

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) szerepének vizsgálata reprodukzív és patológiás folyamatokban

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Tóth Dénes

Témavezetők: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Dr. Tamás Andrea, egyetemi docens

Programvezető (Reprodukzív endokrinológia): Dr. Bódis József, egyetemi tanár

Doktori iskola vezetője (Klinikai orvostudományok): Dr. Bogár Lajos, egyetemi tanár



Pécsi Tudományegyetem, OGYDHT Pécs

Pécs, 2024

Tartalom

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	6
1.1. A HIPOFÍZIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP)	6
1.1.1. A PACAP és receptorai	6
1.1.2. A PACAP általános hatásai	9
1.1.3. PACAP, mint biomarker	10
1.2. MAGZATVÍZ DIAGNOSZTIKA	13
1.2.1. A magzatvíz	13
1.2.2. Praenatalis diagnosztika	14
1.2.3. A PACAP és humán reprodukció	16
1.3. A POLITRAUMA	19
1.3.1. A politrauma klinikuma	19
1.3.2. PACAP, trauma és immunhomeosztázis	22
1.4. A RETINOBLASTOMA	24
1.4.1. A retinoblastoma klinikopatológiája	24
1.4.2. A PACAP szemészeti vonatkozásai	27
1.4.3. A PACAP és daganatok	28
1.4.4. PACAP és retinoblastoma	30
2. CÉLKITŰZÉSEK	31
2.1. A MAGZATVÍZ VIZSGÁLATA	31
2.2. POLITRAUMATIZÁLT SZEMÉLYEK VIZSGÁLATA	31
2.3. A HUMÁN RETINOBLASTOMA VIZSGÁLATA	31
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32
3.1. A MAGZATVÍZ VIZSGÁLATA	32
3.1.1. Kutatásetikai háttér	32
3.1.2. Magzatvíz mintavétel	32
3.1.3. Radioimmuno-assay (RIA)	32
3.2. POLITRAUMATIZÁLT SZEMÉLYEK VIZSGÁLATA	35
3.2.1. Kutatásetikai háttér	35
3.2.2. A vizsgálat felépítése	35
3.2.3. Bevonási és kizárási kritériumok	35
3.2.4. Mérési módszerek	36
3.2.4.1. CRP és PCT	36
3.2.4.2. LAR	36
3.2.4.3. PACAP38	37
3.2.5. Statisztikai módszerek	37
3.3. A RETINOBLASTOMA VIZSGÁLATA	38
3.3.1. Humán vizsgálat	38
3.3.1.1. Kutatásetikai háttér	38
3.3.1.2. Mintagyűjtés	38
3.3.1.3. PACAP38 és PAC1 receptor immunhisztokémia	38
3.3.2. In vitro kísérlet	39
3.3.2.1. Sejtkultúra	39
3.3.2.2. A sejtek életképességének vizsgálata	39
3.3.2.3. Statisztikai módszerek	40
4. EREDMÉNYEK	41
4.1. A MAGZATVÍZ VIZSGÁLAT	41

4.2. POLITRAUMATIZÁLT SZEMÉLYEK VIZSGÁLATA.....	42
4.2.1. <i>Demográfiai és klinikai adatok</i>	42
4.2.2. <i>A laborparaméterek napi változása</i>	42
4.2.3. <i>A laborparaméterek korrelációi</i>	43
4.3. A RETINOBLASTOMA VIZSGÁLATA.....	46
4.3.1. <i>Demográfiai és klinikai adatok</i>	46
4.3.2. <i>PACAP38 és PAC1 receptor immunhisztokémia</i>	47
4.3.3. <i>In vitro kísérlet</i>	48
5. MEGBESZÉLÉS	50
5.1. A MAGZATVÍZ VIZSGÁLAT	50
5.2. POLITRAUMATIZÁLT SZEMÉLYEK VIZSGÁLATA.....	51
5.2.1. <i>A laborparaméterek kinetikájának vizsgálata</i>	51
5.2.2. <i>A laborparaméterek korrelációinak vizsgálata</i>	52
5.2.3. <i>Összegzés</i>	53
5.3. A RETINOBLASTOMA VIZSGÁLATA.....	54
5.3.1. <i>Humán vizsgálat</i>	54
5.3.2. <i>In vitro kísérlet</i>	55
5.3.3. <i>Összegzés</i>	56
6. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	57
7. IRODALOMJEGYZÉK	58
8. ÁBRA- ÉS TÁBLÁZATJEGYZÉK	84
9. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	85
9.1. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	85
9.2. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBA KÖZVETLENÜL NEM ILLESZTHETŐ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK	86
9.3. TUDOMÁNYMETRIAI TÁBLÁZAT	90
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	92

Rövidítések jegyzéke

AC	adenylate cyclase (adenilát-cikláz)
ACTH	adrenocorticotrop hormone (adrenocorticotrop hormon)
AJCC	American Joint Committee on Cancer (a ráktípusok stádiumainak meghatározásával foglalkozó amerikai bizottság)
AIS	Abbreviated Injury Scale (rövidített sérülési index)
AFP	alpha-fetoprotein (alfa-foetoprotein)
Akt	serine-threonine protein kináz B (protein kináz B)
ANOVA	analysis of variance (varianciaanalízis)
APACHE II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II (egy prognosztikai pontrendszer)
APTII	aktivált parciális tromboplasztin idő
ARF	adenosine diphosphate-ribosylation factor (adenozin-difoszfát-ribozilációs faktor)
ATLS	Advanced Trauma Life Support (súlyos sérültek primer ellátási protokollja)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (B-sejtes lymphoma protein 2)
BE	base excess (bázisfelesleg)
cAMP	cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (ciklikus 3',5'-adenozin-monofoszfát)
CARS	compensatory antiinflammatory response syndrome (kompenzatórikus antiinflammatoricus válasz szindróma)
CI	confidence interval (konfidencia-intervallum)
CRP	C-reactive protein (C-reaktív protein)
DAG	1,2-diacylglycerol (1,2-diacil-glicerol)
DAMP	damage-associated molecular pattern (sérülés asszociálta molekuláris mintázat)
DNS	deoxiribonukleinsav
DPPIV	dipeptidyl peptidase IV (dipeptidil-peptidáz-IV)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzimhez kötött immunszorbens assay)
ER	endoplazmatikus reticulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase (extracelluláris szignál-regulált kináz)
FBS	fetal bovine serum (magzati borjú szérum)
FSH	follicle-stimulating hormone (folliculus stimuláló hormon)
GCL	ganglion cell layer (ganglionsejtek rétege)
GCS	Glasgow Coma Scale (Glasgow-kómaskála)
GH	growth hormone (növekedési hormon)
GnRH	gonadotropin-releasing hormone (gonadotropin-releasing hormon)
hCG	human chorionic gonadotropin (humán korion-gonadotropin)
ICRB	Intraocular Classification of Retinoblastoma (retinoblastoma intraocularis osztályozása)
IIRC	International Intraocular Retinoblastoma Classification (nemzetközi intraocularis retinoblastoma osztályozási rendszer)
IL	interleukin
ILM	inner limiting membrane (belső határmembrán)
INL	inner nuclear layer (belső magvas réteg)
INR	international normalized ratio (nemzetközileg normalizált ráta)
IP3	inositol 1,4,5-trisphosphate (inozitol-1,4,5-triszfoszfát)
IPL	inner plexiform layer (belső rostos réteg)
IRSS	International Retinoblastoma Staging System (nemzetközi retinoblastoma stádiummeghatározó rendszer)
ISS	Injury Severity Score (sérülés súlyossági index)
JNK	c-jun N-terminal kinase (c-jun N-terminális kináz)

LAR	leukocyte antisedimentation rate (leukocytá antiszedimentációs ráta)
LH	luteinizing hormone (luteinizáló hormon)
MEK1/2	mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (mitogen-aktivált proteinkináz kináz 1/2)
Mib-1	molecular immunology borstel-1 (proliferációs marker)
MOF	multiple organ failure (többszervi elégtelenség)
mRNS	messenger (hírvívő) ribonukleinsav
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid)
MYCN	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog (v-myc madár myelocytomatosis virális onkogén neuroblastoma homológ)
NFL	nerve fibre layer (optikus rostok rétege)
NIPT	non-invasive prenatal testing (neminvazív praenatalis teszt)
NO	nitric oxide (nitrogén-monoxid)
NYHA	New York Heart Association (New York-i Kardiológus Társaság)
OLM	outer limiting membrane (külső határmembrán)
ONL	outer nuclear layer (külső magvas réteg)
OPL	outer plexiform layer (külső rostos réteg)
PAC1	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid 1-es típusú szelektív receptora)
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid)
PACAP27	a PACAP 27 aminosavból álló izoformája
PACAP38	a PACAP 38 aminosavból álló izoformája
PACAP38-LI	PACAP38-like immunoreactivity (PACAP38-szerű immunreaktivitás)
PAMP	pathogen-associated molecular pattern (patogén asszociálta molekuláris mintázat)
PAPP-A	pregnancy associated plasma protein-A (terhességgel összefüggő plazmafehérje-A)
PBS	phosphate-buffered saline (foszfát pufferelt sóoldat)
PCT	procalcitonin (prokalcitonin)
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase (foszfatidil-inozitol-3-kináz)
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát)
PKA	protein kinase A (proteinkináz-A)
PKC	protein kinase C (proteinkináz-C)
PL	photoreceptor layer (fotoreceptorok rétege)
PLC	phospholipase C (foszfolipáz-C)
PLD	phospholipase D (foszfolipáz-D)
PRL	prolactin (prolaktin)
RB1	retinoblastoma gene 1 (retinoblastoma-1 gén)
RIA	radioimmuno-assay (radioimmun analízis)
RPE	retinal pigment epithelium (retinalis pigmenthám)
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (súlyos akut légzőszervi szindrómát okozó koronavírus-2)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome (szisztémás gyulladáshoz vezető válasz szindróma)
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment (egy prognosztikai pontrendszer)
TNF-α	tumor necrosis factor-α (tumornekrózis faktor-α)
TNM	Tumor-Node-Metastasis (tumor-nyirokcsomó-metasztázis)
VIP	vasoactive intestinal polypeptide (vazoaktív intestinalis polipeptid)
VPAC1	vasoactive intestinal polypeptide receptor 1 (vazoaktív intestinalis polipeptid receptor 1)
VPAC2	vasoactive intestinal polypeptide receptor 2 (vazoaktív intestinalis polipeptid receptor 2)
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

1. Bevezetés

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

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide, PACAP) két biológiailag aktív formában fordul elő a szervezetben, melyek közül a 38 aminosavból álló izoformát (PACAP38) 1989-ben [Miyata és mtsai, 1989], a 27 aminosavból álló izoformát (PACAP27) egy évvel később fedezték fel [Miyata és mtsai, 1990]. Az öt exont tartalmazó humán PACAP gént először heréből izolálták [Kimura és mtsai, 1990]. A gén a 18. kromoszóma rövid karján (18p11.32) található, melyről 176 aminosav hosszúságú prepro-PACAP transzlálódik. A 38 és 27 aminosavas izoformák proteolitikus és amidációs lépéseket követően ebből a prekursorból képződnek egymástól független módon [Hosoya és mtsai, 1992]. Emlősökben a PACAP 90%-át a 38 aminosavból álló izoforma teszi ki [Arimura és mtsai, 1991]. A szekretin/glükagon/vazoaktív intestinalis polipeptid (vasoactive intestinal polypeptide: VIP) családhoz tartozó PACAP [Arimura, 1998] N-terminális aminosav-szekvenciája az evolúció során rendkívül konzerváltak bizonyult. Az emlősökben az aminosav szekvencia azonos, míg az egyéb gerincesekből izolált PACAP szerkezetében mindössze csupán 1-4 aminosav eltérés található, mely a peptid fontos élettani szerepét igazolja [Sherwood és mtsai, 2000; Vaudry és mtsai, 2009]. Habár a PACAP-ot először birka hypothalamusból izolálták, a későbbiek során jelenlétét számos humán és nem humán idegrendszeri és perifériás szervben/szövetben igazolták, mely széleskörű előfordulás a molekula alapvető élettani funkcióit bizonyítja [Vaudry és mtsai, 2009]. A VIP-hez való hasonlósága ellenére a PACAP attól eltérő eloszlást mutat a központi idegrendszer struktúráiban [Masuo és mtsai, 1992, 1993] és a perifériás szervekben/szövetekben, ugyanakkor gyakran közösen expresszálódnak a perifériás idegrendszer ugyanazon sejtjeiben [Sundler és mtsai, 1992].

1.1.1. A PACAP és receptorai

A PACAP a szervezetben hatását döntően specifikus transzmembrán receptorokon keresztül fejt ki, melyeknek hét transzmembrán, valamint egy G-protein kötő doménje van. Ugyanakkor a szakirodalmi adatokból ismert, hogy a PACAP receptor-independens módon is képes a sejtbe bejutni és ott további jelátviteli útvonalakat aktiválni [Doan és mtsai, 2012].

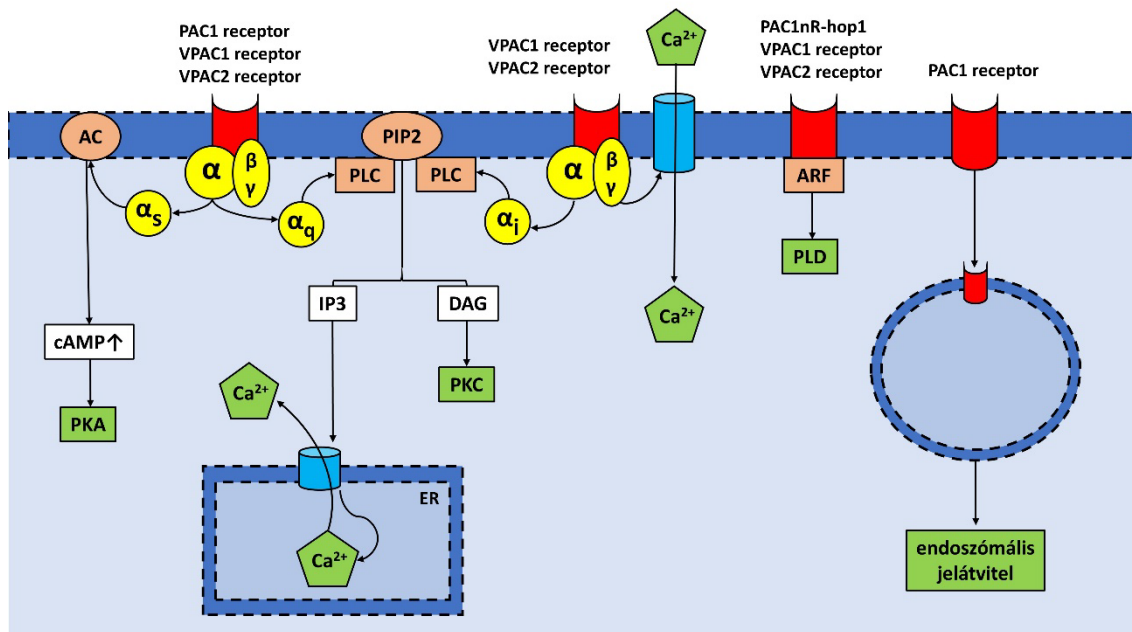
A PACAP receptorai G-proteinhez kapcsolt receptor családba tartoznak: a PACAP a VIP-vel azonos affinitást mutat a vazoaktív intestinalis peptid receptor 1 és 2 (VPAC1 és VPAC2 receptorok) tekintetében, míg 1-es típusú receptorához, a PAC1 receptorhoz, 1000-szer erősebb mértékben kötődik, mint a VIP [Vaudry és mtsai, 2009]. A PACAP N-terminális vége a receptor aktivációban játszik szerepet [Gourlet és mtsai, 1991], míg C-terminális vége a kötőhely felismerést segíti [Gourlet és mtsai, 1996]. A PACAP receptorok széles eloszlást mutatnak a szervezetben, a különböző receptorok más és más arányban vannak jelen bizonyos szervekben/szövetekben [Vaudry és mtsai, 2009]. A PACAP szerteágazó biológiai hatásaiért mindezekon túlmenően az alternatív splicing során kialakuló, jelenleg több, mint 20 különböző PAC1 receptor variáns is állhat. Ezek feloszthatók több alcsoportba a receptorfunkció érintettsége szerint. Az extracelluláris N-domén variánsai a ligandkötést és affinitást, a harmadik intracelluláris hurokba beépülő génkazetta variánsok az intracelluláris jelátvitelt, a transzmembrán domén variációi a receptor heteromerizációt és intracelluláris transzportfolyamatokat, míg az 5' nem transzlált régió variánsai a messenger ribonukleinsav (mRNS) expressziós dinamikáját befolyásolják [Blechman és Levkowitz, 2013; Langer és mtsai, 2022].

Mindhárom receptor esetén a ligandkötődést követően a G-protein α s alegységén keresztül aktiválódik az adenilát-cikláz (AC) és a ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) szintjének emelkedése jön létre, mely önmagában is számos fiziológiai hatásért felelős (például simaizom relaxáció, endokrin és elektrolit szekréció), valamint a proteinkináz-A (PKA) aktivációjához vezet, melynek fontos szerepe van a sejtek differenciációjában és plaszticitásuk modulációjában. A PKA jelátvitelen keresztül a sejtproliferációt serkentő extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) jelátviteli út is aktiválódhat (például prosztata-, colontumor sejtvonalak), valamint előfordulhat olyan sejtproliferációt serkentő cAMP/ERK jelátviteli út is, mely PKA-independens. A cAMP/PKA/ERK jelátvitel a sejt túléléshez is hozzájárul a kaszpáz-3 gátlása és az antiapoptotikus hatású Bcl-2 (B-sejtes lymphoma protein 2) serkentése révén. A PACAP antiinflammatoricus hatásának többsége is a PKA szignálon keresztül zajlik, mely a proinflammatoricus citokinek termelésének redukcióját és az antiinflammatoricus citokinek elválasztásának serkentését jelenti [Langer és mtsai, 2022; Lu és mtsai, 2022; Vaudry és mtsai, 2009].

Szintén mindhárom receptor esetében G-protein α q alegységén keresztül aktiválódhat a foszfolipáz-C (PLC), mely a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP2)

hasítása révén emeli a diacil-glicerol (DAG) és az inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP3) szinteket. A DAG a proteinkináz-C (PKC) aktivációjához vezet, míg az IP3 az intracelluláris kalciumszint emelkedését idéző elő az endoplazmatikus reticulumból felszabadított kalcium révén. A PAC1 receptor aktivációja kifejezetten ezen útvonalat érinti, míg a VPAC1 és VPAC2 receptorok PLC aktivációjához a G-protein α alegységén keresztül is van lehetőség. A VPAC2 receptor esetén az intracelluláris kalciumszint növekedésben szerepe van a G-protein $\beta\gamma$ dimerjének is, mely a sejtmembrán kalciumcsatornáinak megnyitása révén emeli az intracelluláris kalciumszintet. A PLC/kalcium jelátvitel aktiválódásával magyarázható többek között a PACAP sejt migrációt, neurotranszmittereket és neurohormonokat elválasztó, és bizonyos sejtek differenciációját segítő hatása [Langer és mtsai, 2022; Lu és mtsai, 2022; MacKenzie és mtsai, 2001; Vaudry és mtsai, 2009].

G-protein független hatásokról is vannak irodalmi adatok. A PAC1 receptor egyik splice variánsa (PAC1nR-hop1), valamint a VPAC receptorok aktivációja képes az ADP-ribozilációs faktor (ARF) stimulációja révén a foszfolipáz-D (PLD) szignálon keresztüli jelátviteli utakat aktiválni, ugyanakkor az ARF/PLD szignál kapcsán még kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre. Azt feltételezik, hogy ezen jelátviteli úton keresztül a PACAP-nak hatása van a fehérvérsejtek reaktív oxigén szabadgyök kibocsátásában, valamint az endocitózisban, sejten belüli transzportfolyamatokban és a sejt migrációban [McCulloch és mtsai, 2001]. A receptorhoz való kötődést követően a PAC1 receptor képes internalizálódni, míg VPAC receptorok esetén ilyen jelenséget nem írtak le. Az internalizáció következtében endoszómális jelátvitelen keresztül hosszabb távú ERK aktiváció is létrejöhet, valamint ismert az is, hogy a PAC1 receptor egyik splice variánsa (PAC1nR-hop1) az endoszómális foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) / Akt szignálon keresztül a neuronok túlélését segíti [May és mtsai, 2010, 2014]. A PAC1 receptor, valamint a VPAC1 és 2 receptorok eloszlása egy adott szöveten belül is nagymértékű variabilitást mutat és alternatív splicing során számos variáns is kialakulhat [Langer és mtsai, 2022; Vaudry és mtsai, 2009], továbbá a fentiekben vázolt kiterjedt jelátviteli útvonalak (1. ábra) aktivációja kellően magyarázza a PACAP pleiotrop hatását.

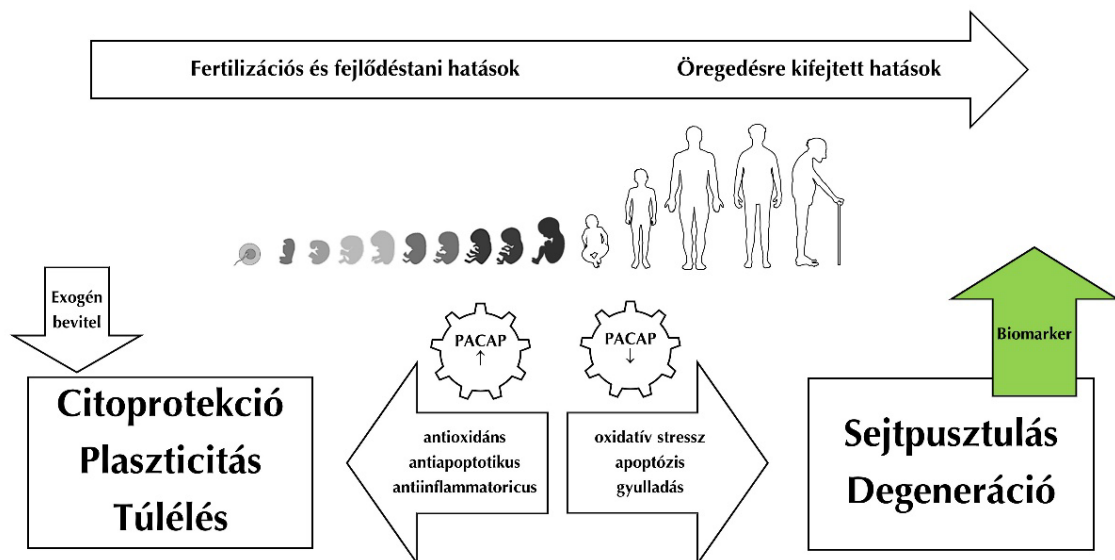


1. ábra. A PAC1 és VPAC receptorok aktivációjának főbb jelátviteli útvonalai (saját ábra). Rövidítések: AC: adenilát-cikláz; ARF: ADP-ribosilációs faktor; Ca²⁺: kalcium-ion; cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát; DAG: diacilglicerol; ER: endoplazmatikus reticulum; IP3: inozitol-1,4,5-triszfoszfát; PIP2: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát; PKA: proteinkináz-A; PKC: proteinkináz-C; PLC: foszfolipáz-C; PLD: foszfolipáz-D.

1.1.2. A PACAP általános hatásai

A PACAP a vérkeringésben néhány percig van aktív formában jelen, ezt követően rövidebb peptidekre bomlik a dipeptidil-peptidáz-IV (DPP-IV) hatása révén [Bourgault és mtsai, 2008; Zhu és mtsai, 2003]. A PACAP rövid felezési ideje ellenére szerteágazó biológiai hatásokkal bír; a felfedezését követően rövid időn belül számos in vitro és in vivo tanulmányban igazolták általános cito- és neuroprotektív hatásait, melyeket antiapoptotikus, antiinflammatoricus és antioxidáns tulajdonságai révén fejt ki. E hatásai nem csak a központi idegrendszer területén – ahol a legnagyobb mennyiségben fordul elő – figyelhetők meg, hanem a periférián is, ideértve a nem neurális szöveteket, szerveket is [Tóth és mtsai, 2020]. Számos idegrendszeri betegség (például Parkinson-kór, Huntington-chorea, egyéb neurodegeneratív betegségek, agyi ischaemia) in vivo modelljében az exogén PACAP kezelés protektív hatással bírt [Fang és mtsai, 2020; Reglődi és mtsai, 2011, 2018b; Shioda és mtsai, 2006; Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004; Vaudry és mtsai, 2009]. A PACAP-génkiütött egerek sérülés vagy negatív külső ingerek hatására nagyobb mértékű károsodást szenvednek el vad típusú társaikhoz viszonyítva, valamint a szervezetük számos területén kóros eltérést mutat [Abad és Tan, 2018; Farkas és mtsai, 2017; Fülöp és mtsai, 2019; Gray és mtsai, 2002; Józsa és mtsai, 2018, 2021; Reglődi és mtsai, 2018a; Szabadfi és mtsai, 2012].

A PACAP számos egyéb hatással is bír, mely filogenetikailag konzervált szerkezetéből, valamint szervezetben való széleskörű előfordulásából is adódik. Fertilizációs, reprodukív regulációs funkcióin túlmenően több élettani folyamatot szabályoz (például táplálkozás, hőszabályozás, stresszválasz, immunfolyamatok, mirigyműködések), illetve az öregedésben is fontos szerepe van [Reglódi és Tamás, 2016; Reglódi és mtsai, 2018a; Vaudry és mtsai, 2009]. A PACAP felfedezését követően rövid idővel intenzíven kutatott neuropeptiddé vált. Számos szakirodalmi adat áll rendelkezésre a PACAP koncentrációjának változásáról különböző emberi eredetű biológiai mintákban mind élettani, mind kóros folyamatokban, valamint egyre több tanulmány foglalkozik a PACAP38 biomarkerként való alkalmazásának lehetőségeivel [Reglódi és mtsai, 2016; Tóth D és mtsai, 2023]. A PACAP főbb hatásait a 2. ábra foglalja össze.



2. ábra. A PACAP főbb hatásainak sematikus összefoglalója (saját ábra). A PACAP az egyedfejlődés teljes hosszában fontos regulációs szereppel bír a fertilizációtól az öregedésig. A PACAP antiapoptotikus, antiinflammatoricus és antioxidáns tulajdonságai révén sejtvédő hatású, így exogén bevitel protektív hatással bír(hat), míg a PACAP hiánya, vagy endogén termelődésének csökkenése az ellenkező irányú folyamatok révén a sejtek degenerációjához, sejtpusztuláshoz vezet(het).

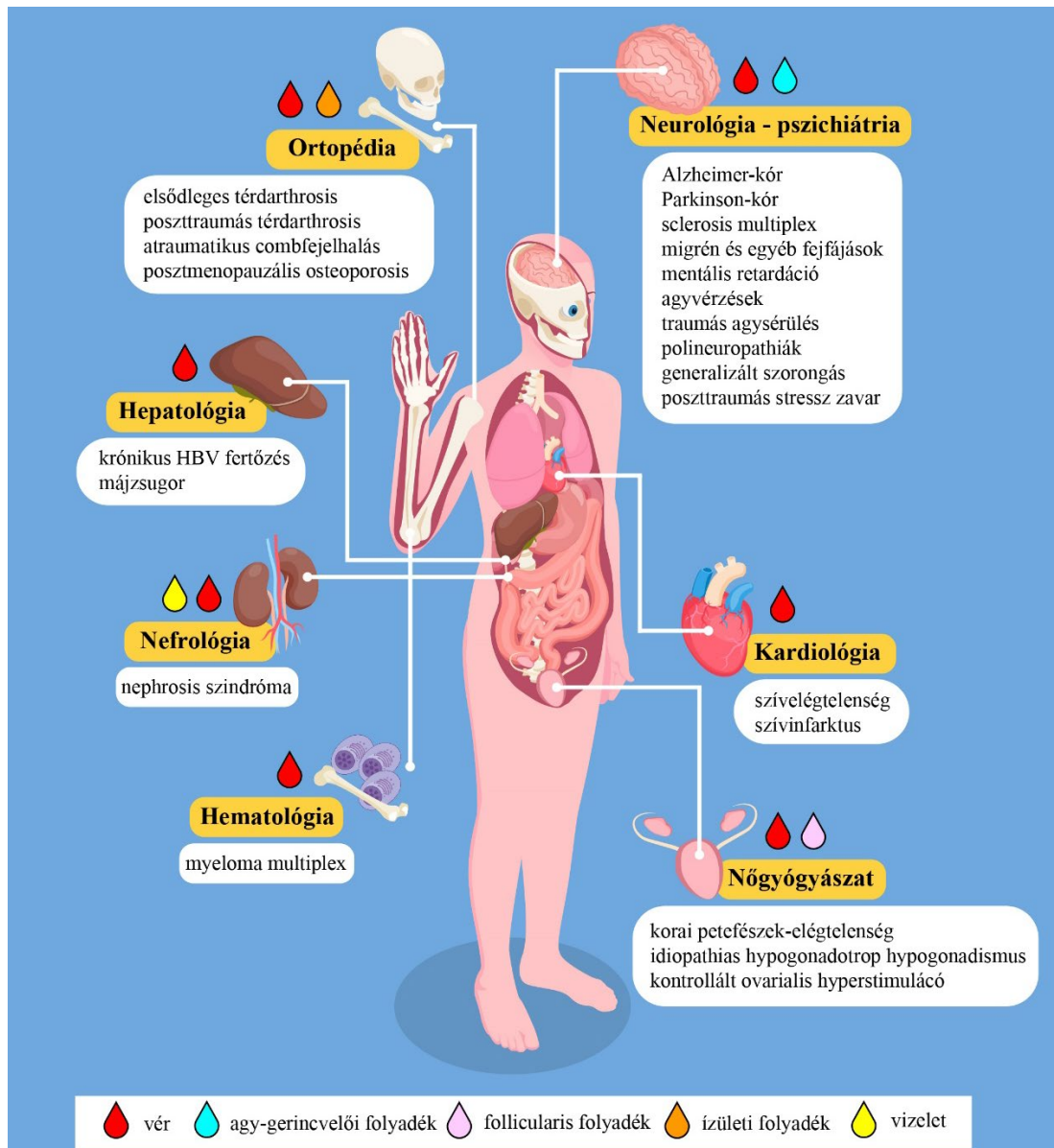
1.1.3. PACAP, mint biomarker

Az utóbbi évtizedben egyre több publikáció jelent meg, melyek a PACAP38 klinikai diagnosztikus vagy prognosztikus biomarker szerepét vizsgálták. A leggyakrabban vizsgált biológiai minta a vér, azonban vizsgálták már e célból az agy-gerincvelői folyadékot, ízületi folyadékot, follicularis folyadékot és a vizeletet is [Reglódi és mtsai, 2016; Tóth D és mtsai, 2023].

A PACAP legnagyobb koncentrációban az idegrendszer területén fordul elő [Arimura és mtsai, 1991], így nem meglepő, hogy a legintenzívebben kutatott kórképek közé tartoznak a neurológiai és pszichiátriai betegségek, így az Alzheimer-kór [Han és mtsai, 2014, 2015], Parkinson-kór [Han és mtsai, 2014; Hu és mtsai, 2021; Pham és mtsai, 2022], sclerosis multiplex [Al-Keilani és mtsai, 2022; Baranowska-Bik és mtsai, 2013], migrén és egyéb fejfájások [Cernuda-Morollón és mtsai, 2016; Eslami és mtsai, 2021; Hanci és mtsai, 2021; Pérez-Pereda és mtsai, 2020; Snoer és mtsai, 2019; Togha és mtsai, 2021; Tuka és mtsai, 2013, 2016; Veréb és mtsai 2018; Zagami és mtsai, 2014; Zhang és mtsai, 2019], agyvérzés [Jiang és mtsai, 2016; Ma és mtsai, 2015], traumás agysérülés [Bukovics és mtsai, 2014], mentális retardáció [Nelson és mtsai, 2001], generalizált szorongás [Ross és mtsai, 2020], poszttraumás stressz zavar [Ressler és mtsai, 2011] és különböző etiológiájú polineuropathiák [Yevgi és mtsai, 2023]. A cardiovascularis betegségek tekintetében munkacsoportunk különböző etiológiájú szívelégtelenségeket [Sárszegi és mtsai, 2019], krónikus és heveny szívelégtelenséget [Szabó és mtsai, 2022], valamint az ST-elevációval járó myocardialis infarctust [Szabó és mtsai, 2021] vizsgált. Az ortopéd-traumatológiai betegségek kapcsán egyre nagyobb számban jelennek meg publikációk, így vizsgálták már a primer térdízületi arthrosist [Sun Z P és mtsai, 2019], a poszttraumás térdízületi arthrosist [Sun B Y és mtsai, 2019], az atraumatikus combfejelhalást [Zhu H X és mtsai, 2020] és a posztmenopauzális osteoporosist [Zhu X X és mtsai, 2020] is. Egyéb betegségek kapcsán leírták a PACAP szintjének változását nephrosis szindrómában [Eneman és mtsai, 2015], májzsugorban [Yang és mtsai, 2021] és idült hepatitis-B-fertőzés [Elefsiniotis és mtsai, 2003] esetén. Munkacsoportunk myeloma multiplex [Tóth T és mtsai, 2023] és szuperovulációs kezelések [Koppán és mtsai, 2012] esetén is vizsgálta a PACAP38 szintek változását, valamint utóbbi, szülészeti-nőgyógyászati vonalon leírták még a PACAP38 koncentrációinak változását petefészek-elégtelenségben és idiopathias hypogonadotrop hypogonadismusban [Kanasaki és mtsai, 2013]. A súlyos akut légzőszervi szindrómát okozó koronavírus-2 (SARS-CoV-2) fertőzés esetén bár vizsgálták, nem találtak összefüggést a PACAP38 szintek és a betegség lefolyása között [Temerozo és mtsai, 2022].

A PACAP38 klinikai biomarkerként való hasznosítására vonatkozó kutatások csupán nemrég kezdődtek meg és számos kérdés megválaszolatlan, valamint egyelőre – kevés kivételtől eltekintve – kis elemszámú, néhány testfolyadékra korlátozódo tanulmányok érhetőek el. További nehézséget jelent, hogy a különböző kutatások

eredményeinek összehasonlíthatósága sem minden esetben lehetséges, azonban a jövőben e kutatási terület további rapid fejlődése várható, mely az egyre növekvő számú publikációkat (3. ábra) szem előtt tartva bizakodásra adhat okot.



3. ábra. A szakirodalomban fellelhető, testfolyadékokból kimutatott PACAP38-cal kapcsolatos humán vizsgálatok által érintett kórképek sematikus rajza (saját ábra). Az ábra egyes elemei macrovector/FreePik (<https://www.freepik.com>) felhasználásával készültek.

1.2. Magzatvíz diagnosztika

1.2.1. A magzatvíz

A magzatvíznek számos szerepe van a magzat egészségének védelmében és fejlődésének biztosításában. Egyrészt, fizikai-mechanikai védelmet nyújt a külső erőhatások ellen, másrészt a köldökzsinór mechanikai védelmét is ellátja azáltal, hogy megakadályozza annak magzat és a méhfal közötti kompresszióját. Védelmet nyújt a fertőzések ellen, valamint a magzati hőháztartás fenntartásában is fontos. A magzatvízben végzett magzati mozgások a vázizomrendszer fejlődéséhez is hozzájárulnak, valamint a magzatvíz lenyelése a tápcsatorna fejlődéséhez, aspirációja a tüdő fejlődésében nélkülözhetetlen. Mindezek mellett a magzatvíz folyadék- és tápanyagrezervként is szolgál [Fitzsimmons és Bajaj, 2022; Tong és mtsai, 2009].

A magzatvíz átlagos mennyisége viszonylag széles varianciát mutat még élettani várandósság alatt is, és mind mennyiségében, mind összetételében jellegzetes változásokat lehet megfigyelni a várandósság ideje alatt [Brace, 1997]. A magzatvíz mennyisége a gesztáció 10. hetében 25-30 ml, ezt követően a 15. hétig hetente 20-30 ml-rel, a 16-20. hetekben pedig hetente 50-100 ml-rel gyarapodik, majd a 34-38. héten éri el a maximális mennyiséget, ezt követően fokozatosan csökken; terminusban általában 800-1000 ml közötti [Papp, 1986]. A várandósság korai szakaszában a magzatvíz összetétele megegyezik az anyai és magzati plazmáéval, ami arra utal, hogy a magzatvíz transsudatum, mivel a még nem keratinizált magzati bőr nem akadályozza a folyadékok mozgását, és mintegy membránként működik. Ezért a várandósság korai szakaszában a magzatvíz a magzati sejtközi folyadék „kiterjesztéseként” tekinthető. A 8-10. gesztációs héttől a magzat vizelettermelésének megindulásával az összetétele kismértékben változik, valamint a magzati nyelőmozgások is megindulnak, azonban sem a magzati vizeletürítés, sem a nyelés nem járul jelentősen hozzá a magzatvíz összetételéhez vagy térfogatához addig, amíg a magzati bőr keratinizációja befejeződik (25. hét). Ekkor a magzatvíz ozmolaritása és elektrolit összetétele jelentősen megváltozik, valamint a magzatvíz mennyisége is rapidan emelkedni kezd [Huri és mtsai, 2023; Modena és Fieni, 2004; Tong és mtsai, 2009]. A várandósság késői szakaszában a magzatvíz két fő termelési forrása már a magzati vizeletürítés és a tüdőnedv kiválasztódása, míg a két fő eliminációs útja a nyelés és az intramembrán felszívódás (a folyadék és oldott anyagok visszaszívását jelenti az amnionzsákból a magzati vérbe az amnionon keresztül). A transzmembrán út

(víz és oldott anyagok mozgása az amnion és a chorion felületén keresztül az anyai vérbe) rendkívül kismértékű az intramembrán felszívódáshoz képest, valamint a magzati orr- és szájúregből származó váladékok a magzatvízben szintén elhanyagolható volument képeznek [Brace és Cheung, 2014; Huri és mtsai, 2023; Underwood és mtsai, 2005].

A magzatvíz biokémiai összetétele nem állandó, így az, a várandósság során dinamikusan és egyéni varianciákat mutatóan változik magzati patológia hiányában is [Liu és mtsai, 2019]. A magzatvíz szervesanyag tartalmának közel fele fehérjékből áll, a maradékot pedig szénhidrátok, lipidek, enzimek, hormonok, elektrolitok és egyéb anyagok teszik ki [Moore és Persaud, 2003]. A magzatvíz sejtes elemei kizárólag magzati eredetűek, azonban acelluláris részét tekintve szervesanyag tartalma anyai és magzati oldalról épül fel, így az abban fellelhető biomolekulák, többek között fehérjék, enzimek, nukleinsavak, metabolitok információval szolgálhatnak az anyai és magzati jóllétról, illetve kellő alapot nyújthatnak különböző fejlődési rendellenességek szűrésére, kórismézésére is [Hui és Bianchi, 2011; Li és mtsai, 2023; Tsangaris és mtsai, 2011].

1.2.2. Praenatalis diagnosztika

A praenatalis diagnosztika a klinikai genetika azon ága, amely magába foglalja mindazon módszereket és eljárásokat, amelyek segítségével az embrió, illetve a magzat genetikai állományáról információt nyerhetünk, melyek segítségével felismerhetjük azokat a magzati rendellenességeket, melyek méhen belüli, esetleg korai újszülöttkori kezelést tesznek szükségessé, vagy a jogszabályban meghatározott esetekben a várandósság terminálását indokolhatják [Papp, 2017]. Genetikai tanácsadás és szükség esetén praenatalis diagnosztika indokolt lehet terhelő genetikai kórelőzmény, vérrokon kapcsolat, feltételezhetően teratogén noxa expozíciója, az anyai szérumbiokémiai markerek és/vagy neminvaszív praenatalis teszt (non-invasive prenatal testing, NIPT) jelezte magas kockázata esetén, valamint magas anyai (> 35 év), vagy apai (> 45 év) életkor kapcsán [Papp, 2017].

A magasabb anyai életkorban emelkedik a magzati kromoszóma-rendellenességek gyakorisága, ez praenatalis genetikai diagnosztika szükségességét veti fel. Az egyes biokémiai markerek és az ultrahang vizsgálat együttes alkalmazása ugyanis növelheti a kiemelt magas kockázatú várandósságok azonosításának esélyét, melyeknél további invazív diagnosztika szükséges [Findley és mtsai, 2023; Jenkins és mtsai, 2022]. Az anyai szérumbiokémiai markerek elsősorban a magzati 21-triszómia szűrését

célozzák, azonban az elvégzett vizsgálatoktól függően egyéb rendellenességek is, mint például magzati 18-triszómia, 13-triszómia, X-monoszómia és velőcsőzáródási rendellenességek is szűrhetők. A kombinált tesztet a 12. héten ajánlják, mely a várandós nő egyedi magzati 21-triszómia (Down-szindróma) kockázatát adja meg a gesztációs kor, anyai életkor, korábbi triszómiák, az ultrahanggal észlelt gyanújelek, valamint a szérumszűrés (szabad béta humán chorialis gonadotropin [hCG], pregnancy associated plasma protein-A [PAPP-A]) eredményei alapján. A kombinált teszt 85-95%-os szenzitivitással bír 3-5%-os álpozitivitás mellett. A második trimeszterben alkalmazott szűrőmódszerek a hármas és négyes teszt (anyai szérumból hármas teszt esetén az alfa-foetoprotein [AFP], össz-hCG és nem konjugált ösztriol, négyes szűrésnél az előzőek mellett az inhibin-A meghatározás). A hármas teszt hatékonysága 55-60%, míg a négyes teszté 70-75% (közel 5%-os álpozitivitás mellett). Az integrált teszt az első trimeszterben történt ultrahang gyanújelek és anyai szérum PAPP-A meghatározásból, valamint a második trimeszterben történő négyes tesztből áll. Ezzel a módszerrel a 21-triszómiára vonatkoztatva 85-95%-os szenzitivitás érhető el (3-5%-os álpozitivitással) [Papp, 2017]. A hazánkban is elérhető, azonban az előbbieken rögzített vizsgálatokkal ellentétben a társadalombiztosítás által nem finanszírozott, NIPT találati aránya közel 99% (néhány %-os álpozitivitással), mely a 10. gesztációs héttől ajánlható és az anyai keringésben levő magzati DNS kimutatásán alapul [Dungan és mtsai, 2023].

A szűrővizsgálatok tehát egy átlagpopulációból kiszűrik azokat az eseteket, amelyekben diagnosztikus vizsgálatra van szükség egy adott betegség szempontjából. Közös jellemzőjük még, hogy döntően a Down-szindrómára összpontosítanak, tehát bár kombinálásukkal a találati arány növekedése érhető el, semmiképpen sem jelentik alapját egy olyan módszernek, ami bármilyen (pl. monogénes, egyéb kromoszóma aberrációval járó) örökletes betegség diagnosztizálására alkalmas lehet, mivel azok definitív diagnózisa jelenleg csak invazív beavatkozások útján lehetséges [Sparks és Dugoff, 2023]. Bár az ultrahangos szűrővizsgálatok, a klasszikus klinikai genetikai vizsgálatok és a NIPT technikák segíthetnek a számos malformáció, kromoszóma rendellenesség és genetikai betegség diagnosztizálásában, azonban e kóros állapotok in utero diagnosztikája továbbra is kihívást jelent. Napjainkban egyre több tanulmány irányul a magzatvízben jelen levő biomolekulák mennyiségi és/vagy minőségi meghatározásának diagnosztikus potenciáljának vizsgálatára, melyek biztató előzetes eredményekkel bírnak [Kolvatzis és mtsai, 2023; Park és mtsai, 2021; Vasani és Kumar, 2019].

1.2.3. A PACAP és humán reprodukció

Számos *in vitro* és *in vivo* adat igazolta a PACAP regulatorikus szerepét a reprodukív folyamatokban mind centrális, mind perifériás szinten [Kanasaki és mtsai, 2016; Koppán és mtsai, 2022]. A PACAP szabályozza a fő gonadális hormonok, a gonadotropin-releasing hormon (GnRH), valamint a folliculus stimuláló hormon (FSH) és a luteinizáló hormon (LH) termelését [Dow és mtsai, 1994]. PACAP hatására fokozódik az oxitocin és vazopresszin termelés [Lutz-Bucher és mtsai, 1996], valamint az FSH-n és LH-n kívül a növekedési hormon (GH), a prolaktin (PRL) és az adrenocorticotrop hormon (ACTH) szekréciója is [Vaudry és mtsai, 2009]. Ugyanakkor több vizsgálat igazolta a PACAP előbiekkel ellentétes irányú hatását is, mely a regulációs folyamat komplexitását mutatja, valamint magyarázható azzal is, hogy különböző fajú, korú és nemű állatokon végezték el a kísérleteket, továbbá a kapott eredményekre az adott napszak és az oestrus ciklus is hatással lehetett [Kanasaki és mtsai, 2016; Köves és mtsai, 2020].

A PACAP38-at follicularis folyadékából asszisztált reprodukációs kezelések során, a petefészkek szabályozott stimulációja során nyert mintáiból detektálta munkacsoportunk tömegspektrometriával 2011-ben [Brubel és mtsai, 2011]. Egy évvel később egy tanulmányban hasonló minták radioimmun-assay-vel (RIA) történő vizsgálatával azt találták, hogy a follicularis folyadék magas PACAP38 koncentrációi alacsonyabb számú fejlődő petesejttel társultak, míg az alacsony PACAP38 koncentrációk lényegesen több petesejt kinyerésével jártak, ami a petefészkek hyperstimuláció potenciomális hatékonyságát vetítette előre [Koppán és mtsai, 2012].

Steenstrup és mtsai (1996) mutatták ki először a PACAP mindkét izoformáját emberi uterusban, placentában, valamint köldökzsinórban. A PACAP az uteroplacentaris keringés és a placentaris hormontermelés regulációjában is részt vesz [Desai és Burrin, 1994; Spencer és mtsai, 2001], valamint megfigyelték, hogy a PACAP és PAC1 receptor mRNS expressziója a gesztációs hetek előrehaladtával növekszik, mely a peptid placenta fejlődésére kifejtett kapcsolatára is utalhat [Koh és mtsai, 2005].

Munkacsoportunk várandósok plazmamintájának vizsgálata során az első trimeszterben nem talált szignifikáns PACAP38 szint változást a kontroll, nem várandós populációhoz képest, azonban a várandósság 2. és 3. trimeszterében a PACAP38 szignifikáns emelkedését észleltük. Érdekességként azt találtuk, hogy szülés alatt a

PACAP38 szint mintegy 70%-kal csökkent (ennek okaként uteroplacentaris keringési változások és uteruskontrakciók feltételezhetők), majd a szülést követő harmadik napra a PACAP38 szint visszatért az első trimeszterben mért, „normál”, nemtől, életkortól, táplálkozástól és nemi ciklustól független alapszintre [Reglődi és mtsai, 2010]. A PACAP38 plazma koncentrációjának emelkedése a várandósság előrehaladtával azt sugallja, hogy a méhlepény és/vagy egyéb anyai szerv(ek) termeli(k) a PACAP38-at nagyobb mennyiségben. Ezt erősíti az is, hogy a méhlepény anyai és magzati felszínén is magas PACAP38 immunreaktivitás mutatható ki és a placentaris PACAP38 tartalom a várandósság előrehaladtával emelkedik [Brubel és mtsai, 2010]. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy szignifikánsan magasabb plazma PACAP38 szintek mérhetők szoptató anyák esetén a kontroll populációhoz képest [Börzsei és mtsai, 2009].

