

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A PACAP SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA KORASZÜLÖTT RETINOPÁZIA ÁLLATMODELLBEN

Dr. Kvárik Tímea



Témavezetők: Prof. Dr. Ertl Tibor egyetemi tanár
Prof. Dr. Atlasz Tamás egyetemi tanár
Programvezető: Dr. Kovács Kálmán egyetemi docens
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Vereczkei András egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai Intézet

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

2026

I. Bevezetés

I/1. Koraszülött retinopátia

A koraszülött retinopátia (retinopathy of prematurity, ROP) a koraszülöttek éretlen retináját érintő, kóros érfejlődéssel járó betegség, amely a gyermekkori látáskárosodás és megelőzhető vakság egyik vezető oka. A kórkép első leírása az 1940-es évekre nyúlik vissza, amikor még retrolentális fibroplázia néven írták le. Rövid időn belül nyilvánvalóvá vált, hogy a betegség kialakulása összefügg a koraszülöttlátás során alkalmazott oxigénterápiával, és e felismerés alapozta meg a ROP patomechanizmusának későbbi kutatásait (Terry, 1946; Bedrossian és mtsai., 1954; Silverman, 1980; Robertson, 2003).

A neonatológiai intenzív terápia fejlődésével egyre kisebb gesztációs korú és alacsonyabb születési súlyú újszülöttek életben tartása vált lehetővé, ami a ROP újabb térnyeréséhez vezetett. Míg a fejlett országokban a szervezett szűrés, a korszerű intenzív ellátás és a célzott szemészeti kezelés jelentősen csökkentette a ROP okozta vakságot, addig a fejlődő régiókban a betegség továbbra is jelentős népegészségügyi teher. A ROP előfordulása nem elsősorban földrajzi, hanem ellátási és társadalmi-gazdasági tényezőkkel mutat összefüggést, ezért a kórkép epidemiológiája szorosan összefonódik a neonatológiai ellátás színvonalával (Gilbert, 2008; Quinn és mtsai., 2010; Kiranmayee és mtsai., 2019).

A betegség kizárólag koraszülöttekben fordul elő, és előfordulása fordított arányban áll a gesztációs korrall, illetve a születési súllyal. A legéretlenebb, extrém alacsony születési súlyú újszülöttek különösen veszélyeztetettek, ezért a ROP ma is a modern perinatális ellátás egyik meghatározó szemészeti kihívása. Klinikai jelentőségét tovább növeli, hogy a súlyos látáskárosodás jelentős része időben felismert és kezelt esetekben megelőzhető (Good és mtsai., 2005; Quinn és mtsai., 2014; Quinn és mtsai., 2016; Blencowe és mtsai., 2013).

A ROP patogenezisének megértéséhez alapvető a retina normális érfejlődésének ismerete. A retina ereződése a magzati élet során, szigorúan szabályozott folyamat eredményeként alakul ki, amelyben a vaszkulogenezis és angiogenezis egymásra épülő módon vesz részt. A folyamat élettani mozgatórugója a fejlődő retinaszövet relatív

hipoxiája, amely a növekvő oxigén- és tápanyagigény következménye. Ennek érzékelése és közvetítése többek között a gliaelemek, valamint az angiogén növekedési faktorok, elsősorban a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) révén valósul meg (Chang-Ling és mtsai., 1995; Bai és mtsai., 2009; Hartnett, 2015; Luty és McLeod, 2018).

Mivel a retina teljes ereződése csak a terminushoz közeli időszakban fejeződik be, a koraszülött újszülöttek éretlen, inkomplett retinális érhalózzal jönnek világra. A méhen belüli alacsony oxigénnyomású környezetet követően az extrauterin élet relatíve hiperoxiás közege megszakítja a fiziológiás angiogenezist, ami a ROP első, vazooobliteratív fázisához vezet. Ezt követően a tovább fejlődő retina metabolikus igénye nő, miközben az elégtelen érhalózat miatt szöveti hipoxia alakul ki. Ez indítja el a második, vazoproliferatív fázist, amelynek során az erezett és ereztelen retina határán kóros neovaszkuarizáció jelenik meg. A folyamat legsúlyosabb következményei az extraretinális fibrovaszkuláris proliferáció és a retinaleválás, amelyek végső soron vaksághoz vezethetnek (Smith, 2003; Sapiha és mtsai., 2010; Hellström és mtsai., 2013; Sun és Smith, 2018; Graziosi és mtsai., 2020).

