = 13$ ) and chronic (compensated) ( $n = 33$ ) heart failure patients compared to the control group ( $n = 13$ ). The box plot diagram represents the interquartile range and median values. The individual values are presented with black dots (control group), squares (acute HF) or triangles (chronic HF). Statistical analysis was performed with one-way ANOVA with Tukey post-hoc test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 2.** Correlation between the predicted value of NT-proBNP and plasma PACAP-38 levels (pg/mL) in acute (A) ( $n = 13$ ) and chronic (B) ( $n = 33$ ) heart failure (HF) with multivariate analysis, also taking the etiology of cardiomyopathy into account (ischemic or non-ischemic). Statistical analysis was performed with Spearman's correlation.

### 2.3. Correlation of Plasma PACAP-38 Levels with Different Clinical and Laboratory Parameters

To examine the potential influencing factors on plasma PACAP-38 levels—comorbidities, different medical or instrumental therapeutic opportunity, echocardiographic or routine laboratory parameters—correlation and multivariate analysis tests were performed. We did

not detect any significant individual or additive effect of the examined factors on the plasma PACAP-38 levels of the HF patients (Table 2).

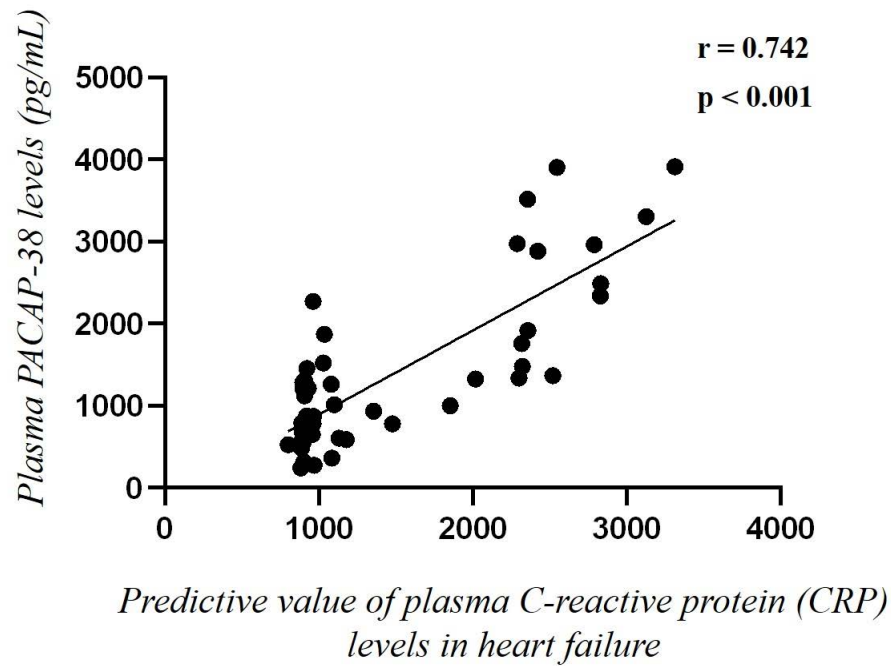
**Table 2.** Potential influencing factors on plasma PACAP-38 levels. ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitor, ARB: angiotensin-II receptor blocker, MRA: mineralocorticoid receptor antagonist, CRT: cardiac resynchronization therapy, ICD: implantable cardioverter-defibrillator, EF: ejection fraction, LV-EDD: left ventricular end-diastolic diameter, RV-EDD: right ventricular end-diastolic diameter, IVC: inferior vena cava size, LDL: low-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein. Spearman's correlation test was performed.

	Correlation Coefficient (r)	Significance (p)
Comorbidities		
Hypertension	r = −0.095	p = 0.532
Diabetes mellitus	r = 0.003	p = 0.983
Atrial fibrillation	r = 0.064	p = 0.671
Therapy		
ACEI/ARB	-	-
β-blocker	-	-
MRA	r = 0.031	p = 0.178
Diuretics	r = 0.081	p = 0.708
Ivabradin	r = 0.206	p = 0.326
Digoxin	r = 0.048	p = 0.822
CRT	r = 0.005	p = 0.973
ICD	r = 0.067	p = 0.659
Echocardiographic parameters		
EF (%)	r = 0.113	p = 0.456
LV-EDD (mm)	r = 0.063	p = 0.689
RV-EDD (mm)	r = −0.012	p = 0.938
Mitral regurgitation	r = 0.045	p = 0.776
Tricuspid regurgitation	r = 0.034	p = 0.827
IVC (mm)	r = 0.067	p = 0.671
Laboratory parameters		
Cholesterol	r = 0.043	p = 0.736
LDL cholesterol	r = 0.183	p = 0.474
HDL cholesterol	r = 0.041	p = 0.826
Triglycerides	r = 0.033	p = 0.354
Blood urea nitrogen	r = 0.010	p = 0.946
Serum creatinine	r = 0.100	p = 0.514

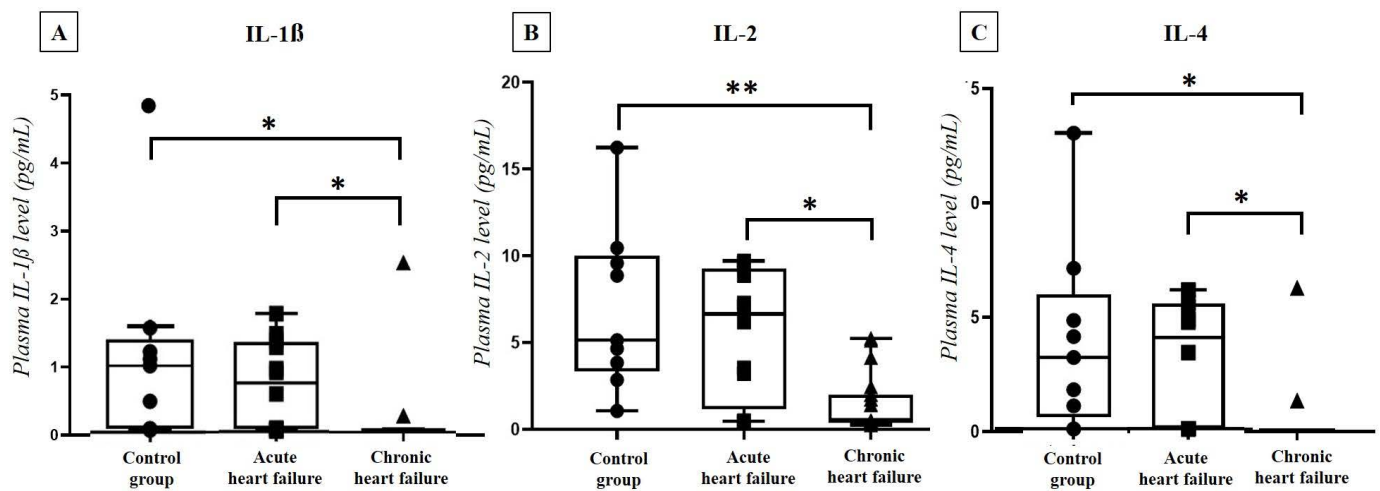
A significant, weak positive correlation ( $r = 0.385$ ,  $p = 0.001$ ) was detected between C-reactive protein (CRP) and PACAP-38 levels in the merged (acute and chronic) HF patient group. Multivariate analysis taking into account the type of HF (acute or chronic) also showed a significant strong positive correlation ( $r = 0.742$ ,  $p < 0.001$ ) between PACAP-38 and CRP (Figure 3). The relationship between CRP and PACAP-38 revealed significant positive correlation ( $r = 0.615$ ,  $p = 0.025$ ) in acute HF patients. In the chronic group, a positive tendency ( $r = 0.497$ ,  $p = 0.059$ ) was found between these two markers.

#### 2.4. Correlation of Plasma PACAP-38 Levels with Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines

In the HF group of 31 patients (12 acute HF, 19 chronic HF) and 9 controls we also performed a Luminex array to determine the plasma level of 7 characteristic pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). In the chronic HF group, significantly lower cytokine concentrations were detected compared to both the acute HF and the control groups regarding IL-1  $\beta$  (acute:  $p = 0.011$ , control:  $p = 0.002$ ), IL-2 (acute:  $p = 0.002$ , control:  $p < 0.001$ ) and IL-4 (acute:  $p = 0.025$ , control:  $p = 0.004$ ) levels (Figure 4).

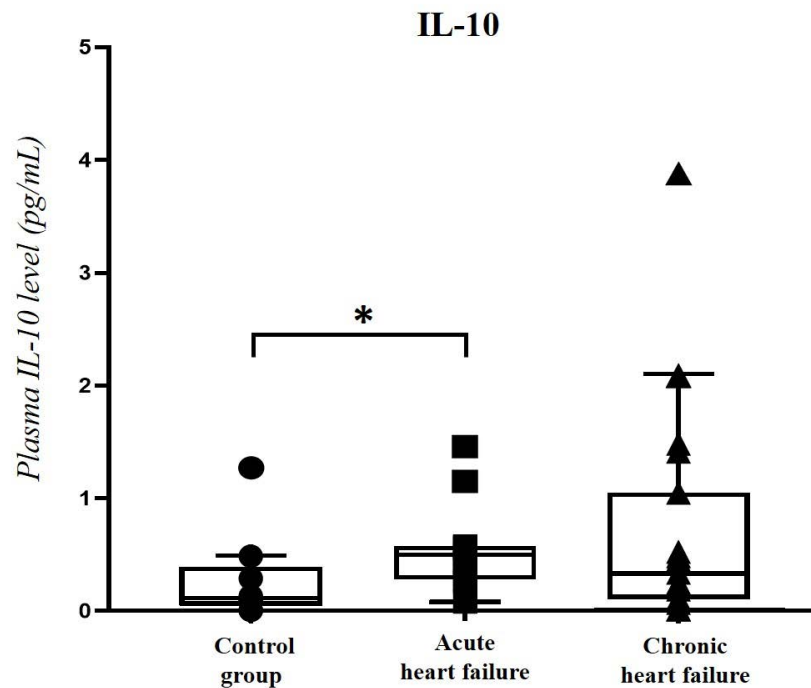


**Figure 3.** Correlation between the predictive value of C-reactive protein (CRP) (mg/mL) and plasma PACAP-38 levels (pg/mL) with multivariate analysis, also taking the type of heart failure into account (acute or chronic) ( $n = 46$ ). Statistical analysis was performed with Spearman’s correlation.



**Figure 4.** IL-1  $\beta$  (A), IL-2 (B) and IL-4 (C) levels in acute ( $n = 12$ ) and chronic heart failure ( $n = 19$ ) patients and in the control group ( $n = 9$ ). Boxes with lines and whiskers represent the interquartile range, median values and the outliers. The individual values are presented with black dots (control group), squares (acute HF) or triangles (chronic HF). Statistical analysis was performed with one-way ANOVA test with Tukey post-hoc test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  vs. chronic heart failure group.

In addition, significantly ( $p = 0.038$ ) higher IL-10 levels were detected in the acute HF group compared to the control, but not to the chronic HF group (Figure 5). In contrast, we did not detect any significant differences between the HF and control groups regarding IL-6, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels.



**Figure 5.** IL-10 levels in acute ( $n = 12$ ) and chronic heart failure ( $n = 19$ ) patients and in the control group ( $n = 9$ ). The box plot diagram represents the interquartile range, median values and the outliers. The individual values are presented with black dots (control group), squares (acute HF) or triangles (chronic HF). Statistical analysis was performed with one-way ANOVA test with Tukey post-hoc test. \*  $p < 0.05$  vs. control group.

Furthermore, the correlation analysis showed significant positive correlation between IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-10 cytokines and PACAP-38 levels in the HF cohort. Multivariate analysis taking the type of HF into consideration (acute/chronic) showed a more remarkable positive correlation between these cytokines and plasma PACAP-38 concentrations (Table 3).

**Table 3.** Correlation between the plasma level of different cytokines (IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-4 and IL-10) and PACAP-38 with Spearman's correlation test or with multivariate analysis (taking also into account the type of heart failure: acute or chronic). Statistically significant differences with  $p$ -values of \*\*  $p < 0.001$  and \*  $p < 0.05$  are indicated.

Cytokines	Correlation Test		Multivariate Analysis	
	Correlation Coefficient (r)	Significance ( $p$ )	Correlation Coefficient (r)	Significance ( $p$ )
IL-1 $\beta$	$r = 0.539$ *	$p = 0.002$	$r = 0.780$ **	$p < 0.001$
IL-2	$r = 0.494$ *	$p = 0.005$	$r = 0.812$ **	$p < 0.001$
IL-4	$r = 0.481$ *	$p = 0.006$	$r = 0.800$ **	$p < 0.001$
IL-10	$r = 0.367$ *	$p = 0.042$	$r = 0.799$ **	$p < 0.001$

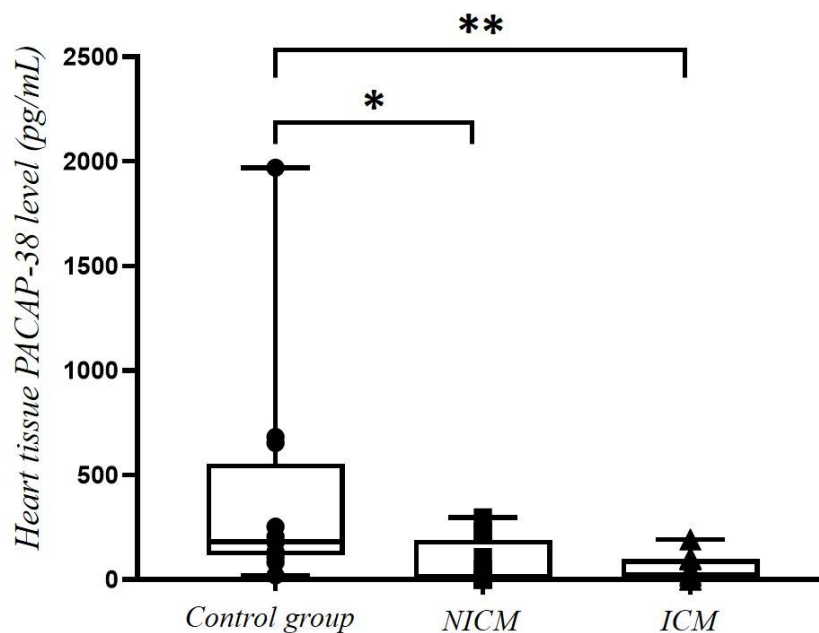
### 2.5. Comparison of PACAP-38 Levels in Heart Tissue Lysate of Non-Ischemic Cardiomyopathy (NICM) and Ischemic Cardiomyopathy (ICM) Patients and Healthy Controls

In the second part of this study, we examined myocardial tissues of 23 advanced HF patients undergoing heart transplantation. The underlying diseases were non-ischemic cardiomyopathy (NICM) in 11 cases (47.8%) and ischemic (ICM) in 12 (52.2%) cases. The most important anthropometric and hemodynamic parameters of the patients are presented in Table 4.

**Table 4.** The most important anthropometric data, echocardiographic and hemodynamic parameters of the examined patients with non-ischemic cardiomyopathy (NICM) and ischemic cardiomyopathy (ICM) before heart transplantation.

	NICM ( <i>n</i> = 11)	ICM ( <i>n</i> = 12)
Mean age (years)	39.18 ± 3.4	59.42 ± 3.8
Gender	90.9% men 9.1% women	91.7% men 8.3% women
Echocardiographic parameters		
End-diastolic diameter (mm)	75.45 ± 3.1	72.92 ± 1.9
End-systolic diameter (mm)	67.34 ± 2.9	65.75 ± 1.8
Ejection fraction (%)	17.09 ± 1.4	21.92 ± 2.3
Hemodynamic parameters		
Cardiac output (L/min)	4.03 ± 0.22	4.28 ± 0.56
Mean heart rate (bpm)	104.5 ± 3.1	74.33 ± 4.9
Mean systolic blood pressure (mmHg)	99.56 ± 3.4	107.17 ± 4.9
Mean diastolic blood pressure (mmHg)	62.89 ± 4.1	56.58 ± 4.6

As a control group, we also included 12 healthy organ donors (mean age: 31.11 ± 3.1 years, 50% men, 50% women, mostly dying of traffic accidents). From the homogenized myocardial tissue samples, first, we determined the tissue PACAP-38 levels, then, we compared the concentrations of the three cohorts. Significantly higher tissue PACAP-38 levels were detected in the healthy control group compared to both the NICM ( $p = 0.007$ ) and the ICM ( $p < 0.001$ ) group (Figure 6). There was no difference between ischemic and non-ischemic cardiomyopathy patients.

**Figure 6.** Tissue PACAP-38 levels in heart tissue samples from patients with non-ischemic cardiomyopathy (NICM,  $n = 11$ ) or ischemic cardiomyopathy (ICM,  $n = 12$ ) and from the healthy control group ( $n = 12$ ). The box plot diagram represents the interquartile range, median values. The individual values are presented with black dots (control group), squares (acute HF) or triangles (chronic HF). Statistical analysis was performed with one-way ANOVA test with Tukey post-hoc test. \*  $p < 0.050$ , \*\*  $p < 0.001$  vs. control group.

### 2.6. Correlation of Tissue PACAP-38 Levels with Different Clinical and Laboratory Parameters

Furthermore, we performed correlation analysis in the examined patient groups to reveal the potential connection between tissue PACAP-38 levels and NT-proBNP, as well as different echocardiographic and routine laboratory parameters. As indicated in Table 5, these statistical tests revealed no significant correlation between the possible influencing factors and the tissue PACAP-38 levels.

