

# **Neuropeptidek retinoprotektív hatásának vizsgálata**

**Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**Dr. Werling Dóra**

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Anatómiai Intézet

Témavezetők:	Dr. Reglődi Dóra, Dr. Biró Zsolt
Programvezető:	Dr. Csernus Valér
Doktori iskola vezetője:	Dr. Szekeres Júlia

Pécs, 2016

## BEVEZETÉS

A PACAP pleiotróp és multifunkcionális neuropeptid, melynek neuroprotektív és neurotrófikus hatását széles körben tanulmányozzák. A PACAP szerepet játszik élettani folyamatok szabályozásában, így például a táplálkozás, alvás, termoreguláció, és a cirkadián ritmus szabályozásában, illetve mindemellett serkenti a memóriát is. A PACAP hatásait G-proteinhez kötött receptorokon keresztül fejti ki. A receptorok közül először a VPAC1-et, majd a VPAC2-öt fedezték fel. Már a receptorok izolálásakor világossá vált, hogy a VPAC receptorokat a VIP és a PACAP is egyaránt aktiválja. A PACAP specifikus receptorát, a PAC1 receptort csak ezt követően azonosították. A szelektív PACAP receptor felelős a PACAP retinális kötődésének 80%-áért.

A PACAP neuronális védő szerepe először *in vitro* kísérletekben, toxikus hatásokkal (glutamát, 6-OHDA, oxidatív stressz) szemben igazolódott. A PACAP neuroprotektív hatását számos *in vivo* állatkísérletben is igazolták, mint például agyi ischaemia, agyi trauma, gerincvelő sérülés, és Parkinson kór állatkísérletes modelljeiben. Későbbi tanulmányokban is megerősítették a neuroprotekciónban betöltött szerepét cerebrális ischaemiás állapotokban, valamint különböző szervek ischaemiás folyamataiban: a vesében, a bélrendszerben és a szívben. A kétoldali arteria carotis communis lekötése lehet időszakos illetve végleges, ami ischaemiás/reperfúziós változásokhoz vagy krónikus retinális hipoperfúzióhoz vezet, mely a krónikus retinadegenerációk állatkísérletes modelljeként szolgál. A PACAP retinoprotektív hatása mindegyik ischaemiás modellben igazolódott. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiban kimutatta, hogy műtétet követően az intravitreálisan beadott PACAP1-38 jelentős protektív hatással bírt. A retina rétegeinek szerkezete és vastagsága a kontroll állatokéhoz hasonló volt, amit morfológiai és morfometriai vizsgálatokkal is igazoltak. Intravitreális beadást követően a PACAP citoprotektív hatását tapasztalták a ganglion sejtek rétegében is.

Az alacsony biológiai hasznosíthatósága és a gyors degradációja miatt a PACAP terápiás felhasználása nehezített. Emiatt rövidebb aminosavszámú fragmenseinek és a peptidcsalád többi tagjának vizsgálata szükséges, ami a problémának egyik lehetséges megoldása lehet. A fehérje N-terminális végéből lehasított aminosavakkal létrehozott fragmensek általában antagonistá hatással bírnak, bár néhány tanulmány agonista tulajdonságról számol be sejt illetve szövet típustól függően. A C-terminálnál megrövidített peptid fragmensei különböző erősséggel kötődnek a receptorokhoz. Munkacsoportunk korábban már kimutatta, hogy a PACAP6-38, mint a PACAP legszélesebb körben alkalmazott antagonistája, súlyosbítja az excitotoxikus retinakárosodás mértékét. A VIP a PACAP-hoz

hasonlóan retinoprotektív hatású retinális ischaemiát követően, azonban a PACAP hatásához hasonló mértékű protekcióhoz magasabb dózisa van szükség. A peptidcsalád többi tagjának, többek közt a szekretinnek és a glükagonnak számos hatását és tulajdonságát korábban már vizsgálták, azonban a retinában kifejtett esetleges protektív hatásairól nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat.

Korábbi eredményeink alátámasztották a PACAP potenciális terápiás felhasználásának lehetőségét ischaemiás károsodásokban. Az eddigi vizsgálatokban a PACAP-ot intravitrealisan alkalmaztuk, ami az esetleges későbbi klinikai felhasználás során korlátozó tényező lehet. Klinikai terápiás lehetőségként, az intravitrealisan bejuttatott hatóanyag elfogadott néhány súlyos betegség esetében, ilyen például az időskori macula degeneráció bizonyos formája, és a súlyos diabeteses retinopathia. Számos előnyét élvezhetjük a szemcseppes formának a klinikai hétköznapiak során, az intravitrealis alkalmazással szemben. A PACAP topikális alkalmazásának vizsgálatára nemrég szintén sor került. A száraz szem szindróma tüneteiként szolgáló csökkent könnytermelésre és corneális keratinizációra kifejtett hatását vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy a PACAP fokozza a könnytermelést, és csökkentette a corneális keratinizáció mértékét.

