

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Potenciális protektív faktorok vizsgálata időskori degeneratív
betegségek állatkísérletes modelljeiben**

Dr. Jüngling Adél



Témavezetők: Dr. Tamás Andrea, egyetemi docens, MTA doktora

Prof. Dr. Reglódi Dóra, egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Dr. Reglódi Dóra, egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Reglódi Dóra, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet

Pécs, 2025

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) egy multifunkcionális neuropeptid, melyet Arimura és munkatársai izoláltak hypothalamusból. Az agyalapi mirigyben az adenilát-cikláz stimulálásával emeli a cAMP szintjét. A szekretin/glükagon/vasoactiv intestinalis peptid (VIP) peptidcsalád tagja. A PACAP hatásait G-proteinhez kapcsolt receptorok közvetítik: a PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorok. A PACAP receptorok szinte minden szervben expresszálódnak. A PACAP peptid a hypothalamuson kívül számos szervrendszerben megtalálható, legnagyobb mennyiségben a központi- és perifériás idegrendszerben és az endokrin mirigyekben. Számos élettani folyamat szabályozásában részt vesz, mint a neuroendokrin szabályozás, thermoreguláció, reprodukív funkciók, táplálkozás, motoros aktivitás, memóriefunkciók és a cirkadián ritmus. Az egyik legismertebb és legszélesebb körben a citoprotektív hatása tanulmányozott. Ennek hátterében számos sejt és szövet esetében bizonyított antiapoptotikus, antiinflammatorikus és antioxidáns hatása áll. Neurotrofikus és neuroprotektív hatásait több kísérletes modellben is igazolták.

A PACAP és hatásainak életkorral való összefüggése

Számos kutatás leírta, hogy a PACAP neuropeptid szintje életkorral csökken, valamint képes beavatkozni bizonyos életkorral összefüggő patofiziológiás elváltozások lefolyásába. Jelentős PACAP szint csökkenést írtak le idősödő Rhesus makákó majmok agyában a striatum, hippocampus, temporális és parietális lebeny területén. A PACAP expressziójának csökkenését több vizsgálat is megerősítette humán agyban, életkorral összefüggő neurodegeneratív betegségek esetében. A PACAP hatását számos, életkorral összefüggésbe hozható patológiás állapotban is leírták már, több neurodegeneratív betegség modelljében, mint például a Parkinson-, Huntington-, és Alzheimer-kórban.

Ph.D. munkám során két életkorral összefüggésbe hozható, jellemzően időskorban megjelenő kórkép állatkísérletes modelljében vizsgáltuk a PACAP potenciális protektív hatásait. A PACAP mellett egy környezeti faktor, az ingergazdag környezet pozitív hatásait is feltérképeztük. Ezek alapján dolgozatomban két fő részre osztható:

- I. A korai ingergazdag környezet és a PACAP hatásainak vizsgálata patkány Parkinson-kór modellben.
- II. Felgyorsult szisztémás pre-szenilis amyloidosis vizsgálata különböző életkorú PACAP-génkiütött (PACAP KO) egerekben.

I. A KORAI INGERGAZDAG KÖRNYEZET ÉS A PACAP HATÁSAINAK VIZSGÁLATA PATKÁNY PARKINSON-KÓR MODELLBEN

1. Bevezetés

1.1. Parkinson-kór, valamint a PACAP vizsgálata Parkinson-kórban

A Parkinson-kór az Alzheimer-kórt követően a második leggyakoribb neurodegeneratív betegség. A kórképet neuropszichiátriai tünetek mellett legfőképpen progresszív motoros tünetek jellemzik, melyek a substantia nigra (SN) dopamin (DA) termelő sejtjeinek pusztulása következtében jelennek meg. A betegség pontos patofiziológiai oka jelenleg még nem ismert, ám oxidatív stressz, idegrendszeri gyulladásozó folyamatok, fehérje misfolding és mitokondriális funkció zavarok is szerepet játszhatnak a neurodegeneratív folyamatok kialakulásában. Egyes gének mutációja a Parkinson-kór familiáris, öröklődő formájához vezethetnek: α -synuclein, LRRK2, parkin, PINK1, Parkinson-kór protein 7 (PARK7). A PARK7 szerterágazó biológiai funkciókkal rendelkező chaperon fehérje. Számos tanulmány leírta, hogy gátolja az oxidatív stressz indukálta apoptózist, ezáltal neuroprotektív hatást ér el. A genetikai faktorokon kívül környezeti tényezők is összefüggésbe hozhatóak a betegség kialakulásával. Az életkor egy kulcsfontosságú faktor a Parkinson-kór esetében; a betegség incidenciája és prevalenciája is jelentősen emelkedik az életkor előrehaladtával.

Különböző neurodegenerációs modellekben a PACAP számos előnyös hatását írták le korábban, ahol antiapoptotikus, antiinflammatorikus és antioxidáns hatást fejt ki. A substantia nigrában és a striatumban is igazolt a PAC1 receptor jelenléte és a PACAP expressziója. A PACAP potenciálisan képes a DA szint emelésére. Több tanulmány is bizonyította a PACAP hatását *in vitro* és *in vivo* Parkinson-kór modellekben is. A Balatoni Limnológiai Kutatóintézetrel közösen, gerinctelen állatokon végzett kísérleteinkben rotenonnal kezelt csigákat vizsgáltunk, ahol a PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette az állatok mortalitását és javította a rotenon kezelés következtében kialakuló hipokinetikus tüneteket. A PACAP kezelést követően szignifikánsan magasabb dopamin szinteket mutattunk ki a csak rotenonnal kezelt állatok mintáihoz képest. Munkacsoportunk korábban már leírta az exogén

PACAP protektív hatásait a SN unilaterális 6-hidroxidopamin (6-OHDA)-lézióját követően Parkinson-kórban. Fiatal és idősödő patkányokban a PACAP terápia következtében kevésbé súlyos motoros tüneteket és csökkent dopaminerg sejtpusztulást figyeltek meg. Szintén 6-OHDA-indukálta léziót követően a PACAP terápia kevésbé csökkent dopamin szinteket eredményezett a SN területén fiatal patkányokban. Az állatkísérletes vizsgálatokat követően munkacsoportunk klinikai kutatásokba kezdett, mely során Parkinson-kóros betegek plazmájában a PACAP szintek változását derítettük fel. Vizsgálataink során szignifikánsan alacsonyabb PACAP-38 szinteket mértünk a kezeletlen Parkinson-kóros betegek plazmamintájában az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. A betegség progressziójával a PACAP szintjei tovább csökkentek, azonban mélyagyi stimulációt követően az endogén PACAP szintje jelentős emelkedést mutatott.

1.2. Ingergazdag környezet, és ennek Parkinson-kórra kifejtett hatásai

Számos kutatás kimutatta, hogy a gyógyszeres terápián kívül egyes környezeti faktorok is befolyásolhatják a Parkinson-kór prevalenciáját és lefolyását. Humán vizsgálatok alátámasztják, hogy a fizikai aktivitás, a fiatal korban végzett sporttevékenység később pozitív hatással van a Parkinson-kór motoros tüneteinek kialakulására. A laboratóriumi körülmények között kialakított „ingergazdag környezet” jól modellezi a pozitív környezeti hatásokat, a fizikai aktivitást és az ingerekben gazdag étletteret. Az „ingergazdag környezet” kifejezés olyan mesterségesen megváltoztatott állattartási körülményekre utal, ahol az állatokat a standard ketrechez képest nagyobb ketrebe helyezük, melybe különböző tulajdonságú játékokat helyezünk.

