

**A hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)
szemészeti hatásainak kísérletes vizsgálata**

Ph.D. értekezés tézisei

dr. Gaál Valéria

Témavezetők:

Dr. Reglódi Dóra egyetemi docens

Dr. Lubics Andrea egyetemi docens

Programvezető:

Prof. Dr. Csernus Valér

Pécsi Tudományegyetem

Anatómiai Intézet

Pécs, 2011

I. Bevezetés

PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide)

A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptidet 1989-ben izolálták birka hypothalamusból a hypophysisben kifejtett adenilát-cikláz aktiváló hatása alapján. A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinális polipeptid (VIP) peptidcsalád tagja. A szervezetben két biológiailag aktív formában található meg: a korábban izolált, 38 aminosavból álló forma (PACAP38) és az 1 évvel később azonosított 27 aminosavból álló polipeptid (PACAP27). Az emlős szervezetben előforduló PACAP 90%-át a PACAP38 teszi ki. A PACAP szerkezete rendkívül konzervált: az eddig vizsgált emlősállatokban teljesen azonos, míg az alacsonyabbrendű gerinces állatokban mindössze 1-4 aminosav eltérés mutatkozik. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a peptidnek alapvető élettani folyamatokban lehet szerepe.

A PACAP legnagyobb koncentrációban a központi és perifériás idegrendszerben található, de a legtöbb szervben előfordul. Kimutatható az endokrin mirigyekben, a gasztrointestinális rendszer teljes hosszában, a cardiovascularis, urogenitalis és respiratorikus rendszerben is. A központi idegrendszeren belül nagy mennyiségben van jelen a hypothalamusban, de a kéregállományban, a középgagyban, az agytörzsben, a thalamusban, a hypophysisben és a kisagyban is jelentős mennyiségű PACAP tartalmú sejt található. A perifériás idegrendszerben a spinális ganglionok egyes sejtjei, valamint a prae- és postganglionáris neuronok tartalmazzák PACAP-ot.

A PACAP receptorai és előfordulásuk

A PACAP G-protein receptorokon keresztül fejt ki hatását. Receptorainak két csoportja van: a PAC1 és a VPAC receptorok. A PAC1 receptor a PACAP-ra specifikus, a PACAP-pal rokon peptideket kisebb affinitással köti meg, a receptort kódoló gén a 7. kromoszómán található. A PAC1 receptornak jelenleg 8 splice variánsa ismert. A VPAC1 és VPAC2 receptorok a PACAP-ot és a VIP-t hasonló erősséggel kötik. A receptorok közül a PAC1 receptor elsősorban az agyban, a gerincvelőben, az adenohypophysisben, a mellékvesevelőben és a herékben található meg. A VPAC receptorok a KIR mellett a májban, tüdőben, lépben, ováriumban, a thymusban és a gasztrointestinális rendszerben mutatható ki.

A PACAP élettani hatásai

A PACAP-ot a hypophysisben kifejtett adenilát cikláz aktiváló hatása alapján izolálták, azonban a felfedezése után már rövid idővel nyilvánvalóvá vált, hogy hatása ennél jóval sokrétűbb. Az idegrendszerben fontos szerepet tölt be a fejlődésben, a szinaptikus plaszticitásban, a neuronális excitabilitásban, befolyásol számos magatartási jelet, valamint stimulálja a memóriafolyamatokat. A PACAP neuroprotektív hatását a peptid felfedezése óta számos kísérlet bizonyította. In vitro védi a neuronokat különféle toxikus hatással szemben, például glutamát, etanol, oxidatív stressz, ceramid, hypoxia. Neuroprotektív, sejt túlélést segítő hatását in vivo vizsgálatok is megerősítik. Traumás vagy ischaemiás agykárosodás, Parkinson kór és stroke állatmodelljeiben jelentős védő hatást mutat. Endokrin hatásai is ismertek: központi szerepe van a hypothalamikus releasing hormonok szabályozásában, a hypophysis-hormonok elválasztásában, a mellékvese és a gonádok hormontermelésében. Ezekon kívül a PACAP részt vesz a napi ritmus szabályozásában, a belső szervek simaizom kontrakciójának és mirigyelválasztásának irányításában, általános anti-inflammatorikus hatása van, befolyásolja a fájdalomingerek perifériás és centrális folyamatait és hatékony vasodilatátor.

A PACAP előfordulása és hatásai a szemben

Értekezésem középpontjában a PACAP szemben kifejtett hatásai állnak, ezért a PACAP előfordulását és hatásait a szemben részletesebben ismertetem.

A PACAP a szem számos szövetében kimutatható. A peptid és receptorainak előfordulását elsősorban a retinában vizsgálták. Megtalálható a retina több rétegében, a Müller-féle glia sejtekben is. A PAC1 receptor legerősebben a ganglionsejtek rétegében és a belső magvas rétegben expresszálódik, míg a külső rostos és külső magvas rétegekben gyengébb expresszió mutatható ki. A PACAP a glutamát mellett a retino-hypothalamikus pálya egyik fő transzmittere. Ez a pálya a ganglionsejtektől húzódik a suprachiasmaticus magba, és a fény diurnális ritmust befolyásoló hatásait közvetíti.

A PACAP nemcsak a retinában, hanem az irisben, corpus ciliareban és a conjunctivában is megtalálható. Ismert a simaizomkontrakcióra, vasodilatációra, gyulladásozó folyamatokra és a cAMP szint szabályozására kifejtett hatása. Jelen van a PACAP a trigeminális, sphenopalatinális és ciliáris ganglionokban is, melyeken keresztül befolyásolja a mirigyek szekrécióját.

Kísérleti célkitűzéseink 3 fő témakört érintenek.

Vizsgáltuk, 1. hogyan hat a PACAP a könny fehérjeösszetételére és előfordul-e a PACAP a könnyben és a csarnokvízben; 2. milyen hatása van a PACAP-nak a cornea regenerációjára; 3. van-e védő szerepe a PACAP-nak UV-A besugárzás indukálta retinakárosodásban?

I.1. A könnytermelés szabályozása összetett, a mirigyek működését hormonális és idegi (szimpatikus és paraszimpatikus) hatások egyaránt befolyásolják. Ha idegen test vagy irritáló anyag kerül a conjunctivára, corneára, esetleg az orrjáratba, e mechanikai ill. kémiai inger hatására több könny kezd termelődni, mely akár százszoros mennyiséget is jelenthet. A reflexes könnytermelést a látóideg ingerei (erős fény) is kiválthatják. Érzelmek magasabb szintű agyi központok segítségével azonnali könnytermelést tudnak kiváltani. Az ingereket a n. oculomotorius ggl. ciliare-ban átkapcsolódó, majd a n.trigeminus n.lacimalis ágával haladó paraszimpatikus, valamint a ganglion cervicale superiusból származó szimpatikus idegek közvetítik valamennyi könnymirigynek. A vizes fázis aránya megnő, több lesz a nátrium, kevesebb a kálium a fenti reflexek által termelődött könnyben, de egyéb összetevők aránya is megváltozhat, attól függően, hogy milyen idegrendszeri jel váltotta ki a fokozott képződést. Egyes fehérjékből mindig csak ugyanannyit választanak ki a könnymirigyek, így ezek aránya kevesebb lesz. Más fehérjék mennyisége viszont változik, így az antibakteriális lizozim, vagy a baktériumok számára is fontos vas megkötésére képes laktoferrin mennyisége megemelkedik „könnyfakasztó” ingerek hatására.

PACAP-immunreaktív rostokat mutattak már ki a könnymirigyben is, melyek a ganglion sphenopalatinumából erednek, ahol a neuronok 10%-a PACAP tartalmú.

A nyálmirigyekben és más exocrin mirigyekben leírt hatásai valószínűsítik, hogy a serosus nyálmirigyhez hasonló felépítésű könnymirigyben is kifejt valamilyen, eddig ismeretlen hatást. A nyálmirigyekben PACAP tartalmú rostok mutathatók ki, PACAP adása fokozza a nyálszekréciót, a protein szekréciót és gátolja a Ca^{2+} csatornákat. Azok az anyagok, amelyek emelik a cAMP vagy a cGMP szintet, hatással vannak a könnytermelésre. Ez a megfigyelés szintén valószínűsíti azt, hogy a PACAP szerepet játszik a könnymirigy működésében.

Ennek alapján első kísérletünkben azt vizsgáltuk, vajon szisztémás PACAP kezelés befolyásolja-e a könny fehérjeösszetételét patkányban és vajon a PACAP előfordul-e a könnyben? Összehasonlításként a csarnokvízben is megvizsgáltuk a PACAP előfordulását.

1.2. A cornea nagyfokú érzékenységének fontos szerepe van a szemgolyó védelmében. Ez az érzékenység gazdag és sajátos elrendeződésű érzőideg-hálózatával van összefüggésben. Minden egyes érzőidegrost jól körülírt corneaterületet lát el: sérülése csúcsával a központ felé eső rész érzéskiesését okozza. A cornea érzékenysége a különböző ingerekre változó.

A fájdalom-, tapintás-, hőérzékelés a széli részek felé csökken. A cornea a magas hőt fájdalomként érzékeli. A corneahám folyamatosan fizikai, kémiai, biológiai ingereknek van kitéve. A cornea egy esetleges hámsérülésre gyors gyógyulással reagál. A sérülés területében a keratocyták apoptózist szenvednek és a sebszélek mentén új sejtek proliferációja figyelhető meg. Az apoptotikus és a proliferációs utak egyensúlya rendkívül fontos a sebgyógyulás szempontjából. Számos növekedési faktor, transzkripciós faktor és citokin szerepét igazolták már e folyamatban. Nem megfelelő corneális sebgyógyulás és/vagy fokozott apoptózis számos esetben kialakulhat, pl.: cukorbetegség, kontaktlencse viselés, refraktív sebészeti szövődmény.

A PACAP az idegrendszer fejlődése során növekedési faktorként működik, sérülések esetén sejtvédő hatása is van. A PACAP corneális hatásai kevésbé ismertek, annak ellenére, hogy a peptidnek és receptorainak jelenlétét már kimutatták a corneában. A cornea epithelsejtjei gyorsan reagálnak környezeti ártalmakra s a gyors sebgyógyuláshoz vezető szabályzó útvonalak egyensúlya elengedhetetlen. Egy korábbi vizsgálatban a PACAP27 szemcseppel idegvégződéses növekedését serkentették nyúl corneájában és felgyorsították a cornea érzékenységének helyreállítását. Bár ez a vizsgálat csak a neuronális regenerációra fókuszált, felhívta a figyelmet arra a lehetőségre, hogy a PACAP szemcsepp formájában fokozhatja a cornea hámosodását.

Vizsgáltuk a PACAP epitheliális sebgyógyulásra gyakorolt hatását, valamint két védő molekulának (AKT és ERK1/2) PACAP hatására bekövetkezett változásait, melyekről korábban már leírták, hogy a sejt túlélésben és a regenerációban egyaránt fontos szerepük van.