## CÉLKITŰZÉS

1. Vizsgálataink egyik felében célul tűztük ki a PACAP kisebb aminosavszámú fragmenseinek (PACAP 4-13, 4-22, 6-10, 6-15, 11-15, 20-31), valamint a PACAP peptid családjába tartozó szekretin és glükagon retinoprotektív hatásának vizsgálatát ischaemiás retinopathiában.
2. Arra kerestük a választ, hogy a permanens bilaterális carotis communis lekötést követően a szemcseppes forma (mely könnyebb klinikai felhasználást tenne lehetővé) képes-e az eddig ismert retinoprotektív hatás kifejtésére, mind a PACAP1-27 mind az 1-38 alkalmazása során.

# 1. SZEKRETIN, GLÜKAGON ÉS KÜLÖNBÖZŐ PACAP FRAGMENTEK VIZSGÁLATA ISCHAEMIÁS RETINOPATHIÁBAN

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 1. Az artéria carotis communis permanens lekötésével létrehozott retinadegenerációs modell

Kísérleteink során 3-4 hónapos Wistar patkányokat (sham n=7, BCCAO n=32) vizsgáltunk, melyeket standard laboratóriumi körülmények között, igény szerinti táplálék- és folyadékellátás mellett tartottunk 12 órás világos-sötét ciklusban. Az állatok elhelyezését, gondozását és a kísérletek kivitelezését a jelenleg érvényes etikai szabályoknak és az egyetemi protokollnak megfelelően végeztük (BA02/2000-31/2011, Pécsi Tudományegyetem). Izoflurános altatás alatt, centrális nyaki metszést követően, mindkét oldali arteria carotis communist 3-0-s fonállal permanensen leköttük (BCCAO). Az áloperált állatok (sham) képezték az intakt kontrollt: altatást követően nyaki metszést végeztünk, majd sebüket bezártuk. A műtét végét követően a corneán ejtett metszés után a jobb szembe 30 G Hamilton tűvel intravitreálisan PACAP1-38-at, illetve különböző PACAP fragmenteket (PACAP4-13, 4-22, 6-10, 6-15, 11-15, 20-31), szekretint valamint glükagont juttattunk, mindegyiket 100pM/5µl koncentrációban. Az ischaemiás kontrollt képező bal szemekbe intravitreálisan azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot juttattunk.

Két héttel a műtétet követően az állatokat túlaltattuk, majd a szemeken rutin szövettani vizsgálatot, valamint morfometriai analízist végeztünk. A retina rétegei közül a következőket mértük: külső határhártya és a belső határhártya közötti távolságot (OLM-ILM), a külső magvas réteget (ONL), a külső szinaptikus réteget (OPL), a belső magvas réteget (INL), a belső szinaptikus réteget (IPL), valamint 100µm-es retinahosszon a ganglionsejtek rétegében a sejtek számát és az INL rétegben 500µm<sup>2</sup>-en található sejtek számát. Morfometriai vizsgálataink során kapott eredményeink értékeléséhez egy-utas ANOVA tesztet használtunk, amit Tukey-B féle post hoc analízis követett.

## EREDMÉNYEK

A BCCAO által előidézett retinakárosodás mértéke a retinát alkotó különböző rétegek vastagságának csökkenésében nyilvánult meg. A mért értékeket a sham operált állat retinájához viszonyítottuk. A károsodás mértéke rétegenként eltérő volt. A legnagyobb fokú rétegvastagság csökkenést az OPL rétegben tapasztaltuk. A műtétet követően a ganglion sejtek rétegében nagymértékű sejtvesztést tapasztaltunk. A műtét hatására kialakult károsodás mértékét az intravitrealisan beadott PACAP1-38 jelentősen csökkentette. A PACAP1-38 kezelést követően a retinarétegek vastagsága hasonló volt a sham állatoknál mért értékekhez. Szignifikánsan nagyobb volt a retina különböző rétegeinek vastagsága az intravitrealisan PACAP1-38-al kezelt szemek esetében, a műtéten átesett kontroll retinákhoz képest. Legnagyobb mértékű különbséget az OPL rétegben tapasztaltunk, azonban az ONL és INL rétegvastagságban is számottevő különbség mutatkozott a fentebb említett két csoport között.

Intravitrealisan beadott PACAP fragmensek (PACAP4-13, 4-22, 6-10, 6-15, 11-15, 20-31) nem változtatták meg szignifikáns mértékben a retina szerkezetét. Ezeknél a retinánál a szövettani képeken jól látható volt a sejtes (INL, ONL), valamint szinaptikus (IPL, OPL) rétegek vastagságának csökkenése, hasonlóan az ischaemiás kontroll retinákhoz. A sham állathoz viszonyítva a PACAP fragmens terápiában részesült retinák esetében a sejtszám is szignifikánsan csökkent a GCL és INL rétegekben. Az intravitrealisan beadott PACAP6-10 és 4-13 esetében nagyobb mértékű károsodás volt megfigyelhető az INL és IPL rétegekben az ischaemiás kontrollhoz képest. A PACAP családjába tartozó szekretin és glükagon sem bizonyult retinoprotektívnek ischaemiás retinopathiában. A BCCAO okozta retina rétegvastagság csökkenése hasonló mértékű volt az intravitrealisan szekretinnel vagy glükagonnal kezelt retinákéhoz. Ezt az eredményt a morfológiai analízis is alátámasztotta.