Munkacsoportunk megfigyelte azt is, hogy újszülötkekből vett perifériás vér PACAP38 szintje megegyezett az egészséges felnőttekben mérhető szinttel, ugyanakkor az umbilicalis erekben ehhez képest szignifikánsan alacsonyabb koncentrációkat mértünk. A köldökzsinórból vett artériás mintákban szignifikánsan magasabb PACAP38 koncentráció volt kimutatható, mint a köldökzsinór vénából vett mintában [Reglődi és mtsai, 2010]. Későbbi kutatások igazolták, hogy nincs nemi különbség az újszülöttek köldökzsinórjából vett vénás vér PACAP38 koncentrációi között, valamint a PACAP38 szintek nem mutattak korrelációt sem a szülés módjával, sem az Apgar-értékekkel [Winters és mtsai, 2014].

A PACAP-nak fontos szerepe lehet az emlőmirigy beidegzésében, a tejtermelés, a tejelválasztás és a szopóreflex szabályozásában [Koppán és mtsai, 2022; Tamás és mtsai, 2016b]. Az emberi emlőmirigyben kimutatták a PACAP mRNS expresszióját, valamint a PACAP-immunreaktivitását, továbbá a PACAP mindhárom receptorának jelenlétét is sikerült igazolni [García-Fernández és mtsai, 2004]. Munkacsoportunk igazolta, hogy a PACAP38 az anyatejben az első fél évben állandó, közel 5-20-szor nagyobb koncentrációban van jelen, mint a plazmában, mely független a laktáció idejétől és a szoptatás gyakoriságától [Börzsei és mtsai, 2009]. Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy a kolosztrumban a legmagasabb a PACAP38 koncentráció (az átmeneti és érett anyatejhez képest szignifikánsan magasabb), majd ezt követően fokozatosan csökken a PACAP38 koncentráció az érett anyatejre jellemző átlagos értékre. Az érett anyatejmintákban vizsgálataink során nem találtunk különbséget az előtej és az utótej minták elemzése során [Csanaky és mtsai, 2012]. A laktációt hosszabb ideig követve

megfigyeltük, hogy a 10. hónapot követően az anyatej PACAP38 koncentrációja szignifikánsan megnőtt az első 10 hónaphoz képest, sőt, a 14. és 17. hónap között az előbbi időszakhoz képest is további szignifikáns PACAP38 koncentráció emelkedés volt tapasztalható, mely összefüggésben állhat az elválasztott anyatej mennyiségének időbeli csökkenésével is [Csanaky és mtsai, 2012]. Érdekességként elmondható, hogy a szarvasmarha-, birka- és kecsketej vizsgálatánál is közel tízszeres PACAP38 szintet mért kutatócsoportunk a tejmintákban az adott állat plazmamintáihoz képest, ami nem változott szignifikánsan a laktáció első 3 hónapjában [Czeglédi és mtsai, 2011].

Vizsgáltuk a friss tehéntej és a pasztörözött tejminták PACAP38 tartalmát is, melyek az érett anyatejmintákhoz hasonló PACAP38 szinttel rendelkeztek. Tápszerekben is ki tudtuk mutatni a PACAP38-at, mely valószínűleg az alacsony molakulatömegének köszönhetően jobban ellenáll a tápszergyártás folyamatának, mint a nagyobb/komplexebb felépítésű fehérjék. A hipoallergén tápszerekben érdekes módon magasabb PACAP38 koncentrációt találtunk a nem hipoallergén készítményekkel szemben, melynek hátterében az állhat, hogy a tejben a PACAP38 valamilyen hordozó molekulához vagy exosomákhoz kötötten található, ami a hipoallergén tápszerek előállítási folyamataiban felszabadulhat [Csanaky és mtsai, 2013].

1.3. A politrauma

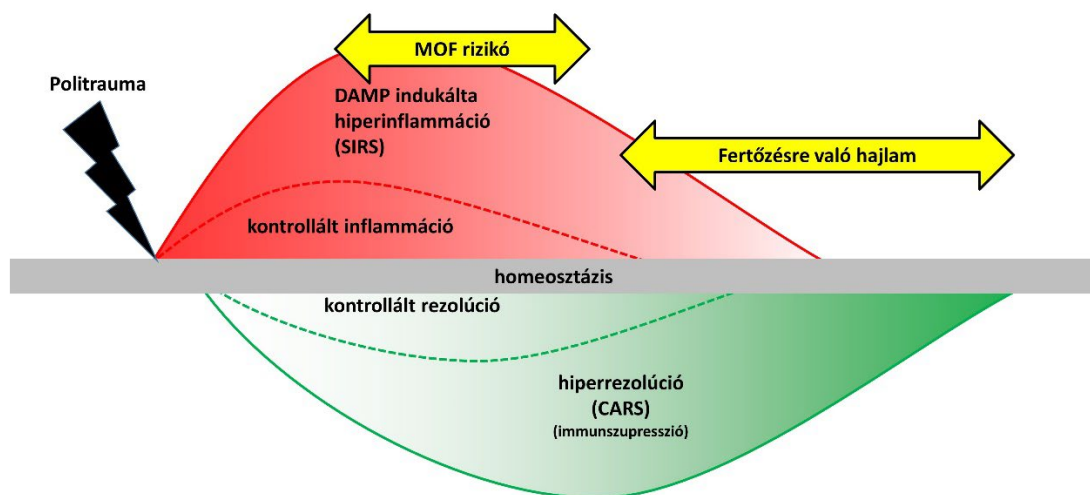
Évente több mint 5 millió ember veszíti életét valamilyen trauma következtében, mely sérülések háromnegyed része közlekedési baleset és magasból való leesés következménye. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) 2014-ben kiadott előrejelzése szerint előbbi a hetedik, míg utóbbi a tizenhetedik leggyakoribb halálok lesz 2023-ra. Sajnálatos módon ezirányú friss statisztika adatok nem állnak rendelkezésre. A globális halálozás 9%-át kitevő 5 millió eset természetesen a jéghegy csúcsát reprezentálja, hiszen nagyságrendekkel magasabb számot képviselnek azok az esetek, amikor az elszenvedett sérülések következtében súlyos egészségromlás vagy fogyatékosként értékelhető állapot alakul ki, melynek nem csak egészségügyi, de jelentős gazdasági hatásai is vannak [WHO, 2014].

1.3.1. A politrauma klinikuma

A politraumatizáltak esetén a sérülés súlyosságának megítélésére különböző klinikai pontrendszerek terjedtek el, ilyen a rövidített sérülési index (Abbreviated Injury Scale, AIS), vagy a sérülés súlyossági index (Injury Severity Score, ISS). Az új Berlin-definíció szerint politraumáról akkor beszélünk, ha az ISS 15-nél nagyobb, és kettő vagy annál több testtáj 3-nál nagyobb AIS értékei mellett egy vagy több kórélettani paraméter (hipotenzió: szisztolés vérnyomás < 90 Hgmm; tudatzavar: GCS < 8; acidózis: BE < -6; véralvadási zavar: APTT > 40 sec vagy INR > 1,4; 70 év feletti életkor) eltérése is megfigyelhető [Pape és mtsai, 2014]. A politraumát elszenvedett személyek korai (azonnali vagy néhány órán belüli) halálozása magas, különösen központi idegrendszeri, szív- és nagyér sérülések, többszörös csonttörések esetén, míg a késői (heteken belüli) halálozás döntően a politraumából levezethető másodlagos károsodások, szövödmények miatt következik be [Longrois és mtsai, 2019; Pfeifer és mtsai, 2016].

A szervezetet ért súlyos sérülések esetén a károsodott sejtek felszínén megjelennek, illetve az extracelluláris térbe kijuthatnak az ún. sérülés asszociálta molekuláris mintázatok (damage-associated molecular patterns, DAMPok), melyek az immunrendszer aktiválódása révén nagy mennyiségű gyulladáshoz vezető mediátort szabadítanak fel. Ezek a proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18) révén szisztémás gyulladáshoz vezető válasz szindróma (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) kialakulásához vezetnek. Ennek során aktiválódik a komplementrendszer, a kallikrein-kinin rendszer, a véralvadási folyamatok, fokozódik az akut fázis fehérjék

szintézise és mindezek által súlyos többszervi elégtelenség (multiple organ failure, MOF) alakulhat ki [Keel és Trentz, 2005; Relja és Land, 2022]. Mivel a szervezet egyensúlyi állapotra törekszik, így az inflammatoricus rendszer aktivációjával párhuzamosan fokozódik az antiinflammatoricus citokinek (IL-4, IL-10, IL-13) szintézise is. Ezt kompenzatórikus antiinflammatoricus válasz szindrómának (compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS) nevezzük. A szervezet igyekszik a SIRS és a CARS közötti érzékeny egyensúlyt fenntartani. A politraumát követő túlzott mértékű gyulladási válaszreakció MOF-ot eredményez, mely a korai halálozások jelentős részéért felelős, míg a késői halálozás sok esetben arra vezethető vissza, hogy az antiinflammatoricus rendszer túlzott aktivitása miatt a szervezet immunszuprimált állapotba kerül, fokozva az infekciókra és szepszisre való hajlamot [Stoecklein és mtsai, 2012; Csontos, 2022] (4. ábra).



4. ábra. A politraumát követő egyensúlyi állapot felborulásának sematikus rajza (átdolgozva: Relja és Land, 2020 alapján). Rövidítések: CARS: kompenzatórikus antiinflammatoricus válasz szindróma (compensatory anti-inflammatory response syndrome); DAMP: sérülés asszociálta molekuláris mintázat (damage-associated molecular pattern); MOF: többszervi elégtelenség (multiple-organ failure); SIRS: szisztémás gyulladási válasz szindróma (systemic inflammatory response syndrome).

Politrauma hatására tehát a szervezet egészét érintő változások – pro-, és antiinflammatoricus válaszreakciók, neuroendokrin folyamatok, véralvadási zavarok – alakulnak ki, melynek eredményeképp a szervek másodlagos károsodása és fertőzéses szövődmények is létre jöhetnek [Dobson és mtsai, 2022; Stoecklein és mtsai, 2012]. A politrauma egyik leggyakoribb és sokszor fatális kimenetelű szövődménye a szepszis, egy életet veszélyeztető szervdiszfunkció, mely a szervezet infekcióra adott diszregulált

immunválasza következtében jön létre [Singer és mtsai, 2016]. A szepszis kórlefordását tekintve hasonlóságot mutat a politrauma során fellépő kórélettani változásokkal. Ez azzal magyarázható, hogy fertőzés esetén felszabaduló patogén asszociálta molekuláris mintázat (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) hasonló immunológiai választ indukál, mint a DAMP [Rai és mtsai, 2022; Pape és mtsai, 2022]. Az infekció, illetve a szepszis diagnosztizálása tehát igen nehéz olyan politraumatizáltaknál, akinél kifejezett SIRS van jelen. Emiatt kiemelten fontos a sérülések elszívését követően az esetleges fogyatékos/súlyos egészségromlás vagy akár halál lehetőségét magában hordozó szövödmények mielőbbi észlelése, melyre lehetőséget nyújthat – többek között – az ebben az időszakban jelentkező pro- és antiinflammatoricus folyamatok monitorozása [Arora és mtsai, 2023; Osuka és mtsai, 2014].

Az akut fázis fehérjék közül a C-reaktív protein (CRP) gyakran alkalmazott, konvencionális marker, mely bármilyen gyulladással járó szövetkárosodásra érzékenyen reagál, így 6-72 órán belül 10-100-szoros koncentráció növekedés is előfordulhat. Általában a harmadik napon tetőzik, azonban nem alkalmas arra, hogy az általános gyulladást elkülönítse a fertőzéses eredetű szövödményektől [Ciriello és mtsai, 2014; Rajab és mtsai, 2020].

A mindennapi gyakorlatban elterjedt másik konvencionális biomarker a prokalcitonin (PCT), mely általában 1-2 nappal a trauma után tetőzik és általában rapidan csökken a szintje fertőzéses szövödmény hiányában. Ennek hiányában, vagy másodlagosan emelkedő PCT érték esetén fel kell merülnie szeptikus komplikáció lehetőségének [AlRawahi és mtsai, 2019; Ciriello és mtsai, 2014; Sakran és mtsai, 2012]. A szakirodalomban ugyanakkor a konvencionális paraméterek, biomarker panelek kapcsán ellentmondásos eredmények is fellelhetők, ezért az új, potenciális targetmolekulák vizsgálata jelenleg is intenzív kutatások tárgyát képezi [AlRawahi és mtsai, 2019; Barichello és mtsai, 2022; Ciriello és mtsai, 2014].

Napjainkban már ismert, hogy a súlyos trauma indukálta oxidatív stressz képes olyan transzkriptom szintű változásokat okozni a leukocytákban, melyek számos laboratóriumi és klinikai paraméter változását idézhetik elő, többek között érintve a szepszis vagy egyéb komplikációk diagnosztikai markereit is. Ezen folyamatok magyarázhatják a klinikai biomarkerek kapcsán rendelkezésre álló olykor ellentmondásos eredményeket [Xiao és mtsai, 2011]. Pontosan ezek miatt, az egyes

izolált gyulladáshoz vezető markerek mellett a fehérvérsejt-funkció, például a leukocita antiszedimentációs ráta (LAR) is hasznos információval szolgálhat a konvencionális paraméterek monitorozása mellett, bár alkalmazása még nem terjedt el a rutin gyakorlatban. A LAR vizsgálata azon alapszik, hogy a szöveti sérülés hatására kialakuló sejtes válaszreakció során a leukocyták aktiválódnak, így – számos egyéb változás mellett – a vízfelvételük is megnövekszik. Emiatt a vízfelvétel miatt fajsúlyuk kisebb lesz, mint az eredeti „nyugalmi” állapotban, ezáltal az egyórás vérsüllyedés során a véroszlop felső felében megnövekszik az antiszedimentálódó fehérvérsejtek száma [Bogár és mtsai, 2002; Bogár és Tarsoly, 2006]. A LAR több tanulmányban is jó prediktornak bizonyult fertőzésekkel szemben [Bogár és mtsai, 2006; Loibl és mtsai, 2021; Rozanovic és mtsai, 2016].

Az akut fázis fehérvérsejt és különböző biomarkerek/biomarker panelek monitorozása tehát segítséget nyújthat a korai terápiás döntések meghozatalában, azonban a diagnosztikát és a prognosztikát jelentősen nehezítik a nem specifikus és kevésbé szenzitív klinikai és laboratóriumi markerek [Ventetuolo és Levy, 2008]. Ezek az adatok alátámasztják az új biomarkerek azonosítására fókuszáló kutatások fontosságát, amelyek lehetővé teszik a súlyos komplikációk, például a szepszis, azonosítását még a szubklinikai állapotban. Az ilyen esetben alkalmazott korai megelőző kezelések révén ezek az új biomarkerek hozzájárulhatnak a mortalitási mutatók javulásához.

1.3.2. PACAP, trauma és immunhomeosztázis

A sérülésekre adott válaszreakció során a szimpatikus idegrendszer és a hypothalamo-hypophysealis rendszer is aktiválódik, ezáltal a neuroendokrin és immunrendszer között kétirányú „párbeszéd” zajlik különböző mediátorokon (hormonok, neuropeptidek, neurotranszmitterek, citokinek) keresztül [Battaglioni és mtsai, 2023; Lotan és Schwartz, 1994; Pintér és mtsai, 2014]. A PACAP antiinflammatoricus, antioxidáns és immunmodulátor hatása révén fontos adaptációs szerepet tölt be a stressz mediálta és mind a veleszületett, mind pedig a szerzett immunitás folyamataiban [Delgado és mtsai, 2003; Ganea és Delgado, 2002; Gray és Cline, 2019; Martinez és mtsai, 2002; Stroth és mtsai, 2011]. Immunmodulátor hatása mellett gyulladáscsökkentő hatással rendelkezik: gátolja a proinflammatoricus citokinek (pl.: IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , NO) szekrécióját az aktivált makrofágokban és a gyulladáscsökkentő hatású IL-10 termelését serkenti, ezáltal a pro- és antiinflammatoricus folyamatok egyensúlyát

moderálja. Emellett a fehérvérsejtek migrációját is csökkenti a kemokin termelés gátlása révén [Delgado, 2016; Delgado és mtsai, 2003].

Az utóbbi években több olyan publikáció jelent meg, mely a PACAP38 diagnosztikus vagy prognosztikus biomarker potenciálját vizsgálta humán kórképekben különböző testfolyadékokból, azonban ezek – munkacsoportunk neurotraumatológiai jellegű tanulmányának kivételével – heveny vagy idült betegségeket és nem sérüléseket érintettek [Reglődi és mtsai, 2016; Tóth D és mtsai, 2023]. Korábbi tanulmányunkban a plazma és az agy-gerincvelői folyadék PACAP38 koncentrációinak változását vizsgáltuk súlyos traumás agysérültek esetében (kontrollcsoport mellett). Munkacsoportunk súlyos traumás agysérülteknél mind a plazmában, mind az agy-gerincvelői folyadékban emelkedett PACAP38 szintet talált. Azon súlyos traumás agysérültek esetében, akik a sérülés elszenvedését követő első héten elhunytak, a plazma PACAP38 szint közel megduplázódott. Ezen értékek szintén közel kétszer magasabbak voltak, mint az esetükben mért agy-gerincvelői folyadék PACAP38 koncentrációi. A súlyos traumás agysérülést túlélte személyek esetében mind a plazmában, mind az agy-gerincvelői folyadékban szignifikánsan alacsonyabb PACAP38 szint volt észlelhető, mint azoknál, akik az első héten elhunytak. A vizsgált testfolyadékokban mért tartósan emelkedett PACAP38 koncentráció eredete kapcsán feltételeztük, hogy azt az agysérülést követő endogén túlprodukció, a vér-agy gát sérülése, a másodlagos központi idegrendszeri sérülések és a SIRS magyarázhatja [Bukovics és mtsai, 2014]. Egy forenzikus szövettani tanulmányban súlyos agysérülések következtében elhunytak esetén az agyi contusio szöveti vizsgálata is azt igazolta, hogy traumát követően megemelkedik a PACAP expresszió. A vizsgált mintákban a contusio területén – a szövetpusztulásnak megfelelően – a PACAP immunreaktivitás ugyan lecsökkent, azonban pericontusios régiókban a sérülést követő 24 órával szignifikánsan és tartósan megnövekedett PACAP expressziót észleltek [van Landeghem és mtsai, 2007].

1.4. A retinoblastoma

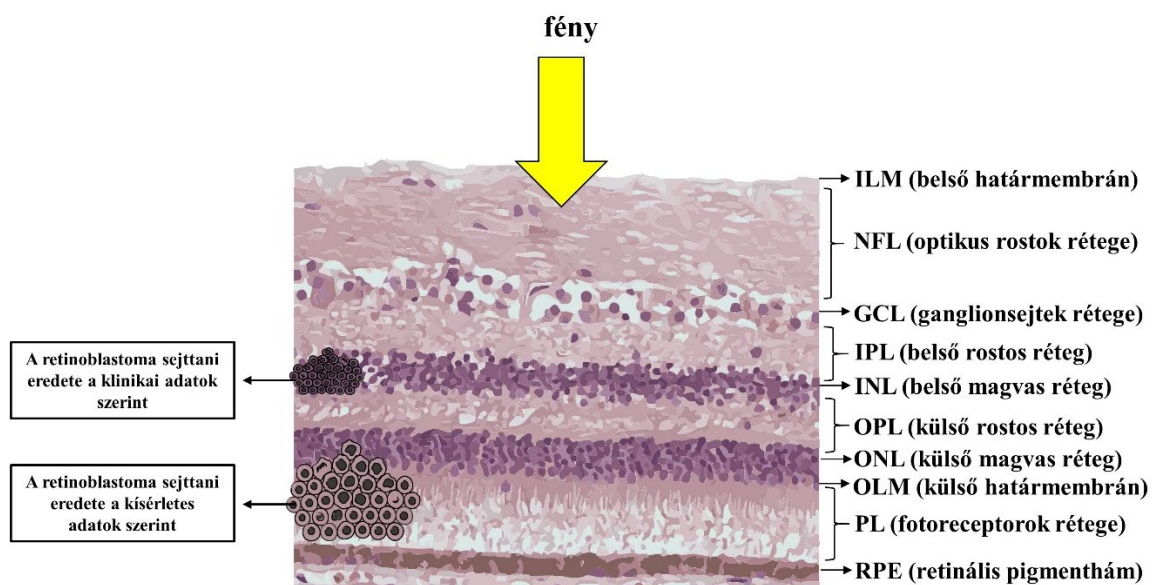
A retinoblastoma a leggyakoribb elsődleges szemdaganat gyermekkorban. A globális előfordulási gyakorisága 1/16000-18000, mely azonban jelentős varianciát mutat különböző földrajzi régiók és etnikai csoportok között, ugyanakkor a nemek érintettsége állandó arányúnak mondható [Dimaras és mtsai, 2015; Orjuela-Grimm és mtsai, 2019]. Az érintett gyermekek 11%-a magas jövedelmű országokból származik, míg a többi beteg 69%-a közepes jövedelmű, 20%-a alacsony jövedelmű országokból kerül ki. Az alacsony jövedelmű országokban a mortalitás jelentősen magasabb (40-70%) összehasonlítva Európa, az Egyesült Államok vagy Kanada mortalitási mutatóival (3-5%). E jelentős különbség többnyire a késői diagnózissal (ezáltal előrehaladottabb stádiumú betegséggel), az egészségügyi ellátó rendszer korlátozott hozzáférhetőségével és állapotával, valamint egyéb, szociokulturális és közgazdasági faktorokkal magyarázható [Dimaras és mtsai, 2012; Gupta és Meena, 2020].

1.4.1. A retinoblastoma klinikopatológiája

A retinoblastoma a daganatkutatás egyik alapmodelljének tekinthető. Knudson 1971-ben írta le a 13. kromoszóma hosszú karján (13q14) elhelyezkedő tumorszupresszor, a retinoblastoma 1 gén (*RBI*) biallélikus funkcióvesztő mutációjával kapcsolatos "kettős csapás" elméletét, melyet a későbbi kutatások megerősítettek [Knudson, 1971]. Az elmélet szerint egy csírasejtes mutáció („első csapás”) esetén már csak egy szerzett mutáció („második csapás”) szükséges a daganat kialakulásához, emiatt a retinoblastoma örökletes formája fiatalabb életkorban jelentkezik és gyakran multifokális vagy bilaterális. A csírasejt-mutáció autoszomális dominánsan öröklődik, 80% penetranciával. Ezzel szemben a sporadikus esetek általában unilaterálisak és időben később jelentkeznek, melynek az a magyarázata, hogy ebben az esetben mindkét *RBI* mutációja szerzett [Knudson, 1971, 2001; Wong és mtsai, 2014]. Természetesen önmagában a biallélikus funkcióvesztő mutáció nem elegendő, hanem további genetikai és epigenetikai változások szükségesek a malignus transzformációhoz [Thériault és mtsai, 2014]. Igen ritka esetben kialakulhat retinoblastoma a *RBI* mutációja nélkül is, ezekben a daganat a *MYCN* gén szomatikus amplifikációjának eredménye [Rushlow és mtsai, 2013].

Annak ellenére, hogy a retinoblastoma az egyik legjobban kutatott daganat, a pontos sejttani eredete mind a mai napig nem igazolt [Bremner és Sage, 2014]. Olyan

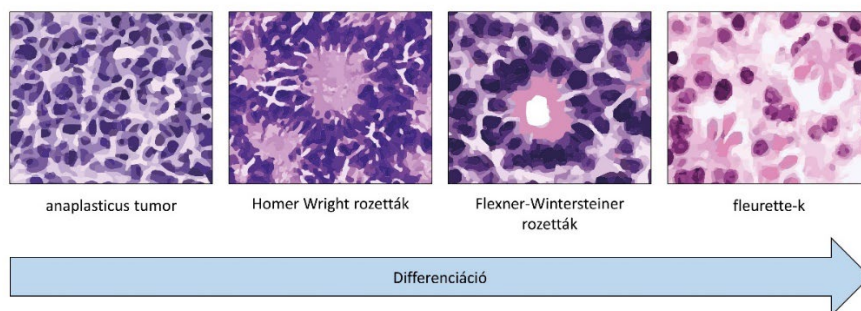
betegek esetén, akiknél igen korai stádiumban magas felbontású optikai koherencia tomográf segítségével igazolták a daganatot, azoknál a belső magvas réteg (inner nuclear layer, INL) tűnt a kiindulási pontnak [Rootman és mtsai, 2013]. Kísérletek alapján azonban felmerült, hogy a retinoblastoma a differenciálódó pálcikákból származik, mivel kimutatták, hogy a retinoblastoma sejtek számos ponton (túlélés, proliferáció) a pálcika prekursor jelátviteli rendszerekre támaszkodnak [Xu és mtsai, 2009] és a *RBI* kiütése az emberi pálcika előalakokban sejtproliferációhoz vezet [Xu és mtsai, 2014]. Későbbi kutatások megerősítették, hogy a pálcika előalakok maturációs folyamata kifejezetten érzékeny az *RBI* funkcióvesztő mutációjára, mely retinoma, retinoblastoma-szerű proliferációhoz vezet [Singh és mtsai, 2018]. Az *RBI*^{-/-} daganatok molekuláris, klinikai és hisztopatológiai különbségei is visszavezethetők voltak arra, hogy a daganatsejtekben a differenciáció csökkenése/elvesztése arányos a fotoreceptor expressziós mintázat hasonló irányú változásával [Kooi és mtsai, 2015]. Egy humán retinoblastoma organoid modellben szintén a fejlődő pálcikákat azonosították kiindulási sejttypusként [Liu és mtsai, 2020]. Multi-omikai vizsgálatok során kettő, különböző molekuláris retinoblastoma altípust is azonosítottak, mindkettő pálcika markereket expresszált [Liu és mtsai, 2021]. Érdekes módon a kutatások arra is rávilágítottak, hogy az *RBI* funkcióvesztő mutációja a fejlődő (tehát már nem éretlen) pálcika előalakokban okoz daganatos proliferációt, míg a *MYCN* szomatikus amplifikációja a teljesen éretlen pálcika előalakokban vezet daganathoz [Singh és mtsai, 2022]. A retinoblastoma sejttani eredetére vonatkozó adatok és a retina szövettani szerkezete az 5. ábrán látható.



5. ábra. Az emberi retina szövettani szerkezete és a retinoblastoma feltételezett kiindulási helyei (saját ábra).

Általában egy- és hároméves kor között válnak láthatóvá az első tünetek, melyek közül a leggyakoribb a pupilla területének sárgás visszfénye (leukocoria, amaurotikus macskaszem), mely annak a következménye, hogy a daganat a szemgolyó nagy részét már kitölti. Gyakoriságban második tünet a kancsalság, mely a látás elvesztése okán keletkezik. Abban az esetben, ha a tumor mérete még nem okoz vakságot, a konvergáló szemállás miatt kereshetik fel a szülők az orvost. Szemfenék vizsgálattal és kiegészítő képalkotó eljárásokkal a kórisme felállítása általában nem okoz nehézséget [Gupta és Meena, 2020].

A daganat makroszkóposan szürkés-fehér, felszíne finoman egyenetlen, benne krétafehér meszesedések, és sárgás-fehéres nekrotikus területek is előfordulhatnak. Szövettanilag a daganat sejtdús, mely hyperchromaticus, keskeny citoplazmájú, nagy kerek/ovális magvú sejtekből áll. Fokozott mitotikus aktivitás mellett számos apoptotikus daganatsejt és változatos méretű nekrozisok és meszesedések figyelhetők meg [Singh és Kashyap, 2018]. A legjobban differenciált daganatokban megfigyelhető a viszonylag halványan festődő, szélesebb citoplazmájú, részlegesen differenciált fotoreceptorokra emlékeztető daganatsejtek virágsziromszerű elrendeződése (fleurette), melyek között a membrana limitans internát idéző junkciók is láthatók. A Flexner-Wintersteiner rozetták korai retinalis differenciációt jelentenek és centrális lumen köré rendeződött köb vagy henger alakú sejtekből állnak. Az egyéb neuroblastos tumorokban is előforduló Homer Wright rozetták primitív neuroblastos differenciációt képviselnek, ezeknél nincs valódi centrális lumen, azt eosinophil neuropil tölti ki [Alsharif és mtsai, 2019]. 2014-ben egy új, utóbbi kettőnél nagyobb méretű rozettát is leírtak, mely valódi lumennel bír, és benne basophil sejtek helyezkednek el, melyeket eosinophil szálcsák kapcsolnak össze egymással és a lumen körüli sejtekkel [Das és mtsai, 2014]. A retinoblastoma szövettani megjelenéseit a 6. ábra foglalja össze.



6. ábra. A retinoblastoma szövettani megjelenési formái sematikusan ábrázolva (saját ábra). Balról jobbra haladva növekvő differenciáltsági fok látható.

A retinoblastoma stádiummeghatározására több osztályozási rendszer is elérhető: a nemzetközi intraocularis retinoblastoma osztályozási rendszer (International Intraocular Retinoblastoma Classification, IIRC) [Linn Murphree, 2005], a nemzetközi retinoblastoma stádiummeghatározó rendszer (International Retinoblastoma Staging System, IRSS) [Chantada, 2006], a retinoblastoma intraocularis osztályozása (Intraocular Classification of Retinoblastoma, ICRB) [Shields és mtsai, 2006], és a ráktípusok stádiumainak meghatározásával foglalkozó amerikai bizottság (American Joint Committee on Cancer, AJCC) TNM (Tumor-Node-Metastasis, Tumor-Nyirokcsomó-Metasztázis) beosztása [Mallapatna és mtsai, 2016], melyek közül az IRSS és a TNM rendszer a leginkább elterjedtek.

1.4.2. A PACAP szemészeti vonatkozásai

A PACAP a különböző fajok esetében már az egyedfejlődés nagyon korai szakaszában megjelenik [Borba és mtsai, 2005; Dénes és mtsai, 2019a; Mathieu és mtsai, 2005] és a peptid, valamint specifikus receptora számos állatfaj szemében kimutatható, például a kötőhártyában, az ínhártyában, szaruhártyában, a sugártestben, az íriszben és a retinában, de igazolták a jelenlétüket a könnycsatornában és a ganglion ciliare területén is [Seki és mtsai, 1997; Wang és mtsai, 1995]. Ugyanakkor az emberi szem PACAP38 és PAC1 receptor eloszlása csak nemrég vált ismertté.

Az első humán adatokat Orianas és munkatársai (1997) szolgáltatották, amikor kimutatták, hogy a PACAP38 a magzati retinában megemelte a cAMP szintet, illetve a humán retina homogenizátumban igazolták a PACAP mRNS-ét. Közel két évtizeddel később írta le munkacsoportunk az emberi szem PACAP38 és PAC1 receptor expresszióját [Patkó és mtsai, 2022]. Mind a PACAP38-at, mind a PAC1 receptort közel azonos mértékben mutattuk ki a szaruhártya epithel és endothel rétegeiben, az írisz pigmenthám rétegében és a stromájában, valamint a sugártestben. A pupillaszűkítő és -tágító izmokban magasabb PACAP38 expressziót találtunk a PAC1 receptorhoz képest. A retina kapcsán a retinalis pigmenthám (retinal pigment epithelium, RPE) erős PACAP38 és még erősebb PAC1 receptor pozitivitást mutatott, míg a csap és pálcika rétegben nem, vagy csak minimális immunpozitivitást detektáltunk, hasonlóan a külső magvas réteghez (outer nuclear layer, ONL) és a külső rostos réteghez (outer plexiform layer, OPL), melyeknél azonban már csak a PAC1 receptor esetében volt detektálható immunhisztokémiai jel. Minimális PACAP38 és PAC1 receptor expressziót figyeltünk

meg az INL-ben, míg a belső rostos rétegben (inner plexiform layer, IPL) erős PACAP38 és még erősebb PAC1 receptor expressziót láttunk. A ganglionsejtek rétegében (ganglion cell layer, GCL) sajátos mintázatot írtunk le, ugyanis erős PACAP38 és még erősebb PAC1 receptor pozitivitás volt látható, azonban nem minden ganglionsejtben (tehát teljesen negatív ganglionsejtek is voltak). Gyenge immunpozitivitást írtunk le mind a PACAP38, mind a PAC1 receptor esetében az optikus rostok rétegében (nerve fiber layer, NFL) [Patkó és mtsai, 2022].

A PACAP-nak fontos szerepe van a retinogenezisben és a látás kialakulásában [Atlasz és mtsai, 2016; Pöstyéni és mtsai, 2021], valamint szerepe van a könnytermelésben és a száraz szem szindróma részeként jelentkező szaruhártya hyperkeratinisatio megakadályozásában [Nakamachi és mtsai, 2016], részt vesz a pupilla méretének és a cirkadián ritmus szabályozásában is [Keenan és mtsai, 2016; Vereczki és mtsai, 2006]. In vitro kísérletek igazolták az antiapoptotikus tulajdonságát retinalis neuronokban glutamát okozta károsodással szemben [Shoge és mtsai, 1998, 1999], retinalis neuroblast sejtekben tapszigargin okozta károsodással szemben [Silveira és mtsai, 2002], antiinflammatoricus tulajdonságát nátriumaziddal előidézett ischaemiás károsodásban [D'Alessandro és mtsai, 2014]. Protéktív funkció kapcsán in vivo kísérletek igazolták a PACAP ezirányú hatását excitotoxikus károsodásokban [Atlasz és mtsai, 2008, 2009], UV-indukálta degenerációban [Atlasz és mtsai, 2011], diabeteses retinopathiában [Maugeri és mtsai, 2019; Szabadfi és mtsai, 2014], ischaemiás és gyulladásszerű retinopathiákban [Atlasz és mtsai, 2007, 2010; Szabadfi és mtsai, 2010; Váczy és mtsai, 2018; Werling és mtsai, 2016, 2017], valamint koraszülött retinopathiában [Kvárik és mtsai, 2016, 2021].

1.4.3. A PACAP és daganatok

A PACAP és receptorainak fontos szerepe van a sejt differenciációban és proliferációban [Dénes és mtsai, 2019b; Horváth és mtsai, 2022; Lindholm és mtsai, 2016], ezért nem meglepő, hogy mind a PACAP, mind a specifikus receptorának változásai megfigyelhetők különböző daganatokban [Moody és Jensen, 2016, 2021; Moody és mtsai, 2016]. Számos daganat esetében leírták a PACAPerg rendszer over- vagy underexpresszióját, azonban a PACAP hatása – a daganat típusától, differenciáltsági fokától, környező szöveti állományától függően – eltérő lehet, így előfordulhat, hogy a PAC1 receptor aktiválódása bizonyos daganatok esetében növekedést serkentő, míg más

tumorok esetén növekedést gátló hatású [Moody és mtsai, 2016; Zibara és mtsai, 2018]. Arra is van adat, hogy ugyanazon daganatos sejtvonalon (pl.: prosztata adenocarcinoma) a PACAP expozíciós időtől, koncentrációtól vagy egyéb faktoroktól függően duális hatással bír [Farini és mtsai, 2003]. Ugyanakkor ismertek olyan daganatos sejtvonalak is, melyeknél a PACAP-nak nincs hatása a sejtproliferációra, például a JAR cytotrophoblast sejtek, vagy a Hep-G2 hepatocellularis carcinoma sejtek [Brubel és mtsai, 2010; Horvath és mtsai, 2010].

Az in vitro adatokon túlmenően több emberi daganatban is leírták a PACAP38 és a PAC1 receptor expressziójának változását a kiindulási „normál” sejtípushoz képest. A papillaris pajzsmirigy carcinomában a PACAP38 overexpresszióját figyelték meg a normál sejtekhez képest, míg a daganatsejteken érdemi PAC1 receptor expresszió nem mutatkozott szemben a normál sejtekkel, ahol erős, granuláris immunhisztokémiai jelet detektáltak [Bárdosi és mtsai, 2016]. Emlőrákok esetén, invazív ductalis adenocarcinomában mind a PACAP38, mind a PAC1 receptor overexpressziója volt megfigyelhető [García-Fernández és mtsai, 2004, 2005]. A hasnyálmirigy esetében munkacsoportunk mind ductalis adenocarcinomában, mind insulinomában ellenkező irányú változást észlelt, azaz a normál, kiindulási sejtekhez képest a PACAP38 és PAC1 receptor expressziója csökkent [Ferencz és mtsai, 2019, 2021]. A PACAPerg rendszer ezirányú változásait RIA-val is igazoltuk különböző humán daganatokban. Nem kissejtes tüdőrákok, vastagbél adenocarcinoma és vesedaganatok esetén szignifikánsan alacsonyabb PACAP38 szinteket mértünk, mint a normál, egészséges szövetekben [Szántó és mtsai, 2012; Tamás és mtsai, 2016a], ugyanakkor nem találtunk szignifikáns változást a PACAP38 szintekben húgyhólyagtumorban, prosztata adenocarcinomában és különböző heredaganatokban (seminoma, embrionális carcinoma, teratoma és yolk sac tumor) [Tamás és mtsai, 2016a]. Az előbbieken említett tanulmányokban látott PACAPerg rendszert érintő változások biológiai jelentőségéről ezidáig nincs adat, így nem ismert az sem, hogy a PACAPerg rendszernek szerepe van-e (és ha igen, akkor milyen) a tumorgenezisben, vagy a látott eltérések mintegy másodlagos következményei a tumoros transzformációnak.

1.4.4. PACAP és retinoblastoma

Olianas és munkatársai (1996) Y-79 humán retinoblastoma sejtvonalon képesek voltak kimutatni a PAC1 receptor jelenlétét; a daganatsejtek 58%-a mutatott PAC1 receptor pozitivitást. Leírták azt is, hogy a PACAP koncentráció-dependens módon növelte az AC aktivitást. Az izoformákat tekintve megfigyelték, hogy a PACAP38 hatszor potensebb, mint a PACAP27. Három évvel később a PAC1 receptor 3 különböző splice variánsát is azonosították Y-79 retinoblastoma sejteken [Dautzenberg és mtsai, 1999]. A PACAP38 koncentrációfüggő módon hatással van az Y-79 humán retinoblastoma sejtek túlélésére. Nanomoláris koncentrációkban (0,1-100 nM) érdemi hatása nincs, azonban mikromoláris koncentrációkban (1-5 μ M) a tumorsejtek túlélése a PACAP38 koncentráció növekedésével párhuzamosan csökkent. PAC1 receptor antagonistá PACAP6-38 előkezelés hatására nem változott a mikromoláris koncentrációjú PACAP okozta citotoxicitás mértéke. Sem a mikromoláris koncentrációjú (0,1-5 μ M) PACAP27, sem a mikromoláris koncentrációjú (1-2 μ M) szelektív PAC1 receptor agonistaként ismert maxadilan nem befolyásolta az Y-79 humán retinoblastoma sejtek túlélését. Meglepő módon, amennyiben a sejtvonalat membrán penetráló (PAC1 és VPAC receptorokon nem ható) PACAP38 analógokkal (FITC-Ahx-PACAP11-38, [Disc⁶]PACAP38) kezelték, szintén bizonyították a citotoxikus hatást, azonban annak mértéke kisebb volt, mint a PACAP38 indukálta hatás. Mindezekből arra lehet következtetni, hogy a PACAP38 membránreceptortól független módon fejt ki citotoxikus hatását. A különböző jelátviteli utak gátlása révén azt is igazolták, hogy a PACAP ezen hatása a PKA, PKC, MEK1/2, p38 és JNK kináztól független [Wojcieszak és Zawilska, 2014].

2. Célkitűzések

Ph.D. értekezésemben a PACAP lehetséges klinikai biomarker potenciáljának vizsgálatát tűztem ki célul reproduktív és patológiás folyamatokban:

2.1. A magzatvíz vizsgálata

A korábbi, tömegspektrometriás vizsgálataink során nem tudtuk igazolni a PACAP38 jelenlétét emberi magzatvízben, azonban a rendelkezésre álló, korábban részletezett szakirodalmi adatokból feltételezhető, hogy a PACAP38 jelen van ebben a testfolyadékban. Célunk volt tehát a PACAP38 jelenlétének igazolása és mennyiségének meghatározása a magzatvízben élettani várandósság magzati patológiától mentes eseteiben RIA-val.

2.2. Politraumatizált személyek vizsgálata

Politrauma esetén a korai időszakban való szoros monitorozás elengedhetetlen a célból, hogy az esetleges szövődményeket mielőbb, minél nagyobb hatékonysággal észleljük/megelőzzük. A klinikai gyakorlat több biomarker paralel monitorozása felé tolódott, így célul tűztük ki a betegek PACAP38 szintjeinek mérését a politraumát követő első öt napon, valamint annak vizsgálatát, hogy a PACAP38 alkalmazható-e biomarkerként és korrelálható-e más labormarkerekkel a korai poszttraumás időszakban.

2.3. A humán retinoblastoma vizsgálata

A PACAP38 és PAC1 receptor előfordulásáról emberi retinoblastoma szövettani mintákban nem érhető el szakirodalmi adat, így célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a retinoblastoma miatt eltávolított szemek műtéti preparátumaiban kimutatható-e a daganatban PACAP38 és PAC1 receptor expresszió, és megfigyelhető-e valamilyen változás ezek és a klinikopatológiai jellemzők között. Továbbá célul tűztük ki, hogy a humán Y-79 retinoblastoma sejteken vizsgáljuk a PACAP38 tumorelles hatását.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A magzatvíz vizsgálata

3.1.1. *Kutatásetikai háttér*

A vizsgálat protokollja az Orvos Világszövetség 2013. októberi közgyűlésén elfogadott Helsinkai Nyilatkozat módosított változatával, a Nemzetközi Egységesítési Konferencia által kidolgozott Helyes Klinikai Gyakorlat, valamint a hazai jogi szabályozásokkal harmonizálva került kivitelezésre, melyet a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottsága is jóváhagyott (PTE 4303/2011 és 6383/2018). A vizsgálatba történő bevonáskor – részletes szó- és írásbeli tájékoztatást követően – az érintett személyek írásos beleegyezésüket adták.

3.1.2. *Magzatvíz mintavétel*

A vizsgálatba 28 olyan várandós került bevonásra, akik magas (35 év feletti) életkor miatt a várandósság 15-19. hetében diagnosztikai amniocentesisen estek át a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján. A mintagyűjtés a rutin prae-natalis diagnosztikát nem zavarta, külön beavatkozásra nem volt szükség, ezáltal külön kockázatot nem jelentett, valamint az amniocentesis kockázati körébe tartozó események előfordulási gyakoriságát nem növelte. A kariotipizálás eredményei alapján, valamint a szülést követően kizárásra kerültek azon esetek, melyeknél bármilyen rendellenességre fény derült.

3.1.3. *Radioimmuno-assay (RIA)*

A magzatvíz-mintavételt követően 30 µl/ml peptidáz inhibitor (aprotinin) adtuk a mintákhoz és hűtve szállítottuk azokat a laboratóriumba, ahol lefagyasztottuk és feldolgozásig -70 °C-on tároltuk őket. A RIA mérés előtt a mintákat kioldottuk, majd lecentrifugáltuk (12000 rpm, 4 °C, 30 perc) és a felülúszókból történt a PACAP38-szerű (PACAP38-LI) immunreaktivitás meghatározása egy korábban kifejlesztett, számos tudományos közlemény metodikai alapját képező, specifikus és szenzitív módszerrel [Jakab és mtsai, 2004] az alábbiak szerint: A „88111-3”-as számú, Akira Arimura Professzor (Tulane University, New Orleans, USA) laboratóriumából származó PACAP38 antiszérum (melyet nyúlban termeltek, karbodiimides módszerrel konjugált

Cys²³-PACAP24-28 - borjú tireoglobulin antigén ellen) 1:10000 hígításban bizonyult a legeredményesebbnek a RIA kifejlesztése során. Tracerként saját laboratóriumban készült ¹²⁵I izotóppal jelzett, birka mono-¹²⁵I-PACAP24-38 C-terminális fragmenst használtunk, míg RIA standardként a teljes birka PACAP38 peptidet alkalmaztuk 0-1000 fmol/ml tartományban. A RIA tesztekét 1 ml, 0,05 mol/l koncentrációjú (pH=7,4) foszfát pufferben végeztük, mely 0,1 mol/l nátrium-kloridot, 0,25% (w/v) marha szérum albumint és 0,05% nátrium-azidot tartalmazott. A mintákat az összekeverést követően 48-72 óráig inkubáltuk 4 °C-on. Ezután az antitesthez kötött jelölt antigén frakciót elválasztottuk a szabad jelölt peptidektől a szeparáló oldat (100 ml desztillált vízben 10 g mosott szén, 1 g dextrán, 0,5 g zsírmentes tejpor) 100 µl-ének hozzáadásával és a minták lecentrifugálásával (3000 rpm, 4 °C, 15 perc), majd a felülúszókat leöntöttük és a csöveket itatóspapírral leitattuk. NZ310 típusú gamma-sugármérő segítségével megmértük a szénhez kötődött szabad peptidfrakció radioaktivitását, melyből következtethetünk az ellenanyaghoz kötött radioaktivitás értékére, majd a bemért ismert peptid-koncentrációk (standard minták) segítségével felvett kalibrációs görbéről az ismeretlen minták PACAP38 koncentrációja leolvasható volt.

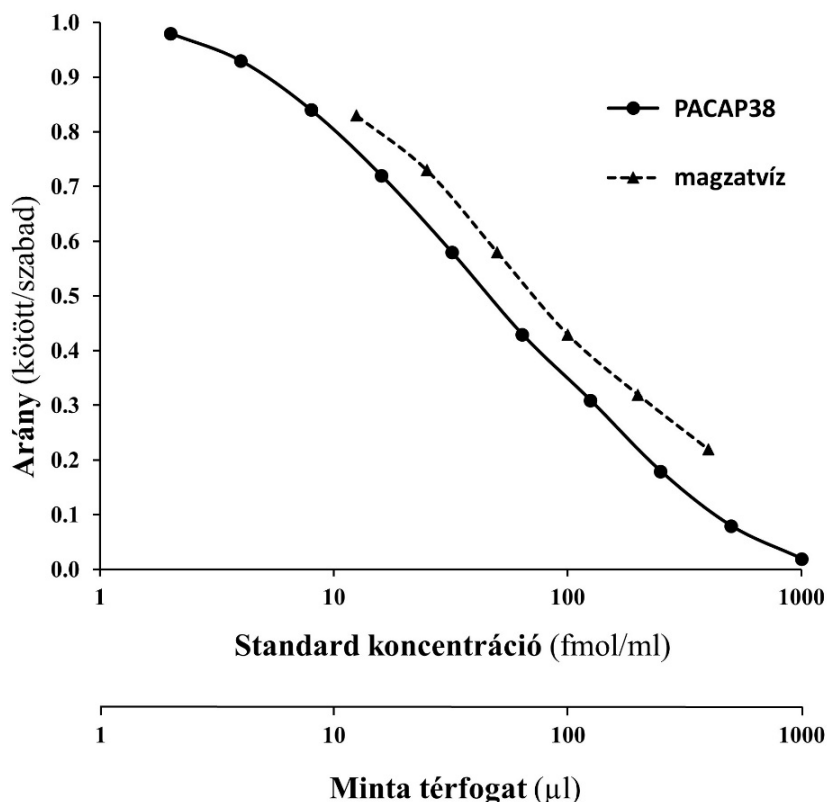
Az alkalmazott antiszérum intra- és inter-assay koefficiense 7,2% és 8,7% volt. A keresztreakciók vizsgálata során a használt antiszérum nem reagált sem a PACAP27-tel, sem a peptidcsalád egyéb tagjaival.