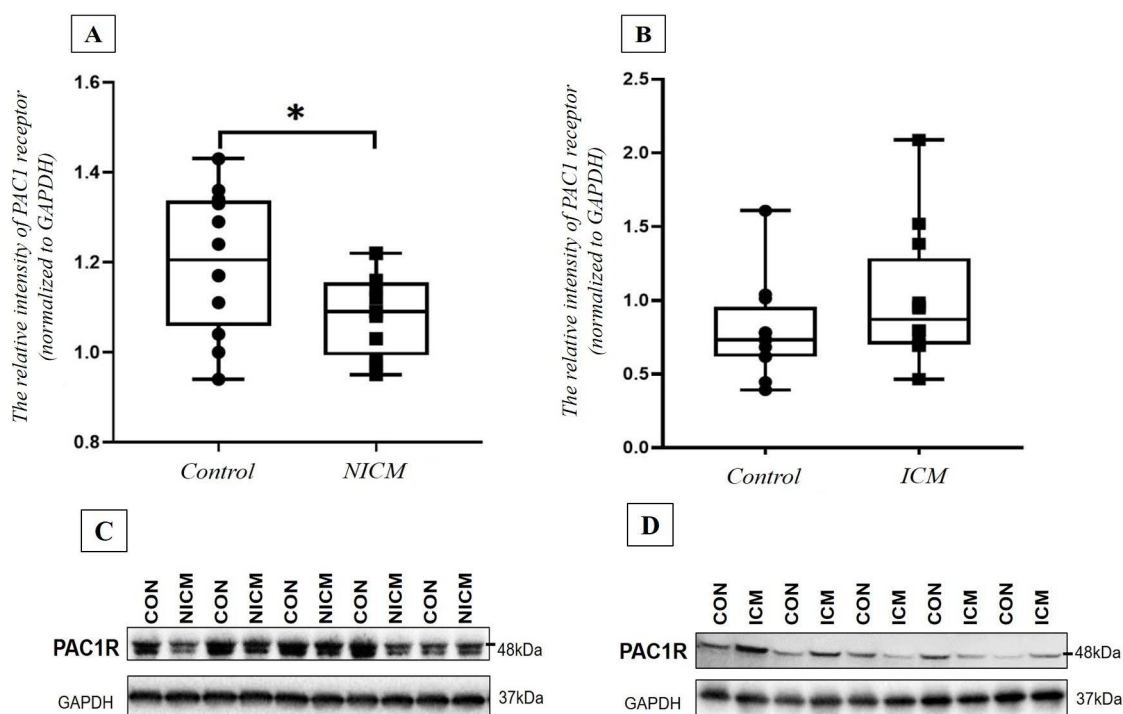
**Table 5.** Examination of the correlation between the potential influencing factors and tissue PACAP-38 levels. NICM: non-ischemic cardiomyopathy, ICM: ischemic cardiomyopathy, EF: ejection fraction, LV-EDD: left ventricular end-diastolic diameter, RV-EDD: right ventricular end-diastolic diameter, LDL: low-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein. Spearman's correlation test was used to examine the correlation between NT-proBNP levels, different echocardiographic and laboratory parameters and heart tissue PACAP-38 levels. Moreover, multivariate analysis was performed, also considering the etiology of cardiomyopathy (non-ischemic or ischemic).

	Correlation Coefficient (r)	Significance (p)
NT-proBNP (pg/mL)		
All patients	r = −0.167	p = 0.435
NICM	r = −0.041	p = 0.899
ICM	r = −0.254	p = 0.425
with multivariate analysis	r = −0.187	p = 0.688
Echocardiographic parameters		
EF (%)	r = 0.146	p = 0.494
LV-EDD (mm)	r = 0.167	p = 0.369
RV-EDD (mm)	r = −0.177	p = 0.407
Posterior wall thickness (mm)	r = 0.240	p = 0.451
septal wall thickness (mm)	r = 0.197	p = 0.540
Routine laboratory tests		
Cholesterol	r = 0.068	p = 0.751
LDL cholesterol	r = 0.089	p = 0.693
HDL cholesterol	r = 0.057	p = 0.766
Triglycerides	r = 0.129	p = 0.567
Blood urea nitrogen	r = −0.031	p = 0.887
Creatinine	r = −0.122	p = 0.578
Sodium	r = −0.280	p = 0.196
Potassium	r = −0.307	p = 0.154

### 2.7. Comparison of PAC1 Receptor Level in the Heart Tissue Lysate of NICM and ICM Patients and Healthy Controls

Finally, the PAC1 receptor level was also examined with Western blot assay in the heart tissue samples of HF patients and control individuals. The densitometry analysis revealed significantly lower PAC1 receptor intensity in the tissue samples obtained from the NICM group compared to the healthy controls ( $p = 0.045$ ). In contrast, there were no significant differences in the relative PAC1 receptor intensities between the ICM and the control group ( $p = 0.145$ ) (Figure 7).





**Figure 7.** PAC1 receptor relative intensity in non-ischemic cardiomyopathy (A) (NICM,  $n = 11$ ) and ischemic cardiomyopathy (B) (NICM,  $n = 11$ ; ICM,  $n = 12$ ) vs. control group (CON,  $n = 12$ ). (C,D) pictures show the scanned Western blot representative images. PAC1 receptor values are normalized to GAPDH. The box plot diagram represents the interquartile range and median values. The individual values are presented with black dots (control group) or squares (NICM or ICM). Statistical analysis was performed with Mann–Whitney test. \*  $p < 0.05$  vs. control group.

### 3. Discussion

In the current study, we provided the first evidence for significant differences between plasma PACAP-38 levels in acute and chronic HF patients and healthy controls. We also studied the potential influencing factors of plasma PACAP-38 levels. Moreover, this is the first human study examining PACAP-38 LI in myocardial tissue samples of NICM and ICM patients and also healthy controls. The significant differences between the tissue PACAP-38 levels and PAC1 receptor intensity of HF patients and controls emphasize the importance of PACAP-38 signaling in HF.

Our results showed significantly higher plasma PACAP-38 levels in acute HF patients compared to both the chronic HF and the control groups. The elevated PACAP-38 levels in acute HF can be the result of a compensating “stress response” to a suddenly worsening left ventricular ejection fraction. This reactive phenomenon seems to be a protective response, potentially decreasing acute cardiomyocyte injury. Perna and co-workers examined 115 patients with HFrEF detecting advanced cardiomyocyte injury in more than half of the patients. The extent of the cardiomyocyte injury showed strong correlation with the prognosis of HF [22]. This myocyte damage is caused by oxidative stress, apoptosis and necroptosis. PACAP effectively promotes cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis in cell culture. As a result of PACAP treatment, significantly decreased caspase-3 activity and significantly higher anti-apoptotic Bcl-2 and phospho-Bad expression were identified in cultured cardiomyocytes [9,14]. Furthermore, PACAP treatment significantly inhibited oxidative stress-induced activity of pro-apoptotic JNK and p38-MAP-kinase in endothelial cells [8]. Similar PACAP-38 release was observed during some acute severe or life-threatening human diseases, such as acute ST-segment elevation myocardial infarction [21]. Based on these findings we suppose, that PACAP-38 can be regarded as a general marker that may indicate the severity of the tissue injury, and also as a protective

factor, eliciting antioxidant, antiapoptotic and anti-inflammatory effects in response to acute cellular damage [23].

In contrast, significantly lower plasma PACAP-38 levels were detected in chronic HF compared not only to the acute HF patients but also to the control group. The lower PACAP-38 levels may be involved in the diminished cardioprotective mechanisms, making the patients susceptible for further progression of HF. Mori and co-workers investigated the effects of PACAP on the progression of HF in doxorubicin-induced cardiomyopathy, observing worse prognosis of HF in PACAP-deficient heterozygous and homozygous mice compared to wild types [18]. According to their data, left ventricular dilatation was significantly higher, while ejection fraction was significantly lower in PACAP-deficient mice; moreover, the mortality rate was significantly higher, suggesting that endogenous PACAP plays an important role in cardiomyocyte protection, and indicating that a lack of PACAP indicates worse progression of HF [18]. In another in vitro model of toxic cardiomyopathy applying mitoxantrone, it was found that PACAP-38 treatment significantly decreased the damage of the left ventricular systolic function [19]. Furthermore, Otto and co-workers revealed that pulmonary hypertension and decreased right ventricular systolic function developed in PAC1 receptor-deficient mice [20], supporting this cardioprotective theory. Albeit these findings are quite convincing, further longitudinal follow-up human studies are necessary to prove that a lower plasma PACAP level is a predictive factor of worse prognosis of HF.

Regarding the connection between PACAP-38 and NT-proBNP, which is the most informative cardiac biomarker of HF, we found a remarkable significant negative correlation between their plasma levels in the chronic HF group, implying a potential role of PACAP-38 in the etiology of cardiomyopathy. This fact confirms our assumption that low PACAP levels may be a potential biomarker of worse prognosis, such as elevated NT-proBNP levels. An increasing number of studies suggest a potential clinical use of PACAP as a diagnostic and prognostic biomarker in various pathological conditions; however, the question whether PACAP alterations are consequences or contributing factors of the disease remains open. Similar results were found in our earlier study, examining NICM and ICM patients, where we observed a significant negative correlation between plasma PACAP-38 and NT-proBNP levels in the ischemic group, but there was no significant correlation in the non-ischemic group [24]. Contrarily, we detected a positive tendency in the acute HF group between the two examined markers. NT-proBNP levels are usually elevated in acute decompensated HF due to the increased atrial wall strain caused by volume and pressure overload [25]. However, the prognostic value of NT-proBNP is weaker in the acute decompensated period before treatment compared to the compensated stable chronic HF [25].

It is a known fact that the not infection-related elevation of plasma CRP levels may mark systemic cardiac stress response and have a prognostic role in HF. The positive correlation between PACAP-38 and CRP levels are also strengthening the potential biomarker role of PACAP-38 in HF. This theory is further supported by our earlier study, where we detected significant positive correlation between PACAP and CRP in polytrauma patients during the acute phase [23]. However, it is important to note that circulating PACAP-38 levels alone may not be a useful biomarker for individuals suffering from HF; therefore, additional, complementary measures of other cardiac biomarkers may need to be combined with the polypeptide. In the future, it seems feasible that a combination of multiple cardiovascular biomarkers in one diagnostic panel will be used for the early diagnosis and reliable prediction of progression or therapeutic response in HF.

Examining the plasma cytokine levels in the different HF groups, we obtained diverse results. Significantly lower IL-1  $\beta$ , IL-2 and IL-4 cytokine levels were detected in the chronic HF group compared to both the acute HF and the control groups. Several earlier studies proved that the baseline therapy of HF containing ACEI,  $\beta$ -blocker and MRA remarkably decrease the serum levels of these cytokines [5,26,27]. Moreover, some studies reported significantly decreased level of inflammatory markers in patients with CRT therapy, especially in the responder cases [27]. In this current study, the rate of the optimal medical

therapy was over 80% in the chronic HF group; all of the examined patients received ACEI and  $\beta$ -blocker therapy and 81.8% of them were also taking MRA. Numerous previous investigations have been conducted examining the different cytokines in HF, but these results are still conflicting [28,29]. Although some have reported higher cytokine levels in HF [28,29], we assume that the lower cytokine levels can be explained by the extremely frequent application of the baseline HF therapy. Moreover, some examinations also showed that the alteration in different cytokine levels is associated with the severity of HF and the NYHA status [5,30]. They found significantly higher cytokine levels in patients with more severe HF and in NYHA stage III–IV. All our chronic HF patients had compensated cardiac status with NYHA stage I–II, which might also explain the low cytokine levels we measured in our assays.

Regarding the anti-inflammatory cytokine IL-10, we found significantly higher IL-10 levels in the acute HF group compared to the controls. Moreover, there was a significant positive correlation between IL-10 and plasma PACAP-38 levels, especially when the type of the HF (acute/chronic) was also considered. IL-10 is widely investigated in different experimental and human studies. In HF patients, significantly increased levels of plasma IL-10-secreting B cells were detected [31], suggesting that the elevated IL-10 levels may be part of the protective response in the acute decompensated HF.

Interestingly, we did not detect any significant differences in IL-6, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels between acute, chronic HF and the control groups, although several investigations discussed remarkable elevated levels of these cytokines in acute decompensated HF [27,29]. Our results fall in line with earlier controversial findings. The pathological role of IFN- $\gamma$  in HF is still unclear, as the results from the limited number of clinical and animal examinations are controversial [32]. TNF- $\alpha$ , the most potent inflammatory cytokine, shows promising results in HF and cardiac remodeling. Several studies detected elevated circulating TNF- $\alpha$  levels in HFrEF correlating with worse prognosis and increased mortality. Surprisingly, clinical trials of anti-TNF- $\alpha$  therapy resulted in increasing all-cause mortality and HF hospitalization [33]. In addition, the above-mentioned medical treatment in HF patients may also influence the plasma level of various inflammatory cytokines, i.e., lower IL-6 concentration can be detected in HF patients after  $\beta$ -blocker treatment [34]. All of these conflicting results about the potential protective or harmful effects of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  and the unknown underlying mechanisms can explain the inconsistency between the published data and our present results.

In the second part of our study, we examined human heart tissue samples and we found conflicting results between HF groups with different etiology and control groups. Earlier, we have already shown the presence of PAC1 receptor in human cardiac tissue samples with immunohistochemistry examination [35]. Since the etiology of HF (primary or ischemic) may influence PAC1 receptor expression and the tissue levels of PACAP-38 peptide, we examined the level of these molecules in the different groups. Correlation tests showed no significant connection between the clinical or myocardial functional parameters (e.g., ejection fraction, cardiac output), the routine laboratory parameters and tissue PACAP-38 levels, indicating no influencing effect on the PACAP levels, similarly to other human studies [21].

We examined the levels of intracellular PACAP-38 in homogenates of NICM and ICM hearts and healthy myocardial tissues. Our present results revealed a significantly lower tissue PACAP level in the end-stage HF hearts compared to the healthy ones, which can be explained by our earlier data, suggesting that intracellular PACAP-38 level, or accumulation of the polypeptide, is mostly related to the living, intact cells [10,35]. In contrast with the plasma levels, we did not find any significant correlation between tissue PACAP-38 levels, plasma NT-proBNP concentrations and different echocardiographic parameters. The exact source of the tissue PACAP-38 is not known, as PACAP-38 was detected in the nerves, myocytes, extracellular matrix and also in the cytoplasm of infiltrating macrophages [36]. Based on these data, we assume that the damaged myocytes or the “exhausted” compensation mechanisms might lead to the lower tissue PACAP-38 levels that we found in end-stage HF. The latter is strengthened by literature data, showing that the natriuretic

peptide levels can be extremely low in some cases of end-stage HF due to the “exhausted” neurohormonal system [37], making the correlation analyses more difficult [24].

Finally, we examined the PAC1 receptor intensity in the collected heart tissue samples. In our earlier experiment, we showed PAC1 receptor expression in the heart muscle cells; in contrast, in the endocardial connective tissue, we did not detect PAC1 receptor positivity [35]. However, in the current study, we first performed PAC1 receptor quantification using Western blot in human cardiac tissue samples, detecting significant differences between different etiological HF groups and the healthy controls. In NICM patients, significantly lower PAC1 receptor intensity was detected, while we found no significant difference in PAC1 receptor density in the ischemic group compared to the healthy controls. The possible explanation for these results is based on the different pathophysiology of the ischemic and non-ischemic cardiomyopathy. In NICM, the main underlying mechanisms are apoptosis, myocardial fibrosis and consequential cardiac remodeling [38]. We suggest that the increased cardiomyocyte apoptosis and the complex medical treatment together may lead to a decreased level of PAC1 receptors. In contrast to the above-mentioned pathomechanism, both the repeated ischemic attacks and preconditioning play an important role in ICM. The ischemic preconditioning enhances beneficial and protecting effect against ischemic injury and increases the production of various factors, such as adenosine, bradykinin or opiates [39]. In an earlier study, we detected a positive tendency between the different conditioning techniques and the plasma PACAP-38 levels [21]. However, there are no clinical data about the connection between preconditioning and PAC1 receptor level. Based on experimental and our human study results, we hypothesized that the relatively higher PAC1 receptor intensity is caused by the ischemic preconditioning in the ICM group. The presence of PAC1 receptors in myocardium raises the possibility of therapeutic use of endogenous or exogenous PACAP taking advantage of the anti-apoptotic, anti-inflammatory and anti-oxidant properties.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Plasma and Serum Samples of HF Patients

In the first part of our study, 13 patients with acute decompensated HF (mean age:  $66.5 \pm 3.7$  years, 33% women, 77% men), 33 patients with chronic, compensated HF (mean age:  $65.9 \pm 3.8$  years, 34.3% women, 75.7% men) and 13 age- and gender-matched controls without HF (mean age:  $65.8 \pm 4.0$  years, 31% women, 69% men) were examined. Patients with ICM and NICM were included in the acute HF group, admitted to intensive care unit due to reduced ejection fraction ( $EF < 40\%$ ) and symptoms of acute cardiac decompensation (shortness of breath, limitation of physical activity, NYHA III–IV stage). In contrast, patients with compensated chronic HF due to dilated cardiomyopathy were enrolled in the chronic HF group. Their cardiovascular status was compensated (NYHA II stage) and patients were on stable pharmacological treatment at least 3 months prior the enrollment. We also involved an age- and gender-matched control group in our study, including patients examined in our hospital for hypertension or atypical chest pain without symptoms or evidence of HF. Structural heart disease, impaired left ventricular systolic function ( $EF > 55\%$ ) and ischemic heart diseases were excluded by coronarography or coronary CT angiography. All patients possessing any inflammatory disease were excluded from the study.

Several routine laboratory tests were performed in all participants: three tubes (native, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and citrate tubes) were taken for general laboratory testing. Inflammatory parameters (serum CRP level), renal function (serum creatinine and urea levels), complete blood count and lipid parameters (serum total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, and levels of triglycerides) were determined. NT-proBNP measurements were also performed in cases of acute decompensated HF and chronic HF. All laboratory tests were performed in the Department of Laboratory Medicine, Clinical Center, University of Pecs. For detection of PACAP-38 LI, another 10 mL tube of peripheral venous blood including EDTA was also taken. Due to the polypeptide nature of PACAP-38, a protease inhibitor (200  $\mu$ L aprotinin (stock 1.4 mg/mL) into 10 mL blood) was

added to the blood samples and an ice water bath was used for storing the tubes to avoid peptide degradation. The EDTA-tubes were centrifuged immediately after the collection (4000 rpm, 4 °C, 15 min), after which the supernatant was collected and stored at –80 °C in polypropylene tubes (Sarstedt, Budapest, Hungary), then PACAP-38 sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and cytokine analysis with Luminex array were performed using these samples.

All human sample collections were carried out according to a protocol approved by the Institutional Ethics Committee (PTE KK 6383). In all cases, we obtained informed consent of the volunteers.