Az elmúlt évtizedekben több eredményt közöltek az ingergazdag környezeti körülmények hatásairól pszichiátriai és neurodegeneratív betegségekben, mint például depresszió, Huntington-, Alzheimer-kórban, amyotrophiás lateralsclerosisban és Parkinson-kórban. Ezen hatások hátterében a környezeti faktorok hatására megnövekedő neurotrofik és neuroprotektív ágensek, mint a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF) és a glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) állhatnak. Számos állatkísérlet foglalkozott az ingergazdag környezet Parkinson-kórra kifejtett pozitív hatásaival. Egereken végzett kísérletek esetén 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinnel (MPTP-vel), patkányok esetén pedig 6-OHDA-nal modellezték a betegséget. Az ingergazdag környezet protektív hatása mindkét modell esetében érvényesül, biokémiai, celluláris és funkcionális szinten is. A fent említett kutatásokban az ingergazdag környezet alkalmazásának ideje és hossza változó volt: az állatokat közvetlenül a Parkinson-kór indukálása előtt, alatt, vagy

közvetlenül utána helyezték ingergazdag körülmények közé. Ezért jelen kísérleteink során célul tűztük ki, hogy a korai, posztnatális ingergazdag környezeti stimulusok hatásait vizsgáljuk, egy, a későbbi életkorban indukált neurodegeneratív elváltozás során.

2. Célkitűzések

I. Vizsgálataink első felében a korai, posztnatális ingergazdag környezet hatásait vizsgáltuk felnőtt patkányokon, 6-OHDA indukálta féloldali SN lézióban. Megfigyeltük a Parkinson-kóros patkányok funkcionális és morfológiai eltéréseit.

II. Kísérletünk második felében célunk az emberi betegség szempontjából releváns modell felállítása volt, melyben a SN dopaminerg sejteinek lézióját idősödő állatokban váltottuk ki 6-OHDA féloldali adásával. Idősödő állatokban 2 lehetséges protektív faktor hatásait vizsgáltuk: a PACAP neuropeptidét, és az ingergazdag környezet hatását. Ebben az életkorban a DA és a PARK7 szintjeit határoztuk meg standard ketrecben nevelkedett és ingergazdag állatokban, annak érdekében, hogy felderítsük, hogy a korai ingergazdag környezetnek van-e hatása még későbbi életkorban is.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok és az ingergazdag környezet létrehozása

Kísérleteinkben Wistar patkányokat vizsgáltunk. Az állatok elhelyezését, gondozását és a kísérletek kivitelezését az etikai szabályoknak és a Pécsi Tudományegyetem szabályzatának megfelelően végeztük (Pécsi Tudományegyetem, Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága. Engedély számok: BA02/2000-15024/2011, BAI/35/55-2/2017). Az állatok táplálék- és folyadékbevitelét nem korlátoztuk, az állattartás 12-12 órás sötét-világos ciklusban történt, 20-24°C-on.

Az ingergazdag környezet hatásainak felderítése céljából a kísérleti állatokat standard és ingergazdag csoportokra osztottuk. A standard csoportba tartozó patkányokat születésüktől fogva hagyományos körülmények között tartottuk. Az ingergazdag környezetet úgy hoztuk létre, hogy születésük után 5 hétig az állatokat nagyobb, különböző nagyságú, formájú, színű és anyagú játékokat tartalmazó ketrecben tartottuk; ezzel komplex szenzoros ésmotoros ingereket biztosítva. Kognitív stimulus céljából a játékok felét naponta cseréltük. A posztnatális ötödik hetet követően ezeket az állatokat is hagyományos ketrecben neveltük a

Parkinson-kór modellezéséig. Vizsgálatainkat két korcsoportú állatokon végeztük: fiatal felnőtt (3 hónapos) és idősödő (14-18 hónapos) patkányokon.

3.2. Fiatal felnőtt állatokon végzett vizsgálataink

Három hónapos korban műtétet végeztünk Parkinson-kór modellezése céljából (n=29). Az állatok bal oldali substantia nigrájának dopaminerg sejtjeit 2µl 6-OHDA-nal roncsoltuk mindkét csoport esetében. Kontrollként, az állatok egy részénél 2 µl fiziológiás sóoldatot fecskendeztünk ugyanezen koordinátáknak megfelelően. Az állatok jobb oldali substantia nigraja mindig kezeletlen kontrollként szolgált.

A Parkinson-kór általunk alkalmazott modelljében a leggyakrabban megjelenő motoros tünetek elemzéséhez több időpontban folytattunk magatartás vizsgálatokat: a lézió előtt egy nappal, majd a beavatkozást követő első és tizedik napon open field tesztet végeztünk. Figyeltük a hipokinetikus jeleket: a nyugalmi időt, az ágaskodások számát (szabad ágaskodás, a fal érintése nélkül), illetve a falhoz két elülső végtaggal való támaszkodások számát. Smart Junior programmal a következő paramétereket mértük: az állat által megtett távolságot (cm), a nyugalmi időt (s), a lassú és gyors mozgással töltött időt, valamint az állat minimum és maximum sebességét. A posztoperatív adatokat az operáció előtti értékek százalékában fejeztük ki. Az adatok statisztikai értékeléséhez két mintás t-próbát használtunk.

A magatartás vizsgálatokat követően frontális irányú szövettani metszeteket készítettünk a középgagyból. A SN dopaminerg neuronjait TH-immunfestéssel azonosítottuk, majdszámláltuk a jobb és bal oldali SN területén jelölődő TH-pozitív neuronok számát. Statisztikai elemzésünk során a sérült oldal sejtszámát az ép oldal százalékában adtuk meg. Az adatok összehasonlításához két utas ANOVA tesztet, majd Fischer-féle post hoc analízist végeztünk.

3.3. Idősödő állatokon végzett vizsgálataink

Először egészséges, műtét nélküli fiatal (3-4 hónapos) és idősödő (14-18 hónapos) standard és ingergazdag állatokban (n=19) vizsgáltuk a DA és a PARK7 szintjét. Ezt követően 14-18 hónapos patkányokban Parkinson-kórt indukáltunk (n=56). Az állatok egy része unilaterálisan 2 µl fiziológiás sóoldatot, következő csoportjuk 2 µl 6-OHDA-t kapott, harmadik csoportjuk a 6-OHDA injekció után közvetlenül PACAP terápiában is részesült (6-OHDA+PACAP) a SN-ba. Az állatok jobb oldali SN-ja ezúttal is kezelés nélküli kontrollként szolgált. A műtét utáni hetedik napon a substantia nigra dopamin tartalmát HPLC-MS technikával, PARK7 szintjét pedig sandwich ELISA módszer segítségével határoztuk meg.