A módszer validálásának ellenőrzésére *cold recovery* tesztet végeztünk, ennek során négy magzatvíz mintának megmértük a PACAP38 koncentrációját, majd alacsony (50 fmol/ml), közepes (300 fmol/ml) és nagy (1000 fmol/ml) koncentrációjú PACAP38-at adtunk hozzá és ismét megmértük a PACAP38 koncentrációkat. A mért és várt koncentrációkból számoltuk ki a visszanyerési arányt, mely alacsony koncentrációjú PACAP38 esetén 83,8%, közepes koncentrációjú PACAP38 mellett 87,5%, nagy koncentrációjú PACAP38 esetén 84,8% volt (1. táblázat).

Minta	Minta + 50 fmol/ml PACAP38				Minta + 300 fmol/ml PACAP38			Minta + 1000 fmol/ml PACAP38		
	Várt (fmol/ml)	Várt (fmol/ml)	Mért (fmol/ml)	Visszanyerési arány %	Várt (fmol/ml)	Mért (fmol/ml)	Visszanyerési arány %	Várt (fmol/ml)	Mért (fmol/ml)	Visszanyerési arány %
1	312	362	296	81,8	612	529	86,4	1312	1130	86,1
2	423	473	412	87,1	723	652	90,2	1423	1423	80,8
3	618	668	540	80,8	918	771	84,0	1618	1618	88,1
4	870	920	785	85,3	1170	1047	89,5	1870	1870	84,2
Átlag ± szórás				83,3 ± 2,95	87,5 ± 2,87			84,8 ± 3,11		

1. táblázat. A RIA visszanyerési tesztjének eredményei négy magzatvíz minta esetén alacsony (50 fmol/ml), közepes (300 fmol/ml) és nagy (1000 fmol/ml) koncentrációjú PACAP38 hozzáadása mellett.

További validálási kísérletben a kiválasztott magzatvíz minta sorozatos hígítását használtuk a paralelitás megítélésére a RIA standardjával. Az analizált folyadékminták térfogata 12,5 és 400 µl között változott. A vizsgált magzatvízminta párhuzamos lefutásban gátolta a radioaktívan jelölt PACAP24-38 C-terminális fragmentumnak (RIA tracer) az antitesthez való kötődését a RIA analízis standardjaként használt PACAP38-hoz hasonlóan (7. ábra).



7. ábra. Az alkalmazott RIA paralelitásának vizsgálata. (A kötött/szabad frakciók arányának [függőleges tengely] változása a koncentráció [vízszintes tengely] függvényében.)

3.2. Politraumatizált személyek vizsgálata

3.2.1. Kutatásetikai háttér

A vizsgálat protokollja az Orvos Világszövetség 2013. októberi közgyűlésén elfogadott Helsinki Nyilatkozat módosított változatával, a Nemzetközi Egységesítési Konferencia által kidolgozott Helyes Klinikai Gyakorlat, valamint a hazai jogi szabályozásokkal harmonizálva került kivitelezésre, melyet a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottsága is jóváhagyott (PTE 422/2014 és 6383/2016). A vizsgálatba történő bevonáskor – részletes szóbeli és írásbeli tájékoztatást követően – az érintett személyek, vagy akadályoztatásuk esetén a legközelebbi hozzátartozójuk írásos beleegyezésüket adták.

3.2.2. A vizsgálat felépítése

A vizsgálatba 20 olyan politraumatizált beteg került előzetesen bevonásra, akik elsődleges ellátást követően a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet Intenzív Osztályán kerültek kezelésre az érvényben lévő Advanced Trauma Life Support (ATLS) irányelvek alapján. Felvételkor (első nap), majd a reggeli vérvételekkel párhuzamosan az 5. napig történt vérvétel az ellátáshoz is szükséges artériás kanülből. Minden vérminta esetén a szérum CRP és PCT, LAR és plazma PACAP38-LI meghatározás történt.

3.2.3. Bevonási és kizárási kritériumok

Bevonási kritérium a politrauma megléte volt, azaz 15-nél magasabb ISS érték. Kizárási kritériumok az alábbiak voltak:

- öt napnál rövidebb osztályos tartózkodás,
- tizennyolc év alatti életkor,
- ismert rosszindulatú daganatos alapbetegség,
- a normál immunválaszt befolyásoló alapbetegség vagy gyógyszeres terápia,
- súlyos, krónikus szervi betegségek (például végstádiumú veseelégtelenség, májzsugor, New York-i Kardiológus Társaság funkcionális klasszifikációja szívelégtelenségben (NYHA) szerinti 4-es stádiumú szívelégtelenség).

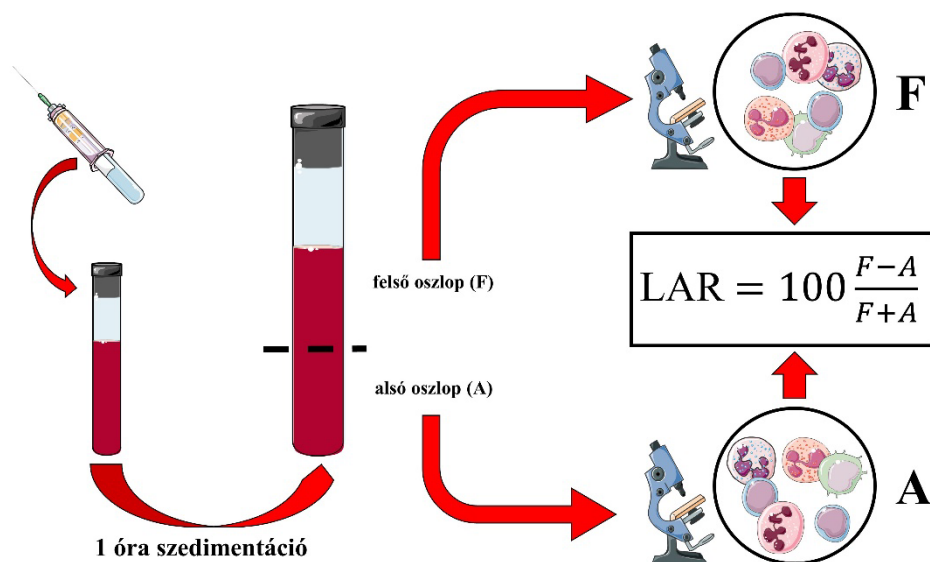
3.2.4. Mérési módszerek

3.2.4.1. CRP és PCT

A CRP és PCT meghatározása a napi rutin laboratóriumi monitorozás részeként a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetben történtek. A referencia érték a CRP esetén 5 mg/l, míg a PCT esetén 0,5 ng/ml alatt volt.

3.2.4.2. LAR

A LAR meghatározáshoz az artériás vért nátrium-citrátot tartalmazó „süllyedéses” kémcsőbe vettük, majd a kémcső oldalához kívülről illesztett vonalzó segítségével megmértük a teljes véroszlop hosszát, és annak felénél jelöltük a felezővonalat. Az egyórás szedimentációs időt követően a véroszlop felezővonalára feletti és alatti vért „vérképes” kémcsőbe injektáltuk, melyekben a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetben meghatározásra kerültek az egyes véroszlopokban - felső (F) és alsó (A) - a leukocyták száma. Ezt követően a $LAR=100(F-A)/(F+A)$ képlettel meghatározásra került az eredeti leukocytá szám százalékában azon a leukocyták száma, melyek az egyórás szedimentáció során felfelé átlépték (antiszedimentálódtak) a süllyedéses csőben lévő vérminta felezővonalát (8. ábra).



8. ábra. A LAR meghatározásának sematikus rajza (saját ábra). Az ábra egyes részeihez a Servier Medical Art képei kerültek felhasználásra a CC-BY-3.0 Unported licenz (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) feltételei alapján.

3.2.4.3. PACAP38

A PACAP38-LI meghatározásához a 3.1.3. fejezetben tárgyalt specifikus és szenzitív módszert alkalmaztuk.

3.2.5. Statisztikai módszerek

Statisztikai analízishez az SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) statisztikai program 21. számú verzióját használtuk. A vizsgált paraméterek napi kinetikájának elemzéséhez Spearman-féle rangkorrelációt használtunk és az eredményeket PlotsOfData-val [Postma és Goedhart, 2019] ábráztuk speciális hegedű-diagramok (jitter type of violin-plots) formájában. Az összes napra vonatkozó korrelációk vizsgálatához a szabad forráskódú R statisztikai program [Team R D C, 2010] rmcrr szoftvercsomagját [Bakdash és Marusich, 2017] használtuk és annak corrplot szoftvercsomagjával [Wei és Simko, 2017] ábráztuk a korrelációs mátrixot.

3.3. A retinoblastoma vizsgálata

3.3.1. Humán vizsgálat

3.3.1.1. Kutatásetikai háttér

A retrospektív vizsgálat a hazai jogi szabályozásokkal harmonizálva került kivitelezésre, melyet a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottsága is jóváhagyott (PTE 9188/2022).

3.3.1.2. Mintagyűjtés

Vizsgálatunk során 16 éves (2001. január és 2017. december közötti) periódusból gyűjtöttünk ki olyan betegeket, akik retinoblastoma miatt enucleation estek át. A betegek klinikai adatainak összegyűjtésén túlmenően a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Patológiai Intézetben fellelhető formalin fixált paraffinba ágyazott enucleatumokból új metszeteket készítettünk. A patológiai stádiummeghatározás az AJCC TNM (8. kiadású) klasszifikációja alapján történt [Mallipatna és mtsai, 2016]. A differenciáltság fokát négy szintű skálán osztályoztuk. A legjobban differenciált tumorokban fleurette-k vagy neuronális differenciálódás látható a daganat több mint felében (G1). Ezeket követték az olyan daganatok, melyekben Flexner-Wintersteiner és/vagy Homer Wright rozetták a daganat több, mint 50%-ában jelen voltak (G2). A következő grádus esetében előbbi rozetták ennél kevesebb arányban fordultak elő (G3), míg az utolsó kategóriába (G4) olyan daganatok kerültek, melyek rosszul differenciált sejteket tartalmaztak rozetták nélkül, vagy bennük kiterjedt anaplasias területek voltak jelen [Lochner és Couce, n.d.].

3.3.1.3. PACAP38 és PAC1 receptor immunhisztokémia

Formalin fixált paraffinba ágyazott szövetmintákból 3 µm-es metszeteket készítettünk rotációs mikrotómmal (Microm HM 325, Thermo Scientific, Ltd., Waltham, MA, USA). Deparaffinálás és felszálló alkoholsoron való átvezetést követően hőmérséklet indukálta antigénfeltárást végeztünk mikrohullámú sütőben (750 W, 15 perc) 1 mM citrát pufferben (pH=6,0). Szobahőmérsékletre hűlést követően a metszeteket 3x10 percig 0,1 M-os (pH=7,6) foszfát pufferelt sóoldattal (PBS) mostuk. Ezután a mintákat egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk PACAP38 ellenes antitesttel (T-4473, BMA Biomedicals, Ltd., Augst, Svájc) 1:500 és PAC1 receptor ellenes antitesttel

(AVR-003, Alomone Labs, Ltd., Jeruzsálem, Izrael) 1:125 hígításban. PBS-sel történő mosást követően a metszeteket 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk HISTOLS-AP-R (30,011.R500A, Hisztopatológia Kft., Pécs, Magyarország) nyúl eredetű elsődleges antitestekkel kompatibilis másodlagos peroxidázzal jelölt, polimer alapú előhívó rendszerrel. A mintákat PBS-sel mostuk, majd sötét környezetben HISTOLS Resistant AP-Red Chromogen/substrate System (30,019, Hisztopatológia Kft., Pécs, Magyarország) magenta színű előhívó rendszert alkalmaztunk. Tíz percnyi inkubációt követően a jelerősséget fénymikroszkóp mellett kontrolláltuk. Desztillált vízben mosva a metszeteket leállítottuk a folyamatot, majd az általános kontrasztfestési eljárást követően felszálló alkoholsorban víztelenítettünk. A metszeteket xilolban derítettük és permanens fedőanyaggal fedtük. Az elsődleges antitest kihagyásával immunjelet nem kaptunk (negatív kontroll). Belső pozitív kontrollként a szem daganatos folyamat által nem érintett struktúrái szolgáltak a rendelkezésre álló szakirodalom alapján [Patko és mtsai, 2022]. A metszeteket Panoramic MIDI II automata metszetszkennelrel (3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) digitalizáltuk és a képeket CaseViewer 2.3 program (3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) segítségével exportáltuk.

3.3.2. *In vitro* kísérlet

3.3.2.1. *Sejtkultúra*

Amerikai típusú (ATCC) Y-79 humán retinoblastoma sejtvonalat (Manassas, VA, USA) RPMI-1640 tápoldatban, 10% magzati borjú szérummal (FBS), 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnel kiegészítve tenyésztettük. A tenyésztő médiumot kétnaponta cseréltük. A kísérletek a médiumban, 5% széndioxid tartalmú, 95% páratartalmú, 37 °C-os közegben történő 24 órás inkubációt követően zajlottak. A sejtkultúra reagensek a Sigma-Aldrich cégtől (St. Louis, MO, USA) származtak.

3.3.2.2. *A sejtek életképességének vizsgálata*

Kolorimetriás MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid) teszttel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a sejtek életképességét vizsgáltuk különböző koncentrációjú PACAP38 (Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet, Szeged, Magyarország) kezelések hatására. A teszt során az élő sejtek mitokondriumaiba bejutott sárga színű MTT festéket a sejtek kék formazánná alakítják. A lyukakban mért abszorbancia az élő sejtek számával arányos. A PACAP38 daganatsejtek túlélésre kifejtett hatását 96 lyukú

tenyésztőedényben (4000 sejt/100 µl médium/lyuk) vizsgáltuk. Tizenkettő lyuk szolgált kontrollként (PACAP38 kezelésben nem részesült), míg 6-6 lyuk 10 µl PACAP38 kezelést kapott az alábbi koncentrációkban: 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 6 µM PACAP38. Ezeket szérumentes médiummal 100 µl térfogatra egészítettük ki. Huszonnégy órás inkubációt követően 10 µl 5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot adtunk a mintákhoz, így a végső koncentráció 0,45 mg/ml. További 4 óra termosztátban való inkubálást követően a kék formazán festék-partikulumokat lyukanként 100 µl dimetil-szulfoxidban újra feloldottuk. Harminc perc rázatást követően az abszorbanciát ELISA leolvasó (Dialab Kft., Budapest, Magyarország) segítségével 630 nm hullámhosszon megmértük, amely arányos volt az élő sejtek számával. Minden kísérletet háromszor ismételtünk.

3.3.2.3. Statisztikai módszerek

A statisztikai analízishez egytényezős varianciaanalízis (ANOVA) vizsgálatot végeztünk, majd Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk a GraphPad Prism 9.5.0. verziójú szoftver (GraphPad Software LLC, San Diego, CA, USA) segítségével. Az adatokat átlag±szórás (SD) jellemzésével grafikusán ábrázoltuk.

4. Eredmények

4.1. A magzatvíz vizsgálat

Csak anyai és magzati patológiától mentes várandósságok kerültek be a végső vizsgálatba, így a kezdeti 28 mintából 7 eset kizárásra került (ezeknél különböző jellegű magzati patológiák igazolódtak). A 15. gesztációs hétből kettő, a 16. gesztációs hétből öt, a 17. gesztációs hétből öt, a 18. gesztációs hétből hat, míg a 19. gesztációs hétből három minta állt rendelkezésre. PACAP38-LI mind a 21 mintában kimutatható volt, az átlagos PACAP38-LI 401 fmol/ml (szórás 142 fmol/ml).

4.2. Politraumatizált személyek vizsgálata

4.2.1. Demográfiai és klinikai adatok

Az 5. nap végére hét személyt zártunk ki (egy elhunyt, kettőt 3 napot követően emittáltunk, kettőnek súlyos társbetegségei igazolódtak és kettő visszavonta részvételi szándékát), így 13 politraumatizált személy (2 nő és 11 férfi; átlag életkor: $45,92 \pm 15,78$ év) maradt a vizsgálatban, akiknek a főbb demográfiai és klinikai adatai (sérülések súlyossága, prognosztikai pontrendszerek) a 2. táblázatban olvashatók.

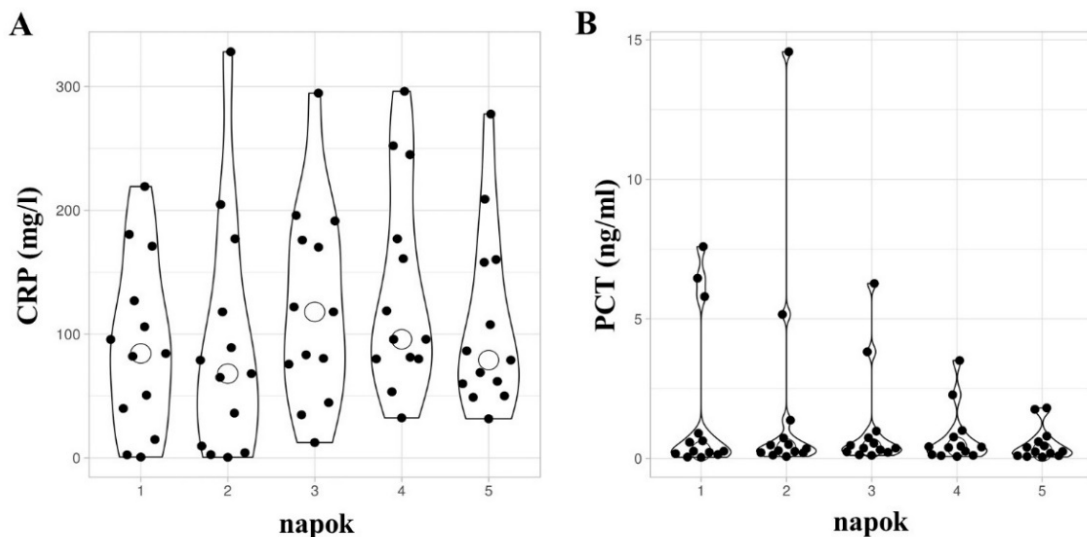
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
nem	férfi	férfi	férfi	nő	férfi	férfi	nő	férfi	férfi	férfi	férfi	férfi	férfi
életkor (év)	61	52	45	17	61	40	39	73	45	25	59	31	49
ISS	18	18	20	22	22	22	28	30	34	34	38	38	38
SOFA	14	10	15	9	10	10	14	18	11	16	18	18	18
APACHE II	10	14	8	2	12	15	18	14	9	12	9	14	14

2. táblázat. A kutatásban résztvevő személyek főbb demográfiai és klinikai adatai. (APACHE II: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II = egy prognosztikai pontrendszer; ISS: Injury Severity Score = sérülési súlyossági index; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment = egy prognosztikai pontrendszer).

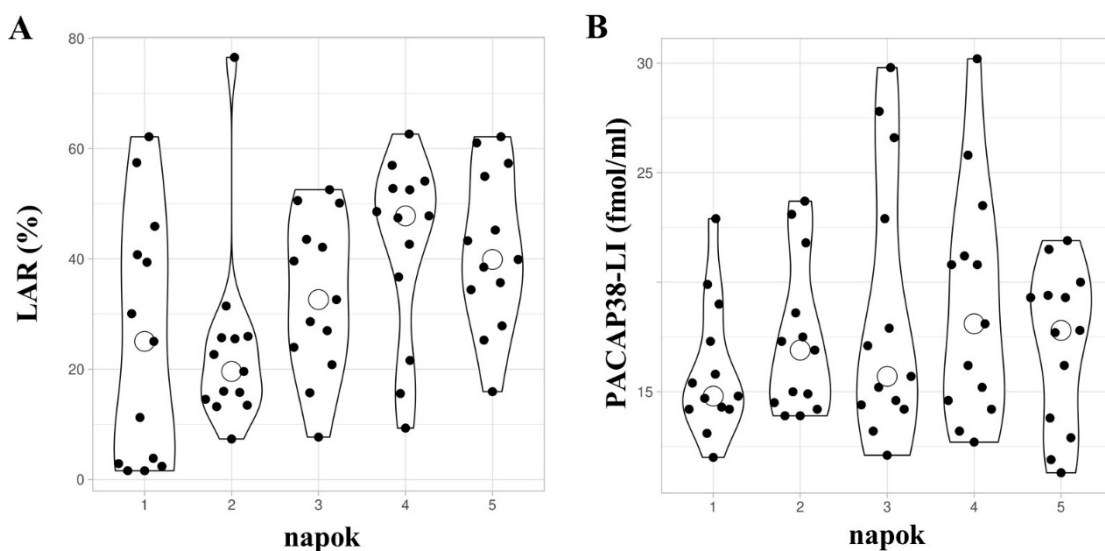
A vizsgálatban bennmaradó személyeknél egy esetben sem alakult ki szövődmény.

4.2.2. A laborparaméterek napi változása

Az egyes napokat tekintve nem volt statisztikailag szignifikáns különbség egyik vizsgált paraméter esetében sem, azonban a CRP esetében emelkedő tendenciát figyeltünk meg. A LAR és PACAP38-LI esetében is hasonló emelkedő tendenciát láttunk, mely a 4. napon tetőzött (9-10. ábrák).



9. ábra. A CRP (C-reaktív protein) és PCT (procalcitonin) koncentrációinak változása az első öt napon. A fekete pontok az individuális értékeket, az üres körök az adatsor mediánját ábrázolják. A hegedű diagramokat PlotsofData programmal szerkesztettük. (CRP: C-reaktív protein; PCT: procalcitonin).



10. ábra. A LAR (leukocita antiszedimentációs ráta) és PACAP38-LI koncentrációinak változása az első öt napon. A fekete pontok az individuális értékeket, az üres körök az adatsor mediánját ábrázolják. A hegedű diagramokat PlotsofData programmal szerkesztettük. (LAR: leukocita antiszedimentációs ráta; PACAP38-LI: PACAP38-szerű immunreaktivitás).

4.2.3. A laborparaméterek korrelációi

Az egyes napokat külön tekintve, a 4. napon statisztikailag szignifikáns, gyenge pozitív korrelációt találtunk a LAR és a CRP ($r = 0,572$, $p = 0,041$) és a PACAP38-LI és CRP ($r = 0,581$, $p = 0,037$) között (3. táblázat).

		LAR	CRP	PCT	PACAP38-LI
LAR	korrelációs együttható	1,000			
	szignifikancia	-			
CRP	korrelációs együttható	0,572*	1,000		
	szignifikancia	0,041	-		
PCT	korrelációs együttható	0,126	0,514	1,000	
	szignifikancia	0,681	0,072	-	
PACAP38-LI	korrelációs együttható	0,426	0,581*	0,393	1,000
	szignifikancia	0,146	0,037	0,184	-

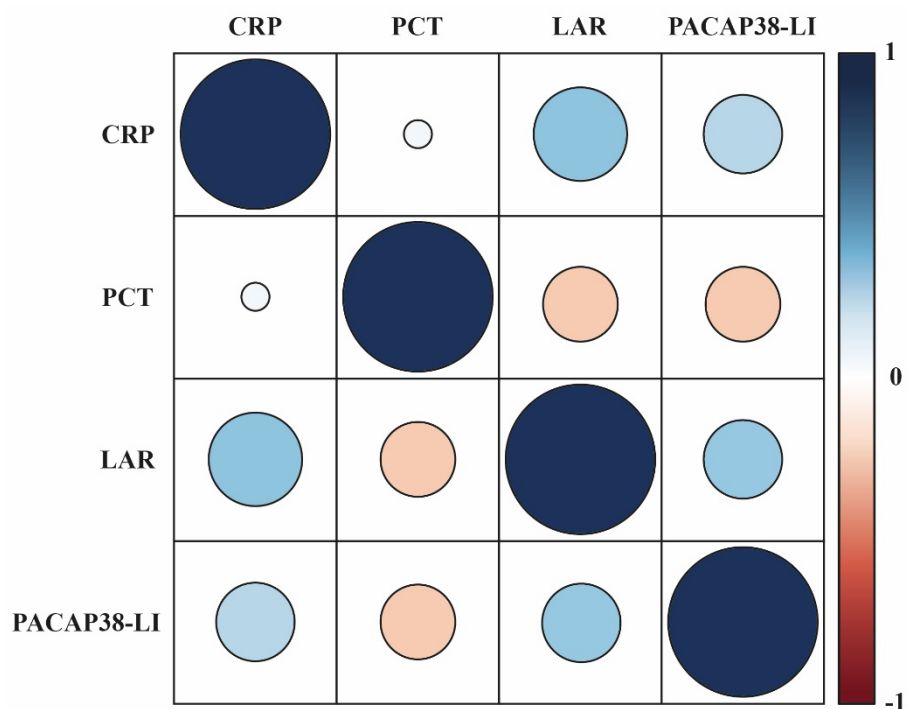
3. táblázat. A negyedik nap laboreredményeinek korrelációi. A korrelációk meghatározásához Spearman analízist végeztünk. * $p < 0,05$. (CRP: C-reaktív protein; LAR: leukocytá antiszedimentációs ráta; PCT: prokalcitonin; PACAP38-LI: PACAP38-szerű immunreaktivitás).

Az 5. napon statisztikailag szignifikáns, mérsékelten erős pozitív korreláció volt kimutatható a PACAP38-LI és a CRP között ($r = 0,776$, $p = 0,002$) (4. táblázat).

		LAR	CRP	PCT	PACAP38-LI
LAR	korrelációs együttható	1,000			
	szignifikancia	-			
CRP	korrelációs együttható	0,231	1,000		
	szignifikancia	0,448	-		
PCT	korrelációs együttható	-0,003	0,523	1,000	
	szignifikancia	0,993	0,067	-	
PACAP38-LI	korrelációs együttható	0,300	0,776*	0,194	1,000
	szignifikancia	0,320	0,002	0,525	-

4. táblázat. Az ötödik nap laboreredményeinek korrelációi. A korrelációk meghatározásához Spearman analízist végeztünk. * $p < 0,01$. (CRP: C-reaktív protein; LAR: leukocytá antiszedimentációs ráta; PCT: prokalcitonin; PACAP38-LI: PACAP38-szerű immunreaktivitás).

Az összes nap együttes vizsgálata során statisztikailag szignifikáns, gyenge pozitív korrelációt igazoltunk a PACAP38-LI és a LAR ($r = 0,279$, $p = 0,042$), valamint a LAR és a CRP ($r = 0,406$, $p = 0,002$) között (11. ábra).



11. ábra. Az összes napra vonatkoztatott grafikusán ábrázolt korrelációs mátrix. Kék körök a pozitív korrelációt, a piros körök a negatív korrelációt mutatják. A körök mérete és a színek intenzitása a korrelációs együtthatóval arányos. A minták összehasonlításához ismételt korrelációs tesztet végeztünk az R statisztikai program rmcorr csomagjával, majd az eredményeket corplot alkalmazásával ábrázoltuk. (CRP: C-reaktív protein; LAR: leukocytá antiszedimentációs ráta; PCT: prokalcitonin; PACAP38-LI: PACAP38-szerű immunreaktivitás).

4.3. A retinoblastoma vizsgálata

4.3.1. Demográfiai és klinikai adatok

Tanulmányunkba hét gyermeket vontunk be: egy lányt és hat fiút. Az enucleatio időpontjában az átlagéletkor $16,3 \pm 10,5$ hónap (a legfiatalabb gyermek 4,1 hónapos, a legidősebb 36,3 hónapos) volt. Kettő eset kivételével a jobb szem volt érintett, és nem fordult elő bilaterális eset. Három esetben a daganat a superotemporalis kvadránsban helyezkedett el, míg egy esetben a daganat a látóidegfő közelében helyezkedett el. A többi esetekben a daganat az egész szemgolyót kitöltötte, így az eredeti kiindulási pontot nem lehetett biztonsággal meghatározni. Egy eset kivételével a daganatok monofokálisak voltak. Az egy multifokális retinoblastoma esetében csírasejtes mutáció nem volt igazolható, azonban egy monofokális esetben családi halmozódás (*RBI* mutáció) igazolódott. Hisztomorfológiailag három esetben rosszul differenciált daganat képe mutatkozott rozetták nélküli (G4), míg egy esetben a tumor kevesebb, mint felében Homer Wright rozettákat láttunk (G3). A maradék három esetben a rozetták a daganat több, mint 50%-ban jelen voltak (G2), két esetben Homer Wright rozetták, egy esetben Flexner-Wintersteiner rozetták formájában. A daganatokban különböző kiterjedésű nekrozisok mellett – kettő minta kivételétől eltekintve – meszesedések is észlelhetők voltak. A Mib-1 jelölési index viszonylag magas volt, minden esetben meghaladta az 50%-ot. A tanulmányban részt vevő betegek főbb adatait az 5. táblázat tartalmazza.

eset	nem	életkor (hónap)	érintett szem	fokáltság	csírasejtes mutáció	differenciáltság	stádium
1	férfi	9,9	jobb	mono	nem	G4	pT2
2	nő	16,6	jobb	multi	nem	G2	pT2
3	férfi	9,3	jobb	mono	nem	G2	pT2
4	férfi	4,1	jobb	mono	igen	G2	pT2
5	férfi	36,3	bal	mono	nem	G3	pT2
6	férfi	19,9	bal	mono	nem	G4	pT2
7	férfi	18,3	jobb	mono	nem	G4	pT2

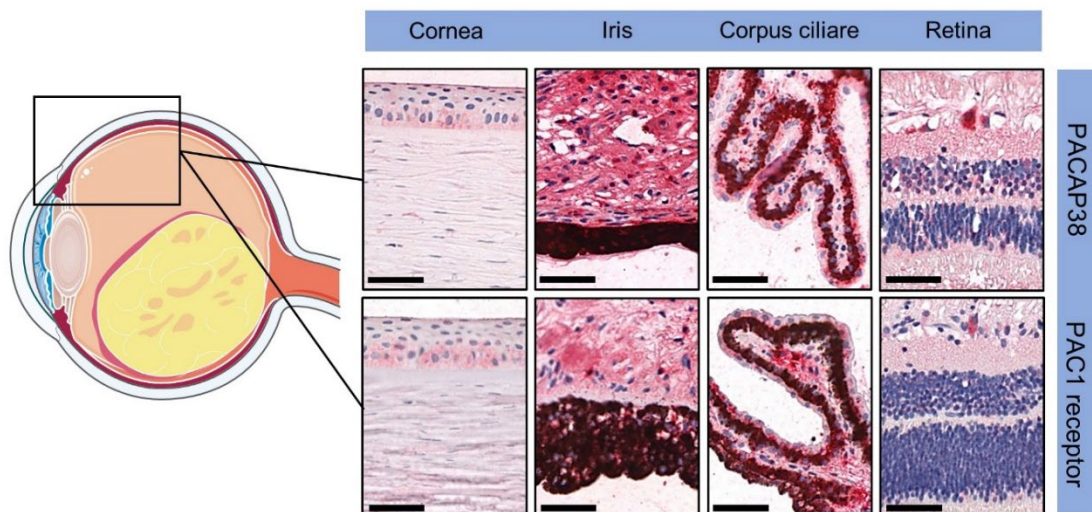
5. táblázat. A retinoblastomás betegek főbb demográfiai és klinikai adatai. A differenciáltság fokát négyesintű skálán osztályoztuk, ahol G1 jól differenciált, míg G4 rosszul differenciált/anaplasticus tumort jelent. Minden betegnél pT2 stádiumot (minimális nervus opticus vagy choroidalis invasio) állapítottunk meg.

4.3.2. PACAP38 és PAC1 receptor immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a munkacsoportunk által korábban leírtaknak [Patkó és mtsai, 2022] megfelelően a szemek ép, daganatos elváltozással nem érintett részein különböző intenzitású PACAP38 és PAC1 receptor immunpozitivitást észleltünk, melyek ezáltal pozitív belső kontrollként szolgáltak (6. táblázat, 12. ábra).

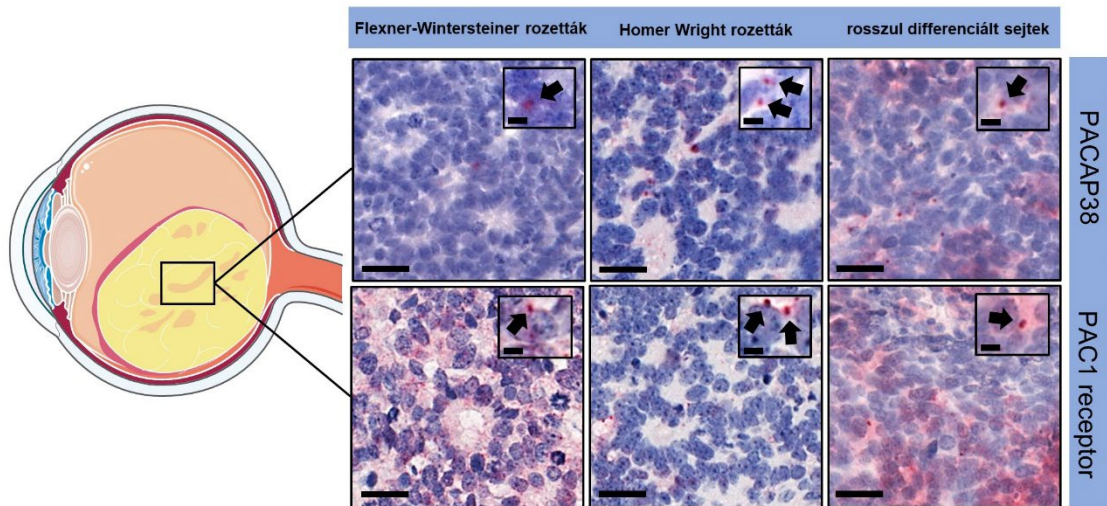
	Struktúra	Immunpozitivitás mértéke	
		PACAP38	PAC1 receptor
cornea	epithelium	közepes	közepes
	endothelium	közepes	közepes
iris	pigment epithelium	erős	erős
	stroma	közepes	közepes
	m. sphincter pupillae	közepes	gyenge
	m. dilatator pupillae	erős	közepes
corpus ciliare	pigment epithelium	erős	erős
	nem pigment epithelium	közepes	közepes
	stroma	gyenge	közepes
retina	ganglionsejt réteg	közepes	közepes
	belső rostos réteg	közepes	közepes
	belső szemcsés réteg	gyenge	gyenge
	pigment epithelium	közepes	közepes
n. opticus	neuropil	közepes	közepes

6. táblázat. A szemek ép részeinek PACAP38 és PAC1 receptor immunprofilja.



12. ábra. A szemek ép részeinek PACAP38 és PAC1 receptor immunprofilja (saját ábra). Nagyítás: 200x; arány mérték: 50 μ m. Az ábra egyes részeihez a Servier Medical Art képei kerültek felhasználásra a CC-BY-3.0 Unported licenz (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) feltételei alapján.

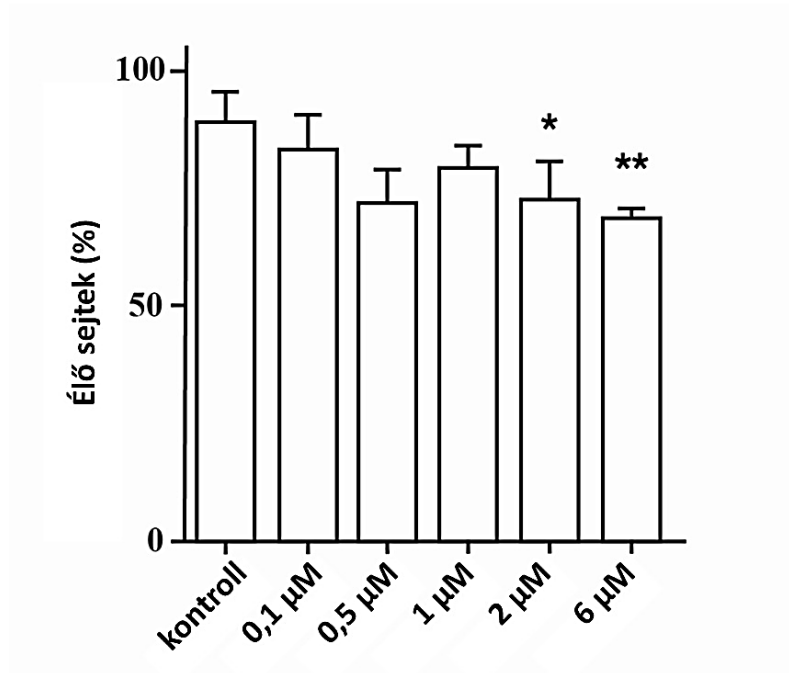
A retinoblastomák esetén – szövettani megjelenéstől függetlenül – minden mintában az találtuk, hogy a daganatsejtekben csupán perinukleáris, pontszerű (dot-like) immunpozitivitás volt jelen mind PACAP38, mind PAC1 receptor esetén (13. ábra).



13. ábra. A retinoblastomák PACAP38 és PAC1 receptor immunprofilja (saját ábra). Nagyítás a nagy képeken 400x, a kis képeken 700x; arány mérték a nagy képeken 20 μm , a kis képeken 5 μm . A perinukleáris pozitivitást fekete nyilak jelzik. Az ábra egyes részeihez a Servier Medical Art képei kerültek felhasználásra a CC-BY-3.0 Unported licenz (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) feltételei alapján.

4.3.3. *In vitro* kísérlet

Az egytényezős ANOVA szignifikáns különbséget jelzett a sejtek túlélésében a kezelési csoportok között ($F = 5,165$, $p = 0,0047$). Dunnett-féle *post hoc* teszt statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatott ki a kontrollcsoport, valamint a 2 μM PACAP38-kezelt (átlagok különbsége: 16,5; 95% CI [1,471; 31,52]; $p = 0,035$) és a 6 μM PACAP38-kezelt (átlagok különbsége: 20,38; 95% CI [8,488; 32,26]; $p = 0,0053$) csoportok között. Bár a 0,5 μM PACAP38-kezelt csoportban az átlagok különbsége nagyságrendileg hasonló (17,09) volt a 2 μM PACAP38-kezelt csoportéhoz, azonban nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a kontrollcsoportéhoz képest (95% CI [-1,290; 35,48], $p = 0,0653$) (14. ábra).



14. ábra. A PACAP38 kezelés hatása az Y-79 sejtek túlélésére (átlag % \pm szórás). Egytényezős ANOVA, post hoc Dunnett analízis. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a kontroll csoporthoz viszonyítva.

5. Megbeszélés

5.1. A magzatvíz vizsgálat

A magzatvíz minták vizsgálata során először igazoltuk, hogy PACAP38-LI jelen van az emberi magzatvízben élettani várandósság során a 15-19. gesztációs hetekben. Korábban az emberi magzatvízben tömegspektrometriás vizsgálattal nem sikerült igazolnunk a PACAP38 jelenlétét [Brubel és mtsai, 2011]. A látszólagos ellentmondás jelen vizsgálatunk és a korábbi kutatásunk eredménye között az alkalmazott vizsgálatok eltérő módszertanával és ebből eredően eltérő érzékenységgel magyarázható, mivel tömegspektrometria esetén a natív fehérjét tudtuk volna kimutatni, így, ha annak módosult formája van jelen, vagy másik molekulához kötődik, a vizsgálat negatív eredményt mutat. Azonban RIA esetén az alkalmazott antiszérum képes felismerni a módosult szerkezetű vagy egyéb molekulához kapcsolt PACAP38 kötőhelyeit. Jelenleg még nem ismert, hogy az emberi magzatvízben a PACAP38 módosult formában, vagy egyéb molekulához kapcsolódva van-e jelen. Ennek megállapításához további vizsgálatok lennének szükségesek. A rendelkezésre álló szakirodalmi adatok azonban azt sugallják, hogy inkább utóbbi lehetőség a valószínű, mivel az jól ismert, hogy a PACAP38 a plazmában cöruoplazminhoz kötődik [Tams és mtsai, 1999], és ismert, hogy a magzatvízben is jelen van a cöruoplazmin [Cho és mtsai, 2007]. Az anyatej és csecsemőtápszerek vizsgálata során is megfigyeltük, hogy az extenzív hidrolízisen átesett hipoallergén tápszerekben magasabb PACAP38-LI volt kimutatható a nem hidrolizált tápszerekhez képest, mely arra utal, hogy a PACAP38 hidrolízis során leválhatott a hordozó molekulájáról [Csanaky és mtsai, 2013].

A PACAP38 fontos szereppel bír a reprodukcióban [Kanasaki és mtsai, 2016; Koppán és mtsai, 2022] és a PACAP38 hiánya az in vivo adatok alapján különböző fejlődési rendellenességekhez vezet [Allais és mtsai, 2007; Farkas és mtsai, 2017; Józsa és mtsai, 2018], azonban pontos szerepe még nem ismert a magzatvízben. Jövőbeli célul tűztük ki a PACAP38 szerepének vizsgálatát különböző fejlődési rendellenességek praenatalis diagnosztikája esetén.

5.2. Politraumatizált személyek vizsgálata

Tanulmányunkban a PACAP38 szintek változását, valamint annak konvencionális (CRP, PCT) és nem konvencionális (LAR) markerekkel való korrelációját vizsgáltuk politraumatizáltak esetében a politraumát követő első öt napon. A vizsgálati időtartamot azért határoztuk meg öt napban, mivel az irodalmi adatok szerint a politraumát követő 5. napra a DAMP-indukálta SIRS már elérte a csúcspontját és csökkenő tendenciát mutat, amennyiben nem alakulnak ki komplikációk [Keel és Trentz, 2005]. Szövődményt egyik esetben sem tapasztaltunk.

5.2.1. A laborparaméterek kinetikájának vizsgálata

A PACAP38 szintek tekintetében nem volt statisztikailag szignifikáns összefüggés megállapítható a vizsgált öt napban, azonban a negyedik napig enyhén emelkedő tendenciát figyeltünk meg. A klinikai gyakorlatban több példa is mutatja, hogy az egyes laborértékek kinetikájának is fontos szerepe lehet mind a diagnosztikai, mind akár a terápiás döntések meghozatalában. Jól ismert, hogy a PACAP38 féléletideje a plazmában rendkívül alacsony (3-10 perc [Birk és mtsai, 2007; Li és mtsai, 2007]). Ebből kifolyólag az általunk észlelt, negyedik napig emelkedő plazma koncentrációk csakis másodlagos mechanizmusokkal magyarázhatók, melyek a politraumát követően kialakult SIRS elleni válaszreakció részeként a PACAP38 antiinflammatoricus, citoprotektív profiljába jól beleilleszthetők. Korábbi humán tanulmányok is hasonló hipotézissel éltek a tartósan emelkedett PACAP38 koncentrációk kapcsán [Bukovics és mtsai, 2014; Jiang és mtsai, 2016]. Emiatt a PACAP38 szint monitorozása hasznos információval szolgálhat a pro- és antiinflammatoricus folyamatok egyensúlya szempontjából. In vitro és in vivo vizsgálatok igazolták, hogy a PACAP gátolja a proinflammatoricus ágensek, például IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α és NO szekrécióját az aktivált makrofágokban, valamint serkenti a gyulladáscsökkentő hatású IL-10 termelődését, ezáltal részt vesz a pro- és antiinflammatoricus folyamatok szabályozásában. Továbbá igazolták azt is, hogy a PACAP-nak szerepe van a fehérvérsejtek aktivációjában, migrációjában is [Delgado, 2016; Delgado és mtsai, 2003; Delgado, Martinez és mtsai, 1999; Delgado, Munoz-Elias és mtsai, 1999].

A CRP értékeket tekintve a PACAP38-hoz hasonlóan szintén nem volt statisztikailag szignifikáns összefüggés igazolható az első öt napon, csupán a PACAP38-cal párhuzamos kinetikát észleltünk. A nem specifikus CRP emelkedés

politrauma esetén gyakran látott jelenség, melynél a paraméter kinetikája jó információval szolgál a szövethárosodás hatására kibontakozó SIRS evolúciójáról [Ciriello és mtsai, 2013].

A PCT esetén nem észleltünk határérték feletti kiugrást. A PCT relatíve gyors kinetikát mutat. Számos tanulmányban leírták, hogy az emelkedett szérumban PCT specifikusabban és szenzitívebben jelzi a bakteriális infekciókat a CRP-nél [Wacker és mtsai, 2013]. A szisztémás bakteriális és gombás fertőzések magasabb PCT emelkedéssel járnak, mint a lokális fertőzések, ugyanakkor virális fertőzésekben nem megbízható. Sőt, emelkedett CRP és PCT értékek jelen lehetnek fertőzés nélkül is, például nagyobb szövethárosító hatás (trauma, műtét) vagy keringésleállás esetén is. Kimutatták, hogy nagyobb műtéti beavatkozásokat követően a PCT megemelkedhet, a csúcs az első posztoperatív napon észlelhető, majd szepszis hiányában rövid idő alatt normalizálódik értéke [Clec'h és mtsai, 2004; Mimos és mtsai, 1998; Schuetz és mtsai, 2010; Sponholz és mtsai, 2006]. Habár a szisztémás fertőzések nagyobb és gyorsabb PCT emelkedéssel jár(hat)nak, a klinikai gyakorlatban a PCT kinetikájának vizsgálata gyakrabban jobb indikátornak bizonyul fertőzések kapcsán, mint önmagában a laborérték nagysága [Trásy és mtsai, 2016]. Általánosságban elmondható, hogy a legtöbb esetben szepszis komplikáció hiányában a PCT határérték alatt marad [Gregoriano és mtsai, 2020], mely tanulmányunk eredményeivel is összhangban áll.

LAR esetében a PACAP38-hoz hasonló tendenciát észleltünk, tehát statisztikailag szignifikáns összefüggést nem találtunk. Ugyanakkor ez a LAR kinetika jól beleilleszthető a korábbi tanulmányok eredményeibe, melyek azt találták, hogy a LAR a fehérvérsejtek aktivációjának indikátora. A magasabb LAR értékek nagyobb számú aktivált leukocytát jelentenek, emiatt ezen betegeknek nagyobb az esélyük a túlélésre azokkal szemben, akiknél nem figyelhető meg a LAR értékek emelkedése [Bogár és mtsai, 2006; Loibl és mtsai, 2021; Molnár és mtsai, 2010; Rozanovic és mtsai, 2016].

5.2.2. A laborparaméterek korrelációinak vizsgálata

Az egyes napokat külön tekintve csak a negyedik és az ötödik napokon észleltünk statisztikailag szignifikáns eltéréseket. A negyedik napon gyenge pozitív korreláció igazolódott a PACAP38-LI és CRP szintek között, mely az ötödik napra már közepes erősségű volt. A PACAP38-LI és CRP párhuzamos emelkedése nagy valószínűséggel a

politraumát követően kialakuló SIRS elleni endogén válaszreakcióval magyarázható, mivel a PACAP-nak jól ismert a potens antiinflammatoricus hatása.

