

**Doktori (PhD) Értekezés Tézise**

**Hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)  
jelátvitel vizsgálata ivarszervek patológiás folyamataiban**

**Dr. Szegeczki Vince**

**Témavezető: Dr. Juhász Tamás**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2025.**

## **Hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) jelátvitel vizsgálata ivarszervek patológiás folyamataiban**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudomány tudományágban

Írta: Dr. Szegezki Vince okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Juhász Tamás, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Fábán Eszter, PhD  
Dr. Lampé Rudolf, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Heinzlmann Andrea, PhD  
Dr. Krasznai Zoárd, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,  
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2025. szeptember 3; 13:00 óra.

## Összefoglalás

A PACAP egy olyan neuropeptid, amely a központi idegrendszeren kívül számos perifériás szövet élettani folyamatainál jelentőséggel bír, köztük a reprodukzív szervekben is. Bizonyos határértékig védi a szöveteket az oxidatív folyamatok károsító hatásától. E destruktív folyamatok a jelen dolgozatban tanulmányozott Alzheimer-kórban és az endometriosisban is szerepet játszanak a kórképek kialakulása során.

Kísérleteinknél célunk volt a PACAP nemi szervek működésében betöltött szerepéről szerzett tudást bővíteni. A kutatás három témarészből áll: a neuropeptid jelátvitelének vizsgálata Alzheimer-kórt modellező egerek heréiben, a műtétileg kinyerhető méhnyálkahártya molekuláris kísérletekbe való bevonása problémáinak ismertetése, valamint a PACAP által létrehozott mRNS expressziós változások feltárása humán endometrium és endometriosis mintákban.

A hím gonádokat PCR, Western blot, immunhisztokémiai és szövettani festési eljárásokkal tanulmányoztuk. A méhnyálkahártya minták alkalmasságát klinikai retrospektív vizsgálattal tártuk fel. Az eutopiás és ectopiás endometrioid szöveteket egy általunk kidolgozott szövettenyésztési módszer segítségével tartottuk fenn és kezeltük az RT-PCR vizsgálatok elvégzése előtt.

A PACAP jelátvitel a neurodegeneratív kórképben hasonló módon károsodik a herében, mint az agy esetében. A neuropeptid szignalizáció változásai hozzájárulhatnak a hím gonádban megfigyelhető mikroszkopikus eltérésekhez. A méhnyálkahártya-minták alap kutatásokban való alkalmazhatóságának esélyét fokozza egy általunk felállított, bevonási és kizárási feltételeken alapuló klinikai kritériumrendszer. Az endometrium és endometriosis mintákban ellentétes mRNS expressziós változások detektálhatók a PACAP női nemi hormonokkal együtt történő adagolása mellett.

A neuropeptid jelátvitelének tanulmányozása bizonyítékul szolgál arra, hogy Alzheimer-kórban az agytól eltérő szervben is vizsgálhatók a kórképben megfigyelhető szignalizációs eltérések. A PACAP adagolás által létrehozott változásokkal feltártuk, hogy alapvető különbségek lehetnek az ép és a kóros endometrioid szövetek molekuláris folyamatai között.

A különböző kórállapotok vizsgálatánál elengedhetetlen a megfelelő modell, illetve szövet kiválasztása.

## I. Bevezetés

### *I.1. A PACAP és jelátvitel, élettani és kóreltani hatásai*

A PACAP – azaz a hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polypeptid – egy olyan neuropeptid, amelyet először 1989-ben extraháltak birka hypothalamusból. A PACAP-ot több fajban (köztük emberben és egérben) is vizsgálták, illetve a központi idegrendszeren (KIR) kívül számos perifériás szövetben igazolták a jelenlétét. A neuropeptid a VIP-secretin-GHRH-glucagon szuperfamilia tagja. A biológiailag aktív izoformák közül kettő ismert: a PACAP38 és a PACAP27.

A neuropeptidet kötő receptorok közül hármat azonosítottak. Ezek a PAC1, a VPAC1 és a VPAC2 receptorok. A PACAP és VIP szekvenciális hasonlósága miatt mindhárom receptor képes a két peptid kötésére, azonban a PAC1R a PACAP-ot jóval nagyobb affinitással, specifikusan köti, míg a másik kettő receptor esetén a kötésaffinitás azonos. A PACAP-kötő receptorok döntő többségben transzmembrán Gs-proteinekhez kapcsolódnak, ritkábban azonban Gi/0 és Gq/11 proteinekhez is. A neuropeptid (Gs-protein kapcsolt) receptorhoz való kötődése hatására elinduló kanonikus jelátviteli kaskád a cAMP közvetítette szignalizáció. Az ily módon aktiválódó protein kináz A (PKA) több transzkripciós faktor (pl.: CREB) foszforilálásával, és így azok magi transzlokációjával számos gén expresszióját eredményezheti. A PACAP fokozhatja más receptorok (pl.: NMDA-receptor) és más jelátviteli utak aktivitását is (pl.: MAPK, köztük az ERK aktivitását). Továbbá, a neuropeptid számos szignalizációs utat befolyásol crosstalk mechanizmus segítségével. Ilyenek a BMP, a Notch, a Hedgehog és a TGFβ-jelátviteli utak.

A központi idegrendszerben a PACAP legnagyobb mennyiségben a hypothalamusban, míg a perifériás szövetek közül a legnagyobb mennyiségben a herében expresszálódik. A PACAP-kötő receptorok esetében az adott agyterület, illetve perifériás szövet expresszálhatja mindhárom féle receptort, de az is előfordul, hogy csak kettőt vagy egyet. Több publikáció összevetéséből megállapítható, hogy a neuropeptid elsősorban idegsejtek, simaizmok, valamint endokrin és exokrin mirigyek működésében bír jelentőséggel, azonban egyéb hámeredetű szövetek (pl.: gonádok és vese), és egyéb mesenchymális eredetű szövetek (pl.: porc-, és csontszövet) élettani folyamataira is hatással van. A PACAP fiziológiai szerepére a szövetekhez adagolt neuropeptid hatásaiból, a különböző kórfolyamatokban megfigyelt jelátviteli változásaiból, valamint a hiányából (PACAP-KO és PACAP-receptor KO modellek) lehet következtetni. A PACAP szövetekben betöltött általános jelentősége a sejtvédelem (cytoprotectio), azaz a szöveteket károsító folyamatok ellenében hat. Ezt az antiapoptotikus,

anti-inflammatórikus és antioxidáns tulajdonságának köszönheti. A különböző publikációk tanulmányozásából feltételezhető, hogy a neuropeptid szerepe azokban az élettani és kóros folyamatokban jelentős, ahol a fokozottabb anyagcsere miatt megnövekednek a szöveteket érő stresszhatások (pl.: fokozottabb oxidatív stressz). Fontos megemlíteni továbbá, hogy az életkor előrehaladtával csökken a neuropeptid mennyisége a szervezetben, így az öregedés folyamataiban a PACAP is részt vesz.

Tekintettel arra, hogy a több ezer PACAP kutatást felölelő publikáció ismeretanyaga meghaladja jelen dolgozat kereteit, a teljesség igénye nélkül, felsorolás szintjén említjük azokat a szerveket, amelyekben szerepét leírták. Ezek a központi idegrendszer számos területe, az érzékszervek (a szem, a belső fül), a hormontermelő szövetek (pl.: agyalapi mirigy, pajzsmirigy, hasnyálmirigy), a gyomor-bélhuzal külső elválasztású mirigyei és simaizomzata, a parenchymás szervek (szív, tüdők, vesék és máj), valamint a vázrendszer (csontok és porcok) és a reproduktív traktus. Utóbbi működésében a neuropeptid szerepe nélkülözhetetlen. A PACAP-ot a here szinte minden sejt típusa expresszálja, még a hímivarsejtek acrosomájában is kimutatható. A neuropeptid esszenciális a hím gonád embrionális és pubertáskori fejlődése során, a Sertoli- és Leydig-sejteken hatva, valamint az FSH és LH felszabadítása révén közvetlenül és közvetetten is részt vesz a hímivarsejtképzés (spermatogenezis) folyamataiban, továbbá segít fenntartani a vér-here barrier intakt állapotát. A PACAP hiánya nem csökkenti kóros mértékben a fertilitást, ugyanakkor sérül a spermatogenezis folyamata, a vér-here gát károsodik, illetve morfológiai anomáliák figyelhetők meg a spermiumok alakjában is. A neuropeptid szerepét leírták továbbá különböző kórfolyamatokban is. Példaként említhetők a neurodegeneratív kórképek (pl.: Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór és amyotropiás lateralsclerosis), a migrén, a glaucoma, a diabetogén és hypertoniás retinopathiák, a szívelégtelenség, illetve az allergiás asthma.

## ***1.2. A kutatás során vizsgált szövetek: a here***

A here az állatvilágban a hím egyedek hímivarsejt-képzéséért és androgén hormonok felszabadításáért felelős páros szerv. Előbbi a reprodukciós képességet, utóbbi a szexuális magatartás fenntartását, a spermiumok képzését, illetve bizonyos fajoknál (köztük az embernél) a másodlagos nemi jellegek kialakítását biztosítja.

A herét kétféle sejt típus építi fel: a csírasejtek és a támogató somaticus sejtek. Előbbihez tartoznak a spermatogoniumok, utóbbihoz a dajkasejtek (Sertoli-sejtek), az interstitialis sejtek (Leydig-sejtek), a peritubularis sejtek (myoid sejtek) és az ellátó képletek sejtjei (pl.: az erek endothel sejtjei).