## **2. SZEMCSEPPKÉNT ALKALMAZOTT PACAP1-27 ÉS 1-38 VIZSGÁLATA ISCHAEMIÁS RETINOPATHIÁBAN**

### **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **1. Bilaterális carotis communis műtétet követő szemcseppes terápia**

Kísérleteinkben 3-4 hónapos hím Wistar patkányokat (PACAP1-27:  $\Sigma n=130$ :  $n=43$  szövettani analízis,  $n=11$  immunhisztokémiai analízis,  $n=20$  immuno-blot analízis,  $n=28$  citokin array,  $n=28$  elektroretinográfiás vizsgálat; PACAP1-38:  $n=12$  szövettani analízis,  $n=4$  immunhisztokémiai analízis) vizsgáltunk. A fentebb már részletezett BCCAO-s műtéti eljárást alkalmaztuk ebben a kísérletben is. A műtétet követően az állatok az első szemcseppes terápiában részesültek. Az áloperált állatok (sham) képezték a kontroll csoportot, ők is ugyanúgy részesültek szemcseppes kezelésben. A szemcsepp 400 $\mu$ l vivőanyagban feloldott 10 $\mu$ g PACAP1-27-et tartalmazott (1 $\mu$ g/csepp). Vivőanyagként fiziológiás sóoldatot, aqua ad iniectabilia, solvens viscosa pro oculo guttis cum thiomersalot és solutio ophthalmica cum benzalkoniót alkalmaztunk. Az állatok jobb szemét az éppen aktuális vivőanyagban feloldott PACAP1-27-el kezeltük, míg a bal szemükbe az aktuálisan alkalmazott vivőanyagot cseppentettük. Kezelésünk öt napig tartott, naponta kétszer cseppentettünk. A szövettani vizsgálatot követően az egyedülként hatásosnak bizonyuló solutio ophthalmica cum benzalkonióval végeztük a további kísérleteket. A PACAP1-38-at csak a solutio ophthalmica cum benzalkonióban oldottuk fel (1 $\mu$ g/csepp koncentrációban).

#### **2. A PACAP1-27 és 1-38 szemcseppel kezelt retinák hisztológiai analízise**

A szövettani analízishez 43 állatot: PACAP1-27:  $n=7$  sham,  $n=24$  BCCAO; PACAP1-38:  $n=3$  sham,  $n=9$  BCCAO vizsgáltunk. Két héttel a műtét után az állatokat túlaltattuk, és szemük eltávolítását követően a szemszerleget kipreparáltuk, majd 4%-os paraformaldehidben (PFA) fixáltuk. A szövettani protokollt a fent már részletesen leírt módszer szerint végeztük. A retina rétegei közül a következőket mértük: a külső és a belső határhártya távolságát, a külső magvas réteget, a külső szinaptikus réteget, a belső magvas réteget, a belső szinaptikus réteget, valamint 100 $\mu$ m-es retinahosszon, a ganglionsejtek rétegében a sejtek számát. Kétutas ANOVA tesztet alkalmaztunk, amit Fischer féle post hoc analízis követett.

### **3. PACAP1-27 és 1-38 radioaktív jelölése**

Ezt a vizsgálatot amerikai kollaborációban végeztük William A. Banks, és Therese S. Salameh segítségével (Education, and Clinical Center, Veterans Affairs Puget Sound Health Care System, Seattle, WA, USA; Division of Gerontology and Geriatric Medicine, Department of Medicine, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA). A PACAP1-27-et valamint 1-38-at 125-ös jódidzotóppal (<sup>125</sup>I) jelöltünk, laktoperoxidáz módszert alkalmazva. Hím CD-1 egereket uretránnal altattunk, majd PACAP1-27 és 1-38 szemcseppel kezeltünk (1x10<sup>6</sup> cpm/szem solution ophthalmica cum benzalkonioban). Különböző időpontokban mértük a PACAP koncentrációját a carotisból származó vérből, a szemből vett, valamint az agyból származó mintákból. A mintavétel időpontjai a következők voltak: 5, 30, 60 és 120 perc. Minden mérésnél n=3-6 egeret használtunk.

### **4. Gliális fibrilláris savas protein expressziójának mérése PACAP1-27 és 1-38 szemcseppes kezelést követően**

Két héttel a műtétet követően 4 sham - és 7 BCCAO-n átesett állat (PACAP1-27: n=2 sham, n=5 BCCAO; PACAP1-38: n=2 sham, n=2 BCCAO) szeméit eltávolítottuk, majd a szemszerlegeiket kipreparáltuk, és felszálló cukoroldatba helyeztük őket. Óránként egyre töményebb koncentrációjú szacharóz oldatba (szacharóz + PBS) tettük a szemszerleget: 10%-os, 20%-os, végül éjszakára 30%-os cukros oldatba kerültek. A preparátumokat másnap a kriosztáthoz szükséges médiumba tettük, majd 10 perc alatt lefagyasztottuk. Ezt követően a mintát lemetszettük, és a 10-12µm-es metszeteket zselatinózott tárgylemezre helyeztük. Felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Ezt követően kezdtük el a 2 napos immunhisztokémiai protokollt.

