

A PACAP szerepének vizsgálata retina pigmenthámsejtekben



Doktori (Ph. D.) értekezés

Fábián Eszter

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Anatómia Intézet

2016

Doktori iskola vezetője: Dr. Szekeres Júlia
egyetemi tanár

Programvezető: Dr. Csernus Valér
egyetemi tanár

Témavezetők: Dr. Reglódi Dóra
egyetemi tanár
Dr. Kovács Krisztina
egyetemi docens

Tartalomjegyzék

| | | |
|-------|--|----|
| I. | Rövidítések jegyzéke | 2 |
| II. | Bevezetés | 4 |
| 1. | A retina és a retinális pigmenthám | 4 |
| 2. | A PACAP | 8 |
| III. | Célkitűzések | 23 |
| IV. | Anyagok és módszerek | 24 |
| 1. | In vivo kísérletek | 24 |
| 1.1. | Kísérleti állatok és szövettani analízis | 24 |
| 1.2. | Citokin array | 25 |
| 2. | In vitro kísérletek | 25 |
| 2.1. | MTT teszt | 26 |
| 2.2. | Apoptózis array | 26 |
| 2.3. | Foszfo-kináz array | 27 |
| 2.4. | Angiogenezis array | 27 |
| 2.5. | Áramlási citometria | 27 |
| 2.6. | Cell stressz array | 28 |
| V. | Eredmények | 29 |
| 1. | In vivo kísérletek | 29 |
| 1.1. | A szövettani analízis eredményei | 29 |
| 1.2. | A citokin array eredményei | 30 |
| 2. | In vitro kísérletek | 32 |
| 2.1. | Az MTT teszt eredményei | 32 |
| 2.2. | Az apoptózis array eredményei | 34 |
| 2.3. | A foszfo-kináz array eredményei | 35 |
| 2.4. | Az angiogenezis array eredményei | 39 |
| 2.5. | Az áramlási citometriás mérés eredményei | 44 |
| 2.6. | A cell stressz array eredményei | 45 |
| VI. | Megbeszélés | 48 |
| VII. | Új eredmények összefoglalása | 60 |
| VIII. | Irodalomjegyzék | 61 |

I. Rövidítések jegyzéke

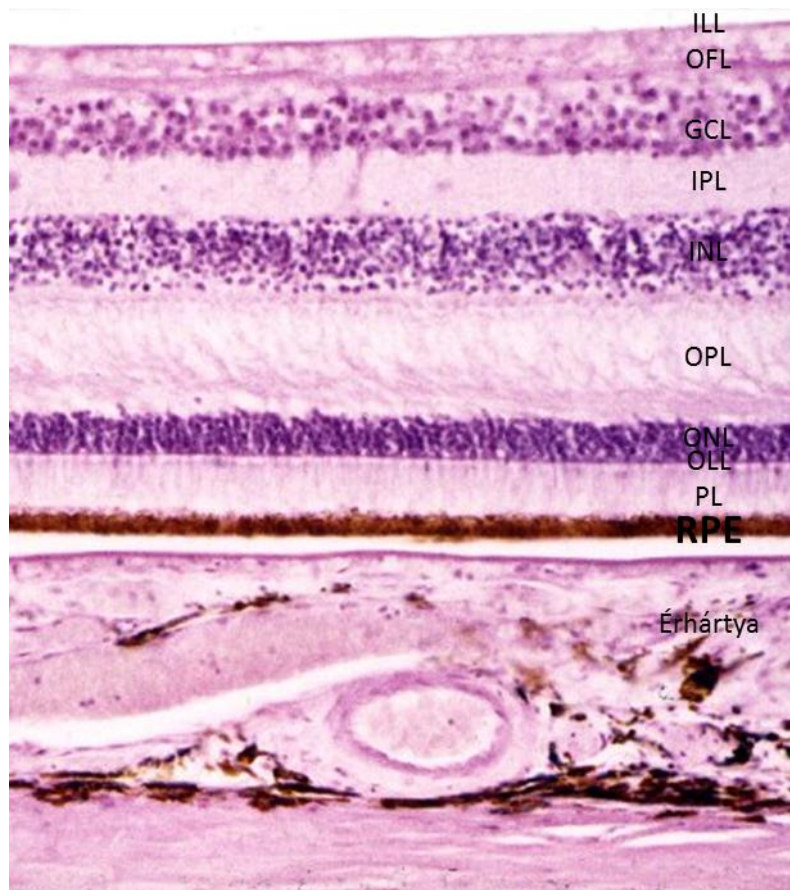
| | |
|---------|--|
| 6-OHDA | 6-hidroxidopamin |
| ARPE-19 | adult retinal pigment epithelium – fenőtt retinális pigmenthám |
| BCCAO | kétoldali arteria carotis communis lekötés |
| BDNF | agyi eredetű neurotrófikus faktor |
| CINC | citokin indukált neutrofil kemoattraktáns |
| CNTF | ciliáris neurotrófikus faktor |
| CREB | cAMP reszponzív elemkötő protein |
| CSF | kolónia stimuláló faktor |
| DMSO | dimetilszulfoxid |
| EG-VEGF | endokrin mirigy eredetű VEGF |
| ERK | extracelluláris szignál által regulált kináz |
| FADD | Fas-asszociált halál domén |
| FGF | fibroblast növekedési faktor |
| FITC | fluoreszcein-isotiocianát |
| GCL | ganglion sejtes réteg |
| GFAP | gliális fibrilláris savas fehérje |
| HIF | hipoxia indukálta faktor |
| HSP | hősokk fehérje |
| IGF | inzulin-szerű növekedési faktor |
| IGFBP | inzulin-szerű növekedési faktort kötő fehérje |
| IL | interleukin |
| ILL | inner limiting layer - belső határhártya |
| INL | inner nuclear layer - belső magvas réteg |
| IPL | inner plexiform layer - belső szinaptikus réteg |
| JNK | c-Jun N-terminalis kináz |
| LEDGF | lencse-epitélium eredetű növekedési faktor |
| LIX | lipopoliszacharid indukálta CXC kemokin |
| MAPK | mitogén aktivált protein kináz |
| max.d.4 | maxadilán deléciós variáns 4 |
| MCP | monocita kemoattraktáns protein |
| MHC | fő hisztokompatibilitási komplex |
| MIP | makrofág gyulladáshoz protein |
| MMP | mátrix metalloproteináz |
| MSG | monoszódium-glutamát |
| MTT | 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium bromid |
| NGF | idegi növekedési faktor |
| NMDA | N-metil D-aszparaginsav |
| NT | neurotropin |
| OFL | optic fibre layer - idegrostréteg |
| OLL | outer limiting layer - külső határhártya |
| ONL | outer nuclear layer - külső magvas réteg |
| OPL | outer plexiform layer - külső szinaptikus réteg |
| PACAP | pituitary adenylate cyclase activating polipeptide - hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid |
| PDGF | platelet derived growth factor - vérlemezke eredetű növekedési faktor |
| PEDF | pigment epithelium derived factor - pigmenthám eredetű faktor |

| | |
|--------|---|
| PI3K | foszfatidil inozitol 3 kináz |
| PIGF | foszfatidil inozitol glikán F |
| PKA | protein-kináz A |
| PL | photoreceptor layer - fotoreceptorok rétege |
| RANTES | regulated on activation, normal T cell expressed and secreted - normál T sejt által regulált, expresszált és szekretált citokin |
| ROP | retinopathy of prematurity - koraszülött retinopátia |
| RPE | retinális pigmenthám |
| RSK | ribosomális s-6 kináz |
| sICAM | intercelluláris adhéziós molekula |
| TGF | transzformáló növekedési faktor |
| TIMP | szöveti mátrix metalloproteáz gátló |
| TNF | tumor nekrosis faktor |
| Trail | TNF-hez hasonló apoptózis-indukálta ligand |
| uPA | urokináz plazminogén aktivátor |
| VEGF | vaszkuláris endoteliális növekedési faktor |
| VIP | vazoaktív intesztinális polipeptid |
| ZO-1 | zonula occludens 1 |

II. Bevezetés

1. A retina és a retinális pigmenthám

A retina (recehártya) a szem legbelső burka, annak fényérzékeny rétege. A szem optikai rendszere által idenfókuszált fény különböző elektromos és kémia reakciókat indít be, melynek segítségével az információ a látóidegen keresztül a nyakszirtlebenyben található látóközpontba kerül. A retinán belül tíz réteget különböztetünk meg (1. ábra). A retina első rétege a pigmenthámsejtek rétege (RPE), amely egy vastag bazál membránon (Bruch-féle membrán) ül. A második rétegben helyezkednek el a fotoreceptorok külső és belső szegmensei (fotoreceptorok rétege). Ezután egy határhártya következik, amit a Müller glia sejtek nyúlványai hoznak létre (külső határhártya). A negyedik réteg a fotoreceptor sejtek sejttestjeit tartalmazza (külső magvas réteg). A következő egy szinaptikus réteg, ahol a fotoreceptorok, a horizontális sejtek és a bipoláris sejtek kapcsolódnak egymáshoz (külső szinaptikus réteg). Ezt követően egy újabb magvas réteg következik, az előbb említett horizontális- és bipoláris sejtek, valamint az amakrin és a Müller glia sejtek sejttestjeivel (belső magvas réteg). A hetedik rétegben szinaptizálnak a bipoláris, amakrin és ganglion sejtek, majd a ganglionsejtek perikaryonjaiból álló réteg következik (belső szinaptikus réteg és ganglionsejtek rétege). A kilencedik rétegben futnak a ganglionsejtek axonjai, ezek alkotják a látóideget (idegrostréteg). Végül egy újabb határhártya zárja a retinát az üvegtest felé (belső határhártya). A retina belső kilenc rétegét együtt neuroretinának nevezzük. A retinális pigmenthám a neuroretina és az érhártya (choroidea) között található egyrétegű hám, a recehártya legkülső rétege (2. ábra). A pigmenthám apikális felszíne a fotoreceptor sejtek külső szegmensével, a basolateralis felszín pedig a Bruch-féle membránnal áll szoros összeköttetésben, amely elválasztja az RPE sejteket a lamina choriocapillaris fenestrált endotheliumától. A pigmenthám hozzájárul a külső vér-retina gát (blood retina barrier - BRB) kialakításához, míg a belső vér-retina gátat a retinát ellátó erek endotheliuma alkotja. Az egymással szomszédos RPE és endothel sejtek közötti tight junction-ök elengedhetetlenek a vér-retina gáton átjutó folyadékok és egyéb anyagok átáramlásának kontrollálásához. Ezen kívül megakadályozzák a káros molekulák és plazma összetevők retinába való bejutását. A pigmenthámsejtek ezen záró funkciója alapvető fontosságú a retina integritásának fenntartásában (Strauss 2005).

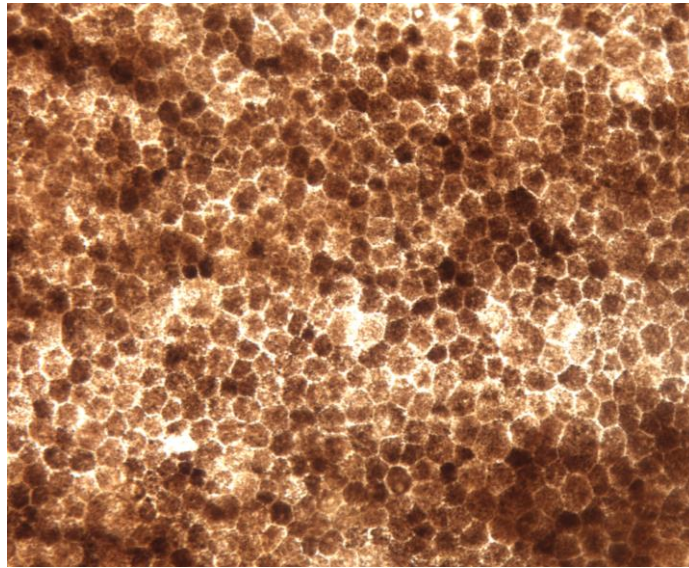


1. ábra. A retina szövettani képe (HE festés)

forrás: PTE-ÁOK Anatómia Intézet szövettani anyaga

RPE- retinális pigmenthám, PL- fotoreceptorok rétege, OLL-külső határhártya, ONL-külső magvas réteg, OPL-külső szinaptikus réteg, INL- belső magvas réteg, IPL- belső szinaptikus réteg, GCL- ganglionsejtes réteg, OFL- idegrostréteg, ILL-belső határhártya

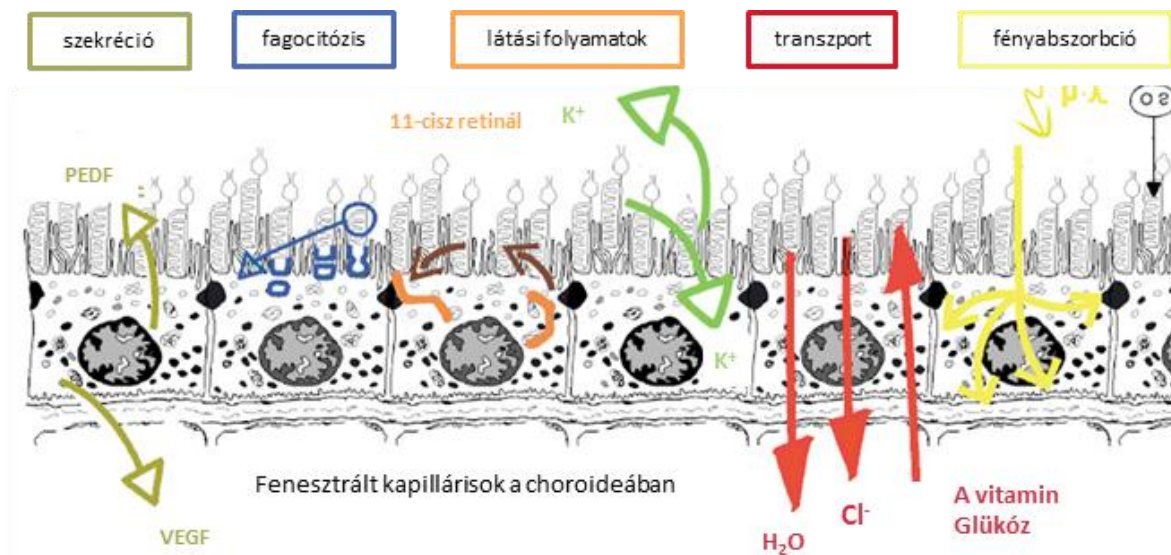
A pigmenthámsejtek az alábbi fontos funkciókkal rendelkeznek: ionok, víz és tápanyagok transzportja; a szórt fény elnyelése, ezáltal védelem a fotooxidáció ellen; a transz-retinal visszaalakítása 11-cisz-retinal-lá, amely a látás egyik kulcsfontosságú folyamata; a fotoreceptorok külső szegmensének fagocitálása és különböző nélkülözhetetlen anyagok kiválasztása (3. ábra). Ezeken kívül a pigmenthámsejtek beállítják az ionkoncentrációt a szubretinális térben, amely létfontosságú a fotoreceptor sejtek ingerelhetőségének fenntartásához (Steinberg 1985). Végül, az RPE sejtek immunszuppresszív anyagok kibocsájtásával a szemgolyó védelmét szolgálják. Az elmúlt években in vitro kísérletekkel igazolták, hogy ezen sejtek fontosak a szemben lejátszódó immunológiai folyamatokban, mert fő hisztokompatibilitási komplexet, adhézions molekulákat, Fas ligandot és különböző citokineket expresszálnak (Holtkamp et al. 2001). Ezen funkciók bármelyikének sérülése a retina degenerációjához, látásromláshoz, illetve vaksághoz is vezethet.