Az adatok statisztikai értékeléséhez egy utas ANOVA tesztet, majd Tukey's multiple comparisons tesztet vagy két mintás t-próbát alkalmaztunk a posthoc analízis során.

4. Eredmények

4.1. Fiatal felnőtt állatokon végzett vizsgálatok

A magatartás tesztek során a Parkinson-kórra jellemző hipokinéziát figyeltük meg. A műtét előtti adatokhoz viszonyítva a hagyományos körülmények között nevelt állatok esetében az ágaskodások százalékos arányának szignifikáns csökkenését találtuk a műtét utáni tizedik napon. Az ingergazdag környezetben tartott állatokban ez az érték szignifikáns csökkenést csak a műtét utáni első napon mutatott, azonban a tizedik napra javulást figyelhettünk meg az állatok mozgásában. Az állatok által megtett távolság elemzésekor a standard, 6-OHDA-nal kezelt patkányok szignifikánsan kevesebbet mozogtak a műtét után. Ezzel szemben az ingergazdag környezetben tartott állatok jobb teljesítményt mutattak: az általuk megtett távolság nem csökkent szignifikánsan a 6-OHDA-lezió után.

Morfometriai vizsgálataink során a standard környezetben tartott állatokban az életben maradt sejtek aránya szignifikánsan csökkent a 6-OHDA-nal kiváltott léziót követően, összehasonlítva a fiziológias sóoldattal kezelt állatokkal. Ezzel szemben az ingergazdag csoportban a 6-OHDA nem okozott szignifikáns dopaminerg csökkenést a fiziológias sóoldattal kezelt állatokhoz viszonyítva.

4.2. Idősödő állatokon végzett vizsgálataink

Az egészséges, műtét nélküli állatok substantia nigrájainak összesített dopamin szintje az életkorral szignifikánsan csökkent. Azonban, az idősödő csoporton belül nem volt különbség a standard és ingergazdag környezetben tartott állatok SN dopamin tartalma között. Az idősödő standard állatok (n=28) esetében a 6-OHDA szignifikánsan alacsonyabb dopamin szintet eredményezett a SN területén a fiziológias sóoldattal való injekcióhoz képest. Amennyiben az állatokat a 6-OHDA-lézió után PACAP-pal is kezeltük, ez a csökkenés nem volt megfigyelhető. Az ingergazdag környezetben tartott állatokban (n=20) a korai ingergazdag környezet képes volt kivédeni a lézió okozta dopamin szint csökkenést. A PACAP-kezelt állatok DA szintje 27,14%-kal magasabb volt, mint a 6-OHDA-nal kezeltké.

A SN beavatkozás nélküli PARK7 szintje nem mutatott korfüggő változást, továbbá a korai környezeti tényezők sem befolyásolták a szintjét. Annak ellenére, hogy nem találtunk szignifikáns különbséget a standard és ingergazdag környezetben nevelkedett idősödő

Parkinson-kóros patkányok között, megfigyeltük, hogy standard környezetben tartott állatokban a 6-OHDA által okozott lézió a PARK7 szintjét a sértetlen oldal 69,47%-ára, míg ingergazdag állatokban csupán 87,31%-ára csökkentette. Mindkét állatcsoport esetén a PACAP kezelés szignifikánsan magasabb fehérjeszintet eredményezett a csak toxinnal kezelt csoporttal összevetve.

5. Megbeszélés

Kutatásunk során kimutattuk, hogy a korai, posztnatális ingergazdag környezet és a PACAP protektív hatással bír felnőtt és idősödő patkányokban Parkinson-kórban. Köztudott, hogy az élet kezdeti szakaszában történő hatásoknak jelentős szerepük van az idegrendszer fejlődésében: bebizonyították, hogy a posztnatális korban bekövetkező hatásoknak hosszú távú következményei vannak. Ebben a periódusban megjelenő negatív behatások, sérülések és környezeti ártalmak etiológiai faktornak számítanak számos neuropszichiátriai és neurodegeneratív betegségek esetében. Ezzel szemben a pozitív környezeti faktorok bizonyítottan jótékony hatással bírnak egyes idegrendszeri sérülésekkel szemben. Több kutatócsoport is leírta, hogy az ingergazdag környezet befolyásolja a Parkinson-kór tüneteit és progresszióját. Azok az állatok, amelyek életük során valamikor ingergazdag környezetben nevelkedtek bizonyítottan kevésbé érzékenyek az MPTP és a 6-OHDA toxikus hatásaira. Ingergazdag állatokban nagyobb számú életben maradt DAerg sejtet, a striatumban magasabb GDNF és BDNF expressziót, a dopamin transzporter alacsonyabb szintjét, valamint jobb motoros tüneteket írtak le. A védelemhez potenciálisan hozzájárulhat a PACAP szint emelkedése is: kimutatták, hogy három hét ingergazdag környezetben eltöltött idő megemeli a PACAP27- és PACAP38-szerű immunreaktivitást felnőtt patkány agy több régiójában. Az előzőleg említett kutatások során az állatok különböző ideig és időpontokban nevelkedtek ingergazdag környezetben. Azonban a születés utáni, posztnatális ingergazdag környezet hosszú távú hatásairól eddig még nem voltak ismereteink. Kísérleteinkben a standard körülmények között nevelkedett állatokban a 6-OHDA kezelés szignifikáns sejtpusztulást okozott a közepagy substantia nigra régiójában, azonban a posztnatális ingergazdag környezet képes volt megvédeni a dopaminerg sejteket. Annak ellenére, hogy az életben maradt sejtek százalékos arányát tekintve nem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget standard és ingergazdag környezetben tartott állatok között, az ingergazdag állatokban tapasztalt kisebb dopaminerg sejtpusztulás kevésbé súlyos motoros tünetekhez vezetett.

A magasabb életkor a Parkinson-kór egyik jelentős rizikófaktora, így a betegséget megfelelően modellezni idősödő állatokon lehet a terápiás lehetőségek felderítése céljából. Kísérletünk azon részében, amikor unilaterális 6-OHDA adásával Parkinson-kórt modelleztünk idősödő állatokban két olyan faktor potenciális szerepét vizsgáltuk, melyek fiatal állatokban bizonyítottan neuroprotektív hatással bírtak: az ingergazdag környezetét és a PACAP neuropeptidét. Korábban kutatócsoportunk már összehasonlította a 6-OHDA által kiváltott lézió magatartásbeli és morfológiai következményeit fiatal és idős patkányokban. A jelenlegi megfigyeléseink jól korrelálnak a fiatal állatok vizsgálata során tapasztalt eredményeinkkel: miszerint a toxin csak a standard csoport állataiban okozott szignifikáns dopamin szint csökkenést a substantia nigrában. Az ingergazdag környezetben nevelkedett állatok védettek voltak a károsító hatással szemben, bennük a 6-OHDA nem okozott szignifikáns DA csökkenést a fiziológiás sóoldattal kezelt csoporthoz képest. Annak ellenére, hogy szignifikáns különbség nem volt kimutatható standard és ingergazdag 6-OHDA-nal kezelt állatok között, a standard csoportban 48,94%-kal, míg az ingergazdag csoportban csak 39,23%-kal csökkent a DA szintje. Ez az enyhe dopamin-szintbeli különbség az ingergazdag állatok hatékonyabb kompenzációs képességére utalhat modellünkben, mely később jobb motoros tünetekhez vezethet. A korai ingergazdag környezetben való nevelkedés nem volt hatással az egészséges, műtét nélküli idős állatok DA szintjére, azonban eredményeink arra utalnak, hogy egy neurodegeneratív betegség esetén mégis enyhe neuroprotektív hatást fejthet ki. Az öregedő parkinsonos csoportban a PACAP kezelés megakadályozta a DA csökkenést. Ez a hatás a standard állatokban szembetűnőbb volt, mert ebben a csoportban a 6-OHDA önmagában szignifikáns DA-szint csökkenést okozott. Jelen megfigyeléseink új bizonyítékot szolgáltatnak a PACAP időskorban megnyilvánuló neuroprotektív hatásáról és összhangban vannak korábbi vizsgálatunkkal, melyben fiatal patkányban mutattuk ki, hogy a PACAP-pal való kezelés kivédi a 6-OHDA által okozott DA szint csökkenést.