A koraszülés és az oxigénexpozíció önmagukban nem magyarázzák teljes mértékben a betegség kialakulását. A ROP multifaktoriális kórkép, amelyben az oxidatív stressz, a gyulladásos folyamatok, a növekedési faktorok eltérései, valamint egyes metabolikus zavarok egyaránt szerepet játszanak. A hiperoxiás állapot fokozza a reaktív oxigéngyökök és reaktív nitrogéngyökök képződését, ami endotélkárosodást, kapillárisvesztést és vazooobliterációt idéz elő. A koraszülöttek csökkent antioxidáns kapacitása tovább fokozza sérülékenységüket (Nielsen és mtsai., 1988; Oguni és mtsai., 1995; Gu és mtsai., 2003; Beauchamp és mtsai., 2004). A hipoxia-indukálta faktor-1 α (HIF1 α) központi szerepet tölt be a hipoxiás válasz szabályozásában, és az általa vezérelt gének között több olyan molekula is megtalálható, amelyek a retinális érfejlődésben és neovaszkuarizációban meghatározó jelentőségűek (Rey és Semenza, 2010; Hartnett és Penn, 2012).

E faktorok közül kiemelkedő jelentőségű a VEGF, amely az endotélsejtek proliferációját, migrációját és tubulusképződését szabályozza, és döntő szerepet játszik a kóros érújdonképződésben. Hasonlóan fontos az eritropoetin (EPO), amely nemcsak hematopoetikus hormonként, hanem angiogén és citoprotektív faktorként is részt vesz a

folyamatban. Emellett az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) hiánya is kritikus lehet, mivel a koraszüléssel megszakad az intrauterin környezet növekedést támogató hatása. Az alacsony IGF-1-szint összefüggést mutat a ROP kialakulásával, és a normális érfejlődés egyik fontos permisszív feltételének tekinthető (Hellström és mtsai., 2001; Hellström és mtsai., 2003; Lofqvist és mtsai., 2007).

Az utóbbi években a hiperglikémia és a gyulladás szerepe is előtérbe került. A klinikai megfigyelések és kísérletes adatok arra utalnak, hogy a koraszülöttkori anyagcsere-eltérések, különösen a magas vércukorszint, kedvezőtlenül befolyásolhatják a retina érfejlődését, bár az összefüggés mértéke a humán adatokban nem minden esetben egységes. Ugyancsak egyre több adat szól amellett, hogy a prenatális és posztnatális gyulladásos állapotok, köztük a szepszis és a nekrotizáló enterokolitisz, hozzájárulhatnak a súlyosabb ROP kialakulásához (Garg és mtsai., 2003; Ertl és mtsai., 2006; Tolsma és mtsai., 2011; Lundgren és mtsai., 2017; Turai és mtsai., 2019; Lei és mtsai., 2021).

A kórkép klinikai megítélését és terápiás döntéshozatalát a nemzetközileg elfogadott ICROP klasszifikáció segíti, amely a lokalizáció, a súlyosság és a kiterjedés alapján írja le a betegséget. Az osztályozás nemcsak a klinikai leírást teszi egységessé, hanem a kezelési indikáció meghatározásában is alapvető szerepet tölt be (Chiang és mtsai., 2021; Nagy és mtsai., 2023). A jelenlegi gyakorlatban a veszélyeztetett koraszülöttek rendszeres szűrése az egyik legfontosabb preventív lépés, hiszen a megfelelő időben felismert kezelést igénylő ROP esetén a látás prognózisa lényegesen kedvezőbb.

A rendelkezésre álló terápiák túlnyomórészt a betegség vazoproliferatív fázisát célozzák. A perifériás avaszkuláris retina lézeres fotokoagulációja továbbra is alapvető kezelési módszer, bár az anti-VEGF készítmények megjelenése új lehetőségeket teremtett, különösen a hátsó lokalizációjú vagy agresszív esetekben. Ugyanakkor ezen gyógyszerek alkalmazása kapcsán továbbra is nyitott kérdés a fejlődő szervezetre gyakorolt lehetséges szisztémás hatás (Mintz-Hittner és mtsai., 2011; Morin és mtsai., 2016; Stahl és mtsai., 2019). Ez a klinikai helyzet indokolja olyan új, célzott és lehetőség szerint neurovaszkuláris szempontból is kedvező terápiás megközelítések keresését, amelyek nemcsak az érújdonképződés gátlását, hanem a fejlődő retina védelmét is szolgálhatják.

A ROP patomechanizmusának tanulmányozásában meghatározó szerepet töltenek be az oxigén-indukálta retinopátia (OIR) állatmodelljei. A rágcsálók éretlen vizuális rendszerrel jönnek világra, ami megfelel egy 25. hétre született koraszülött vizuális fejlettségének (Madan és Penn, 2003). Így az egér- és patkánymodellek lehetőséget biztosítanak a vaszkuláris és neuronális eltérések kísérletes vizsgálatára, valamint potenciális terápiás beavatkozások tesztelésére. Míg az egérmodell alkalmas molekuláris és genetikai vizsgálatokra, addig a patkány OIR-modell a humán ROP-hoz közelebb álló morfológiai és patofiziológiai jellemzőkkel bír, ezért különösen hasznos a terápiás célú kutatásokban (Smith és mtsai., 1994; Penn és mtsai., 1994; Madan és Penn, 2003; Barnett és mtsai., 2010).