1.3. A retina a központi idegrendszer „kihelyezett” része. Kísérleteinkben a patkány retinát vizsgáltuk, mely hasonlít a humán retinához jó vascularizáltsága és a három fő sejtes és két szinaptikus rétege miatt. Nincs csapokban gazdag központi része, bár itt is megfigyelhető centripériális gradiens, azaz a centrális rész felé a photoreceptor-sűrűség megnövekszik a perifériához képest.

Számos tanulmány bizonyította, hogy a PACAP és receptorai jelen vannak a retina rétegeiben. PACAP immunpozitivitás figyelhető meg patkány retinában az amacrin-, horizontális-, és ganglionsejtekben, valamint az idegvégzésekben és a belső rostos

rétegben. PACAP immunreaktivitás igazolható a PACAP pozitív neuronok plazmamembránjában, a durva felszínű endoplazmás retikulumban és a citoplazmában. Csirke retinájában a PACAP immunreaktivitás cirkadián változást mutat. Emlősökben a retino-hypothalamikus pálya a retina ganglionsejtjeiből ered és a hypothalamus suprachiasmaticus magjában végződik, mely az emlősök biológiai órája. Ezen ganglionsejtek melanopszin tartalmuk miatt direkt fényérzékenyek. Melanopszin kizárólag a PACAP-ot tartalmazó sejtekben termelődik. A ganglionsejtek PACAP termelése részben dopamin-irányítás alatt áll. A PACAP immunreaktivitás a retina fejlődésének korai szakaszában jelenik meg. A csirkeretina belső magvas rétegében az embrionális élet 8. napjától már kimutatható a PACAP. Patkány retina ganglionsejt rétegében a fejlődés 20. napján jelenik meg a PACAP mRNS.

Szelektív PACAP receptorok felelősek a PACAP retinális kötődésének 80%-áért. Humán foetális retinában immunhisztokémiai vizsgálatok PACAP és receptorainak jelenlétét igazolták, melyet a PACAP receptor mRNS kimutatásával is megerősítettek RT-PCR kísérlettel. A human retinoblastoma sejtek is tartalmaznak PACAP receptorokat.

PAC1 receptor mRNS-t és protein expressziót találtak újszülött patkány retinájának minden rétegében. Csirkeretinában az embrionális fejlődés 6. napjától már jelen van a PAC1 receptor és mRNS. A retina pigment epithel sejtjeiben mindegyik PACAP receptor mRNS-ét megtalálták. Pontos lokalizációra irányuló vizsgálatok szerint különösen erős PAC1 receptor mRNS expresszió észlelhető a ganglionsejt, a belső magvas és idegrost rétegben, míg gyengébb receptor jelenlét mutatható ki a belső és külső rostos, a külső magvas rétegben és a photoreceptorok külső tagjaiban. Más vizsgálat megerősítette a VPAC receptorok jelenlétét a retinában. Sejttenyészetben már a retina Müller sejtjeiben is kimutattak PAC1 receptorokat.

In vitro retinoprotekció

Az első olyan tanulmány, mely a PACAP retinoprotektív hatásával foglalkozik, arról számol be, hogy a PACAP-nak védő hatása van retinális idegsejt-tenyészetekben glutamát toxicitással szemben. Korábban már bizonyították a VIP hasonló hatását. Az emelkedett glutamát koncentráció excitotoxikus sejthalált okoz az idegrendszerben, beleértve a retinát is. 10 nM/L-1 μ M/L PACAP27 és 38 a glutamát-indukálta sejthalált dózisfüggő módon gyengítette. Ezt a hatást a PACAP antagonistá PACAP6-38 és a PKA gátló H-89 egyidejű kezelés megakadályozta.

Újszülött patkányokból származó retina neuroblast rétegében anizomycin sejthalált okoz. PACAP38 kezelés dóziszfüggő mértékben kivédte a sejthalált: az 1-10 nM/L koncentrációjú PACAP38 a sejthalál teljes gátlását eredményezte.

A PACAP in vivo retinoprotektív hatása

Az idegrendszer legfontosabb serkentő transzmittere, a glutamát nagy koncentrációban toxikus hatású. Az excitotoxikus sérülés a retina számos betegségének fő faktora, így a glaucomának és az ischaemiás retinopathiának is. A nátrium-glutamát (monosodium-glutamát=MSG) újszülött patkánynak szisztémásan adva átlépi a vér-retina gátat súlyos retinadegenerációt okozva, a belső retinarétegek súlyos károsodása mutatható ki. A külső-belső határhártya közti távolság a felére csökken, 3 hetes korban vizsgálva. Az IPL csaknem teljes eltűnése, az INL és a GCL fúziója figyelhető meg. Fénymikroszkóppal látható, hogy a GCL-ben a 100 mikrométer retinahosszra jutó sejtszám kb. a fele a normálisnak (a papillától azonos távolságban mérve). Bár a PACAP átlép a vér-agy gáton, a szisztémás PACAP kezelés az MSG indukálta retina degenerációt csak mérsékelten csökkentette. Ugyanakkor lokális PACAP38 kezelés (intravitrealis 1-100 pmol PACAP) a degeneratív morfológiai elváltozások szignifikáns csökkenését eredményezte. Míg 1 pmol PACAP csekély javulást hoz, 100 pmol PACAP csaknem intakt retina megjelenést biztosított. Hasonló védőhatás figyelhető meg PACAP27 kezelésnél is. PACAP antagonisták, a PACAP6-38 és a PACAP6-27 az MSG indukálta degeneráció fokozódását eredményezik, jelezve, hogy az endogén PACAP a retina természetes védekezésében fontos szerepet játszik. A PACAP az excitotoxikus retinakárosodásokkal szemben protektív hatású felnőtt és újszülött patkányban is.

Az excitotoxikus sérüléseken kívül nervus opticus átvágása esetén és ischaemiás retinakárosodásban is igazolták a PACAP retinoprotektív hatását. Mindkét arteria carotis communis lekötése után krónikus hypoperfúzió jön létre és a retinában ischaemiás degeneráció figyelhető meg. PACAP kezelés a retina degenerációját mérsékelte, és a hatás ebben a modellben sem volt sejtspecifikus. A PACAP ezen kísérleti előzmények alapján erőteljes retinális védő hatással rendelkezik, melyet UV-A indukálta károsodásban teszteltünk.

UV-A sugárzás okozta retina degeneráció

Az atmoszféra változásai növelhetik az UV sugárzás mértékét a Földön. Ezáltal a szem UV expozíciója is emelkedni fog.

A hosszúhullámú UV-A (315-440 nm) sugarak minden optikai közegen képesek áthatolni és a retina fotokémiai károsodását okozni. Humán vizsgálatok azt mutatták, hogy a napfény expozíció, különösen az UV-A, photoaktív gyógyszerekkel együtt rendkívül phototoxikus. A phototoxicitás reaktív szabadgyökök (pl.: H_2O_2), singlet oxigén és hydroxil gyökök képződését jelenti. A reaktív oxigén szabadgyökök fehérje és DNS károsodást okozhatnak. A szabadgyökfogó glutathion, C és E vitamin a fény-indukálta retinakárosodást csökkenteni próbáló endogén védelmi rendszert szolgálnak. Az endogén neuroprotekciónak további elemei a retinában található neurotrophikus faktorok, melyek közé tartozik a PACAP is.

Harmadik kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy van-e védő hatása az intravitreálisan adott PACAP-nak UV-A besugárzás indukálta retinakárosodás esetén?

Részletes kísérleti leírás

II. A PACAP könny fehérjeösszetételére kifejtett hatásának vizsgálata

II.1. Anyagok és módszerek

Vizsgálatainkhoz felnőtt hím Wistar patkányokat (200-250 gramm) használtunk. A kísérletek során betartottuk a PTE Munkahelyi Állatetikai Bizottság 2006-os Állatetikai Kódexében foglaltakat (BA02/2000-20/2006).

Könny gyűjtéséhez a szemészeti Schirmer-próbánál használatos szűrőpapírcsíkokat használtuk. A papír 2-3 mm-es átitatódása elegendő volt a további vizsgálatokhoz. A mintákat a PACAP kezelés előtt, majd a PACAP szisztémás adása után 1, 6, 24 órával gyűjtöttük (minden időpontban $n=5$). 20 μ l PACAP38-at adtunk intravénásan 100 μ l fiziológias sóoldatban feloldva. A mintagyűjtést 3 alkalommal ismételtük Izofluránnal történő inhalációs narcosisban.

A könnymintákat feldolgozásig 0,5 ml-es steril Eppendorf csövekben $-20\text{ }^\circ\text{C}$ fokon tároltuk. A papírcsíkok által megkötött fehérjéket 30 μ l mintapufferben oldottuk ki (0,125 M Tris/HCl, pH:6,8, 4% nátrium dodecil szulfát-SDS-, és 10% β -mercaptoetanol). Az így kapott oldatot microchip electrophoresisra készítettük elő (Agilent 2100 Bioanalyzer). A vizsgálat

során a Protein 230-as fehérje chipet használtuk. A gél egy lineáris polimert tartalmaz szűrő ágensként, amely biztosítja a 14-230 kDa tartományban a fehérjék molekulatömeg alapján történő szétválasztását. Egy chip 10 fehérjeminta elemzésére alkalmas. Az ismeretlen fehérjék molekulatömegének pontos meghatározásához a Chip Kit molekulatömeg markereit használtuk. A méréseket háromszor ismételtük meg a reprodukálhatóság bizonyítására. Az eredmények kiértékelését a protein 230-as assay software segítségével végeztük el.

A tömegspektrometriai mérésekhez a gélelectrophoresis során szétválasztott fehérjéket a gélből kivágtuk, majd Eppendorf csőbe helyezve 3x 10 percig 200 µl 50%-os acetonitril és 50 mmol NH₄CO₃ oldattal mostuk. A géldarabokat szobahőmérsékleten dehidratáltuk és 10µl 0,04 mg/cm³ cc. tripszinoldattal kezeltük. A tripszines emésztés után a peptideket ultrahang segítségével oldottuk ki. Oldószerként 15 µl víz-acetonitril-hangyasav (49:50:1 v/v/v) oldatot használtunk. Az extrakció után a peptideket tartalmazó oldatot liofilizáltuk, majd 10 µl desztillált vízbe oldottuk vissza. A vizes peptidoldatok 1 µl-ét azonos térfogatú telített CHCA (alfa-ciano-4-hidroxi fahéjsav) mátrix oldattal mintatartó tálcára csepegtettük. A könnymintákban található fehérjék azonosítására Mascot adatbázis keresőt használtunk. A fehérjék szekvencia-egyezéseinek vizsgálatát a Chestal W II program segítségével végeztük el. Humán könnymintákat egészséges felnőtt önkéntesektől vettünk Schirmer próbával (kor: 25-40, mindkét nem, ismert szemészeti betegség nélkül). A humán csarnokvizet (n=10, 65-85 év közötti, mindkét nem) önkéntesektől nyertük cataracta ellenes műtétek alkalmával. Natív mintáinkat, illetve a PACAP38 vizes oldatú standardjának (Sigma-Aldrich) 1-1 µl-ét felvittük a Bruker rozsdamentes acél mintatartó tálcára. A minták beszáradását követően az elemzéseket Autoflex II típusú MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel reflektor detektálási módban végeztük el. Az ionizáláshoz 337 nm-es nitrogén lézert alkalmaztunk (50 Hz, 20 kV, késleltetési idő: 120 ns volt). A tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban 1000 és 10000 m/z tartomány között regisztráltuk. Minden minta esetében a peptidkeverékre jellemző tömegspektrumokat (1000 lövés/minta) összesítettük.