Kísérletünk folytatásában célul tűztük ki, hogy kiderítsük a PACAP védő hatásának mechanizmusát modellünkben, ezért vizsgáltuk, hogy milyen proteomikai változások történnek a SN-ban, melyek a magasabb DA szintekhez vezethetnek. Kutatásunk során a PARK7 fehérje kvantitatív meghatározására fókuszáltunk munkacsoportunk ugyanezen Parkinson modellen végzett előző eredményei alapján. A PARK7 fehérje mutációja által kiváltott Parkinson-kór autoszomális recesszív öröklődésű formájára a lassabb progresszió jellemző, ám ebben a formában a tünetek fiatalabb életkorban jelentkeznek. Feltételezhető, hogy ha a PARK7 funkciójának kiesése hatással van a Parkinson-kór patogenezisére, akkor aktivációja jótékony következményekkel jár. Kísérletünk szempontjából jelentős, hogy az

elmúlt évtizedben Guzman és munkatársai kimutatták a PARK7 sejtvédő hatását dopaminerg neuronokon is. A PARK7 számos mechanizmus révén védi a dopaminerg sejteket. Jelen kísérletünk során kimutattuk, hogy sem az életkor, sem a környezeti tényezők nem befolyásolják a PARK7 szintjét egészséges, műtét nélküli állatokban. Az idősödő parkinsonos állatokban a PACAP-nak megegyezik a hatása a fiatal állatokban kimutatottal: a védő PARK7 fehérje szignifikáns emelkedését okozza a károsított SN-ban. Standard és ingergazdag PACAP kezelt állatokban is kimagasló PARK7 szint emelkedést tapasztaltunk. A fehérje százalékos aránya meghaladta a 100%-ot, ami arra utalhat, hogy ez az emelkedés egy, a PACAP által kiváltott kompenzatorikus védő mechanizmus lehet. Eredményeink feltárják, hogy a PACAP és a PARK7 fehérje egyértelműen kapcsolatban állnak egymással. Védő mechanizmusuk több ponton találkozik, valamint számos közös útvonalon fejtik ki hatásukat. A PACAP és a PARK7 is aktiválja a TH enzimet, a PI3K/PKB jelátviteli útvonalat, valamint mindegyik antiapoptotikus hatást fejt ki a Bcl-2 és a Bcl-xL útvonalon.

Végül, kutatásaink során új eredményként leírtuk, hogy az idősödő parkinsonos patkányokban a PACAP védő hatása jól korrelál a DA és a PARK7 szintjeinek emelkedésével. Kutatásunk során enyhén magasabb DA és PARK7 szinteket detektáltunk 6-OHDA kezelést követően az ingergazdag környezetben tartott állatokban. Ennek ellenére nem találtunk szignifikáns különbséget a PACAP-kezelt standard és ingergazdag kertrebben nevelkedett patkányok között, így kísérleti modellünkben nem tudtuk bizonyítani az ingergazdag környezet és a PACAP hatásának interakcióját. Jelen kutatásunk tovább hangsúlyozza a posztnatális környezeti faktorok fontosságát, miszerint azok képesek megelőzni és a tüneteit módosítani egy idős korban jelentkező neurodegeneratív betegségnek. A PACAP hatásosságát bizonyító eredményeink pedig megerősítik azon törekvéseket és kutatásokat, melyek potenciális terápiás hatását írták le Parkinson-kórban.

II. FELGYORSULT SZISZTÉMÁS PRE-SZENILIS AMYLOIDOSIS VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ ÉLETKORÚ PACAP-GÉNKIÜTÖTT (KO) EGEREKBEN

1. Bevezetés

1.1. Amyloidosis, valamint a PACAP és az amyloidosis kapcsolata

Az amyloidosis fibrilláris fehérjék extracelluláris lerakódásával járó állapot, mely számos betegséggel összefüggésben kialakulhat. Heterogén betegségcsoport, formái a lokalizálttól a szisztémás generalizált típusokig terjednek. Az amyloid megjelenése morfológiailag állandó, viszont felépítése biokémiailag heterogén. A proteomika fejlődésének köszönhetően ma már az amyloid fibrillumok legalább 38 különböző emberi fehérje prekuzora ismert. Klinikailag az amyloidosist a lerakódott fehérje típusa és a lerakódások lokalizációja alapján osztályozzák. Az amyloidosis egyes formái idős életkorban jelennek meg. Az amyloidogenikus fehérje prekuzorok későbbi fibrillumképzéséhez számos tényezőre van szükség: mint például proteázok, nukleáló részecskék, chaperonok, mátrix molekulák és a mikroörményzet. Ezek egyensúlya az öregezés során felborulhat, melynek következtében szenilis amyloidosis alakulhat ki több egértörzsben, valamint embereken is. Klinikailag az amyloidosist az adott szervből vett minta szövettani vizsgálatával, polarizációs mikroszkóp alatt Kongó-vörös festéssel lehet igazolni. Az elmúlt évtizedben a tömegspektrometria teret nyert az amyloid diagnosztikájában. Lézeres mikrodisszekció alkalmazásával lehetővé vált specifikusan az amyloidlerakódások kijelölése, ami kisméretű lerakódások esetén különösen hasznos.

Felismerték, hogy a szervezetünkben természetesen előforduló egyes peptidok és peptid-alapú molekulák az amyloidogenesis különböző pontjain beavatkozva képesek gátolni az amyloid képződését és progresszióját. A neuropeptidok diszregulációja szerepet játszhat az öregezés-okoza károsodások kialakulásában és felgyorsíthatja az amyloid lerakódások létrejöttét. Jelenleg kevés ismeret áll rendelkezésünkre a PACAP amyloidosisban kifejtett hatásairól illetve a PACAP és az amyloidosis kapcsolatáról. A lokális szenilis cerebrális amyloidosisban, vagyis Alzheimer-kórban β -amyloid lerakódás figyelhető meg. Humán neuroblastoma sejteken a PACAP hozzáadása serkenti az α -szekretáz aktivitását, ezáltal csökkenti a káros β -amyloid képződését. Amyloid prekuzor protein transzgenikus egereken kimutatták, hogy az intranazálisan alkalmazott PACAP képes lassítani lokálisan a β -amyloid lerakódását. Idegsejttenyészetben megfigyelték, hogy a PACAP dózisfüggő módon véd az β -amyloid által kiváltott toxicitással szemben. Az Alzheimer-kór korai jelének számít a kóros

tau protein felhalmozódása a szinapszisokban. Igazolt, hogy a PACAP a szinaptikus proteoszómák aktivitásának fokozásával csökkenti a tau mennyiségét a posztszinaptikus kompartmentekben egér agyban. A fent említett kutatások mindegyike az exogén PACAP lokális amyloidosisra gyakorolt hatásait vizsgálta, azonban az nem ismert, hogy az endogén PACAP hogyan befolyásolja a szisztémásan megjelenő amyloid plakkok kialakulását.