### **5. Western blot analízis, BCCAO-t követő PACAP1-27 szemcseppes kezelés után**

Két héttel a műtétet követően (3 sham-es és 9 BCCAO-n átesett állat), valamint 24 órával a műtétet követően (n=4 sham és n=4 BCCAO-n átesett állat) az állatok retináin western blot vizsgálatot végeztünk. A minták előkészítése a western blot analízishez munkacsoportunk által már korábban leírtak szerint történt. Ezt követően a mintákat nitrocellulóz membránon 4 °C-on inkubáltuk a primer antitestekkel: anti-totál Akt, foszfospecifikus anti-Akt, foszfospecifikus anti-extracelluláris szignál regulációs kináz 1/2 valamint anti-aktin antitestek. A foszfo-Akt (pAkt) belső kontrollja a total-Akt (tAkt) volt, míg a foszfo-ERK1/2-nek (pERK1/2) az aktin. Az antigén-antitest komplex vizualizálása erősített kemilumineszcencia segítségével történt, a

reakciót ECL Plus western blotting detektáló rendszerrel rögzítettük. Scanningelést követően eredményeinket NIH ImageJ program segítségével kvantifikáltuk, szemikvantitatív pixel denzitás mérést követően. A normalizációt a pAkt esetében tAkt-re, a pERK1/2 esetében aktinra végeztük. Statisztikai elemzésünkhöz kétutas ANOVA tesztet alkalmaztunk, Fischer féle post hoc analízissel.

## **6. A PACAP1-27 szemcseppes kezelést követő citokin array vizsgálat**

A retinákat a műtétet követő 24 óra után távolítottuk el. Kísérletünkhöz 11 sham és 17 ischaemiás károsodást szenvedett állatot használtunk. A mintákat PBS-ben feloldott proteáz inhibitorral homogenizáltuk, majd pooloztuk. A citokin array vizsgálatig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a retinákat. Vizsgálatunkhoz Rat Cytokine Array Panel A Array kitet használtunk. Másnap háromszori mosást követően adtuk a rendszerhez a tormaperoxidázhoz konjugált streptavidint, melyet kemilumineszcens előhívás követett, végül röntgenfilmen rögzítettük az eredményeket. A filmeket scanneltük, végül ImageJ Protein Array Analiser program segítségével a denzitás változásokat lemértük. A kontroll spotok átlagához normalizáltuk adatainkat. A citokin array méréseinket négyszer ismételtük meg.

## **7. Elektroretinográfiás (ERG) vizsgálat PACAP1-27 szemcseppes terápiát követően**

Két héttel a műtétet követően, állatainkat (11 sham operált és 17 BCCAO műtéten átesett) az ERG vizsgálat előtt 24 órán keresztül sötét adaptációnak tettük ki. A vizsgálat során az állatokat 0,7ml intraperitoneálisan beadott ketamin-xylazin koktéllal altattuk. A vizsgálatához Homatropin szemcseppet használtunk pupillatágítóként, illetve oxybuprocaine cseppet érzéstelenítőként. A felvillanó fényre adott retinális elektromos jeleket ( $5,0\text{ cd/m}^2$ , 0,25 Hz, 503 nm zöld LED fény) az elektródokkal vezettük el, majd a kapott válaszokat felerősítettük és A/D konverterrel rögzítettük. Az így kapott görbéket Origin 8 szoftver segítségével értékeltük, ahol lehetőség volt a különböző hullámok amplitúdójának lemérésére, és az implicit idő, valamint az oszcillációs potenciál meghatározására. Kiértékelésünkhöz kétutas ANOVA tesztet használtunk Fischer féle post hoc analízissel.



## EREDMÉNYEK

### 1. Rutin morfológiai és morfometriai analízis

Két héttel a műtétet követően retina metszeteinken az ischaemiás károsodás jelei jól láthatóak illetve mérhetőek voltak. A sham operált állatok jobb és bal szemei között (PACAP1-27-el kezelt – nem kezelt szemek) nem detektálható szignifikáns különbség. A fiziológias sóoldatban, az aqua ad iniectabiliában és a solvens viscosa pro oculo guttis cum thiomersaloban feloldott PACAP1-27-nél nem tapasztaltunk retinoprotektív hatást a szövettani analízis során. A solutio ophthalmica cum benzalkonio vivóanyagban feloldott PACAP1-27-nél viszont szignifikáns különbséget mértünk a BCCAO és BCCAO + PACAP1-27 csoport retináinak rétegvastagságai között. Többszöri méréseink alátámasztották korábbi eredményeinket, a PACAP1-27 szignifikánsan csökkentette a károsodás mértékét a teljes retina vastagságában (OLM-ILM: 50,7%-al csökkent BCCAO, 36,1%-al BCCAO + PACAP1-27 csoportba), a külső szinaptikus rétegben (OPL: 54,2%-al csökkent BCCAO, míg 47,9%-al BCCAO + PACAP1-27 kezelés hatására) és a belső magvas rétegben is (INL: 46,5%-al csökkent BCCAO-t követően, 30,7%-al BCCAO + PACAP1-27 kezelés után), valamint a belső szinaptikus rétegben (IPL: BCCAO: 61,4%, BCCAO + PACAP1-27: 38,3%).