#### 4.2. Cardiac Tissue Samples of HF Patients

Human heart samples were collected in the Department of Heart Failure and Transplantation, Cardinal Stefan Wyszyński National Institute of Cardiology, Warszawa, Poland, as previously described [40]. Healthy human hearts were obtained from organ donor patients (control,  $n = 12$ ). The donors did not have any relevant previous cardiological history or any abnormalities in ECG and echocardiography (LV dimensions/contractility within normal ranges), and the control hearts were not used for transplantation due to technical reasons (e.g., due to donor/recipient incompatibility). Explanted failing hearts were obtained from patients suffering from advanced HF of non-ischemic (NICM,  $n = 11$ ) or ischemic (ICM,  $n = 12$ ) etiology. Human left ventricular tissue samples were taken from free wall, at the time of heart explantation (avoiding scarred, fibrotic or adipose tissue, endocardium, epicardium or coronary vessels). The samples were rinsed immediately in physiological saline, blotted dry, frozen in liquid nitrogen and kept at –80 °C until further processing.

For tissue disruption, a total of 30 mg frozen cardiac tissue samples were sonicated with a Hielscher UP 200 H/S homogenizer (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany) in 500 µL of ice-cold phosphate buffered saline (PBS) containing 14 µg aprotinin as protease inhibitor. Sonication was performed on ice with  $3 \times 30$  s bursts and an amplitude of 30%. Then, the homogenates were centrifuged at 10,000 rpm, for 15 min at 4 °C. The obtained supernatants were collected and tested for PACAP-38 LI with a PACAP-38-specific ELISA.

All experimental procedures were done in accordance with the ethical standards of the responsible institutional and national committee on human experimentation, adhering to the Helsinki Declaration (1975). Written informed consent was obtained from all patients involved in the study according to the protocol approved by the Local Ethics Committees of the Institute of Cardiology, Warszawa, Poland (IK-NP-0021-24/1426/18).

#### 4.3. Measurement of PACAP-38 Like Immunoreactivity (LI) by ELISA

For the determination of PACAP-38 LI in human cardiac tissue homogenates and plasma samples, sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (human PACAP-38 ELISA kit, MyBiosource, San Diego, CA, USA, cat.No: MBS109020) was used according to the protocol provided by the manufacturer. PACAP-38 LI is referred to as PACAP-38 level in the manuscript. Briefly, 50 µL of PACAP-38 standards, tissue homogenates, and plasma of myocardial infarction patients and healthy controls were pipetted to the appropriate wells of the anti-PACAP-38 antibody-precoated microwells in duplicate. Then, 100 µL of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated reagent was added to each well, covered with closure plate and incubated for 60 min at 37 °C. The plate was washed four times with 200 µL/well of  $1 \times$  Wash buffer. Next, 50 µL of Chromogen Solution A and 50 µL of Chromogen Solution B was added to each well and incubated for 15 min at 37 °C in dark. The developing color reaction was stopped by adding 50 µL of Stop solution to every well. The SPECTROStar Nano spectrophotometer (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) was used to measure the optical density (OD) of the test-wells at a wavelength of 450 nm. Since the obtained OD values were proportional to the level of PACAP-38 in the test samples, their concentrations were calculated by comparing the OD values of the sample wells to the ODs of the standard curve. All measured plasma PACAP-38 levels are shown in pg/mL.

#### 4.4. Measurement of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Levels with LUMINEX Array

Plasma samples from 9 healthy control and 31 HF patients ( $n = 12$  acute HF,  $n = 19$  chronic HF) were examined for the concentrations of 7 characteristic pro-, and anti-inflammatory cytokines (IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-g, TNF-a) with the high sensitivity Invitrogen™ Human Cytokine 7-Plex ProcartaPlex™ Panel (Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria) according to the manufacturer's instructions. All tests were run in duplicate. Briefly, first, the kit components were allowed to warm up to room temperature. Then, plasma samples were thawed and 25  $\mu$ L volume/well plasma and diluted cytokine standards were loaded onto a 96-well plate containing 25  $\mu$ L of capture antibody-coated fluorescent-coded beads. The plate was incubated for 30 min. After washing, 25  $\mu$ L biotinylated detection antibodies and 50  $\mu$ L streptavidin-PE were added to the plate with alternate incubation and washing steps. After final washing 120  $\mu$ L Reading buffer was added to the wells and the plate was read on the Luminex MagPix array reader. Five-parameter logistic (PL) regression curve was used to plot the 7-pt standard curves for all analytes. Data were analyzed using the Belysa 1.1.0 (Merck KGaA; Darmstadt, Germany) software. The calculated cytokine concentrations were given in pg/mL.

#### 4.5. Measurement of PAC1 Receptor Level by Western Blot Analysis

In order to investigate whether PAC1 receptor level is altered at the protein level in the homogenates of heart samples, Western blot was performed as previously described in our laboratory with modifications [41]. Frozen tissue samples were homogenized in 1  $\times$  radio immunoprecipitation assay buffer (RIPA; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), supplemented with 1  $\times$  HALT Protease and Phosphatase Inhibitor cocktail (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Protein concentration of the samples was determined by bicinchoninic acid assay kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Equal amounts of protein from each sample were mixed with 1/4th total volume of Laemmli buffer containing  $\beta$ -mercaptoethanol (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and were loaded on 4–20% Tris-glycine sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gradient gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and electrophoresed at constant voltage (on 90 V for 15 min and on 110 V for 1.5 h, room temperature). The separated proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (2.5 A, 7 min, room temperature, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Next, membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20 (0.05% TBS-T; Sigma, St. Louis, MO, USA) for 2 h at room temperature, and then were probed with primary antibodies overnight at 4 °C (anti-ADCYAP1R1/PAC1: 1:2500, cat. No: SAB2900693, Sigma, St. Louis, MO, US; GAPDH: 1:5000, cat. No: 2118, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). After a 3  $\times$  10-min wash in 0.05% TBS-T, membranes were incubated with corresponding HRP-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit: 1:5000, cat. No: 7074; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) for 2 h at room temperature and washed in 0.05% TBS-T again for 3  $\times$  10 min. Signals were visualized after incubation with Clarity™ Western ECL Substrate chemiluminescence kit (#170506S; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) by Chemidoc XRS+ Gen Imagine System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Image analysis was performed using Image Lab™ 6.0 software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The measured density of PAC1 receptor was normalized to the intensity of GAPDH specific lane and presented as relative PAC1 receptor intensity.

#### 4.6. Statistical Analysis

For statistical analysis, SPSS 22 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) Program was used. Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk normality tests were performed, showing normally distributed data. To detect the potential differences between the examined groups (acute or chronic HF vs. control; ICM or NICM vs. control), one-way ANOVA with Tukey post hoc tests were used. Mann–Whitney test was performed to examine the differences in PAC1 receptor intensity between the different cardiomyopathy groups (ICM or NICM) and healthy controls. The interaction between PACAP-38 and NT-

proBNP, CRP, different cytokine levels and other potential impacting factors (comorbidities, echocardiographic parameters, therapy and routine laboratory parameters) were tested with Spearman's correlation. Based on the correlation coefficient (the  $r$  value), we could define positive ( $r = 0-1$ ) and negative ( $r = -1-0$ ) correlation, including subgroups with different strength. Multivariate regression analysis was performed to examine the additive effects of the main influencing factors. In all cases,  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 5. Conclusions

In this study, we detected significantly higher plasma PACAP-38 levels in acute, decompensated HF and significantly lower PACAP-38 in chronic, compensated HF compared to the healthy control group. PACAP-38 also showed strong correlations with important HF biomarkers, such as NT-proBNP and CRP. Moreover, we revealed significant correlation between PACAP-38 and different pro- and anti-inflammatory cytokines. Furthermore, significantly higher tissue PACAP-38 was detected in the healthy controls compared to both ischemic and non-ischemic cardiomyopathies. Additionally, we found significantly lower PAC1 receptor intensity in the NICM group compared to the controls. All of these results highlight the importance and necessity to investigate the predictive biomarker role of PACAP-38 in human follow-up studies of HF patients.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.S., Z.S., D.R., Z.H., P.F., P.L. and A.T.; Methodology, D.S., B.P., É.S., Z.O., Z.V.V. and Á.K.; Investigation, D.S., B.P., É.S., Á.K. and A.T.; Resources, D.R., P.F. and A.T.; Data Curation D.S., B.P. and É.S.; Writing—Original Draft Preparation, D.S., Z.S. and A.T.; Writing—Review and Editing, D.S., Z.S., B.P., É.S., D.R., P.L., Z.V.V., Z.H., P.F., Á.K., Z.O. and A.T.; Visualization, D.S., T.T. and B.P.; Supervision, Z.S. and A.T.; Project Administration, A.T.; Funding Acquisition, D.R., P.F. and A.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was funded by the Hungarian Scientific Research Fund K119759, K129190 and K135457, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 "PEPSYS", Hungarian Academy of Sciences MTA-TKI-14016, Thematic Excellence Program 2021 Health Sub-programme of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the EGA-16 project of the University of Pécs, University of Pécs Medical School KA Research Grant, KA-2019-30. The work was supported by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No 739593. NVKP\_16-1-2016-0017 ('National Heart Program') has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary. This project was supported by grants from the National Research, Development and Innovation Office (NKFIH) of Hungary (FK134751 to Z.V.V.). É.S. and Z.V.V. were supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences. É.S. was supported by the ÚNKP-19-4 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology. This research was supported by National Brain Research Program 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 (NAP-2; Chronic Pain Research Group) and the Lorand Eotvos Research Network.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethical Committee of University of Pécs, Medical School (PTE KK 6383).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** English language proofreading was done by our native English-speaking colleague, Schwieters Lili Margaret. We are very grateful to Professor Tamás Kőszegi and the Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs for performing all the routine laboratory tests of the examined patients.

**Conflicts of Interest:** P.F. is the founder and CEO of Pharmahungary Group, a group of R&D companies ([www.pharmahungary.com](http://www.pharmahungary.com), accessed on 23 March 2022). Other authors declare no conflict of interest.

## References

1. Huang, Y.T.; Tseng, Y.T.; Chu, T.W.; Chen, J.; Lai, M.Y.; Tang, W.R.; Shiao, C.C. N-terminal pro b-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP)-based score can predict in-hospital mortality in patients with heart failure. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29590. [[CrossRef](#)]
2. Taylor, K.S.; Verbakel, J.Y.; Feakins, B.G.; Price, C.P.; Perera, R.; Bankhead, C.; Pluddemann, A. Diagnostic accuracy of point-of-care natriuretic peptide testing for chronic heart failure in ambulatory care: Systematic review and meta-analysis. *BMJ* **2018**, *361*, k1450. [[CrossRef](#)]
3. Pan, W.; Yang, D.; Yu, P.; Yu, H. Comparison of predictive value of NT-proBNP, sST2 and MMPs in heart failure patients with different ejection fractions. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2020**, *20*, 208. [[CrossRef](#)]
4. Hedayat, M.; Mahmoudi, M.J.; Rose, N.R.; Rezaei, N. Proinflammatory cytokines in heart failure: Double-edged swords. *Heart Fail. Rev.* **2010**, *15*, 543–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Zhang, Y.; Bauersachs, J.; Langer, H.F. Immune mechanisms in heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **2017**, *19*, 1379–1389. [[CrossRef](#)]
6. Vaudry, D.; Falluel-Morel, A.; Bourgault, S.; Basille, M.; Burel, D.; Wurtz, O.; Fournier, A.; Chow, B.K.; Hashimoto, H.; Galas, L.; et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* **2009**, *61*, 283–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bian, N.; Du, G.; Ip, M.F.; Ding, J.; Chang, Q.; Li, Z. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide attenuates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in endothelial colony-forming cells. *Biomed. Rep.* **2017**, *7*, 11–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Racz, B.; Gasz, B.; Borsiczky, B.; Gallyas, F., Jr.; Tamas, A.; Jozsa, R.; Lubics, A.; Kiss, P.; Roth, E.; Ferencz, A.; et al. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2007**, *153*, 115–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Racz, B.; Gasz, B.; Gallyas, F., Jr.; Kiss, P.; Tamas, A.; Szanto, Z.; Lubics, A.; Lengvari, I.; Toth, G.; Hegyi, O.; et al. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul. Pept.* **2008**, *145*, 105–115. [[CrossRef](#)]
10. Reglodi, D.; Tamas, A. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide–PACAP*, 1st ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; ISBN 978-3-319-35135-3.
11. Roth, E.; Weber, G.; Kiss, P.; Horvath, G.; Toth, G.; Gasz, B.; Ferencz, A.; Gallyas, F., Jr.; Reglodi, D.; Racz, B. Effects of PACAP and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1163*, 512–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Seaborn, T.; Masmoudi-Kouli, O.; Fournier, A.; Vaudry, H.; Vaudry, D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 204–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sano, H.; Miyata, A.; Horio, T.; Nishikimi, T.; Matsuo, H.; Kangawa, K. The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cultured rat cardiocytes as a cardioprotective factor. *Regul. Pept.* **2002**, *109*, 107–113. [[CrossRef](#)]
14. Gasz, B.; Racz, B.; Roth, E.; Borsiczky, B.; Tamas, A.; Boronkai, A.; Gallyas, F., Jr.; Toth, G.; Reglodi, D. PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1070*, 293–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. McDonagh, T.A.; Metra, M.; Adamo, M.; Gardner, R.S.; Baumbach, A.; Bohm, M.; Burri, H.; Butler, J.; Čelutkienė, J.; Chioncel, O.; et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J.* **2021**, *42*, 3599–3726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Szobi, A.; Gonçalvesova, E.; Varga, Z.V.; Leszek, P.; Kusmierczyk, M.; Hulman, M.; Kyselovič, J.; Ferdinandy, P.; Adameova, A. Analysis of necroptotic proteins in failing human hearts. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 86. [[CrossRef](#)]
17. Songbo, M.; Lang, H.; Xinyong, C.; Bin, X.; Ping, Z.; Liang, S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol. Lett.* **2019**, *307*, 41–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Mori, H.; Nakamachi, T.; Ohtaki, H.; Yofu, S.; Sato, A.; Endo, K.; Iso, Y.; Suzuki, H.; Takeyama, Y.; Shintani, N.; et al. Cardioprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Circ. J.* **2010**, *74*, 1183–1190. [[CrossRef](#)]
19. Subramaniam, V.; Chuang, G.; Xia, H.; Burn, B.; Bradley, J.; Maderdrut, J.L.; Coy, D.H.; Varner, K.J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects against mitoxantrone-induced cardiac injury in mice. *Peptides* **2017**, *95*, 25–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Otto, C.; Hein, L.; Brede, M.; Jahns, R.; Engelhardt, S.; Grone, H.J.; Schutz, G. Pulmonary hypertension and right heart failure in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *Circulation* **2004**, *110*, 3245–3251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Szabo, D.; Sarszegi, Z.; Polgar, B.; Saghy, E.; Nemeth, A.; Reglodi, D.; Makkos, A.; Gorbe, A.; Helyes, Z.; Ferdinandy, P.; et al. PACAP-38 in acute ST-segment elevation myocardial infarction in humans and pigs: A translational study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2883. [[CrossRef](#)]
22. Perna, E.R.; Macin, S.M.; Canella, J.P.; Augier, N.; Stival, J.L.; Cialzeta, J.R.; Pitzus, A.E.; Garcia, E.H.; Obregon, R.; Brizuela, M.; et al. Ongoing myocardial injury in stable severe heart failure: Value of cardiac troponin T monitoring for high-risk patient identification. *Circulation* **2004**, *110*, 2376–2382. [[CrossRef](#)]
23. Tamas, A.; Toth, D.; Pham, D.; Loibl, C.; Rendeki, S.; Csontos, C.; Rozanovic, M.; Bogar, L.; Polgar, B.; Nemeth, J.; et al. Changes of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP-38) level in polytrauma patients in the early post-traumatic period. *Peptides* **2021**, *146*, 170645. [[CrossRef](#)]