I/2. PACAP

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) egy 1989-ben azonosított neuropeptid, amely a szekretin/VIP peptidcsalád tagja, és széles körben ismert neuromodulátorként, trofikus faktorként és citoprotektív molekulaként (Miyata és mtsai., 1989; Vaudry és mtsai., 2009). Hatásait elsősorban a PAC1 receptor közvetíti, de a VPAC1 és VPAC2 receptorokon keresztül is képes jelátviteli folyamatok aktiválására. A PACAP számos szervrendszerben jelen van, különösen az idegrendszerben, és több jelátviteli útvonalon keresztül sejttúlélést, differenciációt, valamint antiapoptotikus és gyulladáscsökkentő folyamatokat támogat (Reglodi és mtsai., 2011; Harmar és mtsai., 2012; Toth és mtsai., 2020).

A látószervben a PACAP és receptorai a retina több rétegében is kimutathatók, különösen a ganglionsejtek, amakrin sejtek, horizontális sejtek, valamint a Müller-glia elemek szintjén. A neuropeptid már a fejlődő retinában is jelen van, ami arra utal, hogy nemcsak sérülés esetén, hanem a normális retinogenezisben is szerepet játszik (Seki és mtsai., 1997; Atlasz és mtsai., 2010; Denes és mtsai., 2014; Patko és mtsai., 2022). Kísérletes modellekben a PACAP retinoprotektív hatását excitotoxikus, iszkémiás, oxidatív és diabéteszes károsodás esetén egyaránt igazolták. A kezelés kedvezően befolyásolta a retina morfológiai integritását, az apoptotikus folyamatokat és a funkcionális kimenetelt is (Tamas és mtsai., 2004; Atlasz és mtsai., 2007; Szabadfi és mtsai., 2012; Szabadfi és mtsai., 2014; Li és mtsai., 2025).

Az exogén PACAP mellett az endogén peptid szerepe is egyre nagyobb figyelmet kapott. PACAP-hiányos állatmodellekben számos szervrendszerben fokozott sérülékenységet, kedvezőtlenebb stresszadaptációt és súlyosabb strukturális károsodást figyeltek meg. A retinában is igazolták, hogy az endogén PACAP hiánya fokozott sejtpusztulással és kifejezettebb degeneratív eltérésekkel társul különböző károsító hatások esetén (Hashimoto és mtsai., 2001; Endo és mtsai., 2011; Reglődi és mtsai., 2012; Szabadfi és mtsai., 2012). Mindez arra utal, hogy a PACAP nemcsak terápiásan alkalmazható védőmolekula, hanem a retina élettani homeosztázisának és stresszválaszának endogén szabályozója is.

II. Problémafelvetés és célkitűzés

A ROP-ban a vaszkuláris és neuronális károsodás párhuzamosan zajlik, ezért különösen indokolt olyan molekulák vizsgálata, amelyek egyszerre képesek az érrendszeri és idegi komponensek befolyásolására. A PACAP ismert neuroprotektív, antiapoptotikus, gyulladáscsökkentő és részben vaszkuláris hatásai alapján megalapozottan feltételeztük, hogy szerepet játszhat az oxigén-indukálta retinális károsodás mérséklésében. Ennek megfelelően vizsgálataink célja a PACAP, illetve az endogén PACAP-rendszer szerepének tanulmányozása volt az oxigén-indukálta retinopátia kísérletes modelljeiben.

Vizsgálataink céljai a következők voltak:

1. Az exogén PACAP lehetséges védő hatásának vizsgálata oxigén-indukálta retinopátia patkánymodelljében, különös tekintettel a retinális strukturális eltérésekre, valamint az ezekkel összefüggő immunhisztokémiai és biokémiai változásokra.
2. Az endogén PACAP-hiány hatásának elemzése oxigén-indukálta retinopátia egérmodelljében immunhisztokémiai, biokémiai és funkcionális vizsgálatok alkalmazásával.

III. Az exogén PACAP protektív hatásának vizsgálata koraszülött retinopátia patkánymodelljében

III/1. Anyagok és módszerek

Vizsgálatainkat újszülött Sprague–Dawley patkányokon végeztük. A koraszülött retinopátia modellezésére az 50/10 oxigén-indukálta retinopátia (OIR) modellt alkalmaztuk, amelyben az állatokat az első 14 posztnatális napon 24 óránként váltakozó hiperoxiás és hipoxiás környezetben tartottuk, majd a 19. napig normoxián neveltük tovább. A kontroll állatok végig szobalevegőn maradtak.

