

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

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Tóth Dénes

Témavezetők: Dr. Reglódi Dóra, egyetemi tanár

Dr. Tamás Andrea, egyetemi docens

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

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



Pécsi Tudományegyetem, OGYDHT Pécs

Pécs, 2024

1. Bevezetés

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

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) két biológiailag aktív formában fordul elő a szervezetben, melyek közül a 38 aminosavból álló izoformát (PACAP38) 1989-ben, a 27 aminosavból álló izoformát (PACAP27) egy évvel később fedezték fel [Miyata és mtsai, 1989, 1990]. Emlősökben a PACAP 90%-át a 38 aminosavból álló izoforma teszi ki [Arimura és mtsai, 1991]. A PACAP a szervezetben hatását döntően specifikus transzmembrán receptorokon keresztül fejti 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. 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 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]. A PACAP a vérkeringésben néhány percig van aktív formában jelen, ezt követően rövidebb peptidekre bomlik a dipeptidil-peptidáz-IV (DPP-IV) hatása révén [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 fejti ki. Fertilizációs, reprodukív regulációs funkcióin túlmenően a PACAP több élettani folyamatot szabályoz (például táplálkozás, hőszabályozás, stresszválasz, immunfolyamatok, mirigyműködések), illetve az öregedésben is fontos szerepe van [Reglődi és Tamás, 2016; Vaudry és mtsai, 2009]. Az utóbbi évtizedben egyre több publikáció jelent meg, melyek a PACAP38 klinikai diagnosztikus vagy prognosztikus biomarker szerepét vizsgálták. A legintenzívebben kutatott kórképek közé tartoznak a neurológiai és pszichiátriai betegségek (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, sclerosis multiplex, migrén, egyéb fejfájások, agyvérzés, traumás agysérülés, mentális retardáció, generalizált szorongás, poszttraumás stressz zavar), cardiovascularis betegségek (szívelégtelenség, ST-elevációval járó myocardialis infarctus), ortopéd-traumatológiai betegségek (primer és poszttraumás térdízületi arthrosis, atraumatikus combfejelhalás, a postmenopausális osteoporosis), illetve egyéb betegségek kapcsán leírták a

PACAP szintjének változását (nephrosis szindrómában, májzsugorban, idült hepatitis-B-fertőzés esetén, myeloma multiplexben, szuperovulációs kezelések esetén, petefészek-elégtelenségben és idiopathias hypogonadotrop hypogonadismusban [Reglődi és Tamás, 2016; Tóth és mtsai, 2023]).

1.2. Magzatvíz diagnosztika

A magzatvíz egyrészt fizikai-mechanikai védelmet nyújt a külső erőbehatások ellen, másrészt a köldökzsinór mechanikai védelmét is ellátja azáltal, hogy megakadályozza annak magzat és a méhfal közötti kompresszióját. A fertőzések ellen is védelmet nyújt, valamint a magzati hőháztartás fenntartásában is fontos. A magzatvízben végzett magzati mozgások a vázizomrendszer fejlődéséhez is hozzájárulnak, a magzatvíz lenyelése a tápcsatorna fejlődéséhez, aspirációja a tüdő fejlődésében nélkülözhetetlen. Mindezek mellett a magzatvíz folyadék- és tápanyag rezervként is szolgál [Fitzsimmons és Bajaj, 2022]. 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. A 8-10. gesztációs héttől a magzat vizelettermelésének megindulásával az összetétel 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) [Huri és mtsai, 2023; Modena és Fieni, 2004]. 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 [Li és mtsai, 2023; Tsangaris és mtsai, 2011]. 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]. 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].

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 [WHO, 2014]. Az új Berlin-definíció szerint politraumáról akkor beszélünk, ha a sérülés súlyossági index (ISS) 15-nél nagyobb, és kettő vagy annál több testtáj 3-nál nagyobb rövidített sérülési index (AIS) értékei mellett egy vagy több kórélettani paraméter eltérése is megfigyelhető [Pape és mtsai, 2014]. A politraumát elszenvedett személyek korai (azonnali vagy néhány órán belüli) halálózása magas, míg a késői halálozás döntően a politraumából levezethető másodlagos károsodások, szövődmények 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 proinflammatoricus citokinek (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18) révén szisztémás gyulladáshoz vezető válasz szindróma (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 (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 (CARS) nevezzük. A szervezet igyekszik a SIRS és a CARS közötti érzékeny egyensúlyt fenntartani. A politraumát követő túlzott mértékű gyulladáshoz vezető 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 immunszupprimált állapotba kerül, fokozva az infekciókra és szeptikus szövődményekre való hajlamot [Stoecklein és mtsai, 2012; Csontos, 2022]. A politrauma egyik leggyakoribb és sokszor fatális kimenetelű szövődménye a szepszis, ami egy életet veszélyeztető szervdiszfunkció, mely a szervezet infekcióra adott diszregulált immunválasza következtében jön létre [Singer és mtsai, 2016]. Az infekció, illetve a szepszis diagnosztizálása tehát igen nehéz olyan politraumatizáltaknál, akinél kifejezett SIRS van jelen. Emiatt kiemelten