A napok együttes értékelése során statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk a PACAP38-LI és LAR értékek között. A politraumát követően meginduló multimodális immunfolyamat kezdete a SIRS, mely fokozott leukocyta aktivációval jár és ezt követi az ellenregulációs folyamat. A PACAP38-LI és LAR közötti korreláció magyarázható a PACAP antiinflammatoricus hatásával ezen ellenregulációs folyamat során.

5.2.3. Összegzés

A PACAP számos szervben/szövetben előfordul, többek között az immunrendszer szerveiben is, mint például a csecsemőmirigy, csontvelő, lép és nyirokcsomók. Számos immunsejten igazolták a PAC1 receptor jelenlétét, bár a PACAP pontos funkciója még nem ismert ezekben a sejtekben. Ugyanakkor a PACAP szerepe jól ismert az immunsejtek érésében, motilitásában és az immunfagocitózisban. A korábban ismertetett immunregulációs, stressz-tengelyen érvényesülő, valamint általános antiinflammatoricus és citoprotektív hatásai miatt feltételezzük, hogy a PACAP fontos szereppel bír a politraumát követő homeosztázis fenntartásában/szabályozásában, mely során a trauma indukálta proinflammatoricus folyamatok mérséklése révén a CARS-ban vesz részt.

Tanulmányunk kis elemszáma miatt pilot study-nak tekinthető. A későbbiekben nagyobb elemszámú, több klinikai paramétert involváló vizsgálatot tervezünk, valamint terveink között szerepel az is, hogy hosszabb időtartamban vizsgáljuk a komplikációmentes és szövődményes eseteket. Távlabbi terveink között szerepel, hogy a politraumán belül további, különböző etiológiájú alcsoportokat is vizsgáljunk.

5.3. A retinoblastoma vizsgálata

5.3.1. Humán vizsgálat

A vizsgálatunk első részében retinoblastoma miatt eltávolított szemek PACAP38 és PAC1 receptor immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el. Mind a PACAP38, mind a PAC1 receptor kapcsán a daganatmentes, ép szemterületeken a munkacsoportunk által korábban leírtaknak [Patkó és mtsai, 2022] megfelelő immunhisztokémiai mintázatot találtunk. Ezek a belső kontrollok ezáltal az immunhisztokémia vizsgálatok megfelelő hatékonyságát igazolták. Elsőként írtuk le a PACAP38 és PAC1 receptor expressziós mintázatát humán retinoblastomában, mely fokális, perinukleáris, pontszerű immunpozitivitásként jellemezhető. Nem találtunk különbséget a PACAP38 és a PAC1 receptor expresszió mintázataiban sem a demográfia, sem a klinikai és hisztopatológiai jellemzőkkel összefüggésben.

Számos emberi daganatban ismert már, hogy a PACAP38 és a PAC1 receptor expressziója eltér a kiindulási „normál” sejttypushoz képest. Ez megnyilvánulhat abban, hogy a PACAP38 és a PAC1 receptor expressziója közösen, egyirányba változik (over- vagy underexpresszió), azonban ellentétes irányba történő változásuk is ismert. Az emlő invazív ductalis adenocarcinomájában mind a PACAP38, mind a PAC1 receptor overexpresszióját figyelték meg [García-Fernández és mtsai, 2004, 2005], míg hasnyálmirigyrákok esetében a ductalis adenocarcinomákban [Ferencz és mtsai, 2019] és az insulinomákban [Ferencz és mtsai, 2021] a PACAP38 és PAC1 receptor expressziója csökkent. A papillaris pajzsmirigy carcinomákban a daganatsejtekben a PACAP38 overexpressziója mellett ugyanakkor érdemi PAC1 receptor expresszió nem mutatkozott, utóbbi tehát a normál sejttypushoz képes alul expresszáldott [Bárdosi és mtsai, 2016]. A rendelkezésre álló tanulmányok egyik közös limitációja, hogy az azokban megfigyelt PACAPerg rendszert érintő változások biológiai jelentőségéről nincs érdemi adat, így pontosan nem ismert, hogy a PACAPerg rendszernek szerepe van-e (és ha igen, akkor milyen) a tumorgenezisben, vagy a látott eltérések mintegy másodlagos következményei a tumoros elfajulásnak.

A retinoblastoma annyiban különbözik a korábban ismertetett daganatoktól, hogy annak pontos kiindulási sejttypusa még nem ismert [Bremner és Sage, 2014], emiatt nem volt lehetőségünk összehasonlítani a PACAP38 és a PAC1 receptor expressziós mintázatát a daganatban és a „kiindulási” sejttypusban. Figyelembe véve a betegek

képképző vizsgálata során felmerült INL eredetet [Rootman és mtsai, 2013], valamint a kísérletes eredmények által azonosított pálcika eredetet [Kooi és mtsai, 2015; Liu H és mtsai, 2020; Liu J és mtsai, 2021; Singh és mtsai, 2018, 2022; Xu és mtsai, 2009, 2014], megkíséreltük az ezekkel a területekkel való összehasonlítást, ami azonban érdemi eredményre nem vezetett, mivel adott szövettani rétegekben negatív, illetve gyenge immunhisztokémiai jelet észleltünk a daganatmentes területeken. Pozitivitás esetén adott rétegben levő ugyanazon sejttípusok esetén is változó intenzitást tapasztaltunk, azonban konstans megfigyelés volt, hogy a PACAP38, illetve PAC1 receptor expresszió mintázata perinukleáris, pontszerű jellegű volt, csakúgy, mint a retinoblastoma esetében.

Olianas és munkatársai (1996) az Y-79 sejtvonal vizsgálata során azt írták le, hogy a sejtek közel 60%-a expresszál PAC1 receptort a sejtmembránon. Ezzel szemben a mi vizsgálatunk a PAC1 receptor esetében membránra lokalizált eloszlást nem mutatott, csupán pontszerű, perinukleáris pozitivitás volt észlelhető. Ez a humán vizsgálatok és az in vitro rendszerek közötti különbségre hívja fel a figyelmet.

5.3.2. In vitro kísérlet

Kísérletünk második felében igazoltuk, hogy 0,1 μM , 0,5 μM és 1 μM PACAP38 kezelésnek nincs hatása az Y-79 sejtek túlélésére. Ezen megfigyelésünk a meglévő szakirodalmi adatokba jól beleilleszthető, azokat kiegészíti, mivel a korábbi kutatásokban a PACAP38 ezirányú hatását csak 0,1 nM és 0,1 μM között vizsgálták. Ugyanebben a korai kísérletben találták azt is, hogy a PACAP38 1-5 μM -os koncentrációk között dóziszfüggő citotoxikus hatással bír [Wojcieszak és Zawilska, 2014]. Eredményeink alapján a PACAP38 1 μM -os koncentrációban nem, csupán 2 és 6 μM -os koncentrációban bizonyult citotoxikusnak. Az, hogy a PACAP38 hogyan fejti ki citotoxikus hatását az Y-79 sejtvonalban még nem pontosan ismert, azonban az előbbieken idézett szerzőpáros felvetette, hogy ez a hatás membránreceptor-független módon jöhet létre, mivel kísérletükben kettő, membránpenetráló, membrán PAC1 receptorhoz nem kötő analóg is képes volt citotoxikus hatást létrehozni a PKA, PKC, MEK1/2, p38 és JNK jelátviteli utak érintése nélkül [Wojcieszak és Zawilska, 2014]. Korábbi kutatások is azt találták, hogy a PACAP38 képes direkt transzlokációval, endocitózissal a citoplazmába jutni, különösen mikromoláris koncentrációk esetén. Továbbá megfigyelték, hogy az intracelluláris PACAP38 nem teljes egészében degradálódik enzimatisz uton, így képes az intracelluláris, intranukleáris PAC1

receptorok aktiválására [Doan és mtsai, 2012; Yu és mtsai, 2013]. A retinoblastomában általunk látott perinukleáris, pontszerű pozitivitás ezen in vivo megfigyelést megerősíti.

5.3.3. Összegzés

Az emberi daganatok sejttani eredetének tisztázása, beleértve a retinoblastomát is, és annak megértése, hogy a celluláris/subcelluláris környezet hogyan befolyásolja a daganatok kialakulását és fejlődését hozzájárulna új megelőző és korai intervenciós terápiák kifejlesztéséhez vagy a meglévők javításához. A PACAP38 számos élettani és patofiziológiai folyamatban érintett, és egyre növekvő mennyiségű tudományos bizonyíték utal arra, hogy a PACAP38 diagnosztikai és terápiás potenciállal rendelkezik bizonyos betegségekben. Tanulmányunkban először írtuk le az emberi retinoblastoma PACAP38 és PAC1 receptor immunreaktivitásának eloszlását, és megerősítettük a mikromoláris PACAP38 koncentrációk citotoxikus hatását Y-79 sejtekben. Az a tény, hogy a PACAP38 és PAC1 receptor jelen van az emberi retinoblastomában, és hogy a PACAP38 és annak analógjainak citotoxikus hatása volt a retinoblastoma sejtekre (ugyanakkor a normál intraocularis szövetekben sejtvédő hatással bírnak), a PACAP38 és analógjai potenciális jövőbeli terápiás szerepét vetíti előre.

Kísérletünk több limitációval bír. Először is meg kell említeni a kis elemszámot, mely miatt nem lehet általánosítani azt, hogy minden humán retinoblastoma az általunk fentebb leírt immunhisztokémiai profillal bír. Az elemszámmal összefüggésben áll, hogy nem tudtuk a teljes tumordifferenciálódási spektrumot lefedni, mivel nem volt olyan daganatunk, melyben fleurette-*ket* vagy neuronális differenciálódást detektáltunk volna a daganat több, mint felében. A retinoblastoma nem tisztázott sejttani eredete okán jelenleg nem tudunk következtetést levonni abból, hogy a PACAPerg rendszer érintett-e a daganatos elváltozásban, és ha igen, akkor milyen módon. Ezeket további, jövőbeli kísérletekkel szükséges tisztázni. Az in vitro kísérletünk limitációjaként értékelhető, hogy csak egy sejtvonalat használtunk. A jövőben több, eltérő retinoblastoma sejtvonal vizsgálata lenne indokolt a PACAP38 mellett egyéb, PACAP analógokkal.

6. Új eredmények összefoglalása

I. Emberi magzatvíz kapcsán egy szenzitív és specifikus vizsgálmódszerrel bizonyítottuk, hogy:

- az emberi magzatvízben jelen van a PACAP38 és
- élettani várandósságban, magzati patológia hiányában az emberi magzatvíz átlagos PACAP38-LI koncentrációja 401 fmol/ml (szórás 142 fmol/ml).

II. Politrauma kapcsán először írtuk le, hogy szövődmény hiányában:

- az első öt napon a plazma PACAP38-LI koncentrációkban statisztikailag szignifikáns különbség nincs, csupán emelkedő tendencia látható, mely a 4. napon tetőzik;
- az egyes napokat tekintve
 - a 4. napon statisztikailag szignifikáns, gyenge pozitív korreláció van a LAR és a CRP, valamint a PACAP38-LI és CRP között,
 - az 5. napon statisztikailag szignifikáns, mérsékelten erős pozitív korreláció van a PACAP38-LI és a CRP között.
- az összes nap együttes értékelése során statisztikailag szignifikáns, gyenge pozitív korreláció igazolható a PACAP38-LI és a LAR, valamint a LAR és a CRP között.

III. Retinoblastoma kapcsán:

- igazoltuk, hogy a humán retinoblastoma mind PACAP38-at, mind PAC1 receptort expresszál.
- leírtuk, hogy az emberi retinoblastomában – az in vitro adatokkal ellentétben – nincs membrán PAC1 receptor expresszió, csupán perinukleáris, pontszerű immunpozitivitás észlelhető mind a PAC1 receptor, mind a PACAP38 esetében.
- az Y-79 sejtvonal esetén a korábbi irodalmi adatokkal
 - egyezően azt találtuk, hogy nanomoláris koncentrációban a PACAP38-nak nincs hatása a sejtek túlélésére;
 - szemben azt találtuk, hogy a PACAP38 nem 1 μ M, hanem 2 μ M koncentráció felett citotoxikus ezen a sejtvonalon.

7. Irodalomjegyzék

- Abad, C., & Tan, Y. V. (2018). Immunomodulatory roles of PACAP and VIP: Lessons from knockout mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, *66*(1), 102–113. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1150-y>
- Al-Keilani, M. S., Almomani, B. A., Al-Sawalha, N. A., Al Qawasmeh, M., & Jaradat, S. A. (2022). Significance of serum VIP and PACAP in multiple sclerosis: An exploratory case-control study. *Neurological Sciences*, *43*(4), 2621–2630. <https://doi.org/10.1007/s10072-021-05682-5>
- Allais, A., Burel, D., Isaac, E. R., Gray, S. L., Basille, M., Ravni, A., Sherwood, N. M., Vaudry, H., & Gonzalez, B. J. (2007). Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *The European Journal of Neuroscience*, *25*(9), 2604–2618. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05535.x>
- AlRawahi, A. N., AlHinai, F. A., Doig, C. J., Ball, C. G., Dixon, E., Xiao, Z., & Kirkpatrick, A. W. (2019). The prognostic value of serum procalcitonin measurements in critically injured patients: A systematic review. *Critical care*, *23*(1), 390. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2669-1>
- Alsharif, H., Helmi, H., & Maktabi, A. (2019). Histopathological characteristics and classification for prognostic indicators. In H. M. Alkatan (Ed.), *Retinoblastoma - Past, Present and Future*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89410>
- Arimura, A., Somogyvári-Vigh, A., Miyata, A., Mizuno, K., Coy, D. H., & 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>
- Arimura, A. (1998). Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *The Japanese Journal of Physiology*, *48*(5), 301–331. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.48.301>
- Arora, J., Mendelson, A. A., & Fox-Robichaud, A. (2023). Sepsis: network pathophysiology and implications for early diagnosis. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *324*(5), R613–R624. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00003.2023>
- Atlasz, T., Babai, N., Kiss, P., Reglodi, D., Tamás, A., Szabadfi, K., Tóth, G., Hegyi, O., Lubics, A., & Gábrriel, R. (2007). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *General and Comparative Endocrinology*, *153*(1-3), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.12.022>
- Atlasz, T., Szabadfi, K., Kiss, P., Babai, N., Koszegi, Z., Tamas, A., Reglodi, D., & Gabriel, R. (2008). PACAP-mediated neuroprotection of neurochemically identified cell

types in MSG-induced retinal degeneration. *Journal of Molecular Neuroscience*, 36(1-3), 97–104. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9059-5>

Atlasz, T., Szabadfi, K., Kiss, P., Marton, Z., Griecs, M., Hamza, L., Gaal, V., Biro, Z., Tamas, A., Hild, G., Nyitrai, M., Toth, G., Reglodi, D., & Gabriel, R. (2011). Effects of PACAP in UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, 43(1), 51–57. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9392-3>

Atlasz, T., Szabadfi, K., Kiss, P., Tamas, A., Toth, G., Reglodi, D., & Gabriel, R. (2010). Evaluation of the protective effects of PACAP with cell-specific markers in ischemia-induced retinal degeneration. *Brain Research Bulletin*, 81(4-5), 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.09.004>

Atlasz, T., Szabadfi, K., Reglodi, D., Kiss, P., Tamás, A., Tóth, G., Molnár, A., Szabó, K., & Gábrriel, R. (2009). Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its fragments on retinal degeneration induced by neonatal monosodium glutamate treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163, 348–352. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03650.x>

Atlasz, T., Vaczy, A., Werling, D., Kiss, P., Tamas, A., Kovacs, K., Fabian, E., Kvarik, T., Mammel, B., Danyadi, B., Lokos, E., & Reglodi, D. (2016). Protective effects of PACAP in the retina. In D. Reglodi & T. Andrea (Eds.), *In Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide—PACAP* (pp. 501–527). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_30

Bakdash, J. Z., & Marusich, L. R. (2017). Repeated measures correlation. *Frontiers in Psychology*, 8, 456. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.00456>

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. *Journal of Neuroimmunology*, 263(1-2), 159–161. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.08.012>

Barichello, T., Generoso, J. S., Singer, M., & Dal-Pizzol, F. (2022). Biomarkers for sepsis: More than just fever and leukocytosis—a narrative review. *Critical Care*, 26(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03862-5>

Bardosi, S., Bardosi, A., Nagy, Z. S., & Reglodi, D. (2016). Expression of PACAP and PAC1 receptor in normal human thyroid gland and in thyroid papillary carcinoma. *Journal of Molecular Neuroscience*, 60(2), 171–178. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0823-7>

Battaglini, D., De Rosa, S., & Godoy, D. A. (2023). Crosstalk between the nervous system and systemic organs in acute brain injury. *Neurocritical Care*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12028-023-01725-1>

Birk, S., Sitarz, J. T., Petersen, K. A., Oturai, P. S., Kruuse, C., Fahrenkrug, J., & Olesen, J. (2007). The effect of intravenous PACAP38 on cerebral hemodynamics in healthy

volunteers. *Regulatory Peptides*, 140(3), 185–191.
<https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.12.010>

Blechman, J., & Levkowitz, G. (2013). Alternative splicing of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor PAC1: Mechanisms of fine tuning of brain activity. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 55. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00055>

Bogar, L., Molnar, Z., Kenyeres, P., & Tarsoly, P. (2006). Sedimentation characteristics of leucocytes can predict bacteraemia in critical care patients. *Journal of Clinical Pathology*, 59(5), 523–525. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.033035>

Bogar, L., & Tarsoly, P. (2006). Gravity sedimentation of leukocytes is partially independent from erythrocyte sedimentation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 34(3), 439–445.

Bogar, L., Tarsoly, P., & Jakso, P. (2002). Characteristics of light and heavy polymorphonuclear leukocytes. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 27(2), 149–153.

Borba, J. C., Henze, I. P., Silveira, M. S., Kubrusly, R. C., Gardino, P. F., de Mello, M. C., Hokoç, J. N., & de Mello, F. G. (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) can act as determinant of the tyrosine hydroxylase phenotype of dopaminergic cells during retina development. *Brain research. Developmental Brain Research*, 156(2), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.02.016>

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. *European Journal of Endocrinology*, 160(4), 561–565. <https://doi.org/10.1530/EJE-08-0911>

Bourgault, S., Vaudry, D., Botia, B., Couvineau, A., Laburthe, M., Vaudry, H., & Fournier, A. (2008). Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides*, 29(6), 919–932. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.01.022>

Brace R. A. (1997). Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 40(2), 280–289. <https://doi.org/10.1097/00003081-199706000-00005>

Brace, R. A., & Cheung, C. Y. (2014). Regulation of amniotic fluid volume: evolving concepts. In L. Zhang & C. Ducsay (Eds.), *Advances in Fetal and Neonatal Physiology: Proceedings of the Center for Perinatal Biology 40th Anniversary Symposium* (pp. 49–68). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1031-1_5

Bremner, R., & Sage, J. (2014). Cancer: The origin of human retinoblastoma. *Nature*, 514(7522), 312–313. <https://doi.org/10.1038/nature13748>

Brubel, R., Boronkai, A., Reglodi, D., Racz, B., Nemeth, J., Kiss, P., Lubics, A., Toth, G., Horvath, G., Varga, T., Szogyi, D., Fonagy, E., Farkas, J., Barakonyi, A., Bellyei, S., Szereday, L., Koppan, M., & Tamas, A. (2010). Changes in the expression of pituitary

adenylate cyclase-activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 42(3), 450–458. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9374-5>

Brubel, R., Reglodi, D., Jambor, E., Koppan, M., Varnagy, A., Biro, Z., Kiss, P., Gaal, V., Matkovits, A., Farkas, J., Lubics, A., Bodis, J., Bay, C., Veszpremi, B., Tamas, A., Nemeth, J., & Mark, L. (2011). Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 46(2), 189–194. <https://doi.org/10.1002/jms.1884>

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>

Czegledi, L., Tamas, A., Borzsei, R., Bagoly, T., Kiss, P., Horvath, G., Brubel, R., Nemeth, J., Szalontai, B., Szabadfi, K., Javor, A., Reglodi, D., & Helyes, Z. (2011). Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *General and Comparative Endocrinology*, 172(1), 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.12.012>

Cernuda-Morollón, E., Riesco, N., Martínez-Camblor, P., Serrano-Pertierra, E., García-Cabo, C., & Pascual, J. (2016). No change in interictal PACAP levels in peripheral blood in women with chronic migraine. *Headache*, 56(9), 1448–1454. <https://doi.org/10.1111/head.12949>

Chantada, G., Doz, F., Antoneli, C. B., Grundy, R., Clare Stannard, F. F., Dunkel, I. J., Grabowski, E., Leal-Leal, C., Rodríguez-Galindo, C., Schwartzman, E., Popovic, M. B., Kremens, B., Meadows, A. T., & Zucker, J. M. (2006). A proposal for an international retinoblastoma staging system. *Pediatric Blood and Cancer*, 47(6), 801–805. <https://doi.org/10.1002/pbc.20606>

Cho, C.-K. J., Shan, S. J., Winsor, E. J., & Diamandis, E. P. (2007). Proteomics analysis of human amniotic fluid. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6(8), 1406–1415. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700090-MCP200>

Ciriello, V., Gudipati, S., Stavrou, P. Z., Kanakaris, N. K., Bellamy, M. C., & Giannoudis, P. V. (2013). Biomarkers predicting sepsis in polytrauma patients: Current evidence. *Injury*, 44(12), 1680–1692. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2013.09.024>

Clec'h, C., Ferriere, F., Karoubi, P., Fosse, J. P., Cupa, M., Hoang, P., & Cohen, Y. (2004). Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock. *Critical Care Medicine*, 32(5), 1166–1169. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000126263.00551.06>

Csanaky, K., Banki, E., Szabadfi, K., Reglodi, D., Tarcai, I., Czegledi, L., Helyes, Z., Ertl, T., Gyarmati, J., Szanto, Z., Zapf, I., Sipos, E., Shioda, S., & Tamas, A. (2012).

Changes in PACAP immunoreactivity in human milk and presence of PAC1 receptor in mammary gland during lactation. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(3), 631–637. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9779-4>

Csanaky, K., Reglődi, D., Bánki, E., Tarcai, I., Márk, L., Helyes, Z., Ertl, T., Gyarmati, J., Horváth, K., Sántik, L., & Tamás, A. (2013). Examination of PACAP38-like immunoreactivity in different milk and infant formula samples. *Acta Physiologica Hungarica*, 100(1), 28–36. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.100.2013.1.2>

Csontos, C. (2022). Polytraumatizált beteg intenzív terápiája. In L. Bogár (Ed.), *Aneszteziológia és intenzív terápia* (4th ed., pp. 657-663). Medicina Könyvkiadó Zrt.

D'Alessandro, A., Cervia, D., Catalani, E., Gevi, F., Zolla, L., & Casini, G. (2014). Protective effects of the neuropeptides PACAP, substance P and the somatostatin analogue octreotide in retinal ischemia: a metabolomic analysis. *Molecular bioSystems*, 10(6), 1290–1304. <https://doi.org/10.1039/c3mb70362b>

Dautzenberg, F. M., Mevenkamp, G., Wille, S., & Hauger, R. L. (1999). N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. *Journal of Neuroendocrinology*, 11(12), 941–949. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1999.00411.x>

Das, D., Bhattacharjee, K., Barthakur, S. S., Tahiliani, P. S., Deka, P., Bhattacharjee, H., Deka, A., & Paul, R. (2014). A new rosette in retinoblastoma. *Indian Journal of Ophthalmology*, 62(5), 638–641. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.129786>

Delgado, M. (2016). Immunobiology of the pituitary adenylate cyclase-activating peptide. In D. Reglodi & A. Tamas (Eds.), *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide—PACAP* (pp. 691–708). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_40

Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., Juarranz, M. G., Leceta, J., Ganea, D., & Gomariz, R. P. (2003). PACAP in immunity and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 992, 141–157. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb03145.x>

Delgado, M., Martinez, C., Pozo, D., Calvo, J. R., Leceta, J., Ganea, D., & Gomariz, R. P. (1999). Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. *Journal of Immunology*, 162(2), 1200–1205.

Delgado, M., Munoz-Elias, E. J., Gomariz, R. P., & Ganea, D. (1999). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *Journal of Immunology*, 162(3), 1707–1716.

Denes, V., Hideg, O., Nyisztor, Z., Lakk, M., Godri, Z., Berta, G., Geck, P., & Gabriel, R. (2019a). The neuroprotective peptide PACAP1-38 contributes to horizontal cell development in postnatal rat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 60(2), 770–778. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-25719>

- Denes, V., Geck, P., Mester, A., & Gabriel, R. (2019b). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: 30 years in research spotlight and 600 million years in service. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1488. <https://doi.org/10.3390/jcm8091488>
- Desai, B. J., & Burrin, J. M. (1994). PACAP-38 positively regulates glycoprotein hormone alpha-gene expression in placental cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 99(1), 31–37. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90143-0)
- Dimaras, H., Kimani, K., Dimba, E. A., Gronsdahl, P., White, A., Chan, H. S., & Gallie, B. L. (2012). Retinoblastoma. *Lancet*, 379(9824), 1436–1446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61137-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61137-9)
- Dimaras, H., Corson, T. W., Cobrinik, D., White, A., Zhao, J., Munier, F. L., Abramson, D. H., Shields, C. L., Chantada, G. L., Njuguna, F., & Gallie, B. L. (2015). Retinoblastoma. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15021. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.21>
- Doan, N. D., Chatenet, D., Létourneau, M., Vaudry, H., Vaudry, D., & Fournier, A. (2012). Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(4), 940–949. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.02.001>
- Dobson, G. P., Morris, J. L., & Letson, H. L. (2022). Immune dysfunction following severe trauma: A systems failure from the central nervous system to mitochondria. *Frontiers in Medicine*, 9, 968453. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.968453>
- Dow, R. C., Bennie, J., & Fink, G. (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP)-38 is released into hypophysial portal blood in the normal male and female rat. *The Journal of Endocrinology*, 142(1), R1–R4. <https://doi.org/10.1677/joe.0.142r001>
- Dungan, J. S., Klugman, S., Darilek, S., Malinowski, J., Akkari, Y. M. N., Monaghan, K. G., Erwin, A., Best, R. G., & ACMG Board of Directors. (2023). Noninvasive prenatal screening (NIPS) for fetal chromosome abnormalities in a general-risk population: An evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 25(2), 100336. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2022.11.004>
- Elefsiniotis, I. S., Ketikoglou, I., Kafiri, G., Pantazis, K. D., Moulakakis, A., & Mavrogiannis, C. (2003). Plasma pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) levels in chronic hepatitis B patients under lamivudine treatment. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(11), 1209–1216. <https://doi.org/10.1097/00042737-200311000-00010>
- Eneman, B., Freson, K., van den Heuvel, L., van Hoyweghen, E., Collard, L., Vande Walle, J., van Geet, C., & Levtchenko, E. (2015). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficiency associated with increased platelet count and aggregability in

- nephrotic syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *13*(5), 755–767. <https://doi.org/10.1111/jth.12891>
- Eslami, R., Parnow, A., Pairo, Z., Nikolaidis, P., & Knechtle, B. (2021). The effects of two different intensities of aerobic training protocols on pain and serum neuro-biomarkers in women migraineurs: a randomized controlled trial. *European Journal of Applied Physiology*, *121*(2), 609–620. <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04551-x>
- Fang, Y., Ren, R., Shi, H., Huang, L., Lenahan, C., Lu, Q., Tang, L., Huang, Y., Tang, J., Zhang, J., & Zhang, J. H. (2020). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a promising neuroprotective peptide in stroke. *Aging and Disease*, *11*(6), 1496–1512. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0626>
- Farini, D., Puglianiello, A., Mammi, C., Siracusa, G., & Moretti, C. (2003). Dual effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on prostate tumor LNCaP cells: Short- and long-term exposure affect proliferation and neuroendocrine differentiation. *Endocrinology*, *144*(4), 1631–1643. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221009>
- Farkas, J., Sandor, B., Tamas, A., Kiss, P., Hashimoto, H., Nagy, A. D., Fulop, B. D., Juhasz, T., Manavalan, S., & Reglodi, D. (2017). Early neurobehavioral development of mice lacking endogenous PACAP. *Journal of Molecular Neuroscience*, *61*(4), 468–478. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0887-z>
- Ferencz, S., Reglodi, D., Kaszás, B., Bardosi, A., Tóth, D., Vekony, Z., Vicena, V., Karádi, O., & Kelemen, D. (2019). PACAP and PAC1 receptor expression in pancreatic ductal carcinoma. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10971>
- Ferencz, S., Tóth, D., Kaszás, B., Bardosi, S., Vicena, V., Karádi, O., Reglodi, D., & Kelemen, D. (2021). PACAP and PAC1 receptor expression in human insulinomas. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *27*(3), 1719–1728. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10204-0>
- Findley, T. O., Parchem, J. G., Ramdaney, A., & Morton, S. U. (2023). Challenges in the clinical understanding of genetic testing in birth defects and pediatric diseases. *Translational Pediatrics*, *12*(5), 1028–1040. <https://doi.org/10.21037/tp-23-54>
- Fitzsimmons, E. D., & Bajaj, T. (2022). Embryology, Amniotic Fluid. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Fulop, B. D., Sandor, B., Szentleky, E., Karanyicz, E., Reglodi, D., Gaszner, B., Zakany, R., Hashimoto, H., Juhasz, T., & Tamas, A. (2019). Altered notch signaling in developing molar teeth of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, *68*(3), 377–388. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1146-7>
- Ganea, D., & Delgado, M. (2002). Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, *13*(3), 229–237. <https://doi.org/10.1177/154411130201300303>

García-Fernández, M. O., Bodega, G., Ruíz-Villaespesa, A., Cortés, J., Prieto, J. C., & Carmena, M. J. (2004). PACAP expression and distribution in human breast cancer and healthy tissue. *Cancer Letters*, 205(2), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.10.008>

García-Fernández, M. O., Collado, B., Bodega, G., Cortés, J., Ruíz-Villaespesa, A., Carmena, M. J., & Prieto, J. C. (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide/vasoactive intestinal peptide receptors in human normal mammary gland and breast cancer tissue. *Gynecological Endocrinology*, 20(6), 327–333. <https://doi.org/10.1080/09513590500098240>

Gourlet, P., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Rathé, J., De Neef, P., & Robberecht, P. (1996). C-terminally shortened pituitary adenylate cyclase-activating peptides (PACAP) discriminate PACAP I, PACAP II-VIP1 and PACAP II-VIP2 recombinant receptors. *Regulatory Peptides*, 62(2-3), 125–130. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(96\)00010-9](https://doi.org/10.1016/0167-0115(96)00010-9)

Gourlet, P., Woussen-Colle, M. C., Robberecht, P., de Neef, P., Cauvin, A., Vandermeers-Piret, M. C., Vandermeers, A., & Christophe, J. (1991). Structural requirements for the binding of the pituitary adenylate-cyclase-activating peptide to receptors and adenylate-cyclase activation in pancreatic and neuronal membranes. *European Journal of Biochemistry*, 195(2), 535–541. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15734.x>

Gray, S., & Cline, D. L. (2019). PACAP: Regulator of the stress response. In G. Fink (Ed.), *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 279–291). Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813146-6.00021-7>

Gray, S. L., Yamaguchi, N., Vencová, P., & Sherwood, N. M. (2002). Temperature-sensitive phenotype in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology*, 143(10), 3946–3954. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220401>

Gregoriano, C., Heilmann, E., Molitor, A., & Schuetz, P. (2020). Role of procalcitonin use in the management of sepsis. *Journal of Thoracic Disease*, 12(Suppl 1), S5–S15. <https://doi.org/10.21037/jtd.2019.11.63>

Gupta, A. K., & Meena, J. P. (2020). A narrative review of retinoblastoma and recent advances in its management. *Pediatric Medicine*, 3, 20. <https://doi.org/10.21037/pm-20-79>

Han, P., Caselli, R. J., Baxter, L., Serrano, G., Yin, J., Beach, T. G., Reiman, E. M., & Shi, J. (2015). Association of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with cognitive decline in mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. *JAMA neurology*, 72(3), 333–339. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.3625>

Han, P., Liang, W., Baxter, L. C., Yin, J., Tang, Z., Beach, T. G., Caselli, R. J., Reiman, E. M., & Shi, J. (2014). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is reduced in

- Alzheimer disease. *Neurology*, 82(19), 1724–1728. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000417>
- Hanci, F., Kilinc, Y. B., Kilinc, E., Turay, S., Dilek, M., & Kabakus, N. (2021). Plasma levels of vasoactive neuropeptides in pediatric patients with migraine during attack and attack-free periods. *Cephalalgia*, 41(2), 166–175. <https://doi.org/10.1177/0333102420957588>
- Horvath, G., Brubel, R., Kovacs, K., Reglodi, D., Opper, B., Ferencz, A., Szakály, P., Laszlo, E., Hau, L., Kiss, P., Tamas, A., & Racz, B. (2010). Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 43(1), 67–75. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9428-8>
- Horvath, G., Reglodi, D., Fabian, E., & Opper, B. (2022). Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide on Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4953. <https://doi.org/10.3390/ijms23094953>
- Hosoya, M., Kimura, C., Ogi, K., Ohkubo, S., Miyamoto, Y., Kugoh, H., Shimizu, M., Onda, H., Oshimura, M., & Arimura, A. (1992). Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1129(2), 199–206. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90488-1](https://doi.org/10.1016/0167-4781(92)90488-1)
- Hu, S., Huang, S., Ma, J., Li, D., Zhao, Z., Zheng, J., Li, M., Wang, Z., Sun, W., & Shi, X. (2021). Correlation of decreased serum pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide levels with non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 689939. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.689939>
- Hui, L., & Bianchi, D. W. (2011). Cell-free fetal nucleic acids in amniotic fluid. *Human Reproduction Update*, 17(3), 362–371. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq049>
- Huri, M., Di Tommaso, M., & Seravalli, V. (2023). Amniotic fluid disorders: From prenatal management to neonatal outcomes. *Children*, 10(3), 561. <https://doi.org/10.3390/children10030561>
- Jakab, B., Reglodi, D., Józsa, R., Hollósy, T., Tamás, A., Lubics, A., Lengvári, I., Oroszi, G., Szilvássy, Z., Szolcsányi, J., & Németh, J. (2004). Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 61(1-2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.03.002>
- Jenkins, M., Seasely, A. R., & Subramaniam, A. (2022). Prenatal genetic testing 1: screening tests. *Current Opinion in Pediatrics*, 34(6), 544–552. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000001172>
- Jiang, L., Wang, W. H., Dong, X. Q., Yu, W. H., Du, Q., Yang, D. B., Wang, H., & Shen, Y. F. (2016). The change of plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide levels after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurologica Scandinavica*, 134(2), 131–139. <https://doi.org/10.1111/ane.12522>

- Józsa, G., Fülöp, B. D., Kovács, L., Czibere, B., Szegeczki, V., Kiss, T., Hajdú, T., Tamás, A., Helyes, Z., Zákány, R., Reglódi, D., & Juhász, T. (2021). Lack of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) disturbs callus formation. *Journal of Molecular Neuroscience*, *71*(8), 1543–1555. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01448-z>
- Józsa, G., Szegeczki, V., Pálfi, A., Kiss, T., Helyes, Z., Fülöp, B., Cserháti, C., Daróczy, L., Tamás, A., Zákány, R., Reglódi, D., & Juhász, T. (2018). Signalling alterations in bones of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene deficient mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 2538. <https://doi.org/10.3390/ijms19092538>
- Kanasaki, H., Oride, A., Tselmeg, M., Sukhbaatar, U., & Kyo, S. (2016). Role of PACAP and its PACAP type I receptor in the central control of reproductive hormones. In D. Reglodi & A. Tamas (Eds.), *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide—PACAP* (pp. 375–387). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_22
- Kanasaki, H., Purwana, I. N., 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. *Gynecological Endocrinology*, *29*(6), 583–587. <https://doi.org/10.3109/09513590.2013.788624>
- Keel, M., & Trentz, O. (2005). Pathophysiology of polytrauma. *Injury*, *36*(6), 691–709. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2004.12.037>
- Keenan, W. T., Rupp, A. C., Ross, R. A., Somasundaram, P., Hiriyanna, S., Wu, Z., Badea, T. C., Robinson, P. R., Lowell, B. B., & Hattar, S. S. (2016). A visual circuit uses complementary mechanisms to support transient and sustained pupil constriction. *eLife*, *5*, e15392. <https://doi.org/10.7554/eLife.15392>
- Kimura, C., Ohkubo, S., Ogi, K., Hosoya, M., Itoh, Y., Onda, H., Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R. R., & Stibbs, H. H. (1990). A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *166*(1), 81–89. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)91914-e](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)91914-e)
- Knudson A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *68*(4), 820–823. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820>
- Knudson A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *1*(2), 157–162. <https://doi.org/10.1038/35101031>
- Koh, P. O., Won, C. K., Noh, H. S., Cho, G. J., & Choi, W. S. (2005). Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor mRNAs in human placenta. *Journal of veterinary science*, *6*(1), 1–5.

- Kolvatzis, C., Tsakiridis, I., Kalogiannidis, I. A., Tsakoumaki, F., Kyrkou, C., Dagklis, T., Daniilidis, A., Michaelidou, A. M., & Athanasiadis, A. (2023). Utilizing amniotic fluid metabolomics to monitor fetal well-being: A narrative review of the literature. *Cureus*, *15*(3), e36986. <https://doi.org/10.7759/cureus.36986>
- Kooi, I. E., Mol, B. M., Moll, A. C., van der Valk, P., de Jong, M. C., de Graaf, P., van Mil, S. E., Schouten-van Meeteren, A. Y., Meijers-Heijboer, H., Kaspers, G. L., Te Riele, H., Cloos, J., & Dorsman, J. C. (2015). Loss of photoreceptor and gain of genomic alterations in retinoblastoma reveal tumor progression. *eBioMedicine*, *2*(7), 660–670. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.06.022>
- Koppan, M., Nagy, Z., Bosnyak, I., & Reglodi, D. (2022). Female reproductive functions of the neuropeptide PACAP. *Frontiers in Endocrinology*, *13*, 982551. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.982551>
- Koppan, M., Varnagy, A., Reglodi, D., Brubel, R., Nemeth, J., Tamas, A., Mark, L., & Bodis, J. (2012). Correlation between oocyte number and follicular fluid concentration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in women after superovulation treatment. *Journal of Molecular Neuroscience*, *48*(3), 617–622. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9743-3>
- Köves, K., Szabó, E., Kántor, O., Heinzlmann, A., Szabó, F., & Csáki, Á. (2020). Current state of understanding of the role of PACAP in the hypothalamo-hypophyseal gonadotropin functions of mammals. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 88. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00088>
- Kvarik, T., Mammel, B., Reglodi, D., Kovacs, K., Werling, D., Bede, B., Vaczy, A., Fabian, E., Toth, G., Kiss, P., Tamas, A., Ertl, T., Gyarmati, J., & Atlasz, T. (2016). PACAP is protective in a rat model of retinopathy of prematurity. *Journal of Molecular Neuroscience*, *60*(2), 179–185. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0797-5>
- Kvarik, T., Reglodi, D., Werling, D., Vaczy, A., Kovari, P., Szabo, E., Kovacs, K., Hashimoto, H., Ertl, T., Gyarmati, J., & Atlasz, T. (2021). The protective effects of endogenous PACAP in oxygen-induced retinopathy. *Journal of Molecular Neuroscience*, *71*(12), 2546–2557. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01846-2>
- Langer, I., Jeandriens, J., Couvineau, A., Sanmukh, S., & Latek, D. (2022). Signal transduction by VIP and PACAP receptors. *Biomedicines*, *10*(2), 406. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020406>
- Li, A., Zhang, L., Liu, Q., Fang, Z., Sun, Y., Li, S., Peng, Y., Zhang, M., & Wang, X. (2023). Proteomic analysis of amniotic fluid to identify potential targets predicting preterm delivery. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, *1871*(2), 140879. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2022.140879>
- Li, M., Maderdrut, J. L., Lertora, J. J., & Batuman, V. (2007). Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple

myeloma and myeloma kidney: A case study. *Peptides*, 28(9), 1891–1895. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.05.002>

Lindholm, D., Mäkela, J., & Korhonen, L. (2016). PACAP and Neural Progenitor cells. In D. Reglodi & A. Tamas (Eds.), *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide—PACAP* (pp. 53–63). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_5

Linn Murphree A. (2005). Intraocular retinoblastoma: the case for a new group classification. *Ophthalmology Clinics of North America*, 18(1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.ohc.2004.11.003>

Liu, H., Zhang, Y., Zhang, Y. Y., Li, Y. P., Hua, Z. Q., Zhang, C. J., Wu, K. C., Yu, F., Zhang, Y., Su, J., & Jin, Z. B. (2020). Human embryonic stem cell-derived organoid retinoblastoma reveals a cancerous origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(52), 33628–33638. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011780117>

Liu, J., Ottaviani, D., Sefta, M., Desbrousses, C., Chapeaublanc, E., Aschero, R., Sirab, N., Lubieniecki, F., Lamas, G., Tonon, L., Dehainault, C., Hua, C., Fréneaux, P., Reichman, S., Karboul, N., Biton, A., Mirabal-Ortega, L., Larcher, M., Brulard, C., Arrufat, S., ... Radvanyi, F. (2021). A high-risk retinoblastoma subtype with stemness features, dedifferentiated cone states and neuronal/ganglion cell gene expression. *Nature Communications*, 12(1), 5578. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25792-0>

Liu, X., Song, Y., Guo, Z., Sun, W., & Liu, J. (2019). A comprehensive profile and inter-individual variations analysis of the human normal amniotic fluid proteome. *Journal of Proteomics*, 192, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.023>

Lochner, R.; Couce, M. Retinoblastoma. PathologyOutlines. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/eyeretinaretinoblastoma.html> (Megtekintve: 2023. november 15.)

Loibl, C., Rozanovic, M., Bogár, L., Pankaczi, A., Kovács, P., Miseta, A., Molnár, T., & Csontos, C. (2021). Lack of early platelet and leukocyte activation can indicate complications after major burn injury. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 77(1), 17–26. <https://doi.org/10.3233/CH-190779>

Longrois, D., Maegele, M., Bersini, H., Crooks, G., Hubloue, I., Nowé, A., Rimensberger, P. C., Sabbe, M., Tilsed, J., Vandemeulebroucke, J., Verhelst, W., & Vincent, J. L. (2019). Streamlining pre- and intra-hospital care for patients with severe trauma: a white paper from the European Critical Care Foundation. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 45(1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/s00068-018-1053-1>

Lotan, M., & Schwartz, M. (1994). Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: Implications for regeneration. *FASEB Journal*, 8(13), 1026–1033. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.13.7926367>

- Lu, J., Piper, S. J., Zhao, P., Miller, L. J., Wootten, D., & Sexton, P. M. (2022). Targeting VIP and PACAP receptor signaling: New insights into designing drugs for the PACAP subfamily of receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8069. <https://doi.org/10.3390/ijms23158069>
- Lutz-Bucher, B., Monnier, D., & Koch, B. (1996). Evidence for the presence of receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the neurohypophysis that are positively coupled to cyclic AMP formation and neurohypophyseal hormone secretion. *Neuroendocrinology*, 64(2), 153–161. <https://doi.org/10.1159/000127113>
- Ma, B. Q., Zhang, M., & Ba, L. (2015). Plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide concentrations and mortality after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Clinica Chimica Acta*, 439, 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.010>
- MacKenzie, C. J., Lutz, E. M., Johnson, M. S., Robertson, D. N., Holland, P. J., & Mitchell, R. (2001). Mechanisms of phospholipase C activation by the vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 2 receptor. *Endocrinology*, 142(3), 1209–1217. <https://doi.org/10.1210/endo.142.3.8013>
- Mallipatna, A., Gallie, B. L., Chévez-Barrios, P., Rouic, L. L., Chantada, G. L., Doz, F., Brisse, H., Munier, F. L., Albert, D. M., Mora, J., Desjardins, L., Suzuki, S., Carroll, W. L., Coupland, S. E., & Finger, P. T. (2016). Retinoblastoma. In M. B. Amin, S. Edge, F. Greene, D. R. Byrd, R. K. Brookland, M.K. Washington, J. E. Gershenwald, C. C. Compton, K. R. Hess, et al. (Eds.), *AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition* (8th ed., pp. 819-831). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40618-3_68
- Masuo, Y., Ohtaki, T., Masuda, Y., Tsuda, M., & Fujino, M. (1992). Binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): Comparison with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) binding site localization in rat brain sections. *Brain Research*, 575(1), 113–123. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90430-h](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90430-h)
- Masuo, Y., Suzuki, N., Matsumoto, H., Tokito, F., Matsumoto, Y., Tsuda, M., & Fujino, M. (1993). Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Research*, 602(1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90241-e](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90241-e)
- Martinez, C., Abad, C., Delgado, M., Arranz, A., Juarranz, M. G., Rodriguez-Henche, N., Brabet, P., Leceta, J., & Gomariz, R. P. (2002). Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 1053–1058. <https://doi.org/10.1073/pnas.012367999>
- Mathieu, M., Girosi, L., Vallarino, M., & Tagliafierro, G. (2005). PACAP in developing sensory and peripheral organs of the zebrafish, *Danio rerio*. *European Journal of Histochemistry*, 49(2), 167–178.