A PACAP1-38 kezelést kezdetben intraperitoneálisan (1 mg/kg a 1-7. posztnatális napokon), illetve intravitreálisan alkalmaztuk (100 pmol/3 µl a 11., 14. és 17. posztnatális napokon). Összességében az alábbi csoportokkal dolgoztunk:

- Kontroll, n=18
- Kontrol + intraperitoneális PACAP, n=6
- Kontroll + intravitreális PACAP, n=25
- Kontroll + intravitreális sóoldat, n=25
- OIR, n=35
- OIR + intraperitoneális PACAP, n=26
- OIR + intravitreális PACAP, n=41
- OIR + intravitreális sóoldat, n=41

Mivel a szisztémás kezelés nem eredményezett érdemi morfológiai változást, a további vizsgálatok az intravitreális kezelési paradigmára összpontosultak.

A retinális érhálózat vizsgálatához a 19. posztnatális napon izolált retinákon izolektin-festést végeztünk, majd meghatároztuk a perifériás avaszkuláris terület arányát, az érelágazódások számát és a neovaszkuláris gócok kiterjedését. A gyulladásos és angiogén mediátorok változásait citokin array vizsgálattal elemeztük. A retina funkcionális állapotának megítélésére sötétadaptált elektroretinográfiát (ERG) alkalmaztunk. A statisztikai elemzést a variancia és homogenitás vizsgálatot követően parametrikus vagy nem-parametrikus tesztekkel végeztük, $p < 0,05$ szignifikanciaszint mellett.

III/2. Eredmények

Az OIR-modellben jellegzetes retinopátiás eltérések alakultak ki, elsősorban a perifériás avaszkuláris retina megjelenésével. A kontrollcsoportokban a retina teljes ereződése lezajlott, és a PACAP-kezelés nem okozott kimutatható morfológiai eltérést.

Az intravitreális PACAP-kezelés szignifikánsan csökkentette a perifériás avaszkuláris terület arányát a kezeletlen és a sóoldattal kezelt OIR-csoporthoz képest, míg az intraperitoneális kezelés nem mutatott érdemi hatást. Ez alapján a lokális PACAP-kezelés kedvezően befolyásolta a retinális vaszkularizációt.

Az OIR-állatokban az érelágazódások száma emelkedett a kontrollhoz képest, azonban ezt a PACAP-kezelés nem módosította. Hasonlóan, a neovaszkuláris gócok az OIR-retinákban megjelentek, de kiterjedésük az intravitreális PACAP-kezelés hatására nem változott szignifikánsan.

A citokin array vizsgálatok alapján az OIR során több gyulladásos, adhézis és angiogén faktor expressziója fokozódott, köztük a CNTF, a LIX, az L-selectin, a MIP-3 α , a TIMP-1 és a VEGF szintje. Az intravitreális PACAP-kezelés ezek többségének expresszióját mérsékelte, míg a TIMP-1 szintjét tovább növelte, ami a gyulladásos és angiogén válasz részleges modulációjára utal.

Az ERG-vizsgálatokban az OIR-állatoknál az a- és b-hullám amplitúdója egyaránt csökkent, ami a retina jelentős funkcionális károsodását jelezte. Az intravitreális PACAP-kezelés ezt a funkcionális romlást nem javította, és az implicit időkben sem mutatkozott szignifikáns eltérés.

III/3. Megbeszélés

Vizsgálataink célja a neuro- és retinoprotektív hatású PACAP szerepének elemzése volt koraszülött retinopátia állatmodelljeiben. A ROP továbbra is a megelőzhető gyermekkori látáskárosodások egyik vezető oka, annak ellenére, hogy a jelenlegi terápiás lehetőségek – beleértve a lézerkezelést és az anti-VEGF terápiát – hatékonyak, de potenciális mellékhatásokkal járnak. Ez indokolja új, biztonságosabb terápiás megközelítések keresését, melyek közé a PACAP is potenciálisan sorolható.

Az OIR patkánymodellben végzett vizsgálataink során igazoltuk, hogy az intravitreálisan alkalmazott PACAP-kezelés javította a retinális vaszkularizációt,

csökkentve az avaszkuláris terület kiterjedését. Ezzel párhuzamosan, a citokin expressziós vizsgálatok alapján a kezelés mérsékelte az OIR során megemelkedett gyulladásos és angiogén mediátorok szintjét. Eredményeink összhangban állnak korábbi megfigyelésekkel, melyek a PACAP retinoprotektív hatását több különböző károsodási modellben is igazolták.

Az OIR modell kétfázisú patomechanizmusa – kezdeti vazoobliteráció, majd neovaszkularizáció – lehetővé tette, hogy a kezelést időben célzottan alkalmazzuk. A PACAP-kezelés hatása alapján feltételezhető, hogy a peptid elsősorban az érújráképződés folyamatát támogatja, miközben a kóros angiogenezishez kapcsolódó gyulladásos válaszokat mérsékli.