2. *ábra.* A pigmenthám szövettani képe (festetlen készítmény)

A pigmenthám azon funkcióiról, melyek kísérleteinkben relevánsak, részletesebben beszámolnék. A pigmenthámsejtek különféle növekedési faktorokat (Simó et al. 2006), valamint a retina (Cao et al. 1999; Steele et al. 1993) és a lamina choriocapillaris (Witmer et al. 2003) szerkezeti egységének megtartásához nélkülözhetetlen egyéb faktorokat szekretálnak. Tehát az RPE sejtek a fotoreceptorok túlélését szolgáló molekulákat termelnek, valamint biztosítják a retina megfelelő vérellátását a choroidea felől. A pigmenthám az alábbi fontos faktorokat választja ki: pigmenthám eredetű faktor (PEDF) (Dawson et al. 1999; King és Suzuma 2000; Simó et al. 2006), vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF) (Adamis et al. 1993; Kuroki et al. 1998; Lopez et al. 1996; Simó et al. 2006; Wirostko et al. 2008; Witmer et al. 2003), fibroblast növekedési faktor (FGF-1, FGF-2, and FGF-5) (Dunn et al. 1998; Kitaoka et al. 1993; Kitaoka et al. 1994; Simó et al. 2006; Sternfeld et al. 1989), transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) (Kvanta 1994; Matsumoto et al. 1994; Simó et al. 2006; Tanihara et al. 1993), inzulin-szerű növekedési faktor-I (IGF-I) (Martin et al. 1992; Slomiany és Rosenzweig 2004), idegi növekedési faktor (NGF), agyi eredetű neurotrófikus faktor (BDNF), neurotropin-3 (NT-3), ciliáris neurotrófikus faktor (CNTF) (Cao et al. 1997; Walsh et al. 2001), vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) (Simó et al. 2006, Campochiaro et al. 1989; Campochiaro et al. 1994), lencse-epitéium eredetű növekedési faktor (LEDGF) (Ahuja et al. 2001), különböző interleukinok (Ishida et al. 2003; Streilein et al. 2002; Wenkel és Streilein 2000), kemokinek (MCP-1, MCP-2, RANTES) (Juel et al. 2012), tumor nekrosis faktor α (TNF- α), kolónia stimuláló faktor (CSF) és a szöveti mátrix metalloproteáz gátlók különböző fajtái (TIMP) (Alexander et al. 1990; Della et al. 1996;

Eichler et al. 2002; Padgett et al. 1997; Ruiz et al. 1996). Ezek közül legfontosabbnak a PEDF és a VEGF mutatkozik.



3. *ábra.* A pigmenthám fontosabb funkciói
(forrás: Strauss 2005 (módosítva))

Az egészséges szemben a pigmenthám PEDF-et szekretál, amely kétféleképpen segít fenntartani a retina és a choroidea struktúráját. A PEDF neuroprotektívnek bizonyult glutamát és hipoxia indukálta apoptózissal szemben (Cao et al. 2001; Ogata et al. 2001). Ezek mellett anti-angiogenikus hatását is leírták: a PEDF gátolni tudta a choriocapillaris endothel sejtek proliferációját (Adamis et al. 1993; Lopez et al. 1996; Simó et al. 2006). A vaszkularizációra kifejtett ezen hatása a szem embrionális fejlődésében is fontos szerepet játszik (Behling et al. 2002; Jablonski et al. 2000). PEDF deficiens egereken bebizonyították, hogy a PEDF jelentős modulátora a korai posztnatális vaszkularizációnak és hiányában, hiperoxiás körülmények között az erek könnyebben elzáródnak (Huang et al. 2008).

A pigmenthám által termelt másik igen fontos faktor a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor, a VEGF. Az egészséges szemben alacsony koncentrációban termelődik (Lu et al. 1998; Simó et al. 2006), feladata az endothel sejtek apoptózisának gátlása és ezzel fontos szerepet tölt be a choriocapillaris endothelium integritásának megőrzésében (Burns és Hartz 1992). A VEGF az endothel sejtek fenestráltságának stabilizálásával befolyásolja a sejtek permeabilitását (Saucan és Palade 1992). Az egészséges szemben a PEDF és a VEGF a pigmenthám két különböző felszínére választódik ki. A PEDF az apikális felszínre, ahol a fotoreceptorokra fejti ki hatását, míg a VEGF-et a bazális felszínre szekretálja a sejt és a choroidea endotheliumára hat elsősorban (Becerra et al. 2004; Blaauwgeers et al. 1999). A

túlzott VEGF termelés a proliferatív diabéteszes retinopátia egyik legfőbb kiváltója. A makulaödéma patogenezise még kevésbé ismert, de a VEGF és más gyulladáscsökkentő citokinek részt vesznek a kialakulásában. A pro-angiogénikus VEGF és az anti-angiogénikus PEDF egyensúlya kritikus ezen kórképek létrejöttében. RPE sejt kultúrákban, magas glükóz szint mellett megfigyelték például a PEDF expresszió csökkenését (Yao et al. 2003). Ezért a VEGF gátlása, illetve a PEDF szekréció stimulálása mind hatékony módszer lehet a diabéteszes retinopátia kezelésében. Az utóbbi években kimutatták, hogy az RPE sejtek a fent említetteken kívül egyéb faktorokat is termelnek. Többek között szomatosztatint, erythropoietint, ApoA1-et és dopamint, melyek mind fontos terápiás jelentőséggel bírnak (Simó et al. 2006; Ming et al. 2009).

A fejlett országokban, dolgozó korú egyéneknél a diabéteszes retinopátia a vakság vezető oka (Congdon et al. 2003). Az I-es típusú diabétesznél a proliferatív diabéteszes retinopátia (PDR), míg a kettes típusúnál a diabéteszes makulaödéma a legáltalánosabb látást károsító tényező. A II-es típusú diabétesz jóval gyakoribb előfordulása miatt diabéteszes betegeknél a látásromlásnak legtöbbször az utóbbi károsodás az oka (Lightman és Towler 2003). Mindezek mellett azt is kimutatták, hogy a kettes típusú diabéteszes betegeknél a PDR mellett szinte mindig kialakul makulaödéma is (Tong et al. 2001). A betegségek patogenezisének legfontosabb komponensei a proliferatív diabéteszes retinopátiában a hipoxiát követő neovaszularizáció, míg makulaödéma esetén a vér-retina gát sérülése miatt bekövetkező folyadékbeáramlás (Joussen et al. 2007; Simó et al. 2006). A diabéteszes retinopátiát tárgyaló legtöbb tanulmány a belső vér-retina gát diszfunkciójával és a neuroretina károsodásával foglalkozik, ezzel szemben a diabétesz pigmenthámra kifejtett hatásai kevesebb figyelmet kaptak. Az értekezés ezért nagy hangsúlyt fektet a retinális pigmenthám szerepének megismerésére és a sejtek által szekretált faktorok szabályozási útvonalaira.

2. A PACAP

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, röviden PACAP (pituitary adenilate cyclase activating polypeptide) egy széles spektrumú hatásokkal rendelkező peptid, melyet 1989-ben Arimura és társai izoláltak birka hipotalamuszból. Elsőként a PACAP cAMP aktiváló hatásáról számoltak be, melyet patkány adenohipofízis sejtjein mutattak ki (Miyata et al. 1989). A PACAP két biológiailag aktív formája a PACAP1-38 (38 aminosavas forma, továbbiakban PACAP) és a PACAP1-27 (27 aminosavas). Utóbbi 68%-os homológiát mutat a vazóaktív intesztinális peptiddel (VIP), mely alapján a PACAP-ot a VIP/glükagon/szekretin

szupercsaládba sorolták (Arimura 1998; Campbell és Scanes 1992; Segre és Goldring 1993). A 27 aminosavnál rövidebb fragmensek általában antagonisták hatásúak, közülük a legáltalánosabban alkalmazott antagonisták a PACAP6-38 (Bourgault et al. 2008b). A PACAP-ot ezek után egyéb állatokból is sikerült izolálni és azt találták, hogy aminosav szekvenciája az emlősöknél teljesen azonos, alacsonyabb rendű gerinceseknél pedig csak 1-4 aminosav eltérés mutatkozik (Vaudry et al. 2000; Vincze és Köves 2001). A peptidnek ezen rendkívüli konzerváltsága arra enged következtetni, hogy alapvető élettani folyamatokban lehet szerepe (Reglődi 2009).

A PACAP előfordulása

A PACAP a szervezetben többek között a központi és a perifériás idegrendszerben fordul elő (Shioda és Nakamachi 2015). Radioimmúnassay mérések segítségével kimutatták, hogy patkány agyban a hipotalamusz területén található meg legnagyobb mennyiségben (Arimura et al. 1991; Ghatei et al. 1993). A mérések a hipotalamikus portális erekben jóval magasabb PACAP koncentrációt mutattak, mint a perifériás vérben, ami azt bizonyítja, hogy a hipotalamusz axonterminálisai által felszabadított PACAP a portális keringés útján az adenohipofízisbe jut (Dow et al. 1994). A kísérletek során arra is fény derült, hogy a PACAP két formája közül a 38 aminosav hosszúságú 90%-ban, míg a 27 aminosavas forma csak 10%-ban van jelen az agyban (Arimura et al. 1991; Ghatei et al. 1993; Hannibal et al. 1995; Masuo et al. 1993; Piggins et al. 1996). A hipotalamuszon kívül a központi idegrendszer egyéb területein is kimutatták a PACAP-ot, többek között a substantia nigra, nucleus accumbens, globus pallidus, híd területén (Ghatei et al. 1993; Masuo et al. 1993), a kisagyban (Ghatei et al. 1993; Hannibal et al. 1995a; Mikkelsen et al. 1994; Nielsen et al. 1998a; Takahashi et al. 1994; Horváth et al. 2015), a ganglion spinale-ban (Mulder et al. 1994), az amygdalában és a talamusz mediodorsalis, valamint paraventriculáris magjaiban, (Köves et al. 1991; Masuo et al. 1993; Takahashi et al. 1994; Palkovits et al., 1995) és nem utolsósorban a retinában is (Hannibal et al. 1997; Seki et al. 2000). Később gerinctelen állatokból (Kiss és Pirger 2013; Molnár et al. 2006), halakból (Matsuda et al. 1997; Montéro et al. 1998, Agnese et al. 2016), kételtűekből (Yon et al. 1992, 1993b), és madaraktól (Peeters et al. 1998, Józsa et al. 2006) is izoláltak PACAP-ot. A peptid központi idegrendszerbeli eloszlása hasonló mintázatot mutatott, mint emlősökben (Yon et al. 1992; Montéro et al. 1998).

A PACAP a perifériás szervekben

A központi idegrendszeren kívül a PACAP kimutatható perifériás szervekben is. Ezek közül az endokrin szervekben található a legtöbb PACAP. A mellékpajzsmirigyben (Luts és Sundler 1994), a mellékvesékben (Arimura et al. 1991; Liu et al. 2016), az endokrin pancreasban (Arimura és Shioda 1995; Love és Szebeni 1999), valamint a gonádokban (Shioda et al. 1994) fordul elő a legnagyobb mennyiségben. Patkányban érdekes módon a legmagasabb PACAP koncentrációt a herében mérték, ami bármely más peptid koncentrációjánál nagyobb volt, valamint az átlagos agyi PACAP koncentrációt is meghaladta (Arimura et al. 1991). Az endokrin szerveken kívül a periférián a gasztrointesztinális rendszerben volt még a PACAP nagy mennyiségben kimutatható (Arimura et al. 1991; Ghatei et al. 1993; Hauser-Kronberger et al. 1992; Horváth et al. 2016; Mao et al. 1998; Pirone et al. 2011; Szántó et al. 2012, Vincze et al. 1999). A PACAP ezen kívül előfordul még különböző testfolyadékokban, a folliculáris folyadékban, vérplazmában, és a VIP-hez hasonlóan a tejben is (Werner et al. 1985; Börzsei et al. 2009, Brubel et al. 2011; Koppán et al. 2012). A központi idegrendszerrel ellentétben a periférián a PACAP-ot és a VIP-et koexpresszáló sejtek találhatóak (Fahrenkrug és Hannibal, 1998; Moller et al. 1993).

A PACAP előfordulása a szemben

PACAP-szerű immunreaktivitást (PACAP-IR) a szemben radioimmunassay módszerrel legnagyobb koncentrációban a musculus sphincter pupillae-ban és a corpus ciliare-ban találtak (Onali és Olianias, 1994; Wang et al. 1995). PACAP pozitív idegrostokat mutattak ki a retina idegrostrétegében, a ganglionsjetes rétegben és a belső szinaptikus rétegben. Ezen kívül az amakrin és a horizontális sejtek perikaryonjai a belső magvas rétegben és a ganglionsejtek is jelölődtek immunhisztokémiai módszerrel. Ultrastrukturális szinten PACAP-szerű immunreaktivitás a plazmamembrán közelében, a durva felszínű endoplazmatikus retikulumban és a citoplazmában volt detektálható (Seki et al. 2000). Patkány, egér, sertés és marha retinában és a szem egyéb szöveteiben a PACAP mindkét formája jelentős cAMP növekedést okoz. A PACAP1-38 hatásosabbnak bizonyult a PACAP1-27-nél és mindkettő erősebb cAMP aktivációt okozott, mint a VIP (D'Agata és Cavallaro 1998). Más tanulmányok kimutatták, hogy a PACAP emeli az inozitol monofoszfát szintjét is (Onali és Olianias 1994). A ganglionsejtek bizonyos csoportjaiban, melyek a

nucleus suprachiasmaticusba projiciálnak, a PACAP a glutamáttal együtt tárolódik és a cirkadián ritmus szabályozásában is szerepet játszik (Hannibal és Fahrenkrug 2004).

A PACAP receptorai és előfordulásuk

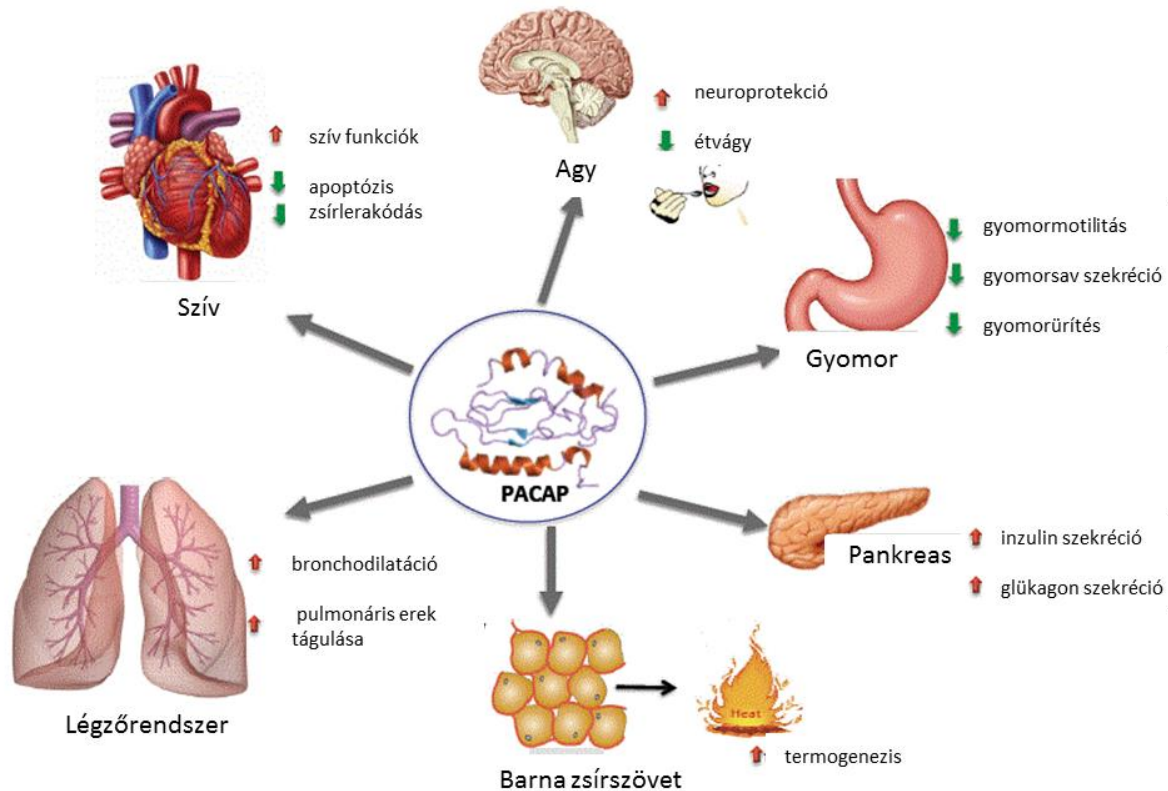
A PACAP három receptorral rendelkezik. Mindhárom receptor G proteinhez kapcsolt és a szekretin receptor családkhoz tartozik. A receptorok hét transzmembrán domént és egy intracellulárisan G-proteint kötő domént tartalmaznak. Az egyes típusú PAC1-receptort emberben az ADCYAP1R1 gén kódolja. Ez a receptor nagyságrendekkel erősebben köti a PACAP-ot, mint a VIP-et, míg a másik két receptor (VPAC1 és VPAC2) azonos affinitással köti mindkét peptidet (Arimura 1998; Laburthe et al. 2007). A receptorok a szervezetben különböző mennyiségben fordulnak elő. A PAC1-receptort az adenohipofízisben, a gerincvelőben, a mellékvesevelőben és a herében és a retinában írták le többek között, míg a VPAC1-receptor például a központi idegrendszerben, a tüdőben, a májban, a lépben, a tímuszban, az ováriumban és az emésztőrendszer egyes szakaszain mutatható ki (Hashimoto et al. 1996; D'Agata és Cavallaro 1998; Joo et al. 2004). A VPAC2 eltérő eloszlást mutat, előfordul a talamuszban, a nucleus suprachiasmaticusban, az amygdalában és a ponsban (Ishihara et al. 1992; Usdin et al. 1994). A PAC1-receptornak 8 splice variánsa ismert: hip, hop1, hop2, hip-hop1, hip-hop2, short, very short és TM4 (Arimura 1998; Dickson és Finlayson 2009; Vaudry et al. 2000a).