Két héttel a műtétet követően, solutio ophthalmica cum benzalkonióban oldott PACAP1-38 szemcseppes kezelésben részesülő állatok retináinak morfometriai és morfológiai analízisét is elvégeztük. A sham operált és a BCCAO-n átesett állatok retináinak szerkezetében, illetve a rétegvastagságokban számos eltérést tapasztaltunk. PACAP1-38 szemcseppes kezelés hatására, az ischaemia okozta károsodás mértéke szignifikánsan csökkent: a teljes retina vastagságában (OLM-ILM: 46,7%-al csökkent BCCAO, 40,6%-al BCCAO + PACAP1-38 csoportba), a belső magvas rétegben (INL: 38,5%-al csökkent BCCAO-t követően, 30,5%-al BCCAO + PACAP1-38 kezelés után), valamint a belső szinaptikus rétegben (IPL: BCCAO: 64,8%, BCCAO + PACAP1-38: 38,2%). A két csoport között a külső sejtes, valamint a külső szinaptikus réteg esetében szignifikáns mértékű különbség nem mutatkozott (ONL: BCCAO: 36,5%-al, BCCAO + PACAP1-38: 37,7%-al; OPL: BCCAO: 53,0%-al, BCCAO + PACAP1-38: 48,2%-al csökkent).

A műtéten átesett állatok retinái esetében a GCL rétegben a sejtek száma jelentősen lecsökkent a sham csoportba tartozó retinákhoz képest. A BCCAO-t követő sejtszám csökkenés mértéke azonban szignifikánsan kisebb volt a PACAP1-27-el és 1-38-al kezelt szemeknél (jobb szemek), a csak vivóanyagot kapott szemekhez (bal szemek) képest. A szövettani méréseink bizonyították, hogy a PACAP1-27 solutio ophthalmica cum benzalkonióban oldva kifejti eddig ismert retinoprotektív hatását ischaemiás károsodás esetén. Az említett vivóanyagban oldott PACAP1-38 szintén retinoprotektívnek bizonyult.

## **2. <sup>125</sup>I izotóppal jelölt PACAP1-27 és 1-38 koncentráció változása szemcseppes kezelés esetén**

A radioaktív jódizótoppal jelölt PACAP1-27 és 1-38 radioaktivitását 5 – 120 perces periódus között többször mértük hím CD-1 egereken. Elsőként a corneán való átjutásukat ábrázoltuk, csúcskoncentrációjukat a PACAP1-27 esetében a 60. percnél, míg PACAP1-38 esetében a 120. percnél érték el. Az üvegtestben detektált PACAP1-27 és 1-38 koncentrációja a szaruhártyához hasonlóan, 60 perc után érte el a csúcserőket. A retinánál a PACAP1-27 csúcskoncentrációját szintén a 60. percben detektáltuk, míg a PACAP1-38 esetében már a 30. percnél. A PACAP1-27 gyorsan bejutott az agy területére is (30 perc) alacsony koncentrációban, azonban 120 perc után szinte alig volt kimutatható. A PACAP1-38 nem számottevő mértékben jutott be az agy területére. A PACAP1-27 és 1-38 nagyon alacsony koncentrációban jutott a szérumba.

## **3. Müller glia sejtek immunhisztokémiai analízise**

A GFAP filamentumok intermedier filamentumok, melyek főként az astrocytáknak és az ependimális sejtekben expresszálódnak a központi idegrendszerben. A retinában normális esetben a Müller glia sejtek végtalpaiban vannak jelen, az ILM rétegben. Carotis leköttést követően a GFAP szintje megemelkedett, és a Müller glia sejtek teljes hosszában kimutathatóvá vált (az OLM-től az ILM rétegekig). PACAP1-27 illetve 1-38 kezelés hatására, a GFAP kisebb mértékben expresszálódott, szinte csak a végtalpakra korlátozódott.

## **4. Akt és ERK1/2 foszforilációs változása PACAP1-27 kezelés hatására**

Két héttel a műtétet követően nem detektáltunk eltérést az Akt aktivációban a sham és a BCCAO csoportba tartozó állatok között. Azonban 24 órával a műtétet követően eltérés mutatkozott a vizsgált csoportoknál. A BCCAO jelentősen nem befolyásolta a foszfo-Akt (pAkt) expresszóját, azonban PACAP1-27 kezelés hatására szignifikáns mértékben megemelkedett ennek az anti-apoptotikus fehérjének az aktivitása. A sham és sham + PACAP1-27 csoportba tartozó retinánál önmagában a PACAP1-27 szemcseppes kezelés csökkentette a foszfo-ERK1/2 (pERK 1/2) fehérje szintjét. A carotis leköttést követően a pERK1/2 szintje megemelkedett, ami később a PACAP1-27 kezelés hatására tovább nőtt.