- Maugeri, G., D'Amico, A. G., Bucolo, C., & D'Agata, V. (2019). Protective effect of PACAP-38 on retinal pigmented epithelium in an in vitro and in vivo model of diabetic retinopathy through EGFR-dependent mechanism. *Peptides*, *119*, 170108. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170108>
- May, V., Buttolph, T. R., Girard, B. M., Clason, T. A., & Parsons, R. L. (2014). PACAP-induced ERK activation in HEK cells expressing PAC1 receptors involves both receptor internalization and PKC signaling. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *306*(11), C1068–C1079. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00001.2014>
- May, V., Lutz, E., MacKenzie, C., Schutz, K. C., Dozark, K., & Braas, K. M. (2010). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PAC1HOP1 receptor activation coordinates multiple neurotrophic signaling pathways: Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase gamma and vesicle endocytosis for neuronal survival. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(13), 9749–9761. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.043117>
- McCulloch, D. A., Lutz, E. M., Johnson, M. S., Robertson, D. N., MacKenzie, C. J., Holland, P. J., & Mitchell, R. (2001). ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by VPAC receptors and a PAC(1) receptor splice variant. *Molecular Pharmacology*, *59*(6), 1523–1532. <https://doi.org/10.1124/mol.59.6.1523>
- Mimoz, O., Benoist, J. F., Edouard, A. R., Assicot, M., Bohuon, C., & Samii, K. (1998). Procalcitonin and C-reactive protein during the early posttraumatic systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Medicine*, *24*(2), 185–188. <https://doi.org/10.1007/s001340050543>
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R. R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M. D., & Coy, D. H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *164*(1), 567–574. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)91757-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)91757-9)
- Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R. D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., Minamino, N., & Arimura, A. (1990). Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *170*(2), 643–648. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)92140-u](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)92140-u)
- Modena, A. B., & Fieni, S. (2004). Amniotic fluid dynamics. *Acta Bio-medica*, *75 Suppl I*, 11–13.
- Molnar, T., Papp, V., Banati, M., Szereday, L., Pusch, G., Szapary, L., Bogar, L., & Illes, Z. (2010). Relationship between C-reactive protein and early activation of leukocytes indicated by leukocyte antisedimentation rate (LAR) in patients with acute cerebrovascular events. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, *44*(3), 183–192. <https://doi.org/10.3233/CH-2010-1273>

- Moody, T. W., & Jensen, R. T. (2016). PACAP and Cancer. In D. Reglodi & A. Tamas (Eds.), *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide—PACAP* (pp. 795–814). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_47
- Moody, T. W., & Jensen, R. T. (2021). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal peptide [Part 1]: Biology, pharmacology, and new insights into their cellular basis of action/signaling which are providing new therapeutic targets. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 28(2), 198–205. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000617>
- Moody, T. W., Nuche-Berenguer, B., & Jensen, R. T. (2016). Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 23(1), 38–47. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000218>
- Moore, K. L. & Persaud, T. V. N. (2003). *The developing human: Clinically oriented embryology* (7th ed.) Saunders. pp. 140-141.
- Nakamachi, T., Ohtaki, H., Seki, T., Yofu, S., Kagami, N., Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A., Mark, L., Lanekoff, I., Kiss, P., Farkas, J., Reglodi, D., & Shioda, S. (2016). PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nature Communications*, 7, 12034. <https://doi.org/10.1038/ncomms12034>
- Nelson, K. B., Grether, J. K., Croen, L. A., Dambrosia, J. M., Dickens, B. F., Jelliffe, L. L., Hansen, R. L., & Phillips, T. M. (2001). Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Annals of Neurology*, 49(5), 597–606.
- Olianas, M. C., Ennas, M. G., Lampis, G., & Onali, P. (1996). Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in Y-79 human retinoblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 67(3), 1293–1300. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67031293.x>
- Olianas, M. C., Ingianni, A., Sogos, V., & Onali, P. (1997). Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors and PACAP in human fetal retina. *Journal of Neurochemistry*, 69(3), 1213–1218. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69031213.x>
- Orjuela-Grimm, M., Singh, N., Bhatt-Carreño, S., & Singh, A. D. (2019). Retinoblastoma: incidence and etiologic factors. In J. L. Berry, J. W. Kim, B. E. Damato, A. D. Singh (Eds.), *Clinical Ophthalmic Oncology* (pp. 39–56). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11123-6_4
- Osuka, A., Ogura, H., Ueyama, M., Shimazu, T., & Lederer, J. A. (2014). Immune response to traumatic injury: Harmony and discordance of immune system homeostasis. *Acute Medicine and Surgery*, 1(2), 63–69. <https://doi.org/10.1002/ams2.17>
- Pape, H. C., Lefering, R., Butcher, N., Peitzman, A., Leenen, L., Marzi, I., Lichte, P., Josten, C., Bouillon, B., Schmucker, U., Stahel, P., Giannoudis, P., & Balogh, Z. (2014).

The definition of polytrauma revisited: An international consensus process and proposal of the new 'Berlin definition'. *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 77(5), 780–786. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000000453>

Pape, H. C., Moore, E. E., McKinley, T., & Sauaia, A. (2022). Pathophysiology in patients with polytrauma. *Injury*, 53(7), 2400–2412. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2022.04.009>

Papp, Z. (1986). *Szülészeti genetika*. Medicina Könyvkiadó. pp. 131-132.

Papp, Z. (2017). *A szüléset-nőgyógyászat tankönyve*. (5th ed.) Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió Kft. pp. 202-207.

Park, H. J., Cho, H. Y., & Cha, D. H. (2021). The Amniotic fluid cell-free transcriptome provides novel information about fetal development and placental cellular dynamics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2612. <https://doi.org/10.3390/ijms22052612>

Patko, E., Szabo, E., Toth, D., Tornoczky, T., Bosnyak, I., Vaczy, A., Atlasz, T., & Reglodi, D. (2022). Distribution of PACAP and PAC1 receptor in the human eye. *Journal of Molecular Neuroscience*, 72(11), 2176–2187. <https://doi.org/10.1007/s12031-022-01985-0>

Pérez-Pereda, S., Toriello-Suárez, M., Ocejo-Vinyals, G., Guiral-Foz, S., Castillo-Obeso, J., Montes-Gómez, S., Martínez-Nieto, R. M., Iglesias, F., González-Quintanilla, V., & Oterino, A. (2020). Serum CGRP, VIP, and PACAP usefulness in migraine: A case-control study in chronic migraine patients in real clinical practice. *Molecular Biology Reports*, 47(9), 7125–7138. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05781-0>

Pfeifer, R., Teuben, M., Andruszkow, H., Barkatali, B. M., & Pape, H. C. (2016). Mortality patterns in patients with multiple trauma: A systematic review of autopsy studies. *PloS One*, 11(2), e0148844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148844>

Pham, D., Polgar, B., Toth, T., Jungling, A., Kovacs, N., Balas, I., Pal, E., Szabo, D., Fulop, B. D., Reglodi, D., Szanto, Z., Herczeg, R., Gyenesei, A., & Tamas, A. (2022). Examination of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in Parkinson's disease focusing on correlations with motor symptoms. *GeroScience*, 44(2), 785–803. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00530-6>

Pintér, E., Pozsgai, G., Hajna, Z., Helyes, Z., & Szolcsányi, J. (2014). Neuropeptide receptors as potential drug targets in the treatment of inflammatory conditions. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(1), 5–20. <https://doi.org/10.1111/bcp.12097>

Postma, M., & Goedhart, J. (2019). PlotsOfData-A web app for visualizing data together with their summaries. *PLoS Biology*, 17(3), e3000202. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000202>

- Pöstyéni, E., Kovács-Valasek, A., Dénes, V., Mester, A., Sétáló, G., Jr, & Gábrriel, R. (2021). PACAP for retinal health: model for cellular aging and rescue. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 444. <https://doi.org/10.3390/ijms22010444>
- Rajab, I. M., Hart, P. C., & Potempa, L. A. (2020). How C-reactive protein structural isoforms with distinctive bioactivities affect disease progression. *Frontiers in Immunology*, 11, 2126. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02126>
- Rai, V., Mathews, G., & Agrawal, D. K. (2022). Translational and clinical significance of DAMPs, PAMPs, and PRRs in trauma-induced inflammation. *Archives of Clinical and Biomedical Research*, 6(5), 673–685. <https://doi.org/10.26502/acbr.50170279>
- Reglodi, D., Atlasz, T., Szabo, E., Jungling, A., Tamas, A., Juhasz, T., Fulop, B. D., & Bardosi, A. (2018a). PACAP deficiency as a model of aging. *GeroScience*, 40(5-6), 437–452. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0045-8>
- 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. *Journal of Endocrinological Investigation*, 33(7), 443–445. <https://doi.org/10.1007/BF03346621>
- Reglodi, D., Helyes, Z., Nemeth, J., Vass, R. A., & Tamas, A. (2016). PACAP as a potential biomarker: alterations of PACAP levels in human physiological and pathological conditions. In D. Reglodi & A. Tamas (Eds.), *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide—PACAP* (pp. 815–832). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_48
- Reglodi, D., Kiss, P., Lubics, A., & Tamas, A. (2011). Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Current Pharmaceutical Design*, 17(10), 962–972. <https://doi.org/10.2174/138161211795589355>
- Reglodi, D., & Tamas, A. (Eds.). (2016). *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide—PACAP*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3>
- Reglodi, D., Vaczy, A., Rubio-Beltran, E., & MaassenVanDenBrink, A. (2018b). Protective effects of PACAP in ischemia. *The Journal of Headache and Pain*, 19(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s10194-018-0845-3>
- Relja, B., & Land, W. G. (2020). Damage-associated molecular patterns in trauma. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 46(4), 751–775. <https://doi.org/10.1007/s00068-019-01235-w>
- Ressler, K. J., Mercer, K. B., Bradley, B., Jovanovic, T., Mahan, A., Kerley, K., Norrholm, S. D., Kilaru, V., Smith, A. K., Myers, A. J., Ramirez, M., Engel, A., Hammack, S. E., Toufexis, D., Braas, K. M., Binder, E. B., & 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>

- Rootman, D. B., Gonzalez, E., Mallipatna, A., Vandenhoven, C., Hampton, L., Dimaras, H., Chan, H. S., Gallie, B. L., & Heon, E. (2013). Hand-held high-resolution spectral domain optical coherence tomography in retinoblastoma: Clinical and morphologic considerations. *The British Journal of Ophthalmology*, *97*(1), 59–65. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2012-302133>
- Ross, R. A., Hoepfner, S. S., Hellberg, S. N., O'Day, E. B., Rosencrans, P. L., Ressler, K. J., May, V., & Simon, N. M. (2020). Circulating PACAP peptide and PAC1R genotype as possible transdiagnostic biomarkers for anxiety disorders in women: a preliminary study. *Neuropsychopharmacology*, *45*(7), 1125–1133. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0604-4>
- Rožanović, M., Csontos, C., Bogár, L., Szélig, L., Bocskai, T., Kovács, P., Matancic, M., Miseta, A., & Loibl, C. (2016). Can leukocyte antisedimentation rate (LAR) predict septic complications and critical care survival early in polytrauma and burn victims? *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, *64*(4), 875–885. <https://doi.org/10.3233/CH-168024>
- Rushlow, D. E., Mol, B. M., Kennett, J. Y., Yee, S., Pajovic, S., Thériault, B. L., Prigoda-Lee, N. L., Spencer, C., Dimaras, H., Corson, T. W., Pang, R., Massey, C., Godbout, R., Jiang, Z., Zacksenhaus, E., Paton, K., Moll, A. C., Houdayer, C., Raizis, A., Halliday, W., ... Gallie, B. L. (2013). Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: genomic, gene expression, and clinical studies. *The Lancet. Oncology*, *14*(4), 327–334. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70045-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70045-7)
- Sakran, J. V., Michetti, C. P., Sheridan, M. J., Richmond, R., Waked, T., Aldaghlis, T., Rizzo, A., Griffen, M., & Fakhry, S. M. (2012). The utility of procalcitonin in critically ill trauma patients. *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, *73*(2), 413–418. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31825ff5b7>
- Sarszegi, Z., Szabo, D., Gaszner, B., Konyi, A., Reglodi, D., Nemeth, J., Lelesz, B., Polgar, B., Jungling, A., & Tamas, A. (2019). Examination of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a potential biomarker in heart failure patients. *Journal of Molecular Neuroscience*, *68*(3), 368–376. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-1025-7>
- Schuetz, P., Affolter, B., Hunziker, S., Winterhalder, C., Fischer, M., Balestra, G. M., Hunziker, P., & Marsch, S. (2010). Serum procalcitonin, C-reactive protein and white blood cell levels following hypothermia after cardiac arrest: a retrospective cohort study. *European Journal of Clinical Investigation*, *40*(4), 376–381. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02259.x>
- Seki, T., Shioda, S., Ogino, D., Nakai, Y., Arimura, A., & Koide, R. (1997). Distribution and ultrastructural localization of a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its mRNA in the rat retina. *Neuroscience Letters*, *238*(3), 127–130. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00869-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00869-0)

- Sherwood, N. M., Krueckl, S. L., & McRory, J. E. (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine Reviews*, *21*(6), 619–670. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0414>
- Shields, C. L., Mashayekhi, A., Au, A. K., Czyz, C., Leahey, A., Meadows, A. T., & Shields, J. A. (2006). The International Classification of Retinoblastoma predicts chemoreduction success. *Ophthalmology*, *113*(12), 2276–2280. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.06.018>
- Shioda, S., Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K., Watanabe, J., Nakajo, S., Arata, S., Kitamura, S., Okuda, H., Takenoya, F., & Kitamura, Y. (2006). Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1070*, 550–560. <https://doi.org/10.1196/annals.1317.080>
- Shoge, K., Mishima, H. K., Saitoh, T., Ishihara, K., Tamura, Y., Shiomi, H., & Sasa, M. (1998). Protective effects of vasoactive intestinal peptide against delayed glutamate neurotoxicity in cultured retina. *Brain Research*, *809*(1), 127–136. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00789-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00789-6)
- Shoge, K., Mishima, H. K., Saitoh, T., Ishihara, K., Tamura, Y., Shiomi, H., & Sasa, M. (1999). Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Research*, *839*(1), 66–73. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01690-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01690-x)
- Silveira, M. S., Costa, M. R., Bozza, M., & Linden, R. (2002). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(18), 16075–16080. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110106200>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Cooper-Smith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubinfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*, *315*(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Singh, H. P., Shayler, D. W. H., Fernandez, G. E., Thornton, M. E., Craft, C. M., Grubbs, B. H., & Cobrinik, D. (2022). An immature, dedifferentiated, and lineage-deconstrained cone precursor origin of N-Myc-initiated retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(28), e2200721119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2200721119>
- Singh, H. P., Wang, S., Stachelek, K., Lee, S., Reid, M. W., Thornton, M. E., Craft, C. M., Grubbs, B. H., & Cobrinik, D. (2018). Developmental stage-specific proliferation and retinoblastoma genesis in RB-deficient human but not mouse cone precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(40), E9391–E9400. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808903115>

- Singh, L., & Kashyap, S. (2018). Update on pathology of retinoblastoma. *International Journal of Ophthalmology*, *11*(12), 2011–2016. <https://doi.org/10.18240/ijo.2018.12.22>
- Snoer, A., Vollesen, A. L. H., Beske, R. P., Guo, S., Hoffmann, J., Fahrenkrug, J., Jørgensen, N. R., Martinussen, T., Jensen, R. H., & Ashina, M. (2019). Calcitonin-gene related peptide and disease activity in cluster headache. *Cephalalgia*, *39*(5), 575–584. <https://doi.org/10.1177/0333102419837154>
- Somogyvári-Vigh, A., & Reglődi, D. (2004). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Current Pharmaceutical Design*, *10*(23), 2861–2889. <https://doi.org/10.2174/1381612043383548>
- Sparks, T. N., & Dugoff, L. (2023). How to choose a test for prenatal genetic diagnosis: a practical overview. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *228*(2), 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2022.08.039>
- Spencer, F., Chi, L., & Zhu, M. (2001). Temporal relationships among uterine pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, decidual prolactin-related protein and progesterone receptor mRNAs expressions during decidualization and gestation in rats. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and Pharmacology*, *129*(1), 25–34. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(01\)00177-6](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(01)00177-6)
- Sponholz, C., Sakr, Y., Reinhart, K., & Brunkhorst, F. (2006). Diagnostic value and prognostic implications of serum procalcitonin after cardiac surgery: a systematic review of the literature. *Critical care*, *10*(5), R145. <https://doi.org/10.1186/cc5067>
- Steenstrup, B. R., Jørgensen, J. C., Alm, P., Hannibal, J., Junge, J., Fahrenkrug, J., & Ottesen, B. (1996). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): Occurrence and vasodilatory effect in the human uteroplacental unit. *Regulatory Peptides*, *61*(3), 197–204. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(95\)00156-5](https://doi.org/10.1016/0167-0115(95)00156-5)
- Stoecklein, V. M., Osuka, A., & Lederer, J. A. (2012). Trauma equals danger--damage control by the immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, *92*(3), 539–551. <https://doi.org/10.1189/jlb.0212072>
- Stroth, N., Holighaus, Y., Ait-Ali, D., & Eiden, L. E. (2011). PACAP: a master regulator of neuroendocrine stress circuits and the cellular stress response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1220*(1), 49–59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05904.x>
- Sun, B. Y., Sun, Z. P., Pang, Z. C., Huang, W. T., & Wu, S. P. (2019). Decreased synovial fluid pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) levels may reflect disease severity in post-traumatic knee osteoarthritis after anterior cruciate ligament injury. *Peptides*, *116*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.04.009>
- Sun, Z. P., Wu, S. P., Liang, C. D., Zhao, C. X., & Sun, B. Y. (2019). The synovial fluid neuropeptide PACAP may act as a protective factor during disease progression of primary knee osteoarthritis and is increased following hyaluronic acid injection. *Innate Immunity*, *25*(4), 255–264. <https://doi.org/10.1177/1753425919839125>

- Sundler, F., Ekblad, E., Absood, A., Håkanson, R., Köves, K., & Arimura, A. (1992). Pituitary adenylate cyclase activating peptide: a novel vasoactive intestinal peptide-like neuropeptide in the gut. *Neuroscience*, *46*(2), 439–454. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90064-9)
- Szabadfi, K., Atlasz, T., Kiss, P., Danyadi, B., Tamas, A., Helyes, Z., Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A., Toth, G., Gabriel, R., & Reglodi, D. (2012). Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotoxicity Research*, *21*(1), 41–48. <https://doi.org/10.1007/s12640-011-9254-y>
- Szabadfi, K., Mester, L., Reglodi, D., Kiss, P., Babai, N., Racz, B., Kovacs, K., Szabo, A., Tamas, A., Gabriel, R., & Atlasz, T. (2010). Novel neuroprotective strategies in ischemic retinal lesions. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(2), 544–561. <https://doi.org/10.3390/ijms11020544>
- Szabadfi, K., Szabo, A., Kiss, P., Reglodi, D., Setalo, G., Jr, Kovacs, K., Tamas, A., Toth, G., & Gabriel, R. (2014). PACAP promotes neuron survival in early experimental diabetic retinopathy. *Neurochemistry International*, *64*, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.11.005>
- Szabo, D., Sarszegi, Z., Polgar, B., Saghy, E., Nemeth, A., Reglodi, D., Makkos, A., Gorbe, A., Helyes, Z., Ferdinandy, P., Herczeg, R., Gyenesei, A., Cziraki, A., & Tamas, A. (2021). PACAP-38 in acute ST-Segment elevation myocardial infarction in humans and pigs: A translational study. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6), 2883. <https://doi.org/10.3390/ijms22062883>
- Szabó, D., Sárszegi, Z., Polgár, B., Sággy, É., Reglódi, D., Tóth, T., Onódi, Z., Leszek, P., Varga, Z. V., Helyes, Z., Kemény, Á., Ferdinandy, P., & Tamás, A. (2022). PACAP-38 and PAC1 receptor alterations in plasma and cardiac tissue samples of heart failure patients. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(7), 3715. <https://doi.org/10.3390/ijms23073715>
- 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. *Journal of Molecular Neuroscience*, *48*(3), 667–673. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9815-4>
- Tamas, A., Javorhazy, A., Reglodi, D., Sarlos, D. P., Banyai, D., Semjen, D., Nemeth, J., Lelesz, B., Fulop, D. B., & Szanto, Z. (2016a). Examination of PACAP-like immunoreactivity in urogenital tumor samples. *Journal of Molecular Neuroscience*, *59*(2), 177–183. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0652-0>
- Tamas, A., Vass, R. A., Helyes, Z., Csanaky, K., Szanto, Z., Nemeth, J., & Reglodi, D. (2016b). Examination of PACAP during lactation. In D. Reglodi & A. Tamas (Eds.), *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide—PACAP* (pp. 833–840). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_49

- Tams, J. W., Johnsen, A. H., & Fahrenkrug, J. (1999). Identification of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide1-38-binding factor in human plasma, as ceruloplasmin. *The Biochemical Journal*, *341*(Pt 2), 271–276.
- Team, R. D. C. (2010). *R: A language and environment for statistical computing*. [computer software]. <http://www.r-project.org/index.html>
- Temerozo, J. R., Sacramento, C. Q., Fintelman-Rodrigues, N., Pão, C. R. R., de Freitas, C. S., Dias, S. S. G., Ferreira, A. C., Mattos, M., Soares, V. C., Teixeira, L., Azevedo-Quintanilha, I. G., Hottz, E. D., Kurtz, P., Bozza, F. A., Bozza, P. T., Souza, T. M. L., & Bou-Habib, D. C. (2022). VIP plasma levels associate with survival in severe COVID-19 patients, correlating with protective effects in SARS-CoV-2-infected cells. *Journal of Leukocyte Biology*, *111*(5), 1107–1121. <https://doi.org/10.1002/JLB.5COVA1121-626R>
- Thériault, B. L., Dimaras, H., Gallie, B. L., & Corson, T. W. (2014). The genomic landscape of retinoblastoma: A review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, *42*(1), 33–52. <https://doi.org/10.1111/ceo.12132>
- Togha, M., Ghorbani, Z., Ramazi, S., Zavvari, F., & Karimzadeh, F. (2021). Evaluation of serum levels of transient receptor potential cation channel subfamily V member 1, vasoactive intestinal polypeptide, and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in chronic and episodic migraine: The possible role in migraine transformation. *Frontiers in Neurology*, *12*, 770980. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.770980>
- Tong, X. L., Wang, L., Gao, T. B., Qin, Y. G., Qi, Y. Q., & Xu, Y. P. (2009). Potential function of amniotic fluid in fetal development—Novel insights by comparing the composition of human amniotic fluid with umbilical cord and maternal serum at mid and late gestation. *Journal of the Chinese Medical Association*, *72*(7), 368–373. [https://doi.org/10.1016/S1726-4901\(09\)70389-2](https://doi.org/10.1016/S1726-4901(09)70389-2)
- Toth, D., Reglodi, D., Schwieters, L., & Tamas, A. (2023). Role of endocrine PACAP in age-related diseases. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, 1118927. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1118927>
- Toth, D., Szabo, E., Tamas, A., Juhasz, T., Horvath, G., Fabian, E., Opper, B., Szabo, D., Maugeri, G., D'Amico, A. G., D'Agata, V., Vicena, V., & Reglodi, D. (2020). Protective effects of PACAP in peripheral organs. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 377. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00377>
- Tóth, T., Alizadeh, H., Polgár, B., Csalódi, R., Reglődi, D., & Tamás, A. (2023). Diagnostic and prognostic value of PACAP in multiple myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(13), 10801. <https://doi.org/10.3390/ijms241310801>
- Trásy, D., Tánzos, K., Németh, M., Hankovszky, P., Lovas, A., Mikor, A., Hajdú, E., Osztróluczki, A., Fazakas, J., & Molnár, Z. (2016). Delta procalcitonin is a better indicator of infection than absolute procalcitonin values in critically ill patients: a prospective observational study. *Journal of Immunology Research*, *2016*, 3530752. <https://doi.org/10.1155/2016/3530752>

- Tsangaris, G. T., Anagnostopoulos, A. K., Tounta, G., Antsaklis, A., Mavrou, A., & Kolialexi, A. (2011). Application of proteomics for the identification of biomarkers in amniotic fluid: are we ready to provide a reliable prediction? *The EPMA journal*, 2(2), 149–155. <https://doi.org/10.1007/s13167-011-0083-0>
- Tuka, B., Helyes, Z., Markovics, A., Bagoly, T., Szolcsányi, J., Szabó, N., Tóth, E., Kincses, Z. T., Vécsei, 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>
- Tuka, B., Szabó, N., Tóth, E., Kincses, Z. T., Párdutz, Á., Szok, D., Körtési, T., Bagoly, T., Helyes, Z., Edvinsson, L., Vécsei, L., & Tajti, J. (2016). Release of PACAP-38 in episodic cluster headache patients - an exploratory study. *The Journal of Headache and Pain*, 17(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s10194-016-0660-7>
- Underwood, M. A., Gilbert, W. M., & Sherman, M. P. (2005). Amniotic fluid: Not just fetal urine anymore. *Journal of perinatology*, 25(5), 341–348. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211290>
- van Landeghem, F. K., Weiss, T., Oehmichen, M., & von Deimling, A. (2007). Cellular localization of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) following traumatic brain injury in humans. *Acta Neuropathologica*, 113(6), 683–693. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0208-7>
- Vasani, A., & Kumar, M. S. (2019). Advances in the proteomics of amniotic fluid to detect biomarkers for chromosomal abnormalities and fetomaternal complications during pregnancy. *Expert Review of Proteomics*, 16(4), 277–286. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1578213>
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B. K., Hashimoto, H., Galas, L., & Vaudry, H. (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological Reviews*, 61(3), 283–357. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>
- Ventetuolo, C. E., & Levy, M. M. (2008). Biomarkers: Diagnosis and risk assessment in sepsis. *Clinics in Chest Medicine*, 29(4), 591–603. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2008.07.001>
- Vereczki, V., Köves, K., Csáki, A., Grósz, K., Hoffman, G. E., & Fiskum, G. (2006). Distribution of hypothalamic, hippocampal and other limbic peptidergic neuronal cell bodies giving rise to retinopetal fibers: Anterograde and retrograde tracing and neuropeptide immunohistochemical studies. *Neuroscience*, 140(3), 1089–1100. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.081>
- Veréb, D., Szabó, N., Tuka, B., Tajti, J., Király, A., Faragó, P., Kocsis, K., Tóth, E., Kincses, B., Bagoly, T., Helyes, Z., Vécsei, L., & Kincses, Z. T. (2018). Correlation of neurochemical and imaging markers in migraine: PACAP38 and DTI

measures. *Neurology*, *91*(12), e1166–e1174.
<https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000006201>

Wacker, C., Prkno, A., Brunkhorst, F. M., & Schlattmann, P. (2013). Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious Diseases*, *13*(5), 426–435. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70323-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70323-7)

Vaczy, A., Kovari, P., Kovacs, K., Farkas, K., Szabo, E., Kvarik, T., Kocsis, B., Fulop, B., Atlasz, T., & Reglodi, D. (2018). Protective Role of Endogenous PACAP in Inflammation-induced Retinal Degeneration. *Current Pharmaceutical Design*, *24*(30), 3534–3542. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180924141407>

Wang, Z. Y., Alm, P., & Håkanson, R. (1995). Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rabbit eye. *Neuroscience*, *69*(1), 297–308. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00258-k](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00258-k)

Wei, T., & Simko, V. (2017). *R package “corrplot”: visualization of a correlation matrix* (Version 0.84) [computer software]. <https://github.com/taiyun/corrplot>

Werling, D., Banks, W. A., Salameh, T. S., Kvarik, T., Kovacs, L. A., Vaczy, A., Szabo, E., Mayer, F., Varga, R., Tamas, A., Toth, G., Biro, Z., Atlasz, T., & Reglodi, D. (2017). Passage through the ocular barriers and beneficial effects in retinal ischemia of topical application of PACAP1-38 in rodents. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(3), 675. <https://doi.org/10.3390/ijms18030675>

Werling, D., Reglodi, D., Banks, W. A., Salameh, T. S., Kovacs, K., Kvarik, T., Vaczy, A., Kovacs, L., Mayer, F., Danyadi, B., Lokos, E., Tamas, A., Toth, G., Biro, Z., & Atlasz, T. (2016). Ocular delivery of PACAP1-27 protects the retina from ischemic damage in rodents. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *57*(15), 6683–6691. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20630>

Winters, S. J., King, J. C., Brees, C. K., & Moore, J. P., Jr (2014). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in fetal cord blood. *Early Human Development*, *90*(9), 451–453. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2014.06.001>

Wojcieszak, J., & Zawilska, J. B. (2014). PACAP38 and PACAP6-38 exert cytotoxic activity against human retinoblastoma Y79 cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, *54*(3), 463–468. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0248-0>

Wong, J. R., Tucker, M. A., Kleinerman, R. A., & Devesa, S. S. (2014). Retinoblastoma incidence patterns in the US surveillance, epidemiology, and end results program. *JAMA Ophthalmology*, *132*(4), 478–483. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.8001>

World Health Organization. (2014). *Injuries and violence: the facts 2014*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/149798>

Xiao, W., Mindrinos, M. N., Seok, J., Cuschieri, J., Cuenca, A. G., Gao, H., Hayden, D. L., Hennessy, L., Moore, E. E., Minei, J. P., Bankey, P. E., Johnson, J. L., Sperry, J., Nathens, A. B., Billiar, T. R., West, M. A., Brownstein, B. H., Mason, P. H., Baker, H.

- V., Finnerty, C. C., ... Inflammation and Host Response to Injury Large-Scale Collaborative Research Program (2011). A genomic storm in critically injured humans. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(13), 2581–2590. <https://doi.org/10.1084/jem.20111354>
- Xu, X. L., Fang, Y., Lee, T. C., Forrest, D., Gregory-Evans, C., Almeida, D., Liu, A., Jhanwar, S. C., Abramson, D. H., & Cobrinik, D. (2009). Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell*, 137(6), 1018–1031. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.051>
- Xu, X. L., Singh, H. P., Wang, L., Qi, D. L., Poulos, B. K., Abramson, D. H., Jhanwar, S. C., & Cobrinik, D. (2014). Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours. *Nature*, 514(7522), 385–388. <https://doi.org/10.1038/nature13813>
- Yang, L., Hou, J., Han, E., Qiao, G., Liu, L., & Men, X. (2021). Decreased plasma pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) levels are linked with disease severity in patients with liver cirrhosis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(2), 1229–1237. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10163-6>
- Yevgi, R., Laloğlu, E., & Bilge, N. (2023). High plasma calcitonin gene-related peptide and serum pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide levels in patients with neuropathic pain. *Revue Neurologique*, 179(4), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2022.10.005>
- Yu, R., Zhong, J., Li, M., Guo, X., Zhang, H., & Chen, J. (2013). PACAP induces the dimerization of PAC1 on the nucleus associated with the cAMP increase in the nucleus. *Neuroscience Letters*, 549, 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.06.015>
- Zagami, A. S., Edvinsson, L., & Goadsby, P. J. (2014). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and migraine. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(12), 1036–1040. <https://doi.org/10.1002/acn3.113>
- Zibara, K., Zeidan, A., Mallah, K., Kassem, N., Awad, A. I., Mazurier, F., Badran, B., & El-Zein, N. (2018). Signaling pathways activated by PACAP in MCF-7 breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 50, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.06.009>
- Zhang, Y., Pan, Q., Jiang, H., Yang, G., Chen, L., Qin, G., & Zhou, J. (2019). A prospective study of headache and neuropeptides in patients with pituitary adenomas. *Cephalalgia*, 39(8), 1049–1057. <https://doi.org/10.1177/0333102419839963>
- Zhu, H. X., Jin, Y., & Wei, B. F. (2020). Decreased serum pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) levels may reflect disease severity in patients with non-traumatic osteonecrosis of femoral head. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 397–404. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10098-4>
- Zhu, L., Tamvakopoulos, C., Xie, D., Dragovic, J., Shen, X., Fenyk-Melody, J. E., Schmidt, K., Bagchi, A., Griffin, P. R., Thornberry, N. A., & Sinha Roy, R. (2003). The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo

metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *The Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22418–22423. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212355200>

Zhu, X. X., Weng, L. J., Qian, X. W., Huang, C. Y., Yao, W. F., & Lu, Y. L. (2020). Decreased pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) levels were linked with disease severity of postmenopausal osteoporosis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 1327–1334.

8. Ábra- és táblázatjegyzék

Ábrák jegyzéke

1. ábra. A PAC1 és VPAC receptorok aktivációjának főbb jelátviteli útvonalai	9
2. ábra. A PACAP főbb hatásainak sematikus összefoglalója	10
3. ábra. A PACAP38-cal kapcsolatos humán vizsgálatok által érintett kórképek	12
4. ábra. A politraumát követő egyensúlyi állapot felborulásának sematikus rajza	20
5. ábra. Az emberi retina szövettani szerkezete és a retinoblastoma feltételezett kiindulási helyei.....	25
6. ábra. A retinoblastoma szövettani megjelenési formái sematikusán ábrázolva	26
7. ábra. Az alkalmazott RIA paralelitásának vizsgálata	34
8. ábra. A LAR meghatározásának sematikus rajza	36
9. ábra. A CRP és PCT koncentrációinak változása az első öt napon	43
10. ábra. A LAR és PACAP38-LI koncentrációinak változása az első öt napon	43
11. ábra. Az összes napra vonatkoztatott grafikusán ábrázolt korrelációs mátrix	45
12. ábra. A szemek ép részeinek PACAP38 és PAC1 receptor immunprofilja	47
13. ábra. A retinoblastomák PACAP38 és PAC1 receptor immunprofilja	48
14. ábra. A PACAP38 kezelés hatása az Y-79 sejtek túlélésére	49

Táblázatok jegyzéke

1. táblázat. A RIA visszanyerési tesztjének eredményei	34
2. táblázat. A kutatásban résztvevő személyek főbb demográfiai és klinikai adatai	42
3. táblázat. A negyedik nap laboreredményeinek korrelációi	44
4. táblázat. Az ötödik nap laboreredményeinek korrelációi	44
5. táblázat. A retinoblastomás betegek főbb demográfiai és klinikai adatai	46
6. táblázat. A szemek ép részeinek PACAP38 és PAC1 receptor immunprofilja	47

9. Közlemények jegyzéke

9.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Toth, D.**, Veszpremi, B., Koppan, M., Tamas, A., Szogyi, D., Brubel, R., Nemeth, J., Shams, M., & Reglodi, D. (2020). Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human amniotic fluid samples. *Reproductive Biology*, 20(4), 491–495. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.07.013>
IF: 2,376; Q1
2. **Toth, D.**, Tamas, A., & Reglodi, D. (2020). The neuroprotective and biomarker potential of PACAP in human traumatic brain injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 827. <https://doi.org/10.3390/ijms21030827>
IF: 5,924; D1 (review)
3. **Toth, D.**, Szabo, E., Tamas, A., Juhasz, T., Horvath, G., Fabian, E., Opper, B., Szabo, D., Maugeri, G., D'Amico, A. G., D'Agata, V., Vicena, V., & Reglodi, D. (2020). Protective effects of PACAP in peripheral organs. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 377. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00377>
IF: 5,555; Q1 (review)
4. 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., & Reglodi, D. (2021). Changes of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) level in polytrauma patients in the early post-traumatic period. *Peptides*, 146, 170645. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170645>
IF: 3,867; Q2
5. **Toth, D.**, Reglodi, D., Schwieters, L., & Tamas, A. (2023). Role of endocrine PACAP in age-related diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1118927. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1118927>
IF: 3,9; Q2 (review)
6. **Tóth, D.**, Fábíán, E., Szabó, E., Patkó, E., Vicena, V., Váczy, A., Atlasz, T., Tornóczky, T., & Reglodi, D. (2024). Investigation of PACAP38 and PAC1 receptor expression in human retinoblastoma and the effect of PACAP38 administration on human Y-79 retinoblastoma cells. *Life*, 14, 185. <https://doi.org/10.3390/life14020185>
IF(2023): 3,2; Q1

Az értekezés alapjául szolgáló eredeti közlemények összesített impakt faktora: 24,822
Összefoglaló (review) közlemények nélkül: 9,443

9.2. Az értékezés témájába közvetlenül nem illeszthető egyéb közlemények

7. Horvatovich, K., Bokor, S., Baráth, A., Maász, A., Kisfali, P., Járomi, L., Polgár, N., **Tóth, D.**, Répásy, J., Endreffy, E., Molnár, D., & Melegh, B. (2011). Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in obese pediatric patients. *International Journal of Pediatric Obesity* 6(2-2), e318–e325. <https://doi.org/10.3109/17477166.2010.490268>
IF: 2,986; D1
8. László, T., Lacza, A., **Tóth, D.**, Molnár, T. F., & Kálmán, E. (2014). Pulmonary enteric adenocarcinoma indistinguishable morphologically and immunohistologically from metastatic colorectal carcinoma. *Histopathology*, 65(2), 283–287. <https://doi.org/10.1111/his.12403>
IF: 3,453; D1
9. Rácz, E., Könczöl, F., **Tóth, D.**, Patonai, Z., Porpáczy, Z., Kozma, Z., Poór, V. S., & Sipos, K. (2016). PCR-based identification of drowning: four case reports. *International Journal of Legal Medicine*, 130(5), 1303–1307. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1359-7>
IF: 2,382; Q1
10. Simon, G., Rácz, E., Mayer, M., Heckmann, V., **Tóth, D.**, & Kozma, Z. (2017). Suicide by intentional air embolism. *Journal of Forensic Sciences*, 62(3), 800–803. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13320>
IF: 1,184; Q2
11. Simon, G., Heckmann, V., **Tóth, D.**, & Kozma, Z. (2019). Brain death of an infant caused by a penetrating air gun injury. *Legal Medicine*, 39, 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2019.06.004>
IF: 1,195; Q1
12. Reglodi, D., **Toth, D.**, Vicena, V., Manavalan, S., Brown, D., Getachew, B., & Tizabi, Y. (2019). Therapeutic potential of PACAP in alcohol toxicity. *Neurochemistry International*, 124, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.01.017>
IF: 3,881; Q2 (review)
13. Ferencz, S., Reglodi, D., Kaszas, B., Bardosi, A., **Toth, D.**, Vekony, Z., Vicena, V., Karadi, O., & Kelemen, D. (2019). PACAP and PAC1 receptor expression in pancreatic ductal carcinoma. *Oncology Letters*, 18(6), 5725–5730. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10971>
IF: 2,311; Q3

14. Simon, G., Heckmann, V., **Tóth, D.**, Pauka, D., Petrus, K., & Molnár, T. F. (2020). The effect of hepatic steatosis and fibrosis on liver weight and dimensions. *Legal Medicine*, 47, 101781. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2020.101781>
IF: 1,376; Q2
15. **Tóth, D.**, Petrus, K., Heckmann, V., Simon, G., & Poór, V. S. (2021). Application of photogrammetry in forensic pathology education of medical students in response to COVID-19. *Journal of Forensic Sciences*, 66(4), 1533–1537. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14709>
IF: 1,717; Q2
16. Ferencz, S., **Tóth, D.**, Kaszás, B., Bardosi, S., Vicena, V., Karádi, O., Reglodi, D., & Kelemen, D. (2021). PACAP and PAC1 receptor expression in human insulinomas. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(3), 1719–1728. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10204-0>
IF: 2,191; Q3
17. Simon, G., **Tóth, D.**, Heckmann, V., Kuzma, M., & Mayer, M. (2022). Lethal case of myocardial ischemia following overdose of the synthetic cannabinoid ADB-FUBINACA. *Legal Medicine*, 54, 102004. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2021.102004>
IF: 1,5; Q2
18. Simon, G., **Tóth, D.**, Heckmann, V., & Poór, V. S. (2022). Application of 3D printing in assessment and demonstration of stab injuries. *International Journal of Legal Medicine*, 136(5), 1431–1442. <https://doi.org/10.1007/s00414-022-02846-6>
IF: 2,1; Q1
19. Patko, E., Szabo, E., **Toth, D.**, Tornoczky, T., Bosnyak, I., Vaczy, A., Atlasz, T., & Reglodi, D. (2022). Distribution of PACAP and PAC1 receptor in the human rye. *Journal of Molecular Neuroscience*, 72(11), 2176–2187. <https://doi.org/10.1007/s12031-022-01985-0>
IF: 3,1; Q2
20. Simon, G., **Tóth, D.**, Heckmann, V., Mayer, M., & Kuzma, M. (2023). Simultaneous fatal poisoning of two victims with 4F-MDMB-BINACA and ethanol. *Forensic Toxicology*, 41(1), 151–157. <https://doi.org/10.1007/s11419-022-00632-y>
IF: 2,8; Q2

21. Poór, V. S., **Tóth, D.**, & Simon, G. (2023). Emphasise details of 3D-printed bones with contrast paints. *Medical Education*, 57(2), 191. <https://doi.org/10.1111/medu.14985>
IF: 4,9; D1
22. Petrus, K., Angyal, M., **Tóth, D.**, Poór, V. S., Heckmann, V., & Simon, G. (2023). Forensic assessment of a life-threatening penetrating abdominal air gun injury. *Legal Medicine*, 60, 102182. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2022.102182>
IF: 1,3; Q3
23. Heckmann, V., Engum, V., Simon, G., Poór, V. S., **Tóth, D.**, & Molnar, T. F. (2023). Piercing the surface: A mechanical analysis of stabbing with household tools. *Journal of Forensic Sciences*, 68(4), 1218–1227. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15313>
IF: 1,5; Q2
24. Dani, L. M., **Tóth, D.**, Frigyük, A. B., & Kozma, Z. (2023). Beyond Henssge's formula: using regression trees and a support vector machine for time of death estimation in forensic medicine. *Diagnostics*, 13(7), 1260. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13071260>
IF: 3; Q1
25. Angyal, M., Petrétei, D., Bukovecz, T., **Tóth, D.**, & Simon, G. (2023). Műtéti implantátumok tételszáma alapján történő igazságügyi célú személyazonosítás [The use of lot numbers of surgically implanted devices for forensic identification]. *Orvosi Hetilap*, 164(23), 911–918. <https://doi.org/10.1556/650.2023.32767>
IF: 0,8; Q3
26. Pauka, D., Poór, V. S., Maróti, P., Told, R., **Tóth, D.**, Tornóczky, T., Molnár, T. F., & Simon, G. (2023). Biomechanical study on the effect of atherosclerosis on the vulnerability of thoracic aorta, and its role in the development of traumatic aorta injury. *PLoS One*, 18(9), e0287652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287652>
IF: 2,9; Q1
27. Simon, G., Kuzma, M., Mayer, M., Petrus, K., & **Tóth, D.** (2023). Fatal overdose with the cannabinoid receptor agonists MDMB-4en-PINACA and 4F-ABUTINACA: A case report and review of the literature. *Toxics*, 11(8), 673. <https://doi.org/10.3390/toxics11080673>
IF: 3,9; Q1

28. **Tóth, D.**, Simon, G., & Reglódi, D. (2023). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and sudden infant death syndrome: a potential model for investigation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15063. <https://doi.org/10.3390/ijms242015063>
IF: 4,9; Q1 (review)

Az eddig megjelent eredeti közlemények **összesített impakt faktora: 81,698**

9.3. Tudománymetriai táblázat

Tóth Dénes tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2024.06.17)				
Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összesen
I. Folyóiratcikk ²	28	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	12	45	65
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	0	0	0
összefoglaló közlemény	---	6	45	91
rövid közlemény	---	10	73	76
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény ⁴	0	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV)	---	28	163	232
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	28	---	163	232

V. További tudományos művek	15	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	15	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
Oltalmak (szabadalmak)	---	0	0	0

VI. Hivatkozott absztraktok ⁵	0	---	0	0
Összes hivatkozás ¹	---	---	163	232
Hirsch index ⁶	9	---	---	---
g index ⁶	15	---	---	---

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	8	88
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	2	2
A tudományos fokozat elnyerése utáni (nincs adat) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	n.a.	n.a.
Az utolsó 10 év (2014 - 2024) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	27	208
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	46	19.83%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	38
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

Megjegyzések:

¹ a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok

² lektorált, tudományos folyóiratban

³ a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja

⁴ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

⁵ nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

⁶ a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója

⁷ közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

10. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném kifejezni hálámat dr. Reglődi Dóra egyetemi tanárnak és dr. Tamás Andrea egyetemi docensnek, akiknek köszönhetően lehetőségem nyílt csatlakozni a PACAP Kutatócsoporthoz. Ők kezdetektől fogva támogatták és irányították munkámat, és értékes szakmai tanácsaikkal, figyelmes és önzetlen segítségükkel hozzájárultak a kutatásaim sikeréhez. Nagy köszönettel tartozom nekik, hogy megismertették velem a kutatói pálya szépségeit és lehetőségeit. Ugyancsak köszönettel tartozom a Retina Kutatócsoport minden tagjának és az Anatómiai Intézet, a Pathológiai Intézet, a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika és az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet munkatársainak, akikhez bármikor fordulhattam kérdéseimmel.

Köszönetet szeretnék mondani dr. Szekeres Györgynek és Mecker Ágnesnek az immunhisztokémiai vizsgálatok kapcsán nyújtott segítségükért és tanácsaikért.

Köszönöm dr. Németh Józsefnek a RIA során nyújtott segítséget, valamint dr. Gyenesei Attila és dr. Herczeg Róbert szakmai segítségét a statisztikai vizsgálatokban.

Szeretném megköszönni valamennyi szerzőtársamnak, TDK-hallgatómnak is, akik elkötelezett támogatásukkal hozzájárultak kutatásaim előrehaladásához.

Köszönet előbírálóimnak, dr. Péterfalvi Ágnesnek és dr. Almási Róbert Gyulának, hogy alapos kritikájukkal hozzájárultak a dolgozat végső formájához.

Köszönetet szeretnék mondani dr. Simon Gábor egyetemi adjunktusnak és az Igazságügyi Orvostani Intézet minden munkatársának, akik támogatták munkásságom. Köszönettel tartozom dr. Bajnóczky István (†) egyetemi tanárnak és Dömse Angélának is, akik a tudományos pálya felé tereltek és hálás vagyok dr. Kálmán Endrének, hogy orvosi pályafutásom kezdetén türelme és bizalma, hatalmas szakmai tudása mindvégig segítette a klinikai és kutatói készségeim formálódását.

Hálás vagyok páromnak, családomnak, barátaimnak a támogatásukért, akik a legnehezebb időkben is kiálltak mellettem és hittek abban, hogy ezt a célokat is véghez tudom vinni.

Értekezésemet Beke István szeretett emlékének ajánlom.



Original article

Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human amniotic fluid samples

Denes Toth^{a,*}, Bela Veszpremi^b, Miklos Koppan^b, Andrea Tamas^c, Donat Szogyi^c, Reka Brubel^c, Jozsef Nemeth^d, Mahsa Shams^a, Dora Reglodi^c

^a Department of Forensic Medicine, University of Pécs Medical School, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary

^b Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Pécs Medical School, Édesanyák útja 17, H-7624 Pécs, Hungary

^c Department of Anatomy, MTA-PTE PACAP Research Team, Centre for Neuroscience, University of Pécs Medical School, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary

^d Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Nagyerdei körút 98, H-4032 Debrecen, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)
Amniotic fluid
Pregnancy
PACAP-like immunoreactivity

ABSTRACT

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide acting as a hormone, a neuro-modulator, a neurotransmitter, a trophic factor and is involved in a variety of developmental and regenerative processes. PACAP is present in several human tissues and biological fluids. In many pathological conditions, changes in PACAP levels have been described to reflect disease progression, therefore PACAP has diagnostic value as a potential biomarker. Since PACAP has been shown to play an important role in reproductive physiology and development, it was of interest to examine whether this neuropeptide occurs in the human amniotic fluid. Amniotic fluid samples were collected between the 15–19th weeks of gestation from volunteering pregnant women undergoing amniocentesis as a prenatal diagnostic tool due to maternal age. Pathological cases were excluded after prenatal karyotype analysis. PACAP-like immunoreactivity was measured by radioimmunoassay and could be detected in all samples. The present study provides evidence for the presence of PACAP in human amniotic fluid, but determination of the exact physiological or pathological significance awaits further investigation.

1. Introduction

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) was isolated from ovine hypothalamus in 1989 [1]. PACAP has two isoforms as a result of proteolysis of the same precursor protein: PACAP38 [1] and PACAP27 [2]. PACAP is a member of the secretin/glucagon/growth hormone-releasing hormone/vasoactive intestinal peptide (VIP) superfamily. The effects of PACAP are mediated through three types of class B G protein-coupled receptors. PAC1 receptor, showing higher affinity for PACAP than for VIP, is located predominantly in the central nervous system and is associated with protective and trophic effects. The other two receptors, VPAC1 and VPAC2, are recognized equally by PACAP and VIP and are more related to peripheral actions [3]. PACAP and its receptors are distributed throughout the body and the peptide is involved in numerous physiological processes in the central nervous system and in several peripheral organs [3]. PACAP plays a role in behavioral processes, hormonal- and thermoregulation, digestion and other gastrointestinal processes, regulation of cardiac and urinary bladder contractility [4–8]. PACAP has well-established protective

effects in the nervous system and in peripheral organs [9–14].