A szemben PAC1 receptort és mRNS-ét a legnagyobb mennyiségben a retina ganglionsejtes rétegében és a belső magvas rétegben detektálták (Seki et al. 1997, 1998, 2000). A pigmentsejtes rétegben mindhárom PACAP receptor mRNS-ét ki tudták mutatni (Zhang et al. 2005), míg egy másik tanulmányban a VPAC receptorok jelenlétét bizonyították patkány retinában (D'Agata és Cavallaro 1998).

A PACAP általános szerepe a szervezetben

A PACAP izolálását követően elsőként az endokrin rendszerre kifejtett hatásai váltak ismertté (Counis et al. 2007; Köves et al. 1990, 1998). A peptid a hipofízis elülső és hátsó lebenyi hormontermelésének szabályozásában egyaránt szerepet játszik (Azuma et al. 2013; Chiodera et al. 1995; Evans 1999, Kántor et al. 2000; Okada et al. 2007; Rawlings és Hezareh 1996). Ezen kívül befolyásolja a pajzsmirigy és a gonádok által termelt hormonok elválasztását (El-Gehani et al. 2000; Okada et al. 2007), a spermiogenezist, a folliculusok

fejlődését a petefészekben (Apa et al. 2002; Barberi et al. 2007; Csaba et al. 1997; Gras et al. 2005; Li et al. 2004, Reglődi et al. 2012), serkenti a csont- és porcfejlődést (Juhász et al. 2015), valamint a hasnyálmirigy inzulintermelését is serkenti (Winzell és Ahren 2007) (4. ábra).



4.ábra. A PACAP hatásai a test egyes szerveire (a teljesség igénye nélkül)
(forrás: Diané et al. 2014(módosítva))

Az endokrin hatásain kívül patkányban és egérben többek között növeli a lokomotoros aktivitást (Adamik és Telegdy 2004; Masuo et al. 1995), védi a vese szöveteit diabéteszes nefropátia esetén (Bánki et al. 2014), részt vesz a stressz adaptációs magatartás szabályozásában (Agarwal et al. 2005; Gaszner et al. 2012; Légrádi et al. 2007) és antidepresszáns hatásai is vannak (Reichenstein et al. 2008). A PACAP szerepe a circadián ritmus szabályozásában is elengedhetetlen, a glutamát mellett a retinohipotalamikus pálya fő transzmittere (Hannibal 2006; Hannibal és Fahrenkrug 2004; Hannibal et al. 2016; Köves et al. 2003; Nagy és Csernus 2007; Vereczki et al. 2006).

A PACAP általános cito- és neuroprotektív hatását többen leírták már. A PACAP védő hatását először kisagyai szemcsesejteken mutatták ki (Canonica et al. 1996). A PACAP ezeken a sejteken antiapoptotikus hatást mutat ethanol, oxidatív stressz és ceramid-indukálta

károsodáskor is (Vaudry et al. 2002, 2003). Kutatócsoportunk vizsgálatai során igazolódott a peptid védő hatása arteria cerebri media okklúzió okozta fokális agyi ischaemiában (Reglődi et al. 2000) és 6-OHDA-indukálta Parkinson-kór (Reglődi et al. 2004; Reglődi et al. 2011) modellekben in vivo. Felfedezése óta számos nem-neuronális modellben bizonyították antiapoptotikus hatását, többek között: hypophysis adenoma sejtekben TGF β -indukálta sejtkárosodással szemben (Oka et al. 1999), ovarialis follicularis sejtekben (Lee et al. 1999), PC-3 prosztata tumorsejtekben (Gutierrez-Canas et al. 2003). Emellett a PACAP a vékonybél ischaemia esetén szintén protektív hatást mutat (Ferencz et al. 2009).

A következő bekezdésekben részletesebben beszámolok a PACAP retinára kifejtett hatásairól, mivel ezek a legrelevánsabbak az értekezésemben.

A PACAP in vitro védő hatása a retinában

Általános in vitro hatások

Az első in vitro kutatások eredményei alapján az derült ki, hogy a VIP, PACAP1-27 és PACAP1-38 (Shoge et al. 1998, 1999) retinoprotektív hatású a glutamát okozta toxicitás ellen sejtenyészetben. A PACAP1-27, PACAP1-38 és a VIP emelte a cAMP aktivitást, míg izoformáik a VIP6-28, PACAP6-38 antagonistá hatást fejtettek ki. Ezen felül a H-89 (PKA antagonistá) is csökkentette a PACAP és VIP védő hatását. Silveira és munkatársai (2002) azt találták, hogy az anizomicin újszülött patkányok szeméből létrehozott retinatenyészetben sejthalált indukált a fehérjeszintézis gátlásán keresztül. A PACAP1-27 és PACAP1-38 dóziszfüggően gátolta a sejthalált. A PACAP1-38 neuroprotektív hatását thapsigargin okozta fotoreceptor sejthalál esetében is bizonyították (Silveira et al. 2002). Ebben a szövetenyészetben a PACAP6-38 és egy másik specifikus PAC1-receptor antagonistá, a max.d.4 gátolta ezt a védő hatást. Molekuláris biológiai és immunhisztokémiai módszerekkel is igazolták, hogy a retinoprotekció nagy valószínűséggel PAC1-receptor mediált, ami az újszülött retina minden rétegében megtalálható.

Ivarérett teknősök horizontális sejtjei a szem eltávolítását követő 18, 22, 42 és 46 órával még fényreakciót mutattak. Rábl és munkatársai (2002) kimutatták, hogy ennek amplitúdója minden alkalommal nagyobb volt PACAP1-38-at tartalmazó oldatban, mint a kontroll, anoxiás retinaszeletekben (Rábl et al. 2002).

A PACAP pigmenthámra kifejtett in vitro védő hatása

Az első eredményeket Zhang és munkatársai publikálták 2005-ben. Kezeletlen pigmenthám tenyészetben (ARPE-19 sejtvonalon) kimutatták a PAC1 és VPAC1-receptor mRNS-t. VPAC2-receptor mRNS-t csak IL-1 β kezelés hatására találtak. Ezen kívül azt tapasztalták, hogy 0,1-1 μ M-os koncentrációban a PACAP az IL-1 β hatására megemelkedett IL-6, IL-8 és a monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1) mRNS és fehérje szinteket lecsökkentette. A PACAP-pal kezelt ARPE-19 sejtek túlélése jelentős mértékben, dóziszfüggően javult hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz esetén (Mester et al. 2011). A legnagyobb hatékonyságot 100 nM-os koncentrációnál figyelték meg, de hatásos volt az 1pM-1 μ M-os tartományban is, míg ennél kisebb dózisban hatástalannak bizonyult. Áramlási citometriás mérésekkel és JC-1 assay-vel kimutatták, hogy a PACAP kezelés csökkenti az apoptotikus sejthalált. Ez a védő hatás PI3K/Akt gátlókkal kivédhető volt, míg a MAPK gátlók hatástalannak voltak (Mester et al. 2011).

Egy kísérletben a közelmúltban azt találták, hogy a PACAP befolyásolja a pigmenthámsejtek semaphorin4A expresszióját (Ko et al. 2015). A semaphorin fehérjecsatlád egyes tagjai befolyással vannak az agy és a retina fejlődésére. A semaphorin4A a fotoreceptor sejtek és pigmenthámsejtek közötti kapcsolat kialakulásának idején a ganglionsejtek rétegében, a belső magvas rétegben és a pigmenthámsejtekben expresszálódik. Az ARPE-19 sejteket PC12 sejtekkel együtt tenyésztve azt találták, hogy a semaphorin4A fehérje és mRNS szintje a neuronális sejtek jelenlétében PACAP kezelés hatására megemelkedett. Ez a hatás még ERK foszforilációval is kapcsolatba hozható volt. Mindezen hatásokat a PACAP6-38 blokkolta. Ezen felül a PACAP6-38 csökkentette az IL-6 expresszióját, mutatva, hogy az endogén PACAP részt vesz a neuronális sejtek által indukált IL-6 termelésben. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a neurális sejtek által termelt PACAP több, pigmenthám által termelt faktor szekrécióját befolyásolja, melyek fontosak a fejlődésben és a homeosztázis fenntartásában (Ko et al. 2015).

Egy másik tanulmány a PACAP és a VIP retinasejtek közötti zonula occludensek felszakadására kifejtett védő hatását vizsgálta. Ez a folyamat fontos szerepet játszik a diabéteszes retinopátia során kialakuló makulaödéma létrejöttében (Scuderi et al. 2013). Az ARPE-19 sejteket IL-1 β gyulladáscsökkentő citokin jelenlétében normál és magas glükóztartalmú médiumban tenyésztették. A sejtek permeabilitásának változásait transzepiteliális elektromos ellenállás és a fluoreszcein-isotiocianát (FITC) dextrán sejtben történő mozgásának mérésével becsülték meg (Scuderi et al. 2013). Az eredmények azt mutatták, hogy a magas glükóz és IL-

1 β jelenlétében tenyésztett sejtekbe szignifikánsan több FITC-dextrán diffundált, míg az elektromos ellenállás lecsökkent. A PACAP és a VIP ezeket a hatásokat meggátolták. Ezen felül a magas glükóz és IL-1 β kombinációja által indukált claudin-1 és ZO-1 expressziót is lecsökkentették. Az occludin expressziója semmilyen kísérleti körülmény között nem változott. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi megfigyelésekkel egy in vitro vér-agy gát modellben. Azt találták, hogy a PACAP kezelés megerősítette az agyi endothel sejtek barrier funkcióját azáltal, hogy a transzendotheliális elektromos ellenállást megemelte, ami az egyik legfontosabb tényező a zonula occludensek fenntartásában (Wilhelm et al. 2014).

A PACAP protektív hatásai a retinában in vivo

A PACAP védő hatása excitatórikus retinakárosodás esetén

A glutamát egy nem esszenciális aminosav, normál körülmények között excitatórikus neurotranszmitterként funkcionál a retinában. Mindazonáltal, a glutamát receptorok túlstimulálásával nagy mennyiségben károsíthatja a retina sejtjeit. A szisztémásan adott nátrium-glutamát (MSG) átjut az újszülött patkányok vér-agy (és vér-retina) gátján, ezáltal károsítja a retinát (Szabadfi et al. 2009) és a belső retinarétegek elvesztésével jár (Babai et al. 2006).

A retina excitotoxikus károsodása sok retinabetegség hátterében állhat. Ilyen például a glaukóma és az iszkémiás retinopátia. PACAP munkacsoportunk korábban többször is leírta a PACAP védő hatását szisztémás MSG károsodást követően. Babai és munkatársai azt találták, hogy a posztnatális első, ötödik és kilencedik napon intravitrealisan adott MSG az újszülött patkányok retinájának belső rétegeiben súlyos neurodegenerációt okozott. Három héttel az MSG kezelést követően a retina teljes vastagsága jelentősen lecsökkent, a külső és belső határhártya közötti távolság csak a fele volt a normál retinához képest. Ezen túlmenően a belső rostos réteg majdnem teljesen eltűnt, valamint a ganglionsejtek rétege és a belső magvas réteg összenőtt. A ganglionsejtek száma szintén csökkent (Atlasz et al. 2009a; Babai et al. 2005, 2006; Tamas et al. 2004). Bár a PACAP képes áthatolni a vér-agy gáton, a szisztémás PACAP kezelés mégsem eredményezett jelentős javulást az MSG okozta károsodást követően (Kiss et al. 2006). Az intravitrealisan injektált PACAP (1-100 pmol) ezzel szemben szignifikánsan javította a retina szöveti szerkezetét. Míg az 1 pmol koncentrációjú PACAP csak kismértékben, a 100 pmol-os PACAP jelentős javulást eredményezett, a kezelt retina a

normál retinához volt hasonló. PACAP1-27 kezeléssel ugyanezeket az eredményeket kapták (Atlasz et al. 2009). A két leggyakrabban használt PACAP antagonistá (PACAP6-27, PACAP6-38) alkalmazása további károsodáshoz vezetett, ami azt sugallja, hogy a szervezetben jelenlévő endogén PACAP kulcsszerepet tölt be retinakárosodást okozó tényezőkkel szemben (Atlasz et al. 2009). Hasonló fokú retinoprotekciót figyeltek meg ingergazdag környezetben élő állatoknál is, míg az előző két neuroprotektív stratégia együttes alkalmazása nem okozott további javulást (Kiss et al. 2011).

Immunohisztokémiával kimutatták a PACAP sejtspecifikus hatását MSG indukálta retinadegeneráció esetén. Az MSG-vel kezelt retinánál a belső magvas réteg, a belső rostos réteg és a ganglionsejtek rétegében lévő sejtek sejttestjei és nyúlványai a vezikuláris glutamát transzporter 1-re (VGLUT1), a tirozin hidroxilázra, vezikuláris GABA transzporterre, parvalbuminra és calretininre gyengébb immunreaktivitást mutattak. Az MSG kezelést követően a calbindin pozitív horizontális sejtek nem tűntek érintettnek. Az MSG és PACAP-pal kezelt retinák a normálhoz hasonló immunreaktivitást mutattak. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PACAP egy általános protektív mechanizmussal védi a retinát a glutamát okozta excitotoxicitás ellen (Atlasz et al. 2008).

A PACAP kutatócsoportunk a potenciális szignáltranszdukciós utakat is megvizsgálta. Azt találták, hogy az MSG kezelést megelőző intravitreális PACAP adagolás 12 órával a kezelést követően szignifikánsan emelte az ERK1/2 és a CREB foszforilációját, a nem kezelt kontralaterális szemekhez képest. 24 órával a kezelést követően nem történt további emelkedés. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy mind az MSG degeneratív, mind a PACAP védő hatása komplex, kináz szignáltranszdukciós utakon keresztül történik, és összefüggenek a cAMP/ERK/CREB aktivációjával (Rácz et al. 2006b). Ezen felül, az MSG kezelést követően pro-apoptotikus szignálfehérjék, mint a kaszpáz-3, JNK, apoptózis indukáló faktor és a citokrom-c expressziója nőtt, míg néhány anti-apoptotikus fehérje (foszfo-PKA, foszfo-Bad, Bcl-xL, 14-3-3 fehérje) koncentrációja csökkent. PACAP egyidejű adásával ezek a folyamatok megfordultak, a pro-apoptotikus szignálmolekulák szintje lecsökkent, míg az anti-apoptotikus faktorok expressziója szignifikánsan megnövekedett (Rácz et al. 2006a, 2006b, 2007).