24. Sarszegi, Z.; Szabo, D.; Gaszner, B.; Konyi, A.; Reglodi, D.; Nemeth, J.; Lelesz, B.; Polgar, B.; Jungling, A.; Tamas, A. Examination of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) as a potential biomarker in heart failure patients. *J. Mol. Neurosci.* **2019**, *68*, 368–376. [[CrossRef](#)]
25. Mueller, C.; McDonald, K.; de Boer, R.A.; Maisel, A.; Cleland, J.; Kozhuharov, N.; Coats, A.; Metra, M.; Mebazaa, A.; Ruschitzka, F.; et al. Heart Failure Association of the European Society of Cardiology practical guidance on the use of natriuretic peptide concentrations. *Eur. J. Heart Fail.* **2019**, *21*, 715–731. [[CrossRef](#)]
26. Gage, J.R.; Fonarow, G.; Hamilton, M.; Widawski, M.; Martínez-Maza, O.; Vredevoe, D.L. Beta blocker and angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy is associated with decreased Th1/Th2 cytokine ratios and inflammatory cytokine production in patients with chronic heart failure. *Neuroimmunomodulation* **2004**, *11*, 173–180. [[CrossRef](#)]
27. Lappégård, K.T.; Bjørnstad, H.; Mollnes, T.E.; Hovland, A. Effect of cardiac resynchronization therapy on inflammation in congestive heart failure: A review. *Scand. J. Immunol.* **2015**, *82*, 191–198. [[CrossRef](#)]
28. Bartekova, M.; Radosinska, J.; Jelemensky, M.; Dhalla, N.S. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. *Heart Fail. Rev.* **2018**, *23*, 733–758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hanna, A.; Frangogiannis, N.G. Inflammatory cytokines and chemokines as therapeutic targets in heart failure. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2020**, *34*, 849–863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ji, Y.; Ge, J.; Li, X. Association of IL-1 $\beta$  polymorphisms and plasma levels with chronic heart failure: A case-control study in Chinese patients. *Eur. J. Infl.* **2018**, *16*, 2058739218818686. [[CrossRef](#)]
31. Guo, Y.; Cen, Z.; Wei, B.; Wu, W.; Zhou, Q. Increased circulating interleukin 10-secreting B cells in patients with dilated cardiomyopathy. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 8107–8114.
32. Levick, S.P.; Goldspink, P.H. Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Heart Fail. Rev.* **2014**, *19*, 227–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chung, E.S.; Packer, M.; Lo, K.H.; Fasanmade, A.A.; Willerson, J.T. Anti-TNF therapy against congestive heart failure investigators. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor- $\alpha$ , in patients with moderate-to-severe heart failure: Results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation* **2003**, *107*, 3133–3140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Matsumura, T.; Tsushima, K.; Ohtaki, E.; Misu, K.; Tohbaru, T.; Asano, R.; Nagayama, M.; Kitahara, K.; Umemura, J.; Sumiyoshi, T.; et al. Effects of carvedilol on plasma levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in nine patients with dilated cardiomyopathy. *J. Cardiol.* **2002**, *39*, 253–257.
35. Szanto, Z.; Sarszegi, Z.; Reglodi, D.; Nemeth, J.; Szabadfi, K.; Kiss, P.; Varga, A.; Banki, E.; Csanaky, K.; Gaszner, B.; et al. PACAP-38 immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *48*, 667–673. [[CrossRef](#)]
36. Alston, E.N.; Parrish, D.C.; Hasan, W.; Tharp, K.; Pahlmeyer, L.; Habecker, B.A. Cardiac ischemia-reperfusion regulates sympathetic neuropeptide expression through gp130-dependent and independent mechanisms. *Neuropeptides* **2011**, *45*, 33–42. [[CrossRef](#)]
37. Miller, W.L.; Hartman, A.K.; Burritt, M.F.; Burnett, J.C., Jr.; Jaffe, A.S. Mortality in end stage heart failure is associated with paradoxically low NT-pro BNP and BNP levels: “natriuretic peptide exhaustion”? *J. Card. Fail.* **2004**, *10*, s45. [[CrossRef](#)]
38. Dadson, K.; Hauck, L.; Billia, F. Molecular mechanisms in cardiomyopathy. *Clin. Sci.* **2017**, *131*, 1375–1392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Tomai, F.; Crea, F.; Chiariello, L.; Giofrè, P.A. Ischemic preconditioning in humans: Models, mediators, and clinical relevance. *Circulation* **1999**, *100*, 559–563. [[CrossRef](#)]
40. Varga, Z.V.; Pipicz, M.; Baan, J.A.; Baranyai, T.; Koncsos, G.; Leszek, P.; Kuśmierczyk, M.; Sánchez-Cabo, F.; García-Pavía, P.; Brenner, G.J.; et al. Alternative splicing of NOX4 in the failing human heart. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 935. [[CrossRef](#)]
41. Baranyai, T.; Herczeg, K.; Onodi, Z.; Voszka, I.; Modos, K.; Marton, N.; Nagy, G.; Mager, I.; Wood, M.J.; El Andaloussi, S.; et al. Isolation of exosomes from blood plasma: Qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0145686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



# Examination of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) as a Potential Biomarker in Heart Failure Patients

Zsolt Sarszegi<sup>1</sup> · Dora Szabo<sup>1,2</sup> · Balazs Gaszner<sup>1</sup> · Attila Konyi<sup>1</sup> · Dora Reglodi<sup>2</sup> · Jozsef Nemeth<sup>3</sup> · Beata Lelesz<sup>3</sup> · Beata Polgar<sup>4</sup> · Adel Jungling<sup>2</sup> · Andrea Tamas<sup>2</sup> 

Received: 13 October 2017 / Accepted: 25 December 2017 / Published online: 20 January 2018  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a pleiotropic and multifunctional neuropeptide having neurotrophic, neuroprotective, and general cytoprotective actions in a variety of tissues based on its anti-apoptotic, anti-inflammatory, and antioxidant effects. Several studies have demonstrated its cardioprotective effects *in vitro* and in various animal models. However, few data are available on the presence of PACAP in human cardiac tissues and its role in the pathomechanism and progression of different cardiac disorders, particularly heart failure. Earlier, our research group has shown PAC1 receptor immunoreactivity in human heart tissue samples and we have found significantly elevated PACAP27- and PACAP38-like immunoreactivity in ischemic cardiac samples compared to valvular abnormalities with radioimmunoassay. In the last few years, numerous studies examined the presence and the changes of PACAP levels in different human tissue samples and biological fluids to show alterations in different physiological and pathological conditions. Therefore, the aim of the present study was to measure the alterations of blood PACAP levels in chronic heart failure caused by primary dilated cardiomyopathy or ischemic cardiomyopathy and to examine the possible relationship between serum levels of PACAP, N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide (NT-proBNP), and systolic left ventricular function, the most reliable biomarkers of heart failure. In the group of mild heart failure patients, a significant strong negative correlation was detected. Furthermore, in moderate heart failure, we found a significant moderate negative correlation between PACAP and NT-proBNP levels only in ischemic subgroup. Positive correlation was found between serum PACAP level and ejection fraction only in patients with heart failure due to ischemic cardiomyopathy but not in patients with primary dilated cardiomyopathy. In summary, remarkable differences were observed between the ischemic and non-ischemic heart failure suggesting that PACAP might play an important role in the pathomechanism and progression of ischemic heart failure and it might be a potential biomarker of cardiac diseases in the future.

**Keywords** PACAP · Heart failure · NT-proBNP · Dilated cardiomyopathy

## Introduction

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a multifunctional neuropeptide identified as a hypothalamic

neuropeptide that stimulates adenylate cyclase activity in the pituitary gland (Miyata et al. 1989). PACAP belongs to the vasoactive intestinal polypeptide (VIP)/secretin/glucagon family and it exists in 27 and 38 amino acid forms, the latter accounts for 90% of total PACAP. Three distinct PACAP receptors are known, the specific PAC1 receptor and the PACAP/VIP indifferent VPAC1 and VPAC2 receptors (Vaudry et al. 2009). PACAP exerts neuroprotective, neurotrophic, and general cytoprotective actions in a variety of tissues based on its anti-apoptotic, anti-inflammatory, and antioxidant effects (Reglodi and Tamas 2016).

Several studies have examined the cardioprotective effects of PACAP. Based on these results, it is proved that PACAP has positive chronotropic, inotropic (Farnham et al. 2011; Merriam et al. 2012; Clason et al. 2016), and dromotropic effects. Furthermore, PACAP is a potent vasodilator (Lenti

✉ Andrea Tamas  
andreatamassz@gmail.com

<sup>1</sup> Heart Institute, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary

<sup>2</sup> Department of Anatomy, MTA-PTE PACAP Research Team, Centre for Neuroscience, Medical School, University of Pecs, Szigeti Street 12, Pecs 7624, Hungary

<sup>3</sup> Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

<sup>4</sup> Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary

et al. 2007; Vamos et al. 2014) and has protective effects against ischemia/reperfusion injury and oxidative stress on cardiomyocytes and endothelial cells (Sano et al. 2002; Gasz et al. 2006a, b; Racz et al. 2007, 2010; Roth et al. 2009; Mori et al. 2010). Studies have demonstrated that not only exogenous PACAP protects against doxorubicin-induced cell death in cardiomyocytes (Racz et al. 2010) but also endogenous PACAP has a cardioprotective effect on cardiomyopathy triggered by doxorubicin in mice (Mori et al. 2010). PACAP also prevents mitoxandrone-induced cardiac injury in mice (Subramaniam et al. 2017). Otto and co-workers (2004) have found pulmonary hypertension and right heart failure in PAC1 receptor-deficient mice. Another study has demonstrated elevated PACAP levels in the mouse heart after myocardial infarction (Alston et al. 2011). Based on in vitro and animal experiments — which have shown cardioprotective effect of PACAP — the question arises, what role this neuropeptide can play in human cardiovascular diseases.

In the last few years numerous studies examined the presence and the changes of PACAP level in different human tissue samples and biological fluids to show alterations in different physiological and pathological conditions (Reglodi et al. 2016). Our research group has shown elevated blood PACAP level in pregnant and lactating women, and we have also described the presence of PACAP in human milk samples (Borzsei et al. 2009; Reglodi et al. 2010). Most of the clinical studies were performed in neurological diseases, such as migraine (Tuka et al. 2013), neurodegenerative disorders (Han et al. 2014a, b), traumatic brain injury (Bukovics et al. 2014), and hemorrhagic stroke (Ma et al. 2015; Jiang et al. 2016). There are some other experiments from urological (Eneman et al. 2015) and gynecological disorders (Kanasaki et al. 2013) where significant alterations of blood PACAP levels have been found compared to healthy samples. Based on these results, we can suggest that PACAP might have diagnostic value, as a potential biomarker, in several clinical disorders.

Although the results of different studies in the last 15 years suggest that PACAP might play a role in the pathology of ischemic heart disease, there are only few data about PACAP from patients with cardiac disorders. Earlier, we have shown PAC1 receptor immunoreactivity in human heart tissue samples and we have found significantly elevated PACAP27- and PACAP38-like immunoreactivity (LI) in ischemic cardiac samples compared to valvular abnormalities with radioimmunoassay (Szanto et al. 2012). Therefore, the aim was to continue our cardiological clinical studies to examine the alterations of PACAP levels in blood samples of heart failure patients with reduced ejection fraction (HF-rEF) with radioimmunoassay (RIA).

The etiology and progression of heart failure are well defined; furthermore, the systolic left ventricular (LV) dysfunction is objectively diagnosable with non-invasive

echocardiographic methods. Several biomarkers have been investigated in relation to heart failure, such as high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), troponin-T, and creatine kinase (ESC Guideline 2016). The most reliable biomarker for heart failure seems to be the serum N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide (NT-proBNP), even though this marker has its limitations, especially in non-acute cases (Kelder et al. 2011a, b). Clinical experience shows that patients with the same NT-proBNP levels respond to the same medical treatment in different ways. This low-level evidence is a regular challenge for monitoring the prognosis. Based on these observations, it is presumable that there are some other factors which can affect the course of the disease and could serve as potential biomarker in cardiac diseases. Therefore, the aim of this study was to examine the possible relations between serum levels of PACAP, NT-proBNP, and systolic left ventricular function. To examine these markers, we chose two well-defined initial diseases: primary dilated cardiomyopathy (DCM) and ischemic dilated cardiomyopathy, the most common forms of HF-rEF.

## Methods

In this experiment, we examined peripheral venous blood samples of 42 patients with primary ( $n = 9$ ) and ischemic ( $n = 33$ ) dilated cardiomyopathy. The most common type of DCM is ischemic cardiomyopathy, which is characterized by a lack of blood supply to the heart muscle caused by coronary artery disease and heart attacks (Anversa and Sonnenblick 1990). In the primary form, a lot of different causes are detectable such as genetic disorders or myocarditis, but the ischemic causes are excluded in all cases (Maron et al. 2006). The selection of the patients was based on systolic ventricular function ( $EF < 40\%$ ). For the relative objective measurement of EF, we used the Simpson method (Dornberger et al. 2015).

From all patients, two blood collection tubes (one 10 ml, one 5 ml) were taken for general laboratory examination. During these laboratory tests, inflammatory parameter (serum C-reactive protein level), kidney function (serum creatinin and urea levels), and blood lipid parameters (serum cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, and levels of triglycerides) were detected. Other two 10-ml tubes including ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were taken — one for PACAP and the other one for NT-proBNP determination. Because of the polypeptide nature of PACAP, we had to use protease inhibitor (200  $\mu$ l aprotinin (1.4 mg/ml) into 10 ml blood) and ice water bath for storage of the tubes to avoid peptide degradation. The two EDTA tubes were centrifuged immediately after the collection (4000 rpm, 4 °C, 15 min), and one of the supernatants was examined with chemiluminescence detector to measure the serum NT-proBNP level. The other

supernatant, which included aprotinin, was further processed for RIA analysis of PACAP38-LI. The collected plasma samples were stored in polypropylene RIA tubes (Sarstedt, Hungary) at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until RIA determination.

All human sample collections were carried out according to a protocol approved by the Institutional Ethic Committee (PTE KK 6383). In all cases, we obtained written consent of the volunteers before sample collection.

Due to the low circulating levels of PACAP38 in plasma, a minimum of 1 ml plasma was required for the accurate determination by RIA. Collected plasma samples were thawed, and during extraction procedures, samples and extraction reagents were stored in an ice water bath. Extraction was performed in the polypropylene RIA tubes (5 ml,  $12 \times 75$  mm). For precipitation of plasma proteins, 1 ml plasma was added to 3 ml 96% ethyl alcohol. After mixing, the samples were incubated in an ice bath for 30 min. After centrifugation (4000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 min), the supernatants were decanted into RIA tubes and evaporated to dryness using nitrogen stream without heat. The dried samples were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  prior to RIA determination. In the RIA process, the samples were re-dissolved in 800  $\mu\text{l}$  assay buffer and assayed directly in these tubes.

In RIA examination, PACAP38-specific antiserum (88111-3) was applied, which was raised against a conjugate of Cys(23)-PACAP(24-38) and bovine thyroglobulin coupled by carbodiimide in rabbits (Arimura et al. 1991). PACAP38 peptide was used as a RIA standard ranging from 0 to 1000 fmol/ml. Mono $^{125}\text{I}$ -labeled PACAP24-38 C-terminal fragment was applied as a RIA tracer prepared in the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pecs. The assay buffer (0.05 mol/l, pH 7.4 phosphate buffer) contained 0.1 M NaCl, 0.05%  $\text{NaN}_3$ , and 0.25% bovine serum albumin (BSA, Sigma). The 1 ml incubation mixture contained 100  $\mu\text{l}$  PACAP38 standards, 100  $\mu\text{l}$  antiserum (working dilution 1:10000), 100  $\mu\text{l}$  RIA tracer (5000 cpm/tube), and the assay buffer. After 48 h incubation at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the antibody-bound peptide was separated from the free peptide by addition of 100  $\mu\text{l}$  separating suspension (10 g charcoal, 1 g dextran, and 0.5 g commercial fat-free milk powder in 100 ml distilled water). After centrifugation (4000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 min) the tubes were gently decanted. Radioactivity of the precipitates was measured in a NZ310 type gamma counter (Gamma, Budapest, Hungary). The PACAP38-LI of the unknown samples was read from the calibration curve.

Antiserum “88111-3,” used in the assay, turned out to be C-terminal specific without affinity for PACAP27, VIP, glucagon, secretin, motilin, PHI, and GRF based on cross-reaction studies. Intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 7.2 and 8.7%, respectively. In the recovery test, known amounts (low, middle, high) of PACAP38 were added to human plasma and after extraction and RIA determination, the observed

percentage recovery of PACAP38 were 85.6, 91.6, and 92.3%, respectively (Arimura et al. 1991; Jakab et al. 2004).

For statistical analysis, we used the IBM SPSS Statistic 21 Program. For the examination of the relationship between PACAP, NT-proBNP, and EF, we used linear regression, Pearson’s (for parametric values), and Spearman’s (for non-parametric values) correlation tests. Correlation tests were used to detect the strength of the relationship between two variables. Based on the correlation coefficient (the  $r$  value), we could define positive ( $r=0-1$ ) and negative ( $r=-1-0$ ) correlation including subgroups with different strength (Table 1.) We also used linear regression to describe the linear relationship between PACAP and NT-proBNP in a more sensitive way with regression line and coefficient ( $\beta$ ). In both statistical models, the coefficient of determination ( $R^2$ ) can be defined to describe the impact of one variable to the other; furthermore, it can give more information about the goodness of fit of a model.  $R^2$  ranges from 0 to 1, an  $R^2$  of 1 indicates that the regression line perfectly fits the data and the variables perfectly determine each other. In all cases,  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

In our study, we investigated the plasma level of PACAP38-LI in heart failure. We examined 42 patients who suffered from dilated cardiomyopathy. These patients were aged 37–84 years with a mean age of  $64.4 \pm 5.66$  years and included 35 males and 7 females; 73.4% of patients had hypertension, and 40.5% had diabetes mellitus. The correlation analysis showed no association between plasma PACAP levels and gender, age, hypertension, diabetes mellitus, and some important labor parameters (Table 2). According to previous study results (Farnham et al. 2011), we also evinced that these factors have no influence on the plasma PACAP levels.

Based on the etiology, we separated our patients in two groups, primary ( $n = 9$ ) and ischemic ( $n = 33$ ) DCM. Patients with ischemic DCM were divided into three other subgroups by virtue of NT-proBNP levels and clinical symptoms. We defined a mild ( $n = 6$ , NT-proBNP  $< 500$  pg/ml, grade I according to the New York Heart Association functional classification — NYHA I), a moderate ( $n = 16$ , NT-proBNP = 500–

**Table 1** The interpretation of the correlation coefficient ( $r$ )

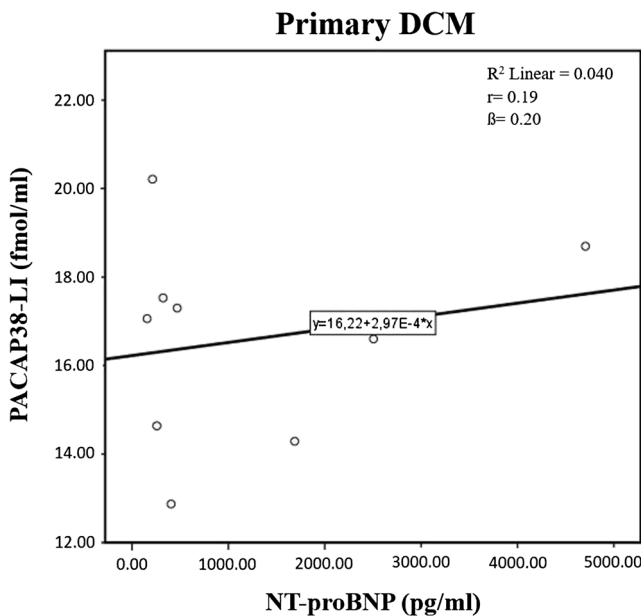
(+) relationship	(-) relationship	The strength of the relationship
$< 0.2$	$> -0.2$	No correlation
0.2–0.4	$-0.4 - -0.2$	Weak correlation
0.4–0.7	$-0.7 - -0.4$	Moderate correlation
0.7–0.9	$-0.9 - -0.7$	Strong correlation
0.9–1	$-1 - -0.9$	Very strong correlation

**Table 2** Correlation analysis between serum PACAP38 level and gender, age, hypertension, diabetes mellitus, and labor parameters. Bivariate correlations were assessed by Pearson’s (for parametric values) and Spearman’s (for non-parametric values) correlation coefficient. NS non-significant

Factors	r value	p value
Gender (male/female)	0.037	> 0.05 — NS
Age (years)	0.015	> 0.05 — NS
Hypertension	0.020	> 0.05 — NS
Diabetes mellitus	0.098	> 0.05 — NS
Plasma C-reactive protein (mg/l)	0.071	> 0.05 — NS
Serum creatinine (μmol/l)	0.123	> 0.05 — NS
Serum urea (mmol/l)	0.063	> 0.05 — NS
Serum cholesterol (mmol/l)	0.024	> 0.05 — NS
Serum LDL cholesterol (mmol/l)	0.107	> 0.05 — NS
Serum HDL cholesterol (mmol/l)	0,067	> 0.05 — NS
Serum triglycerides (mmol/l)	0.022	> 0.05 — NS

3000 pg/ml, NYHA II–III), and a severe ( $n = 11$ , NT-proBNP > 3000 pg/ml, NYHA III–IV) HF group. The NYHA classification has been used to express the severity of symptoms. However, the latest studies have shown that symptom severity barely correlates with measures of LV function, although a clear relationship has been detected between the severity of symptoms and survival (McMurray et al. 2012; ESC Guideline 2016).