A retina idegi komponenseinek érintettsége szintén meghatározó a betegség kialakulásában. Az OIR modellben ismert a belső retinarétegek károsodása és a Müller-sejtek gliotikus aktivációja, amely gyulladásos mediátorok és VEGF felszabadulásához vezet. Korábbi és jelen vizsgálataink eredményei alapján a PACAP képes befolyásolni ezeket a folyamatokat, amit alátámaszt a L-selectin, LIX, CNTF, MIP-3 α és VEGF szintjének csökkenése. A TIMP-1 szintjének emelkedése ugyanakkor arra utalhat, hogy a PACAP a szöveti regenerációt és az extracelluláris mátrix szabályozását is befolyásolja.

A funkcionális vizsgálatok alapján a retinopátiás állatokban jelentős ERG eltéréseket észleltünk a kontroll csoporthoz képest, azonban a PACAP-kezelés nem eredményezett kimutatható funkcionális javulást. Ez arra utal, hogy a strukturális regeneráció és a funkcionális helyreállítás időben eltérhetnek egymástól, illetve a különböző retinarétegek eltérő mértékben reagálhatnak a kezelésre.

Módszertani szempontból megjegyzendő, hogy a szisztémás PACAP-kezelés nem befolyásolta a retinális érfejlődést, ami feltehetően a dózis, a biohasznosulás vagy az alkalmazási mód korlátaival magyarázható. Ezzel szemben a lokális alkalmazás hatékonyabbnak bizonyult. A citokin array vizsgálatok értékelését továbbá befolyásolta a különböző mérési sorozatok közötti variabilitás, ezért relatív változásokat alkalmaztunk az összehasonlítás során.

Összességében eredményeink azt mutatják, hogy a lokálisan alkalmazott PACAP-kezelés mérsékli az oxigén-indukálta retinopátiában kialakuló vaszkuláris károsodást, és csökkenti a gyulladásos mediátorok expresszióját, ami a peptid potenciális terápiás szerepére utal.

IV. Az endogén PACAP protektív hatásának vizsgálata koraszülött retinopátia egérmodelljében

IV/1. Anyagok és módszerek

Vizsgálataink során CD-1 vad típusú (Wt) és homozigóta PACAP génhiányos (KO) egereket alkalmaztunk, amelyeket standard laboratóriumi körülmények között, az érvényes etikai előírásoknak megfelelően tartottunk. A retinopátia kiváltására a Smith-féle oxigén-indukálta retinopátia modellt használtuk, melynek során az állatokat a posztnatális 7–12. nap között 75%-os oxigénkoncentráción, majd a 17. napig normoxiás körülmények között neveltük (OIR-Wt n=15; OIR-KO n=14), míg a kontroll csoportok végig normoxián maradtak (Kont-Wt n=15; Kont-KO n=15).

A retinák morfológiai vizsgálatát a 17. posztnatális napon, izolektin festést követően végeztük. Meghatároztuk az avaszkuláris terület arányát, a teljes vaszkularizáció mértékét, valamint a neovaszkuláris gócok számát. A kvantitatív analízist képfeldolgozó szoftverek segítségével végeztük. A jelátviteli folyamatok vizsgálatához Western blot módszert alkalmaztunk, mely során az Akt-foszforiláció mértékét határoztuk meg. Az angiogén faktorok expresszióját szemikvantitatív angiogenezis array segítségével elemeztük, míg a retina funkcionális állapotát elektroretinográfiás vizsgálattal értékeltük az a- és b-hullám amplitúdók, valamint az implicit idők meghatározásával. A statisztikai analízist parametrikus vagy nem-parametrikus tesztekkel végeztük, $p < 0,05$ szignifikanciaszint mellett.

IV/2. Eredmények

Normoxiás körülmények között mind a vad típusú, mind a PACAP génhiányos egerek retinája teljesen ereződött, kóros eltérést nem észleltünk. Az oxigén-indukálta retinopátia modellben ezzel szemben jellegzetes vaszkuláris eltérések alakultak ki, és a PACAP génhiányos egerekben szignifikánsan nagyobb avaszkuláris területet mértünk a vad típusú állatokhoz képest. A neovaszkuláris gócok száma szintén emelkedett a KO csoportban, míg a kapillarizáció mértékében nem találtunk különbséget.

A jelátviteli folyamatok elemzése során normoxiás körülmények között nem mutatkozott eltérés az Akt-foszforiláció mértékében a csoportokat összehasonlítva. OIR

esetén azonban a vad típusú egerekben az Akt aktivációja fokozódott, míg a PACAP génhiányos állatokban ez szignifikánsan csökkent.

Az angiogén faktorok vizsgálata során az OIR modellben a vad típusú egerek retinájában több angiogén molekula fokozott expresszióját figyeltük meg. A PACAP génhiányos állatokban ehhez képest további angiogén és gyulladáshoz közlő mediátorok emelkedett szintje volt kimutatható, míg egyes faktorok csökkent expressziót mutattak. Normoxiás körülmények között csak minimális eltérések voltak a genotípusok között.