Munkacsoportunk megvizsgálta az MSG kezelés rövid távú funkcionális következményeit is egér retinában. Spontán és fény által kiváltott csúcsokat detektáltak a vad típusú egerek ganglionsejtjeiből 60 csatornás multielektroda array segítségével. 4-5 perccel a kezelést követően az MSG jelentősen megnövelte a szabad intracelluláris kalcium koncentrációját és a spontán tüzelést is. Ez 10-15 perccel az MSG adás után szinte teljesen

megszűnt. A PACAP-pal történő előkezelés kivédte az MSG hatásait, a tüzelési mintázatban csak csekély vagy semmilyen különbség nem volt felfedezhető a normál szemhez képest, valamint a Ca^{2+} beáramlás jelentős mértékben csökkent. Az eredmények tükrében elmondható, hogy a PACAP kezelés megóvta a sejteket a rövid távú MSG okozta károsodástól (Atlasz et al. 2014). Felmerült a kérdés, hogy a PACAP ezen nyilvánvaló morfológiai hatásai vajon funkcionális javulással is járnak-e MSG okozta károsodás esetén (Varga et al. 2011). Elektroretinográfiás mérésekkel az a és b hullámok jelentős csökkenését mutattuk ki MSG kezelés után, ezzel tükrözve a belső retinarétegek és a fotoreceptorok működésének sérülését. Azon retinánál, ahol intravitreális PACAP kezelést alkalmaztunk, ezek az értékek szignifikánsan magasabbak voltak. Tehát a PACAP kezelés képes volt a morfológia mellett a funkció javítására is (Varga et al. 2011). Ezek az eredmények klinikai szempontból is igencsak fontosak lehetnek, egy esetleges PACAP hatásokon alapuló gyógyszer kifejlesztése esetén.

A kainsav egy glutamát receptor agonista, excitotoxikus sejthalált okoz a központi idegrendszerben, így a retinában is. Seki és munkatársai (2006) azt találták, hogy 5 nmol kainsav az AMPA/kainát receptort expresszáló ganglionsejtek halálát okozta (Zhang et al. 1995). Munkacsoportunk is kimutatta, hogy a mikroiontoforetikusan in vivo adagolt PACAP blokkolni tudta a kainsav excitatórikus hatásait több agyi területen is (Atlasz et al. 2006). A 10 pmol-os PACAP előkezelés kainsav indukálta neurodegeneráció esetén protektívnek bizonyult patkány retinában, amit a ganglionsejtek szignifikáns túlélése is alátámasztott (Seki et al. 2006).

A PACAP hatása a retina iszkémiás károsodása esetén

Az emberi testben az egyik legérzékenyebb szövet a hipoxiára a retina. Több betegség, például a diabéteszes retinopátia és a magas intraokuláris nyomás a retina hipoperfúzióját okozzák. Ennek modellezésére többek között permanens kétoldali arteria carotis communis leköttést alkalmaznak (BCCAO), ami csökkent agyi vérátáramláshoz vezet. Mindezek biokémiai és viselkedésbeli változásokat, valamint retinadegenerációt okoznak (Atlasz et al. 2007; Mester et al. 2009).

A PACAP kutatócsoport több tanulmányban is kimutatta, hogy az intravitreális PACAP a retina iszkémiás léziója esetén erőteljes védő szereppel bír. Azt találták, hogy a BCCAO súlyosan károsítja a retina összes rétegét. Két héttel az artériák leköttése után a rostos rétegek vastagsága jelentős mértékben csökkent, így a külső és belső határhártya közötti

távolság is szignifikánsan kevesebb lett, mint a kontroll retináknál. Néhány BCCAO-n átesett állatnál bipoláris sejtek degenerálására utaló jeleket találtak. Ezen kívül, a fotoreceptorok külső szegmensei megrövidültek és struktúrájukban is sérültek (Atlasz et al. 2007). A BCCAO-t követő intravitreális PACAP adagolás a retina normál állapotának megőrzését eredményezte, amit a morfológiai analízis is alátámasztott. A retina rétegeinek vastagsága a kontroll értékekhez közeli volt, míg a ganglionsejtek száma a PACAP kezelt egyedeknél sem volt magasabb. A PACAP6-38 ellensúlyozta a PACAP védő hatását. Immunhisztokémiás módszerekkel is megerősítették a fent leírtakat, és kimutatták, hogy a retina bizonyos sejtípusai BCCAO hatására sérültek, míg az intravitreális PACAP megvédte ezen sejteket (Atlasz et al. 2010).

A PACAP munkacsoport egy további tanulmányosorozattal is alátámasztotta ezeket az eredményeket, melyet különböző analógok hatásainak összehasonlításával is kiegészítettek (Szabadfi et al. 2012a; Werling et al. 2014). A következő PACAP fragmensek hatását vizsgálták BCCAO okozta iszkémiás retinopátiás modellben: PACAP 4-13, 4-22, 6-10, 6-15, 11-15, és 20-31, valamint három rokon peptidet (VIP, szekretin, glükagon). Azt találták, hogy a leghatékonyabb molekula a PACAP1-38, míg a többi fragmens és a rokon peptidek nem védtek meg a retinát (Werling et al. 2014). Az egyetlen kivétel a VIP volt, ami képes volt retinoprotektív hatást kifejteni, de csak tízszer nagyobb dózisban, mint a PACAP (Szabadfi et al. 2012a). A legújabb kutatások során arra az eredményre jutottak, hogy a PACAP iszkémiás károsodás esetén szemcsepp formájában is képes kifejteni retinavédő hatását (Werling et al. 2015).

Hogy fény derüljön a molekuláris mechanizmusokra, a MAP kinázok, az Akt és jónéhány citokin expresszióját vizsgáltuk meg BCCAO indukálta retinális iszkémia modellben, patkányokon (Szabó et al. 2012). A PACAP önmagában nem befolyásolta a MAP kinázok foszforilációját, de csökkentette a hipoperfúzió által aktivált p38 MAPK és JNK koncentrációját, és növelte a védő hatású Akt és ERK1/2 expresszióját. A PACAP citokinekre kifejtett hatásának vizsgálata saját munka volt, ezt a későbbiekben az eredményeknél tárgyalom. A PACAP kutatócsoport a funkcióban bekövetkező változásokat itt is elektroretinográfiás mérésekkel erősítette meg (Dányádi et al. 2014). A retinakárosodás mértékét és a PACAP védő hatását az elektroretinogram által detektált hullámok formájának és amplitúdójának változásai alapján mérték. A BCCAO okozta funkcióvesztés már a második posztoperatív napon jelentkezett és az egész megfigyelési idő alatt fennállt. Az arteria carotis communis lekötését követő intravitreális PACAP kezelés jelentős funkciójavulást eredményezett a 2. és a 14. posztoperatív napon is. A PACAP-pal kezelt

retinák ERG-je a kontrollhoz volt hasonló, szemben a fiziológias sóoldatot kapott retinák ERG-jével. A PACAP szignifikáns mértékben javította az iszkémia indukálta amplitúdóváltozásokat mind az 'a', mind a 'b' hullámok esetén a 14. posztoperatív napon. Az oszcillátoros potenciálok csökkentek az iszkémiás csoportoknál, a PACAP védő szerepe itt is szignifikánsan megmutatkozott, az oszcillátoros potenciálok a PACAP kezelést követően a normálhoz közelítettek. A kapott eredmények azt bizonyítják, hogy PACAP kezelés hatására a morfológia mellett a funkció is javul (Dányádi et al. 2014). Ezeknek az eredményeknek köszönhetően a PACAP a potenciális neuroprotektív molekulák listájára került az iszkémiás retinopátia elleni harcban (Cervia és Casini 2013; Szabadfi et al. 2010).

A PACAP protektív hatása UV sugárzás esetén

A PACAP munkacsoport elsőként mutatta ki, hogy a PACAP két különböző (diffúz és fókuszált) UV-A indukálta degenerációban is védő hatással bír. A retina rétegeinek vastagságát, valamint a belső és külső magvas réteg és a ganglionsejtek rétegében található sejtek számát standard morfológiai és morfometriai analízissel határozták meg. Diffúz UV-A besugárzás esetén a ganglionsejtek száma szignifikánsan csökkent. Emellett a magvas rétegek súlyos károsodása és a belső rostos réteg megduzzadása volt megfigyelhető. A UV-A besugárzást követő PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette a degenerációt és helyreállította a sejtszámokat (Atlasz et al. 2011). A fókuszált UV-A besugárzás modelljénél szövethézagokat találtak a külső magvas rétegben és a fotoreceptorok rétegében, valamint a belső rostos réteg vastagsága lecsökkent. A retina teljes vastagsága szignifikánsan kisebb volt, mint a nem besugárzott területeken. A PACAP a retina minden rétegében védő hatással rendelkezett (Atlasz et al. 2009).

A PACAP hatásai diabéteszes retinopátia esetén

Kutatócsoportunk nemrégiben közölt tanulmányai kimutatták, hogy a PACAP diabéteszes retinopátiában, a cukorbetegség egy jelentős mikroangiopátiájában is védő hatást fejt ki. Az első eredmények azt mutatták, hogy a diabétesz korai stádiumában az amakrin sejtek, közülük is leginkább a dopaminerg amakrinsejtek degenerálódnak. A PACAP megakadályozta a sejtek arborizációjában és a tirozin-hidroxiláz pozitív dopaminerg sejtek közötti szinapszisokban bekövetkező degenerációt (Atlasz et al. 2010). Sztreptozotocin indukálta diabéteszes retinopátia patkánymodellben, a cukorbetegség korai jelei nem a

retinarétegek vastagságának, hanem a ganglionsejtek számának csökkenésében és a GFAP expressziójának növekedésében, azaz a Müller glia sejtek aktivációjában mutatkozott meg. Ezeket a változásokat háromszori 100 pmol-os PACAP kezelés kivédte (Szabadfi et al. 2012b). A fotoreceptorok külső szegmensének és terminálisainak degenerációját is csökkentette a PACAP. Molekuláris biológiai módszerekkel kimutatták, hogy a PACAP emeli a PAC1-receptor és a tirozin-hidroxiláz expresszióját.

A felsorolt tanulmányok mind a PACAP terápia alkalmazhatóságának lehetőségét támasztják alá (Gábrriel 2013; Marzagalli et al. 2015; Szabadfi et al. 2014b). Jónéhány egyéb állatmodellen folytatott kísérlet eredményei is bizonyítják a PACAP védő hatását diabéteszben, például diabéteszes nefropátia esetén (Bánki et al. 2013, 2014). Így a PACAP a VEGF antagonisták, antioxidánsok, gyulladásgátló szerek és egyéb neuropeptidek mellett a diabétesz elleni harc egyik potenciális molekulája (Gábrriel 2013; Ola et al. 2015; Scuderi et al. 2015).

Tumorsejteken folytatott vizsgálatok

A PACAP-nak eltérő hatása lehet különböző forrásból származó sejtekre, különösen a tumorsejtekre. Míg a legtöbb sejttípus esetén a PACAP védő hatású, néhány tumor esetén sejtkárosodást idéz elő (Brubel et al. 2010). Ezen felül, a PACAP6-38 általában antagonistá hatást fejt ki, de bizonyos tumoros, sőt néhány nem tumoros sejtvonal esetében agonistaként is viselkedhet (Juhász et al. 2015, Ságghy et al. 2015).

A retinoblastoma a retinális progenitor sejtek rosszindulatú daganata. Az emberi retinoblastoma sejtekről leírták, hogy PACAP receptorokat expresszálnak, ezért vizsgálták a PACAP ezen sejtekre kifejtett hatását (Olianas et al. 1996). Az Y79 emberi retinoblastoma sejtvonalnál a nanomólos koncentrációban történő PACAP kezelés nem befolyásolta a sejttúlélést, de az 1-5 mikromólos PACAP adagolás gátolta azt (Wojcieszak és Zawilska 2014). Érdekesség, hogy a PACAP1-27 és a maxadilán (PAC1-receptor agonista) elhanyagolható hatású volt, míg a PACAP két membránon átjutó analógja csökkentette a sejtek életképességét. A szerzők azt is leírták, hogy ez a citotoxikus hatás a p38 és JNK jelátviteli utak gátlásán keresztül történhet (Wojcieszak és Zawilska 2014). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a magas koncentrációjú PACAP kezeléskor a PACAP nem receptorain keresztül, hanem a sejtmembránon áthatolva közvetlenül fejt ki citotoxikus hatását.

A PACAP angiogenezisre kifejtett hatása

Az angiogenezis az a folyamat, mely során a már létező erekből új erek képződnek. Az embrionális fejlődés során és később posztnatálisan is jelentős szerepe van számos fiziológias és patológias folyamatban is, mint a tumorok kialakulása, valamint krónikus gyulladásos reakciók progressziója (Folkman 1995). Az angiogenezis szabályozásában szerepet játszó legfontosabb faktorok a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor, a fibroblast növekedési faktor-2, az angiopietin, a vérlemezke eredetű növekedési faktor és a thrombospondin-1. Az utóbbi években egyre több tanulmány igazolta egyéb, endogén peptidok szerepét az angiogenezis szabályozásában, főként patológias körülmények között (Bouloumié et al. 1998; Fernandez et al. 1985; Ghezzi és Brines 2004; Le Noble et al. 1991; Seegers et al. 2003; Spinazzi et al. 2006). Az angiogenezis során az új kapillárisok és posztkapilláris venulák képződése részben endotheliális sejtburjánzásra, részben a mikroerek növekedésére vezethető vissza (Risau 1997). Az utóbbi folyamatnál nagyobb szinuszoid kapillárisok szétválnak kisebb kapillárisokra és külön növekednek tovább (Djonov et al. 2000), míg a sejtburjánzásos érképződés egy komplex folyamat, mely során nemcsak a sejtek és erek burjánzása, de sejt migráció, proliferáció, lumenképződés és a sejt túlélés is szerepet játszik (Risau 1997).

Az angiogenezis indukálásában több egyéb faktor mellett az FGF-2 és a VEGF bizonyult a legfontosabbnak. Az FGF-2 egy heparinkötő polipeptid, ami *in vitro* a proliferációt, migrációt és proteáz szekréciót serkenti, míg *in vivo* neovaszkularizációt fokozó szerepet tölt be (Basilico és Moscatelli 1992).

A VEGF *in vitro* és *in vivo* körülmények között is angiogénikus tulajdonságokkal rendelkezik, ezen kívül hatással van az erek permeabilitására is. Fontos szerepet tölt be a fiziológias és patológias érképződésben egyaránt. Az expressziója angiogenezis hatására nő, míg ezen folyamatok hiányában csökken (Ferrara 2004; Ribatti 2005). A fent említett két faktor mellett az angiopietin 1-et és 2-t is fontos ér stabilizáló faktorként írták le. Az előbbi az érképződéshez nélkülözhetetlen, míg az utóbbi az angiopietin 1 antagonistája, tehát egyensúlyuk elengedhetetlen a normális érképződéshez (Thurston 2003). A thrombospondin-1 molekulát írták le először, mint endogén anti-angiogénikus anyagot (Good et al. 1990). A hatását az endothel sejtek szaporodásának gátlásával, valamint a köztük lévő sejt kapcsolatok megbontásával fejtí ki (Taraboletti et al. 1990; Iruela-Arispe et al. 1991). Ezt követően még számos angiogenezis gátló faktort találtak, többek között az angiostatint és az endostatint. A PACAP angiogenezisre kifejtett hatásáról viszonylag kevés irodalom létezik. Leírták azonban, hogy a VIP és a PACAP1-27 is növeli a VEGF expressziót tüdőrákban a PKA

útvonal aktivációjával (Casibang et al. 2001). Ehhez hasonlóan mindkét előbb említett faktor fokozta a VEGF mRNS expresszióját prosztatacarcinóma sejtekben szintén a PKA, valamint a PI3K és az ERK1/2 útvonalakon keresztül (Collado et al. 2004, 2005). Kutatócsoportunk nemrégiben igazolta a PACAP pro-angiogenikus hatását öregedő cerebromikrovaszkuláris endothel sejteken (Bánki et al. 2014) A kísérlet során az öregedő endothel sejteken a PACAP szignifikánsan emelte a VEGFR2 receptor expresszióját, melyet a VEGF pro-angiogenikus hatásáért tartanak felelősnek. A PACAP egy másik tanulmányban leírtak szerint képes volt csökkenteni a VEGF koncentrációját ex vivo egér retinán. A magas glükóz koncentrációnak és oxidatív stressznek kitett egér retinák VEGF expressziója jelentős mértékben megnőtt, míg a PACAP kezelés visszaszorította ennek az pro-angiogenikus faktornak a mennyiségét (Amato et al. 2016). A PACAP humán trophoblast sejtek esetén is csökkentette számos angiogenikus molekula expresszióját (angiopoietin, angiogenin, VEGF), így védő hatásúnak bizonyult ebben a modellben is (Horváth et al. 2014).