II.2. Eredmények

A szűrőpapír csíkokból nyert fehérjemennyiség elegendőnek bizonyult a fehérjeösszetétel microchipeken történő elemzésére. A chip-technológia segítségével 45 másodperc alatt kvantitatív adatokat nyertünk a könny fehérje-összetételéről. A patkánykönnyből több fehérjecsúcsot tudtunk kimutatni a 14-80 kDa molekulatömegű tartományban. A humán könnyhöz hasonlóan a patkánykönnyben is detektálhatók a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjék, a lizozim, az albumin, a laktoferrin és az IgA.

Ezen fehérjék mennyiségében nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és a PACAP-kezelt állatok között. Azonban már 1 órával a kezelés után egy új csúcsot figyeltünk meg a 60-70 kDa tartományban mindegyik PACAP-kezelt állat könnyében. Ez a fehérjecsúcs 6 és 24 órával a kezelés után is megfigyelhető volt.

Az SDS gélelectrophoresis során a kontroll és PACAP-kezelt minták között talált különbségek megegyeztek a microchippel detektált különbségekkel, melyek az 50-70 kDa molekulatömegű tartományban voltak a legkifejezettebbek. Az e tartományba eső fehérjék azonosítását MALDI TOF tömegspektrometriával végeztük el.

A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a PACAP kezelés hatására az adott molekulásúly tartományban a könny fehérje-összetétele jelentősen megváltozott. Egyes fehérjék/peptidek eltűntek, míg mások megjelentek. Jelentősen megváltozott a könnyben található keratintípusok aránya is. A PACAP hatására olyan keratinhomológok jelentek meg, melyek C-terminálisainak aminosavszekvenciái egymáshoz nagyon hasonlítanak, de a kontroll mintáktól jelentősen eltértek. A PACAP-kezelt állatok mintáiban megjelent a keratin 1, keratin 10, az 1. típusú cytoskeletal keratin 13, a KA10 keratin 1-es típusa. A PACAP kezelés hatására nem expresszáldott a keratin komplex 2 basic gene 5, a 2. típusú cytoskeletal keratin 5. A keratin komplex 2 basic gene 6a isoform 1, az aldehid dehidrogenáz class 3 enzim és az aktin mindkét mintában megtalálható volt, de mennyiségük csökkent a PACAP hatására.

PACAP vizsgálata humán könnyben és csarnokvízben

A PACAP jelenlétét humán könnyből sikerült igazolnunk MALDI tömegspektrometriai analízissel. Ezzel szemben a humán csarnokvíz minták nem tartalmaztak PACAP-ot a kimutathatósági határon belül.

II.3. Megbeszélés

Kimutattuk, hogy a PACAP kezelés megváltoztatja a könny fehérje összetételét. A könny proteomika előnyös a noninvazív mintavétel miatt és egy ígéretes technika humán betegségek biomarkereinek azonosítására. A PACAP-hoz hasonlóan több neuropeptidről, pl. a substance P és a szomatosztatin, kimutatták már, hogy megváltoztatják bizonyos fehérjék szekréciónját a könnyben.

A MALDI TOF tömegspektrometria érzékeny, nagy hatékonyságú technika, mely jól alkalmazható különböző biológiai minták fehérjeösszetételének vizsgálatára. Eddig csak pheochromocytoma-sejtek (PC12) fehérjéinek, PACAP kezelés utáni megváltozott

összetételét vizsgálták tömegspektrometriás elemzéssel. Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP kezelés hatására a könnyben az 50-70 kDa tartományban számos keratintípus expressziója megváltozott. A keratin 1 és 10 a felszíni differenciálódott epitheliális sejtekre jellemző. Ezen fehérjék mennyiségét a PACAP kezelés növelte. A különböző corneális keratinok szerepe a reepithelizációban jelentős, melyeket növekedési faktorok is befolyásolnak. A keratin 13 mennyisége is emelkedett PACAP hatására, ugyanezt tapasztalhatjuk A vitamin jelenléte esetén is.

Az aldehid dehidrogenáz a cornea átlátszóságában játszik szerepet, megakadályozza a citotoxikus anyagok felszaporodását és védi a corneát az UV sugárzással szemben. PACAP hatására ennek az enzimnek a termelődése csökkent, ami meglepő, hiszen a PACAP általában citoprotektív tulajdonságokkal bír. Ugyanakkor az aldehid dehidrogenáz sebgyógyulásban betöltött szerepe valóban minimális és működése inkább az endothel réteghez kötődik.

Kísérletünk második részében a PACAP jelenlétét vizsgáltuk a könnyben és a csarnokvízben. Kimutattuk, hogy a PACAP jelen van a könnymintákban, míg a csarnokvízben nem volt tömegspektrometriai kimutathatósági határon belül. A peptid könnyben való előfordulása valószínűsíti, hogy a PACAP a szem felszíni szöveteiben fontos szerepet játszik.

A PACAP általános sejtvédő és regenerációt elősegítő peptid, melynek endogén védő hatását több kísérlet is bizonyította. Többek között PACAP génhíányos (knockout) egerekben azt találták, hogy PACAP hiányában a sérülések fokozott mértékű károsodást idéznek elő. Az endogén PACAP szintje sérülések hatására az idegrendszer számos területén megemelkedik, mely ugyancsak ezt az endogén védő szerepet támasztja alá. Ennek alapján feltételezzük, hogy a könnyben előforduló PACAP a cornea regenerációjában és sérülés elleni védelmében játszhat szerepet. Ezt a lehetőséget második kísérletsorozatunkban vizsgáltuk.

III. A PACAP hatásának vizsgálata a cornea regenerációjára

III.1. Anyagok és módszerek

Hím Wistar patkányokat használtunk (250-300 gramm, n=20). Az állatok szemét 50 mg/kg pentobarbital ip. adása után mikroszkóp alatt megvizsgáltuk, majd cornea trepánnal 2 mm-es átmérőjű körkörös hámsérülést ejtettünk a cornea centrumában. A körbevágott epitheliumot csipesszel, operációs mikroszkóp alatt távolítottuk el.

PACAP27 20, 100 és 200 µg-ját oldottuk fel 800 µl desztillált vízben. Ezzel a cseppel kezeltük a szemeket a beavatkozás után közvetlenül és minden 2. órában. Minden egyes csepp

1, 5, ill. 10 μg PACAP27-et tartalmazott 40 μl vivőanyagban. Mindegyik állatnak csak az egyik szemét csepegtettük PACAP27-tel, a másik szem kontroll sérült szemként szerepelt és desztillált víz „kezelésben” részesült a fenti időintervallumokban. Normál, intakt corneákat 2 állatból távolítottunk el. Korábbi tanulmányok alapján, a szemeket a beavatkozás után 6 órával vizsgáltuk, amikor már szignifikáns sebgyógyulás volt jelen.

A kísérleti állatokat túlaltattuk, majd szemeiket eltávolítottuk és olyan csészébe helyeztük, mely lágy plasztilinnel volt kitöltve, biztosítva ezzel a pozicionálást. A corneákat fluorescein festékkel festettük meg (Haag-Streit, Svájc), majd Nikon FX-A fotomikroszkóppal lefényképeztük őket. A mikroszkóp digitális kamerával volt összekötve (Spot RT color kamera). A sérült terület nagyságát Spot advance softwearral számítottuk ki. Statisztikai próbaként student-t próbát alkalmaztunk. Szignifikánsnak tekintettük a kontroll és kezelt corneák között a különbséget, ha $p < 0,05$. A corneákat rutin hisztológiai festésnek is alávetettük. 4%-os formaldehides fixációt követően 10 μm vastagságú szeleteket készítettünk és haematoxin-eosinnal festettük meg.

Western blot vizsgálathoz cornea abráziót végeztünk a korábban leírt módon, a corneákat 4 óra múlva eltávolítottuk a protektív mechanizmusok megítélése céljából ($n=7$). Normál, intakt corneák is eltávolításra kerültek 4 állatból, hogy az Akt és az ERK1/2 foszforiláció alapértékét megmérjük. A mintákon Western blot analízist végeztünk. A membránokat 4 $^{\circ}\text{C}$ -on 12 órán át a következő antitestekkel kezeltük: foszfospecifikus anti-Akt-1 Ser473, foszfospecifikus anti-ERK1/2 Thr202/Tyr204 és anti-Aktin. A membránokat 6x5 percig mostuk ($\text{pH}= 7,5$), majd anti-nyúl tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitestet használtunk, a komplexet kemoluminescenciával tettük láthatóvá. Az eredményeket NIH ImageJ programmal értékeltük. A kísérletet minimum 4 alkalommal ismételtük. Statisztikai analízis Anova próbával történt, melyet Bonferroni post hoc analízis követett. Szignifikánsnak tekintettük az eredményeket, amennyiben $p < 0,05$.

III.2. Eredmények

6 órával a cornea sérülése után a gyógyulási folyamat a fluoresceinnel festett szemeken valamennyi állatban jól látható volt. A sérült terület a Spot advance programmal számolva szignifikánsan kisebb volt az 5, ill. 10 μg PACAP27-tel kezelt corneákban, mint a kontroll szemekben. A hámosodás mértéke kb. 20% ($p < 0,05$) és 25% ($p < 0,01$) az 5 és 10 μg PACAP-pal kezelt szemeken. A PACAP kisebb dózisa (1 μg) szintén csökkentette a sérülés méretét (15%), de ez nem volt szignifikáns, összehasonlítva a kontroll corneákkal. Ezeket az eredményeket a rutin szövettani vizsgálat is megerősítette.

Mind az Akt, mind az ERK1/2 foszforilációja alacsony szinten maradt a normál corneákban. Az ERK1/2 foszforilációja szignifikánsan megemelkedett cornea abráziót követően. A foszforilációt PACAP27 adása szignifikánsan fokozta mind a sértetlen, mind a sértett corneákban. Az Akt foszforilációját önmagában a sérülés nem fokozta, de PACAP27 szignifikánsan stimulálta a foszforilációját mind az intakt, mind a sérült mintákban.

III.3. Megbeszélés

Korábban nem volt ismeretes, hogy a PACAP hatással lenne a cornea epitheliális regenerációjára. Vizsgálatunkban a lokális PACAP27 kezelés serkentette a corneális sebgyógyulást. Számos vizsgálat bizonyítja, hogy a PACAP elsősorban PAC1 receptorokon keresztül fejti ki ezen citoprotektív hatását. A cAMP indukálta folyamatok fontos szerepet játszanak a corneális sebgyógyulásban és homeosztázisban. A cAMP fokozni tudja a növekedési faktorok hatását, ezt epidermális növekedési faktor és corneális epidermális migráció kapcsolatában írták le. Számos növekedési faktor esetében igazolódott, hogy fontos szerepük van a cornea sebgyógyulásában.