fontos a sérülések elszívódását követően az esetleges szövődmények mielőbbi észlelése, melyre lehetőséget nyújthat többet 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, azonban nem alkalmas arra, hogy az általános gyulladással járó reakciókat elkülönítse a fertőzéses eredetű szövődményekről [Rajab és mtsai, 2020]. A prokalcitonin (PCT) általában 1-2 nappal a trauma után tetőzik és általában rapidan csökken a szintje fertőzéses szövődmény hiányában. Ennek hiányában, vagy másodlagosan emelkedő PCT érték esetén fel kell merülnie szeptikus komplikáció lehetőségének [AlRawahi és mtsai, 2019]. Az egyes izolált gyulladással járó markerek mellett a fehérvérsejt-funkció, például a leukocytá 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 antiszedimentáló fehérvérsejtek száma [Bogár és mtsai, 2002; Bogár és Tarsoly, 2006].

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 relatíve állandó arányúnak mondható [Dimaras és mtsai, 2015]. 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%-os 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]. 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 sejtes 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 (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]. 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]. Olianás és munkatársai (1996) Y-79 humán retinoblastoma sejtvonalon képesek voltak kimutatni a PAC1 receptor jelenlétét [Olianás és mtsa, 1996]. 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 [Wojcieszak és Zawilska, 2014].

2. Célkitűzések

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

2.1. A magzatvíz vizsgálata

A korábbi, tömegspektrometriás vizsgálataink során nem tudtuk igazolni a PACAP38 jelenlétét emberi magzatvízben, azonban a rendelkezésre álló 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 radioimmun-assay-vel (RIA).

2.2. Politraumatizált személyek vizsgálata

Politrauma esetén a korai időszakban való szoros monitorozás elengedhetetlen abból a célból, hogy az esetleges szövődeményeket mielőbb észleljük. 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 citotoxicitását.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A magzatvíz vizsgálata

A vizsgálatot a PTE Regionális Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (PTE 4303/2011 és 6383/2018). A vizsgálatba történő bevonáskor – részletes szó- és írásbeli tájékoztatást követően – az érintett személyek írásos beleegyezésüket adták. A vizsgálatba 28 olyan várandós került bevonásra, akik magas (35 év feletti) anyai életkor miatt a várandósság 15-19. hetében diagnosztikai amniocentesisen estek át a PTE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján. A kariotipizálás eredményei alapján, valamint a szülést követően kizárásra kerültek azon esetek, melyeknél bármilyen rendellenességre fény derült. A magzatvíz-mintavételt követően 30 µl/ml peptidáz inhibitor (aprotinin) adtunk a mintákhoz és hűtve szállítottuk azokat a laboratóriumba, ahol lefagyasztottuk és feldolgozásig -70°C-on tároltuk őket. A RIA mérés előtt a mintákat kioldoztattuk, 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, (amelyet 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 teszteket 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. További validálási kísérletben a kiválasztott magzatvízminta sorozatos hígítását használtuk a paralelitás megítélésére a RIA standardjával. Az analizált folyadékminták térfogata 12,5 és 400 µl között változott. A vizsgált magzatvízminta párhuzatos lefutásban gátolta a radioaktívan jelölt PACAP24-38 C-terminális fragmentumnak (RIA tracer) az antitesthez való kötődését, a RIA analízis standardjaként használt PACAP38-hoz hasonlóan.