III. Célkitűzések

1. A BCCAO kezelés által indukált súlyos degenerációt és a PACAP hatására bekövetkező szignifikáns morfológiai javulást már több közlemény leírta (Babai et al. 2005; Atlasz et al. 2008; Tamas et al. 2004). Kutatásaink során vizsgáltuk, hogy a pigmenthámsejtek milyen morfológiai változásokon esnek át súlyos iszkémiát követően, valamint azt, hogy ez az esetleges változás visszafordítható, illetve megelőzhető-e PACAP kezeléssel.
2. Célul tűztük ki a PACAP pigmenthámsejtekre kifejtett hatásának jobb megismerését, a molekuláris biológia folyamatok feltérképezését oxidatív stressz, valamint hipoxiás és hiperozmotikus károsodás esetén.
3. Mivel több, retinát érintő patológiás folyamat háttérében a pigmenthám által termelt VEGF, és egyéb angiogenikus faktorok hatására bekövetkező neovaszkularizáció áll, vizsgáltuk a PACAP angiogenikus hatásait a oxidatív stressz, hipoxiás és hiperozmotikus károsodás modellnél.

IV. Anyagok és módszerek

1. In vivo kísérletek

1.1. Kísérleti állatok és szövettani analízis

A 250-300 g súlyú hím Wistar patkányokon mindkét oldali arteria carotis communis lekötést (BCCAO) végeztünk. Izoflurán altatás mellett feltártuk az arteria carotis communisokat, majd elkötöttük őket 3-0-ás fonállal. A műtét után az állatok jobb szemébe Hamilton tű segítségével PACAP38-at (100 nmol/ 3 µl sóoldat) injektáltunk intravitreálisan. A bal szembe hasonló mennyiségű vivőfolyadékot adtunk. Az állatok egy csoportján az artériák lekötését leszámítva a folyamat minden lépését elvégeztük. Ezek szolgáltak PACAP és sóoldattal kezelt, áloperált (sham) állatokként. Az állatok elhelyezését, gondozását és a kísérletek kivitelezését az etikai szabályoknak és az egyetem által elfogadott protokollnak megfelelően végeztük (BA02/2000-15024/2011, Pécsi Tudományegyetem).

Az állatok túlaltatását követően a szemeket eltávolítottuk és jéghideg PBS-ben kipreparáltuk a retinát, majd 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk. A szöveteket Durcupan ACM gyantába (Fluka, Svájc) ágyaztuk, 2 µm-es metszeteket készítettünk, majd toluidin késsel (Sigma, Magyarország) festettük. A metszeteket ezután Depex médiummal (Fluka, Svájc) tárgylemezen rögzítettük és Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal (Tokyo, Japán) vizsgáltuk. A digitális fotókon a méréseket a NIH Image 1.55 szoftver segítségével végeztük. A statisztikai analízisnél két-utas ANOVA-t használtunk Bonferroni féle poszt tesztel. A szöveti blokkokból a discus opticusától 1 és 2 mm közötti távolságban lévő területeken mértük a különböző rétegek vastagságát. Ahol a ganglion sejtes réteg (GCL) nem egy sejtréteg vastagnak látszott, azokat a metszeteket kizártuk a mérésből. Csoportonként 30 retinán analizáltunk a következő paramétereket: 1. a retina vastagsága a belső és külső határhártya között, 2. az egyes retinarétegek vastagsága és 3. a pigmenthámsejtek száma 100 µm-en. Az értekezés során részleteiben csak a harmadik paraméterre térek ki.

1.2. Citokin array

Az array a nitrocellulóz membránra felvitt antitestek és a mintában lévő fehérjék kötődésén alapul. A citokin array, és a későbbiekben leírt array kitek mindegyike egyszerre több (25-40) marker vizsgálatára alkalmas. A szemikvantitatív citokin array-hez a retinákat (n=18, 9 állat/ csoport) az iszkémiát követően 24 órával távolítottuk el. A citokin array-hez patkány citokin array panel A-t (R&D Systems, Biomedica, Magyarország) használtunk. A sejthomogenizátumokat és az array-t a korábban leírtakhoz hasonlóan (Horváth et al. 2010) a gyártó leírása alapján készítettük elő és végeztük el. A sejteket mini homogenizátor segítségével egy Eppendorf csőben proteáz inhibitor tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk. Ezt követően a sejteket 2 percen keresztül jégen szonikáltuk, majd 5 percig 14 000-es fordulatszámom centrifugáltuk. A felülúszóból fehérjemérést végeztünk. A mintákat pufferoldatba vettük fel, és az elsődleges antitestek keverékéből (1:100) 15 µl adtunk hozzájuk, majd egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Eközben a membránokat szintén 1 órán keresztül blokkoltuk. Ezután az elsődleges antitesttel konjugált mintákból 1,5 ml került minden membránra és így egy éjszakán át 2-8 fokon rázatógépen inkubáltuk. Háromszori, egyenként 10 perces PBS-ses mosást követően a membránokra tormaperoxidáz konjugált sztrepavidint tettünk, majd megismételtük a 3X10 perces mosást. Ezután a membránokra 2 ml kemilumineszcens reagenst pipettáztunk, majd röntgenfilmre előhívtuk. A filmet szkennelés után ImageJ szoftver segítségével analizáltuk.

2. In vitro kísérletek

Az emberi ARPE-19 (ATCC, Manassas, VA) sejtvonal egy 19 éves férfi donor intakt szeméből származik, aki egy motorbalesetben szerzett koponyasérülés következtében hunyt el. Azóta széles körben használják a sejtvonalat kutatási célokra. A sejteket Dulbecco szerint módosított Eagle F12 médiumban (DMEM/F12, Invitrogen) növesztettük, melyet 10 % FBS-sel (Invitrogen), 100 U/ml penicillinnel, és 100 µg/ml streptomycinnel egészítettük ki. A sejteket 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó termosztátban, 75 cm² alapterületű flaskákban inkubáltuk.

2.1. MTT teszt

Az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium bromid) teszttel a sejtek életképességét vizsgáltuk különböző kezelések hatására. A teszt során az élő sejtek mitokondriumaiba bejutott sárga színű MTT festéket a sejtek kék formazánná alakítják. A wellekben mért abszorbancia az élő sejtek számával arányos. A kísérlet során 15 000 sejtet tettünk ki 100 µl médiumban wellenként egy 96 lyukú plate-re. A sejteket érő hipoxia hatását 200 µM CoCl₂ kezeléssel, a hiperglikémiát 40 mM glükózzal, a hiperozmotikus stresszt 200 mM szacharóz adagolásával, az oxidatív stresszt pedig 250 µM H₂O₂ alkalmazásával modelleztük. Kísérleti csoportjaink a következők voltak:

1. Kontroll
2. 100 nM PACAP
3. 200 µM CoCl₂
4. 200 µM CoCl₂ + 100 nM PACAP
5. 40 mM glükóz
6. 40 mM glükóz + 100 nM PACAP
7. 200 mM szacharóz
8. 200 mM szacharóz + 100 nM PACAP
9. 250 µM H₂O₂
10. 250 µM H₂O₂ + 100 nM PACAP

A mintákat minden csoportból 12-12 lyukba tettük ki és 24 órás kezelést kaptak. A 24 óra leteltével minden wellhez 10 µl 5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot adtunk, így a végkoncentráció 0,45 mg/ml lett. Az MTT-vel kezelt mintákat 4 órán keresztül termosztátban inkubáltuk, majd a sejtek által redukált formazán festék részecskéket 100 µl DMSO-ban (dimetilszulfoxid) oldottuk fel. Fél óra rázatás után az abszorbanciát ELISA leolvasó segítségével 630 nm-en mértük. Az adatokat két-utas ANOVA és Bonferroni féle poszt teszttel analizáltuk.

2.2. Apoptózis array

Az apoptózis array-t sejthomogenizátumból végeztük humán apoptózis array kit felhasználásával (R&D Systems; Biomedica Hungaria, Magyarország). Az ARPE-19 sejteket

24 órán keresztül 0,25 mM hidrogén-peroxid és 100 nM PACAP kezelésnek vetettük alá. A kezelések koncentráció értékeit korábbi mérések alapján határoztuk meg (Mester et al. 2011). Több kutatás eredménye alapján a PACAP erősen citoprotektívnek bizonyult nanomólos koncentrációban, amit korábbi saját ARPE sejt kísérleteink is alátámasztottak (Mester et al. 2011; Somogyvari-Vigh és Reglódi, 2004). Az alkalmazott hidrogén-peroxid koncentráció is optimálisnak bizonyult, mivel szignifikáns, de javítható sejtkárosodást okozott (Mester et al. 2011). Az array-t a citokin array-nél leírtaknak megfelelően végeztük el.

2.3. Foszfo-kináz array

A foszfo-kináz array-t humán foszfo-kináz array kit (R&D Systems; Biomedica Hungaria, Magyarország) felhasználásával végeztük el. A sejteket az apoptózis array-hez hasonlóan 0,25 mM hidrogén-peroxiddal és 100 nM PACAP-pal egy napon keresztül kezeltük. Az arrayt a gyártó protokollját követve, 1.2. pontban leírtaknak megfelelően hajtottuk végre.

2.4. Angiogenesis array

Az angiogenesis array során a különböző kezelések hatására a felülúszóba szekretált angiogénikus faktorok mennyiségi változásait vizsgáltuk. Az oxidatív stressz és hipoxia okozta változások megfigyelésére az ARPE sejteket 0,25 mM hidrogén-peroxiddal és 0,2 mM CoCl_2 -dal 24 órán át kezeltük. Ezen kívül szintén 24 órán keresztül 200 mM szacharóz, valamint 100 mM NaCl-dos kezelést is alkalmaztunk. Mindkét anyag hiperozmotikus körülményeket hoz létre, amely több betegség kialakulásának hátterében fontos tényezőként szerepel. A magas sókoncentráció megváltoztatja az ozmotikus viszonyokat, aminek hatására a szemben a vér-retina gát sérülhet. Ennek többek között ödéma képződés és makuladegeneráció lehet a következménye (Hollborn et al., 2015; Veltmann et al., 2016). A humán angiogenesis array kit (R&D Systems; Biomedica Hungaria, Magyarország) során a felülúszót használtuk mintaként és szintén az 1.2-es pontnál leírtaknak megfelelően végeztük el.

2.5. Áramlási citometria

Az áramlási citometriás méréseket egy Accuri C6 típusú gépen végeztük. A VEGF koncentrációkat CBA – human soluble protein kit segítségével mértük. A kit VEGF antitest

konjugált mikrogyöngyöket tartalmaz, amely az előkészítés során kötődik a megfelelő kötőhelyekre, majd ezt fikoeritrinnel konjugált másodlagos antitesthez kötve mérhetővé válik. A mintákból származó felülúszó és a VEGF konjugált mikrogyöngyök 1:1 arányú (50-50 μ l) keverékét készítettük el, majd egy órán keresztül sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután még 50 μ l fikoeritrin konjugált antitestet adtunk a mintáinkhoz és további 3 órán keresztül szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. Ezt követően a sejteket 1100-es fordulatszámon 5 percig 1 ml mosópufferben centrifugáltuk, majd a felülúszót óvatosan leöntve 300 μ l mosópufferben felvettük az üledéket. A kalibrációs görbe felvételéhez standard sort készítettünk, aminek segítségével kvantifikáltuk a mérés során kapott eredményeket. Az adatokat két-utas ANOVA-val és Bonferroni poszt teszt segítségével analizáltuk.

2.6. Cell stressz

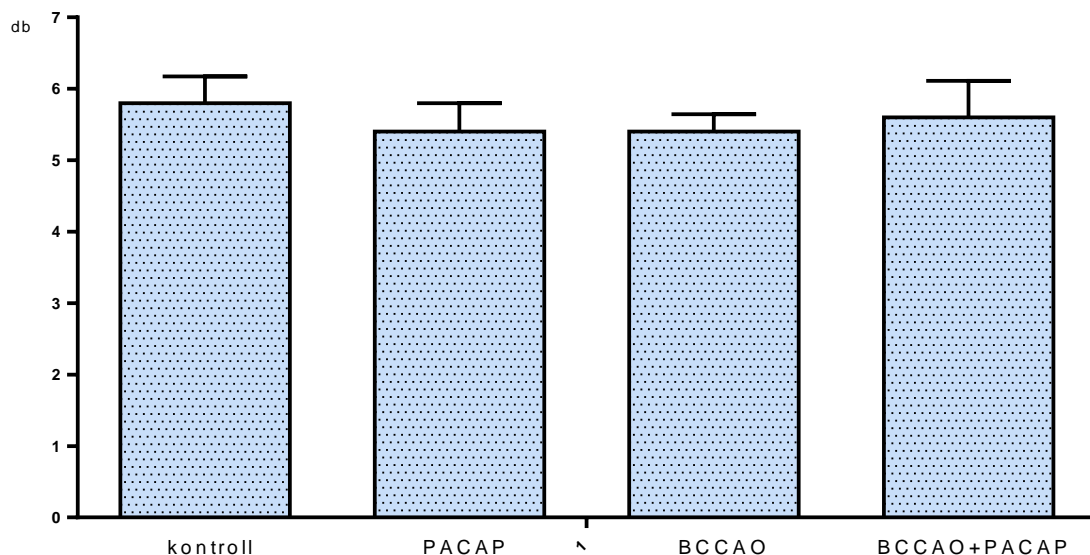
Az oxidatív stressz mellett a hipoxia hatásait is vizsgáltuk. Az oxidatív stresszt ebben az esetben is 0,25 mM hidrogén-peroxiddal váltottuk ki. Az oxigénszegény körülményeket 24 órás 200 μ M-os CoCl_2 kezeléssel hoztuk létre. A kobalt-klorid a hipoxia indukálta faktor 1-3 (HIF 1-3 α) aktiválásával okoz oxigénhiányos állapotot a sejtekben. A retina iszkémiás károsodása több betegség patomechanizmusában is szerepet játszik, például a diabéteszes retinopátia, az öregkori makuladegeneráció és a koraszülött retinopátia esetében (Li et al. 2013). A CoCl_2 alkalmazásával iszkémiás modellt hoztunk létre és vizsgálni tudtuk a PACAP esetleges védő hatását. A humán cell stressz array-t (R&D Systems; Biomedica Hungaria, Magyarország) sejthomogenizátumból a citokin array-nél (1.2.pont) leírt módszerrel hajtottuk végre.