A foszfatidil-inositol-3-kinase (PI3K)-Akt útvonalak és a mitogén aktivált protein kinase (MAPK) család a corneális sebgyógyulás fő mediátorai. Az Akt aktivitását írták le számos olyan növekedési faktor működésekor (inzulin-szerű növekedési faktor 1,2 típusa, epidermális növekedési faktor, hepatocita növekedési faktor), melyek a corneális mitózisra, migrációra és sebgyógyulásra hatnak. Ehhez hasonlóan a MAPK család tagjai, beleértve az ERK1/2-t is, fontos szerepet játszanak e folyamatokban. Igazolták, hogy a gliasejt eredetű növekedési faktor (GDNF) ERK1/2-t indukál a cornea epithelsejtjeiben. A PACAP erőteljes cAMP stimuláló hatását már ismerjük, de az ERK foszforilációját serkentő hatását is leírták retinában, endothel sejtekben, astrocytákban, corticalis neuronokban és kisagyi szemcsesejtekben. Igazolták a PACAP Akt foszforilációt fokozó hatását cardiomyocytákban, monocytákban és szimpatikus neuron sejtekben.

Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a PACAP a corneában is stimulálja e folyamatokat és fontos szerepet játszik a cornea reepithelizációjában.

IV. A PACAP védő szerepének vizsgálata UV-A sugárzás indukálta retina degenerációban

IV.1. Anyagok és módszerek

Kísérleteinkben felnőtt hím Wistar patkányokat (250-300 gramm) használtunk. Pentobarbital anesztheziában pupillatágítást végeztünk 1 csepp 5%-os phenylephrinnel és egy csepp cyclopentolattal (10 mg/ml). Az UV-A expozíció előtt 570 nm hullámhosszúságú fényrel pozicionálást és fókuszálást végeztünk, a retina besugárzását a Calkins és Hochheimer által leírt módszerrel számítottuk ki. Az UV-A sugárzás 45 percig (315-400 nm, 1.5 mW/cm²) tartott, XLPS-10 típusú Xenon lámpával, majd 100 pmol PACAP38-at 5 µl fiziológiás sóoldatban feloldva intravitreálisan adtunk a jobb szembe (n=22). A másik, kontroll szembe 5 µl vivőanyagot adtunk. A besugárzást követő 1, 2 vagy 7 nappal az állatokat túlaltatás után enucleáltuk, a szemeket hideg foszfát puffer fiziológiás sóoldatba raktuk és foszfátpufferben oldott 4%-os paraformaldehidben fixáltuk. A szöveteket Durcupam ACM gyantába ágyasztuk be, 2 µm-es szeletekre vágtuk és toluidin kézzel megfestettük. Digitális CCD kamerával Spot program segítségével fényképeket készítettünk a megfelelő retinaterületekről. A méréseket NIH Image 1.55 programmal végeztük. A mérési minták minimum 3 állatból származtak, preparátumonként legalább 6-6 szövetblokkot tartalmaztak (n=2-5 mérés 1 szövetblokkon belül). A következő paramétereket mértük: (1) a retina vastagsága a külső és belső határhártya között (OLM-ILM); (2) a külső és belső magvas, a külső és belső rostos réteg vastagsága (ONL, INL, OPL, IPL); (3) az 500 µm²-re eső sejtek száma az ONL-ben; (4) az 500 µm²-re jutó sejtek száma az INL-ben; (5) a ganglion sejtek rétegében (GCL) a 100 µm retinahosszra jutó sejtek száma. Statisztikai értékelést ANOVA teszttel végeztünk, melyet Tukey-B post hoc analízis követett.

IV.2. Eredmények

A kontroll készítményekben a patkányretina minden rétege jól elkülöníthető volt. Megfigyelhető a ganglionsejtek rétege, a belső rostos réteg, melyet a bipoláris sejtek, amacrin és horizontális sejtek rétege követ (belső magvas réteg). Ezt követi a vékony külső rostos réteg és a photoreceptorok sejttestjeinek több sora (külső magvas réteg). Végül következik a photoreceptor réteg és a pigmentepithelium (PE). Már 1 nappal a besugárzás után megfigyelhető a retina károsodása. Főleg az ONL-ben számos sejt sérült, de üres sejttesteket találtunk az INL-ben is. Az ONL, INL sejttestjeinek száma szignifikánsan csökkent (42% és 27% a kontrollhoz viszonyítva). A retina rétegeinek vastagsága csökkent. Az intravitreális PACAP kezelés hatására az ONL megőrizte struktúráját és a GCL sejtszáma is változatlan maradt.

2 nappal a besugárzás után degeneratív elváltozások figyelhetők meg az ONL és INL rétegekben. A sejtszám mindkét rétegben markánsan csökkent (42% és 47%) a kontroll retinához képest. Piknotikus sejteket, üres sejttesteket láthatunk mindkét magvas rétegben. Intravitreális PACAP szignifikánsan emelte az ONL és INL sejtszámát (70% és 74%).

A GCL-ben a retina 100 μm -ére jutó sejtszám kb. 50%-a volt a normál retináénak. A PACAP-pal kezelt szemekben a GCL-ben a sejtek száma szignifikánsan emelkedett az UV-A sugárzásnak kitett retinához képest.

1 héttel a diffúz UV-A sugárzást követően súlyos károsodást figyeltünk meg a retinában. Az ONL-ben és az INL-ben a degeneráció jeleit láthatjuk, piknotikus sejteket, üres sejttesteket és az egyes rétegek struktúra vesztését. A photoreceptorok külső tagjai is szignifikánsan károsodtak. Az IPL erősen megduzzadt és ebben a rétegben a bipoláris sejtek károsodását jelző denz pontokat lehet látni. A sejtek száma szignifikánsan csökkent az ONL-ben (42%), az INL-ben (33%) és a GCL-ben (34%).

Az intravitreális PACAP kezelés szignifikáns védelmet biztosított, a retina rétegei jól kivehetők voltak, a magvas rétegekben a sejtek épek maradtak, az IPL duzzadása csökkent. Az ONL-ben a sejtszám 60%-ra, az INL-ben 47%-ra, a GCL-ben 56%-ra nőtt és a retina vastagsága is szignifikánsan nőtt.

IV.3. Megbeszélés

Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a PACAP protektív hatású az UV-A sugárzás kiváltotta retinális károsodással szemben. A sérülés fő jelei a photoreceptorok degenerációja, amit sejtszámuk csökkenése mutatott. Későbbi időpontokban a bipoláris és ganglionsejtek száma is jelentősen csökkent. A fenti változások mindegyike csökkenthető volt PACAP intravitreális adásával. Neuroprotektív hatása mellett a PACAP szignifikánsan csökkentette az oedémát 7 nappal az irradiációt követően, ezt a hatását korábban ischaemiás agyi oedémánál figyelték meg. A PACAP indukálta retinoprotekció általános neuroprotektív mechanizmusra utal és nem fenotípus specifikus sejtprotekciónak. A retina egyes neuronjait jelző sejtmarkereket használva nem találtak korrelációt a PACAP sejt típus specificitása és protektív hatása között sem MSG, sem ischaemia által kiváltott degenerációban. A PACAP retinát érő különböző noxákkal szembeni hatékonysága szintén támogatja ezt a megfigyelést. Jelen vizsgálatunk - melyben először mutattuk ki a PACAP diffúz UV-A besugárzás elleni védő hatását – is azt bizonyítja, hogy a PACAP széleskörű retinoprotektív hatással bír.

V. Új eredmények összefoglalása

1. Igazoltuk, hogy a PACAP megtalálható a könnyben és a szisztémásan adott PACAP megváltoztatja a könny összetételét.
2. Igazoltuk, hogy a lokális PACAP kezelés elősegíti a cornea reepithelizációját és fokozza két védő molekula, az ERK1/2 és az Akt aktivációját.
3. Igazoltuk, hogy az intravitreális PACAP kezelés védő hatást fejt ki UV-A sugárzás indukálta retina degenerációban.

VI. A dolgozat alapjául szolgáló saját publikációk

1. Brubel R., Reglodi D., Jambor E., Koppan M., Varnagy A., Biro Zs., Kiss P., Gaal V., Matkovits A., Farkas J., Lubics A., Bodis J., Bay Cs., Veszpremi B., Tamas A., Nemeth J., Mark L.: Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. J Mass Spectr 2011; 46: 189-194. (IF: 3.289)
2. Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Marton Zs., Griecs M., Hamza L., Gaal V., Biro Zs., Tamas A., Hild G., Nyitrai M., Toth G., Reglodi D., Gabriel R.: Effects of PACAP in UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats. J Mol Neurosci 2011; 43: 51-57. (IF: 2.992)
3. Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Racz B., Gallyas F., Tamas A., Gaal V., Marton Zs., Gabriel R., Reglodi D.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the retina: focus on the retinoprotective effects. Ann NY Acad Sci 2010; 1200: 128-139. (IF: 2.847)
4. Gaal V., Mark L., Kiss P., Kustos I., Tamas A., Kocsis B., Lubics A., Nemeth V., Nemeth A., Lujber L., Pytel J., Toth G., Reglodi D.: Investigation of the effects of PACAP on the composition of tear and endolymph proteins. J Mol Neurosci 2008; 36: 321-329. (IF: 2.061)

PhD alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 11.189

Egyéb publikációk

1. Szijártó Zs., Gaal V.: Zárt zúgú glaucoma és fejfájás. Cefalea Hungarica 1998/4.
2. Gaal V., Szijártó Zs.: Akut zárt zúgú glaucoma néhány érdekes esete. Cefalea Hungarica 1998/4.