A hím gonád szövettani állományát a herecsatornácskák és az interstitium adja. Utóbbi a tubulusok közötti teret tölti ki. A herecsatornácskák vázát az epithelialis sejtek által termelt lamina basalis adja. Ennek a rétegnek a fő fehérjekomponense a IV-es típusú kollagén. A lamina basalisra nyugszanak a Sertoli-sejtek és a spermatogonium sejtek. Az egymással szomszédos Sertoli-sejtek közti távolságot azok oldalnyúlványai hidalják át. Ezek között tight junction segítségével szoros kapcsolókomplexusok jönnek létre. Emiatt a herecsatornácskákban belül két kompartment alakul ki: a lamina basalisra közelebbi basalis, illetve a tubulus lumenéhez közelebbi adluminaris rekeszek. Előbbiben a spermatogonia foglal helyet, utóbbiban a spermatocyták és a spermatidák. A here interstitiuma két alegységre osztható: a peritubularis és az intertubularis régiókra. Előbbiben foglalnak helyet a simaizom tulajdonságokkal bíró, összehúzódásra képes peritubularis sejtek, amelyek közös, perisztaltikus összehúzódásai segítik a tubularis folyadékban elhelyezkedő hímvarsejteket a mellékhere csatornája felé terelni. Az intertubularis részben pedig a Leydig-sejtek foglalnak helyet. A reprodukció szempontjából fontos hímvarsejtképzés folyamata a spermatogenezis, melynek során a diploid DNS állományú spermatogoniából haploid spermiumok keletkeznek.

A spermatocyták, a spermatidák és a hímvarsejtek DNS állománya lényegében eltér a testi sejtek DNS összetételétől. Emiatt az immunrendszer megtámadná ezeket a sejtfeleségeket. Ennek elkerülése érdekében fejlődött ki a vér-here gát (vagy vér-here barrier), amely lehetetlenné teszi a fehérvérsejtek és számos károsító anyag átjutását a basalis kompartmentből az adluminaris térbe, így megelőzve a reprodukciót fenyegető immunreakció kialakulását.

### ***1.3. A kutatás során vizsgált szövetek: a humán endometrium***

Az endometrium a méh (uterus) nyálkahártyája, amely a zsigeri szerv legbelső rétegét alkotja. E szövet felel a megtermékenyítést követően az embrió befogadásáért, illetve táplálásáért, közeget teremt annak beágyazódásához, valamint a méhlepény kialakulását követően vérárama segítségével biztosítja az anyagcserét a magzat és az anya szervezete között.

A méhnyálkahártya a reprodukív életkorban – mikroszkopikus szerkezetét tekintve – egy dinamikusan változó szövet: a menstruációs ciklusban követi a hormonális változásokat. Ennek köszönhetően három fáziskép azonosítható a humán endometrium esetében: menstruációs, proliferációs és szekréciós fázisképek. Utóbbi kettő esetében két szövettani réteg definiálható, amelyek strukturálisan és funkcionálisan is különböznek egymástól: a méh simaizomrétegéhez (myometrium) kapcsolódó bazális réteg (stratum basale), és az ezzel összefüggő, méh lumenéhez közelebb lévő funkcionális réteg (stratum functionale). A megtermékenyítés és az embrió beágyazódásának hiányában a női nemi ciklus során a

funkcionális réteg degradálódik és vérzés kíséretében leöklődik a megmaradó bazális rétegről, majd kiürül a méh üregéből a hüvelyen (vagina) át a külvilágba. Ez a folyamat a menstruáció, amely a méhlepényes emlősök között egy egyedülálló folyamat. Néhány állatfaj (pl.: főemlősök) kivételével egyik emlősben sem figyelhető meg. A legtöbb méhlepényes faj endometriuma ugyanis menstruációs ciklus helyett az ún. oestrus ciklus változásait követi.

Első megtekintésre a humán endometrium két fő egységből áll: endometrialis mirigyekből és egy sejtdús, gazdag extracelluláris állományt tartalmazó endometrialis stromából. A méh lumene felé az endometriumot egy egyrétegű hámréteg, az endometrialis epithelium borítja, a mirigyek ennek stromába való lefűződéseinek tekinthetők. A méhnyálkahártyát (a belek nyálkahártyájával ellentétben) a méh simaizomzatától nem választja el a submucosa, a két réteg egy szabálytalan, hullámos vonal mentén kapcsolódik egymással: ez az endo-myometrialis junctio.

A méhnyálkahártyában többféle sejttípus található, amelyek egy komplex szöveti miliót hoznak létre. Az epithelialis háms sejteken, a mirigyháms sejteken és a stromalis sejteken kívül számos őssejt és terminálisan differenciálódott sejt vesz részt az endometrium felépítésében.

A menstruációs ciklust a hypothalamus-hypophysis-gonadalis tengely finomhangolt hormontermelése szabályozza. Végeredményben, a petefészekben (ovarium) felszabaduló hormonok szabályozzák az endometrium változásait. Így a menstruációs ciklus fogalma az ovarialis és endometrialis ciklusokat foglalja magába. Az ovarialis ciklus három fő fázisból áll: folliculáris (kb. 11 nap), ovulációs (kb. 5 nap) és luteális (kb. 12 nap) fázisok. A petefészek által termelt két fő hormon az ösztrogén és a progeszteron (P4). Az ösztrogén ösztron (E1), ösztradiol (E2), ösztriol (E3) és ösztetrol (E4) hormonok keveréke, amelyek közül a legnagyobb élettani jelentősége az ösztradiolnak van. Az E2 termelődése a petefészek aromatáz-enzim aktivitásának köszönhető, amely a gonádban termelődő androgén hormonokat női nemi hormonokká alakítja az androgén szteránvázis molekulák aromatizálásával.

A menstruációs ciklus első napját az endometrialis ciklus menstruációs vérzés első napjától számítjuk. Az endometrialis ciklus három fázisból áll: menstruációs, proliferációs és szekréción fázisokból. A szekréción fázis utolsó napjaiban a stromasejtek decidualizációja kezdetét veszi, pre-deciduasejtek képződnek. Az endometrium mirigyszerkezetének morfológiája a legjobban a szekréción fázisban érhető meg. Újabb kutatások feltárták, hogy a humán (és a valószínűleg a menstruáló fajok) endometrium szerkezete teljesen eltér a többi méhlepényes emlősétől. A stratum basaleban ugyanis vakon végződő mirigyvégkamrák helyett

rizómához (bizonyos növények egymással kapcsolódó gyökérhajtásai) hasonló, egymással összefüggésben levő, hálózatos szerkezetű mirigyrendszer található.

A szekréciónak végén, amennyiben a megtermékenyítés és az embrió beágyazódása nem történik meg, a mai napig nem teljesen tisztázott folyamatok (főként a progeszteron szérumszint csökkenése) miatt bekövetkezik a funkcionális réteg leválása. Így elkezdődik a menstruáció, és újraindul a menstruációs ciklus.

Egy egészséges nő reproduktív életszakasza során nagyjából 400 alkalommal menstruál. Az első menstruációt menarchénak nevezzük. A reproduktív életszakasz végén, az utolsó mensesst követően, amennyiben 12 hónapon belül nincs vérzés, megjelölhetjük a menopausa időpontját.

#### ***1.4. A kutatás során vizsgált betegségek: az Alzheimer-kór***

Az Alzheimer-kór a leggyakoribb a kognitív zavarokat és demenciát okozó betegségek közül az időskori (65 év feletti) populációban. Egy lassan progrediáló neurodegeneratív kórállapot, amelyet a különféle kóros szerkezetű, illetve kórosan halmozódó fehérjék jelenléte és az idegsejtkárosodás jellemez, elsősorban az agyvelőben.

A halál utáni (postmortem) vizsgálatok makroszkóposan, mikroszkóposan és molekuláris vizsgálatokkal igazolható elváltozásokat is kimutattak az Alzheimer-kór patogenezisének hátterében, ezek állandó gyulladásszerű folyamatokat tartanak fenn, amelyek toxicitást és oxidatív stresszhatást eredményeznek a központi idegrendszerben. Mindez a neuronok degenerációjához, illetve elhalásához vezet.

Az Alzheimer-kór oka a mai napig ismeretlen. Az évek során különböző elméletek (pl.: cholinerg hipotézis, amyloid hipotézis, mitokondriális kaszkád elmélet) születtek a betegség kialakulására. A rizikótényezők közt említhetők genetikai okok, nemi (hormonális) különbségek, a gyomor-bélrendszer mikrobiom egyensúlyának felborulása, bizonyos kórokozók által okozott fertőzések, cardiovascularis kórfolyamatok (pl.: obesitás, diabetes, hipertónia és atherosclerosis okozta érkárosodások), a mozgásszegény életmód, különböző étkezési szokások, bizonyos fémek okozta toxicitás és az öregedés.

Mivel az Alzheimer-kór a demenciák egyik típusa, ezért tüneteinek közé tartoznak a demencia tüneteinek, amelyek klinikai megnyilvánulása három pilléren alapszik: a neuropszichológiai (kognitív) és a neuropszichiátriai (nem kognitív) tüneteken, valamint a mindennapi tevékenységek elvégzésének változásain.

Megemlítendő, hogy állatkísérletek bizonyítják, az Alzheimer-kórban az agyvelőn kívül egyéb szervek is érintettek lehetnek. Ilyen a szív, a máj és a vesék, amelyekben szintén

képződhetnek kóros fehérjék. A perifériás szövetek tüneti manifesztációit azonban eddig kevésbé kutatták.

Az Alzheimer-kór napjainkig is gyógyíthatatlan betegség. A jelenlegi kezelési lehetőségekkel kizárólag a kórkép progressziója lassítható, valamint a különböző tünetek mérséklése lehetséges. Az aktív fizikai mozgás bizonyítottan jótékony hatású. A kórkép patogenezisében résztvevő molekuláris folyamatokat alapul véve, a gyógyszeres kezelési lehetőségeket igyekeztek és igyekeznek kifejleszteni.

### ***1.5. A kutatás során vizsgált betegségek: az endometriosis***

Az endometriosis a méh üregén kívül a szervezeten belül bárhol megtalálható endometrium, amely szöveti felépítésében valóban hasonlít a méhnyálkahártyához (az angol terminológia megfogalmazásában „endometrial-like tissue”, azaz endometrium-szerű szövet).

Az endometriosis leggyakoribb lokalizációi a testen belül a petefészkek (ovarium), a kismedencei hashártya (peritoneum) és az infraperitoneális kötőszövetes tér (főként a septum rectovaginale, a hüvely és a végbél közti kötőszövetes tér. Ennek alapján három fő típusa különböztethető meg: ovarialis (endometrioma, OMA), felszínes peritonealis (superficial peritoneal endometriosis, SPE) és mélyen infiltráló endometriosis (deep infiltrating endometriosis, DIE). Az említett lokalizációkon kívül az ectopiás szövet egyéb testterületeken is jelen lehet.