First, we examined the correlation between plasma levels of PACAP38-LI and NT-proBNP. In the primary DCM group, we could not detect any correlation between the two markers ( $r = 0.19$ ,  $R^2 = 0.04$ ,  $\beta = 0.20$  Fig. 1).



**Fig. 1** The line of linear regression between serum PACAP38-LI and serum NT-proBNP levels in the primary DCM group

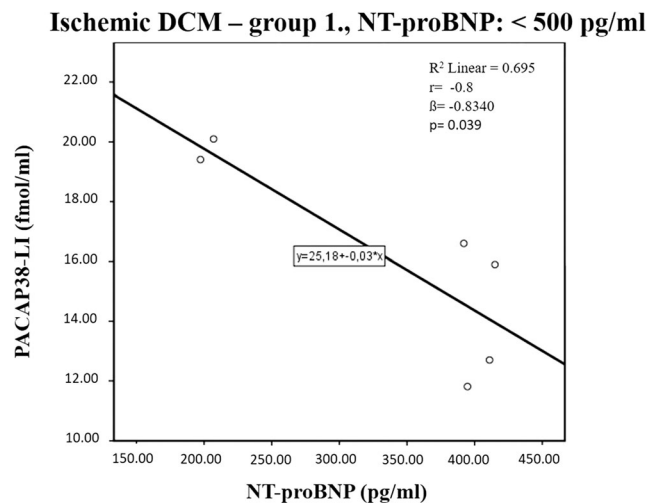
On the other hand, we found significant correlation between PACAP38-LI and NT-proBNP levels in the ischemic DCM group. In patients with mild HF (NT-proBNP < 500 pg/ml, NYHA I), a significant ( $p = 0.039$ ) strong negative correlation ( $r = -0.8$ ) and linear relationship ( $\beta = -0.834$ ,  $R^2 = 0.695$ ) were detected between the two examined factors (Fig. 2).

In the moderate HF group (NT-proBNP = 500–3000 pg/ml, NYHA II–III), which contained higher number of patients, we found a significant ( $p = 0.021$ ) moderate negative correlation ( $r = -0.6$ ) and linear relationship ( $\beta = -0.572$ ,  $R^2 = 0.328$ ) between PACAP38-LI and NT-proBNP levels (Fig. 3).

In the third, severe HF group (NT-proBNP > 3000 pg/ml, NYHA IV) slightly weaker negative correlation ( $r = -0.27$ ) and linear relationship ( $\beta = -0.27$ ,  $R^2 = 0.073$ ) were detected; however, we did not find significant results in this case ( $p = 0.42$ ) (Fig. 4).

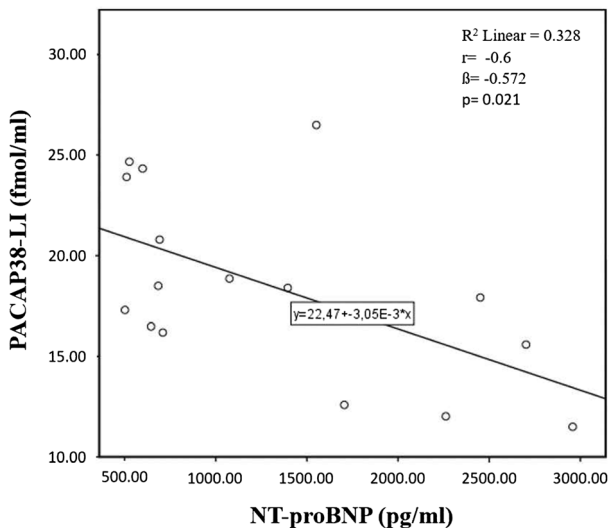
In the second part of the study, we investigated the correlation between NT-proBNP levels and EF, as well as the relation between the plasma levels of PACAP38-LI and EF. Several studies investigated the relationship between NT-proBNP and EF. Our results showed a significant ( $p = 0.021$ ) negative correlation ( $r = -0.39$ ) between the two examined factors by the patients.

We did not find any remarkable differences between the results of primary ( $r = -0.4$ ) and ischemic ( $r = -0.386$ ) DCM groups. In contrast to these results, notable differences were detected between the primary and ischemic DCM groups regarding the correlation between PACAP38-LI levels and EF. In the primary group, no correlation ( $r = 0.05$ ) was found between PACAP38-LI and EF. On the other hand, a positive tendency with a weak positive correlation ( $r = 0.306$ ) was



**Fig. 2** The line of linear regression between serum PACAP38-LI and serum NT-proBNP levels in the first group (mild HF — NT-proBNP < 500 pg/ml, NYHA I) of patients with ischemic DCM

### Ischemic DCM – group 2., NT-proBNP: 500-3000 pg/ml



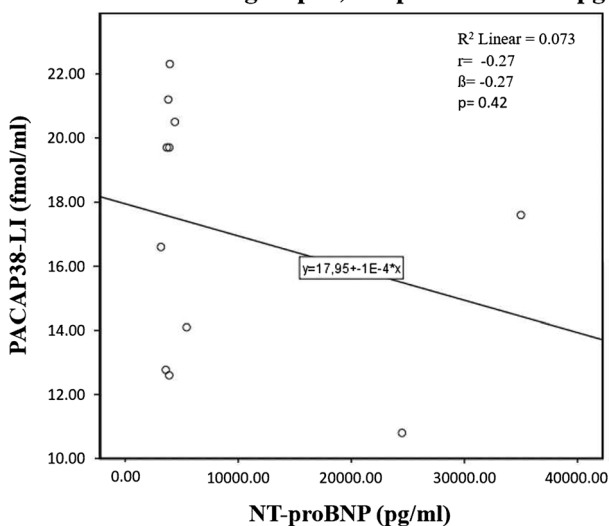
**Fig. 3** The linear regression line describes the relationship between serum PACAP38-LI and serum NT-proBNP levels in the second group (moderate HF — NT-proBNP = 500–3000 pg/ml, NYHA II–III) of patients with ischemic DCM

shown between PACAP38-LI and EF in the ischemic group with no statistical difference ( $p = 0.128$ ).

## Discussion

In the present experiment, we have proven that blood PACAP level significantly changes in heart failure and it shows correlation with EF and NT-proBNP suggesting its possible prognostic and diagnostic value, as a potential biomarker, in cardiovascular disorders.

### Ischemic DCM – group 3., NT-proBNP > 3000 pg/ml



**Fig. 4** The line of linear regression between serum PACAP38-LI and serum NT-proBNP levels in the third group (severe HF — NT-proBNP > 3000 pg/ml, NYHA III-IV) of patients with ischemic DCM

In the last few years, a lot of studies have investigated the diagnostic potential of biomarkers in cardiovascular diseases (Duffy and Hameed 2015). International recommendations highlight the clinical use of troponin, hs-CRP, and NT-proBNP (ESC Guideline 2016), but there are other new biomarker discoveries, e.g., microRNA (Lopez et al. 2015), apolipoprotein-E, and other lipid-based markers (LDL/HDL ratio, sphingolipids) (De Leon et al. 2015) in relation to these disorders. In the background of the intensive biomarker research is the fact that until today, there is no single cardiac biomarker available, which is absolutely specific to different conditions, or relevant both in diagnostics and prognostics. NT-proBNP is one of the most commonly used biomarkers in the clinical practice. This peptide helps to estimate the severity and the prognosis of HF as well as it is also important in the follow-up of the therapeutic efficiency (Yamamoto et al. 2000). However, several studies have shown that the sensitivity and specificity of NT-proBNP for the diagnosis are lower in non-acute cases (Kelder et al. 2011a, b; Santaguida et al. 2014). Furthermore, NT-proBNP alone is not efficient in making reliable diagnoses of HF, the clinical symptoms and echocardiographic results are also necessary (Kelder et al. 2011b).

The question arises whether PACAP may be a potential clinically useful predictor in apoptosis-based or ischemic-based cardiovascular diseases. Several effects of PACAP in the cardiovascular system are well-known; it has positive chronotropic, inotropic, and dromotropic effects (Farnham et al. 2011; Clason et al. 2016). The presence of PACAP and its receptors (PAC1, VPAC1, and VPAC2) has been demonstrated in the cardiac muscle of different animals (mice, rats, guinea pigs) (Chang et al. 2005; Ushiyama et al. 2006). PACAP receptors occur both in atrial and ventricular tissues of rats and humans (Wei and Mojsov 1996; Baron et al. 2001), similarly to mice, where Hoover and co-workers demonstrated that the expression of PACAP receptors' mRNA was uniform across chambers and sides of the mouse heart, and its expression was independent from the differences in chamber pressure (Hoover et al. 2013). All three PACAP receptors have been shown in isolated mouse atria, but only PAC1 receptors mediated positive chronotropic responses to PACAP27 and VIP. This mechanism is supported by the evidence that the PAC1 selective agonist maxadilan causes a tachycardia equivalent to that induced by PACAP. Furthermore, PACAP27 has a much higher potency than VIP for increasing heart frequency (Hoover et al. 2013).

We have also shown PAC1 receptors in human heart atria and detected that PACAP38-LI and PACAP27-LI are significantly higher in ischemic heart diseases compared with samples of patients with valvular heart disease (Szanto et al. 2012).

PACAP is present in preganglionic parasympathetic axons of vagal nerve innervating the cardiac ganglia of guinea pigs (Calupca et al. 2000), and it also occurs in intracardiac

ganglia of rat and cardiac ganglia of the mudpuppy (Schoenfeld et al. 2000; DeHaven and Cuevas 2002; Richardson et al. 2003). PAC1 receptors of cardiac cells could be activated by PACAP released from nerve fibers innervating the heart tissue or by circulating PACAP from an extrinsic source (Hoover et al. 2013). The source of circulating PACAP in the blood is not known exactly. The most probable sources are the nervous system and the endocrine glands such as adrenal gland, where PACAP occurs at high concentration (Lamouche and Yamaguchi 2003; Reglodi et al. 2016).

By virtue of previous studies, it is assumable that PACAP can affect the progression of cardiovascular diseases in which apoptosis plays an important role, e.g., heart failure or ischemic heart disease (Reglodi and Tamas 2016). Oxidative stress seems to be a major factor in the initiation as well as in the regulation of cardiomyocyte apoptosis in heart disorders. PACAP38 effectively protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. Caspase-3 activity was significantly lower and anti-apoptotic Bcl-2 and phospho-Bad expression were significantly higher due to administration of PACAP38 (Gasz et al. 2006a, b). The same anti-apoptotic effect was detected on endothelial cells where PACAP38 treatment significantly attenuated the increased activation of pro-apoptotic JNK and p38 MAP kinases in case of oxidative stress (Racz et al. 2007).

Based on these observations, in this study, we examined dilated cardiomyopathy, in which apoptosis plays an important etiological role (Gopal and Sam 2013). Some animal experiments have already proven that the mortality of doxorubicin-induced cardiomyopathy was significantly higher in PACAP knockout mice than in the wild type (Mori et al. 2010). Based on these observations PACAP has a protective effect against oxidative and ischemic damage; furthermore, it can be a potential new biomarker supporting the value of NT-proBNP.

The examination of serum PACAP and NT-proBNP levels did not reveal a correlation between them in the primary dilated cardiomyopathy group. On the other hand, a remarkable negative correlation was found in the ischemic dilated cardiomyopathy group. This difference is probably due to the distinct etiology. The cause of primary dilated cardiomyopathy is usually unknown, but ischemia is certainly excluded (Caobelli and Bengel 2015). Our results of ischemic dilated cardiomyopathy patients confirm the hypothesis about the potential protecting effect of PACAP against ischemic stress. We have demonstrated earlier that PACAP has protective effects against *in vitro* ischemia/reperfusion-induced apoptosis in cardiomyocytes (Roth et al. 2009). In the present study, we found a negative correlation between NT-proBNP and PACAP levels in ischemic dilated cardiomyopathy. The strongest relationship between PACAP and NT-proBNP was found in the mild HF group. That would be a beneficial virtue for a potential prognostic marker to detect the disease as early as

possible, since more therapeutic options are available in the early stages. Assuming that PACAP is a potential cardioprotective marker, the inverse proportion between the serum PACAP and NT-proBNP levels can be explained with genetically lower PACAP levels. In the lack of PACAP and its cardioprotective effects, the progression of heart failure can be more rapid and severe.

According to international guidelines, EF is one of the most reliable diagnostic and prognostic markers of HF-rEF (ESC Guideline 2016). Multicenter studies have shown strong relationship between EF, mortality, and morbidity. Unanimously with these results, our patients were selected based on EF. In the present research, we found a significant negative correlation between EF and NT-proBNP both in the primary and the ischemic dilated cardiomyopathy groups. This outcome is in accordance with studies on negative relation and an inverse proportion between these two factors. On the other hand, notable differences were detected between the primary and ischemic dilated cardiomyopathy groups by the examination of the correlation between PACAP levels and EF. In the primary dilated cardiomyopathy group, there was no correlation detected between the two examined markers. However, we found a weak, but positive correlation in the ischemic group. So, there may be a direct correlation between PACAP and EF. In these cases, we were not able to find significant results, which may be due to the measurement of EF. Although the Simpson method is a relatively precise echocardiographic procedure to determine EF (Dornberger et al. 2015), heart MRI diagnostic is the most accurate and valid method. The different outcomes of the patients with variable etiology confirm the earlier *in vitro* and animal experiments (Sano et al. 2002; Gasz et al. 2006a, b; Racz et al. 2007, 2010; Roth et al. 2009; Mori et al. 2010).

Similar to our research, there are some experiments which also found negative correlation between PACAP level of body fluids and the severity of different disorders. Han and co-workers (2014a, b) demonstrated that decreased PACAP level is associated with the severity of Alzheimer's disease: negative correlation was observed between PACAP levels and higher amyloid plaque scores in the entorhinal cortex and superior temporal gyrus. Furthermore, there was an inverse correlation between PACAP concentrations and the dementia rating scores in patients with Alzheimer's disease, suggesting that PACAP is not only decreased in Alzheimer's disease, but also indicates the severity of this pathology.

In multiple sclerosis, PACAP levels decrease in the cerebrospinal fluid (CSF), while plasma PACAP levels do not change (Baranowska-Bik et al. 2013). In other experiments, significantly lower PACAP levels are present in patients with hepatitis B, idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, and premature ovarian failure compared to healthy controls (Elefsiniotis et al. 2003; Kanasaki et al. 2013). On the other hand, there are even more clinical studies which found

significantly elevated PACAP level in pathological conditions, e.g., in posttraumatic stress syndrome (Ressler et al. 2011) and migraine (Tuka et al. 2013). After traumatic brain injury, PACAP concentrations significantly increase in both plasma and CSF in the majority of patients (Bukovics et al. 2014). In acute spontaneous basal ganglia hemorrhage PACAP proved oneself to be strong predictor of survival. Survival times after hemorrhage are significantly shorter in patients with high PACAP levels than those with low concentrations (Ma et al. 2015). After traumatic brain injury, presumably, the increased plasma PACAP levels may reflect an overproduction of PACAP as a pathological response to the loss of neural tissue in the central nervous system and it might be associated with the neuroprotective effects of the neuropeptide (Jiang et al. 2016).

## Conclusion

In this study, we found a direct relation between PACAP and EF, as well as an inverse proportion between PACAP and NT-proBNP. Therefore, the more severe heart failure was examined, the lower EF and the higher NT-proBNP levels were detected, and consistently, we found significantly lower PACAP values. Furthermore, remarkable differences were observed between the ischemic and non-ischemic heart failure suggesting that PACAP might play an important role in the pathomechanism and progression of ischemic heart failure.

**Acknowledgments** The authors thank all the volunteers.

**Funding** This work was supported by the following grants: National Research Development and Innovation Fund K119759, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “Pepsys,” EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, EFOP-3.6.2-16-2017-00009, EFOP-3.6.2-16-2017-00008, TAMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 National Excellence Program, UNKP-16-4-IV New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities, MTA TKI 14016 Program, and Bolyai Scholarship. The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pecs, Hungary.