3. Szapáry L., Szóts M., Horváth B., Márton Zs., Késmárky G., Juricskay I., Gaal V., Pálfi A., Koltai K. és Tóth K.: A kardiovaszkuláris rizikófaktorok hatása az agyérbetegek haemorheológiai viszonyaira. (Effects of cardiovascular risk factors on hemorheologic parameters in cerebrovascular patients) *Orv Hetil* 2003; 144: 1085-1090.
4. Szapáry L., Horváth B., Márton ZS., Alexy T., Késmárky G., Szóts M., Gaal V., Pálfi A., Koltai K., Juricskay I., Tóth K.: A krónikus ischaemiás agyérbetegségek haemorheológiai jellemzői. *Agyérbetegségek* 2003, 9: 2-7.
5. Szijártó Zs., Gaal V., Kuhn F., Kovács B.: Ideghártyába csapódott réz idegentest *Szemészet* 2003; 140: 101-103.
6. Szapary L., Horvath B., Marton Zs., Alexy T., Demeter N., Szots M, Kesmarky G., Juricskay I., Gaal V., Czopf J., Toth K.: Hemorheological disturbances in patients with chronic cerebrovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004: 31 (1):1-9. IF: 0,63
7. Ertl T., Gyarmati J., Gaal V., Szabó I., Sárkány I., Funke S., Vida G.: A hyperglycaemia szerepe koraszülöttek retinopathiájának kialakulásában. *Orv Hetil* 2007; 148 (48): 2279-2284.
8. Gaal V., Kilar F., Acs B., Szijarto Zs., Kocsis B., Kustos I.: In vitro study of antibiotic effect on bacterial adherence to acrylic intraocular lenses. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2005; 45: 125-130. IF:1,588
9. Ertl T., Gyarmati J., Gaal V., Szabó I.: Relationship between Hyperglycemia and Retinopathy of Prematurity in Very Low Birth Weight Infants. *Biol Neonate* 2005; 89 (1):56-59. IF: 1,36
10. Schvöller M., Gaal V., Gaál J., Szijártó Zs.: Retinal detachment as a late complication of retinopathy of prematurity. *Acta Medica Ophth Lituanica* 2006.04.
11. Mike A., Gaal V., Németh A., Kövér F., Komoly S., Illés Z.: Susac-szindróma: egy ritka autoimmun kórkép neurológiai, pszichiátriai, szemészeti, fül-orr-gégészeti és neuroradiológiai vonatkozásai. *Orv Hetil* 2007; 148 (19): 897-895.
12. Szijarto Zs., Gaal V., Kovacs B., Kuhn F.: Prognosis of penetrating eye injuries with posterior segment intraocular foreign body. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246 (1):161-165. IF: 1,59
13. Gyarmati J., Tokes-Fuzesi M., Kovacs G.L., Gaal V., Vida G., Ertl T.: Fructosamine Levels and Hyperglycemia in Preterm Neonates. *Neonatology* 2008; 95 (4): 267-270. IF: 1,92

14. Vekasi J., Koltai K., Gaal V., Toth A., Juricskay I., Kesmarky G.: The effect of aspirin on hemorheological parameters of patients with diabetic retinopathy. Clin Hemorheol Microcirc 2008, 39 (1-4): 385-389. IF: 0,977

Idézhető előadáskivonatok

1. Szapary L., Horvath B., Martom Zs., Alexy T., Demeter N., Szots M., Klabuzai A., Juricskay I., Gaal V., Czopf J., Toth K. Hemorheological disturbances in chronic phase cerebrovascular patients. Cerebrovasc Dis 2002; 13 (Suppl.3), 37
2. Szapary L., Szots M., Horvath B., Marton Zs., Alexy T., Kesmarky G., Klabuzai A., Juricskay I., Gaal V., Czopf J., Toth K. The effects of cardiovascular risk factors on hemorheological parameters in patients with chronic cerebrovascular diseases. Eur J Neurol 2002; 9 (Suppl. 2), 169
3. Gaal V., Horváth A., Szabó I., Kovács B.: Az alacsony gesztációs korú újszülöttek ellenőrző vizsgálatai és kezeléseik során nyert tapasztalataink. Szemészet 2003; 140 (Suppl. 1), 95
4. Szapary L., Horvath B., Marton ZS., Alexy T., Kesmarky G., Szots M., Juricskay I., Gaal V., Palfi A., Koltai K., Czopf J., Toth K. Hemorheological parameters and cardiovascular risk factors of stroke. Clin Neurosci 2003; 56, 261
5. Aschermann Zs., Szots M., Szapary L., Luckl J., Szabo I., Gaal V., Hudak S., Kover F. Posttraumatic carotid-cavernous fistula (case-report). 8 th Congress of the European Federation of Neurological Societies, Paris, 4-7 September, 2004, Eur J Neurol 2004; 11 (Suppl. 2), 153
6. Gaal V., Kustos I., Kiss P., Mark L., Tamas A., Toth G., Reglodi D.: Effects of PACAP on protein composition of rat tear film. J Mol Neurosci 2007; 33: 340.
7. Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Reglodi D., Gaal V., Tamas A., Molnar A., Lubics A., Szabo K., Gabriel R.: The neuroprotective effects of PACAP in several models of neurodegeneration in the rat retina. Clin Neurosci/Ideggy. Szml. 2008; 61(9-10): 329.
8. Kiss P., Mark L., Gaal V., Reglodi D., Vaczy A., Tamas A., Helyes Zs., Hashimoto H., Baba A., Shintani N., Opsahl M., Braaten N., Biro Zs., Lubics A.: Investigation on the presence of PACAP in rodent and human tear film and its possible functions in rats and PACAP knockout mice Frontiers in Neuroscience Conference Abstract: IBRO International Workshop 2010. doi: 10.3389/conf.fnins.2010.10.00100.

Konferencia szereplések

1. Biro Zs., Gaal V.: Connection between anterior capsulotomy and IOL decentration ESCRS Kongresszus Innsbruck, Ausztria 1993.
2. Biró Zs., Gaal V.: Elülső capsulotomia és IOL decentralizáció kapcsolata. Magyar szemorvos Társaság Kongresszusa, Gyöngyös 1993.
3. Szapáry L., Gaal V., Magyar H., Pál E.: Acut féloldali látásromlással jelentkező betegek klinikai vizsgálata Ifjú Neurológusok Kongresszusa, Debrecen 1994.
4. Gaal V., Sziujártó Zs.: Congestív glaucoma esetek retrospektív elemzése és differenciál diagnózisa. V. Fejfájás Kongresszus, Balatonalmádi 1998.
5. Sziujártó Zs., Gaal V.: Congestív glaucoma és fejfájás. V. Fejfájás Kongresszus, Balatonalmádi 1998.
6. Gaal V., Pál E., Szapáry L.: Acut féloldali látászavarral jelentkező betegek retrospektív vizsgálata. Magyar Szemorvos Társaság Kongresszusa, Kaposvár 1998.
7. Szapary L., Szots M., Horvath B., Marton Zs., Alexy T., Kesmarky G., Klabuzai A., Juricskay I., Gaal V., Czopf J. and Toth K.: The effects of cardiovascular risk factors on hemorheological parameters in patients with chronic cerebrovascular diseases. 6th Congress of European Federation of Neurological Societies, Vienna, Austria 2002.
8. Szapary L., Horvath B., Marton Zs., Alexy T., Demeter N., Szots M., Klabuzai A., Juricskay I., Gaal V., Czopf J. and Toth K.: Hemorheological disturbances in chronic phase cerebrovascular patients. 11th European Stroke Conference, Geneva, Switzerland 2002.
9. Aschermann Zs., Szóts M., Szapáry L., Czopf J., Szabó I., Gaal V., Hudák I., Kövér F.: Traumás carotico-cavernosus fistula esete. Magyar Stroke Társaság VI. Kongresszusa, Zalakaros 2003.
10. Gaal V., Horváth A., Szabó I., Kovács B.: Az alacsony gesztációs korú újszülöttek ellenőrző vizsgálatait és kezeléseik során nyert tapasztalataink. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Budapest 2003. Legjobb fiatal előadói díj
11. Sziujártó Zs., Gaal V., Kuhn F., Kovacs B.: Intravitreal copper foreign body EVRS Kongresszus, Sopron 2003.
12. Gaal V., Kustos I., Sziujártó Zs., Kocsis B.: Baktériumok műlencséken való megtapadásának vizsgálata és klinikai tapasztalatok. Magyar Műlencse Implantációs Társaság Kongresszusa, Keszthely 2004. Legjobb fiatal előadó 3. díj

13. Ertl T., Gyarmati J., Gaal V.: Relationship between hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. European Society for Developmental Perinatal and Paediatric Pharmacology 9th Biennial Congress., Marburg, Germany 2004.
14. Gaál V., Szijártó Zs., Kiss Gy.: Excimer laser kezelés után kialakuló ideghártya leválások. Magyar Műlencse Implantációs és Refraktív Sebészeti Társaság Kongresszusa, Keszthely 2005.
15. Gaál V., Gyarmati J., Szabó I., Schvöller M., Hermann L.: Hyperglycaemia lehetséges szerepe a ROP kialakulásában. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Szeged 2005.
16. Schvöller M., Szijártó Zs., Gaál V., Gaál J.: Ablatio retinae, mint a ROP késői szövődménye- esetismertetés. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Szeged 2005.
17. Szasz O., Horvath G., Faludi P., Szepes E., Varju C., Gaal V.: Seronegative spondylarthritis linked with acne inversa and scleritis. Deutsch-Ungarischen Dermatologischen Gesellschaft 6. Kongresszusa, Münster 2006.
18. Gaal V., Szijarto Zs., Kustos I., Kocsis B.: Microbiological aspects of bacteria causing acut postoperative endophthalmitis after cataract surgery. EVRS ASRS, Cannes 2006.
19. Szijarto Zs., Gaal V., Kuhn F., Kovacs B.: Prognosis of penetrating eye injuries with posterior segment intraocular foreign body. EVRS ASRS, Cannes 2006.
20. Schvöller M., Gaal V., Gaal J., Szijarto Zs.: Retinal detachment as a late complication of ROP, case report. Word ROP Meeting, Vilnius 2006.
21. Gaal V., Atlasz T., Babai N., Tamas A., Kiss P., Szalai M., Gabriel R., Koppan M., Reglodi D.: Morphology of the retina in toxic and hypoxic/ischemic retinal degeneration and possible protection by the neuropeptide PACAP in the neonatal rat. Joint Congress of SOE/AAO, Vienna, Austria 2007.
22. Gaál V., Kustos I., Kiss P., Márk L., Tamás A., Reglódi D.: A PACAP hatása a könnyfilm fehérje összetételére patkányban. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Debrecen 2007.
23. Gaál V., Szijártó Zs., Kovács B.: Zóna I retinopathia - kezelési eredmények, indikációk. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Debrecen 2007.
24. Gaal V., Kustos I., Kiss P, Mark L., Tamas A., Toth G., Reglodi D.: Effects of PACAP on protein composition of rat tear film. 8th Symposium on VIP, PACAP, and Related Peptides, Manchester and Burlington, Vermont, USA 2007.