Az endometriosis kórereditének oka ismeretlen, kialakulására azonban számos elmélet született. Ezek közül a mai napig legelfogadottabb a Sampson-féle retrográd menstruációs teória. Emellett említést érdemelnek a coeloma metaplasia, az embrionális maradvány(sejt) (embryonic rest) és a transzplantációs (lymphovascularis metastasis) elméletek. A legújabb kutatások az endometriosis kialakulását az őssejt teóriával (stem cell theory) magyarázzák, amely szerint az endometrium regenerációjához szükséges őssejtek, illetve a csontvelő őssejtek migrációs, proliferációs és inváziós kapacitása ismeretlen ok(ok) miatt megnövekszik, így azok ectopiás helyre vándorolnak és ott telepeket képeznek. Az irodalom sok „őssejt transzkripció faktor” megnövekedett expresszióját írja le, amelyek az említett változásokért felelnek. A leggyakrabban vizsgált transzkripció faktorok az Oct4, a Nanog és a Sox2, amelyek a sejtek pluripotencia kapacitásának fenntartásáért felelősek. Az említett faktorok a TGF $\beta$ -jelátvitel aktiválódására expresszálódnak, a TGF $\beta$ -1 fokozott jelenlétének szerepét az ectopiás szövet képződésénél igazolták.

Az endometriosis kialakulása oki hátterében feltételeznek kóros immunfolyamatokat, genetikai eltéréseket, környezeti hatásokat, sőt, az endometrium bakteriális mikroflórájának megváltozását is. Az endometriosis egy krónikus gyulladással fenntartó kór állapot.

Az endometriosis ösztrogénfüggő szövet, amely az eutopiás méhnyálkahártyához hasonlóan követheti a női nemi ciklus hormonális változásait. Így a menstruáció alatt leválhat és vérezhet. Tünetek lehetnek a menstruáció során jelentkező kifejezett fájdalom (dysmenorrhoea), a peritonealis összenövések és a idült gyulladás miatt a krónikus kismencedei fájdalom (chronic pelvic pain), valamint a fájdalmas nemi együttlét (dyspareunia). További tünetek lehetnek a belek érintettsége esetén motilitási zavarok, vérszékelés (haematochesia) és fájdalmas székelés (dyschesia), a húgyhólyag érintettsége esetén hólyagürítési zavarok, fájdalmas vizeletürítés (dysuria) és vérvizelés (haematuria). Az endometriosis jelenlétére gyakran a meddőség kivizsgálása során derül fény, az infertilitás gyakori oka.

A kórkép diagnosztizálása általában több lépésben történik, amelyek között non-invazív és invazív eljárások egyaránt rendelkezésre állnak. Az ectopiás endometrium szöveti felépítése hasonló, mint az eutopiás nyálkahártyáé: endometrialis mirigy és endometrialis stroma sejtek alkotják. A testből ki nem üríthető, felgyülemelő vért a szöveti macrophagok igyekeznek eltávolítani, így haemosiderin pigmenteket halmoznak fel. Az eltávolított ectopiás szövetben az endometrialis mirigyek, az endometrialis stroma sejtek és a haemosiderin tartalmú macrophagok közül kettő jelenléte igazolja a kórképet, illetve megerősíti az endometriosis diagnózisát. Napjaink kutatásai alátámasztják, hogy az endometrioid laesiókban a mirigyek és stroma mellett a méhüri nyálkahártya regenerációját biztosító őssejtek is jelen vannak (eEPs, eMSCs, SP és BMDCs), amelyek lehetővé teszik az ectopiás szövet proliferációját.

Az endometriosis kezelése a mai napig sem megoldott kérdés. Nincs egyöntetű protokoll a kór állapottal kapcsolatos problémák megoldására, csupán terápiás lehetőségek és terápiás (protokoll) ajánlások. A kezeléseknél két fő célja lehet: az ectopiás szövet eliminációja és az általa okozott szövődmények megszüntetése, megoldása, illetve mérséklése. A terápia módja több dologtól függ, köztük a tünetektől (pl.: infertilitás, fájdalom), valamint a laesio helyétől és kiterjedésétől. A kezelési módszerek között vannak konzervatív és operatív lehetőségek is, amelyek egymással kombinálhatók. Lényegében az összes három fő irányelvet képvisel: a termékenység megőrzését és fenntartását, a fájdalomcsillapítást és az ectopiás laesio eliminációját, illetve kiújulásának megelőzését. Fontos az is, hogy az endometriosis sokszínűsége miatt a terápia egyénre tervezett legyen.

## II. Célkitűzés

Jelen dolgozat kutatási munkája során céлом volt a PACAP ivarszervek patológiás folyamataiban betöltött szerepének felderítése. A kísérletek alatt Alzheimer-kórt modellező egerek heréit, illetve az endometriosis jelátvitelét vizsgáltam. A kutatást három részre osztottam, és a dolgozatban a kísérletek során felhasznált anyagokat és módszereket, valamint a kapott eredményeket is e szerint a felosztás szerint ismertetem.

Az első kutatásrészben céлом volt annak feltárása, vajon megfigyelhetők-e elváltozások az Alzheimer-kórt modellező egerek heréiben, és ha igen, szerepet kap-e ebben a neurodegeneratív betegségben sérülő PACAP-jelátvitel. Kíváncsi voltam továbbá arra, hogy a kórképben ismerten hasznos fizikai aktivitás képes-e befolyásolni az esetlegesen észlelt eltéréseket.

Az endometriosis tanulmányozása során szükséges azt összehasonlítani egy hozzá hasonló kontroll szövettel, a humán endometriummal. A fiziológias nyálkahártya kinyerése és kísérletes felhasználása komoly nehézségekbe ütközik. A második kutatásrészben ezért céлом volt annak feltárása, hogy a műtéti eljárásokkal nyerhető endometrium minták mekkora hányada alkalmas molekuláris kísérletekbe való bevonásra, illetve az endometriosisal való összehasonlításra.

Ennek meghatározása után pedig a harmadik kutatásrész során céлом volt feltárni azt, hogy az endometriotikus szövetekben expresszálódnak-e a PACAP, valamint a neuropeptidet kötő receptorok. Emellett céлом volt annak felderítése is, hogy a PACAP adagolás befolyásolja-e az endometriosis kialakulása során megfigyelhető molekuláris elváltozásokat, kiemelten a TGF $\beta$ -jelátvitel eltéréseit.

### **III. Anyagok és módszerek**

#### **III.1. Az első kutatásrész során alkalmazott anyagok és módszerek**

##### ***III.1.1. A kutatásban alkalmazott állatok***

A kutatás során Alzheimer-transzgenikus (B6C3-Tg(APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>dE9</sup>)85Dbo/J) és transzgenikusan nem módosított vad típusú hímivarú egereket hasonlítottunk össze. Az egyedek három kísérleti csoportba oszthatók: transzgenikusan nem módosított és aktív testmozgást nem végző egerek (WT), Alzheimer-transzgenikus és aktív testmozgást nem végző egerek (AD), illetve Alzheimer-transzgenikus, aktív testmozgást végző egerek (TAD). Minden kísérleti csoportban 5-5 egyed vett részt.

##### ***III.1.2. A szövetek HE festése és elemzése***

A kutatásban résztvevő egereket 3 hónapos korukban terminálták. Egy állatból eltávolított mindkét herét horizontális síkban elfeleztük. A mintát fixálást, paraffinálást és beágyazást követően az átvágott felszínnel párhuzamosan metszettük le szilanizált tárgylemezre. Ezt követően, a metszeteket hematoxilín-eozin (HE, Sigma-Aldrich, MO, USA) szövettani festési eljárással megfestettük. A gonádokban a kanyarulat csatornák membrana basalis vastagságát mértük, valamint három sejttípust (spermatogonium, spermatocytá és spermatozoa), továbbá az interstitium Leydig-sejtjeit számláltuk meg. A membrana basalis vastagságának leméréséhez ImageJ 1.40 g freeware programot használtunk. A szoftver segítségével a membrana basalis hossz tengelyére merőleges vonalakat rajzoltunk. Ezek pixelszámát lemérve, az eredményeket mikrométer értékekre konvertáltuk. A különböző sejtek meghatározása mikroszkópos morfológiai jellegzetességeik azonosítása alapján történt. A sejtek számlálását 10×-es nagyítás mellett 3 kutató egymástól függetlenül végezte el 10 kanyarulat csatornán, 5 különálló látótérben.

##### ***III.1.3. Konvencionális RT-PCR***

Egy állatból az elfelezett gonádokból egy felet konvencionális RT-PCR segítségével vizsgáltunk. A mintát mechanikai zúzás után TRIzol reagens (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével oldottuk fel, majd a gyártó RNS izolálási protokollját alkalmazva, 30 perc 4°C-os inkubációs időt követően az izolált totál RNS-t nukleázmentes vízben oldottuk fel. Az összes minta azonos RNS koncentrációra történő hígítását követően, a reverz transzkripciót High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük el. A kutatás során a következő molekulák mRNS expresszióját

vizsgáltuk: PAC1R, VPAC1R, VPAC2R, PKA, Sox9, Sox10, PP2A, IV-es típusú kollagén, IX-es típusú kollagén és testatin. Háztartási génként az aktin bizonyult a legstabilabbnak.

A különböző gének primerjeit PrimerBlast freeware program alkalmazásával terveztük, melyet az IDT (Integrated DNA Technologies, Interleuvenlaan, Belgium) gyártott le. A vizsgált gének amplifikációját Thermal Cycler (Labnet MultiGene™ 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet International, Edison, NJ, USA) segítségével kivitelezte. A PCR termékek futtatása 1.2%-os, etídium-bromid tartalmú agaróz-gélen történt. Ezt követően a gél sávjait FluorChem E géldokumentációs rendszer (FluorChem E, ProteinSimple, CA, USA) segítségével UV fény alkalmazásával fotó dokumentáltuk. A PCR termékek megfelelő sávjainak integrált denzitásértékét ImageJ 1.40 g freeware program segítségével határoztuk meg. Minden gén integrált denzitásértékét a saját háztartási gén integrált denzitásértékére normáltunk, majd ezt követte a statisztikai kiértékelés.