## **5. PACAP1-27 szemcseppes kezelés hatása az ischaemia okozta citokin expresszió változásra**

Különböző citokinek expressziós változásainak méréséhez citokin arrayt használtunk. Az ischaemiás károsodás számos citokin aktivációját befolyásolta. A különböző vizsgált csoportok között ilyen mértékű változást a citokin-indukált neutrophil chemoattraktáns-1 (CINC-1), makrofág gyulladáshoz szükséges fehérje (MIP-3 $\alpha$ ), thymus kemokin (CXCL-7), mátrix metalloproteináz szöveti gátlója (TIMP-1) valamint a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) esetében mértünk. Műtétet követően mennyiségük megemelkedett a sham csoport állataihoz képest, azonban PACAP1-27 kezelés hatására szintjük lecsökkent. A sham csoportba tartozó PACAP1-27-el kezelt és nem kezelt állatoknál is mértünk különbséget a citokinek expressziójában, azonban ez a 20%-ot nem haladta meg egyik esetben sem.

## **6. Funkcionális változások vizsgálata PACAP1-27 szemcseppes terápiát követően**

ERG vizsgálatunkat a műtétet követő 14. napon végeztük. Eredményeink alapján kimondható, hogy a sham csoportba tartozó állatok PACAP1-27-el kezelt, valamint nem kezelt szemek között számottevő eltérés nem mutatkozott. Megállapítható, hogy a BCCAO okozta károsodás szignifikáns mértékű volt a b-hullámok maximumainak tekintetében (25,1%-al csökkent a sham csoporthoz képest). PACAP1-27 szemcseppes kezelés hatására ezek a maximum értékek növekvő tendenciát mutattak (19,9%-al csökkent a sham + PACAP1-27 csoporthoz viszonyítva), azonban szignifikáns mértékű változás nem igazolódott. Az a-hullámnál, az oszcillációs potenciálnál valamint az implicit időnél mért értékekben jelentős különbségeket nem találtunk a vizsgált csoportok között.

## MEGBESZÉLÉS

### **1. PACAP családjába tartozó neuropeptidek valamint fragmenseinek vizsgálatáról szóló korábbi tanulmányok, illetve a mostani vizsgálatok eredményének összefoglalása**

Amellett, hogy a PACAP feltehetően részt vesz különböző fiziológiás folyamatokban, bizonyítottan retinoprotektív sajátosságokkal is rendelkezik. Endogén védő hatását bizonyították olyan egereken, melyek nem termelnek endogén PACAP-ot. Az egereknél ischaemiás retinakárosodást, valamint NMDA indukálta excitotoxikus károsodást idéztek elő, és azt tapasztalták, hogy a PACAP génhiányos egerek retinakárosodásának mértéke fokozottabb volt a kontroll állatokhoz képest. Ezt a tulajdonságát további vizsgálatok is megerősítették: PACAP antagonistá (PACAP6-38) intravitrealis adását követően az apoptózis mértéke fokozódott. A PACAP retinális, illetve más szerveket/szöveteket érintő patológiás folyamatokban nagyon hatásos molekulának bizonyult, ez indukálta új analógok valamint fragmensek vizsgálatának igényét, melyek könnyebb hozzáférhetőséget és nagyobb stabilitást jelentenének az esetleges későbbi klinikai felhasználás során. PACAP carrier-molekulákhoz való kötése feltehetően megnöveli a biológiai membránokon keresztüli transzportálódását, így könnyebben ki tudja fejteni citoprotektív hatását. Kimutatták, hogy a PACAP miután átjut a sejtmembránokon, receptorokhoz nem köthető folyamatokban is részt vesz. A fentebb részletezett feltételezésből fakadóan számos PACAP analóg fejlesztése megkezdődött. Számos tanulmány vizsgálta a PACAP fragmensek, valamint analógok farmakológiai és receptorokra vonatkozó tulajdonságait, azonban kevesen nézték ezeknek a formáknak a biológiai hatásosságát. Tanulmányunkban kimutattuk, hogy az általunk vizsgált rövidebb PACAP fragmensek neuroprotektív hatással nem rendelkeznek, a vizsgált fragmensek többsége nem befolyásolta a károsodás mértékét.

A retinára vonatkozóan kevesebb ismeretünk van a peptidcsalád többi tagjáról. Az amakrin sejtek egy kis subpopulációját képezik a glükagonerg amakrin sejtek, melyek feltételezhetően a vizuális információ feldolgozásában játszanak szerepet. Korábbi vizsgálatokban a glükagon megnövelte a cAMP szintjét csirke retinális Müller glia sejtekben úgy, mint a VIP is. *In vivo* kísérletben, agyi ischaemiát követően a glükagon neuroprotektív hatását írták le. Ezidáig nem vizsgálták a szekretin és glükagon esetleges retinoprotektív hatását ischaemiás károsodást követően. Vizsgálatunkban az alkalmazott koncentrációban sem a szekretin, sem a glükagon esetében nem tapasztaltunk védő hatást ischaemiás retinopathiában.