1.2. PACAP-génkiütött egerek

Az endogén PACAP pontos hatásainak és hatásmechanizmusainak felderítésére kiváló lehetőséget nyújtanak a PACAP-génkiütött (PACAP KO) egereken végzett vizsgálatok. Annak ellenére, hogy ezek az egerek fiatal korban makroszkóposan nem különböznek vad típusú társaiktól, ebben az egértörzsben az endogén PACAP hiánya számos morfológiai, biokémiai és magatartásbeli rendellenességhez vezet. A KO egerek szaporodási képessége csökkent, halálozási arányuk pedig emelkedett. Normál körülmények között a PACAP KO állatokban a legtöbb szövet fejlődése nem különbözik jelentősen a vad típusúakétól, azonban néhány enyhe morfológiai elváltozás kimutatható a génhiányos egerekben. A két állatcsoport közötti különbségek különösen kóros körülmények között nyilvánvalóak: mind az idegrendszer, mind a perifériás szervek esetében igazolták, hogy a PACAP-génkiütött egerek érzékenyebben reagálnak különböző károsító ingerekre. Intézetünkben több mint 10 éve folytatunk kutatásokat PACAP-génkiütött egerek segítségével. Ez idő alatt megfigyeltük, hogy KO egereink élettartama csökkent vad típusú társaikhoz képest. A megnövekedett mortalitás pontos okainak felderítése céljából minden szervrendszerre kiterjedő hisztopatológiai vizsgálatok elvégzésébe kezdtünk, mely kutatások Ph.D. dolgozatom második felének alapjául szolgálnak.

2. Célkitűzések

Célul tűztük ki annak felderítését, hogy milyen morfológiai eltérések állhatnak a PACAP-génkiütött egerek károsító hatásokra mutatott megnövekedett érzékenységének hátterében. Ennek érdekében komplex hisztopatológiai elemzés alá vetettük a PTE ÁOK Anatómiai Intézet állatházában nevelkedő vad típusú és PACAP KO egereket, különös hangsúlyt fektetve a különböző életkorú egyedek patomorfológiai jellemzőinek összehasonlítására.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok

Vizsgálatainkat vad típusú (WT) és PACAP-génkiütött egereken végeztük. Az egereket CD1-es alapon tenyésztettük. Az állattartás az előző kísérletünkkel megegyezően történt. Kísérleteinket a Pécsi Tudományegyetem szabályzatának megfelelően végeztük (Pécsi Tudományegyetem, Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága. Engedély számok: BA02/2000-24/2011; BA02/2000-20/2006). A kísérletünkben részt vevő WT (n=15) és KO (n=15) állatokat két korcsoportra osztottuk: fiatal, 3-12 hónapos és idősödő, 13-24 hónapos állatokra.

3.2. Hisztopatológiai analízis

Szövetteni vizsgálat céljából túlaltatást követően az állatok szerveiből mintát vettünk. Vizsgáltuk az ideg-, endokrin-, kardiovaszkuláris-, légző-, gasztrointesztinális-, urogenitális-, és muszkuloszkeletális rendszer szerveit, valamint egyéb más szöveteket is. Az eltávolított szervekből metszeteket készítettünk, melyek hagyományos haematoxylin-eosin festéssel amyloid lerakódásra utaló jeleket mutattak. Ezért később parallel metszeteket Kongó-vörös festéssel festettünk. A Kongó-festett metszetek alapján hasonlítottuk össze a szervek amyloid tartalmát. Az amyloid depozitumok lokalizációja és súlyosságának mértéke alapján az ún. Amyloid Index (AI) értékkel írtunk le minden mintát, egy 0-tól 3-ig terjedő skálán a következőképpen: 0: nincs amyloid depozíció; 1: enyhe fokális; 2: mérsékelt/súlyos fokális vagy enyhe diffúz; 3: masszív diffúz amyloid depozíció. Statisztikai elemzésünk során a vad típusú és PACAP KO egerek összehasonlítását nonparametrikus Mann-Whitney teszttel végeztük. A különböző életkorú csoportok közötti elemzésekhez a Kruskal-Wallis és a Dunn's multiple comparison teszteket használtuk.

3.3. Proteomikai és immunhisztokémiai vizsgálatok

Az amyloidosis típusának meghatározása céljából egy jelentős mértékben érintett bélmintán vizsgáltuk a depozitumok pontos proteomikai összetételét. Formalin-fixált, paraffinba ágyazott metszeteken lézer-mikrodisszekció (LMD) során kijelöltük az érintett területet és vizsgáltuk a peptid/protein összetételét fordított fázisú folyadék kromatográfiával, majd az ahhoz közvetlen kapcsolattal tömegspektrometriával (LC-MS). Proteomikai eredményeink igazolása céljából anti-Apolipoprotein-AIV antitest segítségével immunfestést végeztünk azokon a szerveken, amelyekben a legsúlyosabb amyloid depozíciót figyeltünk meg.

3.4. Citokin array vizsgálat

A citokin profil analízist fiatal és idősödő WT és KO egerek (n= 4/csoport) veseszövetének homogenizátumából végeztük egér „Cytokine Array Kit, Panel A” segítségével, mely 40 citokin jelenlétének kimutatására és az expresszió intenzitásának mérésére alkalmas. A statisztikai elemzést két utas ANOVA, majd Fisher-féle post hoc teszttel végeztük.

4. Eredmények

4.1. Hisztopatológiai analízis

Polarizációs mikroszkóp alatt, Kongó-vörös festést alkalmazva amyloid lerakódást figyeltünk meg a vizsgált állatcsoportok szerveiben. A depozitumok szervenkénti eloszlása hasonló volt a vad típusú és KO állatokban, azonban a lerakódások megjelenésének ideje és mennyisége lényegesen különbözött. Az életkor előrehaladtával egyre diffúzabb és súlyosabb amyloid lerakódást detektáltunk, főleg a KO állatokban. Először az amyloidosis által érintett állatok százalékos arányát vizsgáltuk szervekre lebontva. Megfigyeléseinket és az amyloid lerakódások eloszlásának részletes leírását szervrendszerenként a dolgozatomban részletesen tartalmazza. Összehasonlítva az azonos életkorú WT és KO állatokat, azt tapasztaltuk, hogy az érintett állatok százalékos aránya jelentősen magasabb volt a fiatal és idősödő KO állatokban is. A legtöbb szerv esetében a lerakódások első jelei a KO állatokban már fiatal korban láthatóak voltak, míg a WT állatokban csak 15 hónapos korban alakultak ki amyloid depozitumok. Ez alól kivételt a bőr és a belek jelentettek, ahol a depozitumok már fiatal életkorban megfigyelhetők, ugyanis ezek a szervek a legsúlyosabban érintettek a WT egerekben. Az idősödő KO állatokban a lép, a máj, a pajzsmirigy és a belek minden állatban érintettek voltak. Összességében a KO állatokban az amyloidosis egyértelműen fiatalabb életkorban jelent meg, gyorsabban progrediált, és idősebb korban súlyosabb mértéket öltött; valamint az állatok nagyobb részét érintette vad típusú társaikkal összehasonlítva.