A funkcionális vizsgálatok alapján a genotípus szignifikánsan befolyásolta a retina működését. A PACAP génhiányos egerekben már alapállapotban is csökkent az a- és b-hullám amplitúdója. OIR esetén a b-hullám amplitúdó tovább csökkent a KO állatokban a vad típusú retinopátiás egerekhez képest, míg az implicit időkben nem találtunk szignifikáns eltérést.

IV/3. Megbeszélés

Vizsgálataink második részében az endogén PACAP szerepét tanulmányoztuk a koraszülött retinopátia egérmodelljében PACAP génhiányos állatok alkalmazásával. Eredményeink alapján az endogén PACAP hiánya súlyosbította az oxigén-indukálta retinopátiában kialakuló vaszkuláris eltéréseket, amit a nagyobb kiterjedésű centrális avaszkuláris terület és a fokozott neovaszkularizáció igazolt. Normoxiás körülmények között ugyanakkor a vad típusú és PACAP-hiányos egerek retinájának erezettsége között nem találtunk különbséget, ami összhangban áll azokkal a korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint az endogén PACAP hiánya elsősorban stressz- vagy károsító körülmények között válik meghatározóvá.

Számos korábbi vizsgálat igazolta, hogy a PACAP hiánya fokozza a szövetek sérülékenységét különböző idegrendszeri és retinális károsodások esetén. Saját eredményeink ezt a megfigyelést a koraszülött retinopátia modelljében is megerősítették, és arra utalnak, hogy az endogén PACAP fontos védő szerepet tölt be a neonatális retinális károsodással szemben. A kontroll állatokban észlelt minimális eltérések, valamint az OIR csoportban megfigyelt markáns különbségek alapján valószínűsíthető, hogy a PACAP szerepe az angiogenezis szabályozásában elsősorban kóros körülmények között érvényesül.

Az angiogenezis array vizsgálatok során a retinopátiás csoportokban több pro- és antiangiogén faktor fokozott expresszióját detektáltuk. A vad típusú OIR állatokban emelkedett szintet mutató molekulák – többek között a DLL4, CYR61, ADAMTS-1, IP-10, PDGF-AA és IGFBP-3 – ismerten részt vesznek az érfejlődés, az extracelluláris mátrix átrendeződése és a gyulladás szabályozásában. A PACAP génhiányos retinopátiás állatokban további angiogén és gyulladásos mediátorok expressziója fokozódott, ami arra utal, hogy endogén PACAP hiányában az angiogén szabályozás egyensúlya felborul, és ez hozzájárulhat a súlyosabb retinopátiás elváltozások kialakulásához.

A PACAP ismert sejtvédő hatásainak egyik fontos közvetítője az Akt-mediált antiapoptotikus jelátvitel. Western blot vizsgálataink során azt találtuk, hogy a retinopátiás vad típusú egerekben az Akt-foszforiláció fokozódott, míg a PACAP-hiányos állatokban ennek szintje szignifikánsan csökkent. Ez összhangban áll korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint a PACAP különböző retinális károsodásokban az Akt jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül fejt ki védő hatását. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az endogén PACAP hiányában a sejt túlélést támogató mechanizmusok gyengülnek, ami hozzájárul a súlyosabb morfológiai eltérések kialakulásához.

A funkcionális vizsgálatok tovább erősítették ezt a feltételezést. A PACAP génhiányos egerekben a retinopátia jelenlétében a b-hullám amplitúdó szignifikánsan alacsonyabb volt, ami a belső retina működésének fokozott károsodására utal. Figyelemre méltó megfigyelés volt, hogy normoxiás PACAP KO állatokban már alapállapotban is csökkent a- és b-hullám amplitúdókat mértünk. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a PACAP nemcsak kóros körülmények között, hanem a retina normális funkcionális fejlődésében is szerepet játszik. A PACAP receptorok jelenléte a fejlődő retinában és a retinális progenitor sejtek proliferációjának szabályozásában betöltött szerepe ezt a feltételezést tovább erősíti, ugyanakkor ennek pontos tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Vizsgálataink értelmezésekor figyelembe kell venni, hogy az elektroretinográfiás mérések alacsonyabb elemszámmal történtek, ami részben a PACAP génhiányos állatok fokozott sérülékenységevel magyarázható. További korlátot jelent, hogy az OIR modell a humán ROP számos fontos jellemzőjét reprodukálja, ugyanakkor nem képes teljes mértékben visszaadni a betegség komplex klinikai és fejlődésbiológiai sajátosságait.