25. Gaal V., Reglódi D., Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Hamza L., Ságvári O., Tamás A., Lubics A., Gábrriel R.: A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) protektív hatása UV besugárzás indukálta retinális degenerációban. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Pécs 2008.
26. Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Reglodi D., Gaal V., Tamas A., Molnar A., Lubics A., Szabo K., Gabriel R.: The neuroprotective effects of PACAP in several models of neurodegeneration in the rat retina. 4th Pannonian Symposium on Central Nervous System Injury, Pécs 2008.
27. Atlasz T., Szabadfi K., Reglódi D., Kiss P., Gaal V., Tamás A., Tóth G., Szabó K., Molnár A., Gábrriel R.: The neuroprotective effects of PACAP in several models of neurodegeneration in the rat retina. Magyar Idegtudományi Társaság XII. Konferenciája, Budapest 2009.
28. Atlasz T., Szabadfi K., Molnár A., Kiss P., Reglódi D., Márton Zs., Hamza L., Gaal V., Tamás A., Hild G., Nyitrai M., Gábrriel R.: Effects of PACAP in different UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats. Magyar Idegtudományi Társaság XII. Konferenciája, Budapest 2009.
29. Atlasz T., Szabadfi K., Molnar A., Kiss P., Reglodi D., Marton Zs., Hamza L., Gaal V., Tamas A. Hild G., Nyitrai M., Gabriel R.: PACAP protects rat retina from UV-A radiation-induced degeneration. Satellite Symposium of the 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Yakushima, Japan 2009.
30. Kiss P., Mark L., Gaal V., Reglodi D., Vaczy A., Tamas A., Helyes Zs., Hashimoto H., Baba A., Shintani N., Opsahl M., Narve B., Lubics A.: Investigation on the presence of PACAP in rodent and human tear film and its possible functions in rats and PACAP knockout mice. Satellite Symposium of the 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Yakushima, Japan 2009.
31. Reglodi D., Kiss P., Szabadfi K., Racz B., Horvath G., Farkas J., Banki E., Csanaky K., Gaal V., Lubics A., Tamas A., Gabriel R., Atlasz T.: Review of the retinoprotective effects of PACAP (plenary lecture) 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Kagoshima, Japan 2009.
32. Kiss P., Márk L., Gaal V., Reglódi D., Váczy A., Tamás A., Helyes Zs., Hashimoto H., Baba A., Shintani N., Opsahl M., Braaten N., Biró Zs., Lubics A.: Investigation on the presence of PACAP in rodent and human tear film and its possible functions in rats and PACAP knockout mice. IBRO International Workshop, Pécs 2010.
33. Kiss P., Farkas J., Matkovits A., Brubel R., Gaal V., Biro Zs., Reglodi D., Tamas A.,

- Lubics A.: The effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the corneal regeneration of rats. Membrán-transzport konferencia, Sümeg 2010.
34. Lubics A., Farkas J., Matkovits A., Gaal V., Biro Zs., Reglodi D., Tamas A., Kiss P.: The effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the corneal regeneration of rats. 7th Forum of European Neuroscience (FENS), Amsterdam 2010.
35. Gaál V.: Laser és kryopexia alkalmazása a ROP kezelésében. Magyar Perinatológiai Társaság IX. Kongresszusa, Pécs 2010.
36. Farkas J., Mester L., Kovacs K., Reglodi D., Matkovits A., Gaal V., Biro Zs., Szabo A., Racz B., Szabadi K., Lubics A., Tamas A., Atlasz T., Shioda S., Nakamachi T., Kiss P: Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in corneal epithelial regeneration and signal transduction in rats. 5th International Peptide Symposium, Kyoto, Japan 2010.
37. Farkas J., Nakamachi T., Wada Y., Seki T., Tsuchikawa D., Hori M., Tsuchida M., Yoshikawa A., Kagami N., Imai N., Matkovits A., Gaal V., Kiss P., Reglodi D., Shioda S.: Effect of PACAP on mouse corneal healing. 10th International Symposium on VIP-PACAP and Related Peptides, Eilat, Izrael 2011.

Könyvfejezet: Gaál V.: Az akut retinopathia prematurorum (ROP) kezelése Perinatológiai továbbképzés Szerk. dr Pajor Attila, Underground Kiadó 2011. ISBN 978-963-08-2400-2

Köszönetnyilvánítás

A közös munkában nemcsak az a jó, ha sikerül valami értékeset, esetleg maradandót alkotni, hanem az is, hogy olyan emberekkel találkozhatunk és köthetünk barátságot, akikkel egyébként talán sosem sodort volna össze az élet. Ezek a legfontosabbak, amiért köszönetet kell mondanom mindenkinek, akik segítettek ennek a dolgozatnak a megszületését.

A legnagyobb köszönettel Reglődi Dórának tartozom hozzáértő segítségéért, szakértő felügyeletéért és baráti támogatásáért.

Köszönöm az Anatómiai Intézet munkatársainak az önzetlen segítséget: Lubics Andrea, Kiss Péter, Tamás Andrea köszönet Nektek az együtt végzett munkákért! Köszönöm Csernus Valér Professzor Úrnak is a támogatást. Köszönettel tartozom Gábrriel Róbert Professzor Úrnak és lelkes csapatának a szövettani feldolgozásokért; külön köszönet Atlasz Tamásnak, Szabadfi Krisztinának a kísérletekben nyújtott segítségért.

Köszönetet mondok Kustos Ildikónak, Márk Lászlónak az önzetlen segítségért.

Köszönöm Biró Zsolt Professzor Úr és a Szemklinika dolgozóinak támogatását, külön köszönet a „drámacsoportnak” a lelkesítésért.

Hálás vagyok a családnak a biztos háttérért és a türelemért.

**Experimental investigation of the ophthalmological effects
of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)**

Ph.D. thesis

Valéria Gaál MD

Supervisors: Dóra Reglódi, MD, Ph.D., DSc

Andrea Lubics, MD, Ph.D.

**University of Pécs
Department of Anatomy
Pécs, 2011**

I. Introduction

PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide)

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide was isolated from ovine hypothalamus in 1989 based on its potential to increase adenylate cyclase activity in the pituitary gland. PACAP is a member of the secretin/glucagon/VIP family, and has 67% sequence similarity with VIP. It occurs in two amidated forms, with 38 and 27 amino acid residues. The primary structure of PACAP-38 is identical among all mammalian species examined, and it also shows marked similarity with lower vertebrates and invertebrates, with differences in only 1-4 amino acids. This suggests that the structure of PACAP has remained very conserved throughout evolution and it may reflect its importance in fundamental functions in the nervous system. PACAP is localized not only in the central but in the peripheral nervous system and in non-neural tissues as well, such as in the endocrine glands, cardiovascular, urogenital, respiratory and gastrointestinal tracts.

The biological actions of PACAP

PACAP is a pleiotropic peptide, with various functions in the nervous system and peripheral organs. Since its discovery, it became evident that it is more than „just” a hypothalamo-hypophyseal regulator. In the nervous system, it has important roles in the development, synaptic plasticity, neuronal excitability, it influences various behavioral symptoms and stimulates cognitive functions. Its neuroprotective effects have been proven in numerous cell cultures and in vivo systems. In vitro, it protects cells against various toxic agents, like glutamate, ethanol, oxidative stress, ceramide, hypoxia. In vivo, it protects in animal models of traumatic brain injury, Parkinson's disease and stroke. Its endocrine effects are also well-known: it plays a central regulatory role in hypothalamic-hypophyseal hormone secretion, and functions of the adrenal gland and gonads. In addition, PACAP plays a role in circadian rhythmic functions, in smooth muscle contraction, secretion of exocrine glands, influences central and peripheral pain responses and has general anti-inflammatory effects.

PACAP receptors

The receptors for PACAP are G protein-coupled receptors and can be divided into two main groups: PAC1 receptor, which binds PACAP with higher affinity than VIP, and VPAC receptors (VPAC1 and VPAC2), which bind PACAP and VIP with similar affinities.

PACAP and its receptors occur in various tissues of the eye. PACAP immunoreactivity has been found in the lacrimal gland, choroid, iris, ciliary body, conjunctiva, sclera, cornea. PACAP is present in the trigeminal, sphenopalatine and ciliary ganglia.

PACAP in the eye

Numerous studies have described the presence of PACAP and its receptors in the whole retina and in the different layers. PACAP immunopositive fibers can be observed in the plexiform layers, while immunopositive cell bodies are displayed in the ganglion cell layer and inner nuclear layer. PACAP immunoreactivity displays circadian alteration in the chicken retina. In mammals, the retinohypothalamic tract originates from a subset of retinal ganglion cells, and it mainly synapses in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus, which is the biological clock of mammalian species. A subset of these ganglion cells is intrinsically photosensitive due to the expression of melanopsin. Melanopsin is exclusively expressed in PACAP-containing cells. The PACAP expression of ganglion cells is under the control of dopamine. PACAP immunoreactivity appears at early stages of retinal development. PACAP can be detected in the inner nuclear layer of embryonic chicken retinas from embryonic day 8 (E8). In the rat, PACAP mRNA appears in the ganglion cell layer at E20.

The selective PACAP receptors are responsible for approximately 80% of PACAP binding in the retina. Radioligand binding studies have revealed the existence of PACAP receptors also in the human fetal retina, which has been confirmed by the detection of PACAP receptor mRNA in RT-PCR experiments. Retinoblastoma cells also contain PACAP receptors. PAC1 receptor mRNA and protein expression have been described in all layers of neonatal rat retina. Similarly, PAC1 receptor and its mRNA can be detected in chicken retinas already at E6. The mRNA for all PACAP receptors has been reported in the retinal pigment epithelium.

Strong expression of PAC1 receptor mRNA is in the ganglion cell layer, inner nuclear layer and nerve fiber layer, while weaker expression is in the inner- and outer plexiform, the outer nuclear layers and the outer segments of the photoreceptors. Other studies have confirmed the presence of VPAC receptors in the retina. In culture, PAC1 receptor expression has been shown in the Muller cells. PACAP occurs not only in the retina, but also in the iris, ciliary body and conjunctiva. It is known that PACAP acts on vasodilation, smooth muscle contraction, inflammatory reactions and cAMP production in the eye. It is also expressed in the trigeminal, ciliary and sphenopalatine ganglia, through which the secretion of the glands can be influenced by PACAP.

The aims of the thesis are: (1) to investigate the effects of PACAP on the protein composition of the tear and whether PACAP occurs in the tear and in the aqueous humor; (2) to investigate the effects of PACAP on corneal regeneration; and (3) to investigate whether PACAP has protective effects in UV light-induced retinal degeneration.

I.1. The regulation of the lacrimal gland is complex, influenced both by hormonal and neuronal (sympathetic and parasympathetic) effects. Tear production is increased upon mechanical or chemical irritation, or strong light. Emotions can also evoke increased tear production involving higher cortical centers. Stimuli are conveyed from the oculomotor nucleus, ciliary ganglion through the lacrimal branch of the trigeminal nerve (parasympathetic) or from the superior cervical ganglion (sympathetic). The ratio of the water phase increases with higher levels of sodium and lower levels of potassium in the above-described reflexory tear production. Other components can also be changed depending on the provoking stimuli. Certain proteins remain the same, while others change, like the antibacterial lysozyme and lactoferrin. PACAP immunoreactive fibers have already been shown in the lacrimal gland, originating from the sphenopalatine ganglion, where 10% of the neurons contain PACAP. The effects of PACAP in the salivary and other exocrine glands make it probable that PACAP exerts comparable effects in the morphologically similar lacrimal gland. For example, PACAP increases saliva production, with increased protein secretion, while it inhibits Ca^{2+} channels. Substances increasing cAMP or cGMP levels, influence lacrimal production. Therefore, it is hypothesized that PACAP affects the functioning of the lacrimal gland.

The aim of the first experimental part was to investigate whether systemic PACAP administration influences the protein composition of rat tear and whether PACAP occurs in the tear. For comparison, we also investigated the presence of PACAP in the aqueous humor.

I.2. The sensitivity of the cornea plays a very important role in the protection of the eye bulb. It is associated with its rich sensory innervation, reacting to different stimuli in varying pattern. The corneal epithelium is constantly exposed to physical, chemical and biological stimuli. It reacts to injuries with fast recovery. In the area of injury, keratocytes suffer apoptosis, but new cell proliferation starts from the periphery. The balance between apoptotic and proliferation pathways is very important in reepithelization. Several growth factors, transcription factors and cytokines play a role in these processes. Inappropriate corneal healing can be observed in several diseases, such as diabetes, contact lens wearing and refractive eye surgery complications.