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Alston EN, Parrish DC, Hasan W, Tharp K, Pahlmeyer L, Habecker BA (2011) Cardiac ischemia-reperfusion regulates sympathetic neuropeptide expression through gp130-dependent and independent mechanisms. *Neuropeptides* 45(1):33–42. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2010.10.002>
- Anversa P, Sonnenblick EH (1990) Ischemic cardiomyopathy: pathophysiological mechanisms. *Prog Cardiovasc Dis* 33(1):49–70. [https://doi.org/10.1016/0033-0620\(90\)900039-5](https://doi.org/10.1016/0033-0620(90)900039-5)
- Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129(5):2787–2789. <https://doi.org/10.1210/endo.129-5-2787>
- Baranowska-Bik A, Kochanowski J, Uchman D, Wolinska-Witort E, Kalisz M, Martynska L, Baranowska B, Bik W (2013) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in humans with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 263(1–2):159–161. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.08.012>
- Baron A, Monnier D, Roatti A, Baertschi AJ (2001) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide activates K(ATP) current in rat atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(3):H1058–H1065. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.3.H1058>
- Borzsei R, Mark L, Tamas A, Bagoly T, Bay C, Csanaky K, Banki E, Kiss P, Vaczy A, Horvath G, Nemeth J, Szauer E, Helyes Z, Reglodi D (2009) Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur J Endocrinol* 160(4):561–565. <https://doi.org/10.1530/EJE-08-0911>
- Bukovics P, Czeiter E, Amrein K, Kovacs N, Pal J, Tamas A, Bagoly T, Helyes Z, Buki A, Reglodi D (2014) Changes of PACAP level in cerebrospinal fluid and plasma of patients with severe traumatic brain injury. *Peptides* 60:18–22. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.07.001>
- Calupca MA, Vizzard MA, Parsons RL (2000) Origin of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-immunoreactive fibers innervating guinea pig parasympathetic cardiac ganglia. *J Comp Neurol* 423(1):26–39. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000717\)423:1<26::AID-CNE3>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000717)423:1<26::AID-CNE3>3.0.CO;2-C)
- Caobelli F, Bengel FM (2015) Ischaemic vs non-ischaemic dilated cardiomyopathy: the value of nuclear cardiology techniques. *J Nucl Cardiol* 22(5):971–974. <https://doi.org/10.1007/s12350-015-0128-1>
- Chang Y, Lawson LJ, Hancock JC, Hoover DB (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: localization and differential influence on isolated hearts from rats and guinea pigs. *Regul Pept* 129(1–3):139–146. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2005.02.012>
- Clason TA, Girard BM, May V, Parsons RL (2016) Activation of MEK/ERK signaling by PACAP in guinea pig cardiac neurons. *J Mol Neurosci* 59(2):309–316. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0766-z>
- De Leon H, Boue S, Szostak J, Peitsch MC, Hoeng J (2015) Systems biology research into cardiovascular disease: contributions of lipidomics-based approaches to biomarker discovery. *Curr Drug Discov Technol* 12(3):129–154. <https://doi.org/10.2174/1570163812666150702123319>
- DeHaven WI, Cuevas J (2002) Heterogeneity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat intrinsic cardiac neurons. *Neurosci Lett* 328(1):45–49. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00445-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00445-7)
- Dornberger V, Dittrich HD, Busch R (2015) Echocardiographic evaluation of systolic left ventricular function in heart failure: value of alternative parameters for determination of ejection fraction. *Herz* 40(2):185–193. <https://doi.org/10.1007/s00059-015-4205-7>
- Duffy JY, Hameed AB (2015) Cardiovascular disease screening. *Semin Perinatol* 39(4):264–267. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2015.05.004>
- Elefsiniotis IS, Ketikoglou I, Kafiri G, Pantazis KD, Moulakakis A, Mavrogiannis C (2003) Plasma pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) levels in chronic hepatitis B patients under lamivudine treatment. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15(11):1209–1216. <https://doi.org/10.1097/01.meg.0000085489.12407.bd>
- Eneman B, Freson K, van den Heuvel L, van Hoyweghen E, Collard L, Vande Walle J, van Geet C, Levtschenko E (2015) Pituitary adenylate



- cyclase-activating polypeptide deficiency associated with increased platelet count and aggregability in nephrotic syndrome. *J Thromb Haemost* 13(5):755–767. <https://doi.org/10.1111/jth.12891>
- ESC Guideline for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure (2016) *Heart Journal*
- Farnham MM, Inglott MA, Pilowsky PM (2011) Intrathecal PACAP-38 causes increases in sympathetic nerve activity and heart rate but not blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300(1):H214–H222. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00662.2010>
- Gasz B, Racz B, Roth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamas A, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Toth G, Lengvari I, Reglodi D (2006a) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 27(1):87–94. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.06.022>
- Gasz B, Racz B, Roth E, Borsiczky B, Tamas A, Boronkai A, Gallyas F Jr, Toth G, Reglodi D (2006b) PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1070(1):293–297. <https://doi.org/10.1196/annals.1317.029>
- Gopal DM, Sam F (2013) New and emerging biomarkers in left ventricular systolic dysfunction—insight into dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res* 6(4):516–527. <https://doi.org/10.1007/s12265-013-9462-3>
- Han P, Liang W, Baxter LC, Yin J, Tang Z, Beach TG, Caselli RJ, Reiman EM, Shi J (2014a) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is reduced in Alzheimer disease. *Neurology* 82(19):1724–1728. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000417>
- Han P, Tang Z, Yin J, Maalouf M, Beach TG, Reiman EM, Shi J (2014b) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects against  $\beta$ -amyloid toxicity. *Neurobiol Aging* 35(9):2064–2071. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.022>
- Hoover DB, Girard BM, Hoover JL, Parsons RL (2013) PAC<sub>1</sub> receptors mediate positive chronotropic responses to PACAP-27 and VIP in isolated mouse atria. *Eur J Pharmacol* 713(1–3):25–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.037>
- Jakab B, Reglodi D, Jozsa R, Hollosy I, Tamas A, Lubics A, Lengvari I, Oroszi G, Szilvassy Z, Szolcsanyi J, Nemeth J (2004) Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Methods* 61(1–2):189–198. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.03.002>
- Jiang L, Wang WH, Dong XQ, Yu WH, Du Q, Yang DB, Wang H, Shen YF (2016) The change of plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide levels after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol Scand* 197(1–2):35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.03.002>
- Kanasaki H, Purwana IN, Oride A, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Miyazaki K (2013) Circulating kisspeptin and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) do not correlate with gonadotropin serum levels. *Gynecol Endocrinol* 29(6):583–587. <https://doi.org/10.3109/09513590.2013.788624>
- Kelder JC, Cramer MJ, Verweij WM, Grobbee DE, Hoes AW (2011a) Clinical utility of three B-type natriuretic peptide assays for the initial diagnostic assessment of new slow-onset heart failure. *J Card Fail* 17(9):729–734. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2011.04.013>
- Kelder JC, Cowie MR, McDonagh TA, Hardman SM, Grobbee DE, Cost B, Hoes AW (2011b) Quantifying the added value of BNP in suspected heart failure in general practice: an individual patient data meta-analysis. *Heart* 97(12):959–963. <https://doi.org/10.1136/hrt.2010.220426>
- Lamouche S, Yamaguchi N (2003) PACAP release from the canine adrenal gland in vivo: its functional role in severe hypotension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284(2):R588–R597. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00466.2002>
- Lenti L, Domoki F, Kis D, Hegyi O, Toth GK, Busija DW, Bari F (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces pial arteriolar vasodilation through cyclooxygenase-dependent and independent mechanisms in newborn pigs. *Brain Res* 1165:81–88. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.032>
- Lopez JP, Diallo A, Cruceanu C, Fiori LM, Laboissiere S, Guillet I, Fontaine J, Ragoussis J, Benes V, Turecki G, Ernst C (2015) Biomarker discovery: quantification of microRNAs and other small non-coding RNAs using next generation sequencing. *BMC Med Genet* 8(1):35. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0109-x>
- Ma BQ, Zhang M, Ba L (2015) Plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide concentrations and mortality after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Clin Chim Acta* 439:102–106. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.010>
- Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB (2006) American Heart Association, Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee, Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups, Council on Epidemiology and Prevention. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 113(14):1807–1816. doi: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287>
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A et al (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 33(14):1787–1847. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs104>
- Merriam LA, Roman CW, Baran CN, Girard BM, May V, Parsons RL (2012) Pretreatment with nonselective cationic channel inhibitors blunts the PACAP-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. *J Mol Neurosci* 48(3):721–729. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9763-z>
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164(1):567–574. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91757-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91757-9)
- Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A, Endo K, Iso Y, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S (2010) Cardioprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Circ J* 74(6):1183–1190. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-09-1024>
- Otto C, Hein L, Brede M, Jahns R, Engelhardt S, Grone HJ, Schutz G (2004) Pulmonary hypertension and right heart failure in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *Circulation* 110(20):3245–3251. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000147235.53360.59>
- Racz B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamas A, Jozsa R, Lubics A, Kiss P, Roth E, Ferencz A, Toth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvari I, Somogyvari-Vigh A, Reglodi D (2007) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol* 153(1–3):115–123. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.12.006>
- Racz B, Reglodi D, Horvath G, Szigeti A, Balatonyi B, Roth E, Weber G, Alotti N, Toth G, Gasz B (2010) Protective effect of PACAP against

- doxorubicin-induced cell death in cardiomyocyte culture. *J Mol Neurosci* 42(3):419–427. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9349-6>
- Reglodi D, Tamas A (2016) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide — PACAP. Springer, Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3>
- Reglodi D, Gyarmati J, Ertl T, Borzsei R, Bodis J, Tamas A, Kiss P, Csanaky K, Banki E, Bay C, Nemeth J, Helyes Z (2010) Alterations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *J Endocrinol Investig* 33(7):443–445. <https://doi.org/10.1007/BF03346621>
- Reglodi D, Helyes Z, Nemeth J, Vass R, Tamas A (2016) PACAP as a potential biomarker—alterations of PACAP levels in human physiological and pathological conditions. In: Reglodi D, Tamas A (eds) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide — PACAP. Springer, Switzerland, pp 815–832. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3\\_48](https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_48)
- Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, Norrholm SD, Kilaru V, Smith AK, Myers AJ, Ramirez M, Engel A, Hammack SE, Toufexis D, Braas KM, Binder EM, May V (2011) Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature* 470(7335):492–497. <https://doi.org/10.1038/nature09856>
- Richardson RJ, Grkovic I, Anderson CR (2003) Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tissue Res* 314(3):337–350. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0805-2>
- Roth E, Weber G, Kiss P, Horvath G, Toth G, Gasz B, Ferencz A, Gallyas F Jr, Reglodi D, Racz B (2009) Effects of PACAP and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1163(1):512–516. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03635.x>
- Sano H, Miyata A, Horio T, Nishikimi T, Matsuo H, Kangawa K (2002) The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cultured rat cardiocytes as a cardioprotective factor. *Regul Pept* 109(1–3):107–113. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00193-3](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00193-3)
- Santaguida PL, Don-Wauchope AC, Oremus M, McKelvie R, Ali U, Hill SA, Booth RA, Brown JA, Bustamam A, Sohel N, Raina P (2014) BNP and NT-proBNP as prognostic markers in persons with acute decompensated heart failure: a systematic review. *Heart Fail Rev* 19(4):453–470. <https://doi.org/10.1007/s10741-014-9442-y>
- Schoenfeld LK, Souder JA, Hardwick JC (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide innervation of the mudpuppy cardiac ganglion. *Brain Res* 882(1–2):180–190. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02885-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02885-7)
- Subramaniam V, Chuang G, Xia H, Bum B, Bradley J, Maderdrut JL, Coy DH, Varner KJ (2017) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects against mitoxantrone-induced cardiac injury in mice. *Peptides* 95:25–32. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.07.007>
- Szanto Z, Sarszegi Z, Reglodi D, Nemeth J, Szabadfi K, Kiss P, Varga A, Banki E, Csanaky K, Gaszner B, Pinter O, Szalai Z, Tamas A (2012) PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J Mol Neurosci* 48(3):667–673. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9815-4>
- Tuka B, Helyes Z, Markovics A, Bagoly T, Szolcsanyi J, Szabo N, Toth E, Kincses ZT, Vecsei L, Tajti J (2013) Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia* 33(13):1085–1095. <https://doi.org/10.1177/0333102413483931>
- Ushiyama M, Sugawara H, Inoue K, Kangawa K, Yamada K, Miyata A (2006) Characterization of the PAC1 variants expressed in the mouse heart. *Ann N Y Acad Sci* 1070(1):586–590. <https://doi.org/10.1196/annals.1317.086>
- Vamos Z, Ivic I, Cseplo P, Toth G, Tamas A, Reglodi D, Koller A (2014) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induces relaxations of peripheral and cerebral arteries, which are differentially impaired by aging. *J Mol Neurosci* 54(3):535–542. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0349-9>
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61(3):283–357. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>
- Wei Y, Mojsov S (1996) Multiple human receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide are expressed in a tissue-specific manner. *Ann N Y Acad Sci* 805:624–627
- Yamamoto K, Burnett JC, Bermudez EA, Jougasaki M, Bailey KR, Redfield MM (2000) Clinical criteria and biochemical markers for the detection of systolic dysfunction. *J Card Fail* 6(3):194–200. <https://doi.org/10.1057/jcaf.2000.9676>



# A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) hatása a kardiovaszkuláris rendszerre

Szabó Dóra<sup>1,3</sup>, Szántó Zalán<sup>2</sup>, Jüngling Adél<sup>3</sup>, Polgár Beáta<sup>4</sup>, Reglődi Dóra<sup>3</sup>, Cziráki Attila<sup>1</sup>, Tamás Andrea<sup>3\*</sup>, Sárszegi Zsolt<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ, <sup>1</sup>Szívgyógyászati Klinika, <sup>2</sup>Sebészeti Klinika, Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, <sup>3</sup>Anatómiai Intézet, MTA-PTE PACAP Munkacsoport, <sup>4</sup>Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézet, Pécs

Levelezési cím:

Dr. Szabó Dóra, e-mail: dora0szabo@gmail.com

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) egy multifunkcionális peptid, amelynek neuroprotektív, antiapoptotikus, antioxidáns, citoprotektív és kardioprotektív hatása van. Ismert, hogy a PACAP kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásának közvetlen mediálásában a PACAP-receptoroknak van kiemelt szerepe. Az elmúlt évek kutatásai sikeresen azonosították a PAC1-receptor jelenlétét cardiomyocita sejt kultúrákban és a szívizomzatban, továbbá igazolták a receptor mRNS-ének expresszióját egér szívizomszövetben. Kutatócsoportunk humán jobb pitvari fülcsében mutatta ki a PAC1-receptor jelenlétét immunhisztokémiai módszerrel. In vitro és in vivo funkcionális tesztekben bizonyították a PACAP iszkémiás károsodással szembeni védőhatását; az oxidatív stressz-indukálta károsodásokra fókuszáló vizsgálatokban pedig mind az endogén PACAP-termelés, mind az exogén PACAP-kezelés apoptózist gátló, kardioprotektív hatását igazolták. Munkacsoportunk legutóbbi vizsgálata során arra kereste a választ, hogy a PACAP miként befolyásolja a humán kardiovaszkuláris kórképek lefolyását. Kutatásunkban iszkémiás szívbetegéknél magasabb plazma PACAP-szintet detektáltunk a billentyűbeteghez képest. Szívelégtelenségben szenvedő iszkémiás és primer dilatatív cardiomyopathiás (DCM) betegek plazma PACAP-szintjének vizsgálatakor jelentős különbségeket találtunk az iszkémiás és nem iszkémiás szívelégtelenek között. Az iszkémiás DCM súlyossága és a plazma PACAP-szintek közötti szignifikáns negatív kapcsolat alapján feltételezhető, hogy a PACAP fontos szerepet tölt be a betegség patomechanizmusában és progressziójában, így a jövőben potenciális kardiológiai biomarkerré is válhat.

**Kulcsszavak:** PACAP, szívelégtelenség, DCM, apoptózis, iszkémia

## Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the cardiovascular system

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is a multifunctional peptide having neuroprotective, antiapoptotic, antioxidant, cytoprotective and cardioprotective effects. It is well known that PACAP has a direct influence on the cardiovascular system and its effects are mediated by their receptors. Latest studies have successfully shown the presence of PAC1 receptor in cardiomyocyte cell cultures and in heart muscle sections, furthermore, the expression of its mRNA was also detected in mouse heart tissue samples. Moreover, the PAC1 receptor was also identified by our research group in human right atrium with immunohistochemistry. Different in vitro and in vivo functional researches confirmed the protective effects of PACAP against ischemic events. The studies focusing on the oxidative stress-induced damages verified the cardioprotective theory and showed that both endogenous PACAP production and exogenous PACAP treatment led to decreased apoptosis of heart muscle cells. The aim of our recent studies was to examine the influence of PACAP on the progression of human cardiovascular diseases. We found significantly higher PACAP levels in heart tissue samples of patients with ischemic heart disorder compared to valvular abnormalities. Remarkable differences were detected between the plasma PACAP levels in ischemic and primary dilated cardiomyopathy. Our study group observed significant negative correlation between the severity of ischemic heart failure and the plasma PACAP levels suggesting that PACAP might play an important role in the pathomechanism and progression of ischemic heart failure and it might be a potential biomarker of cardiac diseases in the future.

**Keywords:** PACAP, heart failure, DCM, apoptosis, ischemia

\*Mindkét szerző egyenlő mértékben járult hozzá a munkához.

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) egy multifunkcionális neuropeptid, amelyet 1989-ben birka hypothalamusból izoláltak a hypophysisben kifejtett adenilát-cikláz aktiváló hatása alapján (1). A vasoaktív intesztinális peptid (VIP) (szekretin) glukagon peptidcsalád tagja, két aktív formája ismert, egy 27 (PACAP-27), és egy 38 (PACAP-38) aminosavból felépülő izoforma, amelyek 10-90%-os arányban fordulnak elő. Három különböző receptora ismert, a specifikus PAC1-receptor valamint a VIP-pel közös VPAC1-, és VPAC2-receptorok (2). Számos hatást képes kifejteni, mint a vazodilatátor, antiapoptotikus, antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásai, és ezeken keresztül kifejtett neuroprotektív, neurotrofikus, általános citoprotektív, anyagcserét és az endokrin rendszert befolyásoló hatásokat. A PACAP legnagyobb koncentrációban az idegrendszerben és az endokrin mirigyekben fordul elő, így elsőként neuroprotektív, neurotrofikus és az endokrin rendszerre kifejtett hatásait vizsgálták, azonban később számos más területen is indultak kutatások (3).