Az AI statisztikai elemzése kimutatta, hogy a PACAP-nak általánosságban szignifikáns hatása van több szervben az amyloid lerakódás súlyosságára, mint például: nyelőcső, máj, légső, vese, lép, bőr és pajzsmirigy. Az AI vizsgálata különböző korcsoportú egerekben szignifikáns különbségeket mutatott a vad típusú és géniütött egerek között. A szervek többségében az amyloidosis súlyossága a fiatal KO egerekben megegyezett az idősödő WT egerekben tapasztalttal, ami arra utal, hogy PACAP hiányában a KO egerekben az amyloidosis már fiatal korban eléri a szenilis szintet. Összefoglalva, eredményeink azt

mutatják, hogy a PACAP hiánya felgyorsítja a szenilis szisztémás amyloidosis megjelenését, ami pre-szenilisen az amyloid lerakódások súlyosbodásával és generalizációjával járó, kóros degeneratív elváltozásokhoz vezet.

Fénymikroszkópos vizsgálataink során az amyloid depozitumokon kívül semmilyen más kóros, patológiás eltérést nem detektáltunk a perifériás szervekben.

4.2. Proteomikai és immunhisztokémiai vizsgálatok

Az LMD-alapú proteomikai analízis során 13 235 peptidet sikerült azonosítani, melyek 2172 fehérjéhez tartoztak. Ezek közül 15 amyloidosis-asszociált fehérjét találtunk a depozitumokban, ezek közül a legnagyobb intenzitásban: Apolipoprotein A-IV (Apo-AIV), Apolipoprotein E (Apo-E), szérum amyloid P-komponens, Apolipoprotein A-I (Apo-AI), és az Apolipoprotein A-II (Apo-AII). Az eredményeink azt valószínűsítik, hogy jelen állatmodellünkben AApoAIV típusú amyloidosis alakult ki.

Ezt követően immunhisztokémiai vizsgálatokkal is sikerült igazolni az Apo-AIV fehérje jelenlétét. A Kongó-vörös festéssel pozitívnak bizonyuló régiókkal megegyező területen detektáltuk az Apo-AIV pozitivitást az idősödő állatokban. Hisztopatológiai megfigyeléseinkkel összhangban a PACAP KO állatokban erősebb és kiterjedtebb Apo-AIV immunpozitivitást figyeltünk meg.

4.3. Citokin array vizsgálat

A citokin array vizsgálat során a legnagyobb különbséget a B-limfocita kemoattraktáns (BLC), Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) és a Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted fehérje (RANTES) szintjeiben figyeltük meg. Méréseink az idősödő KO egerekben szignifikánsan emelkedett citokin és kemokin szinteket mutattak a többi állatcsoportéhoz képest.

5. Megbeszélés

Vad típusú és PACAP-génkiütött egereket összehasonlító kutatásunk során súlyos szenilis szisztémás amyloidosis idő előtti megjelenését figyeltük meg a KO egerekben endogén PACAP hiányában. Tömegspektrometria-alapú proteomikai analízisünk kimutatta, hogy más egyéb jelenlévő komponensek mellett az Apolipoprotein A-IV a fő alkotóelem az amyloid depozitumokban. Ezt immunhisztokémiai vizsgálatokkal is sikerült igazolnunk. Több állatmodellrel vizsgálták már az életkorral összefüggő szisztémás amyloidosis, miután régóta ismert jelenség, hogy egyes beltenyésztett egértörzsekben spontán megjelenhetnek amyloid

aggregátumok. Egy tanulmány szerint a spontán szisztémás szenilis amyloidosis a vizsgált egértörzsek 75%-át érinti. Vizsgálatunk során nem találtunk különbséget hím és nőstény egerek érintettsége között, mely megfigyelés egyezik több kutatócsoport CDI és más egértörzseken való leírásával. Állatainkban a szenilis amyloidosis leginkább a vesét, a lépét, a májat, a bőrt, a pajzsmirigyet, beleket és a nyelőcsövet érintette. Míg a szisztémás amyloidosis legtöbb formája érinti az ízületeket és az azokat körülvevő szöveteket, mi nem figyeltünk meg ízületi érintettséget. A központi idegrendszer és a perifériás idegek szintén nem voltak érintettek, azonban ez a megfigyelés egyezik a korábbi tapasztalatokkal.

Ismert, hogy az amyloid depozitumok számos, jól elkülöníthető komponensből épülnek fel. A proteomika fejlődésével sikerült kimutatni, hogy az amyloidosis majdnem összes típusában az aggregátumokat alkotó fő fehérjék a következők: Apo-E, szérum amyloid P komponens, Apo-AIV és az Apo-AI. Mintáinkból az amyloidosis-asszociált fehérjék közül a legnagyobb mennyiségben az Apo-AIV fordult elő. Érdeemes megemlítenünk, hogy nem-amyloidosis asszociált fehérjéket - mint például vitronektint, szérum albumint, kollagén- α -2 (I) láncot, kollagén- α -1 (I) láncot és az aktint - is kimutattunk mintáinkból, melyek jelenlétét humán szisztémás AApoAIV típusú amyloidosis esetén már leírták. Az apolipoproteinek közül az Apo-AIV szintje életkorral csökken, denaturációra hajlamos, és a legsérülékenyebb környezeti károsító hatásokra. Az utóbbi években végzett proteomikai vizsgálatok rámutattak arra, hogy sokkal nagyobb az AApoAIV típusú amyloidosis előfordulása annál, mint ahogy az korábban ismert volt.

Az abnormális fehérje-feltekeredéssel járó betegségek tanulmányozása során szükség van jó állatmodellekre, mivel még mindig nem ismert, hogy egy fehérje miért lesz hajlamos fibrillum-képzésre az öregedés folyamán és miért csak egyes szövetekben. Azt feltételezik, hogy az amyloidosis életkorral-asszociált formái krónikus gyulladás fennállására utalhatnak. Modellünkben a krónikus gyulladás jelenléte kizárható, erre semmilyen szövettani jel nem utalt. Azonban kísérleti állatainkban megváltozott citokin/kemokin-profil detektáltunk az idősödő KO egerekben. E profil eltolódása megváltozott inflammatórikus és immunológiai milióhoz vezethet. Ez a mikrokörnyezet valószínűleg jobban kedvez az amyloid depozitumok lerakódásának a PACAP-génkiütött egerekben. Egy másik lehetséges elmélet, hogy a megváltozott citokin- és kemokin profil az amyloid lerakódás következménye.