#### ***III.1.4. Western blot***

Egy állatból az elfelezett gonádokból egy felet Western blot segítségével vizsgáltunk. Egy mintát mechanikai zúzást követően 100 µL proteáz-gátló tartalmú RIPA puffer oldatban homogenizáltunk. A szuszpenziót 30 másodpercig 40 A pulzációval szonikáltuk (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, IL, USA). A minták fehérjekoncentrációját BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg. Az abszorbancia reakción alapuló koncentráció-meghatározás során ismert standard koncentrációjú BSA hígítási sor abszorbancia-görbéjéhez viszonyítottuk a minták abszorbancia értékét. Az abszorbanciaértékeket 570 nm-es hullámhosszon Hidex microplate reader (Hidex, Turku, Finland) segítségével detektáltuk. Ezt követően, a fehérjesuszpenziók denaturálását és az egységes fehérjekoncentráció elérését 1×-es Laemmli puffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) hozzáadásával értük el. Egy minta fehérjéinek tömeg szerinti szeparálását 7,5%-os SDS-poliakrilamid gélen való futtatással végeztük el. Ezt követően az elektroforetikus fehérjetranszfer nitrocellulóz membránra történt. A kutatás során a következő molekulák fehérjeexpresszióját vizsgáltuk: PAC1R, VPAC1R, VPAC2R, PKA, Sox9, P-Sox9, Sox10, PP2A, IV-es típusú kollagén, IX-es típusú kollagén és testatin. Belső kontrollként az aktin fehérjeexpresszióját detektáltuk.

A nitrocellulóz membrán fehérjesávjait kemilumineszcens kit (Advansta Inc; CA, USA) alkalmazásával, a gyártó ajánlásának megfelelően, FluorChem E géldokumentációs rendszer (FluorChem E, ProteinSimple, CA, USA) segítségével fotó dokumentáltuk. A vizsgált fehérjék megfelelő kDa tömegű sávjainak integrált denzitásértékét ImageJ 1.40 g freeware program

segítségével határoztuk meg. Minden fehérje integrált denzitásértékét a saját belső kontroll (aktin) integrált denzitásértékére normáltunk, majd ezt követte a statisztikai kiértékelés.

### ***III.1.5. Immunhisztokémiai festés***

A kutatás során a következő molekulákat detektáltuk: P-Sox9 és IV-es típusú kollagén. A herékből készített metszeteket deparaffinálást, valamint leszálló alkoholsorral és PBS oldatokkal történő hidrálást követően előkészítettük a festési eljárásra. A preparátumok nem specifikus kötőhelyeit 1%-os BSA (Amresco, OH, USA) tartalmú PBS oldattal blokkoltuk. PBST oldatos mosást követően a mindenkori vizsgált molekula ellen termeltetett primer antitest bekötődési reakciója egy éjszakán át zajlott. A fluoreszcens festékekkel jelölt szekunder antitestek (Alexa Fluor™ antibody, Life Technologies Corporation-Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) bekötődési reakciója sötétkamrában, szobahőmérsékleten zajlott. Az antitestek hígításának aránya PBST oldatban 1:1000 volt. Ezt követően a preparátumok fedését DAPI-tartalmú Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Peterborough, England) fedőanyaggal végeztük. Az immunfluoreszcens metszetek fotódokumentálása DP74 kamerával ellátott Olympus Bx53 mikroszkóppal (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) történt cellSense Entry 1.5 szoftver (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) használatával.

### ***III.1.6. Statisztikai analízis***

Jelen kutatásban a három vizsgált csoportból (WT, AD és TAD) nyert eredményeket hasonlítottuk össze. Egy csoportban 5-5 egyedet vizsgáltunk. Az AD csoport eredményeit a WT csoport, a TAD eredményeit pedig az AD csoport eredményeivel hasonlítottuk össze. A PCR és a WB kísérletekben minden denzitásértéket a háztartási gén, illetve a háztartási fehérje (mindkét esetben az aktin bizonyult a legstabilabbnak) denzitásértékére normáltunk. A vizsgált csoportjok kontrolljához viszonyított szignifikáns eltéréseit kétmintás t-próba alkalmazásával mutattuk ki. A szignifikancia küszöbértékét  $p < 0,05$  értékben határoztuk meg. A vizsgált csoportoknál a kontroll csoportjához viszonyítás mértékét 0,0-1,0 értékben adtuk meg.

## **III.2. A második kutatásrész során alkalmazott anyagok és módszerek**

### ***III.2.1. A klinikai adatok gyűjtése***

A klinikai adatok gyűjtése a Debreceni Egyetem Egészségügyi Finanszírozási és Kontrolling Igazgatóság Betegdokumentációs Osztály által biztosított lista alapján a DE KK E-MedSolution rendszeréből történt. Az általunk kért lista a 2017 januárja és 2020 márciusa között DE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról DE KK Patológia Intézetbe

„Szabálytalan havivérzés k.m.n.” (N9260) BNO kóddal feladott műtéti minták, illetve az operált betegek adatait tartalmazták. Összesen 1162 eset zárójelentését és az eltávolított minták kórszövetteni leletét tanulmányoztuk át. Minden esetben egy táblázatban rögzítettük a következő adatokat: a beteg életkora, az elvégzett műtét típusa, a műtét indikációja, a minta kórszövetteni diagnózisa, illetve volt-e a páciens kórelőzményében endometriosis vagy adenomyosis.

### ***III.2.2. A kórszövetteni diagnózisok csoportosítása***

Az összes eltávolított méhnyálkahártya minta esetében 21 féle kórszövetteni diagnózis került leírásra. Patológus kolléga javaslatára, annak céljából, hogy áttekinthetőbb legyen az eredmények értékelése, a hasonló tulajdonsággal bíró kórszövetteni diagnózisokat nagyobb csoportokba soroltuk. Ezzel a módszerrel 10 kórszövetteni csoport számadatait tudtuk áttekinteni és mindezekből következtetéseket levonni. Az említett csoportok a következők voltak: proliferációs fázisképű endometrium, szekréciós fázisképű endometrium, menstruációs fázisképű endometrium, exogén hormonhatás jeleit mutató endometrium, menopauzális endometrium, további kórszövetteni elemzésre alkalmatlan endometrium, endometrium polypus, endometrium hyperplasia, malignus tumor és endometritis.

### ***III.2.3. A klinikai és a kórszövetteni kizárási és beválogatási kritériumok***

Az operáció során egy betegből eltávolított szövet kórszövetteni diagnózisa ismeretlen a műtét időpontjában. Ahhoz, hogy növeljük annak esélyét, hogy egy alap kutatásokat (molekuláris kutatásokat) végző laboratóriumba egészséges méhnyálkahártya szövet érkezzon, célszerű klinikai szempontok alapján kizárási és beválogatási kritériumokat alkalmaznunk.

Minden olyan körülmény kizárandó tényezőt jelent, amely az endometrium kóros állapotára utalhat. Ennek figyelembevételével kizárásra kerültek azok az esetek, ahol az operált beteg 45 évnél idősebb volt, illetve ahol a preoperatív vizsgálatok az endometrium kóros állapotát bizonyították, vagy annak gyanúja merült fel. Kizárásra kerültek továbbá azok az esetek, ahol a méhnyálkahártya kinyerése csupán kiegészítő része volt egy nőgyógyászati műtétnek, valamint ahol a beteg kórelőzményében a méhnyálkahártya igazolt elváltozása, illetve endometriosis szerepel. Mindezek mellett kizárásra kerültek olyan kórállapotok, amelyek megváltoztathatják, illetve befolyásolhatják az endometrium élettani folyamatait.

A felsorolt kizárási kritériumokat figyelembe véve, klinikai szempontok alapján molekuláris vizsgálatra való bevonásra kerültek a következő esetek (beválogatási kritériumok): ahol az operált beteg 45 évnél fiatalabb volt, valamint a nőgyógyászati műtét kizárólag az

endometrium méhüregből való kinyerését célozta. Ezek a műtétek a méhnyálkahártya kaparás (D&C: curettage, fractionált curettage, abrasio, fractionált abrasio), illetve a méhnyálkahártya biopsziás (HSC: HSC + endometrium biopszia és TCRE) műtétek voltak. Beválogatásra kerültek továbbá azok az esetek, ahol a műtét javallata vérzészavar miatt történt (pl.: elhúzódó, bő hüvelyi vérzés, irreguláris menzesz).

A minta kórszövettani diagnózisa csak a minta patológiai vizsgálata után válik ismertté. Retrospektív vizsgálattal így csak az egészséges szövetek kerülhetnek alapkutató vizsgálatra való bevonásra. Ennek alapján kórszövettani beválogatási kritériumot jelentett a proliferációs és a szekréciós fázisképet mutató endometrium.

#### ***III.2.4. Matematikai analízis***

A korábban említett 10 vizsgálati csoport eseteinek számadatait százalékos értékre konvertáltuk, hogy az eredmények és azok kiértékelése átláthatóbbá váljon.

### **III.3. A harmadik kutatásrész során alkalmazott anyagok és módszerek**

#### ***III.3.1. A szövettenyésztési eljárás***

A kutatást a DE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársaival kollaborációban végeztük, akik kétféle mintát biztosítottak számunkra: ovarialis endometrioid cysta fal részletet (ectopiás endometrium minta), illetve HSC műtét során méhüregből nyert méhnyálkahártya szövetet (eutopiás endometrium minta). Mindkét típusú mintát csak az alábbi esetekben fogadtuk be: az operált betegek életkora 18 és 45 év közé esett, a pácienseknek nem volt krónikusan kezelt társbetegsége, illetve nem alkalmaztak krónikusan gyógyszereket. A műtét során eltávolított szöveteket átszállításig steril fiziológiás sóoldatban tárolták. Minden minta esetében tájékoztatást kértünk az operált beteg életkoráról (születési dátum), az utolsó rendes menstruációjának 1. napjáról (URM-1.) és a küldött minta típusáról.