### PACAP receptor expresszió vizsgálata a kardiovaszkuláris rendszerben

Az a megfigyelés, hogy direkt PACAP-infúzió tachycardizáló hatással bír felvetette a kérdést, hogy képes-e a PACAP közvetlen hatást kifejteni a kardiovaszkuláris rendszerre (4). Cardiomyocytá sejt kultúrában domináns PAC1-receptor expressziót mutattak ki (5). Továbbá számos állatkísérlet vizsgálta a PACAP és receptoraik jelenlétét a szívizomzatban. Tengerimalacban kimutatták a PACAP szelektív PAC1-receptorokat az intrakardiális neuronokban, később pedig izolált cardiomyocytákban is (6). Egér myocardiumban a PAC1-receptor molekuláris variánsait kutatták, valamint izolált egér pitvarban igazolták a PAC1-receptor jelenlétét, és vizsgálták receptor-mediálta hatásait (7, 8). További patkányvizsgálatok igazolták, hogy a PACAP-receptorok nemcsak a pitvarban, hanem kamrai szívizomzatban is jelen vannak (9). Hoover és munkatársai kimutatták a PAC1-receptor mRNS-ét egér szívből, továbbá nem találtak szignifikáns különbséget a receptor expresszióban a pitvari vagy kamrai, illetve bal vagy jobb

szívfélből származó minták között. Ugyanezen vizsgálat bizonyította, hogy a receptorok expressziója független a nyomásviszonyok változásától (8). Bár az előbb említett állatkísérletek eredményei támogatták azt a feltevést, miszerint a PACAP képes közvetlen hatást kifejteni a kardiovaszkuláris rendszerre, azonban napjainkban csak nagyon kevés humán adat áll a rendelkezésünkre a PACAP direkt kardiális hatásait illetően. Elsőként izolált humán miokardiális trabekulákból sikerült kimutatni mindhárom PACAP-receptor mRNS-ét. Nemcsak pitvari, hanem bal kamrából származó mintákat is vizsgáltak, és mindkét esetben jelentős receptor-specifikus mRNS-expressziót detektáltak (10). Molekuláris bizonyítékkal rendelkezünk már arról, hogy a cardiomyocyták expresszálják a PACAP-receptorokat, azonban pontos elhelyezkedésükről keveset tudunk. A PAC1-receptor pontosabb feltérképezésére kutatócsoportunk iszkémiás szívbetege vagy billentyűbetegség miatt extracorporalis keringéses szívműtétre kerülő betegek szívizommintáját vizsgálta. A mintákból, amelyek a szív-tüdő motor kanulálásának megfelelően a jobb pitvari fülcséből származtak, hematoxin-eozin festett metszeteket készítettünk, továbbá ezekkel paralel metszetekből PAC1-receptor immunhisztokémiát végeztünk. Míg az immunfluoreszcens jelölés kimutatta a PAC1-receptor jelenlétét a szívizomsejteken, az endokardiális kötőszövetben nem találtunk PAC1-receptor expressziót (11). Mindezen eredmények igazolták, hogy a cardiomyocyták jelentős PAC1-receptor expressziót mutatnak, amely receptorokat a szívizomzatot innerváló idegvégződésekből felszabadult vagy az extrinsic forrásokból származó keringésben cirkuláló PACAP képes aktiválni (8). Farmakológiai és mRNS-vizsgálatokkal is detektálták a PACAP-receptorok jelenlétét patkányok meningeális és cerebrális artériáiban egyaránt (12). Nemcsak állatkísérletes, hanem humán farmakológiai receptor-karakterizáció is történt, amelynek során meningeális artériákon, továbbá koronáriákon is igazolták a PACAP-receptorok expresszióját (13). A vérben keringő PACAP eredete pontosan nem ismert, azonban legvalószínűbb forrásnak az idegrendszert és az endokrin mirigyeket tekinthetjük, ahol a legmagasabb koncentrációban mutatták ki a PACAP jelenlétét (14).

#### Rövidítésék

Bad = Bcl-2 család tagja – apoptózis regulátor (Bcl-2-associated death promoter); Bax = Bcl-2 család tagja – X-protein; Bcl-2 = B-cell lymphoma 2 – apoptózis regulátor; Bcl-xL = B-cell lymphoma extra large – apoptózis regulátor; COX= ciklooxigenáz DCM = dilatatív cardiomyopathia; EF = ejekciós frakció; HFrEF = csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség; hsCRP = hiperszenzitív C-reaktív protein; JNK = c-Jun N-terminális kináz; LAD = left anterior descending artery – a bal koronária elülső leszálló ága; mRNS: messenger (hírvívő) ribonukleinsav; NT-proBNP = B-típusú nátriuretikus peptid N-terminális pro-hormonja; NYHA-stádiumok = New York Heart Association által létrehozott – a szívelégtelenség klinikai tünetek alapján történő súlyossági beosztás: NYHA I.: a fizikai állapot nem korlátozott, NYHA II.: enyhe korlátozottság, fizikai aktivitásra dyspnoe, anginás fájdalom, NYHA III.: jelentős korlátozottság, enyhébb fizikai aktivitás is súlyos tüneteket provokál, de nyugalomban tünetmentes, NYHA IV.: a legkisebb fizikai aktivitás is tünetekkel jár, valamint nyugalomban is jelen vannak, orthopnoe; p38 MAPK = p38 mitogén-aktivált protein-kináz; PACAP = hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid; PACAP-27 = hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid 27 aminosavból felépülő formája; PACAP-38 = hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid 38 aminosavból felépülő formája; PACAP-38-LI = PACAP-38-szerű immunoreaktivitás; PAC1 receptor = PACAP 1. típusú receptora; RIA = radioimmunoassay; ROS = reaktív oxigén szabadgyökök; VIP = vasoaktív intesztinális peptid; VPAC1 receptor= vasoaktív intesztinális peptid receptor1; VPAC2 receptor= vasoaktív intesztinális peptid receptor2

## PACAP hatásai a vaszkuláris rendszerre

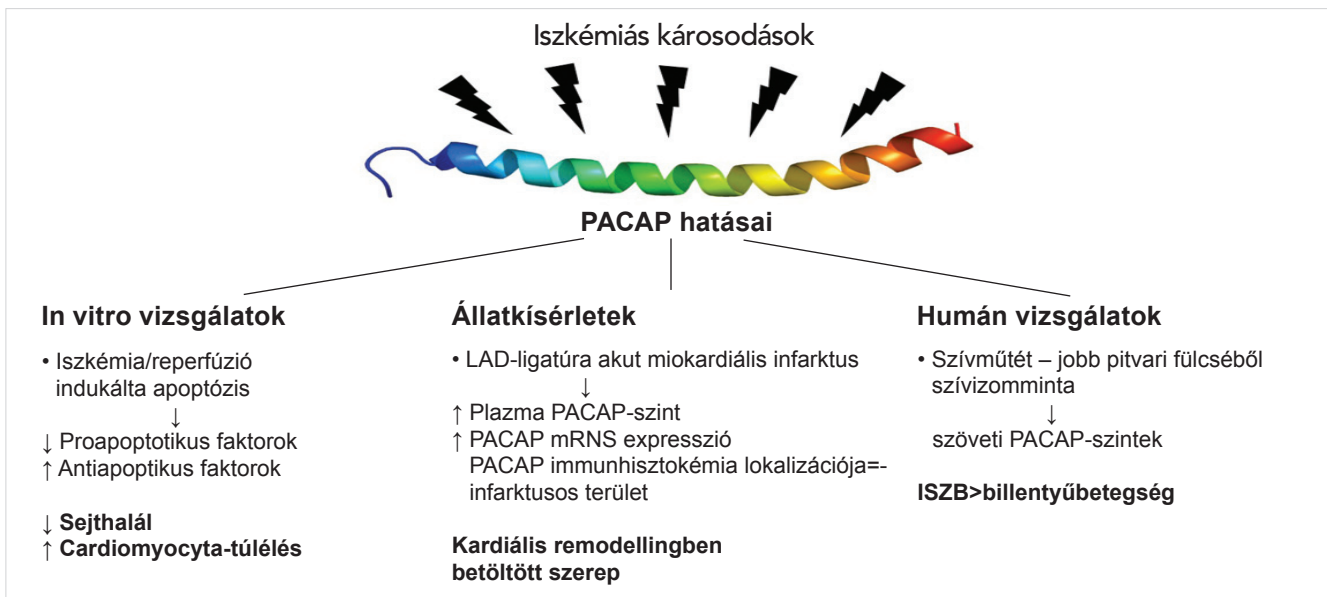
A PACAP potenciálisan vazodilatátor funkcióját többféle állatkísérletes modellen vizsgálták. Tekintettel az idegrendszerben kimutatott magas PACAP-koncentrációra kezdetben a cerebrovaszkuláris rendszer került a kutatások középpontjába. Újszülött sertéseken kimutatták a pia materben futó arteriolák vazodilatációját PACAP-27 és 38 kezelést követően, amely hatást két különböző mechanizmussal képes kifejteni: egy ciklooxygenáz (COX) függő, és egy COX független útvonalon keresztül (15). Emellett patkánymodellben is sikeresen kimutatták a PACAP vazodilatátor funkcióját cerebrális és meningeális artériákon egyaránt (12, 16). Így ez a polipeptid neuroprotektív hatását a cerebrovaszkuláris erek tágításán keresztül is képes kifejteni, csökkentve ezzel az esetleges agyi iszkémia súlyos szövődményeit. A PACAP erős vazodilatátor tulajdonsága miatt szerepet játszhat a migrén indukciójában. Szignifikánsan magasabb plazma PACAP-szinteket mértek migrénes egyéneknél az iktális periódusban a rohammentes időszakhoz képest. Továbbá negatív korrelációt találtak a migrénes roham időtartama és a plazma PACAP-koncentráció között (17), valamint migrénes pácienseknél sumatriptan infúziót követően jelentős PACAP-szint csökkenés volt megfigyelhető (18, 19). Mindezek alapján kifejlesztettek egy speciális PAC1-receptor antitestet (AMG 301), mint potenciális migrén ellenes gyógyszer, amelyet jelenleg 2. fázis klinikai vizsgálatokban tanulmányoznak (20).

Nemcsak a centrális, hanem a perifériás ereken is vizsgálták a PACAP vazodilatátor effektusát. Kutatócsoportunk korábban patkány carotis és basilaris érpreparátumok vizsgálata alapján megállapította, hogy a PACAP feltehetőleg nagyobb hatással bír a centrális artériákon a perifériásokhoz képest, továbbá ezen vazodilatátor hatása korfüggő és szövetspecifikus (21). Ugyanakkor PACAP-deficiens egerek carotis és femoralis artériájában exogén PACAP és VIP indukálta relaxáció vizsgálatának során a PACAP-deficiens egereknél szignifikánsan nagyobb mértékű relaxációt detektáltak miográffal a vad típushoz képest. Míg PACAP-antagonista adásakor teljesen megszűnt a relaxáció (22). Mindezen eredmények alapján feltételezhető, hogy az általunk vizsgált polipeptid fontos fiziológiai szerepet játszik a vaszkuláris tónus kialakításában.

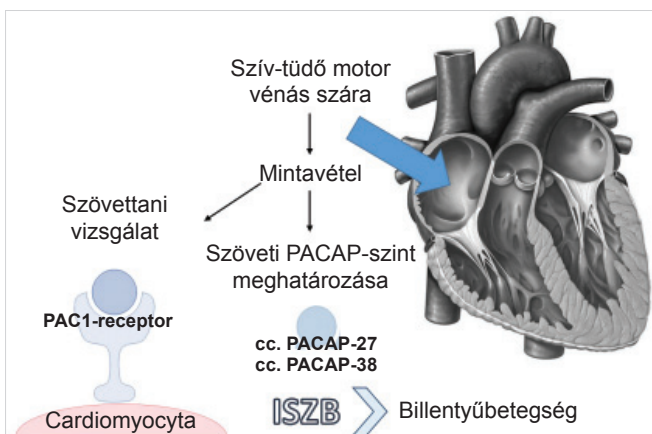
Mind a centrális, mind a perifériás ereken kifejtett értágító hatás felveti annak lehetőségét, hogy a PACAP esetleg akár a koronáriákon is képes vazodilatátor hatást kifejteni. Ezt a feltevést támasztja alá a PACAP-receptorok jelenléte a koronáriák simaizomzatában (13), valamint az az állatkísérlet, amelynek során újszülött sertésszíveket vizsgálva intravénásan adott PACAP-38 hatására koronária vazodilatációt tapasztaltak (23). Sőt, humán koronária simaizomsejteken is kimutatták a K(ATP) és K(Ca) csatornákon keresztül kifejtett PACAP-indukálta vazodilatációt (24).

## PACAP hatása az iszkémiás károsodással szemben

Számos tanulmány vizsgálta már a PACAP kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásait, s ezen eredmények bizonyították, hogy a PACAP pozitív chronotrop, inotrop (4, 25) és dromotrop hatásokkal bír, potens vazodilatátor (21), továbbá antiapoptotikus és antioxidáns hatásain keresztül a különböző káros effektusokkal szemben (iszkémia, oxidatív stressz) kardioprotektív szerepe van. Kutatócsoportunk izolált cardiomyocytá sejt kultúrán iszkémia/reperfúziós károsodás okozta apoptózissal szembeni PACAP védőhatást mutatott ki. Hatvan perces iszkémia, majd 120 perces reperfúziót követően PACAP-kezelés hatására csökkent sejthalált, fokozott cardiomyocytá túlélést detektáltunk. Mindezen hatását a különböző proapoptotikus faktorok gátlása (Bad, kaszpáz-3), illetve antiapoptotikus utak (Bcl-xL) serkentése révén fejtette ki protektív hatását az általunk vizsgált polipeptid (26). További kutatások a PACAP-kezelés és a prekondicionálás védő hatását vizsgálták iszkémia/reperfúzió-indukálta cardiomyocytá apoptózisban. Mindkét esetben szignifikánsan emelkedett sejttúlélést és jelentős kardioprotektív hatást tapasztaltak, azonban a két módszer hatása nem bizonyult additívnek (27). Továbbá *Alston és munkatársai* iszkémia/reperfúzió modellben szignifikánsan magasabb PACAP-értékeket, illetve magasabb PACAP mRNS-expressziót detektáltak egerek LAD-ligatúrával létrehozott mesterséges akut miokardiális infarktusa után. Valamint immunhisztokémiai módszerekkel kimutatták a PACAP-38 immunreaktivitás lokalizációját a károsodott szívizomzatban, amely pontosan megfelelt az infarktusos területnek. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a PACAP fontos szerepet tölthet be a kardiális és neuronális remodellingben ischaemia/reperfúziós károsodást követően (28). Az in vitro és állatkísérletes eredmények alapján – amelyek a PACAP iszkémiás károsodásokkal szemben kifejtett kardioprotektív hatását igazolták – felmerül a kérdés, hogy milyen szerepe lehet az általunk vizsgált neuropeptidnek a humán kardiovaszkuláris kórképekben (1. ábra). Kutatócsoportunk humán pitvari fülcséből származó mintákban szignifikánsan magasabb PACAP-38 és PACAP-27 szinteket detektált az iszkémiás szívbetegyeknél a billentyűbetegekhez képest (11), amely eredmények szintén alátámasztják a PACAP iszkémiás károsodással szemben kifejtett védőhatásának elméletét (1., 2. ábra). Tekintettel arra, hogy mintáink a jobb pitvari fülcséből származtak, olyan betegeket válogattunk be vizsgálatunkba, akik ismert pitvari patológiával (pl. pitvarfibrilláció) nem rendelkeztek, ezzel is kizárva az esetleges befolyásoló tényezőket. Számos állatkísérlet bizonyította, hogy a PAC1-receptor expressziója független a szívüregekben mérhető nyomásviszonyoktól, továbbá a pitvarok és kamrák és a jobb – bal szívfél között sem találtak érdemi különbséget (8, 9). Így fel-



1. ÁBRA. A PACAP iszkémiás károsodásokkal szemben kifejtett védőhatásainak összefoglalása az eddigi irodalmi adatok – in vitro vizsgálatok, állatkísérletes modellek és humán vizsgálatok eredményei – alapján



2. ÁBRA. Extracorporalis keringésű szívműtét során gyűjtött humán szívizomminták vizsgálatának összefoglaló ábrája. Szöveti vizsgálatok során kimutatták a PAC1-receptorok jelenlétét a cardiomyocyták felszínén. Továbbá radioimmunoassay módszerrel meghatároztuk a szívizomminták szöveti PACAP szintjét, amelynek során iszkémiás szívbetegknél (ISZB) szignifikánsan magasabb PACAP-szinteket detektáltunk a billentyűbeteghez képest

tételezhető, hogy a szöveti PACAP-szinteket sem befolyásolják ezen tényezők, ugyan erre konkrét bizonyítékunk nincs.

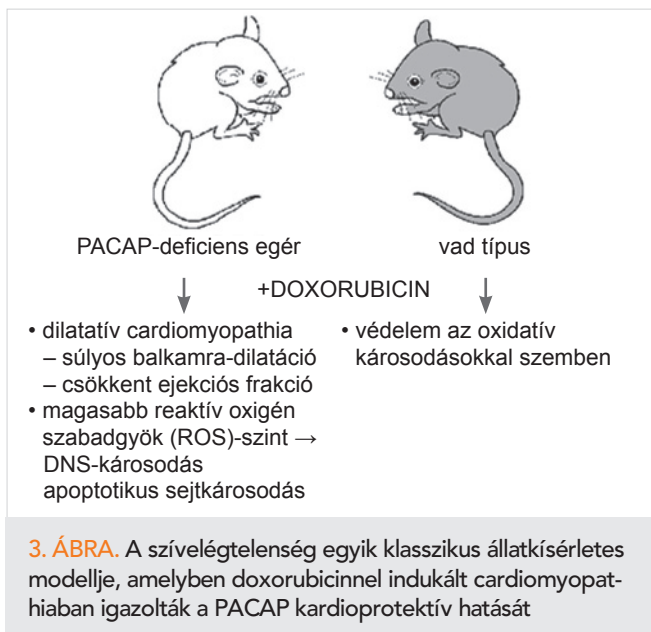
### PACAP kardioprotektív hatása szívelégtelenségben

A PACAP kardioprotektív hatását először Sano és munkatársai 2002-ben vetették fel, amikor igazolták, hogy a PACAP fibroblasztokban szelektíven gátolja a DNS és protein szintézisét, és ezáltal csökkenti a mi-

okardiális fibrózist, ugyanakkor miokardiális sejteken ilyen hatást nem fejt ki (5). Korábbi tanulmányok eredményei alapján feltételezhető, hogy a PACAP elsősorban olyan kardiovaszkuláris kórképek progressziójára képes hatást kifejteni, amelyek kialakulásában az oxidatív stressz és az apoptózis fontos szerepet játszik, mint pl. a szívelégtelenség vagy az iszkémiás szívbetegség (3). Irodalmi adatok szerint a PACAP-38 effektíven védi a cardiomyocytákat az oxidatív stressz által okozott apoptózistól. Ezen hatását izolált sejt kultúrán bizonyították, ahol PACAP-kezelés hatására szignifikánsan alacsonyabb kaspáz-3 aktivitás, valamint szignifikánsan magasabb antiapoptotikus Bcl-2 és foszfo-Bad expresszió volt megfigyelhető (29, 30). Ugyanezt az antiapoptotikus hatást endotheliális sejteken is kimutatták, ahol PACAP-38 kezelés szignifikánsan csökkentette a proapoptotikus JNK és p38 MAP-kináz aktivitását oxidatív stressz hatásban (31).