Soon after its discovery, PACAP was reported to be involved in various developmental processes and to act as a neurohormone, neuro-modulator, neurotransmitter and neurotrophic factor [15]. PACAP is widely expressed in the embryonic brain at the onset of the neurogenesis and plays an important role in brain development [16,17]. PACAP expression is reduced in most brain areas after the termination of brain development [15,18]. Presence of PACAP has been detected in several human tissues and biological fluids [19]. Among tissues, PACAP occurs at highest concentrations in the central nervous system and endocrine glands [19], but several other tissues/organs also have detectable levels, including reproductive organs [20]. Regarding body fluids, PACAP has been previously investigated with mass spectrometry (MS), radioimmunoassay (RIA) and enzyme-linked immunosorbent assay [19]. PACAP occurs in several human fluids: plasma [21–23], cerebrospinal fluid (CSF) and ovarian follicular fluid [24,25], milk [26,27] and synovial fluid [28].

The source of PACAP in human biological fluids is not known, but numerous different research groups have reported that levels can be

* Corresponding author.

E-mail address: denes.toth@aok.pte.hu (D. Toth).

measured. PACAP is cleaved by dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) and has a short half-life between 3 [21] - 10 min. [22] in the plasma. DPPIV is also present in the amniotic fluid [29,30]. The plasma concentration of PACAP is relatively stable; neither gender, age, food intake nor female hormonal cycle have a significant effect. Regarding pregnancy and delivery, plasma PACAP38-like immunoreactivity (PACAP38-LI) has been shown to be increased by the 2nd and 3rd trimesters of the pregnancy, indicating that the neuropeptide is synthesized by the placenta or other maternal tissues [31]. A sudden decrease was found in the maternal plasma during delivery, which might indicate a role in the uteroplacental circulation and/or uterine contraction. Three days after childbirth the PACAP38-LI returned to normal levels [31]. No differences were found in fetal cord venous blood, collected immediately after delivery between male and female babies, and no significant differences were found between samples obtained after caesarian section or vaginal birth either. PACAP levels were unrelated to gestational age or Apgar score [32]. Peripheral blood PACAP levels in newborns were in the same range as in adults. Umbilical arteries had higher PACAP levels than in the umbilical vein, which indicates a fetal synthesis of this neuropeptide [31].

Higher PACAP38 levels were detected with RIA and immunocytochemistry in each part of uteroplacental unit compared to PACAP27 levels [33]. In full-term placentas stronger PACAP38-immunoreactivity was found on both the maternal and fetal sides, while immunoreactivity for PACAP27 increased only on the maternal side [34]. It was found that PACAP38 levels are 5–20-fold greater in the human milk than in the respective plasma samples [26]. Colostrum has the highest levels of PACAP38, and levels are lower in the transitional milk and mature milk. The difference between PACAP38 levels in the colostrum and the mature milk was statistically significant. The changes in PACAP38 levels during lactation indicate an important biological role of this peptide [27].

Since PACAP plays an important role in reproductive physiology [35–39] and lack of PACAP is associated with several developmental abnormalities [40–44] it was of interest to examine whether this neuropeptide occurs in the amniotic fluid (AF). AF is a complex biological fluid, which initially comes from maternal plasma and passes through fetal membranes due to hydrostatic and osmotic pressure [45]. Because of bi-directional diffusion between the AF and the fetus, the composition of AF is similar to fetal plasma until fetal skin keratinization, which usually happens between the 19 and 20 weeks of gestation. The analysis of AF has a high diagnostic potential indicating several pathological conditions [29]. The aim of the present study was to investigate the existence of PACAP38 in human amniotic fluid samples using a specific and sensitive RIA method.

2. Materials and methods

2.1. Biological samples

Amniotic fluid samples were collected between the 15–19th weeks of gestation from volunteering pregnant women undergoing

amniocentesis as a prenatal diagnostic tool due to maternal age (age over 35 years, n = 28). The sample collection was carried out according to a protocol approved by the institutional ethic committee (ethical permission number: PTE 4303/2011; PTE 6383/2018) without extra intervention, after obtaining written consent of the volunteers. The peptidase inhibitor aprotinin was added to all samples (30 µl/ml). Each sample underwent prenatal karyotype analysis. Chromosomal abnormalities and other anomalies (n = 7) were excluded.

2.2. Radioimmunoassay

The amniotic fluid samples were first weighed and centrifuged at 12 000 rpm for 30 min at 4 °C. Then the supernatant was processed to detect PACAP38-LI for a specific and sensitive RIA technique, developed in our laboratory [46]. Briefly, the antiserum used was PACAP38 antibody '88 111-3' (working dilution 1:10 000), the tracer was mono-¹²⁵I-labeled ovine PACAP24-38 C-terminal fragment prepared in our laboratory, and we used ovine PACAP38 as a RIA standard ranging from 0 to 1000 fmol/ml. The assay buffer was prepared in 1 ml of 0.05 mol/l (pH 7.4) phosphate buffer containing 0.1 mol/l sodium chloride, 0.25% (w/v) BSA and 0.05% (w/v) sodium azide. Incubation time was 48–72 hours at 4 °C. Separation solution consisted of charcoal/dextran/commercial fat-free milk powder (10:1:0.5 g in 100 ml distilled water).

The method had been used earlier in several other experiments where the goal was to determine PACAP-like immunoreactivity in animal and human samples. It had been used for tissue samples and biological fluids such as rat or human serum [23,47], animal and human milk [26,48,49] and human follicular fluid [25]. As described earlier, we established the specificity of the serum [46] by determining cross-reactivity to related peptides and intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 7.2% and 8.7%, respectively. The cross-reactivity study revealed that the used antiserum did not show any cross-reactivity with members of the same peptide family and other related peptides, like gastrin-related factor, glucagon, motilin or secretin [46]. As the used antiserum was produced against the C-terminus of PACAP38, it did not show cross-reactivity to PACAP27 either. In the present study we also used a cold recovery test to further confirm the validity of our radioimmunoassay method. We measured the concentration of PACAP38 in four different amniotic fluid samples with low, medium and high levels of added PACAP38 (50, 300 and 1000 fmol/ml, respectively). Measurements were performed before and after adding the known amounts of pure PACAP38. The assayed sample volumes were 100 and 50 µl. The measured and expected concentrations and the calculated recovery rates are presented in Table 1. The observed average recovery percentages after adding low, medium and high amounts of the peptide were 83.8, 87.5 and 84.8 %, respectively. Altogether, this shows an approximately 85–90 % recovery rate, confirming the reliability of the radioimmunoassay method for measuring PACAP38-LI in biological samples.

In an additional validation experiment serial dilution of the selected amniotic fluid sample was used to assess parallelism with the assay standard. The volume of the assayed fluid sample ranged from 12.5 to

Table 1
Recovery of the exogenously added PACAP38 in RIA.

Sample number	Sample	Sample + 50 fmol PACAP38			Sample + 300 fmol PACAP38			Sample + 1000 fmol PACAP38		
	Measured (fmol/ml)	Expected (fmol/ml)	Measured (fmol/ml)	Recovery (%)	Expected (fmol/ml)	Measured (fmol/ml)	Recovery (%)	Expected (fmol/ml)	Measured (fmol/ml)	Recovery (%)
1	312	362	296	81.8	612	529	86.4	1312	1130	86.1
2	423	473	412	87.1	723	652	90.2	1423	1150	80.8
3	618	668	540	80.8	918	771	84.0	1618	1425	88.1
4	870	920	785	85.3	1170	1047	89.5	1870	1575	84.2
Mean ± SD				83.8 ± 2.95			87.5 ± 2.87			84.8 ± 3.11

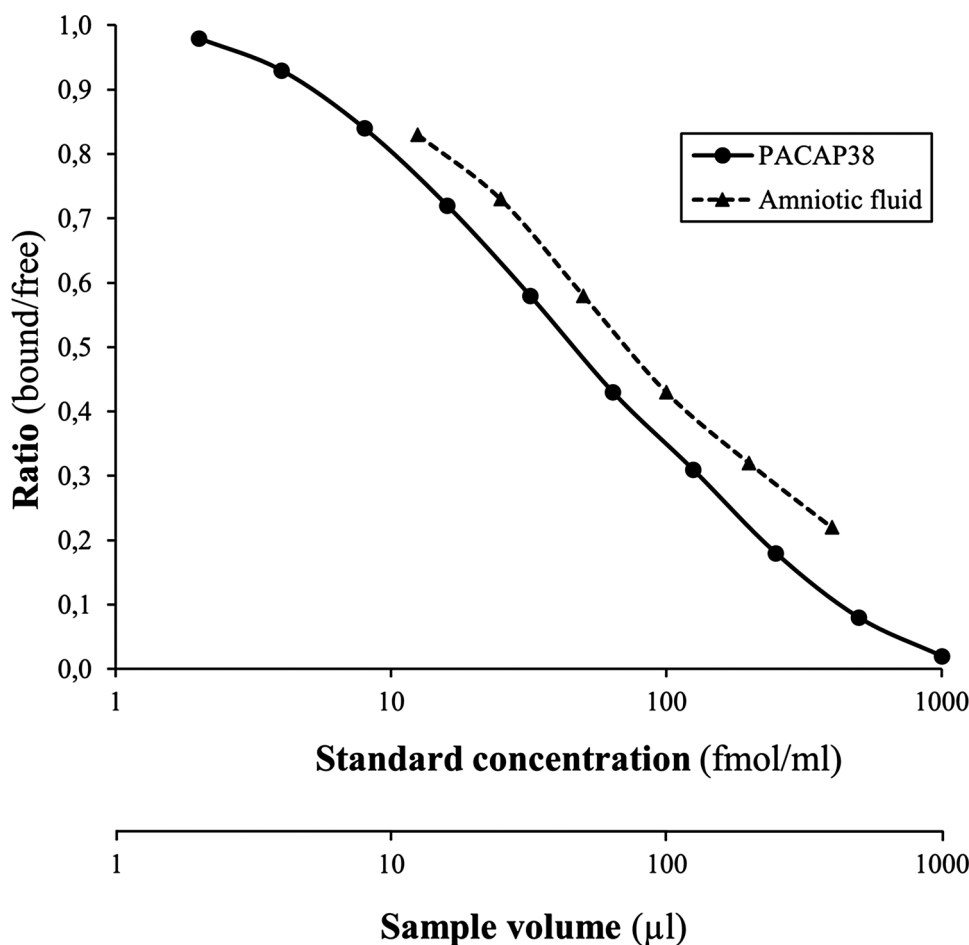


Fig. 1. Inhibition of binding of ^{125}I -labelled PACAP24-38 C-terminal fragment (RIA tracer) to PACAP-antibody "88111-3" by purified PACAP38 (RIA standard) and an amniotic fluid sample.

400 μl . The investigated amniotic fluid sample inhibited binding of the radioiodinated PACAP24-38 C-terminal fragment (RIA tracer) in parallel with the assay standard PACAP38 (Fig. 1).

3. Results and Discussion

PACAP38-like immunoreactivity could be detected in the amniotic fluid in each sample, using a specific and sensitive RIA method. Average level of PACAP38-LI in the AF samples ($n = 21$) was 401 ± 142 fmol/ml (range: 441.3).

The present study provides evidence, for the first time, that PACAP38-LI occurs in the human amniotic fluid under physiological circumstances. Previously, we could not confirm the presence of PACAP38 in its intact, unbound form by mass spectrometry [24]. The lack of PACAP by mass spectrometry in contrast to the presence of PACAP-LI can be due to the presence of the modified form of the peptide, leading to lack of the native peptide, but presence of the site recognized by the antiserum. Binding to a bigger carrier can also be a possibility [24]. PACAP is known to be bound to ceruloplasmin in the plasma [50]. In that above-mentioned mass spectrometry study, the same method was used for all biological samples, regardless of the origin of the different body fluids. This might lead to discrepancies and false negative data, as also emphasized in the publication [50]. A previous study revealed that after extensive hydrolysis, higher PACAP levels could be detected in the human milk, also suggesting that bound PACAP was freed from a carrier protein [49]. The possible structural modifications and binding properties must be identified in further studies.

Our present data can provide the basis for further investigations regarding the potential of PACAP as a biomarker for certain pathological conditions. Increasing number of recent studies have investigated the presence and changes of PACAP in various human physiological and pathological conditions [19]. Changes in PACAP expression in tissues were demonstrated in pancreatic ductal adenocarcinoma [51], non-small cell lung cancers, colon tumors and ischemic heart disease [52], inflammatory bowel disease [53] and thyroid papillary carcinoma [54]. Regarding body fluids, in numerous pathological conditions, changes in PACAP levels have been described to reflect disease progression, like the decreased synovial fluid PACAP levels in post-traumatic osteoarthritis [28] or to correlate with other physiological parameters, like the number of oocytes in the follicular fluid [25]. Decreased CSF PACAP levels have been detected in Alzheimer's disease [55,56] and multiple sclerosis [57]. In severe traumatic brain injury patients elevated CSF and serum PACAP levels correlated with early mortality [58]. Elevation in serum PACAP levels have been described in acute aneurysmal subarachnoid hemorrhage [59], acute spontaneous basal ganglia hemorrhage [60], ictal phases of migraine [61–63], while decreases have been described in nephrotic syndrome [64], cardiomyopathies [23], interictal phases of migraine [63,65] and in episodic cluster headache [66]. Lower PACAP levels showed correlation with disease progression in postmenopausal osteoporosis [67] and in female post-traumatic stress syndrome patients [68]. These results indicate PACAP's diagnostic value as a potential biomarker in different disorders. The biomarker potential of PACAP in certain diseases is further strengthened by negative findings, where no alteration of PACAP levels could be found in contrast to the above-described pathological conditions [69].

Previously published data indicated the placental and/or maternal origin of PACAP in maternal serum based on its higher levels in late pregnancy [31] and the increasing placental PACAP content during pregnancy [34]. Higher PACAP levels were found in umbilical arteries compared to the venous side suggesting fetal PACAP synthesis [31]. Based on these results and the fact that the composition of amniotic fluid is similar to fetal plasma in this period [29], we hypothesize that PACAP in amniotic fluid has fetal and/or placental origin. The exact physiological role of PACAP in the amniotic fluid is not yet known. The results of the aforementioned clinical studies suggest that PACAP may also be a possible factor in prenatal diagnostics, but its functional significance needs further investigations. As PACAP is a well-known trophic factor, it can be expected that it shows changes during development and in developmental defects. A most recent paper has found that PACAP gene is the most strongly upregulated factor in nerve regeneration in carpal tunnel syndrome patients [70], indicating the vital importance of the peptide in nerve growth under pathological conditions. It would be of interest to elucidate the changes of PACAP in the amniotic fluid in certain pathological conditions of the fetus and/or mother in the future. We believe that present finding is particularly important to initiate further investigations in this field.

Research Involving Human Participants and/or Animals

Our study involving human participants was conducted based on the 1975 Helsinki Declaration.

Informed Consent

All participants signed an informed consent approved by the Institutional Review Board.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was supported by National Research, Development and Innovation Fund K115874, K119759, National Brain Research Program NAP2017-1.2.1-NKP-2017-00002; MTA-TKI-14016; GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS”; EFOP-3.6.2-16-2017-00008; EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009; EFOP-3.6.1-16-2016-00004; EFOP-3.6.3-VEKOP-16-15 2017-00008, “The role of neuroinflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics”; Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities in Hungary: 20765/3/2018/FEKUTSTRAT, FIKPII – University of Pecs; EFOP-3.6.2-16-2017-0009.

References

- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:567–74. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91757-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91757-9).
- Miyata A, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, et al. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:643–8. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)92140-U](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)92140-U).
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 2009;61:283–357. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>.
- Cline DL, Short LJ, Forster MAM, Gray SL. Adipose tissue expression of PACAP, VIP, and their receptors in response to cold stress. *J Mol Neurosci* 2019;68:427–38. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1099-x>.
- Koves K, Szabo E, Kantor O, Heinzlmann A, Szabo F, Csaki A. Current state of understanding of the role of PACAP in the hypothalamo-hypophysal gonadotropin

- functions of mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:88. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00088>.
- Ojala J, Tooke K, Hsiang H, Girard BM, May V, Vizzard MA. PACAP/PAC1 expression and function in micturition pathways. *J Mol Neurosci* 2019;68:357–67. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1170-7>.
- Parsons RL, May V. PACAP-induced PAC1 receptor internalization and recruitment of endosomal signaling regulate cardiac neuron excitability. *J Mol Neurosci* 2019;68:340–7. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1127-x>.
- Reglodi D, Illes A, Opper B, Schafer E, Tamas A, Horvath G. Presence and effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide under physiological and pathological conditions in the stomach. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:90. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00090>.
- D'Amico AG, Maugeri G, Saccone S, Federico C, Cavallaro S, Reglodi D, et al. PACAP modulates the autophagy process in an in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21082943>.
- Horvath G, Opper B, Reglodi D. The neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is protective in inflammation and oxidative stress-induced damage in the kidney. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20194944>.
- Laszlo E, Juhasz T, Varga A, Czibere B, Kovacs K, Degrell P, et al. Protective effect of PACAP on ischemia/reperfusion-induced kidney injury of male and female rats: gender differences. *J Mol Neurosci* 2019;68:408–19. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1207-y>.
- Maugeri G, D'Amico AG, Castrogiovanni P, Saccone S, Federico C, Reibaldi M, et al. PACAP through EGFR transactivation preserves human corneal endothelial integrity. *J Cell Biochem* 2019;120:10097–105. <https://doi.org/10.1002/jcb.28293>.
- Toth D, Tamas A, Reglodi D. The neuroprotective and biomarker potential of PACAP in human traumatic brain injury. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030827>.
- Ye D, Shi Y, Xu Y, Huang J. PACAP attenuates optic nerve crush-induced retinal ganglion cell apoptosis via activation of the CREB-Bcl-2 pathway. *J Mol Neurosci* 2019;68:475–84. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01309-9>.
- Watanabe J, Seki T, Shioda S. PACAP and neural development. In: Reglodi D, Tamas A, editors. *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide – PACAP* Springer Nature Publishing; 2016. p. 65–82. https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_6.
- Basille M, Vaudry D, Coulouarn Y, Jegou S, Lihmann I, Fournier A, et al. Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) binding sites and PACAP receptor mRNAs in the rat brain during development. *J Comp Neurol* 2000;425:495–509. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001002\)425:4<495::AID-CNE3>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001002)425:4<495::AID-CNE3>3.0.CO;2-A).
- Hirabayashi T, Nakamachi T, Shioda S. Discovery of PACAP and its receptors in the brain. *J Headache Pain* 2018;19:28. <https://doi.org/10.1186/s10194-018-0855-1>.
- Jolivel V, Basille M, Aubert N, de Jouffrey S, Ancian P, Le Bigot JF, et al. Distribution and functional characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the brain of non-human primates. *Neuroscience* 2009;160:434–51. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.028>.
- Reglodi D, Helyes Z, Nemeth J, Vass R, Tamas A. 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* Springer Nature Publishing; 2016. p. 815–32. https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_48.
- Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 1991;129:2787–9. <https://doi.org/10.1210/endo-129-5-2787>.
- Birk S, Sitarz JT, Petersen KA, Oturai PS, Kruuse C, Fahrenkrug J, Olesen J. The effect of intravenous PACAP38 on cerebral hemodynamics in healthy volunteers. *Regul Pept* 2007;140:185–91. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.12.010>.
- Li M, Maderdrut JI, Lertora JI, Batuman V. Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: A case study. *Peptides* 2007;28:1891–5. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.05.002>.
- Sarszegi Z, Szabo D, Gaszner B, Konyi A, Reglodi D, Nemeth J, et al. Examination of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a potential biomarker in heart failure patients. *J Mol Neurosci* 2019;68:368–76. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-1025-7>.
- Brubel R, Reglodi D, Jambor E, Koppan M, Varnagy A, Biro Z, et al. Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2011;46:189–94. <https://doi.org/10.1002/jms.1884>.
- Koppan M, Varnagy A, Reglodi D, Brubel R, Nemeth J, Tamas A, et al. Correlation between oocyte number and follicular fluid concentration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in women after superovulation treatment. *J Mol Neurosci* 2012;48:617–22. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9743-3>.
- Borzsei R, Mark L, Tamas A, Bagoly T, Bay C, Csanaky K, et al. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur J Endocrinol* 2009;160:561–5. <https://doi.org/10.1530/EJE-08-0911>.
- Csanaky K, Banki E, Szabadi K, Reglodi D, Tarcai I, Czeglédi L, et al. Changes in PACAP immunoreactivity in human milk and presence of PAC1 receptor in mammary gland during lactation. *J Mol Neurosci* 2012;48:631–7. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9779-4>.
- Sun BY, Sun ZP, Pang ZC, Huang WT, Wu SP. Decreased synovial fluid pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) levels may reflect disease severity in post-traumatic knee osteoarthritis after anterior cruciate ligament injury. *Peptides* 2019;116:22–9. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.04.009>.

- [29] Cho CK, Shan SJ, Winsor EJ, Diamandis EP. Proteomic analysis of human amniotic fluid. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1406–15. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700090-MCP200>.
- [30] Rocha SCM, Baptista CJM. Biochemical Properties of Amniotic Membrane. In: Mamede AC, Botelho MF, editors. *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications* Netherlands: Springer; 2015. p. 19–40. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9975-1_2.
- [31] Reglodi D, Gyarmati J, Ertl T, Borzsei R, Bodis J, Tamas A, et al. Alterations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *J Endocrinol Invest* 2010;33:443–5. <https://doi.org/10.1007/BF03346621>.
- [32] Winters SJ, King JC, Brees CK, Moore JP. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in fetal cord blood. *Early Hum Dev* 2014;90:451–3. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2014.06.001>.
- [33] Steenstrup BR, Jørgensen JC, Alm P, Hannibal J, Junge J, Fahrenkrug J, et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): occurrence and vasodilatory effect in the human uteroplacental unit. *Regul Pept* 1996;61:197–204. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(95\)00156-5](https://doi.org/10.1016/0167-0115(95)00156-5).
- [34] Brubel R, Boronkai A, Reglodi D, Racz B, Nemeth J, Kiss P, et al. Changes in the expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. *J Mol Neurosci* 2010;42:450–8. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9374-5>.
- [35] Isaac ER, Sherwood NM. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice. *Mol Cell Endocrinol* 2008;280:13–9. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.09.003>.
- [36] Meggyes M, Lajko A, Fulop BD, Reglodi D, Szereday L. Phenotypic characterization of testicular immune cells expressing immune checkpoint molecules in wild-type and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-deficient mice. *Am J Reprod Immunol* 2019;83. <https://doi.org/10.1111/aji.13212>.
- [37] Reglodi D, Tamas A, Koppan M, Szogyi D, Welke L. Role of PACAP in female fertility and reproduction at gonadal level - recent advances. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:155. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00155>.
- [38] Reglodi D, Cseh S, Somoskoi B, Fulop BD, Szenteleky E, Szegezcki V, et al. Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient mice. *Reproduction* 2018;155:129–39. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0470>.
- [39] Somoskoi B, Torok D, Reglodi D, Tamas A, Fulop BD, Cseh S. Possible effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on early embryo implantation marker HB-EGF in mouse. *Reprod Biol* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.01.005>.
- [40] Allais A, Burel D, Isaac ER, Gray SL, Basille M, Ravni A, et al. Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur J Neurosci* 2007;25:2604–18. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05535.x>.
- [41] Farkas J, Sandor B, Tamas A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, et al. Early neuro-behavioral development of mice lacking endogenous PACAP. *J Mol Neurosci* 2017;61:468–78. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0887-z>.
- [42] Fulop BD, Sandor B, Szenteleky E, Karanyicz E, Reglodi D, Gaszner B, et al. Altered Notch signaling in developing molar teeth of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *J Mol Neurosci* 2019;68:377–88. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1146-7>.
- [43] Jozsa G, Szegezcki V, Palfi A, Kiss T, Helyes Z, Fulop B, et al. Signalling alterations in bones of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene deficient mice. *Int J Mol Sci* 2018;19:2538. <https://doi.org/10.3390/ijms19092538>.
- [44] Yamada K, Matsuzaki S, Hattori T, Kuwahara R, Taniguchi M, Hashimoto H, et al. Increased stathmin1 expression in the dentate gyrus of mice causes abnormal axonal arborizations. *PLoS One* 2010;5:e8596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008596>.
- [45] Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol* 2005;25:341–8. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211290>.
- [46] Jakab B, Reglodi D, Jozsa R, Hollosy T, Tamas A, Lubics A, et al. Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Methods* 2004;61:189–98. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.03.002>.
- [47] Tuka B, Helyes Z, Markovics A, Bagoly T, Nemeth J, Mark L, et al. Peripheral and central alterations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat in response to activation of the trigeminovascular system. *Peptides* 2012;33:307–16. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.12.019>.
- [48] Czeglédi L, Tamas A, Borzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horvath G, et al. Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *Gen Comp Endocrinol* 2011;172:115–9. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.12.012>.
- [49] Csanaky K, Reglodi D, Banki E, Tarcai I, Mark L, Helyes Z, et al. Examination of PACAP38-like immunoreactivity in different milk and infant formula samples. *Acta Physiol Hung* 2013;100:28–36. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.100.2013.1.2>.
- [50] Tams JW, Johnsen AH, Fahrenkrug J. Identification of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide1-38-binding factor in human plasma, as ceruloplasmin. *Biochem J* 1999;341:271–6. <https://doi.org/10.1042/bj3410271>.
- [51] Ferencz S, Reglodi D, Kaszas B, Bardosi A, Toth D, Vekony Z, et al. PACAP and PAC1 receptor expression in pancreatic ductal carcinoma. *Oncol Lett* 2019;18:5725–30. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10971>.
- [52] Szanto Z, Sarszegi Z, Reglodi D, Nemeth J, Szabafi K, Kiss P, et al. PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J Mol Neurosci* 2012;48:667–73. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9815-4>.
- [53] Horvath G, Illes A, Heimesaat MM, Bardosi A, Bardosi S, Tamas A, et al. Protective intestinal effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. In: Reglodi D, Tamas A, editors. *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide – PACAP* Springer Nature Publishing; 2016. p. 271–88. https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_17.
- [54] Bardosi S, Bardosi A, Nagy Z, Reglodi D. Expression of PACAP and PAC1 receptor in normal human thyroid gland and in thyroid papillary carcinoma. *J Mol Neurosci* 2016;60:171–8. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0823-7>.
- [55] Han P, Liang W, Baxter LC, Yin J, Tang Z, Beach TG, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is reduced in Alzheimer disease. *Neurology* 2014;82:1724–8. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000417>.
- [56] Han P, Caselli RJ, Baxter L, Serrano G, Yin J, Beach TG, et al. Association of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with cognitive decline in mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. *JAMA Neurol* 2015;72:333–9. <https://doi.org/10.1001/jamaneuro.2014.3625>.
- [57] Baranowska-Bik A, Kochanowski J, Uchman D, Wolinska-Witort E, Kalisz M, Martynska L, et al. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in humans with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2013;263:159–61. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.08.012>.
- [58] Bukovics P, Czeiter E, Amrein K, Kovacs N, Pal J, Tamas A, et al. Changes of PACAP level in cerebrospinal fluid and plasma of patients with severe traumatic brain injury. *Peptides* 2014;60:18–22. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.07.001>.
- [59] Jiang L, Wang WH, Dong XQ, Yu WH, Du Q, Yang DB, et al. The change of plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide levels after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol Scand* 2016;134:131–9. <https://doi.org/10.1111/ane.12522>.
- [60] Ma BQ, Zhang M, Ba L. Plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide concentrations and mortality after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Clin Chim Acta* 2015;439:102–6. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.010>.
- [61] Amin FM, Hougaard A, Schytz HW, Asghar MS, Lundholm E, Parvaiz AI, et al. Investigation of the pathophysiological mechanisms of migraine attacks induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38. *Brain* 2014;137:779–94. <https://doi.org/10.1093/brain/awt369>.
- [62] 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;14:540–53. <https://doi.org/10.2174/1871527314666150429114234>.
- [63] Tuka B, Helyes Z, Markovics A, Bagoly T, Szolcsanyi J, Szabo N, et al. Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia* 2013;33:1085–95. <https://doi.org/10.1177/0333102413483931>.
- [64] Eneman B, Freson K, van den Heuvel L, van Hoyweghen E, Collard L, Vande Walle J, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficiency associated with increased platelet count and aggregability in nephrotic syndrome. *J Thromb Haemost* 2015;13:755–67. <https://doi.org/10.1111/jth.12891>.
- [65] Han X, Dong Z, Hou L, Wan D, Chen M, Tang W, et al. Interictal plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide levels are decreased in migraineurs but remain unchanged in patients with tension-type headache. *Clin Chim Acta* 2015;450:151–4. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.08.017>.
- [66] Tuka B, Szabo N, Toth E, Kincses ZT, Pardutz A, Szok D, et al. Release of PACAP-38 in episodic cluster headache patients - an exploratory study. *J Headache Pain* 2016;17:69. <https://doi.org/10.1186/s10194-016-0660-7>.
- [67] Zhu XX, Weng LJ, Qian XW, Huang CY, Yao WF, Lu YL. Decreased pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) levels were linked with disease severity of postmenopausal osteoporosis. *Int J Pept Res Ther* 2019;1–8. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09937-w>.
- [68] Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, et al. Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature* 2011;470:492–7. <https://doi.org/10.1038/nature09856>.
- [69] Mosdosi B, Bolcskei K, Helyes Z. Impairment of microcirculation and vascular responsiveness in adolescents with primary Raynaud phenomenon. *Pediatr Rheumatol* 2018;16:20. <https://doi.org/10.1186/s12969-018-0237-x>.
- [70] Baskozos G, Sandy-Hindmarch O, Clark AJ, Windsor K, Karlsson P, Weir GA, et al. Molecular and cellular correlates of human nerve regeneration: ADCYAP1/PACAP enhance nerve outgrowth. *Brain* 2020;143:2009–26. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa163>.



Changes of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) level in polytrauma patients in the early post-traumatic period

Andrea Tamás^{a,*}, Dénes Tóth^b, Dániel Pham^a, Csaba Loibl^c, Szilárd Rendeki^c, Csaba Csontos^c, Martin Rozanovic^c, Lajos Bogár^c, Beáta Polgár^d, József Németh^e, Attila Gyenesei^f, Róbert Herczeg^f, Zalán Szántó^g, Dóra Reglódi^a

^a Department of Anatomy, MTA-PTE PACAP Research Team, Centre for Neuroscience, Medical School, University of Pecs, 7624, Pecs, Hungary

^b Department of Forensic Medicine, Medical School, University of Pecs, 7624, Pecs, Hungary

^c Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy, Clinical Centre, University of Pecs, 7624, Pecs, Hungary

^d Department of Medical Microbiology and Immunology, Clinical Centre, University of Pecs, 7624, Pecs, Hungary

^e Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032, Debrecen, Hungary

^f Bioinformatics Research Group, Szentagothai Research Centre, University of Pecs, 7624, Pecs, Hungary

^g Department of Surgery, Clinical Centre, University of Pecs, 7624, Pecs, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
C-reactive protein
Procalcitonin
Leukocyte anti-sedimentation rate
Polytrauma
Biomarker

ABSTRACT

In polytrauma patients who survive the primary insult, the imbalance between the pro- and anti-inflammatory processes seems to be responsible for life-threatening complications such as sepsis or multiple organ dysfunction syndrome. Measurement of C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) is a standard way for differentiating between infectious (bacterial) and non-infectious inflammation. Monitoring of immune cell functions, like leukocyte anti-sedimentation rate (LAR) can also be useful to diagnose infectious complications. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide with well-known immunomodulatory and anti-inflammatory effects. The aim of our study was to determine the changes of PACAP38 levels in polytrauma patients in the early post-traumatic period in intensive care unit and analyse possible correlation of its level with conventional (CRP, PCT) and unconventional (LAR) laboratory parameters. Twenty polytrauma patients were enrolled. Blood samples were taken daily for five days. We observed significant correlation between PACAP38 and CRP levels on day 4 and 5 as well as between PACAP38 and LAR levels all of the days. This could be due to the anti-inflammatory and cytoprotective functions of PACAP38 as part of an endogenous response to the trauma induced systemic inflammatory response syndrome. These significant correlations could have clinical importance in monitoring the dynamic balance of pro- and anti-inflammatory processes in case of polytraumatic patients.

1. Introduction

Each year more than five million people die in different traumatic injuries, which accounts for 9% of all deaths. Approximately three-quarters of these deaths are consequence of accidents. Road traffic injuries and falls, the two most common accidental polytrauma cases, are predicted to become the 7th and 17th leading cause of death by 2030. The 5 million deaths yearly represent only a small proportion of the injured patients, many of those who survive are left with temporary or

permanent disability [1]. Many polytrauma victims die within the first 48 h after admission [2–4], however, improvements in traumatology and intensive therapy have caused a right-shift in time of mortality after the injury [5].

A complex and dynamic immune response is initiated almost immediately after the physical trauma comprising of pro- and anti-inflammatory responses. The multimodal immunological process starts with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) driven by the innate immune system, where excessive pro-inflammatory mediators

* Corresponding author.

E-mail addresses: andreatamassz@gmail.com (A. Tamás), denes.toth@aok.pte.hu (D. Tóth), pham.dani77@gmail.com (D. Pham), csaba_loibl@yahoo.com (C. Loibl), rendeki.szilard@pte.hu (S. Rendeki), csaba.csontos@gmail.com (C. Csontos), rozanovic.martin@pte.hu (M. Rozanovic), bogar.lajos@pte.hu (L. Bogár), polgar.beata@pte.hu (B. Polgár), nemeth.jozsef@med.unideb.hu (J. Németh), gyenesei.attila@pte.hu (A. Gyenesei), herczeg.robert@pte.hu (R. Herczeg), szanto.zalan@pte.hu (Z. Szántó), dora.reglogdi@aok.pte.hu (D. Reglódi).

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170645>

Received 14 July 2021; Received in revised form 25 August 2021; Accepted 28 August 2021

Available online 1 September 2021

0196-9781/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

are present, meanwhile compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) will develop, which is regulated by the adaptive immune system and believed to act as a natural compensatory host response to trauma-induced inflammation [6,7]. In patients who survive the primary insult(s), the imbalance between these pro- and anti-inflammatory processes seems to be responsible for complications such as sepsis or multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in the subsequent days and weeks [7,8].

In modern polytrauma care it is obligatory to monitor different biomarkers for early detection of infectious complications, because the aforementioned post-traumatic complications affect a high percentage of polytrauma patients population, and are major contributing factors for poor outcomes [9–11]. Diagnosis of sepsis can be challenging in polytrauma patients because SIRS can mask the classical diagnostic criteria of sepsis [12].

Nowadays, measurement of serum C-reactive protein (CRP) has replaced the erythrocyte sedimentation rate as the best diagnostic index for ongoing inflammation because assays quantifying CRP became easily available, fast, economic and sensitive [13]. CRP, a widely known protein synthesized by the liver, is one of the acute phase proteins. Serum CRP level can change rapidly from 10–100-fold within 6–72 hours in response to any tissue damaging event associated with an inflammatory response [14]. Serum CRP level usually peaks within the first 3 days and does not allow to differentiate between infectious and non-septic conditions [12].

Currently the most reliable laboratory marker for differentiating between infectious (bacterial) and non-infectious inflammation is the procalcitonin (PCT), a precursor of calcitonin, which is normally produced in the C-cells of the thyroid gland [15–17]. Serum PCT levels usually peak 24–48 hours after trauma and a rapid decrease can be seen in patients lacking septic complications, while the persistence or secondary increase of PCT values predict septic complications [12,18]. Repetitively measured serum PCT levels help monitoring patients for tailoring antibiotic therapy to individual needs, because serum levels of PCT would decrease rapidly following appropriate antimicrobial therapies [19,20].

A recent study revealed that the severe trauma-induced oxidative stress is able to induce alteration of up to 80 % of the leukocyte transcriptome. This unexpected change affects a large amount of laboratory and clinical parameters used to diagnose sepsis or other complications [21], and this phenomenon could partially explain the contradictory results of several studies [12] dealing with the “well-known” biomarkers. For this reason, monitoring of immune cell functions of patients for infectious complication can also be useful. Although in the everyday clinical practice the leukocyte anti-sedimentation rate (LAR) is not a routinely measured parameter, it can be a hint for early diagnosis of infection. LAR, as a simple leukocyte function test, indicates the proportion of leukocytes crossing the midline of a blood column in the sedimentation tube in an upward direction (that is the upward floating, anti-sedimentation) during one hour of gravity sedimentation. In healthy individuals a maximum 10–15 % increase in leukocyte concentration can be seen in the upper half of the blood column, whereas in case of leukocyte activation this will increase due to water uptake by leukocytes leading to a decrease in their specific gravity [22–24]. LAR was previously found as a good positive predictor of bacteremia and sepsis in critically ill patients [25–27].

The sympathetic nervous system and the hypothalamo-hypophyseal system are also activated in response to injuries. A bidirectional cross-talk exists between the neuroendocrine and immune systems through mediators such as hormones, neuropeptides, neurotransmitters and cytokines [28]. Numerous neuropeptides are secreted by peptidergic nerve endings and different immune cells to regulate the immune response. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), as a ‘master regulator’ of stress adaptation [29], is one of the neuropeptides with well-known immunomodulatory and anti-inflammatory effects [30,31]. PACAP, as a member of the vasoactive intestinal peptide

(VIP)/secretin/glucagon peptide family, was originally isolated from the ovine hypothalamus and exists in 27 and 38 amino acid forms (PACAP27 and PACAP38) [32,33]. Through three G-protein coupled membrane receptors, PACAP exerts neuroprotective, neurotrophic and general cytoprotective actions. VPAC1 and VPAC2 receptors – associated predominantly with peripheral effects – are recognized by VIP and PACAP equally, while PAC1 receptor has higher affinity for PACAP [34]. PACAP has antiapoptotic, anti-inflammatory and antioxidant effects not only in the nervous system but also in other organs and many peripheral tissues/cells [35] and thereby regulates diverse physiological functions. Furthermore, it contributes to circadian rhythms, cytoprotection, energy metabolism, catecholamine synthesis and release and stress-related pathologies [29]. In vivo experiments demonstrated that PACAP exerts significant therapeutic effects attenuating the harmful consequences of septic shock by balancing pro- and anti-inflammatory factors [30,36,37]. Increasing number of studies detected the presence of PACAP in several human biological fluids like plasma [38–40], cerebrospinal fluid (CSF) and ovarian follicular fluid [41,42], amniotic fluid [43], milk [44,45], and synovial fluid [46]. Its therapeutic and biomarker potential in various human pathological conditions with encouraging results have also been investigated [47,48], including severe traumatic brain injury [49], acute aneurysmal subarachnoid hemorrhage [50] or acute spontaneous basal ganglia hemorrhage [51], where elevated serum PACAP levels correlated with the clinical severity and disease progression.

Nowadays, parallel monitoring of acute phase proteins and other biomarkers can help in early therapeutic decisions, but our ability to diagnose and predict the outcome is limited by the currently available nonspecific and insensitive laboratory and clinical parameters [52]. There is a need to identify new biomarkers for early detection of evolving subclinical changes prior to sepsis and other complications that alone or together with others allow early decision making and interventional therapies, thereby may improve the outcomes and mortality rates. The aim of our study was to determine the changes of PACAP38 levels in polytrauma patients in the first five days in intensive care unit (ICU) and to analyse possible correlation of its level with conventional (CRP, PCT) and unconventional (LAR) laboratory parameters.

2. Materials and methods

2.1. Legal ethical aspects and informed consent

The study protocol was based on the ethical directives of Declaration of Helsinki with the relating rules of the Hungarian law and the Good Clinical Practice. After receiving written permission from the Regional Research and Ethical Committee of our University (4422/2014 and 6383/2016) an informed written consent was obtained from the patients or from their legally authorized representatives.

2.2. Inclusion and exclusion criteria

Twenty polytrauma patients were included in our study. All of them were admitted to the ICU at our University. Polytrauma was defined by Injury Severity Score (ISS) > 16 indicating injuries occurring in several body regions. Polytrauma patients who had ISS 16 or above were selected to our study. Exclusion criteria were age under 18 years, patient or relative’s refusal, death within 24 h, ICU stay shorter than 5 days, New York Heart Association (NYHA) stage IV heart failure, patient with chronic hemodialysis treatment, liver cirrhosis or portal hypertension, chronic use of steroids, malignant hematological disease and immunosuppressive therapy affecting the normal immune response.

2.3. Study design

Patients were treated according to the Advanced Trauma Life Support (ATLS). Blood samples were drawn immediately after their admission to ICU (day 1) and on the following days until discharge from

ICU. The kinetics of parameters were analysed for five days. Due to previous observations, the inflammatory response syndrome after trauma reaches its peak and starts to decrease in case of uncomplicated events during the first 5 days after trauma [53]. We assumed that these five days are sufficient to monitor the acute changes in CRP, PCT, LAR and PACAP38 levels.

2.4. Measurement of CRP and PCT

Serum CRP and PCT levels were measured by the Department of Laboratory Medicine of our University as part of daily routine examination. The reference level of our lab in case of serum CRP is below 5.0 mg/L, in case of serum PCT is below 0.5 ng/mL.

2.5. Measurement of LAR

Arterial blood samples were collected to test-tubes containing sodium-citrate (Vacutainer, Becton Dickinson, Meylan, France). After one hour of blood sedimentation the leukocyte count of the total blood column's upper part (U) and lower part (L) were measured. The following formula was used for equation of $LAR = 100 \times (U-L)/(U + L)$ (Fig. 1). This equation provides the percentage of leukocytes in the original samples, which passed upwards the half line of the test tube during one hour of gravity sedimentation.

2.6. Measurement of PACAP38

Ten ml of arterial blood samples were collected from polytrauma patients to plastic Vacutainer tubes (Vacutainer, Becton Dickinson, Meylan, France) containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant. Two hundred μ l of aprotinin, a protease inhibitor (stock solution: 1.4 mg/mL) was added and mixed immediately to the test tubes. In order to avoid peptide degradation, an ice water bath was used for storage of the tubes. The samples were centrifuged immediately after the collection at 4 000 rpm for 15 min at 4 °C and the supernatants were further processed for specific and sensitive radioimmunoassay (RIA) analysis of PACAP38-like immunoreactivity (LI) according to previously published method [54]. Samples were stored in polypropylene RIA tubes (Sarstedt, Budapest, Hungary) at -80 °C until RIA determination. After thawing the plasma samples extraction was performed in the RIA tubes. During extraction the samples and reagents were stored in an ice water bath. One ml plasma was mixed and

incubated with 3 mL 96 % ethyl alcohol – for precipitation of plasma proteins – for 30 min in an ice bath. After 10 min of centrifugation (4 000 rpm, 4 °C), the supernatants were decanted into RIA tubes and evaporated – using nitrogen stream without heat – to dryness. The dried samples were stored at -80 °C prior to RIA determination. In the RIA process, the samples were assayed directly in these tubes after redissolving with 800 μ L assay buffer. PACAP38 specific antiserum (88111–3) was used in RIA examination, which was raised against a conjugate of Cys(23)-PACAP(24–38) and bovine thyroglobulin coupled by carbodiimide in rabbits. As a RIA standard, PACAP38 peptide was used ranging from 0 to 1 000 fmol/mL. The tracer was mono-¹²⁵I-labeled ovine PACAP24-38 C-terminal fragment prepared in our laboratory. The assay buffer (0.05 mol/l, pH 7.4 phosphate) contained 0.25 % bovine serum albumin (BSA, Sigma), 0.1 M sodium chloride and 0.05 % sodium azide. One ml incubation mixture contained 100 μ L PACAP38 standards, 100 μ L antiserum (working dilution 1:10 000), 100 μ L RIA tracer (5 000 cpm/tube) and the assay buffer. Incubation time was 48 h at 4 °C. Hundred μ l separation suspension (10 g charcoal, 1 g dextran, 0.5 g commercial fat-free milk powder in 100 mL distilled water) was applied in order to separate the antibody-bound peptide from the free peptide. After 10 min of centrifugation (4 000 rpm, 4 °C), the tubes were decanted. NZ310 type gamma counter (Gamma, Budapest, Hungary) was used to measure the radioactivity of the precipitates. The PACAP38-LI of the unknown samples was read from the calibration curve.

2.7. Statistical analysis

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 21.0 (IBM Corporation, Chicago, IL, USA) was used to calculate the correlation for every day between levels of CRP, PCT, LAR and PACAP38 by the Spearman rank correlation. Violin plots with jitter were drawn with PlotsOfData [55]. In addition, repeated measures correlation method, rmcrr package [56] within R [57], was applied to determine the correlation for all of the days together. Correlation results was visualized by corrplot function from corrplot package [58] within R [57].

3. Results

Twenty patients were involved in this study. Thirteen (2 female and 11 male, mean age: 45.92 ± 15.78) of them were eligible, while 7 of them were excluded for the following reasons: 1 patient died within 24 h

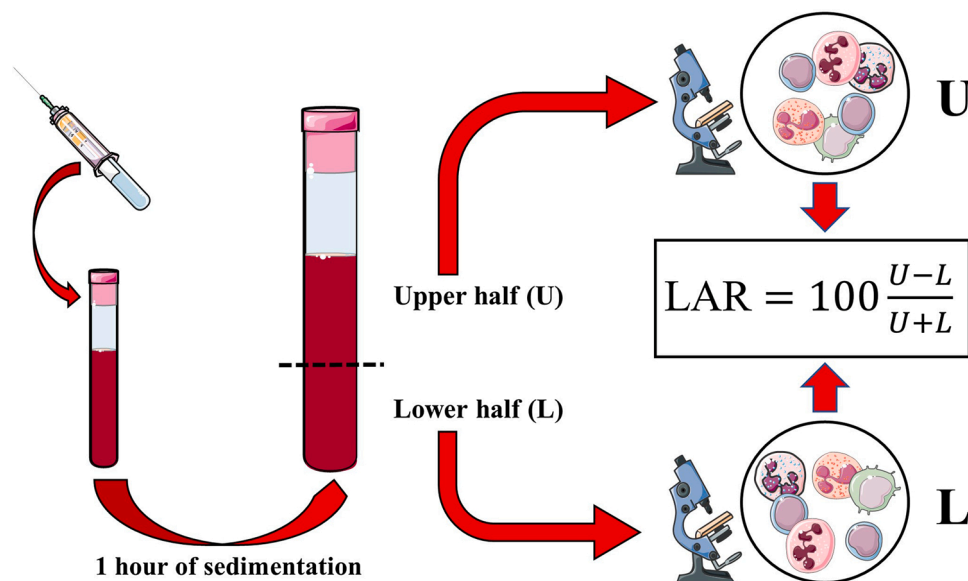


Fig. 1. The measurement of LAR. (Graphics are adapted from Servier Medical Art under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License).

after ICU admission, 2 patients were treated for 3 days only, 2 patients rejected the involvement in the study and 2 patients had severe comorbidities (NYHA stage IV heart failure, chronic steroid medication). The main demographic and clinical characteristics of the patients are presented in Table 1.