Tanulmányunk megerősítette, hogy a PACAP1-38 és 1-27 izoformákban a leghatásosabbak retinális ischaemiában. A 38 valamint 27 aminosavból álló peptideket nem lehet az általunk vizsgált rövidebb fragmensekkel illetve a peptidcsalád többi tagjával helyettesíteni. Kísérleteink újfent alátámasztották a PACAP retinoprotektív hatását, ez a további tanulmányok alapjául is szolgálhat, ezáltal közelebb kerülve az esetleges klinikai felhasználáshoz.

## **2. Szemcseppként alkalmazott PACAP1-27 és 1-38 kutatási eredményeinek összegzése**

Az *in vivo* PACAP kísérleteknél a fő hátráltató tényezőt az jelentette, hogy a peptid eredeti szerkezeti formáját rövid ideig őrzi meg - mivel a szervezetben megtalálható DPPIV enzim hasítja, és az így létrejött fragmensek antagonisták hatásúak - ezáltal a biológiai hasznosulása kismértékű. A PACAP-nak szisztémás hatásai is ismertek intravénás, illetve intraperitoneális adást követően: csökkenti a vérnyomást, arckipirulást, valamint migrén szerű rohamot idéz elő migrénre hajlamos betegekben. Az említett szisztémás kezelést követő mellékhatások ismeretében, és számos szemészeti megbetegedés tudatában, vizsgálatainkhoz lokálisan alkalmazható formák (szemcsepp vagy kenőcs) közül választottunk. Krónikus retinális hipoperfúziós kísérleteinkhez végül a szemcseppes formában feloldott PACAP-ot választottuk.

Morfometriai és morfológiai vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a PACAP 27 és 38 aminosavas formában is, solutio ophthalmica cum benzalkonioban oldva, szignifikánsan csökkentette a BCCAO indukálta retinadegeneráció mértékét. A retina rétegeinek szerkezete megtartottabb volt a BCCAO-t követően csak vivőanyag terápiában részesült szemekhez képest. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a PACAP megfelelő vivőanyagban oldva a szem különböző barrierein keresztül képes eljutni a retináig. Eredményeinket radioaktívan 125-ös jód izotóppal jelölt PACAP1-27-el és 1-38-al is alátámasztottuk: a jelölt molekulákat a corneától az üvegtesten keresztül, a retinában is ki lehetett mutatni. A PACAP solutio ophthalmica cum benzalkonioban oldva, szemcseppként alkalmazva kis koncentrációban volt kimutatható az agyban illetve a szérumban, ami a fent említett mellékhatások elkerülése szempontjából is fontos adatnak bizonyult. A PACAP lokális szemészeti alkalmazás módja további corneális hatások vizsgálatára is alkalmas lehet. Korábbi tanulmányokban a PACAP szemcseppes formában fokozta a corneális sebgyógyulást, stimulálta a könny szekrécióját, és felgyorsította az idegsejtek regenerációját. Néhány lokálisan alkalmazott növekedési faktort

már több tanulmányban is vizsgáltak, ilyen például az idegi növekedési faktor (nerve growth factor - NGF). A PACAP anti-apoptotikus, anti-inflammatorikus, valamint anti-oxidáns hatásai korábban is már igazolódtak. Kutatócsoportunk már kimutatta glutamát indukálta valamint hipoperfúzió okozta retinadegenerációt követően a PACAP anti-apoptotikus útvonalakat aktivál (ERK1/2 valamint Akt mediálta szignáltranszdukciós útvonalak), melyek egyúttal gátolják a pro-apoptotikus jelátviteli útvonalakat. A PACAP-ot általánosságban anti-inflammatorikus peptidként tartják számon. Retinális ischaemia hatására számos citokin aktiválódik. Kutatócsoportunk korábban vizsgálta, hogy a retinában a PACAP képes megváltoztatni a károsodásból fakadó gyulladáshoz tartozó citokin/kemokin profilt, egy anti-inflammatorikus profil irányába. Vizsgálatunkban, BCCAO-t követően kialakult ischaemiás károsodás következtében néhány citokin expressziója nagymértékben fokozódott: CINC-1, MIP-3 $\alpha$ , thymus kemokin, TIMP-1 valamint a VEGF, azonban szemcseppes PACAP1-27 kezelés hatására szintjük lecsökkent, ezáltal kifejtve az anti-inflammatorikus hatást. A retinális ischaemia a gliális sejtek aktivációján keresztül patológias útvonalakat aktivál. Vizsgálatunkban a korábbiakban leírtakhoz hasonlóan tapasztaltunk: BCCAO-t követően a GFAP expressziója fokozódott, a retina összes rétegében kimutatható volt, míg a solutio ophthalmica cum benzalkonioban oldott PACAP1-27 és 1-38 szemcseppel kezelt retinákon kisebb mennyiségben volt detektálható, és megjelenése a kontroll állatokéhoz hasonlóan inkább az ILM rétegre korlátozódott. Az ERG vizsgálat jól alkalmazható neuronális degeneráció mérésére, mivel nem invazív, valamint felvilágosítást ad a retina rétegeiről is. Kísérleteinkben a korábbiakhoz hasonlóan, BCCAO-t követően a b-hullám amplitúdójának csökkenése bekövetkezett, azonban nem tapasztaltunk PACAP kezelés hatására szignifikáns mértékű amplitúdó változást, csupán tendenciát.