A doxorubicin által okozott kardiotoxicitás patofiziológiai alapja a mitokondriális antiapoptotikus útvonalak szuppressziója és a proapoptotikus bax és kaspáz-3 útvonalak fokozott expressziója (32). A szívizomsejteken megtalálható PAC1-receptoron keresztül PACAP hatására a Bax és kaspáz-3 útvonalak inaktivációja következik be, amely végső soron kardioprotektív hatást eredményez a doxorubicin kardiotoxikus hatásával szemben.

A szívelégtelenség egyik klasszikus állatkísérletes modelljében, doxorubicinnel indukált cardiomyopathiában vizsgálták a PACAP hatását a betegség progressziójára. PACAP-deficiens (heterozigóta és homozigóta) egerekben a doxorubicin által indukált szívelégtelenség súlyosabb lefolyású volt, mint a vad típusban. A PACAP-deficiens egereknél echokardiográfiával sokkal súlyosabb balkamra-dilatáció és szignifikánsan alacsonyabb



nyabb szisztolés balkamra-funkció ábrázolódott, valamint mortalitásuk is jelentősen magasabbnak bizonyult a vad egerekhez képest. PACAP hiányában szignifikánsan magasabb – a patofiziológiai folyamatban jelentős szerepet játszó – reaktív oxigén-szinteket, s ennek következtében sokkal súlyosabb DNS-károsodást, illetve apoptotikus sejtkárosodást detektáltak a vad típusú egerekhez képest. Ezek alapján feltételezhető, hogy az endogén PACAP-nak kardioprotektív hatása van a doxorubicin indukálta szívelégtelenségben. Ugyanabban a modellben intraperitoneálisan adott exogén PACAP a heterozigóta PACAP-deficiens egerekben csökkentette az elektronmikroszkóppal kimutatható miofibrilláris károsodást a placebo kezeléshez képest, bár az oxidatív stressz és túlélés tekintetében nem eredményezett szignifikáns javulást (32) (3. ábra). Egy hasonló citosztatikummal végzett másik vizsgálatban igazolták, hogy a PACAP véd a mitoxandron kardiotoxikus hatásával szemben (33). *Otto és munkatársai* PAC1-receptor-deficiens egerekben pulmonalis hipertóniát és jobb szívfél elégtelenséget találtak (34).

Az in vitro és állatkísérletes eredmények alapján – amelyek a PACAP kardioprotektív hatását igazolták – felmerül a kérdés, hogy milyen szerepe lehet az endogén PACAP-nak a humán kardiovaszkuláris kórképek lefolyásában? Az alapvető kutatási eredmények alapján kutatócsoportunk szívelégtelen betegek vizsgálata során kereste a választ arra a kérdésre, hogy vajon a szívelégtelenség súlyosságát jelző paraméterek és az endogén PACAP mennyisége között található-e ok-okozati összefüggés; a magasabb szérum PACAP-szint lehet-e prediktora a jobb prognózisnak?

A csökkent szisztolés balkamra-funkcióval járó szívelégtelenség (HFrEF) progressziójának becslésére a klinikai gyakorlatban az echokardiográfia, a szív MR-vizsgálat és különböző biomarkerek állnak rendelkezésünkre.

Számos biomarkert vizsgáltak már a szívelégtelenséggel kapcsolatban, mint a magas szenzitivitású C-reaktív protein (hs-CRP), troponin-T és a kreatinin-kináz (35). Legmegbízhatóbb markernek azonban a B-típusú nátriuretikus peptid N-terminális prohormonja (NT-proBNP) bizonyult, habár ennek a vizsgálómódszernek is vannak limitációi, különösen nem akut esetekben (36). A klinikai tapasztalat azt mutatja, hogy hasonló NT-proBNP-szinttel rendelkező szívelégtelen betegek ugyanarra a gyógyszeres terápiára különbözőképpen reagálnak. Ennek hátterében nyilvánvalóan az áll, hogy számos faktor befolyásolja a betegség progresszióját. Az eddigi PACAP-pal kapcsolatos kutatási eredmények alapján feltételezhető, hogy a PACAP hatással van a szívelégtelenség prognózisára. Ennek a kérdésnek a tisztázására megvizsgáltuk, hogy a plazma PACAP-szintek, NT-proBNP-szintek, illetve a szisztolés balkamra-funkció mutatnak-e összefüggést szívelégtelenségben. Vizsgálatunkban a csökkent szisztolés balkamra-funkcióval járó szívelégtelenség (HF-rEF) két jól definiált, gyakori formáját, a primer és az iszkémiás dilatatív cardiomyopathiás (DCM) betegcsoportot választottuk, amely betegség etiológiai tényezői között az apoptózis fontos szerepet játszik.

Kutatásunk során 42 beteg (35 férfi, átlagéletkor  $64,4 \pm 5,66$  év) perifériás vénás vérmintáját vizsgáltuk, akik primer ( $n=9$ ) vagy iszkémiás ( $n=33$ ) dilatatív cardiomyopathia miatt álltak gondozásunk alatt. Betegeinket szisztolés balkamra-funkciójuk alapján válogattuk be vizsgálatunkba ( $EF < 40\%$ ), amelyet Simpson-módszerrel (37) határoztuk meg. Pácienseink 73,4%-a hipertónia, 40,5%-a diabetes mellitus miatt állt kezelés alatt. Korrelációs analízis nem mutatott szignifikáns összefüggést a PACAP-szintek valamint a nem, kor, hipertónia, diabetes mellitus és számos rutin laboratóriumi paraméter között. Tehát a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően mi is bizonyítottuk, hogy ezen tényezők nincsenek befolyással a PACAP-szintekre (4). A plazma PACAP-38-szerű immunoreaktivitás (PACAP-38-LI) meghatározása radioimmunoassay (RIA) módszerrel történt. Az iszkémiás DCM-csoportba tartozó betegeket további három alcsoportra bontottuk a szívelégtelenség súlyosságának megfelelően, a klinikai tünetek és a plazma NT-proBNP-szintek alapján. Így elkülönítettünk egy enyhe ( $n=6$ , NT-proBNP  $< 500$  pg/ml, I. fokú a New York-i Társaság [NYHA I-II.] funkcionális klasszifikációja alapján), egy közepesen súlyos ( $n=16$ , NT-proBNP =  $500-3000$  pg/ml, NYHA III.) és egy súlyos ( $n=11$ , NT-proBNP  $> 3000$  pg/ml, NYHA IV.) szívelégtelen csoportot. A NYHA klasszifikációt a tünetek súlyosságának megítélésére használtuk. Bár a legújabb kutatások azt mutatják, hogy a tünetek súlyossága kevéssé korrelál a szisztolés balkamra-funkcióval, azonban egyértelmű kapcsolat látható a tünetek súlyossága és a túlélés, valamint a hospitalizáció gyakorisága között (35, 38). A primer DCM-csoportban a PACAP-38-LI és NT-proBNP plazmaszintek között nem találtunk korrelációt.

Dilatatív cardiomyopathia (DCM)			
	Primer DCM	Iszkémiás DCM	
• PACAP-NT-proBNP	Nincs összefüggés	1. enyhe HF 2. közepesen súlyos HF 3. súlyos HF	erős kp. erős gyenge } <b>negatív korreláció</b>
• NT-proBNP – EF	Negatív korreláció	Negatív korreláció	
• PACAP – EF	Nincs összefüggés	<b>Pozitív tendencia</b>	

**4. ÁBRA.** Szívelégtelenség (HF) – dilatatív cardiomyopathia miatt gondozásunk alatt álló betegek vizsgálatának során detektált plazma PACAP-, NT-proBNP-szintek és ejekciós frakciós (EF) értékek közötti összefüggések összefoglaló táblázata

Ezzel szemben szignifikáns negatív korrelációt detektáltunk a plazma PACAP-38-LI és NT-proBNP-szintek között az iszkémiás betegcsoportban. Enyhe és közepesen súlyos szívelégtelen csoportunkban erős, illetve közepesen erős szignifikáns negatív korrelációt találtunk a két vizsgált faktor között. A harmadik csoportba tartozó súlyos szívelégtelenségben szenvedő betegeinknél valamivel gyengébb negatív korreláció volt. Az ejekciós frakció és NT-proBNP-értékek között mindkét betegcsoportban szignifikáns negatív korrelációt találtunk, a két alcsoport között érdemi különbség nem volt. Ezzel szemben a plazma PACAP-38-LI-szintek és EF kapcsolatának vizsgálatakor jelentős eltérést detektáltunk a két különböző etiológiájú szívelégtelen csoport között. Míg a primer DCM-es betegcsoportban nem találtunk összefüggést a két vizsgált paraméter között, addig az iszkémiás DCM-csoportban pozitív tendencia, egy gyenge pozitív korreláció volt a PACAP-szintek és az EF között (39) (4. ábra). Ez a megfigyelés is alátámasztja a PACAP jelentős iszkémiás károsodással szemben kifejtett védő hatásának szerepét.

### Következtetések

Összefoglalva, vizsgálatunkban bebizonyítottuk, hogy a plazma PACAP-szintek szignifikánsan változnak szívelégtelenségben, továbbá összefüggést mutatnak az NT-proBNP-szintekkel és az ejekciós frakcióval. A szívelégtelenség és a magasabb plazma PACAP-szintek közötti ok-okozati összefüggés további vizsgálata feltétlenül szükséges. Nem tisztázott, hogy a szívelégtelenség kialakulása, különösen iszkémiás szívbetegség talaján, milyen szignál útján vált ki a központi idegrendszerben vagy az endokrin rendszerben a fokozott PACAP-termelést? Egy további tisztázandó kérdés, hogy ez az emelkedett endogén PACAP-szint gyakorol-e védő hatást a még életképes szívizomsejtekre, és vajon lassítja-e a szívelégtelenség progresszióját? Jövőbeni célunk az általunk vizsgált betegpopuláció kibővítése, hosszú távú követéses vizsgálat elvégzése repetitív plazma PACAP-szint meghatározásokkal, és ezek alapján lenne megválaszolható a kérdés, hogy lehet-e a plazma PACAP-szint a szívelég-

telenség progressziójának prediktora. Végül az sem tisztázott, hogy az endogén PACAP-termelés vajon fokozható-e valamilyen módon vagy exogén PACAP-bevitellel lassítható-e a szívelégtelenség progressziója és védhető-e a szívizomzat az iszkémiás károsodásokkal szemben?

### Támogatások

NKFIH K119759; GINOP-2.3.2-15-2016-00050 „Pep-sys”; EFOP-3.6.1.-16-2016-00004; TAMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program; UNKP-16-4-IV Új Nemzeti Kiválóság Program; MTA TKI 14016 Program; Bolyai Ösztöndíj; EFOP-3.6.2-16-2017-00009.

### Irodalom

- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164(1): 567–74. doi: 10.1016/0006-291X(89)91757-9
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 2009; 61(3): 283–357. doi: 10.1124/pr.109.001370
- Reglodi D, Tamas A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide – PACAP. 1st ed. Switzerland: Springer; 2016.
- Farnham MM, Inglott MA, Pilowsky PM. Intrathecal PACAP-38 causes increases in sympathetic nerve activity and heart rate but not blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300(1): 214–22. doi: 10.1152/ajp-heart.00662.2010
- Sano H, Miyata A, Horio T, et al. The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cultured rat cardiocytes as a cardioprotective factor. *Regul Pept* 2002; 109(1–3): 107–13. doi: 10.1016/S0167-0115(02)00193-3
- Chang Y, Lawson LJ, Hancock JC, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: localization and differential influence on isolated hearts from rats and guinea pigs. *Regul Pept* 2005; 129(1–3): 139–46. doi: 10.1016/j.regpep.2005.02.012
- Ushiyama M, Sugawara H, Inoue K, et al. Characterization of the PAC1 variants expressed in the mouse heart. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070: 586–90.
- Hoover DB, Girard BM, Hoover JL, et al. PAC1 receptors mediate positive chronotropic responses to PACAP-27 and VIP in isolated mouse atria. *Eur J Pharmacol* 2013; 713(1–3): 25–30. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.04.037
- Wei Y, Mojsos S. Multiple human receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide are



- expressed in a tissue-specific manner. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 805: 624–7. doi: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb17531.x
10. Saetrum O, Knutsson M, De Vries R, et al. Vasoactive intestinal peptide has a direct positive inotropic effect on isolated human myocardial trabeculae. *Clinical Science* 2001; 101(6): 637–43. doi: 10.1042/cs1010637
11. Szanto Z, Sarszegi Z, Reglodi D, et al. PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J Mol Neurosci* 2012; 48(3): 667–73. doi: 10.1007/s12031-012-9815-4
12. Boni LJ, Plouj KB, Olesen J, et al. The in vivo effect of VIP, PACAP-38 and PACAP-27 and mRNA expression of their receptors in rat middle meningeal artery. *Cephalalgia* 2009; 29(8): 837–47. doi: 10.1111/j.1468-2982.2008.01807.x
13. Chan KY, Baun M, de Vries R, et al. Pharmacological characterization of VIP and PACAP receptors in the human meningeal and coronary artery. *Cephalalgia* 2011; 31(2): 181–9. doi: 10.1177/0333102410375624
14. Reglodi D, Helyes Zs, Nemeth J, et al. PACAP as a potential biomarker – alterations of PACAP levels in human physiological and pathological conditions. In: Reglodi D, Tamas A, editors. *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide – PACAP*, 1st ed. Switzerland: Springer; 2016. pp. 815–32. doi: 10.1007/978-3-319-35135-3\_48
15. Lenti L, Domoki F, Kis D, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces pial arteriolar vasodilatation through cyclooxygenase-dependent and independent mechanisms in newborn pigs. *Brain Research* 2007; 1165: 81–8.
16. Syed AU, Koide M, Braas KM, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) potently dilates middle meningeal arteries: implications for migraine. *J Mol Neurosci* 2012; 48(3): 574–83.
17. Tuka B, Helyes Z, Markovics A, et al. Alterations in PACAP38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia* 2013; 33: 1085–95.
18. Hansen JM, Fahrenkrug J, Petersen J, et al. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the circulation after sumatriptan. *Scand J Pain* 2013; 4: 211–6.
19. Zagami AS, Edvinsson L, Goadshy PJ. Pituitary cyclase activating polypeptide and migraine. *Ann Clin Transl Neurol* 2014; 1(12): 1036–40.
20. Reglodi D, Vaczy A, Rubio-Beltran E, et al. Protective effects of PACAP in ischemia. *J Headache Pain* 2018; 19(1): 19.
21. Vamos Z, Ivic I, Cseplo P, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induces relaxations of peripheral and cerebral arteries, which are differentially impaired by aging. *J Mol Neurosci* 2014; 54(3): 535–42.
22. Ivic I, Fulop BD, Juhasz T, et al. Backup mechanisms maintain PACAP/VIP-induced arterial relaxations in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-deficient mice. *J Vasc Res* 2017; 54(3): 180–92.
23. Ascuitto RJ, Ross-Ascuitto NT, Waddell AE, et al. Contractile and coronary vascular effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in neonatal pig hearts. *Cardiovasc Res* 1996; Spec No: E153–9.
24. Bruch I, Bychkov R, Kästner A, et al. Pituitary adenylate-cyclase-activating peptides relax human coronary arteries by activating K(ATP) and K(Ca) channels in smooth muscle cells. *J Vasc Res* 1997; 34(1): 11–8.
25. Clason TA, Girard BM, May V, et al. Activation of MEK/ERK signaling by PACAP in guinea pig cardiac neurons. *J Mol Neurosci* 2016; 59(2): 309–16.
26. Racz B, Gasz B, Gallyas F JR, et al. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul Pept* 2008; 145(1–3): 105–15.
27. Roth E, Weber G, Kiss P, et al. Effects of PACAP and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1163: 512–6.
28. Alston EN, Parrish DC, Hasan W, et al. Cardiac ischemia-reperfusion regulates sympathetic neuropeptide expression through gp130-dependent and independent mechanisms. *Neuropeptides* 2011; 45(1): 33–42.
29. Gasz B, Racz B, Roth E, et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 2006; 27(1): 87–94.
30. Gasz B, Racz B, Roth E, et al. PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070: 293–7.
31. Racz B, Gasz B, Borsiczky B, et al. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153(1–3): 115–23.
32. Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, et al. Cardioprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on Doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Circ J* 2010; 74(6): 1183–90.
33. Subramaniam V, Chuang G, Xia H, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects against mitoxantrone-induced cardiac injury in mice. *Peptides* 2017; 95: 25–32.
34. Otto C, Hein L, Brede M, et al. Pulmonary hypertension and right heart failure in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *Circulation* 2004; 110(20): 3245–51.
35. ESC Guideline for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Heart Journal* 2016.
36. Kelder JC, Cramer MJ, Verweij WM, et al. Clinical utility of three B-type natriuretic peptide assays for the initial diagnostic assessment of new slow-onset heart failure. *J Card Fail* 2011; 17(9): 729–34.
37. Dornberger V, Dittrich HD, Busch R. Echocardiographic evaluation of systolic left ventricular function in heart failure: value of alternative parameters for determination of ejection fraction. *2015 Herz* 40(2): 185–93.
38. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2012; 33(14): 1787–847.
39. Sarszegi Z, Szabo D, Gaszner B, et al. Examination of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) as a potential biomarker in heart failure patients. *J Mol Neurosci* 2018. In press. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-1025-7>.