V. Eredmények

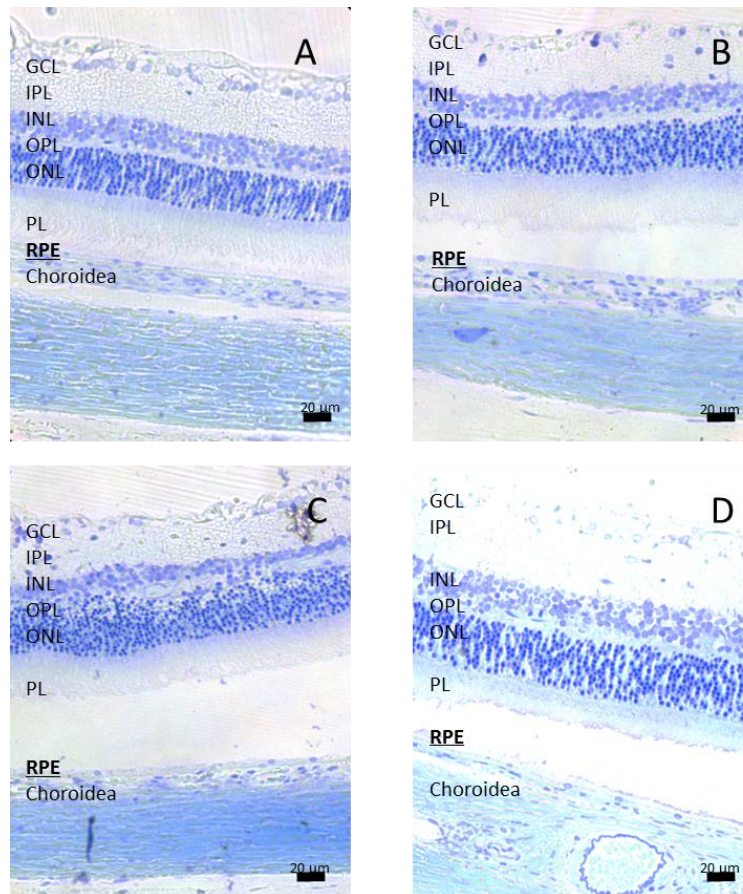
1. In vivo kísérletek

1.1. A szövettani analízis eredményei

Az 6. ábrán a kétoldali arteria carotis communis lekötött állatok retinájának reprezentatív szövettani fotója látható. A metszeteken a pigmenthámsejtek számát 100 μm -en mértük. A kontroll retinán átlagban 5,8 db pigmenthámsejt magot találtunk. A nem operált állatok jobb szemébe PACAP-ot injektáltunk. A PACAP önmagában nem változtatott a pigmenthám sejtek számán, ezeken a retinákon átlagban 5,4 db-ot számoltunk 100 μm -en. A BCCAO-s állatok bal szemében (fiziológiás sóoldattal kezelt) a retina teljes vastagsága, az egyes retinarétegek vastagsága és a ganglionsejtek száma szignifikánsan csökkent (Werling et al. 2014). A pigmenthámsejtek átlagos számában itt sem találtunk jelentős különbséget, átlagban 5,4 db volt 100 μm -en. Míg a retina többi paraméterét a PACAP kezelés jelentősen javította, addig a pigmenthámsejtek számában a vártnak megfelelően (átlagban 5,6 db) nem következett be változás (5. ábra).



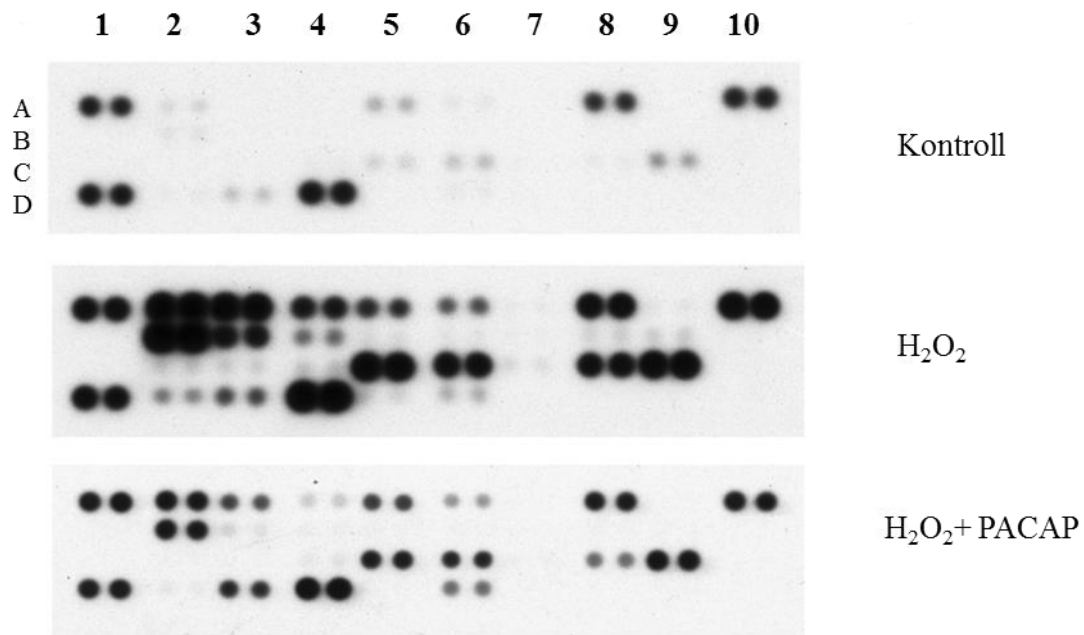
5. ábra. A szövettani mintákon számolt pigmenthámsejtek száma 100 μm -en (átlag \pm SEM)
A) kontroll B) PACAP kezelt C) BCCAO D) BCCAO+PACAP



6. ábra. A retina szövettani szerkezete (toluidinkék festés)
 A) kontroll B) PACAP kezelt C) BCCAO D) BCCAO+PACAP
 RPE-retinális pigmenthám, PL-fotoreceptorok rétege, ONL-külső magvas réteg, OPL-külső szinaptikus réteg, INL-belső magvas réteg, IPL-belső szinaptikus réteg, GCL-ganglion sejtes réteg

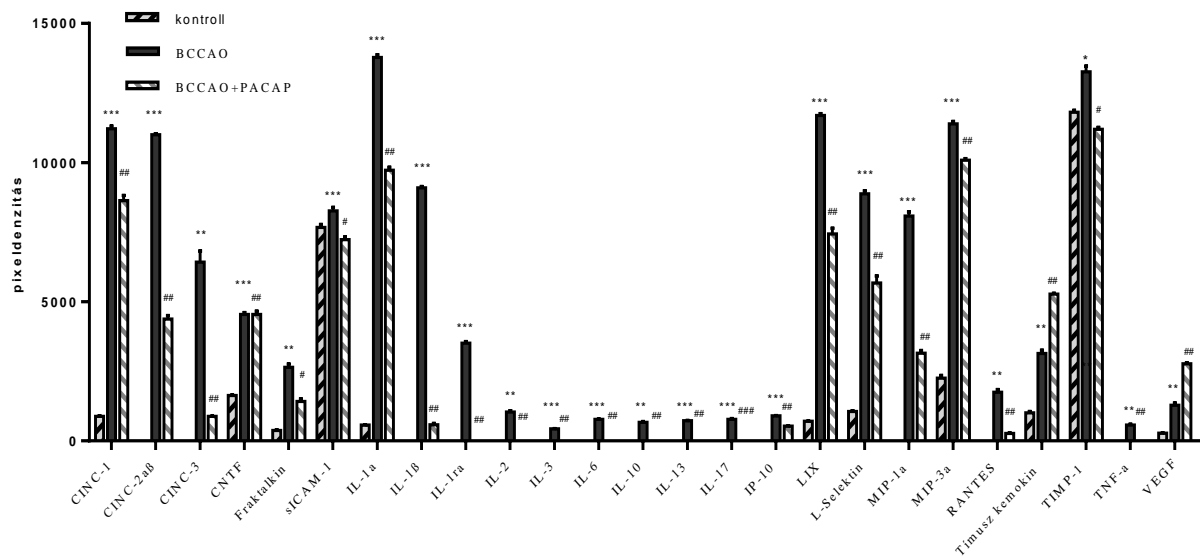
1.2. A citokin array eredményei

A 7. ábrán az előhívott citokin array, és az array-vel mérhető faktorok listája látható. A kétoldali arteria carotis communis lekötött állatok retináján végzett citokin array eredményei azt mutatták, hogy az iszkémiás állapot növelte több citokin, köztük a kemoattraktáns CINC (citokin indukált neutrofil kemoattraktáns) és MIP (makrofág gyulladásozó protein) családba tartozó: CINC-1, CINC-2 α/β , CINC-3 and MIP-1 α , MIP-3 α kemokinek expresszióját is. Számos interleukin szintje is megnőtt: IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 és IL-17. A kontrollhoz képest a ciliáris neurotrofikus faktor (CNTF), a fraktalkin, az sICAM-1 (intercelluláris adhéziozó molekula), a LIX (lipopoliszacharid indukálta CXC kemokin), az L-szelektin, a RANTES (normál T sejt által regulált, expresszált és szekretált citokin), a tímusz kemokin és a TIMP-1 (szöveti metalloproteináz gátló) expressziója is megnövekedett a BCCAO-n átesett csoportokban.



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|-----------------|--------|----------------|--------|-------|-------------|-------|---------|-----------------|-----------------|
| A | Pozitív kontrol | CINC-1 | CINC-2αβ | CINC-3 | CNTF | Fraktalkin | GMCSF | sICAM-1 | IFN-γ | Pozitív kontrol |
| B | | IL-1α | IL-1β | IL-1ra | IL-2 | IL-3 | IL-4 | IL-6 | IL-10 | |
| C | | IL-13 | IL-17 | IP-10 | LIX | L-szelektin | MIG | MIP-1α | MIP-3α | |
| D | Pozitív kontrol | RANTES | Tímusz kemokín | TIMP-1 | TNF-α | VEGF | | | Negatív kontrol | |

7. ábra. Felül: a citokin array reprezentatív képe
alul: a citokin array-vel mérhető faktorok táblázata



8. ábra. A citokin array-vel mért, szignifikáns változáson átesett faktorok (n=2)
minden ábrázolt marker szignifikánsan változott:
vs. kontroll * P<0,5; ** P<0,01; *** P<0,001
vs. BCCAO # P<0,5; ## P<0,01; ### P<0,001

A citokin array eredményei alapján azt találtuk, hogy a PACAP kezelés az összes fent említett citokin szintjét lecsökkentette. Kivételt képezett a VEGF és a tímusz kemokin, melyek aktivációját a PACAP tovább erősítette (8. ábra). A többi, az array által még mért citokin expressziójában nem történt szignifikáns változás a kezelések hatására.

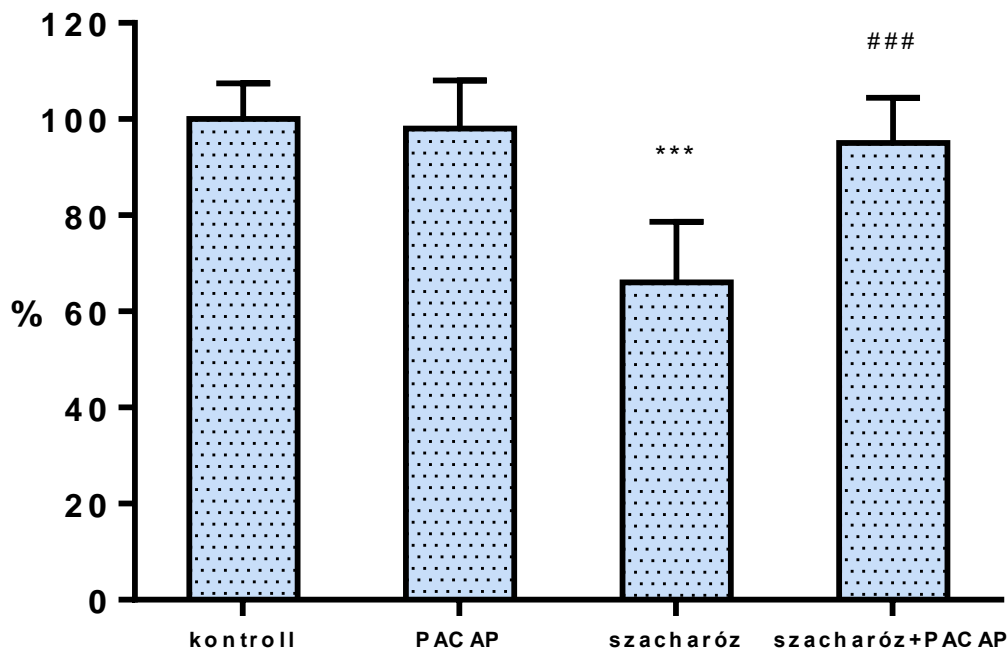
2. In vitro kísérletek

2.1. Az MTT teszt eredményei

Az MTT assay méréssel a sejtek életképességének változásait vizsgáltuk különböző károsító tényezők hatására.

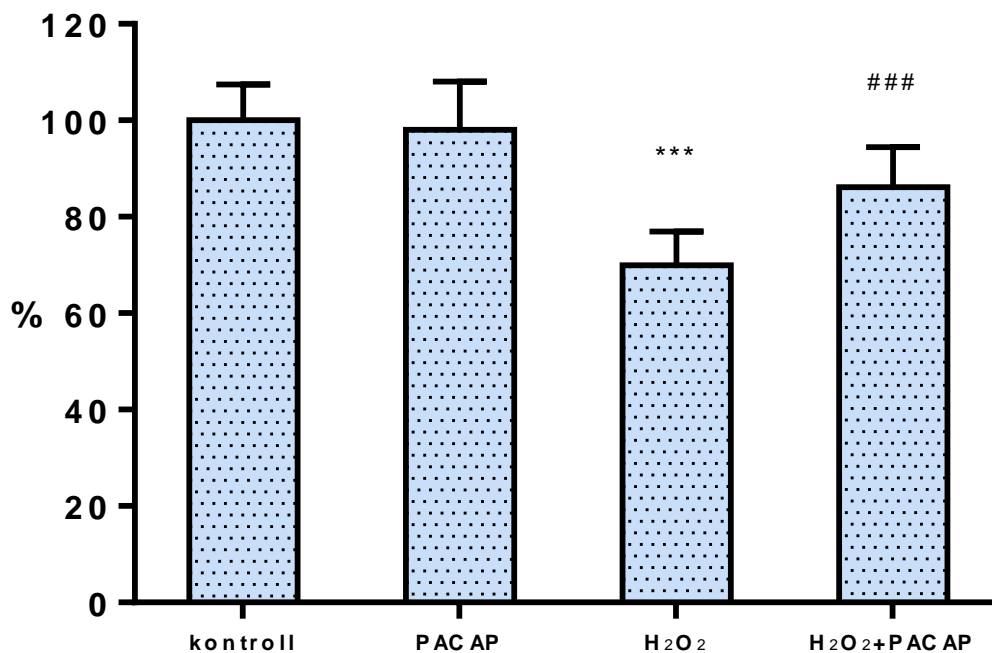
A hiperozmózis hatása

A sejteket 200 mM szacharózzal kezeltük 24 órán át a hiperozmotikus körülmények modellezéséhez. A szacharóz kezelés hatására a sejtek majdnem 36%-a sejthalál áldozata lett, míg a PACAP ki tudta védeni a hiperozmózis sejtölő hatását és a sejtek 95%-a életben maradt (9. ábra).