Mind az eutopiás, mind az ectopiás minták esetében a kutatás során 5 kezelési csoportot alakítottunk ki. A kontroll csoporton kívül, a mintákat női nemi hormonokkal, vagyis ösztrogén (E2) és progeszteron (P4) oldatokkal, PACAP oldattal, valamint hormonokkal és PACAP-pal együttesen kezeltünk. Továbbá egy etanolos kontroll csoport kialakítása is szükséges volt, mivel a progeszteront abszolút etanolban oldottuk fel. A műtét napján beérkezett mintát ennek megfelelően 5 egyenlő részre osztottuk, a szövetdarabokat 60×15 mm-es sejtkultúra tenyésztésére alkalmas petri csészékben (Eppendorf, New York, NY, USA) helyeztük el. A felosztott szövetdarabok tenyésztő csésze felületéhez való tapadása érdekében a petri csészék

aljára 15 µL matrigel cseppet (Cultrex® BME, Type 2) oszlattunk el. Tenyésztő médiumként 4,5 g/l glükózkoncentrációjú DMEM (HG-DMEM) oldatot (Lonza, Bend, OR, USA) használtunk, melyet a kezelés időtartama alatt minden nap cseréltünk. Az URM-1. ismeretében a kezelés időtartama a menstruációs ciklus 24. napjáig tartott. A minták aktuális ciklusállapotát (azaz amelyik ciklusnapon a szövet eltávolítása megtörtént) szintén az URM-1. ismeretében számoltuk ki.

A hormonokkal kezelt csoportok esetében célunk volt *in vitro* körülmények között imitálni a menstruációs ciklus során *in vivo* megfigyelhető hormonális változásokat. Ennek elérésére célunk volt továbbá, hogy a tenyésztő médiumban a hormonok végkoncentrációja megegyezzen a szérumban mérhető hormonkoncentrációkkal. Emiatt négyféle hormonoldatot készítettünk az ovarialis ciklus eltérő hormonállapotainak megfelelően. A hormonoldatok végkoncentrációja a médiumhoz való adagolást követően megegyezett a korai follikuláris fázisban, a follikuláris fázisban, az ovulációs fázisban és a luteális fázisban mérhető szérumban határérték koncentrációk átlagával.

A hormonkezelt csoportok esetében a kezelést a minta mindenkori ciklusállapotának megfelelő koncentrációjú E2 és P4 oldatokkal kezdtük el. A kezelések előrehaladtával, amikor a minta egy új ciklusállapotú napot ért el, az adott ciklusstátusznak megfelelő hormonkoncentrációjú oldatokkal folytattuk tovább a kezelést.

A PACAP-kezelt csoportok esetében PACAP 1-38 oldatot használtunk. Korábbi szövettenyésztési tapasztalatokból kiindulva a PACAP médiumban mérhető végkoncentrációját 1 ng/ml-ben határoztuk meg. Jelen kutatásban 6 db ectopiás mintát és 3 db eutopiás mintát használtunk fel.

### ***III.3.2. A szövetek HE festése és kórszövettani elemzése***

Jelen kutatás alapfeltétele volt, hogy az ectopiás minták esetében kórszövettani vizsgálattal igazoljuk az endometriosiszt, illetve eutopiás minták esetében kizárólag patológiamentes méhüri endometriumot (azaz proliferációs vagy szekrécios fázisképű) vizsgáljunk. A laborba érkező minta méretének függvénye volt, hogy egy kis darab szövetet HE festési eljárással vizsgáljunk tovább, így igazolva a kórszövettani státuszát. Amennyiben a minta mérete ezt nem tette lehetővé, a DE-KK E-MedSolution rendszerben utólagosan ellenőriztük, hogy az egy betegből eltávolított, patológiai vizsgálatra küldött minta kórszövettani vizsgálata során mit diagnosztizáltak.

Egy-egy mintadarabot HE festési eljárással vizsgálatuk tovább. A HE festett szövetek kórszövettani elemzése patológus kolléga segítségével történt.

### ***III.3.3. Konvencionális RT-PCR***

A fentebb részletezett szövetyenyésztési rendszert alkalmazva, mind az ectopiás, mind az eutopiás minták esetében a kezelések utolsó napja a 24. ciklusnap volt. A 25. ciklusnapon történt a mintákból történő RNS izolálás. Az RNS kinyerésére spin-oszlop alapú Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) izoláló kitet alkalmaztunk. A minták tisztaságát és az RNS koncentrációját Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) készülékkel detektáltuk. Az összes vizsgálati csoport azonos RNS koncentrációra történő hígítását követően, a reverz transzkripciót High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük el. A kutatás során a következő molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk: prePACAP, PAC1R, VPAC1R, VPAC2R, TGFβ-1, TGFβR-I, TGFβR-II, Smad2, Smad3, Oct4, Nanog, Sox2, p21, VEGF és Aromatáz. Háztartási génként a GAPDH bizonyult a legstabilabbnak. A különböző gének primerjeit PrimerBlast freeware program alkalmazásával terveztük, melyet az IDT (Integrated DNA Technologies, Interleuvenlaan, Belgium) gyártott le.

A vizsgált gének amplifikációját, valamint a termékek futtatását és gëldokumentációját a korábban leírtakkal azonos módon kivitelezttük. A PCR termékek megfelelő sávjainak integrált denzitásértékét ImageJ 1.40 g freeware program segítségével határoztuk meg. Minden gén integrált denzitásértékét a saját háztartási gén integrált denzitásértékére normáltunk, majd ezt követte a statisztikai kiértékelés.

### ***III.3.4. Statisztikai analízis***

Jelen kutatásban 6 ectopiás mintából és 3 eutopiás mintából nyert eredményeket hasonlítottuk össze. Egy mintánál a kezelési csoportokon belül a PACAP kezelt csoportot a kontroll csoport eredményeihez viszonyítottuk (ectopiás mintánál az ECT+PACAP csoportot az ECT+0 csoporthoz, eutopiás mintánál az EUT+PACAP csoportot az EUT+0 csoporthoz). A hormonkezelt, illetve a hormon- és PACAP-kezelt csoportokat pedig az alkoholos kontroll csoporthoz (ectopiás mintánál az ECT+E2+P4 és ECT+E2+P4+PACAP csoportokat az ECT+etanol csoporthoz, eutopiás mintánál az EUT+E2+P4 és EUT+E2+P4+PACAP csoportokat az EUT+etanol csoporthoz). A kontroll csoportok normált denzitásértékét 100%-nak tekintettük. A különböző kezelési csoportok normált denzitásértékét ehhez viszonyítva konvertáltuk %-os értékre, azaz egy minta esetében azt vizsgáltuk, a kezelési csoportok

génexpressziója hány százaléka a kontroll csoportokhoz viszonyítva. A 6 ectopiás, illetve a 3 eutopiás minta egyes kezelési csoportjainak kontroll csoporthoz viszonyított szignifikáns eltéréseit kétmintás t-próba alkalmazásával mutattuk ki. A szignifikancia küszöbértékét  $p < 0,05$  értékben határoztuk meg.

## **IV. Eredmények**

### **IV.1. Az első kutatásrész eredményei**

#### ***IV.1.1. A here kanyarulat csatornáinak sejtdenzitása és a membrana basalis vastagsága***

Az AD egerekben minden sejttípus száma szignifikánsan lecsökkent a herében a WT állatokhoz képest. A TAD egerekben szintén minden sejttípus száma alacsonyabb volt a WT egyedekhez képest. Megállapítható azonban, hogy a sejtszám értékek normalizálódtak, illetve minden sejttípus száma szignifikánsan növekedett az AD állatok sejtszámához képest.

Az AD egerekben a membrana basalis vastagsága szignifikánsan lecsökkent a WT állatokéhoz képest. Annak ellenére, hogy a TAD egyedekben a szövettani réteg vastagsága szignifikánsan növekedett az AD egerekhez képest, a vastagság mértéke nem érte el a WT egerekben mérhető értéket.

#### ***IV.1.2. A PACAP receptorok és a PACAP jelátviteli elemek expressziója***

A kutatás során a három PACAP kötő receptor mRNS és fehérjeexpresszióját vizsgáltuk meg: PAC1R, VPAC1R és VPAC2R. Az AD egerekben a PAC1R expressziója alig detektálható, szignifikánsan lecsökkent a WT egyedekhez képest. A TAD egerekben a receptor mRNS expressziója közel azonos volt, mint a WT állatoké, a korrigált denzitás értéke szignifikánsan növekedett az AD egyedekhez képest. Hasonló, ezzel korreláló változást figyeltünk meg a Western blot analízis során. Az AD egerekben szignifikánsan lecsökkent a PAC1R expressziója a WT egyedekhez képest. A TAD állatokban pedig a fehérjeexpresszió szignifikánsan növekedett az AD állatokhoz képest, mértéke a WT egyedekben megfigyelhetővel azonos volt.

A VPAC1R mRNS expressziója tendenciózusan csökkent a WT egyedekhez képest, az AD és TAD egerekben egyaránt. A TAD állatokban azonban a receptor fehérjeexpressziója szignifikánsan megnövekedett az AD egerekhez képest. Az AD állatokban a VPAC1R fehérjeexpressziója alig tért el a WT egyedekhez képest.

A VPAC2R mRNS-ét alig lehetett detektálni a mintákban, egyik vizsgálati csoportban sem figyeltünk meg eltérést az expresszióban. A fehérjeexpressziót vizsgálva azonban

kimutattuk, hogy a TAD állatokban a receptor alig detektálható, expressziójának mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt a többi vizsgálati csoporthoz képest.

A PACAP jelátviteli elemek közül a következő molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk: PKA, Sox9, Sox10 és PP2A. Western blot segítségével ugyanezen molekulák mellett a PKA és Sox9 foszforilált formáinak fehérjemennyiségét is detektáltuk. A P-Sox9 lokalizációját immunhisztokémiai festés segítségével is vizsgáltuk.

A PKA mRNS expressziója a WT állatokhoz viszonyítva szignifikánsan lecsökkent az AD egerekben, míg a TAD egyedekben megnövekedett. A TAD egerekben detektált változás szignifikáns volt az AD állatokhoz viszonyítva. A molekula fehérjeexpressziója szintén szignifikánsan csökkent az AD egerekben, míg a TAD állatokban megközelítette a WT egyedekét. A TAD egerekben a PKA fehérjeexpresszió szignifikánsan növekedett az AD állatokhoz képest. A PKA aktívabb, foszforilált formájának mennyisége a TAD egyedekben kétszerese volt a WT egerekben detektálható értékhez viszonyítva és szignifikánsan nagyobb az AD egerekben mérhetőhöz képest. Az AD állatokban a P-PKA mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt a WT egyedekhez képest.