Összegezve, eredményeink alapján kimondható, hogy a PACAP1-27 és 1-38 solutio ophthalmica cum benzalkonioban oldva, szemcseppes formában is ki tudja fejteni eddig ismert retinoprotektív hatását ischaemiás retinopathiában. A szemcsepp egy könnyen alkalmazható forma, ezáltal egy lépést jelenthet a PACAP esetleges klinikai felhasználásához vezető úton.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### 1. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

**Werling D**, Reglődi D, William AB, Theresa SS, Kovács K, Kvárik T, Váczy A, Kovács L, Lőkös E, Tamás A, Tóth G, Biró Zs, Atlasz T (2016) Ocular delivery of PACAP1-27 protects the retina from ischemic damage in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:6683-6691. (IF: 3,427)

**Werling D**, Reglődi D, Kiss P, Tóth G, Szabadfi K, Tamás A, Biró Z, Atlasz T (2014) Investigation of PACAP fragments and related peptides in chronic retinal hypoperfusion. *J Ophthalmol* 2014:563812. (IF: 1,425)

Atlasz T, Váczy A, **Werling D**, Kiss P, Tamás A, Kovács K, Fábíán E, Kvárik T, Mammel B, Dányádi B, Lőkös E, Reglődi D (2016) Neuroprotective effects of PACAP in the retina. in *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP*, edited by Dóra Reglődi and Andrea Tamás. New York: Springer Nature 501-527.

### 2. Az értekezés témájába közvetlenül nem illeszkedő egyéb közlemények

Fehér A, Pusch G, Harang G, Gasztonyi B, Papp E, **Werling D**, Menyhárt M, Komáromy H, Szapáry L, Feher G (2011) Aspirin resistance in cerebrovascular patients. *Int J Cardiol* 152:111-112. (IF: 3,47)

Fehér A, Pusch G, Harang G, Gasztonyi B, Papp E, **Werling D**, Menyhárt M, Komáromy H, Szapáry L, Feher G (2011) Az acetilszalicilsav-rezisztencia klinikai jelentősége a cerebrovascularis betegek esetében. *LAM* 21:719-724.

Kvárik T, Mammel B, Reglődi D, Kovács K, **Werling D**, Bede B, Váczy A, Fábíán E, Tóth G, Kiss P, Tamás A, Ertl T, Gyarmati J, Atlasz T (2016) PACAP is protective in a rat model of retinopathy of prematurity. *J Mol Neurosci* 60:179-85. (IF: 2,352)

Témához kapcsolódó publikációk összesített impakt faktora: **4,852**

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: **10,674**

## Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőimnek Dr. Reglődi Dórának, aki kezdetektől irányította és mindenben támogatta kutatási munkámat, és akinek kitartása és szakmai tudása mindig példaként áll majd előttem, illetve köszönet illeti Dr. Biró Zsoltot, akinek a szakmai támogatása nélkülözhetetlen volt. Köszönetemet fejezem ki Dr. Atlasz Tamásnak, aki a vizsgálati módszerek, kísérleti protokollok elsajátításában, valamint az adatok feldolgozásában és értékelésében segítette és támogatta tudományos munkámat. Hálásan köszönöm a sok segítséget és támogatást Dr. Kvárik Tímeának, kutatótársamnak az időt, fáradságot nem kímélő közös munkát és mindenkor támogató együttműködését. Köszönet illeti William A. Banks-et, és Therese S. Salameh-et akikkel kollaborációban dolgozva segítettük egymás munkáját. Köszönöm a sok segítséget Dr. Kovács Krisztinának, aki a molekuláris biológiai vizsgálatokban és módszertanuk elsajátításában nyújtott segítséget. Köszönettel tartozom Váczy Alexandrának, aki segített és támogatt a munkám során. Hálásan köszönöm Dr. Kovács Lászlónak a statisztikai elemzésekben nyújtott fáradhatatlan segítségét. Köszönet illeti Dr. Dányádi Besét, aki az ERG vizsgálatokban volt segítségemre. Köszönettel tartozom Dr. Szabadfi Krisztinának (†), aki az értekezésben ismertetett szövettani vizsgálatok lépéseinek elsajátításában volt segítségemre. Köszönet illeti TDK hallgatóma Mayer Flórát, és Nagy Noémit valamint Varga Ritát akik segítettek munkánkat, és eredményeinket konferenciákon prezentálták. Köszönettel tartozom az Anatómiai Intézet minden dolgozójának, kiváltképpen Kiss Anikónak és Dittrich Erzsébetnek. Kitüntetett köszönettel fordulok Családom felé, akik mindenben és mindig támogattak, hálás vagyok érte!

Támogatók:

AZ EMBERI ERŐFORRÁSOK MINISZTERIUMA ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT, UNKP-16-3-IV  
OTKA K104984, K119759; Arimura Foundation, PTE AOK KA Research Grant, National Brain Research Programme [KTIA\_13\_NAP-A-III/5]; PTE MTA “Lendület”; GINOP-2.3.2-15- 2016-00050 “PEPSYS”.