9. ábra. A szacharóz indukálta hiperozmózis hatása a sejt túlélésre ARPE-19 sejtekben (átlag % ±SEM)

*** vs kontroll $p < 0,001$; ### vs szacharóz kezelt $p < 0,001$



10.ábra. A hidrogén-peroxiddal kiváltott oxidatív stressz hatása a sejttúlélésre ARPE-19 sejtekben (átlag % ±SEM)

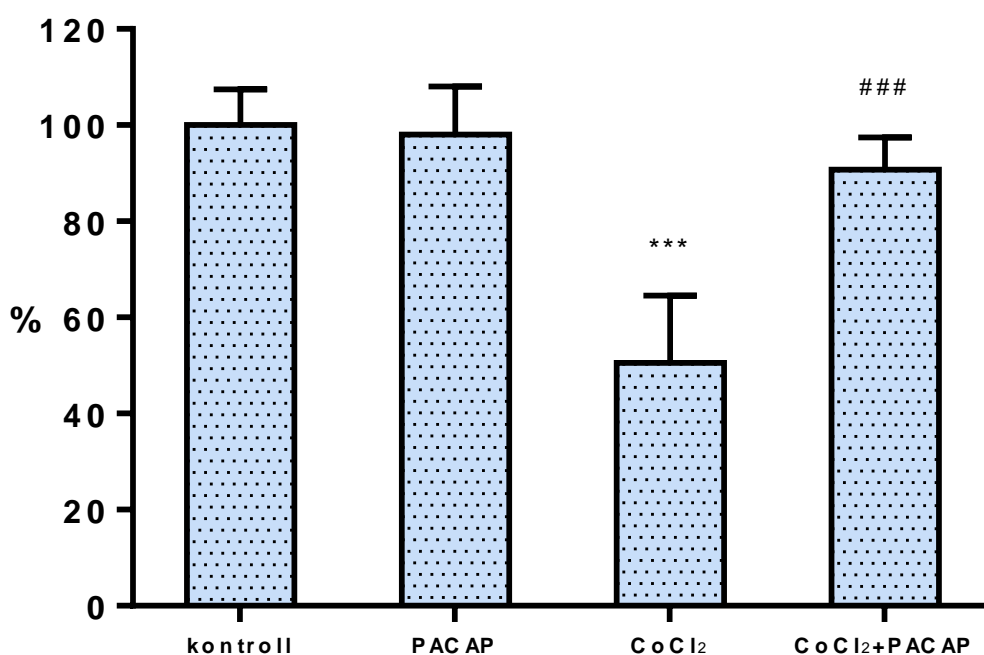
*** vs kontroll $p < 0,001$; ### vs szacharóz kezelt $p < 0,001$

Az oxidatív stressz hatása

Az ARPE-19 sejteket 250 μ M hidrogén-peroxiddal kezeltük 24 órán keresztül, ami erős oxidatív stresszt jelent a számukra. Ennek hatására a sejtek szignifikáns hányada (31%-a) elpusztult. A PACAP hidrogén-peroxiddal egyidejű alkalmazása megóvta a sejtek jelentős részét (86%) (10. ábra).

A hipoxia hatása

A legerősebb sejtölő hatása a kobalt-kloridnak volt. A 24 órás 200 μ M kobalt-kloriddal történő kezelést követően, a hipoxiás körülmények miatt a pigmenthámsejtek 50%-a sejthalál áldozata lett, míg a PACAP-pal való együttes kezelés szignifikánsan, 90%-ra növelte a túlélő sejtek számát (11. ábra).

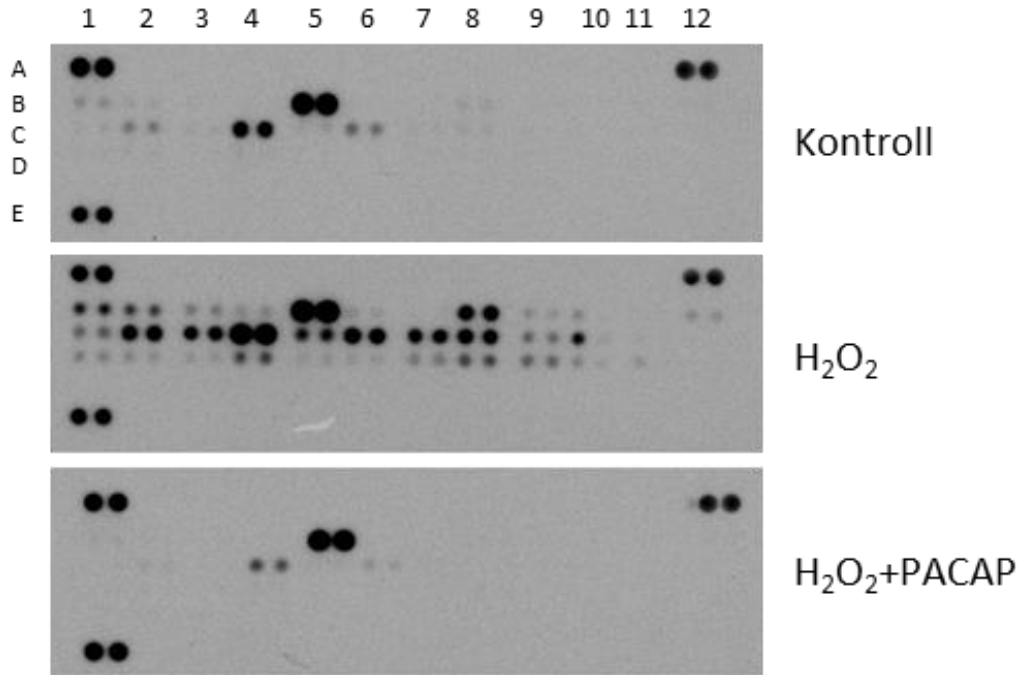


11. ábra. A kobalt-klorid indukálta hipoxia hatása a sejttúlélésre ARPE-19 sejtekben (átlag % ±SEM)

*** vs kontroll $p < 0,001$; ### vs szacharóz kezelt $p < 0,001$

2.2. Az apoptózis array eredményei

Az apoptózis array elvégzése előtt 24 órán keresztül kezeltük a sejteket 0,25 mM hidrogén-peroxiddal és 100 nM PACAP-pal. Az array reprezentatív képe és a mért faktorok a 12. és 13. ábrán láthatóak. Kontroll körülmények között csak néhány faktor volt aktív az ARPE sejtekben. Az oxidatív stressz azonban fokozta a Bad, Bax, citokróm-c, Trail R1 DR4, Trail R2 DR5 (TNF-hez hasonló apoptózis-indukált ligand), FADD (Fas-asszociált halál domén), Fas TNFR SF, HIF-1 α (hipoxia indukált faktor), néhány hő sokk fehérje (HSP32, HO-2, HSP-27, HSP-60, HSP-70), a p21, p27, pp53, a TNF R1 és a SMAC diablo expresszióját. A hidrogén peroxid és a PACAP együttes alkalmazása mindegyik említett apoptózis marker aktivációját csökkentette (14. ábra).



12. ábra. Az apoptózis array reprezentatív képe

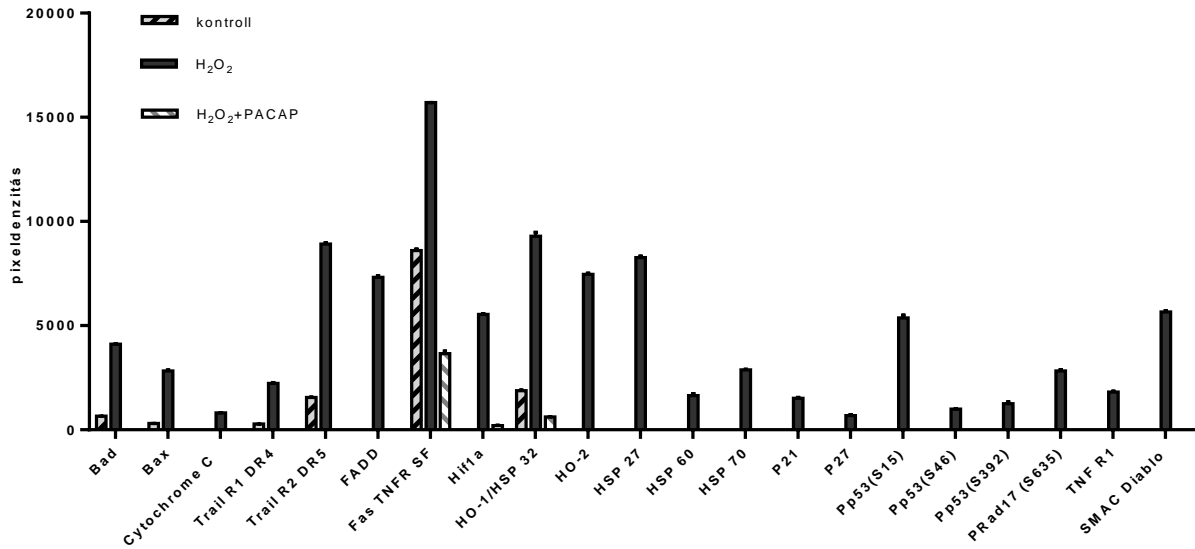
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------------|----------|-------|------------|----------------|------------------|------------|-------------|----------|---------|-----------|-----------------|
| A | Pozitív kontrol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Pozitív kontrol |
| B | Bad | Bax | Bcl-2 | Bcl-x | Pro caspase3 | Cleaved caspase3 | Catalase | clAP-1 | clAP-2 | Claspin | Clusterin | CitokrómC |
| C | Trail R1 | Trail R2 | FADD | Fas TNFR | Hif 1 α | HO-1 HSP32 | HO-2 HMOX2 | HSP27 | HSP60 | HSP70 | HTRA2 | Livin |
| D | PON2 | P21 | P27 | Pp53 (S15) | Pp53 (S46) | Pp53 (S392) | PRad17 | SMAC Diablo | Survivin | TNF R1 | XIAP | Negatív kontrol |
| E | Pozitív kontrol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

13. ábra. Az apoptózis array-vel mérhető faktorok táblázata

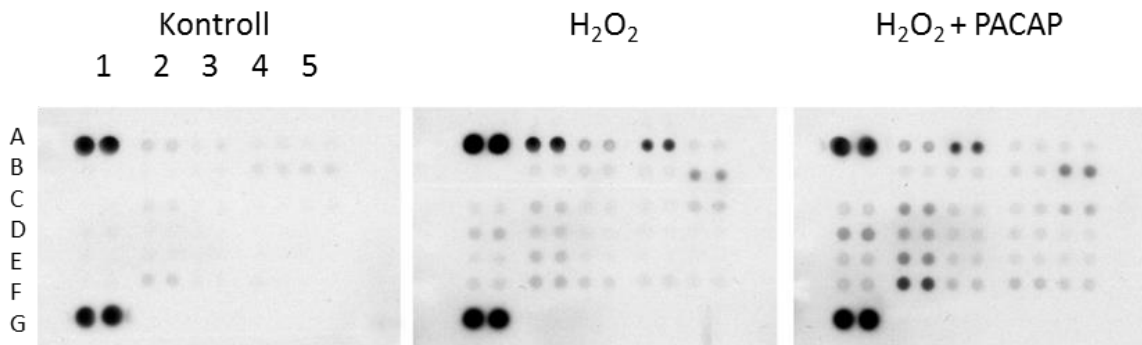
2.3. A foszfo-kináz array eredményei

“A” panel

A 15. ábrán a foszfo-kináz array “A” paneljének képe és a mért faktorok listája látható. A hidrogén peroxid több foszfo-kináz, köztük a p38-alfa és a JNKpan aktivációját (foszforilációját) erősen növelte, míg a PACAP kezelés hatására ez az aktiváció lecsökkent. A PACAP ezen felül tovább növelte a hidrogén peroxid hatására kissé megemelkedő ERK1/2 és Akt aktivációt. Ezen túlmenően a CREB, Src, Lyn, Yes és Chk-2 faktorok is szignifikánsan magasabb expressziót mutattak PACAP hatására (16. ábra).

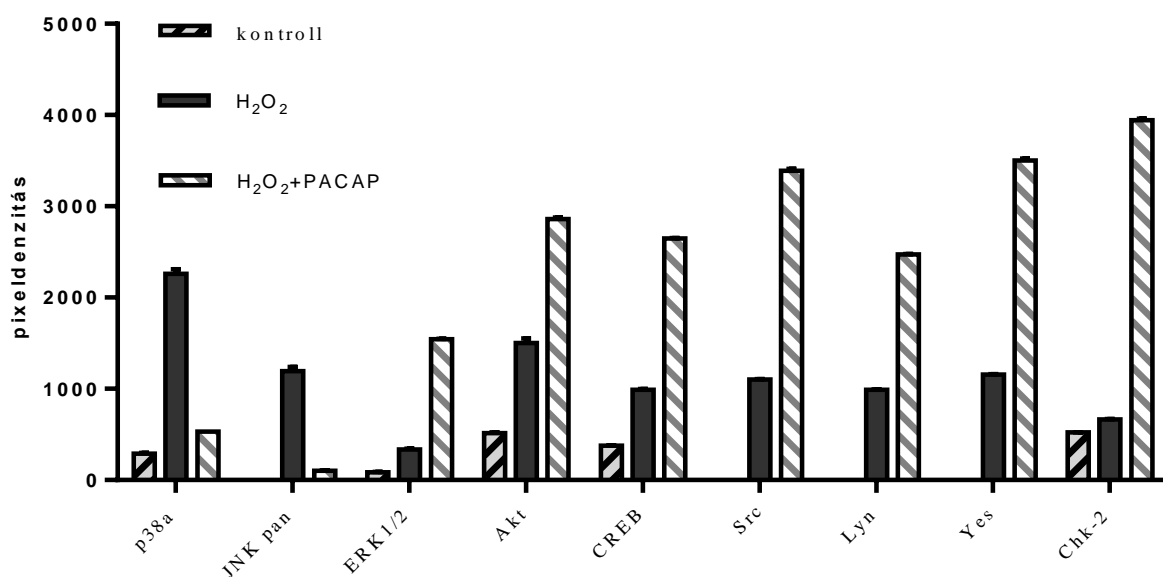


14. ábra. Apoptózis array. Az egyes csoportokban mért pro-apoptikus faktorok szintjei (n=3) minden ábrázolt marker szignifikánsan változott:
 kontroll vs. H_2O_2 $p < 0,001$
 H_2O_2 vs. $H_2O_2 + PACAP$ $p < 0,001$

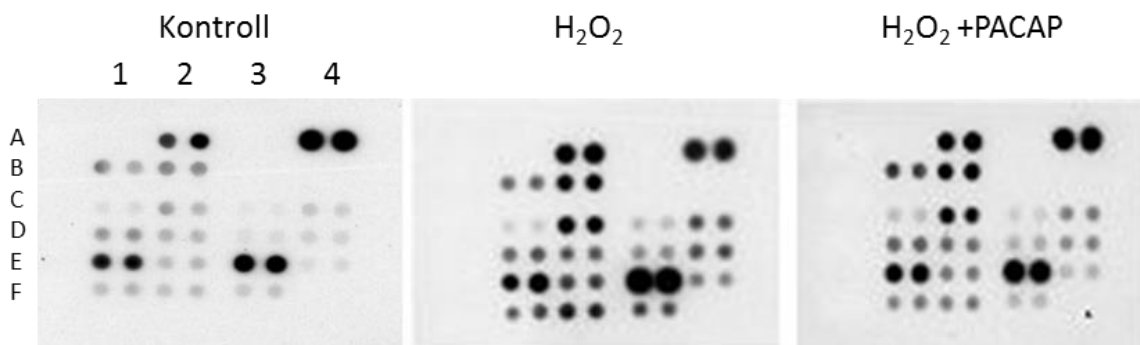


| A panel | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------|------------------|--------------|------------------|-----------------|----------------------|
| A | Pozitív kontroll | p38 α | ERK1/2 | JNK pan | GSK-3 α/β |
| B | - | MEK 1/2 | MSK 1/2 | AMPK α 2 | Akt |
| C | TOR | CREB | HSP27 | AMPK α 2 | β -Catenin |
| D | Src | Lyn | Lck | STAT2 | STAT5a |
| E | Fyn | Yes | Fgr | STAT3 | STAT5b |
| F | Hck | Chk-2 | FAK | STAT6 | STAT5a/b |
| G | Pozitív kontroll | - | Negatív kontroll | - | - |

15. ábra. Felül: foszfo-kináz array A panel reprezentatív képe
 alul: a foszfo kináz array-vel mérhető faktorok táblázata



16. ábra. A foszfo-kináz array A paneljével mért, szignifikáns változáson átesett faktorok (n=2) minden ábrázolt marker szignifikánsan változott:
kontroll vs. H₂O₂ p<0,001
H₂O₂ vs. H₂O₂+PACAP p<0,01