A Sox9 mRNS expressziója az AD és TAD csoportban egyaránt csökkent a WT egyedekhez képest. A változás nem volt szignifikáns az AD és WT, illetve a TAD és AD egerek összehasonlítása során. A molekula fehérjeexpressziója az AD és TAD egerekben is magasabb volt a WT egyedekhez képest. A változás szignifikáns volt az AD és WT, illetve TAD és AD egerek összehasonlítása során. A Sox9 aktívabb, foszforilált formájának mennyisége a WT és AD egerekben közel azonos volt, míg a TAD állatokban megemelkedett. A változás az AD egyedekhez viszonyítva szignifikáns volt a TAD egerekben.

Immunhisztokémiai festés során kimutattuk, hogy míg a WT egerekben a P-Sox9 immunpozitivitás a herecsatornácskákban arányosan oszlott el, és dominálón a sejtmagok körül lehetett detektálni, addig az AD állatokban az immunreaktivitás jóval alacsonyabb volt, és a tubuli seminiferi testis perifériásabb részein lehetett megfigyelni. A TAD egerekben a WT egerekhez hasonló immunreaktivitást figyeltünk meg: a P-Sox9 jelenlétét döntően a sejtmagok körül lehetett detektálni.

A Sox10 mRNS expressziója szignifikánsan lecsökkent az AD állatokban, a WT egyedekhez viszonyítva. A TAD egerekben a molekula expressziója meghaladta a WT állatokban detektálhatót. Ez a változás szignifikáns volt az AD egyedekhez képest. A Sox10 fehérjeexpresszióját alig tudtuk detektálni a WT és AD egerekben, míg a TAD állatokban szignifikánsan megnövekedett a molekula expressziója.

A PP2A mRNS expressziója közel azonos volt a WT és az AD egerekben, míg a TAD állatokban tendenciózusan növekedett. Ezzel ellentétben, a PP2A fehérjeexpressziója szignifikánsan lecsökkent az AD egerekben, míg a TAD állatokban kétszerese volt a WT egyedekben detektálható értéknek. Ez a növekedés szignifikáns volt az AD állatokkal való összehasonlítás során.

#### ***IV.1.3. A here membrana basalis komponenseinek expressziója***

A kutatás során a következő membrana basalist felépítő molekula mRNS és fehérjeexpresszióját vizsgáltuk meg: IV-es típusú kollagén, IX-es típusú kollagén és testatin. A IV-es típusú kollagén jelenlétét immunhisztokémiai festéssel is detektáltuk.

A IV-es típusú kollagén mRNS expressziója az AD egerekben szignifikánsan lecsökkent, míg a TAD állatokban meghaladta a WT egerekben detektálható értéket. Ez a növekedés szignifikáns volt az AD egerekhez képest. Hasonló változást észleltünk a molekula fehérjeexpressziójában: a IV-es típusú kollagén expressziója a WT egyedekhez képest szignifikánsan lecsökkent az AD egerekben, míg a TAD állatokban több, mint kétszeresére emelkedett. Ez a növekedés szintén szignifikáns volt az AD állatokhoz képest.

A WT egerek herecsatornácskái membrana basalisában a IV-es típusú kollagén immunreaktivitása egyenletes eloszlást mutatott. Az AD állatokban a fehérje immunpozitivitását alig észleltük. Ezzel ellentétben, a TAD egerekben a fehérje immunreaktivitása fokozott volt, a membrana basalisban jobban akkumulálódott.

A IX-es típusú kollagén mRNS expressziója hasonló volt a IV-es típusú kollagén mRNS expressziójához: a molekula expressziója tendenciózusan csökkent az AD állatokban, míg a TAD egereké meghaladta a WT egyedekben mérhető denzitásértéket. Ez a növekedés szintén szignifikáns volt az AD állatokhoz képest. Érdekes módon, a fehérjeexpresszió nem korrelált az mRNS expresszióval megfigyelhető változásokkal. A IX-es típusú kollagén fehérjeexpressziója az AD és TAD állatokban is alacsonyabb volt, mint a WT egyedekben. A változás szignifikáns volt mind az AD és a WT, mind a TAD és az AD egyedek összehasonlítása során.

A testatin mRNS expressziójában szignifikáns eltérések egyik csoportban sem voltak a WT egyedekhez képest: az AD állatokban tendenciózusan csökkent, míg a TAD egerekben enyhén növekedett. Ezzel ellentétben, az AD és a TAD állatokban a testatin fehérjeexpressziója növekedett a WT egyedekhez képest. Ez a változás szignifikánsnak bizonyult mind az AD és a WT, mind a TAD és az AD csoportok összehasonlítása során.

## **IV.2. A második kutatásrész eredményei**

A kórszöveti leletek alapján, az 1162 összesetszám 17,64%-át és 10,67%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréciós fázisképző endometriumnak. A fennmaradó esetek kórszöveti diagnózisa a következő volt: 1,46% menstruációs fázisképző endometrium, 4,56% menopauzális endometrium, a kóros állapotot mutató minták közül 13,51% endometrium polypus, 24,01% endometrium hyperplasia, 4,04% malignus tumor és 1,72% endometritis. Az eltávolított méhnyálkahártya minták közül 16,18% alkalmatlannak bizonyult további kórszöveti elemzésre, 6,20% pedig exogén hormonhatás jeleit mutatta.

Az 1162 mintavétel közül 949 műtét célzta kizárólag a méhnyálkahártya kinyerését a méhüzből. A fennmaradó 213 esetben az endometrium reszekciója csupán járulékos része volt egy másik nőgyógyászati operációnak.

A 949 esetből 833 endometriomot méhkaparásos módszerrel nyertek ki a méhüzből. A kórszöveti vizsgálatok során ezek 14,17%-át és 9,84%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréciós fázisképző endometriumnak.

A 949 esetből 116 endometriomot hysteroscopia során végzett biopsziával nyertek ki a méhüzből. A kórszöveti vizsgálatok során ezek 21,55%-át és 11,21%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréciós fázisképző endometriumnak.

A minták kórszöveti diagnózisának ismerete nélkül, csak a korábban leírt klinikai kizárási és beválogatási kritériumok alkalmazásával, a 949 esetből 145 (15,28%) bizonyult alkalmasnak további alap kutatás kísérletekbe való bevonásra. A kórszöveti eredmények retrospektív vizsgálatával meghatározható, hogy e 145 minta 22,07%-át és 15,86%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréciós fázisképző endometriumnak.

A klinikai kritériumok alapján válogatott 145 alkalmasnak tűnő esetből 116 endometriomot méhkaparásos módszerrel nyertek ki a méhüzből. A kórszöveti vizsgálatok során ezek 19,83%-át és 17,24%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréciós fázisképző endometriumnak.

A klinikai kritériumok alapján válogatott 145 alkalmasnak tűnő esetből 29 endometriomot hysteroscopia során végzett biopsziával nyertek ki a méhüzből. A kórszöveti vizsgálatok során ezek 30,03%-át és 10,34%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréciós fázisképző endometriumnak.

Amennyiben az endometriomot kontroll szövetként szeretnénk tanulmányozni, csak a proliferációs és a szekréciós fázisképző mutató méhnyálkahártya alkalmas további kísérletes vizsgálatokra. A 949 összesetszámból, csak a korábban leírt klinikai kizárási és beválogatási

kritériumok alkalmazásával és a kórszövettani diagnózisok ismerete nélkül, 145 (15,3%) minta bizonyult alkalmasnak alapkutató vizsgálatokra való bevonásra. Ebből 116 endometriomot méhkaparásos módszerrel, 29 endometriomot pedig hysteroscopia során végzett biopsziával nyertek ki a méhürből. A molekuláris vizsgálatokra ténylegesen alkalmas esetek csak a minták kórszövettani eredményének ismeretében határozhatók meg retrospektív módon. A kórszövettani kizárási és beválogatási kritériumokat alkalmazva összesen 32 minta volt alkalmas további kísérletes vizsgálatokra. Ez a teljes esetszám (949 minta) 3,37%-a, valamint a klinikailag válogatott esetek (145 minta) 22,07%-a. A 32 ténylegesen alkalmas mintából 28 endometriomot méhkaparásos módszerrel távolítottak el a méhürből. Ez a teljes méhkaparásos esetszám (833 minta) 3,36%-a, valamint a klinikailag válogatott méhkaparásos esetek (116 minta) 24,14%-a. A 32 ténylegesen alkalmas mintából 4 endometriomot hysteroscopia során végzett biopsziával nyertek ki a méhürből. Ez a teljes biopsziás esetszám (116 minta) 3,45%-a, valamint a klinikailag válogatott biopsziás esetek 13,79%-a.

### **IV.3. A harmadik kutatásrész eredményei**

#### ***IV.3.1. A PACAP receptorok és a prePACAP mRNS expressziója méhnyálkahártya mintákban***

A PACAP receptorok közül a PAC1R és a VPAC2R mindhárom vizsgált mintában expresszáldott, míg a VPAC1R-t az egyik mintában nem lehetett detektálni. Szignifikáns változás egyik kezelési csoportnál sem figyelhető meg.

A PAC1R expressziójában tendenciózus csökkenés észlelhető az EUT+E2+P4+PACAP csoport esetében a kontroll csoporthoz viszonyítva, míg az EUT+E2+P4 és EUT+PACAP csoportoknál változás alig detektálható, illetve az expresszió növekedés mértéke elhanyagolható.

A VPAC2R expressziója esetén mindhárom kezelési csoportnál (EUT+E2+P4, EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP) tendenciózus növekedés figyelhető meg a kontroll csoportokhoz képest.

A prePACAP mRNS-ét csupán 1 mintában lehetett kimutatni, így a detektált változások statisztikailag irrelevánsak a változásokat illetően.

#### ***IV.3.2. A PACAP receptorok és a prePACAP mRNS expressziója endometriosis mintákban***

A PACAP receptorok közül a VPAC1R minden vizsgált mintában expresszáldott, míg a VPAC2R-t a hatból 5 mintában, a PAC1R-t pedig 4 mintában lehetett detektálni.