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy az endogén PACAP fontos szerepet játszik a koraszülött retinopátia egérmodelljében kialakuló vaszkuláris és funkcionális károsodás mérséklésében. A PACAP hiánya súlyosabb retinopátiás eltérésekhez vezet, amelyhez hozzájárulhat a pro- és antiangiogén faktorok egyensúlyának felborulása, valamint az Akt-mediált sejtvédő jelátvitel csökkent aktivitása.

V. A disszertáció új tudományos eredményei

Az exogén PACAP hatásainak vizsgálata OIR patkánymodellben

- Igazoltuk, hogy háromszori intravitrealis PACAP-kezelés csökkenti az oxigén-indukálta retinopátia patkánymodellben kialakuló perifériás avaszkuláris terület nagyságát.
- Kimutattuk, hogy az intravitrealis PACAP-kezelés csökkenti az OIR modellben megemelkedett gyulladásos és angiogenezissel összefüggő citokinek expresszióját, ugyanakkor fokozza a TIMP-1 szintjét.
- Elektroretinográfiás vizsgálattal igazoltuk, hogy a retinopátiás állatok látásfunkciója károsodott, azonban a PACAP-kezelés nem befolyásolta a hullámmorfológiát.

Az endogén PACAP szerepének vizsgálata OIR egérmodellben

- Igazoltuk, hogy a PACAP-hiányos egerekben az oxigén-indukált retinopátia súlyosabb formában alakul ki, ami nagyobb avaszkuláris területtel és fokozott neovaszkularizációval jár a vad típusú állatokhoz képest.
- Kimutattuk, hogy a PACAP-hiányos állatokban az angiogenezisben résztvevő pro- és antiangiogén faktorok expressziója kifejezettebb az OIR modellben.
- Western blot vizsgálattal igazoltuk, hogy endogén PACAP hiánya csökkent antiapoptotikus Akt-foszforilációval jár retinopátiás körülmények között.
- Elektroretinográfiás vizsgálattal kimutattuk, hogy PACAP KO egerekben a b-hullám amplitúdója csökken, ami a retina belső rétegeinek funkcionális károsodására utal.

Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények:

Kvarik T, Mammel B, Reglodi D, Kovacs K, Werling D, Bede B, Vaczy A, Fabian E, Toth G, Kiss P, Tamas A, Ertl T, Gyarmati J, Atlasz T. (2016) PACAP Is Protective in a Rat Model of Retinopathy of Prematurity. J Mol Neurosci. 60(2):179-85. **IF: 2,229**

Kvarik T, Reglodi D, Werling D, Vaczy A, Kovari P, Szabo E, Kovacs K, Hashimoto H, Ertl T, Gyarmati J, Atlasz T. (2021) The Protective Effects of Endogenous PACAP in Oxygen-Induced Retinopathy. J Mol Neurosci. 71(12):2546-2557. **IF: 2,866**

Egyéb tudományos közlemények:

Kvarik T, Mammel B, Reglodi D, Antonelli MC, Farkas J, Tamas A, Ertl T, Atlasz T, Bodzai G., Kiss P, Gyarmati J. (2016) Effects of maternal stress during different periods of pregnancy on the early neurobehavioral response of rats. J Neurology and Neuroscience. 7(2): 80. **IF: -**

Atlasz T, Vaczy A, Werling D, Kiss P, Tamas A, Kovacs K, Fabian E, **Kvarik T**, Mammel B, Danyadi B, Lokos E, Reglodi 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.

Werling D, Reglodi D, Banks WA, Salameh TS, Kovacs K, **Kvarik T**, Vaczy A, Kovacs L, Mayer F, Danyadi B, Lokos E, Tamas A, Toth G, Biro Z, Atlasz T. (2016) Ocular Delivery of PACAP1-27 Protects the Retina From Ischemic Damage in Rodents. Invest Ophthalmol Vis Sci. 57(15):6683-6691. **IF: 3,427**

Werling D, Banks WA, Salameh TS, **Kvarik T**, Kovacs LA, Vaczy A, Szabo E, Mayer F, Varga R, Tamas A, Toth G, Biro Z, Atlasz T, Reglodi D. (2017) Passage through the Ocular Barriers and Beneficial Effects in Retinal Ischemia of Topical Application of PACAP1-38 in Rodents. Int J Mol Sci. 18(3):675. **IF: 3,687**

Vaczy A, Kovari P, Kovacs K, Farkas K, Szabo E, **Kvarik T**, Kocsis B, Fulop B, Atlasz T, Reglodi D. (2018) Protective Role of Endogenous PACAP in Inflammation-induced Retinal Degeneration. *Curr Pharm Des.* 24(30):3534-3542. **IF: 2,412**