Annak ellenére, hogy csak néhány adat áll rendelkezésünkre, ezek azt sugallják, hogy az endogén PACAP hiánya az öregedési folyamatok felgyorsulásával jár. Az öregedés során csökken azon faktorok effektivitása, melyek a hibásan feltekeredett fibrillumok képződését és aggregációját lassítják; ezzel szemben az amyloidogenikus folyamatok gyorsulnak,

különösen, ha valamilyen genetikai hajlamosító tényező is fennáll a háttérben. Részben a metabolikus enzimek változása lehet a felelős a PACAP KO egerek csökkent antioxidáns és detoxifikáló képességéért. A homeosztatikus molekulák, gyulladáscsökkentő faktorok és metabolikus enzimek egyensúlyának zavarát fiatalabb életkorban, normál körülmények között még képesek kompenzálni, azonban idősebb életkorban és sérülések esetén a kompenzáció képességének hiánya sebezhetőbbé teszi az állatokat. A PACAP egyéb más tulajdonságai is szerepet játszhatnak sejtvédő hatásában amyloidosis esetén: például akadályozza a toxikus β -amyloid kialakulását, védi a sejteket a β -amyloid toxicitástól és amyloidosishoz kapcsolódó apoptózis esetén is antiapoptotikus hatásokkal bír. Képes továbbá megkötni egyes negatív töltésű proteoglikánokat, melyek az amyloid aggregátum kialakításában vesznek részt. Feltételezzük, hogy mivel a PACAP szerepet játszik azon komplex celluláris interakciókban, melyek amyloidosisban szövetkárosodáshoz vezetnek; valamint a PACAP általános citoprotektív és öregedési folyamatokat késleltető hatásának hiánya áll fent a KO egerekben, ennek következményeképpen gyorsul fel bennük az amyloid képződés.

A szisztémás szenilis amyloidosis egy rendkívül komplex kórkép, melynek kialakulásáról és annak pontos mechanizmusáról jelenleg kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Az amyloid depozitumok fiatalkori megjelenése a PACAP KO egerekben feltételezi az endogén PACAP védő szerepét a szenilis amyloid plakkok lerakódásával szemben. A PACAP KO egerekben megfigyelt korai szenilis szisztémás amyloidosis egy idő előtti öregedési folyamatot jelezhet ebben az állattörzsben, ezáltal a PACAP KO egerek alkalmasak lehetnek felgyorsult öregedési folyamatok modellezésére.

Új eredmények összefoglalása - Tézisek

I. Ph.D. munkám első részében megfigyeltük a korai, posztnatális inergazdag környezet Parkinson-kórban kifejtett védő hatását. Először felnőtt patkányokban kimutattuk, hogy az inergazdag környezetben való nevelkedés védi a substantia nigra dopaminerg sejtjeit 6-OHDA által kiváltott lézió esetében. Az inergazdag állatokban kisebb mértékű sejtpusztulást és kevésbé súlyos motoros tüneteket figyeltünk meg.

Kísérletünk második felében idősödő állatok dopaminerg rendszerén vizsgáltuk a korai inergazdag környezet és a PACAP hatásait. Az inergazdag környezetben nevelkedett állatokban a 6-OHDA nem okozott szignifikáns DA csökkenést. A PACAP kezelés megakadályozta a SN DA csökkenését mindkét vizsgált csoportban. Standard és inergazdag patkányokban is PACAP kezelés hatására magasabb PARK7 szinteket tapasztaltunk. Valamint kutatásunk során új eredményként leírtuk, hogy az idősödő parkinsonos patkányokban a PACAP védő hatása jól korrelál a DA és a PARK7 szintjeinek emelkedésével.

II. Ph.D. munkám második felében fiatal (3-12 hó) és idősödő (13-24 hó) vad típusú és PACAP-génkiütött egereket hasonlítottunk össze. Kutatásunk során súlyos szenilis szisztémás amyloidosis idő előtti megjelenését figyeltük meg a génkiütött egerekben először Kongo-vörös festéssel polarizációs mikroszkóp alatt. Ezt követően tömegspektrometria-alapú proteomikai analízisünk kimutatta, hogy más egyéb jelenlévő komponensek mellett az Apolipoprotein A-IV a fő alkotóelem az amyloid depozitumokban. Ezt immunhisztokémiai vizsgálatokkal is sikerült igazolnunk. Citokin array vizsgálattal az idősödő KO egerekben szignifikánsan emelkedett BLC, IL-1ra és RANTES szinteket mutattunk ki a többi állatcsoporthoz képest. A PACAP KO egerekben megfigyelt korai szenilis szisztémás amyloidosis egy idő előtti öregedési folyamatot jelezhet ebben az állattörzsben, ezáltal a PACAP KO egerek alkalmasak lehetnek felgyorsult öregedési folyamatok modellezésére.

Megfigyeléseink rámutatnak a PACAP rendkívül sokrétű szerepére öregedésben és az életkorhoz-köthető degeneratív megbetegedésekben; és felvetik annak szükségét, hogy tovább vizsgáljuk a PACAP öregedési folyamatokban betöltött pontos szerepét.

Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Jungling A, Reglodi D, Karadi ZN, Horvath G, Farkas J, Gaszner B, Tamas A. Effects of postnatal enriched environment in a model of Parkinson's disease in adult rats. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2): 406. doi: 10.3390/ijms18020406.

Q1; IF: 3,687

Jungling A, Reglodi D, Maasz G, Zrinyi Z, Schmidt J, Rivnyak A, Horvath G, Pirger Z, Tamas A. Alterations of nigral dopamine levels in Parkinson's disease after environmental enrichment and PACAP treatment in aging rats. *Life (Basel)*. 2021;11(1): 35. doi: 10.3390/life11010035.

Q2; IF: 3,253

Jungling A, Reglodi D, Tamas A. Review on the neuroprotective effects of environmental enrichment in models of Parkinson's disease. *Clin Pharmacol Transl Med*. 2018;2(2): 101-107.

A közlemény tartalmának 90%-a került beépítésre jelen doktori értekezésbe:

Reglodi D, **Jungling A**, Longuespee R, Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann M, Juhasz T, Bardosi S, Tamas A, Fulop BD, Kovacs K, Nagy Z, Sparks J, Miseta A, Mazzucchelli G, Hashimoto H, Bardosi A. Accelerated pre-senile systemic amyloidosis in PACAP knockout mice - a protective role of PACAP in age-related degenerative processes. *J Pathol*. 2018;245(4): 478-490. doi: 10.1002/path.5100.

D1; IF: 5,942

Reglodi D, Atlasz T, Szabo E, **Jungling A**, Tamas A, Juhasz T, Fulop BD, Bardosi A. PACAP deficiency as a model of aging. *Geroscience*. 2018;40(5-6): 437-452. doi: 10.1007/s11357-018-0045-8.