A VPAC1R expressziójában az ECT+PACAP és az ECT+E2+P4 csoportok esetében tendenciózus csökkenés figyelhető meg, míg az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál a csökkenés mértéke szignifikáns a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A VPAC2R expressziójában szignifikáns változások egyik csoportnál sem figyelhetők meg: PACAP-kezelt csoportoknál (ECT+PACAP és ECT+E2+P4+PACAP) kismértékű tendenciózus csökkenés, az ECT+E2+P4 csoportnál kismértékű tendenciózus növekedés detektálható.

A PAC1R esetében szignifikáns változás az ECT+E2+P4 csoportnál figyelhető meg, ahol a receptor expressziója növekedett. A többi kezelési csoportnál kismértékű tendenciózus növekedés detektálható a kontroll csoportokhoz képest.

A prePACAP mRNS-ét a hatból csupán 2 mintában lehetett kimutatni. Mivel egy statisztikailag értékelhető eredményhez legalább 3 minta szükséges, a prePACAP expressziójánál szignifikancia és szórás értékeket nem határoztunk meg. Ugyanakkor, mindkét minta esetében a prePACAP expressziója kismértékben tendenciózusan növekedett az összes kezelési csoportnál.

#### ***IV.3.3. A TGF $\beta$ jelátvitel elemeinek mRNS expressziója méhnyálkahártya mintákban***

A TGF $\beta$ -1 expressziója az EUT+E2+P4 csoportban csökkent, míg az EUT+PACAP csoportban növekedést mutatott a kontroll csoportokhoz képest. A hormonok és a PACAP együttes adagolása hatására (EUT+E2+P4+PACAP) a TGF $\beta$ -1 mRNS expressziója megközelítette a kontroll csoportban detektálható expresszió mértékét.

A TGF $\beta$ R-I expressziója mindhárom kezelési csoportban tendenciózusan növekedett (EUT+E2+P4, EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP). Szintén növekedés figyelhető meg a TGF $\beta$ R-II expressziójában a PACAP-kezelt csoportoknál (EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP), a hormonkezelt csoportban azonban a receptor mRNS expressziója csökkenést mutat (EUT+E2+P4).

A TGF $\beta$ R-II expressziójához hasonló változások figyelhetők meg a Smad2 mRNS expressziójában: a PACAP-kezelt csoportoknál az expresszió növekedett (EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP), míg a hormonkezelt csoportnál (EUT+E2+P4) az mRNS expresszió mértéke alig változott a kontroll csoportban detektálhatóhoz képest.

A Smad3 expressziójában szintén a TGF $\beta$ R-II expressziójához hasonló változások figyelhetők meg: a hormonkezelt csoportban csökkenés, a PACAP-kezelt csoportoknál kismértékű növekedés detektálható.

#### ***IV.3.4. A TGF $\beta$ jelátvitel elemeinek mRNS expressziója endometriosis mintákban***

A TGF $\beta$ -1 expressziója az ECT+PACAP és az ECT+E2+P4 csoportokban alig tért el a kontroll csoportokhoz képest, előbbinél kismértékben tendenciózusan növekedett. Az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál azonban tendenciózus csökkenés detektálható.

A TGF $\beta$ R-I esetében minden kezelési csoportnál tendenciózus csökkenések figyelhetők meg a kontroll csoportokhoz képest.

A TGF $\beta$ R-II expressziója az ECT+E2+P4 csoport esetén kismértékű tendenciózus növekedést mutatott, míg a PACAP-kezelt csoportoknál csökkenés detektálható a kontroll csoportokhoz képest. Az ECT+E2+P4+PACAP esetében szignifikáns a csökkenés mértéke.

A Smad2 expressziója minden kezelési csoportnál tendenciózusan csökkent a kontroll mintákhoz képest.

A Smad3 esetében a Smad2-höz hasonló változások figyelhetők meg, az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál azonban az expresszió csökkenés mértéke szignifikáns volt.

#### ***IV.3.5. Az őssejt transzkripciós faktorok mRNS expressziója méhnyálkahártya mintákban***

Az Oct4 expressziója a PACAP-kezelt csoportok (EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP) esetében növekedett, míg a hormonkezelt csoportban (EUT+E2+P4) kismértékben csökkent a kontroll csoportokhoz képest.

A Nanog esetében mindhárom kezelési csoportban (EUT+E2+P4, EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP) expresszió emelkedés figyelhető meg, amely a hormonkezelt csoportnál kismértékű a kontroll csoportéhoz viszonyítva.

Az összes vizsgált molekula közül a Sox2 mRNS expressziója az egyik, amelynél szignifikáns változás figyelhető meg az eutopiás mintákban: az EUT+E2+P4+PACAP csoportban az expresszió mértéke szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az EUT+PACAP csoportban tendenciózus növekedés, az EUT+E2+P4 csoportban csökkenés detektálható a Sox2 expressziójában.

#### ***IV.3.6. Az őssejt transzkripciós faktorok mRNS expressziója endometriosis mintákban***

Míg a Nanog és Sox2 minden mintában expresszálódott, addig az Oct4-et csak a minták felében lehetett detektálni.

A Nanog esetében minden kezelési csoportnál expresszió csökkenés figyelhető meg a kontroll csoportokhoz képest. Míg az ECT+E2+P4 és az ECT+PACAP csoportoknál a csökkenés tendenciózus, addig az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál a csökkenés mértéke szignifikáns volt.

A Sox2 expressziójánál a Nanog expresszióhoz hasonlóan minden kezelési csoportnál csökkenések figyelhetők meg a kontroll csoportokhoz képest, a szignifikáns változást azonban nem az ECT+E2+P4+PACAP, hanem az ECT+E2+P4 csoportnál detektáltuk.

A korábban említett 3 mintában, amelyekben az Oct4 detektálható, a molekula mRNS expressziója a PACAP-kezelt csoportoknál tendenciózusan emelkedett, míg az ECT+E2+P4 csoportnál tendenciózusan csökkent a kontroll csoporthoz képest.

#### ***IV.3.7. Az endometriosis kialakulásában jelentős egyéb molekulák mRNS expressziójának vizsgálata méhnyálkahártya mintákban***

Az összes vizsgált molekula közül az Aromatáz mRNS expressziója szintén az egyik, amelynél szignifikáns változások figyelhetők meg az eutopiás minták esetében. A hormonkezelt csoportokban (EUT+E2+P4, EUT+E2+P4+PACAP) szignifikáns emelkedés figyelhető meg az Aromatáz expresszióban, míg az EUT+PACAP csoportban az mRNS expresszió alig tért el a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A p21 expressziója mindhárom kezelési csoportban (EUT+E2+P4, EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP) növekedett a kontroll csoportokhoz viszonyítva.

Az összes vizsgált molekula közül a VEGF mRNS expressziója az utolsó, amelynél szignifikáns változás figyelhető meg az eutopiás minták esetében: az EUT+E2+P4 csoportnál az expresszió szignifikánsan növekedett a kontroll csoporthoz viszonyítva. A PACAP-kezelt csoportoknál (EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP) tendenciózus növekedés figyelhető meg a VEGF expressziójában.

#### ***IV.3.8. Az endometriosis kialakulásában jelentős egyéb molekulák mRNS expressziójának vizsgálata endometriosis mintákban***

Mindhárom molekula esetében expresszió csökkenések figyelhetők meg a hormon- és a PACAP-kezelt csoportoknál is.

Az Aromatáz esetében, míg az ECT+E2+P4 és az ECT+PACAP csoportoknál az expresszió csökkenése kismértékű, addig az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál a változás mértéke szignifikáns a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A p21 molekulát vizsgálva megállapítható, hogy az ECT+E2+P4 csoport mRNS expressziója alig tér el a kontroll csoporthoz képest, míg az ECT+PACAP csoportnál a tendenciózus csökkenés mértéke jóval nagyobb. Az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál pedig az expresszió csökkenés mértéke szignifikáns.

A VEGF esetében egyik kezelési csoportnál sem detektáltunk szignifikáns változást a kontroll csoportokhoz képest. Míg az ECT+E2+P4 csoportban alig tért el az mRNS expresszió mértéke, addig a PACAP-kezelt csoportoknál a tendenciózus csökkenés jóval nagyobb mértékű volt.

## Eredmények megbeszélése és az értekezés új tudományos eredményei

A PACAP nem tartozik azok közé az endogén anyagok közé, amelyek a szervezetben prominens változásokat hoznak létre. Ennek ellenére számos élettani és kóros folyamatban fontos szereppel bír: a jelenléte, illetve a hiánya is befolyásolja a szövetek biokémiai folyamatait. Jelen kutatásokban az Alzheimer-kórban és az endometriosisban betöltött szerepét vizsgáltuk. Mindkét betegség kialakulásának hátterében gyulladásszerű, oxidatív stresszfolyamatokkal járó patogenezist feltételezünk. Az Alzheimer-kórban a PACAP jelítvitel hím gonádban megfigyelhető eltéréseit, az endometriosisnál a neuropeptid eutopiás és ectopiás szövetre gyakorolt hatásait tanulmányoztuk.

Az Alzheimer-kór egy olyan degeneratív kórkép, amely a központi idegrendszeren kívül perifériás szöveteket is érinthet, köztük a hím gonádot is. Ismert, hogy a betegségben a KIR bizonyos területein a PACAP jelítvitele sérül. Az agy és a here sejt közötti kapcsolatait (neurogliasejt és Sertoli-csírasejt) és vér-szöveti barriereit (vér-agy gát és vér-here gát) tekintve hasonlóságokat mutatnak egymással. Nem meglepő tehát, ha azt feltételezzük, hogy bizonyos neurodegeneratív betegségek a központi idegrendszeren kívül perifériás szövetekben is bizonyos mértékben manifesztálódnak. Az Alzheimer-kór patogenezisének hátterében az A $\beta$ -peptid kóros mennyiségben való termelődését, illetve akkumulálódását feltételezzük. Ez a molekula az APP-ből képződik, amely nemcsak a központi idegrendszerben, de a herében is termelődő és megtalálható fehérje. Az ép szövetekben az amyloidgenézis kontrollált folyamat. Ezzel szemben Alzheimer-kórban patológiás amyloid képződik. Igazoltuk, hogy az Alzheimer-kórban romlik a hím gonád szöveti felépítése: csökken a heretubulusok sejtszáma, illetve sérül a vér-here barrier felépítése is. A mikroszkóposan igazolható károsodásokban szerepet játszik a PACAP szignalizáció alulműködése. A rendszeres fizikai aktivitás, amely a KIR-ben is lassítja a neurodegeneratív betegség progresszióját, jótékony hatással van a here működésére is: a mozgás normalizálja a PACAP jelítvitel eltéréseit a hím gonádban. A neuropeptid szignalizációja nagy valószínűséggel egyike azoknak a biokémiai folyamatoknak, amelyek a fizikai tevékenység során aktiválódnak. Feltételezzük továbbá, hogy az Alzheimer-kórt modellező egerek kísérletekbe való bevonása alkalmas lehet a here degenerációs folyamatainak tanulmányozására. Továbbá, a hím gonád megfelelő szerv lehet a fizikai aktivitás által aktivált biokémiai folyamatok és a szöveti regenerációs mechanizmusok vizsgálata során.