Turai R, Schandl MF, Dergez T, Vass RA, **Kvárik T**, Horányi E, Balika D, Mammel B, Gyarmati J, Fónai F, Vida G, Funke S, Gaál V, Reglődi D, Ertl T. (2019) Az extrém alacsony születési súlyú koraszülöttek hyperglykaemiájának korai és késői szövődményei [Early and late complications of hyperglycemic extremely low birth-weight infants]. *Orv Hetil.* 160(32):1270-1278. Hungarian. **IF: 0,497**

Horvath G, Reglodi D, Farkas J, Vadasz G, Mammel B, **Kvarik T**, Bodzai G, Kiss-Illes B, Farkas D, Matkovits A, Manavalan S, Gaszner B, Tamas A, Kiss P. (2015) Perinatal positive and negative influences on the early neurobehavioral reflex and motor development. *Adv Neurobiol.* 10:149-67. Perinatal Programming of Neurodevelopment. Chapter 8. Antonelli, Marta (Ed.), Springer ISBN 978-1-4939-1371-8

Mammel B, **Kvarik T**, Szabo Z, Gyarmati J, Ertl T, Farkas J, Helyes Z, Atlasz T, Reglodi D, Kiss P. (2020) Prenatal cigarette smoke exposure slightly alters neurobehavioral development in neonatal rats: Implications for developmental origins of health and disease (DoHAD). *Physiol Int.* 107(1):55-66. **IF: 2,090**

Horváth B, **Kvárik T**, Boros Á, Meggyes M, Reuter G, Nyul Z. (2026) Coxsackivírus A6 okozta atípusos klinikai megjelenésű kéz-láb-száj betegség [Hand-foot-mouth disease with atypical clinical presentation caused by Coxsackievirus A6]. *Orv Hetil.* 167(4):156-161. **IF: 0,9**

A közlemények összesített impakt faktora: 17,984

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani elsősorban Dr. Ertl Tibor Professzor Úrnak, aki TDK-s koromtól kezdve témavezetőként irányította, ötleteivel és értékes szakmai tanácsaival segítette kutatási munkámat. Töretlen támogatásának, biztatásának, belém vetett hitének elengedhetetlen szerepe volt abban, hogy ez a munka elkészült. Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek Dr. Atlasz Tamás Professzor Úrnak, akinek szakmai tudása, kutatói tapasztalata kulcsfontosságú volt az állatkísérletes modell megalapozásában. Továbbá köszönöm neki, hogy időt és energiát nem kímélve segített abban, hogy a szövettani eljárásokat, protokollokat megtanulhattam. Köszönet illeti Dr. Reglődi Dóra Professzor Asszonyt, hogy kezdeti ötletünket lelkesedéssel fogadta és az Anatómiai Intézetben helyet, eszközöket és támogatást biztosított a vizsgálatokhoz. Magas szintű tudása, emberségessége és fáradhatatlansága mindig példaként áll előttem. Szeretném megköszönni Dr. Kovács Krisztina egyetemi docensnek és Dr. Fábián Eszter egyetemi adjunktusnak, hogy segítségemre voltak a molekuláris vizsgálatok kivitelezésében és elsajátításában. Köszönöm Dr. Dányádi Bese és Dr. Váczy Alexandra egyetemi adjunktusnak az elektrofiziológiai vizsgálatokban nyújtott fontos munkáját. Hálával tartozom néhai Dr. Szabadfi Krisztina tudományos munkatársnak, aki kutatómunkám kezdetén bevezetett a laboratóriumi munka világába. Figyelemreméltó szakmai igényességéből sokat tanultam. Köszönöm Dr. Mammel Barbara kutatótársamnak, hogy TDK-s korunk óta segítettek, támogattuk egymás munkáját. Külön köszönöm Dr. Werling Dóra egyetemi tanársegédnek, kutatótársamnak, hogy a sok közös munka vidám hangulatban telt. Önzetlen segítségével, tapasztalatcserékkel, szakmai és baráti beszélgetésekkel hozzájárult munkám elkészültéhez. Hálásan köszönöm Dr. Gyarmati Judit egyetemi adjunktusnak, hogy a kezdetek kezdetén lépéseimet türelemmel irányította. Tudásával és kritikus kutatói szemléletével segített eligazodni, irányt mutatni a tudományos világban. Továbbá köszönettel tartozom a PTE ÁOK Anatómiai Intézet minden dolgozójának a kísérletünk során nyújtott segítségért. Hálával tartozom szüleimnek, férjemnek és gyermekeimnek, akikre mindig mindenben számíthatok. Köszönöm nekik, hogy az évek során nyújtott támogatásukkal, türelmükkel, önzetlen segítségükkel, szeretetükkel hozzájárultak ahhoz, hogy munkám elkészüljön. Ajánlom ezt a munkát gyermekeimnek, Ákosnak, Annának és Rékának!

A kutatás megvalósítását az alábbi pályázati támogatások segítették: NKFIH FK129190, NKFIH K135457, NAP3-HUN-REN TKI14016; TKP2021-EGA-32.