PACAP is a trophic factor during the development of the nervous system, while it plays a role during regeneration. The corneal effects of PACAP are less known, in spite of the fact that PACAP and its receptor have already been shown in the cornea. In a previous study, PACAP27 was given in form of eye drops, and enhanced nerve growth was observed after corneal injury in rabbits. Although this study focused only on neuronal regeneration, it drew the attention to the possibility of giving PACAP in form of eye drops. We hypothesize that PACAP can facilitate corneal wound healing. The aim of the second part of the study was to investigate the effects of PACAP on corneal reepithelization and in addition, the expression of two protective molecules (Akt and ERK1/2).

I.3. The retina is an extended part of the central nervous system. In our experiments, we used rat retina, which is similar to the human retina in its vascularization and in the organization of the layers (3 main nuclear and 2 fibrous layers). The first report on the retinoprotective effects of PACAP was a study showing that PACAP protected cultured retinal neurons against glutamate toxicity. Elevated glutamate concentrations lead to excitotoxic cell death in the nervous system, including apoptotic cell death in the retina. 10nmol/L-1 μ mol/L PACAP27 and -38 attenuated the 1 mmol/L glutamate-induced cell death in a dose-dependent manner. This was antagonized by cotreatment with the PACAP antagonist PACAP6-38, and the PKA inhibitor H-89. Anisomycin induces cell death within the neuroblastic layer of retinal explants from newborn rats. A dose-dependent prevention of cell death was found by PACAP38 treatment.

Glutamate, as the main excitatory transmitter in the central nervous system, is able to exert toxic effects when present at high concentrations. The excitotoxic injury of the retina is a major factor in several retinal diseases, such as glaucoma and ischemic retinopathy. Monosodium glutamate (MSG), when given systemically to newborn rats, passes the blood-retina barrier and leads to severe retinal degeneration. The internal to outer limiting membrane distance is approximately half of the normal retinas, measured 3 weeks after birth. With the almost entire disappearance of the IPL, the fusion of the INL and GCL can be observed. The number of cells/100 μ m in the GCL is also approximately half of normal retinas, as measured in light microscopical sections from central retina areas of the same eccentricities, where GCL appears in one row.

Although PACAP has been shown to cross the blood-brain barrier, systemic PACAP treatment leads only to a slight amelioration of the retinal morphology following MSG-induced degeneration. However, local PACAP38 treatment, reached by intravitreal injections of 1-100 pmol PACAP, results in a significant attenuation of this degeneration. While 1 pmol

PACAP leads to a slight improvement, treatment with 100 pmol PACAP results in an almost intact appearance of the retina. Similar protection can be achieved by PACAP27 treatment. The PACAP antagonists, PACAP6-38 and PACAP6-27 leads to a further aggravation of the MSG-induced degeneration, indicating that endogenous PACAP plays an important protective role in the natural defense of the retina against damage. PACAP is protective against excitotoxic retinal lesion both in newborn and in adult rats. PACAP has also been shown to be protective in several other models of retinal injuries. It has protective effects in retinal ischemia, induced by high intraocular pressure or bilateral carotid artery occlusion. Similarly, PACAP protects against optic nerve transection, kainic acid-induced degeneration and diabetic retinopathy. Given that the retinoprotective effects of PACAP are well established, we tested whether it could protect against UV light-induced retinal degeneration.

Global atmospheric changes may increase the level of ultraviolet radiation on earth. This would contribute to enhanced chronic exposure of the eye to UV light. Long wavelength UV-A (315-440 nm) can pass through all optic media and cause photochemical damage to the retina. Exposure to sun-light, particularly UV-A, along with use of certain photoactive pharmaceuticals, has been associated with phototoxicity in humans. Phototoxicity involves generation of reactive oxygen species such as H_2O_2 , singlet oxygen and hydroxyl radicals after interaction of light, especially UV-A, with photosensitive pharmaceuticals. The reactive oxygen species can attack protein and DNA to form oxidative adducts. Free radical scavengers such as glutathione and vitamins C and E are thought to serve as components of an endogenous defense system that helps to limit light-induced retinal damage. Another potential source of endogenous neuroprotection is the presence of neurotrophic factors in the retina. The aim of the third experimental part was to investigate the effects of PACAP in UV-A-induced retinal lesion.

Detailed research description

II. Investigation of the effects of PACAP on the tear composition

II.1. Materials and Methods

Rat tear specimens were collected by application of sterile filter paper strips before saline or PACAP injection 1, 6 and 24h later (n=5 at each time point). Wistar rats (200-250 gr) were injected intravenously with 20 μ g PACAP38 dissolved in 100 μ l physiological saline. The experiment was repeated three times. All procedures were performed in accordance with the

ethical guidelines approved by the University of Pécs (No: BA02/2000-31/2001). Paper strips were placed directly into 0.5 ml sterile Eppendorf tubes and stored at -20°C until examination. Proteins absorbed in the paper strips were eluted by 30 µl of sample buffer (0.125 M Tris/HCl, pH=6.8, 4% sodium dodecyl sulfate, and 10% β-mercaptoethanol). Samples were prepared for microchip electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer System). Protein 230 Plus LabChip Kits were applied in the study. Microcapillaries of the protein chips were filled up with the gel-dye mix of the kit. The linear polymer of the gel ensured the separation of the protein-SDS complexes on the basis of their molecular mass, within the 14 and 230 kDa range. The molecular weight markers (ladder) of the LabChip Kit were applied for the molecular weight determination of the unknown proteins. Evaluation of the results was performed by the Protein 230 assay software. All samples were electrophoretized at least three times.

The spots of interest were excised from the gel, placed in Eppendorf tube, and destained by washing three times for 10 min in 200µl of 50% (v/v) acetonitrile, 50 mM NH₄CO₃ solution. The gel pieces were dehydrated at room temperature and covered with 10 µl of trypsin (0.04 mg ml⁻¹) in Tris buffer (2.0 mM, pH 8.5) and left at 37°C overnight. The spots were crushed, and peptides were extracted in an ultrasonic bath (15 min) with a 15-µl aqueous solution of acetonitrile and formic acid (49:50:1 v/v/v). After extraction, the solution of the peptides was lyophilized and redissolved in distilled water. The aqueous solutions of the lyophilized protein tryptic digests were loaded onto the target plate by mixing 1.0 µl of each solution with the same volume of a saturated matrix solution, prepared by dissolving α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid (1:2, v/v). The mass spectrometer used in this work was an Autoflex II time-of-flight (TOF/TOF) operated in the reflector for matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) TOF peptide mass fingerprint or LIFT mode for MALDI TOF/TOF with an automated mode using the FlexControl software. The instrument uses a 337-nm pulsed nitrogen laser. External calibration was performed in each case using Bruker Peptide Calibration Standard. The sequence homology of the identified keratins was analyzed by Clustal W II programme.

II.2. Results

The quantity of the proteins eluted from the filter paper strips was sufficient for the analysis of the protein composition by microchip technology. Protein content of the rat tear showed a complex pattern; several protein peaks could be detected within the 14 to 80 kDa molecular mass region. Characteristic proteins of the tear, as lysozyme, albumin, immunoglobulin A,

and lactoferrin could be detected in the rat samples. There were no significant alterations observed in the quantity of the characteristic proteins after PACAP administration. However, as early as 1 h after PACAP injection, an extra peak appeared in the protein profile, in the high molecular weight range (60-70 kDa), in all rat tear samples. This alteration was detected in all samples after 6 and 24 h in higher amounts. Marked differences could be detected on SDS gel between the control and PACAP-treated samples, including the 50-70 kDa range that we found altered with electrophoretic microchip. Therefore, in the present study, only the spots of 50-70 kDa were excised and further analyzed by MALDI TOF mass spectrometry. It was found that several proteins were altered in the examined molecular range. A few of these proteins identified in the given molecular range were repressed by PACAP, while others were stimulated. Among both the repressed and stimulated proteins, different types of rat keratin were identified. The keratin types expressed in samples from PACAP-treated rats show a great homology in the C-terminal amino acid sequence, and they are different from those found in control samples. The keratin homologues stimulated by PACAP were keratin 1; keratin 10; keratin type I cytoskeletal 13, keratin type I, KA10. Those repressed by PACAP treatment were keratin complex 2, basis, gene 5, and keratin, type II cytoskeletal 5. Keratin complex 2, basis, gene 6a isoform I was found in both samples, but its expression was reduced by PACAP. Furthermore, PACAP treatment suppressed the expression of actins and aldehyde dehydrogenase class 3.

II.3. Discussion

This part of the study showed that PACAP treatment caused alterations in the protein composition of tear film. Analysis of body fluid proteome has become one of the most promising approaches to discovery of biomarkers for human diseases. Investigating the tear proteome is especially advantageous because of the noninvasive sample collection. Several neuropeptides have already been shown to influence tear secretion and composition, such as substance P and somatostatin. MALDI TOF mass spectrometry is a sensitive and high-throughput technique. The effects of PACAP on a complex protein map using mass spectrometry has only been demonstrated in PC12 cells, which showed more than a hundred proteins altered by PACAP. Our results show that, in the 50-70 kDa molecular weight range, PACAP induced expression of certain keratins, while other keratins, along with beta and gamma actins, aldehyde dehydrogenase, showed a decrease after PACAP treatment. Keratins 1 and 10 are associated in pairs and are characteristic for suprabasal terminally differentiating epithelial cells, similarly to keratin 13, all of which were induced by PACAP

treatment. Different corneal keratins are suggested to play roles in corneal integrity, renewal, and re-epithelialization. The class 3 aldehyde dehydrogenase showed a marked decrease after PACAP treatment. Aldehyde dehydrogenase has also been described to be responsible for preventing accumulation of cytotoxic products in the cornea and in protecting against ultraviolet radiation.

We also showed that PACAP is present in the human tear, but not in the aqueous humor. The presence of PACAP in human tear suggests that PACAP plays an important role in the superficial tissues of the eye. As PACAP is a generally accepted cytoprotective peptide, it is conceivable that it plays a role in the regeneration of the cornea, the possibility of which is studied in the second part of the dissertation.

III. Effects of PACAP in corneal epithelial regeneration

III.1. Materials and methods

Male Wistar rats (250-300 gr, n=20) were used. Animals were anesthetized with 50 mg/kg pentobarbital and eyes were examined under dissecting microscope. Corneal abrasion was performed with corneal trepan, causing a 2-mm diameter circular injury in the center of the cornea, and the encircled corneal epithelium was removed using microsurgical forceps under the dissecting microscope.

PACAP27 (20, 100 and 200 µg) was dissolved in 800 µl distilled water. Eyes were treated immediately after surgery and every two hours with these drops, with each drop containing 1, 5 and 10 µg PACAP27 in 40 µl vehicle. Only one eye was treated with PACAP27 in each animal, the other eye received distilled water treatment at the same time intervals, serving as control injured eyes. Normal, intact corneas were removed from 2 animals. According to preliminary studies eyes were examined 6 hours after injury, when significant wound healing was already present.