Az endometriosis szerkezeti és viselkedésbeli hasonlóságokat mutat az endometriummal, a legelfogadottabb elméletek szerint is az eutopiás szövetből ered. A kóros és egészséges szövet összehasonlítása biztosíthatja a molekuláris folyamataik közti

különbségek feltárását. Ezek az eltérések jelenthetik az endometrisosis eliminációjában alkalmazható terápiai lehetőségek megteremtését. Nehéz azonban megfelelő kontrollt találni az eutopiás szövet vizsgálatára, a sejtvonalak és az állatmodellek tanulmányozása nem fedi le a humán endometrialis szövetek biokémiai folyamatainak minden aspektusát. A méhnyálkahártya egy komplex szövet, amelyet sokféle sejttípus épít fel: az endometriumot alkotó őssejtek és terminálisan differenciálódott sejtek. Ez a diverz populáció egy olyan szöveti miliőt hoz létre, amely finomhangolt, élénk sejtközi kommunikáción alapuló folyamatokkal biztosítja a nyálkahártya ciklusonkénti felépülését, megújulását és ép funkcióját. Az ectopiás és eutopiás szövet mikroszkóposan (kórszövettanilag) azonos sejtekből épül fel. Az endometrium vizsgálatára használt sejtvonalakat gyakran patológiás eutopiás méhnyálkahártyából, vagy menstruációs vérből izolálják, és általában csak egyféle sejttípusát tartalmazzák a szövetnek. Ráadásul sok sejtvonal immortalizált. Ezeknek, és a kóros nyálkahártyából izolált sejteknek a molekuláris folyamatai sok ponton eltérnek az ép szövet működésétől. A legtöbb emlős – köztük a kísérletekre leggyakrabban használt egyszemélyes – méhnyálkahártyája menstruációs ciklus helyett oestrus cikluson megy keresztül a reprodukív életszakasz során. Néhány állatfaj (pl.: főemlősök) kivételével menstruációs ciklusa csak a humán endometriumnak van. A menstruáló emlősökkel való kísérletezés hátránya, hogy a „hozzáférhetőségük” rendkívül nehéz, tartásuk költséges, illetve a velük való kísérletezés súlyos etikai problémákat vet fel. Mindezeket túl, az endometrisosis szintén „humánspecifikus” kórállapot, ugyanis ectopiás endometrium spontán kizárólag az emberben és a menstruáló fajokban alakul ki. Komoly akadályokba ütközik ugyanakkor az a kutató is, aki a legalkalmasabbnak tűnő méhüregi nyálkahártya molekuláris mechanizmusait tanulmányozza. Ugyanis csak az egészséges endometrium jelent valódi kontroll szövetet az endometrisissal való összehasonlítás során. A műtéti eljárásokkal kinyerhető méhnyálkahártya nagy része azonban kóros, így molekuláris folyamataik is számos ponton eltérnek az egészséges szövetétől. Nem túlzás kijelenteni azt, hogy a legtöbb korábbi kutatás eredménye, amely során az endometriumot tanulmányozták, kellő kritikával kezelendő. Retrospektív analízisünkkel bizonyítottuk, hogy a vizsgálandó endometrium minták kiválasztásánál a klinikai beválogatási és kizárási kritériumok alkalmazása növeli annak esélyét, hogy az alap kutatás során ép méhnyálkahártyával dolgozunk. Továbbá minden minta kórszövettani vizsgálata elengedhetetlen a megbízható eredmények elfogadása érdekében. A kóros szövet igazolása kizárási feltételt jelent.

A PACAP endometriumban és endometrisosisban betöltött szerepét korábban még nem vizsgálták. Kutatásunk során először igazoltuk, hogy mindkétféle szövetben expresszálódnak

PACAP-kötő receptorok, annak ellenére, hogy a neuropeptid maga nem expresszálódik minden esetben. Először imitáltuk továbbá a női nemi ciklus hormonális változásait, amely az eutopiás és ectopiás szövetek működésére is hat a szervezeten belül. A PACAP adagolása hormonális közegben eltérő, a kontrollhoz viszonyított ellentétes expressziós változásokat eredményez az endometrium és az ovarialis endometrioid mintákban. További vizsgálatok szükségesek természetesen ennek megerősítésére. Jelen kísérleti eredmények ismeretében úgy tűnik, a PACAP endometriosisban bizonyos mértékben gátolja azokat a mechanizmusokat, amelyek az ectopiás szövet kialakításában szerepet játszanak, míg a méhnyálkahártyában a kóros szövet képzési folyamatainak irányába hat. Utóbbi esetén kérdés, hogy mi a határ a kontrollhoz viszonyított expressziós változásoknál, amely a rendszeres időközönként differenciálódó és proliferáló szövet újraépítését elősegíti, illetve amely az ectopiás szövet létrejöttét okozza. Nem valószínű, hogy a jövőben a PACAP önmagában elegendő lesz az endometrioid szövet eliminálására, ugyanakkor kombinált terápiában való alkalmazása potenciális lehetőség lehet a kór állapot kezelésében. A PACAP adagolás által létrehozott expressziós változások bizonyítékkul szolgálnak arra, hogy alapvető különbségek vannak az eutopiás és ectopiás szövetek biokémiai folyamatai között.



Nyilvántartási szám: DEENK/147/2025.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

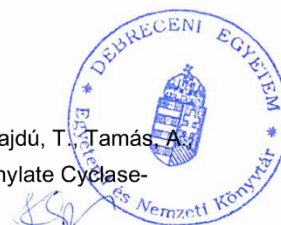
Jelölt: Szegeczki Vince  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10064876

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szegeczki, V.**, Fazekas, L., Kulcsár, M., Reglődi, D., Török, P., Orlik, B., Laganà, A. S., Jakab, A., Juhász, T.: Endometrium as Control of Endometriosis in Experimental Research: assessment of Sample Suitability.  
*Diagnostics*. 12 (4), 1-17, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics12040970>  
IF: 3.6
2. **Szegeczki, V.**, Horváth, G., Perényi, H., Tamás, A., Radák, Z., Ábrahám, D., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Alzheimer's Disease Mouse as a Model of Testis Degeneration.  
*Int. J. Mol. Sci.* 21 (16), 1-16, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21165726>  
IF: 5.924

### További közlemények

3. Fazekas, L., Szabó, B., **Szegeczki, V.**, Fillér, C., Varga, Á., Godó, Z., Tóth, G., Reglődi, D., Juhász, T., Németh, N.: Impact Assessment of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) and Hemostatic Sponge on Vascular Anastomosis Regeneration in Rats.  
*Int. J. Mol. Sci.* 24, 1-24, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms242316695>  
IF: 4.9
4. Józsa, G., Fülöp, B. D., Kovács, L., Czibere, B., **Szegeczki, V.**, Kiss, T., Hajdú, T., Tamás, A., Helyes, Z., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Lack of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Disturbs Callus Formation.  
*J. Mol. Neurosci.* 71 (8), 1543-1555, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-019-01448-z>  
IF: 2.866





5. **Szegeczki, V.**, Perényi, H., Horváth, G., Hinnah, B., Tamás, A., Radák, Z., Ábrahám, D., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Physical Training Inhibits the Fibrosis Formation in Alzheimer's Disease Kidney Influencing the TGF[ $\beta$ ] Signaling Pathways.  
*J. Alzheimers Dis.* 81 (3), 1195-1209, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-201206>  
IF: 4.16
6. Perényi, H., **Szegeczki, V.**, Horváth, G., Hinnah, B., Tamás, A., Radák, Z., Ábrahám, D., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Physical Activity Protects the Pathological Alterations of Alzheimer's Disease Kidneys via the Activation of PACAP and BMP Signaling Pathways.  
*Front. Cell. Neurosci.* 14, 1-14, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2020.00243>  
IF: 5.505
7. **Szegeczki, V.**, Bauer, B., Jüngling, A., Fülöp, B. D., Vágó, J., Perényi, H., Tarantini, S., Tamás, A., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Age-related alterations of articular cartilage in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene-deficient mice.  
*GeroScience.* 41 (6), 775-793, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-019-00097-9>
8. Szentlélek, E., **Szegeczki, V.**, Karanyicz, E., Hajdú, T., Tamás, A., Tóth, G., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Reduces Oxidative and Mechanical Stress-Evoked Matrix Degradation in Chondrifying Cell Cultures.  
*Int. J. Mol. Sci.* 20 (1), 168, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20010168>  
IF: 4.556
9. Reglődi, D., Cseh, S., Somoskői, B., Fülöp, B. D., Szentlélek, E., **Szegeczki, V.**, Kovács, A., Varga, A., Kiss, P., Hashimoto, H., Tamás, A., Bárdosi, A., Manavalan, S., Bakó, É., Zákány, R., Juhász, T.: Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient mice.  
*Reproduction.* 155 (2), 127-137, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1530/REP-17-0470>  
IF: 3.125





10. Józsa, G., **Szegeczki, V.**, Pálfi, A., Kiss, T., Helyes, Z., Fülöp, B., Cserhádi, C., Daróczi, L., Tamás, A., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Signalling Alterations in Bones of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Gene Deficient Mice.  
*Int. J. Mol. Sci.* 19 (9), 2538, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19092538>  
IF: 4.183

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 38,819**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
9,524**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.04.11.