3.2. Politraumatizált személyek vizsgálata

A vizsgálatot a PTE Regionális Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (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. A vizsgálatba 20 olyan, 18. életévét betöltött politraumatizált beteg került előzetesen bevonásra, akik elsődleges ellátást követően a PTE KK Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet Intenzív Osztályán kerültek kezelésre. 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. Bevonási kritérium a politrauma megléte volt, kizárási kritérium volt az öt napnál rövidebb osztályos tartózkodás, az ismert rosszindulatú daganatos alapbetegség, a normál immunválaszt befolyásoló alapbetegség vagy gyógyszeres terápia, illetve a súlyos, krónikus szervi betegségek. A CRP és PCT meghatározása a napi rutin laboratóriumi monitorozás részeként a PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézetben történtek. A referencia érték CRP esetén 5 mg/l, míg PCT esetén 0,5 ng/ml alatt volt. 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 felezővonala feletti és alatti vért „vérképes” kémcsőbe injektáltuk, majd 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 leukocytaszám százalékában azon a leukocyták száma, melyek az egyórás szedimentáció során felfelé átlépték (antiszedimentálódtak) a süllyedéssel csőben lévő vérminta felezővonalát. A PACAP38-LI meghatározásához a korábban tárgyalt specifikus és szenzitív módszert alkalmaztuk. Statisztikai analízishez az SPSS statisztikai program 21. számú verzióját használtuk. A vizsgált paraméterek napi kinetikájának elemzéséhez Spearman-féle rangkorrelációt használtunk és az eredmények PlotsOfData-val [Postma és Goedhart, 2019] kerültek ábrázolásra speciális hegedű-diagramok (jitter type of violin-plots) formájában. Az összes napra vonatkozó korrelációk vizsgálatához a szabad forráskódú R statisztikai program [R Core Team, 2010] rmcorr szoftvercsomagját [Bakdash és Marusich, 2017] használtuk és annak corrplot szoftvercsomagjával [Wei és Simko, 2017] ábrázoltuk a korrelációs mátrixot.

3.3. A retinoblastoma vizsgálata

A retrospektív vizsgálatot a PTE Regionális Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (PTE 9188/2022). 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 PTE KK 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 differenciálódást láttunk a daganat több mint felében (G1). Ezeket követték az olyan daganatok, melyekben Flexner-Wintersteiner és/vagy Homer Wright rozetták a daganat több, mint 50%-ban voltak jelen (G2). A következő grádus esetében előbbi rozetták ennél kevesebb arányban voltak észlelhetők (G3), míg az utolsó kategóriába (G4) olyan daganatok kerültek, melyek rosszul differenciált sejteket tartalmaztak rozetták nélkül, vagy kiterjedt anaplasias területeket tartalmaztak [Lochner és Couce, n.d.]. Formalin fixált paraffinba ágyazott szövetmintákból 3 mikrométeres 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.,

Jerusalem, 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 vízes mossással a folyamatot leállítottuk, majd a szokványos 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 [Patkó 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 mentettük ki. Az in vitro kísérlethez Amerikai típusú (ATCC) Y-79 humán retinoblastoma sejtvonalat használtunk. 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 (SZTE Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet, Szeged, Magyarország) kezelések során. Tizenkettő lyuk szolgált kontrollként (PACAP38 kezelésben nem részesült), míg 6-6 lyuk 10 µl PACAP38 kezelésben részesült 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 volt. További 4 óra termosztátban való inkubálást követően kék formazán festékpartikulumokat 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. 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 vizsgálata

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). PACAP38-LI mind a 21 mintában kimutatható volt. Az átlagos PACAP38-LI 401 fmol/ml (szórás 142 fmol/ml) volt.

4.2. Politraumatizált személyek vizsgálata

Az 5. nap végére hét személy került kizárásra (egy elhunyt, kettőt 3 napot követően otthonába engedtünk, 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, egyiküknél sem alakult ki szövődmény. 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 esetében is hasonló emelkedő tendenciát láttunk, mely a 4. napon tetőzött. 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 és CRP ($r = 0,581$, $p = 0,037$) között. Az 5. napon statisztikailag szignifikáns, mérsékelten erős pozitív korreláció volt kimutatható a PACAP38 és a CRP között ($r = 0,776$, $p = 0,002$). Az összes napot együtt vizsgálva statisztikailag szignifikáns, gyenge pozitív korrelációt igazoltunk a PACAP38 és a LAR ($r = 0,279$, $p = 0,042$), valamint a LAR és a CRP ($r = 0,406$, $p = 0,002$) között.

4.3. A retinoblastoma vizsgálata

Tanulmányunkba hét gyermeket (egy lányt és hat fiút) vontunk be. Az enucleatio időpontjában az átlagéletkor $16,3 \pm 10,5$ hónap volt. Nem fordult elő bilaterális eset. Egy eset kivételével a daganatok monofokálisak voltak. Az egy multifokális retinoblastoma esetében csírasejtes mutáció nem volt igazolható, azonban az egyik monofokális esetben családi halmozódás igazolódott (*RBI* mutáció). Hisztomorfológiailag három G4, egy G3, és három G2 esetünk volt. 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. 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. Az in vitro kísérlet kapcsán 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.