Although we did not find significant differences between individual days, a slightly increasing tendency (Fig. 2A) could be detected in case of CRP levels. Serum PCT levels did not exceed the upper limit of the laboratory value during the observed period (Fig. 2B). Similarly, we were not able to gain statistically significant difference, but a slightly increasing tendency with a peak on day 4 was well observed in LAR levels of polytrauma patients (Fig. 3A). Similar kinetics was found in plasma PACAP38 levels (Fig. 3B).

To gain further insight into the connection between the observed parameters we investigated the correlation between levels of CRP, PCT, LAR and PACAP38. A significant weak positive correlation was found between LAR and CRP ($r = 0.572$, $p = 0.041$) and also between PACAP38 and CRP ($r = 0.581$, $p = 0.037$) on day 4 (Table 2).

On day 5 a significant moderate positive correlation was found between PACAP38 and CRP ($r = 0.776$, $p = 0.002$) (Table 3).

Examining all of the days together a significant but weak correlation was observed between PACAP38 and LAR ($r = 0.279$, $p = 0.042$) and between LAR and CRP ($r = 0.406$, $p = 0.002$) (Fig. 4).

4. Discussion

In our study we examined the changes of PACAP38 level in polytrauma patients in the first five days in ICU and analysed correlation with CRP, PCT and LAR.

A significant weak positive correlation could be detected on day 4 and a significant moderate positive correlation on day 5 between PACAP38 and CRP levels. The parallel elevation of plasma PACAP38 levels with the CRP levels after the polytrauma may be due to an endogenous response to the trauma induced SIRS, as PACAP exerts anti-inflammatory effects. In vitro and in vivo studies found that PACAP inhibits the secretion of pro-inflammatory products, like IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α and NO in activated macrophages, and stimulates the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10, therethrough PACAP plays an important role in the moderation of the inflammatory response by affecting the balance between pro- and anti-inflammatory factors through the inhibition of pro-inflammatory and the stimulation of anti-inflammatory cytokines. It has also been proven that PACAP reduces leukocyte trafficking by the inhibition of chemokine production [30,37,59]. Previous human studies have also hypothesized that the protective and anti-inflammatory effect of PACAP is the possible explanation for the elevation of plasma PACAP levels as part of the pathophysiological response [49,50].

Examining all of the days together, a statistically significant

Table 1

Baseline characteristics at enrollment of the patients (M: male, F: female; ISS: Injury Severity Score; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; APACHE II: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II).

Patient	Sex	Age (years)	ISS	SOFA	APACHE II
1	M	61	18	14	10
2	M	52	18	10	14
3	M	45	20	15	8
4	F	17	22	9	2
5	M	61	22	10	12
6	M	40	22	10	15
7	F	39	28	14	18
8	M	73	30	18	14
9	M	45	34	11	9
10	M	25	34	16	12
11	M	59	38	18	9
12	M	31	38	18	14
13	M	49	38	18	14

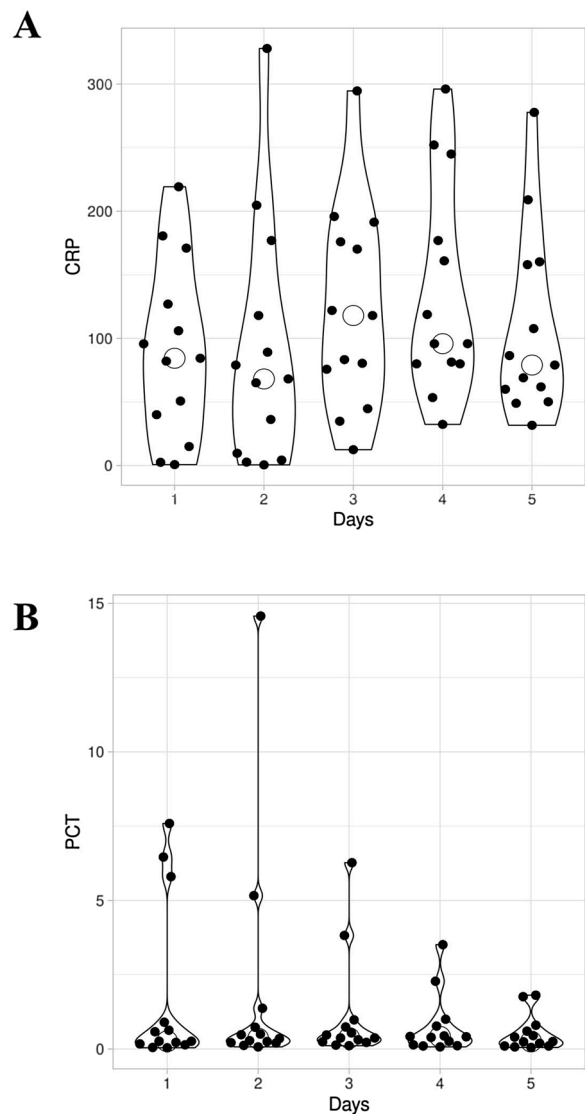


Fig. 2. CRP (mg/L) (A) and PCT (ng/mL) (B) levels during the observed 5 days period visualized with jitter type of violin plots. The open circle indicating the median of the data.

correlation was observed between PACAP38 and LAR levels. The tendency of LAR levels was similar to that of PACAP38. This is also in concordance with the results from previous studies, where it was found that LAR acts as an indicator of leukocyte activation. Higher LAR value reflects high number of activated leukocytes, therefore patients with elevated LAR level had a higher chance to survive, whereas the lack of elevation associated with poor outcome [26,27,60,61]. After the polytrauma, a multimodal immunological process starts with SIRS, causing elevation of the number of activated leukocytes, followed by a counter-regulatory process during the CARS. The correlation between PACAP38 and LAR levels could also be explained by the anti-inflammatory effect of PACAP during the CARS.

Albeit the CRP kinetics during the first five days following the polytrauma was statistically insignificant, the detected slightly increasing CRP levels might also have clinical importance. These results are in concordance with earlier observations, indicating that a non-specific elevation in the CRP level occurs in the early phase of polytrauma, which could be used for monitoring the evolution of response to tissue damaging event(s) associated with inflammatory response [12].

Regarding PCT, its levels did not exceed the upper limit of the laboratory value during the observed period. PCT is a fast reacting

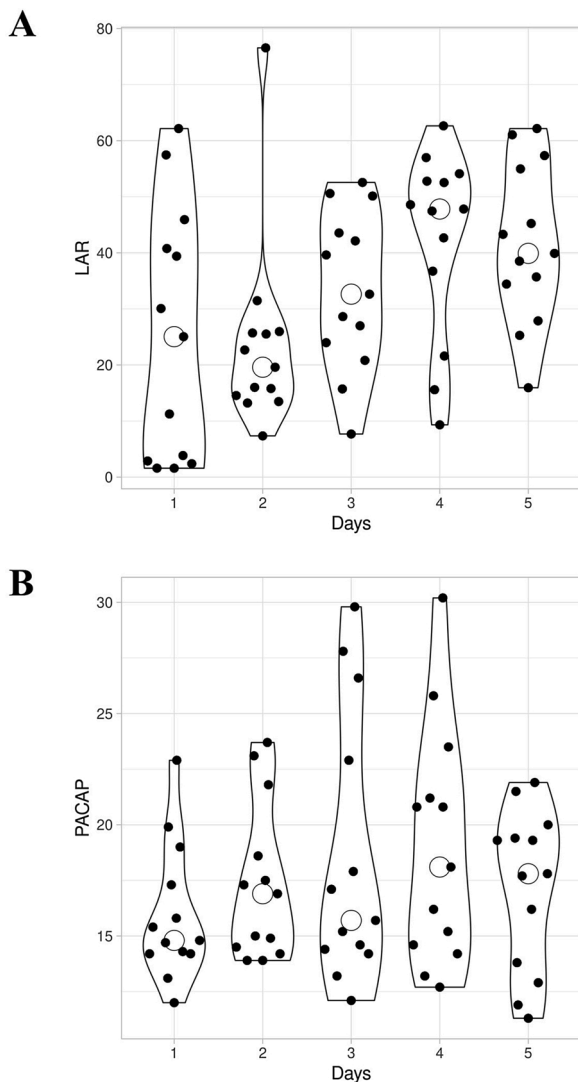


Fig. 3. LAR (%) (A) and PACAP38 (fmol/mL) (B) levels during the observed 5 days period visualized with jitter type of violin plots. The open circle indicating the median of the data.

Table 2
The correlation for day 4 between levels of CRP, PCT, LAR and PACAP38. *Correlation is significant at the 0.05 level.

		LAR	CRP	PCT	PACAP38
LAR	Correlation Coefficient	1.000	0.572*	0.126	0.426
	Sig. (2-tailed)	–	0.041	0.681	0.146
	N	13	13	13	13
CRP	Correlation Coefficient	0.572*	1.000	0.514	0.581*
	Sig. (2-tailed)	0.041	–	0.072	0.037
	N	13	13	13	13
PCT	Correlation Coefficient	0.126	0.514	1.000	0.393
	Sig. (2-tailed)	0.681	0.072	–	0.184
	N	13	13	13	13
PACAP38	Correlation Coefficient	0.426	0.581*	0.393	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.146	0.037	0.184	–
	N	13	13	13	13

laboratory biomarker with a half-life of ~24 h. Numerous previous studies indicated that the sensitivity and specificity of elevated serum PCT levels for prediction of bacterial infection seems to be superior to CRP [62]. It was found that systemic bacterial and fungal infections are associated with stronger PCT elevation than local infections, but viral infections are difficult to identify based on PCT measurements. In

Table 3
The correlation for day 5 between levels of CRP, PCT, LAR and PACAP38. *Correlation is significant at the 0.01 level.

		LAR	CRP	PCT	PACAP38
LAR	Correlation Coefficient	1.000	0.231	–0.003	0.300
	Sig. (2-tailed)	–	0.448	0.993	0.320
	N	13	13	13	13
CRP	Correlation Coefficient	0.231	1.000	0.523	0.776*
	Sig. (2-tailed)	0.448	–	0.067	0.002
	N	13	13	13	13
PCT	Correlation Coefficient	–0.003	0.523	1.000	0.194
	Sig. (2-tailed)	0.993	0.067	–	0.525
	N	13	13	13	13
PACAP38	Correlation Coefficient	0.300	0.776*	0.194	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.320	0.002	0.525	–
	N	13	13	13	13

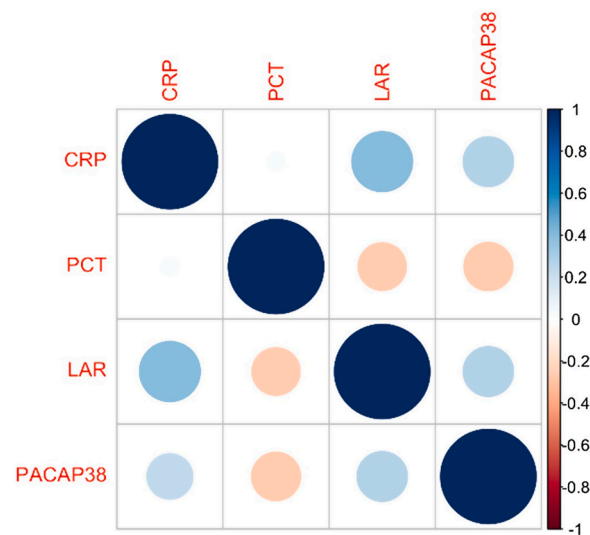


Fig. 4. Graphical display of correlation matrix. Negative correlations are displayed in red and positive correlations in blue color. Size and the color intensity of the circles are proportional to the correlation coefficients.

addition, it must be considered that as inflammatory cytokines - especially IL-6 - can stimulate the release of acute-phase proteins independently from the origin of the SIRS, elevated CRP or PCT values can also be present in different conditions without infection, such as trauma, surgery or after cardiac arrest. It has been shown that serum PCT levels are higher in patients after major surgery [63] and peak PCT levels are reached within 24 h postoperatively but return to normal levels within the first week. Albeit systemic infections are associated with greater and faster PCT elevation than that measured in non-infected patients, evaluating PCT kinetics (e.g. delta PCT) may be a better indicator of infection to absolute PCR values in critically ill patients when SIRS with infectious etiology is suspected [64]. In most cases serum PCT levels are below the laboratory value threshold in lack of septic complications [20]. Therefore, the absence of elevation of PCT levels in our study fits the perceived clinical picture, because our patients did not develop septic complications.

Although the changes of PACAP38-LI levels showed no statistical significance, the detected moderately increasing PACAP38 levels – similarly to CRP levels – could also have a clinical importance. PACAP38 levels showed a slightly increasing tendency with a peak on day 4 and slightly decreased thereafter on day 5. In the human plasma PACAP38 is cleaved by dipeptidyl peptidase IV, therefore, its estimated half-life is relatively short (between 3 [38] - 10 min [39]). For this reason, the observed prolonged elevation could be explained by secondary mechanisms after the primary trauma, associated with the anti-inflammatory

and cytoprotective effect of the neuropeptide during the CARS. Therefore, measuring PACAP levels could be an important tool to monitor the dynamic balance of pro- and anti-inflammatory processes, and further investigations are necessary to describe the exact function of PACAP in case of SIRS.

It is well known that PACAP possesses anti-inflammatory properties by regulating the production of both pro- and anti-inflammatory mediators. Delgado et al. demonstrated that PACAP can downregulate both the inflammatory and autoimmune components of arthritis [30]. Furthermore, it was found that exogenous PACAP inhibited the upregulation of pattern-recognition receptors (PRRs) mainly TLR4, which are widely expressed on various innate immune cells, and downstream signaling molecules which ultimately suppresses the expression of IL-1 β and TNF- α in the brain. Furthermore, PACAP significantly reduced the level of circulating High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) protein, which serves as a danger signal to evoke inflammatory reactions such as the activation of endothelial, glial and various blood immune cells, exacerbating brain damage [65].

PACAP immunoreactive cells have been detected in different organs associated with the immune system, such as thymus, bone marrow, spleen, and lymph nodes. PACAP receptors are also associated with various immune cells. Although the real function of PACAP in these cell types is not clearly known, connections between PACAP and immune cell maturity, mobility, and immune-phagocytosis were demonstrated in different studies. PACAP is reported both to suppress and to activate inflammation through regulation of circulating interleukins (IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ and IL-10), extravasation and histamin liberation [66]. In conclusion and based on these above mentioned protective functions, we suggest that PACAP may have an important role in the restoration of homeostasis in SIRS and have a therapeutic potential in the treatment of acute and chronic inflammatory conditions and autoimmune diseases, including septic shock or SIRS.

In the last few years an increasing number of publications deals with the possible role of PACAP as a novel biomarker. Evidences prove the high translational potential of PACAP, as changes in PACAP levels could reflect disease progression. In acute aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients, higher plasma PACAP levels are associated with clinical severity and long-term prognosis [50]. Similarly, elevation of plasma PACAP showed significant positive correlation with the severity and the mortality of acute spontaneous basal ganglia hemorrhage [51]. Elevated PACAP CSF and serum levels correlated with early mortality in case of severe traumatic brain injury patients [49]. Furthermore, increased serum PACAP levels were detected in the ictal phase of migraine [67], in female patients with post-traumatic stress syndrome [68] and in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction [69]. On the other hand, decrease of PACAP levels could also be an important predictive factor. Decreases of serum PACAP levels have been described in the inter-bout period of episodic cluster headache [70], in liver cirrhosis [71], in patients with chronic hepatitis B [72], in case of heart failure in dilated cardiomyopathy patients [40], in children with nephrotic syndrome [73], in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and premature ovarian failure [74] and in postmenopausal osteoporosis [75]. Additionally, decreased PACAP CSF levels could be detected in case of Alzheimer's disease [76,77] and in multiple sclerosis [78] and lower synovial PACAP levels could be observed in post-traumatic knee osteoarthritis [46].

5. Conclusions

This is the first study where the change of PACAP38 plasma levels and its correlation to conventional and non-conventional laboratory parameters in patients with polytrauma was described. The significant correlation between PACAP38 and CRP levels on days 4 and 5 as well as between PACAP38 and LAR levels all of the examined first 5 days together might be explained by the part of an endogenous response to the trauma induced SIRS as PACAP38 exerts its anti-inflammatory and

cytoprotective functions. Increasing number of evidence suggests that PACAP38 has a high translational value and numerous studies have demonstrated the biomarker potential of this neuropeptide in various human pathophysiological processes. Although our results are considered preliminary, we believe that PACAP38 could be a good candidate biomarker in this field.

Author contributions

Conceptualization, methodology, A.T., C.L., C.C., D.R.; investigation, resources, A.T., C.L., S.R., C.C., M.R., J.N.; data curation, D.P., D.T., B.P., A.G., R.H., Z.S.; writing-original draft preparation, A.T., D.T., D.R.; writing-review and editing, A.T., D.R., D.T., C.C., L.B., J.N., R.H., Z.S.; visualization, D.T., R.H., A.G.; supervision, A.T.; project administration, A.T.; funding acquisition, A.T. D.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgements

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 neuroinflammation 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, R.H. and A.G. 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 Szentagotai Research Centre of the University of Pecs. Bioinformatics infrastructure was supported by ELIXIR Hungary (<http://elixir-hungary.org>). We would like to thank to Patrícia Kovács, Andrea Pankaczi, Livia Szélig, Marianna Matancic for participating in collection of clinical samples.

References




- [1] World Health Organization, Injuries and Violence: The Facts, World Health Organization, Geneva, 2014. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/149798>.
- [2] C.C. Baker, L. Oppenheimer, B. Stephens, F.R. Lewis, D.D. Trunkey, Epidemiology of trauma deaths, *Am. J. Surg.* 140 (1980) 144–150, [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(80\)90431-6](https://doi.org/10.1016/0002-9610(80)90431-6).
- [3] D.D. Trunkey, *Trauma, Sci. Am.* 249 (1983) 28–35, <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0883-28>.
- [4] J.A. Evans, K.J.P. van Wessem, D. McDougall, K.A. Lee, T. Lyons, Z.J. Balogh, Epidemiology of traumatic deaths: comprehensive population-based assessment, *World J. Surg.* 34 (2010) 158–163, <https://doi.org/10.1007/s00268-009-0266-1>.
- [5] J.M.M. van Breugel, M.J.S. Niemeyer, R.M. Houwert, R.H.H. Groenwold, L.P. H. Leenen, K.J.P. van Wessem, Global changes in mortality rates in polytrauma patients admitted to the ICU—a systematic review, *World J. Emerg. Surg.* 15 (2020) 55, <https://doi.org/10.1186/s13017-020-00330-3>.
- [6] M.F. Osuchowski, K. Welch, J. Siddiqui, D.G. Remick, Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality, *J. Immunol.* 177 (2006) 1967–1974, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1967>.
- [7] A. Ostuka, H. Ogura, M. Ueyama, T. Shimazu, J.A. Lederer, Immune response to traumatic injury: harmony and discordance of immune system homeostasis, *Acute Med. Surg.* 1 (2014) 63–69, <https://doi.org/10.1002/ams2.17>.
- [8] J.K. Skelton, R. Purcell, Preclinical models for studying immune responses to traumatic injury, *Immunology* 162 (2021) 377–388, <https://doi.org/10.1111/imm.13272>.

- [9] A. Wafaisade, R. Lefering, B. Bouillon, S.G. Sakka, O.C. Thamm, T. Paffrath, et al., Epidemiology and risk factors of sepsis after multiple trauma: an analysis of 29,829 patients from the Trauma Registry of the German Society for Trauma Surgery, *Crit. Care Med.* 39 (2011) 621–628, <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318206d3df>.
- [10] M. Fröhlich, R. Lefering, C. Probst, T. Paffrath, M.M. Schneider, M. Maegele, et al., Epidemiology and risk factors of multiple-organ failure after multiple trauma: an analysis of 31,154 patients from the TraumaRegister DGU, *J. Trauma Acute Care Surg.* 76 (2014) 921–928, <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000000199>.
- [11] K.J.P. van Wessem, L.P.H. Leenen, Reduction in mortality rates of postinjury multiple organ dysfunction syndrome: a shifting paradigm? A prospective population-based cohort study, *Shock* 49 (2018) 33–38, <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000938>.
- [12] V. Ciriello, S. Gudipati, P.Z. Stavrou, N.K. Kanakaris, M.C. Bellamy, P. V. Giannoudis, Biomarkers predicting sepsis in polytrauma patients: current evidence, *Injury* 44 (2013) 1680–1692, <https://doi.org/10.1016/j.injury.2013.09.024>.
- [13] I. Lapić, A. Padoan, D. Bozzato, M. Plebani, Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in acute inflammation, *Am. J. Clin. Pathol.* 153 (2020) 14–29, <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz142>.
- [14] I.M. Rajab, P.C. Hart, L.A. Potempa, How C-reactive protein structural isoforms with distinctive bioactivities affect disease progression, *Front. Immunol.* 11 (2020) 2126, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02126>.
- [15] S. Riedel, J.H. Melendez, A.T. An, J.E. Rosenbaum, J.M. Zenilman, Procalcitonin as a marker for the detection of bacteremia and sepsis in the emergency department, *Am. J. Clin. Pathol.* 135 (2011) 182–189, <https://doi.org/10.1309/AJCP1MFYINQLEVCV2>.
- [16] M. Assicot, C. Bohuon, D. Gendrel, J. Raymond, H. Carsin, J. Guilbaud, High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection, *Lancet* 341 (1993) 515–518, [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90277-N](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90277-N).
- [17] R. Paudel, P. Dogra, A.A. Montgomery-Yates, A. Coz Yataco, Procalcitonin: a promising tool or just another overhyped test? *Int. J. Med. Sci.* 17 (2020) 332–337, <https://doi.org/10.7150/ijms.39367>.
- [18] J.V. Sakran, C.P. Michetti, M.J. Sheridan, R. Richmond, T. Waked, T. Aldaghlis, et al., The utility of procalcitonin in critically ill trauma patients, *J. Trauma Acute Care Surg.* 73 (2012) 413–418, <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31825ff5b7>.
- [19] E.W. Covington, M.Z. Roberts, J. Dong, Procalcitonin monitoring as a guide for antimicrobial therapy: a review of current literature, *Pharmacotherapy* 38 (2018) 569–581, <https://doi.org/10.1002/phar.2112>.
- [20] C. Gregoriano, E. Heilmann, A. Molitor, P. Schuetz, Role of procalcitonin use in the management of sepsis, *J. Thorac. Dis.* 12 (2020) S5–S15, <https://doi.org/10.21037/jtd.2019.11.63>.
- [21] W. Xiao, M.N. Mindrinos, J. Seok, J. Cuschieri, A.G. Cuenca, H. Gao, et al., A genomic storm in critically injured humans, *J. Exp. Med.* 208 (2011) 2581–2590, <https://doi.org/10.1084/jem.20111354>.
- [22] L. Bogar, J.A. Horvath, M. Tekeres, *Leucocyte motion during gravity sedimentation of whole blood*. Chapter: advances in critical care testing. The 1996 IFCC-AVL Award, 1997, pp. 13–19.
- [23] L. Bogar, M. Tekeres, *Leucocyte flotation during gravity sedimentation of the whole blood*, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 22 (2000) 29–33.
- [24] L. Bogar, P. Tarsoly, P. Jakso, Characteristics of light and heavy polymorphonuclear leukocytes, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 27 (2002) 149–153.
- [25] L. Bogar, Z. Molnar, P. Kenyeres, P. Tarsoly, Sedimentation characteristics of leukocytes can predict bacteraemia in critical care patients, *J. Clin. Pathol.* 59 (2006) 523–525, <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.033035>.
- [26] M. Rozanovic, C. Csontos, L. Bogar, L. Szelig, T. Bocskai, P. Kovacs, et al., Can leukocyte antisedimentation rate (LAR) predict septic complications and critical care survival early in polytrauma and burn victims? *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 64 (2016) 875–885, <https://doi.org/10.3233/CH-168024>.
- [27] C. Loibl, M. Rozanovic, L. Bogar, A. Pankaczi, P. Kovacs, A. Miseta, T, et al., Lack of early platelet and leukocyte activation can indicate complications after major burn injury, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 77 (2021) 17–26, <https://doi.org/10.3233/CH-190779>.
- [28] E. Pinter, G. Pozsgai, Z. Hajna, Z. Helyes, J. Szolcsanyi, Neuropeptide receptors as potential drug targets in the treatment of inflammatory conditions, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 77 (2014) 5–20, <https://doi.org/10.1111/bcp.12097>.
- [29] S.L. Gray, D.L. Cline, PACAP: Regulator of the Stress Response. Chapter: Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology, Handbook of stress series vol 3, 2019, pp. 279–291, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00021-7>.
- [30] M. Delgado, C. Abad, C. Martinez, M.G. Juarranz, J. Leceta, D. Ganea, et al., PACAP in immunity and inflammation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 992 (2003) 141–157, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb03145.x>.
- [31] C. Abad, Y.-V. Tan, Immunomodulatory roles of PACAP and VIP: lessons from knockout mice, *J. Mol. Neurosci.* 66 (2018) 102–113, <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1150-y>.
- [32] A. Miyata, A. Arimura, R.R. Dahl, N. Minamino, A. Uehara, L. Jiang, et al., Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 (1989) 567–574, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)91757-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)91757-9).
- [33] A. Miyata, L. Jiang, R.D. Dahl, C. Kitada, K. Kubo, M. Fujino, et al., Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170 (1990) 643–648, [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)92140-U](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)92140-U).
- [34] D. Vaudry, A. Falluel-Morel, S. Bourgault, M. Basille, D. Burel, O. Wurtz, et al., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery, *Pharmacol. Rev.* 61 (2009) 283–357, <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>.
- [35] D. Toth, E. Szabo, A. Tamas, T. Juhasz, G. Horvath, E. Fabian, et al., Protective effects of PACAP in peripheral organs, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 11 (2020), <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00377>.
- [36] C. Martinez, Y. Juarranz, C. Abad, A. Arranz, B.G. Miguel, F. Rosignoli, et al., Analysis of the role of the PAC1 receptor in neutrophil recruitment, acute-phase response, and nitric oxide production in septic shock, *J. Leukoc. Biol.* 77 (2005) 729–738, <https://doi.org/10.1189/jlb.0704432>.
- [37] M. Delgado, C. Martinez, D. Pozo, J.R. Calvo, J. Leceta, D. Ganea, et al., Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF- α and IL-6, *J. Immunol.* 162 (1999) 1200–1205.
- [38] S. Birk, J.T. Sitarz, K.A. Petersen, P.S. Oturai, C. Kruse, J. Fahrenkrug, et al., The effect of intravenous PACAP38 on cerebral hemodynamics in healthy volunteers, *Regul. Pept.* 140 (2007) 185–191, <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.12.010>.
- [39] M. Li, J.L. Maderdrut, J.J.L. Lertora, V. Batuman, Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: a case study, *Peptides* 28 (2007) 1891–1895, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.05.002>.
- [40] Z. Sarszegi, D. Szabo, B. Gaszner, A. Konyi, D. Reglodi, J. Nemeth, et al., Examination of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a potential biomarker in heart failure patients, *J. Mol. Neurosci.* 68 (2019) 368–376, <https://doi.org/10.1007/s12031-017-1025-7>.
- [41] R. Brubel, D. Reglodi, E. Jambor, M. Koppan, A. Varnagy, Z. Biro, et al., Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 46 (2011) 189–194, <https://doi.org/10.1002/jms.1884>.
- [42] M. Koppan, A. Varnagy, D. Reglodi, R. Brubel, J. Nemeth, A. Tamas, et al., Correlation between oocyte number and follicular fluid concentration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in women after superovulation treatment, *J. Mol. Neurosci.* 48 (2012) 617–622, <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9743-3>.
- [43] D. Toth, B. Veszpremi, M. Koppan, A. Tamas, D. Szogyi, R. Brubel, et al., Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human amniotic fluid samples, *Reprod. Biol.* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.07.013>.
- [44] R. Borzsei, L. Mark, A. Tamas, T. Bagoly, C. Bay, K. Csanaky, et al., Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk, *Eur. J. Endocrinol.* 160 (2009) 561–565, <https://doi.org/10.1530/EJE-08-0911>.
- [45] K. Csanaky, E. Banki, K. Szabadi, D. Reglodi, I. Tarcai, L. Czeglédi, et al., Changes in PACAP immunoreactivity in human milk and presence of PAC1 receptor in mammary gland during lactation, *J. Mol. Neurosci.* 48 (2012) 631–637, <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9779-4>.
- [46] B.Y. Sun, Z.P. Sun, Z.C. Pang, W.T. Huang, S.P. Wu, Decreased synovial fluid pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) levels may reflect disease severity in post-traumatic knee osteoarthritis after anterior cruciate ligament injury, *Peptides* 116 (2019) 22–29, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.04.009>.
- [47] D. Reglodi, Z. Helyes, J. Nemeth, R.A. Vass, A. Tamas, PACAP as a potential biomarker: alterations of PACAP levels in human physiological and pathological conditions. chapter: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-PACAP, *Curr. Topics Neurotox.* 11 (2016) 815–832, https://doi.org/10.1007/978-3-319-35135-3_48.
- [48] D. Toth, A. Tamas, D. Reglodi, The neuroprotective and biomarker potential of PACAP in human traumatic brain injury, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020), <https://doi.org/10.3390/jms21030827>.
- [49] P. Bukovics, E. Czeiter, K. Amrein, N. Kovacs, J. Pal, A. Tamas, et al., Changes of PACAP level in cerebrospinal fluid and plasma of patients with severe traumatic brain injury, *Peptides* 60 (2014) 18–22, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.07.001>.
- [50] L. Jiang, W.H. Wang, X.Q. Dong, W.H. Yu, Q. Du, D.B. Yang, et al., The change of plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide levels after aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *Acta Neurol. Scand.* 134 (2016) 131–139, <https://doi.org/10.1111/ane.12522>.
- [51] B.Q. Ma, M. Zhang, L. Ba, Plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide concentrations and mortality after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage, *Clin. Chim. Acta* 439 (2015) 102–106, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.010>.
- [52] C.E. Ventetulo, M.M. Levy, Biomarkers: diagnosis and risk assessment in sepsis, *Clin. Chest Med.* 29 (2008) 591–603, <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2008.07.001>.
- [53] M. Keel, O. Trentz, Pathophysiology of polytrauma, *Injury* 36 (2005) 691–709, <https://doi.org/10.1016/j.injury.2004.12.037>.
- [54] B. Jakab, D. Reglodi, R. Jozsa, T. Hollosy, A. Tamas, A. Lubics, et al., Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay, *J. Biochem. Biophys. Methods* 61 (2004) 189–198, <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.03.002>.
- [55] M. Postma, J. Goedhart, PlotsOfData: A web app for visualizing data together with their summaries, *PLoS Biol.* 17 (2019), e3000202, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000202>.
- [56] J.Z. Bakdash, L.R. Marusic, Rmcorr: repeated measures correlation. R Package Version 0.4.0, 2020. <https://CRAN.R-project.org/package=rmmcorr>.
- [57] R Core Team, R: a Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019. <https://www.R-project.org/>.

- [58] T. Wei, V. Simko, R Package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix. (Version 0.88), 2021. <https://github.com/taiyun/corrplot>.
- [59] M. Delgado, E.J. Munoz-Elias, R.P. Gomariz, D. Ganea, Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies, *J. Immunol.* 162 (1999) 1707–1716.
- [60] L. Bogar, Z. Molnar, P. Tarsoly, P. Kenyeres, S. Marton, Serum procalcitonin level and leukocyte antisedimentation rate as early predictors of respiratory dysfunction after oesophageal tumour resection, *Crit. Care* 10 (2006) R110, <https://doi.org/10.1186/cc4992>.
- [61] T. Molnar, V. Papp, M. Banati, L. Szereday, G. Pusch, L. Szapary, et al., Relationship between C-reactive protein and early activation of leukocytes indicated by leukocyte antisedimentation rate (LAR) in patients with acute cerebrovascular events, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 44 (2010) 183–192, <https://doi.org/10.3233/CH-2010-1273>.
- [62] C. Wacker, A. Prkno, F.M. Brunkhorst, P. Schlattmann, Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Infect. Dis.* 13 (2013) 426–435, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70323-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70323-7).
- [63] C. Clec'h, F. Ferriere, P. Karoubi, J.P. Fosse, M. Cupa, P. Hoang, et al., Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock, *Crit. Care Med.* 32 (2004) 1166–1169.
- [64] D. Trasy, K. Tanczos, M. Nemeth, P. Hankovszky, A. Lovas, A. Mikor, et al., Delta procalcitonin is a better indicator of infection than absolute procalcitonin values in critically ill patients: a prospective observational study, *J. Immunol. Res.* 9 (2016), 3530752, <https://doi.org/10.1155/2016/3530752>.
- [65] J. Kim, J.S. Choi, Y. Yu, K. Nam, C. Piao, S. Kim, et al., HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain, *J. Neurosci.* 26 (2006) 6413–6421, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3815-05.2006>.
- [66] N.M. Sherwood, S.L. Krueckl, J.E. McRory, The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily, *Endocr. Rev.* 21 (2000) 619–670, <https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0414>.
- [67] B. Tuka, Z. Helyes, A. Markovics, T. Bagoly, J. Szolcsanyi, N. Szabo, et al., Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients, *Cephalalgia* 33 (2013) 1085–1095, <https://doi.org/10.1177/0333102413483931>.
- [68] K.J. Ressler, K.B. Mercer, B. Bradley, T. Jovanovic, A. Mahan, K. Kerley, et al., Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor, *Nature* 470 (2011) 492–497, <https://doi.org/10.1038/nature09856>.
- [69] D. Szabo, Z. Sarszegi, B. Polgar, E. Saghy, A. Nemeth, D. Reglodi, et al., PACAP-38 in acute ST-segment elevation myocardial infarction in humans and pigs: a translational study, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021), <https://doi.org/10.3390/ijms22062883>.
- [70] B. Tuka, N. Szabo, E. Toth, Z.T. Kincses, A. Pardutz, D. Szok, et al., Release of PACAP-38 in episodic cluster headache patients - an exploratory study, *J. Headache Pain* 17 (2016) 69, <https://doi.org/10.1186/s10194-016-0660-7>.
- [71] L.Y. Yang, J.P. Hou, E.-K. Han, G. Qiao, L.B. Liu, X.B. Men, Decreased plasma pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) levels are linked with disease severity in patients with liver cirrhosis, *Int. J. Pept. Res. Ther.* 27 (2021) 1229–1237, <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10163-6>.
- [72] I.S. Elefsiniotis, I. Ketikoglou, G. Kafiri, K.D. Pantazis, A. Moulakakis, C. Mavrogiannis, Plasma pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) levels in chronic hepatitis B patients under lamivudine treatment, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15 (2003) 1209–1216, <https://doi.org/10.1097/00042737-200311000-00010>.
- [73] B. Eneman, K. Freson, L. van den Heuvel, E. van Hoyweghen, L. Collard, J. Vande Walle, et al., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficiency associated with increased platelet count and aggregability in nephrotic syndrome, *J. Thromb. Haemost.* 13 (2015) 755–767, <https://doi.org/10.1111/jth.12891>.
- [74] H. Kanasaki, I.N. Purwana, A. Oride, T. Mijiddorj, U. Sukhbaatar, K. Miyazaki, Circulating kisspeptin and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) do not correlate with gonadotropin serum levels, *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 29 (2013) 583–587, <https://doi.org/10.3109/09513590.2013.788624>.
- [75] X.X. Zhu, L.J. Weng, X.W. Qian, C.Y. Huang, W.F. Yao, Y.L. Lu, Decreased pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) levels were linked with disease severity of postmenopausal osteoporosis, *Int. J. Pept. Res. Ther.* 26 (2020) 1327–1334, <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09937-w>.
- [76] P. Han, W. Liang, L.C. Baxter, J. Yin, Z. Tang, T.G. Beach, et al., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is reduced in Alzheimer disease, *Neurology* 82 (2014) 1724–1728, <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000417>.
- [77] P. Han, R.J. Caselli, L. Baxter, G. Serrano, J. Yin, T.G. Beach, et al., Association of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with cognitive decline in mild cognitive impairment due to Alzheimer disease, *JAMA Neurol.* 72 (2015) 333–339, <https://doi.org/10.1001/jamaneuro.2014.3625>.
- [78] A. Baranowska-Bik, J. Kochanowski, D. Uchman, E. Wolinska-Witort, M. Kalisz, L. Martynska, et al., Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in humans with multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 263 (2013) 159–161, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.08.012>.

Article

Investigation of PACAP38 and PAC1 Receptor Expression in Human Retinoblastoma and the Effect of PACAP38 Administration on Human Y-79 Retinoblastoma Cells

Dénes Tóth^{1,*}, Eszter Fábíán², Edina Szabó², Evelin Patkó², Viktória Vicena², Alexandra Váczy², Tamás Atlasz^{2,3}, Tamás Tornóczky⁴ and Dóra Reglódi²

¹ Department of Forensic Medicine, University of Pécs Medical School, Szigeti út 12, 7624 Pécs, Hungary

² Department of Anatomy, HUN-REN-PTE PACAP Research Team, Centre for Neuroscience, University of Pécs Medical School, Szigeti út 12, 7624 Pécs, Hungary; eszter.fabian@aok.pte.hu (E.F.); szaboedina90@gmail.com (E.S.); evelin.patko@gmail.com (E.P.); vicena.viktoria@gmail.com (V.V.); vaczyalexandra@gmail.com (A.V.); attam@gamma.ttk.pte.hu (T.A.); dora.reglodia@aok.pte.hu (D.R.)

³ Department of Sportbiology, University of Pécs, Ifjúság út 6, 7624 Pécs, Hungary

⁴ Department of Pathology, University of Pécs Medical School and Clinical Center, 7624 Pécs, Hungary; tornoczki.tamas@pte.hu

* Correspondence: denes.toth@aok.pte.hu

Abstract: Retinoblastoma represents the most prevalent malignant neoplasm affecting the eyes in childhood. The clear-cut origin of retinoblastoma has not yet been determined; however, based on experiments, it has been suggested that *RB1* loss in cone photoreceptors causes retinoblastoma. Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) is a pleiotropic neuropeptide which has been shown to be affected in certain tumorous transformations, such as breast, lung, kidney, pancreatic, colon, and endocrine cancers. This study aimed to investigate potential changes in both PACAP38 and PAC1 receptor (PAC1R) expression in human retinoblastoma and the effect of PACAP38 administration on the survival of a human retinoblastoma cell line (Y-79). We analyzed human enucleation specimens removed because of retinoblastoma for PACAP38 and PAC1R immunostaining and the effect of PACAP38 on the survival of the Y-79 cell line. We described for the first time that human retinoblastoma cells from patients showed only perinuclear, dot-like immunopositivity for both PACAP38 and PAC1R, irrespective of laterality, genetic background, or histopathological features. Nanomolar (100 nM and 500 nM) PACAP38 concentrations had no effect on the viability of Y-79 cells, while micromolar (2 μ M and 6 μ M) PACAP38 significantly decreased tumor cell viability. These findings, along with general observations from animal studies showing that PACAP38 has strong anti-apoptotic, anti-inflammatory, and antioxidant effects on ocular tissues, together suggest that PACAP38 and its analogs are promising candidates in retinoblastoma therapy.

Keywords: PACAP; retinoblastoma; enucleation; immunohistochemistry; cell survival; cell viability



Citation: Tóth, D.; Fábíán, E.; Szabó, E.; Patkó, E.; Vicena, V.; Váczy, A.; Atlasz, T.; Tornóczky, T.; Reglódi, D. Investigation of PACAP38 and PAC1 Receptor Expression in Human Retinoblastoma and the Effect of PACAP38 Administration on Human Y-79 Retinoblastoma Cells. *Life* **2024**, *14*, 185. <https://doi.org/10.3390/life14020185>

Academic Editor: Soo-Young Kim

Received: 18 December 2023

Revised: 23 January 2024

Accepted: 25 January 2024

Published: 26 January 2024



Copyright: © 2024 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/>).

1. Introduction

Retinoblastoma, acknowledged as one of the leading childhood malignancies, is the most prevalent primary intraocular neoplasm that tends to manifest in early childhood [1]. The worldwide occurrence of retinoblastoma is approximately 1 in 16,000–18,000 live births [2]. However, there are variations in incidence among countries, regions, and ethnic groups, with almost similar incidence rates for males and females [3]. Developing countries with high birth rates have the highest mortality (40–70%) compared with Europe, the USA, and Canada (3–5%) [4]. The causes of these differences in mortality include delays in diagnosis, advanced stages of the disease, lack of access to health care systems, and other socioeconomic factors [5].

Biallelic loss-of-function mutations in the tumor suppressor gene *RB1*, located on chromosomal region 13q14, account for the initiation of retinoblastoma in 95% of cases [6].

Individuals with germline mutation (first hit) require only one additional hit (acquired somatic mutation). Therefore, heritable retinoblastoma occurs at a younger age and is usually multifocal or bilateral. In contrast, most sporadic cases are unilateral as a result of mutation in both alleles of *RB1* [7]. In rare cases, sporadic retinoblastoma could develop in the absence of *RB1* mutation as a consequence of the somatic amplification of the *MYCN* gene [8]. The exact cellular origin of retinoblastoma is not clear yet [9,10]. Based on live imaging data of early tumors from patients' eyes, the inner nuclear layer of the retina seemed to be the origin [11], but based on experiments, it has been suggested that human retinoblastoma arise from differentiating cones as it was found that retinoblastoma cells exhibit multiple elements of the cone precursor signaling circuitry and depend on this circuitry for their proliferation, survival [12], and *RB1* knockdown-induced human cone precursor proliferation [13]. Distinctions in molecular, clinical, and histopathological aspects among *RB1*−/− tumors reveal a progression marked by a loss of differentiation and a decline in the photoreceptor expression signature [14]. Human cone precursor maturation's unique cell-signaling circuitry makes them sensitive to *RB1* loss, leading to proliferation and lesion formation resembling retinoma and retinoblastoma [15]. A human Rb organoid model also identified maturing cone precursors as the origin of human retinoblastoma [16]. A multi-omics approach identified two retinoblastoma molecular subtypes expressing cone markers [17]. Interestingly, *RB1* loss was observed to induce proliferation and tumorigenesis in maturing cone precursors, while it was found that the somatic amplification of the *MYCN* gene induced proliferation in immature cone precursors [18].

Retinoblastoma is characterized primarily by leukocoria, with subsequent symptoms including strabismus, a red and painful eye, impaired visual tracking, and vision loss. Diagnosis is usually clinical (ophthalmoscopy) combined with additional examinations like ultrasonography, computer tomography, or magnetic resonance imaging [5]. Retinoblastoma is usually white and has a brain-like appearance with pale areas of calcification and yellowish necrotic zones. The histopathological characteristics of retinoblastoma encompass small hyperchromatic cells exhibiting a high nuclear-to-cytoplasmic ratio, accompanied by areas of variable-sized necrosis and dystrophic calcification [19]. The level of retinal differentiation in retinoblastoma varies and correlates negatively with the age of a child [20]. Differentiated tumors include fleurettes, representing advanced photoreceptor differentiation; Flexner–Wintersteiner rosettes, showing early retinal differentiation; and Homer Wright rosettes, exhibiting primitive neuroblastic differentiation [21,22].

The current therapy for retinoblastoma depends on the time of disease detection and socioeconomic factors. In low- and middle-income countries, therapy is aimed at protecting patients' lives due to enucleation, followed by salvage of the globe and vision. Unfortunately, enucleation is still the most frequent choice worldwide [23].

An evolutionarily conserved neuropeptide, pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP), is recognized for its multifunctionality and pleiotropy. Its established anti-apoptotic, anti-inflammatory, and antioxidant effects [24,25] are attributed to two functionally active isoforms: PACAP38 [26] and PACAP27 [27]. The latter represents 10% of the total PACAP in the body, while PACAP38 is the predominant form in mammalian tissues. PACAP acts on two nonspecific and one specific G-protein-coupled receptors. Highlighting its selective nature, the PAC1 receptor (PAC1R) responds exclusively to PACAP, in contrast to the shared VPAC1 and VPAC2 receptors that accommodate both PACAP and VIP. Across the central and peripheral nervous systems, as well as in peripheral organs, PACAP and PAC1R display broad and widespread expression [28].

The current understanding of the presence, distribution, and functional aspects of PACAP and its specific receptor in the human eye is limited. In a previous study, Olianias and coauthors [29] provided evidence showcasing that PACAP has the capacity to elevate cAMP levels in the retina. Additionally, from retinal homogenates obtained from human fetuses, they successfully identified the mRNA for both PACAP and its receptors. The first detailed exploration of the distribution of PACAP38 and PAC1R within the normal human

eye was conducted in 2022 [30]. Corneal epithelial and endothelial cells, the iris (both muscle and stroma), the ciliary body, several retinal layers, and the optic nerve showed immunopositivity for both PACAP38 and PAC1R. Regarding the retina, the pigment epithelial layer—forming from the original outer eyecup layer—showed strong expression for PACAP38 and PAC1R. Weak or no immunostaining was observed in the outer nuclear and plexiform layers where rods and cones are located. In the majority of cases, the inner nuclear layer exhibited a markedly positive expression for both the peptide and PAC1R. The inner plexiform layer had strong PACAP38 and PAC1R immunoreactivity. Interestingly, a specific staining pattern was observed in the ganglion cell layer, where some ganglion cells showed very strong, and others showed negative, immunosignals [30]. PACAP takes part in a wide range of physiological [31–33] and pathological processes [34,35]. *In vitro* studies with human corneal endothelial cells and pigment epithelial cells proved that PACAP stimulates adenylate cyclase and various intracellular signaling pathways to protect the cells against various noxas, including hyperglycemia, oxidative stress, and growth factor deprivation [36–41]. *In vivo* studies showed the protective effect of PACAP in different types of retinopathies [40,42–44], glaucoma [45], and injuries [46,47]. PACAP also affects cellular differentiation [48], cell division, cell cycle, and cell death [49]. As PACAP regulates almost every aspect of stem cell physiology [50], it is not surprising that PACAP and its receptors were detected in numerous human cancer types [51–53]. Many different tumors show over- or under-expression of the PACAPergic system. The activation of PACAP receptors in specific neoplasms can lead to growth stimulation, whereas in others, it results in inhibitory effects. These effects depend on numerous factors, like the origin and type of the tumor, the stage of differentiation, and the tumoral environment [52,54]. As PACAP is shown to be involved in certain tumorous transformations [55] and changes in PACAP and PAC1R can be detected under pathological conditions [34,35], this study aimed to investigate potential alterations in the expression of PACAP38 and PAC1R within tumor tissue samples obtained from enucleation specimens of retinoblastoma patients and the effect of PACAP38 treatment on the survival of human Y-79 retinoblastoma cells.