Rats were sacrificed under anesthesia and eyes were stained with fluorescein dye. Eyes were removed and placed in cup of filled with soft modeling clay, ensuring a central positioning. Photographs were taken using a Nikon FXA photomicroscope attached to a digital camera (Spot RT Color camera). The injured area was calculated using Spot advance software. Statistical analysis was performed using Student's t-test, and differences were considered significant when $p < 0.05$ between control and PACAP-treated corneas. After the fluorescein-stained photographs were taken, corneas were also further processed for routine histological staining. Following fixation in 4% paraformaldehyde, serial, 10 µm thick sections were made and stained with haematoxylin-eosin.

For Western blot studies, corneal abrasion was performed as above, and corneas were removed after 4 h in order to investigate protective signaling pathways during wound healing in corneal injury (n=7). Normal, intact corneas were also removed from 4 animals in order to investigate the baseline phosphorylation of Akt and ERK1/2. Samples were processed for Western blot analysis. Membranes were probed overnight at 4 °C with the following primary antibodies: phospho-specific anti-Akt-1 Ser473, phosphospecific anti-ERK1/2 Thr202/Thr204 and anti-aktin. Membranes were washed 6x5 min in Tris buffered saline (pH=7.5) containing goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The antibody-antigen complexes were visualized by means of enhanced chemiluminescence. Results were quantified by means of NIH ImageJ program. All experiments were performed at least four times. Statistical comparisons were made using the ANOVA test followed by Bonferroni's post hoc analysis. Differences with P values below 0.05 were considered as significant.

III.2. Results

Six hours after corneal abrasion, the healing process was clearly visible in fluorescein-stained eyes in all animals. The area of injury, as calculated with Spot advance program, was significantly smaller in corneas treated with 5 or 10 µg PACAP27 than in control, vehicle-treated eyes. The decrease was approximately 20% and 25% in the corneas treated with 5 or 10 µg PACAP27, respectively. The smallest dose of PACAP (1 µg) also led to a decreased injury size, however, difference between PACAP- and vehicle-treated corneas was not statistically significant. These results were confirmed by routine histological staining. Both Akt and ERK1/2 phosphorylation was detected at low levels in normal corneas. ERK1/2 phosphorylation was significantly induced after the corneal abrasion. Phosphorylation was significantly stimulated by PACAP27 in both uninjured corneas and after abrasion. Akt phosphorylation was not induced by the injury alone. PACAP27 significantly stimulated Akt phosphorylation in both intact and in injured corneas.

III.3. Discussion

In this part of the study, we provided evidence that topical PACAP application enhances corneal regeneration. This effect of PACAP was not known before. These results are in accordance with the generally accepted cytoprotective and regenerative functions of PACAP. Our study also showed that topical PACAP application induced ERK1/2 and Akt signaling in the injured cornea. Based on numerous studies, PACAP, mainly via its PAC1 receptor, exerts cytoprotective effects in a number of cells/tissues. The cAMP-induced pathways are

important in corneal functions such as wound healing and homeostasis. cAMP can also potentiate the effects of growth factors, such as it has been described for epidermal growth factor during corneal epithelial migration. Several growth factors have been shown to play important roles during corneal wound healing. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Akt pathways and the mitogen activated protein kinase (MAPK) family are major pathways governing corneal epithelial healing. The involvement of Akt activity has been described in the action of several growth factors, such as insulin-like growth factor 1 and 2, epidermal growth factor and hepatocyte growth factor, during corneal mitosis, migration and wound healing. Similarly, MAPKs, including ERK1/2, play important roles in these processes. It has been described that glial cell-derived neurotrophic factor induces ERK1/2 in corneal epithelial cells. The effects of PACAP, a strong stimulator of cAMP, have been reported earlier on these signaling molecules in other cells/tissues, for example in the retina, in endothelial cells, in astrocytes, cortical neurons and in cerebellar granule cells. Similarly, the effects of PACAP on Akt phosphorylation have been reported in cardiomyocytes, monocytes and in sympathetic neuronal cells. Our present results show that these pathways are stimulated by PACAP in the cornea and they may play important roles during corneal epithelial wound healing.

IV. Effects of PACAP in UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats

IV.1. Materials and methods

Adult Wistar rats (250-300 gr, n=22) were used. Animals were anesthetized with 50 mg/kg pentobarbital and pupils were dilated with one drop of phenylephrine 5% and one drop of cyclopentolate (10 mg/ml). A slow flow NaCl 0.9% prevented drying of the cornea. Before exposure to UV-A light, retinal image position and focus were established with 570 nm light. Retinal irradiance was calculated by the method described by Calkins and Hochheimer. The UV-A radiation source was 45 minutes (315-400 nm, 1.5 mW/cm²) with a XLPS-10 Xenon lamp. PACAP38 (100 pmol, was dissolved in 5 µl saline) injection was given immediately following UV-A radiation with a Hamilton syringe into the treated (right) eye. The same volume of vehicle was injected into the left eye, serving as a control, non-treated eye.

One day, 2 days and 1 week after irradiation the animals were sacrificed with an overdose of pentobarbital and were enucleated. The eyes were immediately dissected in ice-cold phosphate buffered saline and fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1 M phosphate buffer. Tissues were embedded in Durcupam ACM resin, cut at 2 µm and stained with toluidine blue. Photographs were taken with a digital CCD camera using the Spot program, from central retina areas of nearly same eccentricities. Measurements were taken

from digital photographs with the NIH Image 1.55 program. Samples for measurements derived from at least six tissue blocks prepared from at least three animals (n=2-5 measurements from one tissue block). The following membrane were measured: 1. cross-section of the retina from the outer limiting membrane to the inner limiting membrane (OLM-ILM); 2. the width of the outer and inner nuclear and and outer and inner plexiform layers (ONL, INL, OPL, IPL); 3. the number of cells in the ONL/500 μm^2 ; 4. the number of cells in the INL/500 μm^2 ; 5. the number of cells/100 μm section length in the ganglion cells layer (GCL). Statistical comparisons were made using the ANOVA test followed by Tukey-B' post hoc analysis.

IV.2. Results

In control preparations all characteristic layers of the rat retina were well visible. Under the pigment epithelium, the photoreceptor layer (PL) is followed by several rows of photoreceptor cell bodies, forming the outer nuclear layer (ONL). A thin outer plexiform layer (OPL) is followed by 4-5 rows of the cell bodies of bipolar, amacrine and horizontal cells (INL). Finally, the inner plexiform layer (IPL) is followed by cells in the ganglion cell layer (GCL).

The retinal structure, especially the ONL, was slightly damaged after 1 day of the diffuse UV-A exposure. During this short period, a number of cells were damaged, supported by the detection of the empty cell body shapes in the ONL and the INL. As a consequence, the number of cells in the ONL and INL significantly decreased (42% and 27% of controls, respectively). The thickness of retinal layers was also reduced. However, intravitreal PACAP treatment retained the structure of ONL and the number of GCL was unchanged compared to the control retina.

Two days after the radiatio, degenerative alteration in the ONL and INL could be detected. The number of cells in both layers was markedly reduced compared to control retinas. Pycnotic cells and empty cell body-shapes spaces could be observed in the nuclear layers. Intravitreal PACAP administration caused a significant improvement in the retinal cell numbers. The number of cells/100 μm in the GCL was also approximately 50% of the normal retinas. In retinas with intravitreal PACAP treatment, the number of cells in the GCL was significantly higher than in control eyes.

Severe degeneration could be observed 1 week after diffuse UV-A exposure. Several neurodegenerative structures were detected in the ONL and INL. The outer segments of the photoreceptors also showed signs of degeneration. The IPL was markedly swollen and in this

layer scattered dense dots were seen representing degenerating bipolar cells terminals. The cell number in the ONL, INL and also in the GCL was significantly diminished. Significant protection could be noted following intravitreal PACAP treatment also in this case. The retinal layers were distinct, the cells were intact in the nuclear layers and the swelling of the IPL was reduced. The cell number in the ONL, INL and GCL was increased and an improvement could be found in the whole retinal thickness.

IV.3. Discussion

In the present study we showed that PACAP is protective against UV-A-induced retinal injury. The major signs of damage were the degeneration of photoreceptors, as shown by the decrease of their cell number. At later time points, the number of bipolar cells and of ganglion cells was also markedly decreased. All these changes could be, at least partially, counteracted by PACAP administration. In addition to the neuroprotection, in the present study we also observed that PACAP decreased the significant edema in the retina 7 days after irradiation, a similar observation has been made in ischemic brain edema.

The PACAP-induced retinoprotection rather reflects a general neuroprotective mechanism than a phenotype-specific cellular protection. Using several different cell markers we could not find a correlation between cell type specificity and the protective effects of PACAP. The efficacy of PACAP against a diverse array of noxious stimuli in the retina also supports this hypothesis. Our study shows, for the first time, that PACAP has neuroprotective effects in the retina against diffuse UV-A-induced degeneration, a finding that adds to the numerous other observations on the retinoprotective effects of the peptide.

V. Summary of new results

1. We showed the presence of PACAP in human tear. PACAP, injected systemically, alters the composition of tear proteins.
2. We provided evidence that local administration of PACAP enhances corneal wound healing. In addition, PACAP stimulates the activation of two protective factors, ERK and Akt.
3. We proved that intravitreal PACAP treatment is protective in UVA light-induced retinal degeneration.

VI. Publications related to the thesis

1. Brubel R., Reglodi D., Jambor E., Koppan M., Varnagy A., Biro Zs., Kiss P., Gaal V., Matkovits A., Farkas J., Lubics A., Bodis J., Bay Cs., Veszpremi B., Tamas A., Nemeth J., Mark L.: Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. J Mass Spectr 2011; 46: 189-194. (IF: 3.289)
2. Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Marton Zs., Griecs M., Hamza L., Gaal V., Biro Zs., Tamas A., Hild G., Nyitrai M., Toth G., Reglodi D., Gabriel R.: Effects of PACAP in UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats. J Mol Neurosci 2011; 43: 51-57. (IF: 2.992)
3. Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Racz B., Gallyas F., Tamas A., Gaal V., Marton Zs., Gabriel R., Reglodi D.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the retina: focus on the retinoprotective effects. Ann NY Acad Sci 2010; 1200: 128-139. (IF: 2.847)
4. Gaal V., Mark L., Kiss P., Kustos I., Tamas A., Kocsis B., Lubics A., Nemeth V., Nemeth A., Lujber L., Pytel J., Toth G., Reglodi D.: Investigation of the effects of PACAP on the composition of tear and endolymph proteins. J Mol Neurosci 2008; 36: 321-329. (IF: 2.061)

Total impact factor of publications related to the thesis: 11.189

Acknowledgements

I am grateful for the colleagues and friends who helped my work.

Special thanks to Dora Reglodi, who supervised my PhD research.

I thank other researchers of the Department of Anatomy: Peter Kiss, Andrea Lubics and Andrea Tamas. I also thank Professor Valer Csernus for his support as the leader of the doctoral program. Sepcial thanks to Professor Gabriel and his research team, especially Tamas Atlasz and Krisztina Szabadfi for their help in retinal histological studies.

I thank Ildiko Kustos and Laszlo Mark for their help in tear protein analysis and mass spectrometry measurements.

I also thank Professor Zsolt Biro for his support.

This work could not have been done without the support of my family.