5. Megbeszélés

5.1. A magzatvíz vizsgálat

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

5.2. Politraumatizált személyek vizsgálata

A PACAP38 szintek tekintetében 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 PACAP antiinflammatoricus, citoprotektív profiljába jól beleilleszthetők. Emiatt a PACAP38 szint monitorozása hasznos információval szolgálhat a pro- és antiinflammatoricus folyamatok egyensúlya szempontjából. 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 PCT esetén nem találtunk határérték feletti kiugrást. Általánosságban elmondható, hogy a legtöbb esetben szeptikus komplikáció hiányában a PCT határérték alatt marad [Gregoriano és mtsai, 2020], mely tanulmányunk eredményeivel is összhangban áll. LAR esetében a PACAP38-hoz hasonló tendenciát figyeltünk meg, 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 [Bogár és mtsai, 2006; Loibl és mtsai, 2021; Molnár és mtsai, 2010; Rozanovic és mtsai, 2016]. Az egyes napokat külön tekintve a negyedik napon gyenge pozitív korrelációt észleltünk a PACAP38 és CRP szintek között, mely az ötödik napon közepes erősségű volt. A PACAP38 és CRP paralel emelkedése nagy valószínűséggel a politraumát követően kialakuló SIRS elleni endogén válaszreakcióval magyarázható. A napok együttes vizsgálata során statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk a PACAP38 és LAR értékek között. A politraumát követően meginduló multimodális immunfolyamat kezdete a SIRS, mely fokozott leukocita aktivációval jár és ezt követi az ellenregulációs folyamat. A PACAP38 és LAR közötti korreláció magyarázható a PACAP antiinflammatoricus hatásával ezen ellenregulációs folyamat során. 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. Távlatos terveink között szerepel, hogy a politraumán belül további alcsoportokat hozzunk létre a trauma etiológiáját is figyelembe véve.

5.3. A retinoblastoma vizsgálata

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. 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. A retinoblastoma pontos kiindulási sejt típusa 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” sejt típusban. Orianas és munkatársai (1996) az Y-79 sejt vonal 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 pozitivitást észleltünk. Ez a humán vizsgálatok és az in vitro rendszerek közötti különbségre hívja fel a figyelmet.

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 meglevő 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 azt is találták, 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. Kísérletünk több limitációval bír. Először is meg kell említeni a kis elemszámot, mely miatt nem lehet általánosítani azt, hogy minden humán retinoblastoma a korábban bemutatott immunhisztokémiai profillal bír. Az elemszámmal összefüggésben áll, hogy nem tudtuk a teljes differenciálódási spektrumot lefedni, mivel nem volt olyan daganatunk, melyben fleurette-k vagy neuronális differenciálódást láttunk volna a daganat több, mint felében. A retinoblastoma nem tisztázott sejtteni 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 sejtvonulat használtunk. A jövőben több, eltérő sejtvonulat vizsgálata lenne indokolt a PACAP38 mellett egyéb, PACAP analógokkal.

6. Új eredmények összefoglalása

I. Emberi magzatvíz kapcsán egy szenzitív és specifikus vizsgálómódszerrel 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 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 és CRP között,
 - az 5. napon statisztikailag szignifikáns, mérsékelten erős pozitív korreláció van a PACAP38 és a CRP között.
- az összes nap együttes vizsgálata során statisztikailag szignifikáns, gyenge pozitív korreláció igazolható a PACAP38 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

- 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>
- 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>
- Bakdash, J. Z., & Marusich, L. R. (2017). Repeated measures correlation. *Frontiers in Psychology*, *8*, 456. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.00456>
- 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>
- 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.
- Bremner, R., & Sage, J. (2014). Cancer: The origin of human retinoblastoma. *Nature*, *514*(7522), 312–313. <https://doi.org/10.1038/nature13748>
- 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>
- 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>
- Csontos, C. (2022). Polytraumatizált beteg intenzív terápiája. In L. Bogar (Ed.), *Aneszteziológia és intenzív terápia* (4th ed., pp. 657–663). Medicina Könyvkiadó Zrt.

- 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>
- 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>
- 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.
- 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>
- 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., Seasey, 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>
- Keel, M., & Trentz, O. (2005). Pathophysiology of polytrauma. *Injury*, *36*(6), 691–709. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2004.12.037>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>.

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>

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

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 1, 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>

Moore, K. L. & Persaud, T. V. N. (2003). *The developing human: Clinically oriented embryology* (7th ed.) Saunders. pp. 140-141.

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>

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>

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>

- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Rozanovic, 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)
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, 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, 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>
- 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>
- Tamas, A., Vass, R. A., Helyes, Z., Csanaky, K., Szanto, Z., Nemeth, J., & Reglodi, D. (2016). 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>
- 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>

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

8. Közlemények jegyzéke

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

Az értekezés 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; Q1
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.**, Frigyk, 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; Q2
25. Angyal, M., Petrétei, D., Bukovecz, T., **Tóth, D.**, & Simon, G. (2023). Műteti 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., & Reglődi, 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 közleményeinek **összesített impakt faktora: 81,698**

9. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném kifejezni hálámat dr. Reglödi 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 szerzőtársaimnak, 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.