2. Materials and Methods

2.1. Human Eyes

This study was conducted according to the ethical standards specified in the Declaration of Helsinki, along with due consideration of the corresponding regulations within Hungarian law. The collection of all samples strictly followed a protocol that received approval from the Institutional Ethics Committee at the University of Pécs (9188-PTE 2022; approval date: 10 June 2022). The identification of cases involved a comprehensive search through the pathological records of the Department of Pathology at the University of Pécs Medical School, covering the period from January 2001 to December 2017. This search specifically targeted enucleation specimens carrying a histopathological diagnosis of retinoblastoma. Patient medical records were reviewed for demographic information and clinical findings. The staging was conducted following the eighth edition of the Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) [22]. In brief, pT1 denotes intraocular tumor(s) without local invasion, focal choroidal invasion, or involvement of the optic nerve head either pre- or intralaminarily. pT2 corresponds to intraocular tumor(s) with local invasion, pT3 indicates intraocular tumor(s) with substantial local invasion, and pT4 signifies the presence of extraocular tumor(s) [22]. The level of differentiation (grading) was classified as follows: G1 corresponds to a tumor displaying areas of retinocytoma, characterized by fleurettes or neuronal differentiation, accounting for more than half of the tumor. G2 signifies a tumor featuring numerous rosettes, including Flexner–Wintersteiner or Homer Wright rosettes, constituting more than half of the tumor. G3 denotes a tumor with occasional rosettes (Flexner–Wintersteiner or Homer Wright rosettes), accounting for less than half of the tumor. G4 represents a tumor with poorly differentiated cells lacking rosettes or displaying extensive areas of anaplasia [56].

Immunohistochemistry

Tissue samples underwent fixation in a 10% neutral-buffered formalin solution, followed by dehydration through a series of graded ethanol solutions and eventual embedding in paraffin. Subsequently, sections with a three-micrometer thickness were cut using a rotational microtome (Microm HM 325, Thermo Scientific, Ltd., Waltham, MA, USA) and affixed onto coated glass slides. Following deparaffinization and rehydration through graded ethanol, the samples underwent pretreatment using a heat-induced epitope retrieval method. This involved subjecting the samples to a microwave oven for 15 min at 750 W in a 1 mM (pH = 6.0) citrate buffer. Subsequent to cooling at room temperature, the samples were washed in a pH 7.6 TRIS-buffered saline solution (TBS). Samples were then incubated for 1 h at room temperature with anti-PACAP38 (Cat. Nr. T-4473, BMA Biomedicals, Ltd., Augst, Switzerland, 1:500) and anti-PAC1-R antibody (Cat. Nr. AVR-003, Alomone Labs, Ltd., Jerusalem, Israel, 1:125). After washing in TBS, the sections were exposed to an HISTOLS-AP-R anti-rabbit alkaline phosphatase labeled detection system (Cat. Nr. 30,011.R500A, Histopathology, Ltd., Pécs, Hungary) for a 30 min incubation at room temperature. Subsequently, they underwent another round of TBS washing, and the enzymatic reaction was initiated in a dark environment using an HISTOLS Resistant AP-Red Chromogen/substrate System (Cat. Nr. 30,019K, Histopathology, Ltd., Pécs, Hungary). Following a 10 min incubation with the chromogen/substrate working solution, staining intensity was controlled under a light microscope. This chromogen substance was chosen because its magenta staining was visible in the pigmented cells. Counterstaining was performed with hematoxylin, and tap water was used for bluing. After drying, samples were dehydrated in graded ethanol and cleared in xylene before being mounted with a permanent mounting medium. For negative control, the primary antibody was replaced with TBS, which resulted in no staining. The healthy parts of the eye served as an internal positive control. Using a Panoramic MIDI II automatic digital slide scanner (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary), the slides were thoroughly scanned, and images were captured through CaseViewer 2.3 software (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary).

2.2. Cell Culture

Y-79 human retinoblastoma cells, sourced from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), were cultivated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. The culture was maintained in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂, and the culture medium was refreshed every second day. All cell culture reagents were procured from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2.1. Cell Viability Assay

A colorimetric assay for evaluating cell viability, an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), was utilized to investigate the effect of PACAP38. Cells were seeded in 96-well plates (4 × 10³ cells/well). Twelve wells served as control, and 100 µL of serum-free medium was added to these wells. Six wells in each column were treated with 10 µL 0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2 µM, and 6 µM PACAP38 (produced within the Department of Medical Chemistry at the University of Szeged, Szeged, Hungary) to observe the dose dependency. The wells were then filled with serum-free medium to a final volume of 100 µL. Following a 24 h incubation period, 10 µL of a 5 mg/mL MTT solution was added to each well, achieving a final concentration of 0.45 mg/mL. The plate underwent an additional 4 h incubation in a thermostat, after which the reduced formazan dye was dissolved using 100 µL DMSO (dimethyl-sulfoxide). After 30 min on a shaker, the absorbance was gauged at 630 nm using an ELISA reader (Dialab Ltd., Budapest, Hungary). The assay was performed in duplicate and repeated three times.

2.2.2. Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Dunnett’s test with GraphPad Prism version 9.5.0 for Microsoft Windows (GraphPad Software LLC, San Diego, CA, USA). The presented data include means ± standard deviation (SD).

3. Results

3.1. Human Eyes

3.1.1. Clinical Data

Seven children (one girl and six boys) were included in our study who underwent primary enucleation because of retinoblastoma. The mean age at enucleation was 16.3 ± 10.5 months (median: 16.6 months; range: 32.2). Except for two cases, the right eye was affected, and there were no bilateral cases. In three cases, the tumor site involved the superotemporal quadrant after sectioning, while in one case, the lesion was near the optic disc. In the remaining cases, the tumor occupied the entire eye, and the precise point of origin could not be determined. In all cases, with one exception, a monofocal tumor was observed, and in the case of multifocal retinoblastoma, genetic involvement could not be confirmed. However, in the monofocal case, familial clustering and an RB1 mutation were identified. Histomorphologically, in three cases, poorly differentiated cells without rosettes were found (G4), while in one case, a tumor with occasional Homer Wright rosettes (G3) was observed. In the remaining cases, a tumor with many rosettes was detected (G2). Among the latter, Homer Wright rosettes were visible in two cases, and Flexner–Wintersteiner rosettes were observed in one case. In all cases, various degrees of necrosis were present within the tumors, and except for two cases, calcifications were also observed. The Mib-1 (Ki-67) labeling index was relatively high, exceeding 50% in all cases (excluding two instances where such an examination was not conducted for technical reasons). Table 1 provides an overview of the primary demographic and clinical features, while Table 2 summarizes the main pathological findings of the cases.

Table 1. Main clinical and demographic features of retinoblastoma cases.

Case	Sex	Age at Enucleation (Months)	Eye Involved	Tumor Site	Number of Tumor Foci	RB1 Mutation
1	male	9.9	right	superotemporal	monofocal	no
2	female	16.6	right	superotemporal	multifocal	no
3	male	9.3	right	superotemporal	monofocal	no
4	male	4.1	right	adjacent to the optic disc	monofocal	yes
5	male	36.3	left	whole eye	monofocal	no
6	male	19.9	left	whole eye	monofocal	no
7	male	18.3	right	whole eye	monofocal	no

Table 2. Pathological findings of retinoblastoma cases (Mib-1: cell proliferation marker—percentage of immunoreactive tumor cells; n.d.: no data).

Case	Histomorphology	Necrosis	Calcification	Mib-1 (%)	Stage
1	tumor cells arranged in sheets, nests, and trabeculae (G4)	large	focal	80	pT2
2	tumor with many Homer Wright rosettes (G2)	small	focal	90	pT2
3	tumor with many Homer Wright rosettes (G2)	small	focal	90	pT2
4	tumor with many Flexner–Wintersteiner rosettes (G2)	large	no	50–60	pT2
5	tumor with occasional Homer Wight rosettes (G3)	large	focal	80	pT2
6	tumor cells arranged in sheets, nests, and trabeculae (G4)	large	focal	n.d.	pT2
7	tumor cells arranged in sheets, nests, and trabeculae (G4)	large	no	n.d.	pT2

3.1.2. Immunohistochemistry

In accordance with our earlier observations [30], we found PACAP38 and PAC1R immunopositivity in disease-free areas of the eye, including the cornea (both epithelial and

endothelial cells), the iris (stroma and muscles), the ciliary body, and different retinal layers (pigment epithelial layer, inner plexiform layer, and ganglion cell layer). These findings served as a positive internal control. Figure 1 includes representative pictures from the disease-free section of the eyes, which served as an internal control in the study.

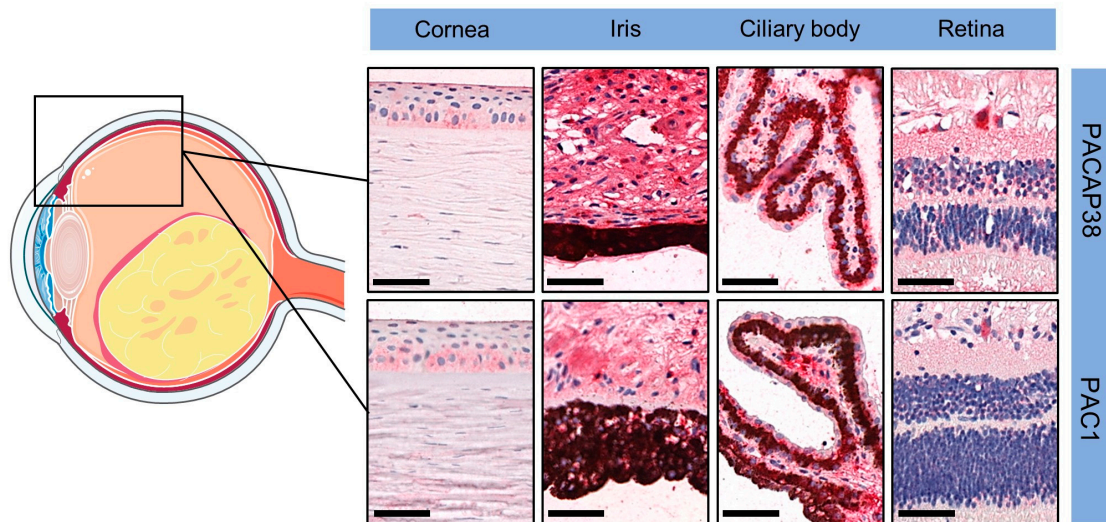


Figure 1. Representative pictures of PACAP38 and PAC1R immunopositivity in disease-free parts of the eyes (magnification 200 \times ; scale bars: 50 μ m). Certain parts of the figure were created using images from Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>, accessed on 1 November 2023).

Retinoblastoma cells showed only perinuclear, dot-like immunopositivity (black arrows) for both PACAP38 and PAC1R, irrespective of laterality and genetic background. In this immunopattern, there was no difference between the poorly differentiated samples or the different types of rosettes, regardless of the proportion of rosettes in the tumor (Figure 2).

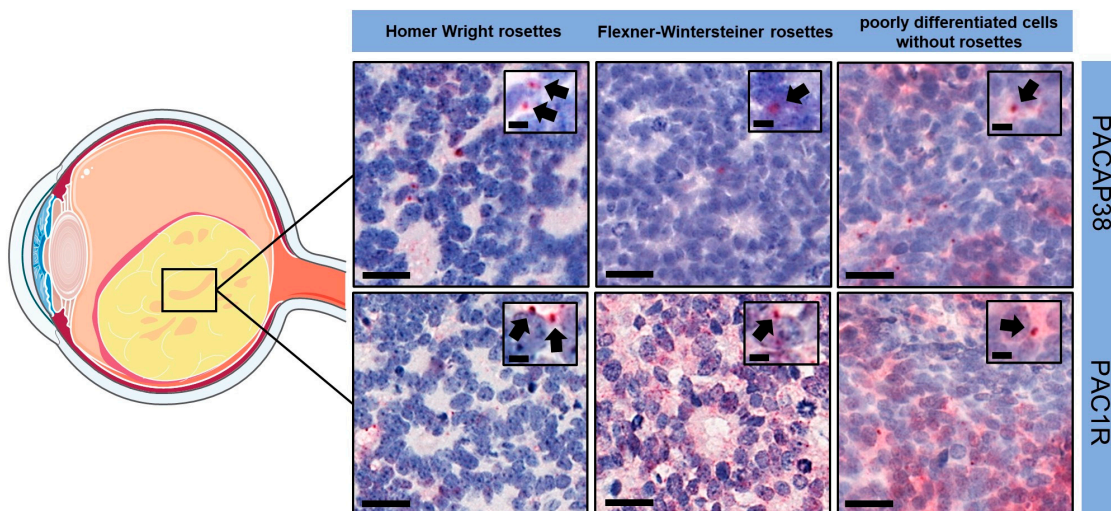


Figure 2. PACAP38 and PAC1R immunopositivity in the tumor samples (magnification: large pictures 400 \times , scale bars: 20 μ m; index pictures 700 \times , scale bars: 5 μ m). Black arrows indicated perinuclear, dot-like immunopositivity in retinoblastoma cells. The illustration includes components that were drawn utilizing images sourced from Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>, accessed on 1 November 2023).

3.2. Cell Culture

One-way analysis of variance indicated significant differences in cell survival among the treatment groups ($F = 5.165$, $p = 0.0047$). Dunnett's multiple comparisons test revealed statistically significant differences between the control group and both the 2 μM PACAP38 (mean diff: 16.5, 95% CI [1.471, 31.52], $p = 0.035$) and the 6 μM PACAP38 (mean diff: 20.38, 95% CI [8.488, 32.26], $p = 0.0053$)-treated groups. Although the mean difference for the 0.5 μM PACAP38-treated group was similar to that of the 2 μM PACAP38-treated group (17.09 vs. 16.5), there were no statistically significant differences observed when compared to the control group (95% CI [−1.290, 35.48], $p = 0.0653$) (Figure 3).

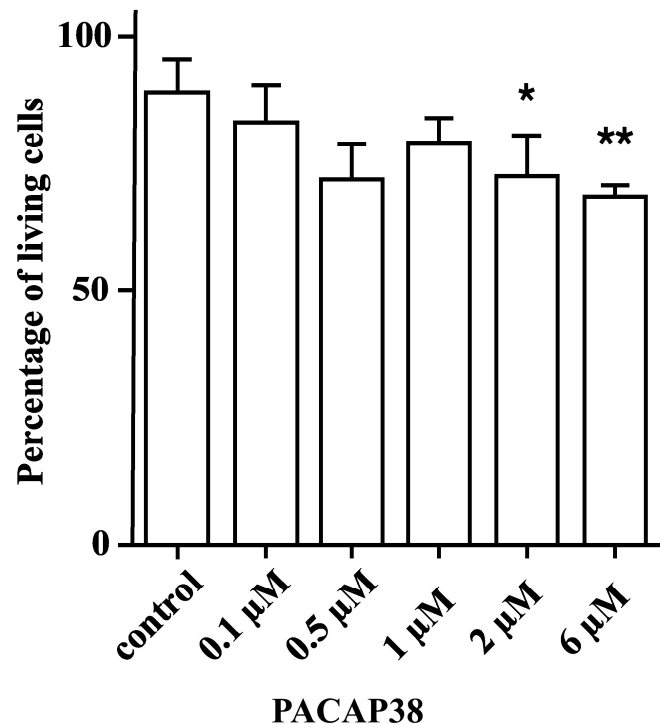


Figure 3. The percentage of living Y-79 cells after different concentrations of PACAP38 administration. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to the control group. The data are presented as mean \pm SD).

4. Discussion

In the first part of our study, we analyzed human enucleation specimens removed because of retinoblastoma for PACAP38 and PAC1R immunostaining and described, for the first time, the distribution of PACAP38 and PAC1R expression in human retinoblastoma. We found PACAP38 and PAC1R immunopositivity in the tumor-free area of the eyes consistent with the results of the first description of the distribution of PACAP38 and PAC1R in the human eye [30] which, therefore, served as a positive internal control. In retinoblastoma, we observed only focal, perinuclear dot-like immunopositivity for both PACAP38 and PAC1R. There were no differences in the immunopatterns between the different histological features, i.e., the presence of different types of rosettes.

A broad spectrum of human cancers has been observed to express PACAP38 and PAC1R. Furthermore, certain tumors show alteration of the PACAPergic system compared to the normal tissue. In papillary thyroid carcinoma, the overexpression of PACAP38-positive cells was detected compared to normal thyroid glands, while colloid showed weaker or no staining pattern. Regarding PAC1R, tumor cells showed only minimal or no expression compared to the normal glands, where strong granular expression was present [57]. Similar overexpression was observed in the case of invasive ductal adenocarcinoma of the breast both for PACAP38 and PAC1R [58,59]. Lower PACAP38 and PAC1R immunosignals were detected in the case of pancreatic ductal adenocarcinoma and insulinoma compared to those in healthy pancreatic tissues [60,61]. In the case of non-small cell

lung cancer, colon adenocarcinoma, and kidney tumor samples, a significantly lower level of PACAP38-like immunoreactivity was detected by RIA compared with that in normal healthy tissues [62,63]. Prostatic adenocarcinoma showed essentially preserved PACAP38 immunopatterns compared to those in normal prostatic glands [64], and no significant alterations in PACAP38-like immunoreactivity detected by RIA were found in cases of urinary bladder tumor samples, prostatic adenocarcinoma samples, or various types of testicular malignancies, like seminoma, embryonal carcinoma, yolk sac tumor, and teratoma [63]. Regarding the tumors mentioned above in the immunohistochemical studies, both the peptide and its specific receptor showed widespread expression, including membrane and intracytoplasmic PAC1R expression, and in none of these cases were they able to detect a pattern where PACAP38 and PAC1R were expressed only in a perinuclear dot-like pattern, as observed in our study.

Retinoblastoma differs from these types of tumors as the exact cellular origin of retinoblastoma is still controversial. For this reason, in our experiment, we were not able to compare the PACAP38 and PAC1R immunoprofiles of 'normal' and tumor tissues. We attempted to compare the immunopatterns observed in disease-free parts of the eyes within the inner nuclear layer, outer nuclear layer (housing the nuclei of photoreceptor cells), and the layer of rods and cones with the immunopattern observed in retinoblastoma. No or only faint PACAP38 and PAC1R immunosignals were identified in the inner nuclear layer, depending on the cell types located in this layer. Moreover, the same type of cells showed individually variable patterns. In this retinal layer, the faint immunopatterns of PACAP38 and PAC1R were morphologically (perinuclear dot-like positivity) similar to that observed in retinoblastoma. The same observations were made in the case of the outer nuclear layer, as well as in the layer of rods and cones. Since the originating cell type of retinoblastoma is unknown, and the cells potentially involved in this context also exhibited individual expression variations, we could not establish a parallel with the pattern observed in retinoblastoma.

Regarding human retinoblastoma cell lines, literature data on PACAP38 and PAC1R expression are only available for the Y-79 cell line. Olanas and coworkers noted that around 60% of Y-79 cells express membrane-bound PAC1R, and PACAP induces a concentration-dependent increase in adenylyl cyclase activity, with PACAP38 being six-fold more potent than PACAP27 [65]. In contrast, we observed the absence of membrane PAC1R in retinoblastoma, highlighting a significant distinction between the *in vitro* model and the clinical manifestation. Thus, the Y-79 cell line, which is mostly used for *in vitro* retinoblastoma studies, has the limitation of representing patients' retinoblastoma. In the future, we need further studies to understand the precise reason for this.

In the second part of our experiment, we observed that nanomolar (100 nM and 500 nM) and 1 μ M PACAP38 concentrations had no effect on the viability of Y-79 human retinoblastoma cells. In their investigation, Wojcieszak and Zawilska extensively explored how PACAP influences the viability of Y-79 cells derived from human retinoblastoma. Nanomolar (0.1–100 nM) concentrations of PACAP38 did not affect the viability of Y-79 cells, while micromolar (1–5 μ M) concentrations of PACAP38 induced a dose-dependent decrease in tumor cell viability. The administration of a PAC1R antagonist, PACAP6-38, did not terminate this cytotoxic effect of PACAP38; furthermore, PACAP6-38 alone, in the same micromolar concentration, also produced a dose-dependent decrease in tumor cell viability. Micromolar concentrations of PACAP27 (0.1–5 μ M) and a high-affinity selective PAC1 receptor agonist, maxadilan (1–2 μ M), did not significantly affect the viability of Y-79 human retinoblastoma cells. [125 I]PACAP38 and FITC-Ahx-PACAP11-38, two membrane-penetrating PACAP38 analogs which are inactive in PAC1, VPAC1, and VPAC2 receptors, also decreased the viability of Y-79 cells but with lower potency than PACAP38. This suggests that PACAP can exert its cytotoxic effects in a membrane receptor-independent way [66]. Our results are in accordance with the aforementioned study [66], showing that concentrations of PACAP38 up to 100 nM had no effect on the viability of Y-79 cells. PACAP38 proved to be cytotoxic only when used in micromolar (2 μ M and 6 μ M) concen-

trations. Despite this, it is important to emphasize that Y-79 is just one of numerous human retinoblastoma cell lines, necessitating future testing of PACAP38 effects across diverse in vitro models.

The activation of PACAP receptors in specific neoplasms can lead to growth stimulation, whereas in others, it results in inhibitory effects. These effects are influenced by various factors, such as the species' origin, tumor type and origin, stage of differentiation, or the tumor environment [52,54]. For instance, in glioblastoma cases, the administration of PACAP27 resulted in the increased proliferation of mouse C6 glioma cells, while applying both PACAP isoforms led to a significant decrease in proliferation for T98G human glioma cells. In other human glioblastoma cell lines (M059K and M59J), PACAP agonists reduced cancer cell migration without affecting their proliferation. Furthermore, it has been demonstrated that the impact of PACAP is also dependent on the conditions within the tumor microenvironment [67]. On the other hand, there were instances where both pro-survival and anti-survival effects of PACAP38 were absent, as observed in JAR cytotrophoblast cells exposed to methotrexate treatment [68], and likewise in hepatocellular carcinoma cells (HEP-G2) [69]. The multifaceted nature of PACAP's impact is highlighted, elucidating that opposite effects can emerge within the same cell line depending on factors such as exposure time, like in the case of LNCaP human prostatic tumor cells [70], or concentration, like in the case of Y-79 human retinoblastoma cells [66]. In human Y-79 retinoblastoma cells, the cytotoxic effects of PACAP38 were observed at concentrations equal to or exceeding 2 μ M. However, the exact mechanism of PACAP38-induced Y-79 cell cytotoxicity is still unknown. It was observed that PACAP38 exerts its cytotoxic effects in a PAC1/VPAC1-2 membrane receptor-independent way in Y-79 cells without the activation of PKA, PKC, MEK1/2, p38, and JNK kinases [66]. Previous investigations have also indicated that PACAP38 acts as an intracrine factor, exhibiting the capacity to penetrate the internal cell compartment through direct translocation and endocytosis. This phenomenon results in a significant upsurge in the intracellular fraction, particularly at micromolar concentrations. Moreover, intracellular PACAP38 is not entirely degraded by intracellular enzymes and is able to activate intranuclear PAC1Rs [71,72]. The perinuclear PACAP38 and PAC1R positivity in human retinoblastoma detected by our first experiment could confirm these in vivo findings.

PACAP has demonstrated favorable outcomes in numerous pathological conditions which are primarily attributed to its cell-protective, antioxidant, and anti-inflammatory properties [34,35]. On the other hand, as indicated above, the PACAPergic system is affected by numerous malignant transformations as PACAP might exhibit both stimulatory and inhibitory impacts on tumor growth or cancer cell migration depending on the type of tumor [52,54]. This implies the possible exploration of developing selective agonists or antagonists for PAC1R, as well as analogs or antagonists for PACAP38, as valuable tools for diverse approaches to cancer treatment [52,73,74]. While in most diseases, PACAP or PAC1R agonist/antagonist treatment may pose significant limitations due to inadequate in vivo stability or limited penetration through the blood–brain barrier [75], in ophthalmic diseases, local application can overcome these factors. Previous in vivo studies have confirmed that PACAP38, when administered as eye drops, can permeate ocular barriers and exhibit retinoprotective effects [76]. Additionally, PACAP38 has been identified as a new candidate medication for Dry Eye Disease [77]. A study suggests that VIP and PACAP analogs, explicitly developed for therapeutic purposes, can modulate molecular and cellular processes relevant to treating high-risk neuroblastoma [78]. In our study, we proved that human retinoblastoma expresses PAC1R, and it is also known that in Y-79 human retinoblastoma cells, the micromolar concentration of PACAP38 exerts cytotoxic effects. These data highlight the therapeutic potential of PACAP38 and its analogs in retinoblastoma therapy. The results of Boisvilliers et al. [78] especially strengthen this potential in the case of retinoblastoma (even in its rare form, where retinoblastoma develops in the absence of an *RB1* mutation as a consequence of the somatic amplification of the *MYCN* gene), as they found that these peptide analogs are capable of inducing a sustained

decrease in n-MYC expression and hold potential not only for neuroblastoma therapy but also for addressing other tumors. In our study, human retinoblastoma was found to express PACAP38 and PAC1R exclusively in a perinuclear dot-like pattern, with PACAP38 demonstrating cytotoxicity at concentrations of 2 μ M and above in Y-79 retinoblastoma cells. Nevertheless, our studies also have limitations. To begin with, the limited number of cases prevents us from making a broad generalization that all retinoblastomas exhibit a uniform expression pattern. None of the cases in our study showcased fleurettes or neuronal differentiation which constituted more than half of the tumor, thereby hindering our ability to establish the immunoprofile for grade 1 tumors. Additionally, we cannot currently conclude whether PACAP signaling is implicated in the carcinogenesis of retinoblastoma. These aspects should be investigated more thoroughly in future studies. Furthermore, it is crucial to emphasize the need for exploring PACAP38 and its analogs in diverse in vitro models, establishing the groundwork for potential in vivo studies.

5. Conclusions

Elucidating the cellular origin of human cancers, including retinoblastoma, and understanding how cellular/subcellular context influences the probability of cancer initiation and progression would help to develop novel preventive and early-intervention therapies or improve existing ones. PACAP is involved in dozens of physiological and pathophysiological processes, and an increasing amount of evidence suggests that PACAP has diagnostic and therapeutic potential in certain diseases. In our study, we described, for the first time, the distribution of PACAP38 and PAC1R immunoreactivity in human retinoblastoma and we confirmed the cytotoxic effect of micromolar PACAP38 concentrations in human retinoblastoma cells. The facts that (i) PACAP38 and PAC1R are present in human retinoblastoma and that (ii) PACAP38 and its analogs had a cytotoxic effect on retinoblastoma cells suggest the potential role of PACAP38 and its analogs in retinoblastoma therapy.

Author Contributions: Conceptualization, D.T., D.R. and T.A.; methodology, D.T., T.T., E.F., E.P. and A.V.; validation, E.F., T.T. and E.S.; formal analysis, E.F.; investigation, D.T., E.F., V.V., E.P. and T.T.; resources, D.T., D.R. and T.A.; data curation, V.V.; writing—original draft preparation, D.T., T.T., D.R., T.A., A.V., E.S. and E.F.; writing—review and editing, D.T., D.R., T.A. and A.V.; visualization, D.T., E.F., E.P. and V.V.; supervision, T.A., D.R. and T.T.; project administration, D.T. and D.R.; funding acquisition, D.R. and T.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Hungarian Brain Research Program NAP 3.0, the Thematic Excellence Program 2021 TKP2021-EGA-16, HUN-REN-TKI-14016, and the Hungarian Scientific Research Fund (NKFIH K135457).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethic Committee of the University of Pécs (9188-PTE 2022, approval date: 10 June 2022).

Informed Consent Statement: Not applicable. This was a retrospective study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Yanoff, M.; Sassani, J.W. Retinoblastoma and simulating lesions. In *Ocular Pathology*, 8th ed.; Yanoff, M., Sassani, J.W., Eds.; Elsevier: London, UK, 2020; pp. 726–759.
2. Dimaras, H.; Corson, T.W.; Cobrinik, D.; White, A.; Zhao, J.; Munier, F.L.; Abramson, D.H.; Shields, C.L.; Chantada, G.L.; Njuguna, F.; et al. Retinoblastoma. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2015**, *1*, 15021. [[CrossRef](#)]
3. Orjuela-Grimm, M.; Singh, N.; Bhatt-Carreño, S.; Singh, A.D. Retinoblastoma: Incidence and etiologic factors. In *Clinical Ophthalmic Oncology*; Berry, J.L., Kim, J.W., Damato, B.E., Singh, A.D., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019; pp. 39–56.

4. Dimaras, H.; Kimani, K.; Dimba, E.A.; Gronsdahl, P.; White, A.; Chan, H.S.; Gallie, B.L. Retinoblastoma. *Lancet* **2012**, *379*, 1436–1446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Gupta, A.K.; Meena, J.P. A narrative review of retinoblastoma and recent advances in its management. *Pediatr. Med.* **2020**, *3*, 20. [[CrossRef](#)]
6. Knudson, A.G. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 820–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Wong, J.R.; Tucker, M.A.; Kleinerman, R.A.; Devesa, S.S. Retinoblastoma incidence patterns in the US surveillance, epidemiology, and end results program. *JAMA Ophthalmol.* **2014**, *132*, 478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Rushlow, D.E.; Mol, B.M.; Kennett, J.Y.; Yee, S.; Pajovic, S.; Thériault, B.L.; Prigoda-Lee, N.L.; Spencer, C.; Dimaras, H.; Corson, T.W.; et al. Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: Genomic, gene expression, and clinical studies. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*, 327–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Bremner, R.; Sage, J. The origin of human retinoblastoma. *Nature* **2014**, *514*, 313. [[CrossRef](#)]
10. Bouchoucha, Y.; Matet, A.; Berger, A.; Carcaboso, A.M.; Gerrish, A.; Moll, A.; Jenkinson, H.; Ketteler, P.; Dorsman, J.C.; Chantada, G.; et al. Retinoblastoma: From genes to patient care. *Eur. J. Med. Genet.* **2023**, *66*, 104674. [[CrossRef](#)]
11. Rootman, D.B.; Gonzalez, E.; Mallipatna, A.; VandenHoven, C.; Hampton, L.; Dimaras, H.; Chan, H.S.L.; Gallie, B.L.; Heon, E. Hand-held high-resolution spectral domain optical coherence tomography in retinoblastoma: Clinical and morphologic considerations. *Br. J. Ophthalmol.* **2013**, *97*, 59–65. [[CrossRef](#)]
12. Xu, X.L.; Fang, Y.; Lee, T.C.; Forrest, D.; Gregory-Evans, C.; Almeida, D.; Liu, A.; Jhanwar, S.C.; Abramson, D.H.; Cobrinik, D. Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell* **2009**, *137*, 1018–1031. [[CrossRef](#)]
13. Xu, X.L.; Singh, H.P.; Wang, L.; Qi, D.-L.; Poulos, B.K.; Abramson, D.H.; Jhanwar, S.C.; Cobrinik, D. Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours. *Nature* **2014**, *514*, 385–388. [[CrossRef](#)]
14. Kooi, I.E.; Mol, B.M.; Moll, A.C.; Van Der Valk, P.; De Jong, M.C.; De Graaf, P.; Van Mil, S.E.; Schouten-van Meeteren, A.Y.N.; Meijers-Heijboer, H.; Kaspers, G.L.; et al. Loss of photoreceptor and gain of genomic alterations in retinoblastoma reveal tumor progression. *EBioMedicine* **2015**, *2*, 660–670. [[CrossRef](#)]
15. Singh, H.P.; Wang, S.; Stachelek, K.; Lee, S.; Reid, M.W.; Thornton, M.E.; Craft, C.M.; Grubbs, B.H.; Cobrinik, D. Developmental stage-specific proliferation and retinoblastoma genesis in RB-deficient human but not mouse cone precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E9391–E9400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Liu, H.; Zhang, Y.; Zhang, Y.-Y.; Li, Y.-P.; Hua, Z.-Q.; Zhang, C.-J.; Wu, K.-C.; Yu, F.; Zhang, Y.; Su, J.; et al. Human embryonic stem cell-derived organoid retinoblastoma reveals a cancerous origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 33628–33638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Liu, J.; Ottaviani, D.; Sefta, M.; Desbrousses, C.; Chapeaublanc, E.; Aschero, R.; Sirab, N.; Lubieniecki, F.; Lamas, G.; Tonon, L.; et al. A high-risk retinoblastoma subtype with stemness features, dedifferentiated cone states and neuronal/ganglion cell gene expression. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5578. [[CrossRef](#)]
18. Singh, H.P.; Shayler, D.W.H.; Fernandez, G.E.; Thornton, M.E.; Craft, C.M.; Grubbs, B.H.; Cobrinik, D. An immature, dedifferentiated, and lineage-deconstrained cone precursor origin of N-Myc-initiated retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2200721119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Singh, L.; Kashyap, S. Update on pathology of retinoblastoma. *Int. J. Ophthalmol.* **2018**, *11*, 2011–2016. [[CrossRef](#)]
20. Alsharif, H.; Helmi, H.; Maktabi, A. Histopathological characteristics and classification for prognostic indicators. In *Retinoblastoma—Past, Present and Future*; Manaa Alkatan, H., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2019. [[CrossRef](#)]
21. Eagle, R.C. The pathology of ocular cancer. *Eye* **2013**, *27*, 128–136. [[CrossRef](#)]
22. Mallipatna, A.C.; Gallie, B.L.; Chévez-Barrios, P.; Rouic, L.L.-L.; Chantada, G.L.; Doz, F.; Brisse, H.J.; Munier, F.L.; Albert, D.M.; Català-Mora, J.; et al. Retinoblastoma. In *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th ed.; Amin, M.B., Edge, S.B., Greene, F.L., Byrd, D.R., Brookland, R.K., Washington, M.K., Gershenwald, J.E., Compton, C.C., Hess, K.R., Sullivan, D.C., et al., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; pp. 827–839. [[CrossRef](#)]
23. Martínez-Sánchez, M.; Hernandez-Monge, J.; Rangel, M.; Olivares-Illana, V. Retinoblastoma: From discovery to clinical management. *FEBS J.* **2022**, *289*, 4371–4382. [[CrossRef](#)]
24. Manecka, D.-L.; Boukhzar, L.; Falluel-Morel, A.; Lihrmann, I.; Anouar, Y. PACAP signaling in neuroprotection. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP*; Current Topics in Neurotoxicity; Reglodi, D., Tamas, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; Volume 11, pp. 549–561.
25. 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](#)]
26. 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](#)]
27. Miyata, A.; Jiang, L.; Dahl, R.D.; Kitada, C.; Kubo, K.; Fujino, M.; Minamino, N.; Arimura, A. Isolation of a neuropeptide corresponding to the n-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *170*, 643–648. [[CrossRef](#)]

28. Vaudry, D.; Falluel-Morel, A.; Bourgault, S.; Basille, M.; Burel, D.; Wurtz, O.; Fournier, A.; Chow, B.K.C.; 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](#)]
29. Olianas, M.C.; Ingianni, A.; Sogos, V.; Onali, P. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors and PACAP in human fetal retina. *J. Neurochem.* **2002**, *69*, 1213–1218. [[CrossRef](#)]
30. Patko, E.; Szabo, E.; Toth, D.; Tornoczky, T.; Bosnyak, I.; Vaczy, A.; Atlasz, T.; Reglodi, D. Distribution of PACAP and PAC1 Receptor in the Human Eye. *J. Mol. Neurosci.* **2022**, *72*, 2176–2187. [[CrossRef](#)]
31. Reglodi, D.; Tamas, A.; Koppan, M.; Szogyi, D.; Welke, L. Role of PACAP in female fertility and reproduction at gonadal level—Recent advances. *Front. Endocrinol.* **2012**, *3*, 155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Watanabe, J.; Seki, T.; Shioda, S. PACAP and neural development. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP; Current Topics in Neurotoxicity*; Reglodi, D., Tamas, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; Volume 11, pp. 65–82.
33. Reglodi, D.; Atlasz, T.; Szabo, E.; Jungling, A.; Tamas, A.; Juhasz, T.; Fulop, B.D.; Bardosi, A. PACAP deficiency as a model of aging. *GeroScience* **2018**, *40*, 437–452. [[CrossRef](#)]
34. Reglodi, D.; Helyes, Z.; Nemeth, J.; Vass, R.A.; Tamas, A. PACAP as a potential biomarker: Alterations of PACAP levels in human physiological and pathological conditions. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP; Current Topics in Neurotoxicity*; Reglodi, D., Tamas, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; Volume 11, pp. 815–832.
35. Toth, D.; Reglodi, D.; Schwieters, L.; Tamas, A. Role of endocrine PACAP in age-related diseases. *Front. Endocrinol.* **2023**, *14*, 1118927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Fabian, E.; Reglodi, D.; Mester, L.; Szabo, A.; Szabadfi, K.; Tamas, A.; Toth, G.; Kovacs, K. Effects of PACAP on intracellular signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *48*, 493–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Maugeri, G.; D’Amico, A.G.; Saccone, S.; Federico, C.; Cavallaro, S.; D’Agata, V. PACAP and VIP inhibit HIF-1 α -mediated VEGF expression in a model of diabetic macular edema. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *232*, 1209–1215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Maugeri, G.; D’Amico, A.G.; Castrogiovanni, P.; Saccone, S.; Federico, C.; Reibaldi, M.; Russo, A.; Bonfiglio, V.; Avitabile, T.; Longo, A.; et al. PACAP through EGFR transactivation preserves human corneal endothelial integrity. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 10097–10105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Fabian, E.; Reglodi, D.; Horvath, G.; Opper, B.; Toth, G.; Fazakas, C.; Vegh, A.G.; Wilhelm, I.; Krizbai, I.A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide acts against neovascularization in retinal pigment epithelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1455*, 160–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Maugeri, G.; D’Amico, A.G.; Bucolo, C.; D’Agata, V. Protective effect of PACAP-38 on retinal pigmented epithelium in an in vitro and in vivo model of diabetic retinopathy through EGFR-dependent mechanism. *Peptides* **2019**, *119*, 170108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Maugeri, G.; Longo, A.; D’Amico, A.G.; Rasà, D.M.; Reibaldi, M.; Russo, A.; Bonfiglio, V.; Avitabile, T.; D’Agata, V. Trophic effect of PACAP on human corneal endothelium. *Peptides* **2018**, *99*, 20–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Atlasz, T.; Szabadfi, K.; Kiss, P.; Tamas, A.; Toth, G.; Reglodi, D.; Gabriel, R. Evaluation of the protective effects of PACAP with cell-specific markers in ischemia-induced retinal degeneration. *Brain Res. Bull.* **2010**, *81*, 497–504. [[CrossRef](#)]
43. Vaczy, A.; Kovari, P.; Kovacs, K.; Farkas, K.; Szabo, E.; Kvarik, T.; Kocsis, B.; Fulop, B.; Atlasz, T.; Reglodi, D. Protective role of endogenous PACAP in inflammation-induced retinal degeneration. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *24*, 3534–3542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kvarik, T.; Reglodi, D.; Werling, D.; Vaczy, A.; Kovari, P.; Szabo, E.; Kovacs, K.; Hashimoto, H.; Ertl, T.; Gyarmati, J.; et al. The protective effects of endogenous PACAP in oxygen-induced retinopathy. *J. Mol. Neurosci.* **2021**, *71*, 2546–2557. [[CrossRef](#)]
45. Szabo, E.; Patko, E.; Vaczy, A.; Molitor, D.; Csutak, A.; Toth, G.; Reglodi, D.; Atlasz, T. Retinoprotective effects of PACAP eye drops in microbead-induced glaucoma model in rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8825. [[CrossRef](#)]
46. Atlasz, T.; Szabadfi, K.; Reglodi, D.; Kiss, P.; Tamas, A.; Tóth, G.; Molnár, A.; Szabó, K.; Gábel, R. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its fragments on retinal degeneration induced by neonatal monosodium glutamate treatment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1163*, 348–352. [[CrossRef](#)]
47. Seki, T.; Itoh, H.; Nakamachi, T.; Shioda, S. Suppression of ganglion cell death by PACAP following optic nerve transection in the rat. *J. Mol. Neurosci.* **2008**, *36*, 57–60. [[CrossRef](#)]
48. Lindholm, D.; Mäkelä, J.; Korhonen, L. PACAP and neural progenitor cells. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP; Current Topics in Neurotoxicity*; Reglodi, D., Tamas, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; Volume 11, pp. 53–63.
49. Horvath, G.; Reglodi, D.; Fabian, E.; Opper, B. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cell death. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4953. [[CrossRef](#)]
50. 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](#)]
51. Moody, T.W.; Jensen, R.T. PACAP and cancer. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP; Current Topics in Neurotoxicity*; Reglodi, D., Tamas, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; Volume 11, pp. 795–814.
52. Moody, T.W.; Nucho-Berenguer, B.; Jensen, R.T. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2016**, *23*, 38–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Moody, T.W.; Jensen, R.T. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal peptide [Part 1]: Biology, pharmacology, and new insights into their cellular basis of action/signaling which are providing new therapeutic targets. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2021**, *28*, 198–205. [CrossRef]
54. Zibara, K.; Zeidan, A.; Mallah, K.; Kassem, N.; Awad, A.; Mazurier, F.; Badran, B.; El-Zein, N. Signaling pathways activated by PACAP in MCF-7 breast cancer cells. *Cell. Signal.* **2018**, *50*, 37–47. [CrossRef] [PubMed]
55. Maugeri, G.; D'Amico, A.G.; Saccone, S.; Federico, C.; Rasà, D.M.; Caltabiano, R.; Broggi, G.; Giunta, S.; Musumeci, G.; D'Agata, V. Effect of PACAP on hypoxia-induced angiogenesis and epithelial—Mesenchymal transition in glioblastoma. *Biomedicines* **2021**, *9*, 965. [CrossRef]
56. Lochner, R.; Couce, M. Retinoblastoma. Available online: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/eyeretinaretinoblastoma.html> (accessed on 15 November 2023).
57. Bardosi, S.; Bardosi, A.; Nagy, Z.; Reglodi, D. Expression of PACAP and PAC1 receptor in normal human thyroid gland and in thyroid papillary carcinoma. *J. Mol. Neurosci.* **2016**, *60*, 171–178. [CrossRef]
58. García-Fernández, M.O.; Bodega, G.; Ruíz-Villaespesa, A.; Cortés, J.; Prieto, J.C.; Carmena, M.J. PACAP expression and distribution in human breast cancer and healthy tissue. *Cancer Lett.* **2004**, *205*, 189–195. [CrossRef]
59. García-Fernández, M.O.; Collado, B.; Bodega, G.; Cortés, J.; Ruíz-Villaespesa, A.; Carmena, M.J.; Prieto, J.C. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide/vasoactive intestinal peptide receptors in human normal mammary gland and breast cancer tissue. *Gynecol. Endocrinol.* **2005**, *20*, 327–333. [CrossRef]
60. Ferencz, S.; Reglodi, D.; Kaszas, B.; Bardosi, A.; Toth, D.; Vekony, Z.; Vicena, V.; Karadi, O.; Kelemen, D. PACAP and PAC1 receptor expression in pancreatic ductal carcinoma. *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 5725–5730. [CrossRef] [PubMed]
61. Ferencz, S.; Toth, D.; Kaszas, B.; Bardosi, S.; Vicena, V.; Karadi, O.; Reglodi, D.; Kelemen, D. PACAP and PAC1 receptor expression in human insulinomas. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2021**, *27*, 1719–1728. [CrossRef]
62. 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]
63. Tamas, A.; Javorhazy, A.; Reglodi, D.; Sarlos, D.P.; Banyai, D.; Semjen, D.; Nemeth, J.; Lelesz, B.; Fulop, D.B.; Szanto, Z. Examination of PACAP-like immunoreactivity in urogenital tumor samples. *J. Mol. Neurosci.* **2016**, *59*, 177–183. [CrossRef] [PubMed]
64. García-Fernández, M.O.; Bodega, G.; Solano, R.M.; Ruíz-Villaespesa, A.; Sánchez-Chapado, M.; Carmena, M.J.; Prieto, J.C. Expression and distribution of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in human prostate and prostate cancer tissues. *Regul. Pept.* **2002**, *110*, 9–15. [CrossRef] [PubMed]
65. Olianias, M.C.; Ennas, M.G.; Lampis, G.; Onali, P. Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in Y-79 human retinoblastoma cells. *J. Neurochem.* **2002**, *67*, 1293–1300. [CrossRef] [PubMed]
66. Wojcieszak, J.; Zawilska, J.B. PACAP38 and PACAP6-38 exert cytotoxic activity against human retinoblastoma y79 cells. *J. Mol. Neurosci.* **2014**, *54*, 463–468. [CrossRef] [PubMed]
67. D'Amico, A.G.; Maugeri, G.; Vanella, L.; Pittalà, V.; Reglodi, D.; D'Agata, V. Multimodal role of PACAP in glioblastoma. *Brain Sci.* **2021**, *11*, 994. [CrossRef] [PubMed]
68. Brubel, R.; Boronkai, A.; Reglodi, D.; Racz, B.; Nemeth, J.; Kiss, P.; Lubics, A.; Toth, G.; Horvath, G.; Varga, T.; et al. Changes in the expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. *J. Mol. Neurosci.* **2010**, *42*, 450–458. [CrossRef] [PubMed]
69. Horvath, G.; Brubel, R.; Kovacs, K.; Reglodi, D.; Opper, B.; Ferencz, A.; Szakaly, P.; Laszlo, E.; Hau, L.; Kiss, P.; et al. Effects of PACAP on oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. *J. Mol. Neurosci.* **2011**, *43*, 67–75. [CrossRef] [PubMed]
70. Farini, D.; Puglianiello, A.; Mammi, C.; Siracusa, G.; Moretti, C. Dual effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on prostate tumor LNCaP cells: Short- and long-term exposure affect proliferation and neuroendocrine differentiation. *Endocrinology* **2003**, *144*, 1631–1643. [CrossRef]
71. Doan, N.-D.; Chatenet, D.; Létourneau, M.; Vaudry, H.; Vaudry, D.; Fournier, A. Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 940–949. [CrossRef]
72. Yu, R.; Zhong, J.; Li, M.; Guo, X.; Zhang, H.; Chen, J. PACAP induces the dimerization of PAC1 on the nucleus associated with the cAMP increase in the nucleus. *Neurosci. Lett.* **2013**, *549*, 92–96. [CrossRef]
73. Reubi, J.C.; Läderach, U.; Waser, B.; Gebbers, J.O.; Robberecht, P.; Laissue, J.A. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3105–3112.
74. Bourgault, S.; Vaudry, D.; Botia, B.; Couvineau, A.; Laburthe, M.; Vaudry, H.; Fournier, A. Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* **2008**, *29*, 919–932. [CrossRef] [PubMed]
75. Apostol, C.R.; Bernard, K.; Tanguturi, P.; Molnar, G.; Bartlett, M.J.; Szabò, L.; Liu, C.; Ortiz, J.B.; Saber, M.; Giordano, K.R.; et al. Design and synthesis of brain penetrant glycopeptide analogues of PACAP with neuroprotective potential for traumatic brain injury and parkinsonism. *Front. Drug Discov.* **2022**, *1*, 818003. [CrossRef] [PubMed]
76. Werling, D.; Banks, W.; Salameh, T.; Kvarik, T.; Kovacs, L.; Vaczy, A.; Szabo, E.; Mayer, F.; Varga, R.; Tamas, A.; et al. Passage through the ocular barriers and beneficial effects in retinal ischemia of topical application of PACAP1-38 in rodents. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 675. [CrossRef]

77. Hirabayashi, T.; Shibato, J.; Kimura, A.; Yamashita, M.; Takenoya, F.; Shioda, S. Potential therapeutic role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide for dry eye disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Boisivilliers, M.D.; Perrin, F.; Hebache, S.; Balandre, A.-C.; Bensalma, S.; Garnier, A.; Vaudry, D.; Fournier, A.; Festy, F.; Muller, J.-M.; et al. VIP and PACAP analogs regulate therapeutic targets in high-risk neuroblastoma cells. *Peptides* **2016**, *78*, 30–41. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.