Q1; IF: 6,444

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk összesített impakt faktora: 19,326

A szerző további társszerzős közleményei

Sandor B, Fintor K, Felszeghy S, Juhasz T, Reglodi D, Mark L, Kiss P, **Jungling A**, Fulop BD, Nagy AD, Hashimoto H, Zakany R, Nagy A, Tamas A. Structural and morphometric comparison of the molar teeth in pre-eruptive developmental stage of PACAP-deficient and wild-type mice. *J Mol Neurosci*. 2014;54(3): 331-41. doi: 10.1007/s12031-014-0392-6.

Q1; IF: 2,343

Maasz G, Zrinyi Z, Reglodi D, Petrovics D, Rivnyak A, Kiss T, **Jungling A**, Tamas A, Pirger Z. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models. *Dis Model Mech*. 2017;10(2): 127-139. doi: 10.1242/dmm.027185.

D1; IF: 4,398

Reglodi D, Atlasz T, **Jungling A**, Szabo E, Kovari P, Manavalan S, Tamas A. Alternative routes of administration of the neuroprotective Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide. *Curr Pharm Des.* 2018;24(33): 3892-3904. doi: 10.2174/1381612824666181112110934.

Q2; IF: 2,412

Szabo D, Szanto Z, **Jungling A**, Polgar B, Reglodi D, Cziraki A, Tamas A, Sarszegi Z. A Hypophysis Adenilát-Cikláz Aktiváló Polipeptid (PACAP) hatása a kardiovaszkuláris rendszerre. *Cradiologia Hungarica* 2018; 48(2): 129-135. doi: 10.26430/CHUNGARICA.2018.48.2.129.

Sarszegi Z, Szabo D, Gaszner B, Konyi A, Reglodi D, Nemeth J, Lelesz B, Polgar B, **Jungling A**, Tamas A. Examination of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) as a potential biomarker in heart failure patients. *J Mol Neurosci.* 2019;68(3): 368-376. doi: 10.1007/s12031-017-1025-7.

Q1; IF: 2,678

Reglodi D, Tamas A, **Jungling A**, Vaczy A, Rivnyak A, Fulop BD, Szabo E, Lubics A, Atlasz T. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide against neurotoxic agents. *Neurotoxicology.* 2018;66: 185-194. doi: 10.1016/j.neuro.2018.03.010.

Q1; IF: 3,263

Vass RA, Kemeny A, Dergez T, Ertl T, Reglodi D, **Jungling A**, Tamas A. Distribution of bioactive factors in human milk samples. *Int Breastfeed J.* 2019;14: 9. doi: 10.1186/s13006-019-0203-3.

D1; IF: 2,545

Szegeczki V, Bauer B, **Jungling A**, Fulop BD, Vago J, Perenyi H, Tarantini S, Tamas A, Zakany R, Reglodi D, Juhasz T. Age-related alterations of articular cartilage in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene-deficient mice. *Geroscience.* 2019;41(6):775-793. doi: 10.1007/s11357-019-00097-9.

D1; IF: 4,361

Sparks J, **Jungling A**, Kiss G, Hiripi L, Pham D, Tamas A, Hoffmann O, Bardosi S, Miseta A; Reglodi D. Presence of systemic amyloidosis in mice with partial deficiency in Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) in aging. *Appl. Sci.* 2021;11,7373. <https://doi.org/10.3390/app11167373>.

Q2; IF: 2,838

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

D1; IF: 5,600

Szegeczki V, Palfi A, Filler C, Hinnah B, Toth A, Kovacs LS, **Jungling A**, Zakany R, Reglodi D, Juhasz T. Synergistic crosstalk of PACAP and Notch signaling pathways in bone development. *Int. J. Mol. Sci.* 2025; 26(11):5088. <https://doi.org/10.3390/ijms26115088>.

D1; IF: 4,9

A szerző kumulatív impakt faktora: 54,664

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném kifejezni hálámat és köszönetemet témavezetőimnek, Dr. Tamás Andrea egyetemi docensnek és Prof. Dr. Reglődi Dóra egyetemi tanárnak, akik lehetőséget adtak arra, hogy csatlakozhassak a PACAP Kutatócsoporthoz és megteremtették a munkámhoz szükséges feltételeket és lehetőségeket. Dr. Tamás Andrea TDK-s korom óta támogatta tudományos diákköri és demonstrátori munkámat, végezte szakmai irányításomat és ösztönzött az Intézethez való csatlakozásban. Mindkettejüktől a szakmai tudáson felül számos fontos leckét is tanultam az élet más területeiről is, amit ezúton is köszönök!

Köszönöm korábbi társtémavezetőmnek, Dr. Sándor Baláznak is, hogy munkájával hozzájárult tudományos fejlődéseemhez. A kezdetekben a kutatások módszertanának elsajátításában nagy segítséget nyújtott Dr. Fülöp Balázs Dániel. Hálásan köszönöm a rengeteg segítséget Dr. Maász Gábor, Dr. Horváth Gábor, Dr. Karádi Zsófia Nozomi, Dr. Császár András, Dr. Rivnyák Ádám és Dr. Sparks Jason kutató-, és Ph.D. hallgatótársaimnak és TDK hallgatóimnak. Köszönöm az évek során együtt elvégzett kísérleteket, valamint hálás vagyok, hogy baráti szeretettel bíztattak munkásságom során.

Köszönöm a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, a trieri Center for Histology, Cytology and Molecular Diagnostics és a heidelbergi Institute of Pathology munkatársainak kutatásunkhoz nyújtott önzetlen segítségét.

Köszönettel tartozom a PACAP Munkacsoport minden tagjának, valamint az Anatómiai Intézet összes munkatársának, akik kezdetektől fogva segítették kutatásom előrehaladását. A laboratóriumi vizsgálatok tekintetében intézetünkben elsősorban Nagy Enikőnek, Dittrich Erzsébetnek, Gréczi Brigittának, Kiss Anikónak, Mercz Tündének és Godáné Brumán Beatrixnek tartozom hálával.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani Családomnak, Szüleimnek és Barátaimnak. Az ő támogatásuk, ösztönzésük és szeretetük nélkül nem jutottam volna el idáig. Köszönöm szépen!

A disszertáció megvalósításához a következő támogatók járultak hozzá:

TKP2021-EGA-16, OTKA K1049840, K119759, K129190, K135457, K115874; GINOP-2.3.2-15-2016-00050; PTE ÁOK Kutatási Alap pályázat KA-2017-15, KA-2019-30; Nemzeti Agykutatási Program: NAP-A-III/5. 2014-2017, NAP2017-1.2.1-NKP-2017-00002, NAP 3.0; TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001; Nemzeti Kiválóság Program; Új Nemzeti Kiválóság Program ösztöndíj UNKP-16-4-IV és 18-2; Bolyai János Kutatási Ösztöndíj; GINOP-2.3.2-15-2016-00050 "PEPSYS"; EFOP-3.6.3-VEKOP-16-15 2017-00008; EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009; EFOP 3.6.1-16.2016.00004; EFOP-3.6.2-16-2017-00008; FIKP II, FIKP III; HUN-REN TKI14016 PACAP Kutatócsoport; JSPS KAKENHI: JP26293020, JP17H03989, JP17K19488; the SRPBS and Brain/MINDS from AMED; 20765/3/2018/FEKUTSTRAT.