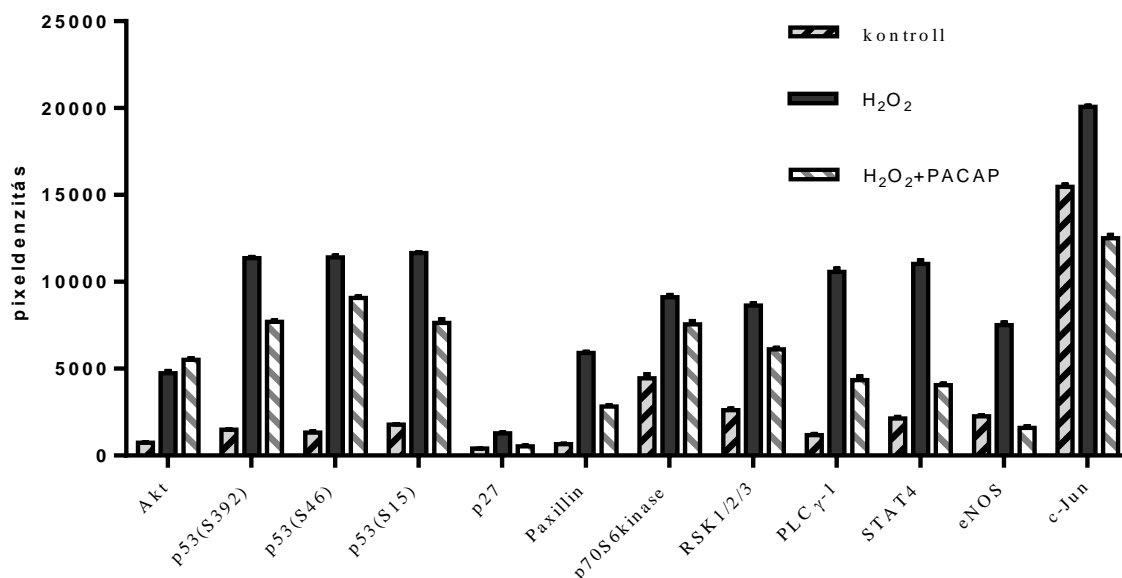
| B Panel | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------|-------------|----------|-------|------------------|
| A | - | p53 | - | Pozitív kontroll |
| B | Akt | p53 | - | - |
| C | p70S6kinase | p53 | p27 | Paxillin |
| D | p70S6kinase | RSK1/2/3 | p27 | PLCγ-1 |
| E | p70S6kinase | RSK1/2 | c-Jun | Pyk2 |
| F | STAT1 | STAT4 | eNOS | Negatív kontroll |

17. ábra. Felül: A foszfo-kináz array B panel reprezentatív képe
alul: a B panellel mérhető faktorok táblázata

“B” panel

A 17. ábrán a foszfo-kináz array “B” paneljének szkennelt képe és a mért faktorok láthatóak. A kísérletek egyértelműen bizonyították, hogy az oxidatív stressz Akt aktivációhoz vezetett, mely a 100 nM PACAP-pal kezelt mintákban tovább fokozódott.

A hidrogén peroxid hatására a p53 három különböző területének (S392, S46 és S15) foszforilációja is megemelkedett. Ezt a 100 nM-os PACAP kezelés enyhén csökkentette. A H₂O₂ okozta oxidatív stressz a paxillin, p70S6 kináz, RSK ½ (ribosomális s-6 kináz), PLCgamma-1, STAT4 és az eNOS aktivációját is fokozta. Ezeket a változásokat a p70S6 kináz kivételével a PACAP képes volt visszafordítani. A c-Jun már kontroll körülmények között is aktivációt mutatott, amit a hidrogén peroxid alkalmazása tovább fokozott. A PACAP kezelés ezt az aktivációt is csökkenteni tudta (18. ábra).

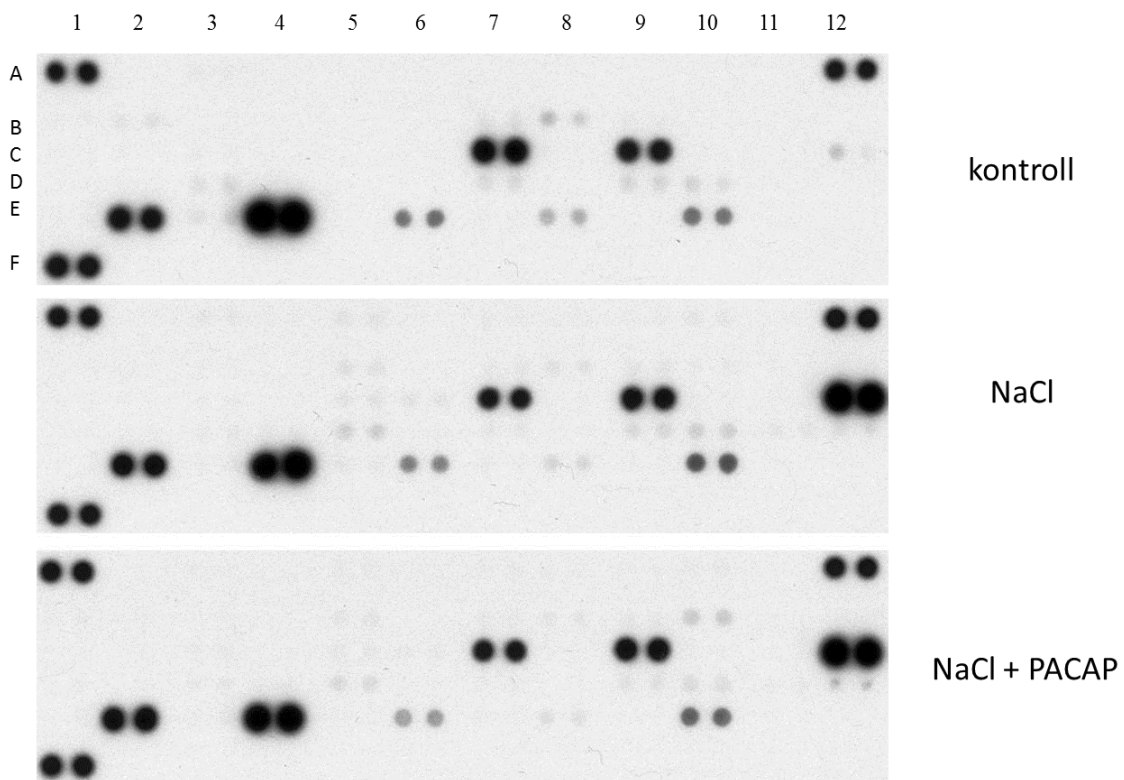


18.ábra. A foszfo-kináz array B paneljével mért, szignifikáns változáson átesett faktorok (n=2) minden marker szignifikánsan változott:
kontroll vs. H₂O₂ p<0,001
H₂O₂ vs. H₂O₂+PACAP p<0,01

2.4. Az angiogenezis array eredményei

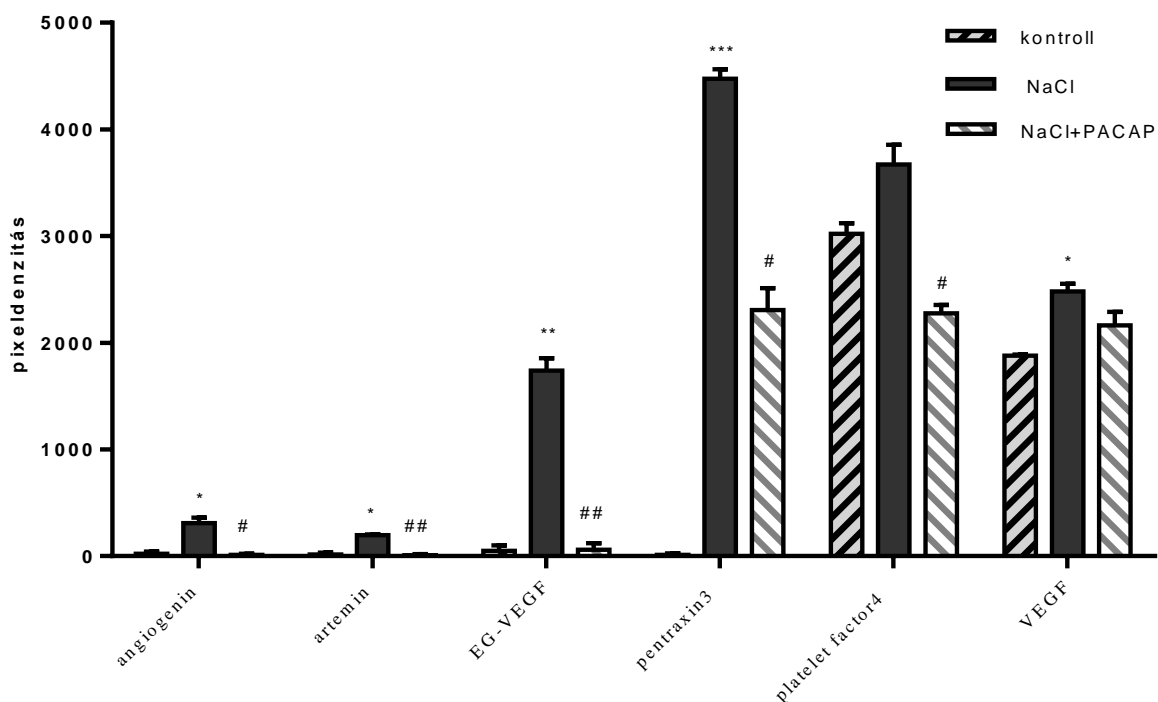
a. A hiperozmózis hatása

A hiperozmózis többféle módon kiváltható a sejtekben. Jelen kísérletünkben kétféle modellt alkalmaztunk, a NaCl (19. ábra) és a szacharózzal (21. ábra) történő kezeléseket. A 100 mM konyhasóval történő kezelés hatására néhány pro-angiogenikus faktor koncentrációja megemelkedett: angiogenin, artemin, EG-VEGF (endokrin mirigy eredetű VEGF), pentraxin 3, platelet factor 4 és VEGF.



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------------------------|-----------|-----------|-----------------|------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|-------------------|--------|-----------------|
| A | Pozitív kontrol | - | activinA | ADAMTS-1 | angiogenin | angiopoetin-1 | angiopoetin-2 | angiostatin | amphiregulin | artemin | - | Pozitív kontrol |
| B | koagulációs faktor III | CXCL16 | DPP IV | EGF | EG-VEGF | endoglin | endostatin | endothelin-1 | FGF-acidic | FGF-basic | FGF-4 | FGF-7 |
| C | GDNF | GM-CSF | HB-EGF | HGF | IGFBP-1 | IGFBP-2 | IGFBP-3 | IL-1beta | IL-8 | LAP | leptin | MCP-1 |
| D | MIP-1 α | MMP-8 | MMP-9 | NRG1- β 1 | pentraxin3 | PDECGF | PDGF-AA | PDGF-AB | persephin | platelet factor 4 | PIGF | prolactin |
| E | serpin B5 | serpin E1 | serpin F1 | TIMP-1 | TIMP-4 | Trombospondin-1 | Trombospondin-2 | uPA | vasohibin | VEGF | VEGF-C | - |
| F | Pozitív kontrol | | | | | | | | | | | Negatív kontrol |

19. ábra. Felül: Az angiogenezis array reprezentatív képe – NaCl kezelés
alul: az angiogenezis array-vel mérhető faktorok táblázata



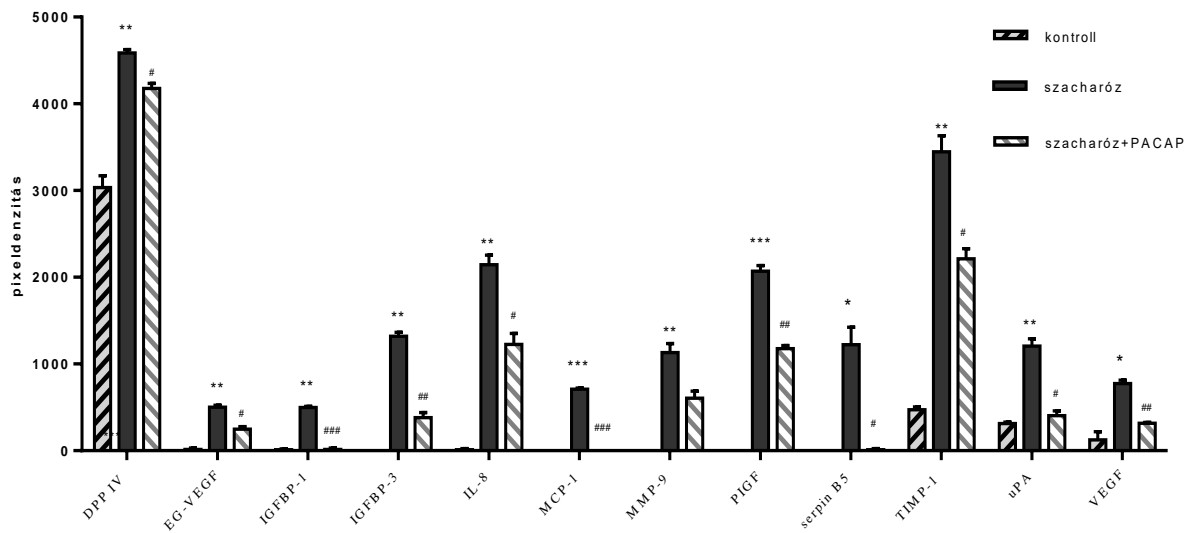
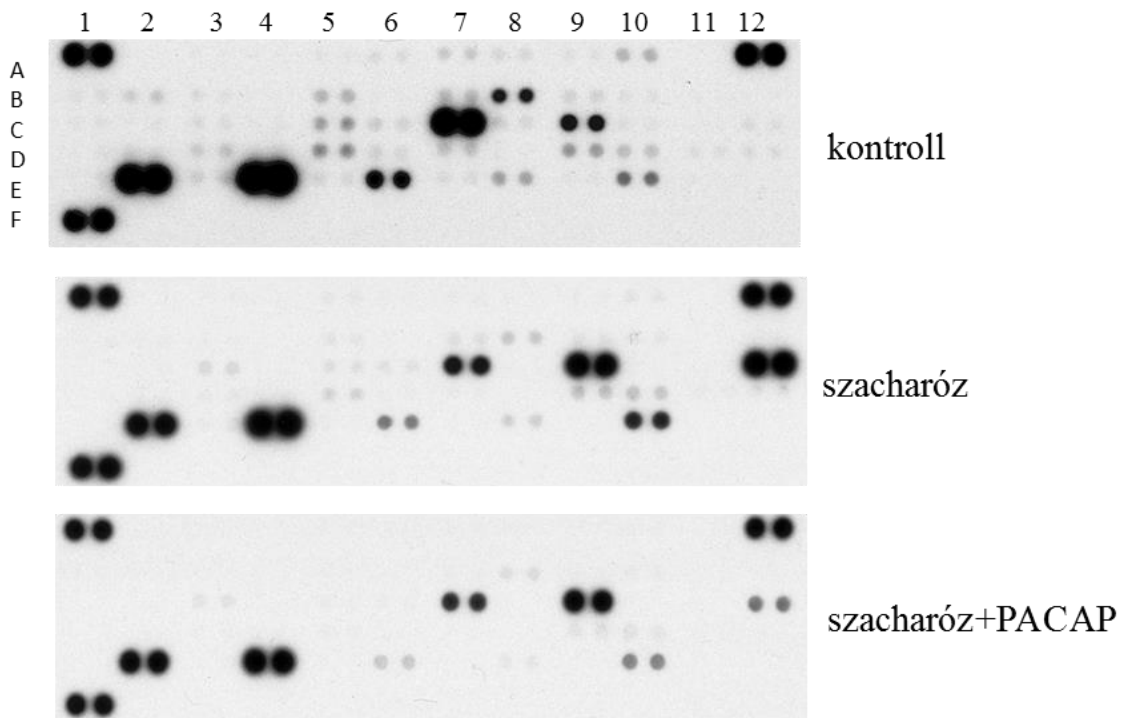
20. ábra. A NaCl indukálta hiperozmózis hatása az angiogenikus faktorokra (n=2)

vs. kontroll * $P < 0,5$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

vs. kezelt # $P < 0,5$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$

Ezek közül az artemin, a pentraxin 3 és a platelet factor 4 gyulladásos folyamatokban résztvevő fehérjék, míg a másik három klasszikus angiogenikus protein. A 100 nM-os PACAP kezelés mind a hat fehérje koncentrációját lecsökkentette, ezáltal védő hatásának bizonyult ebben a modellben (20. ábra).

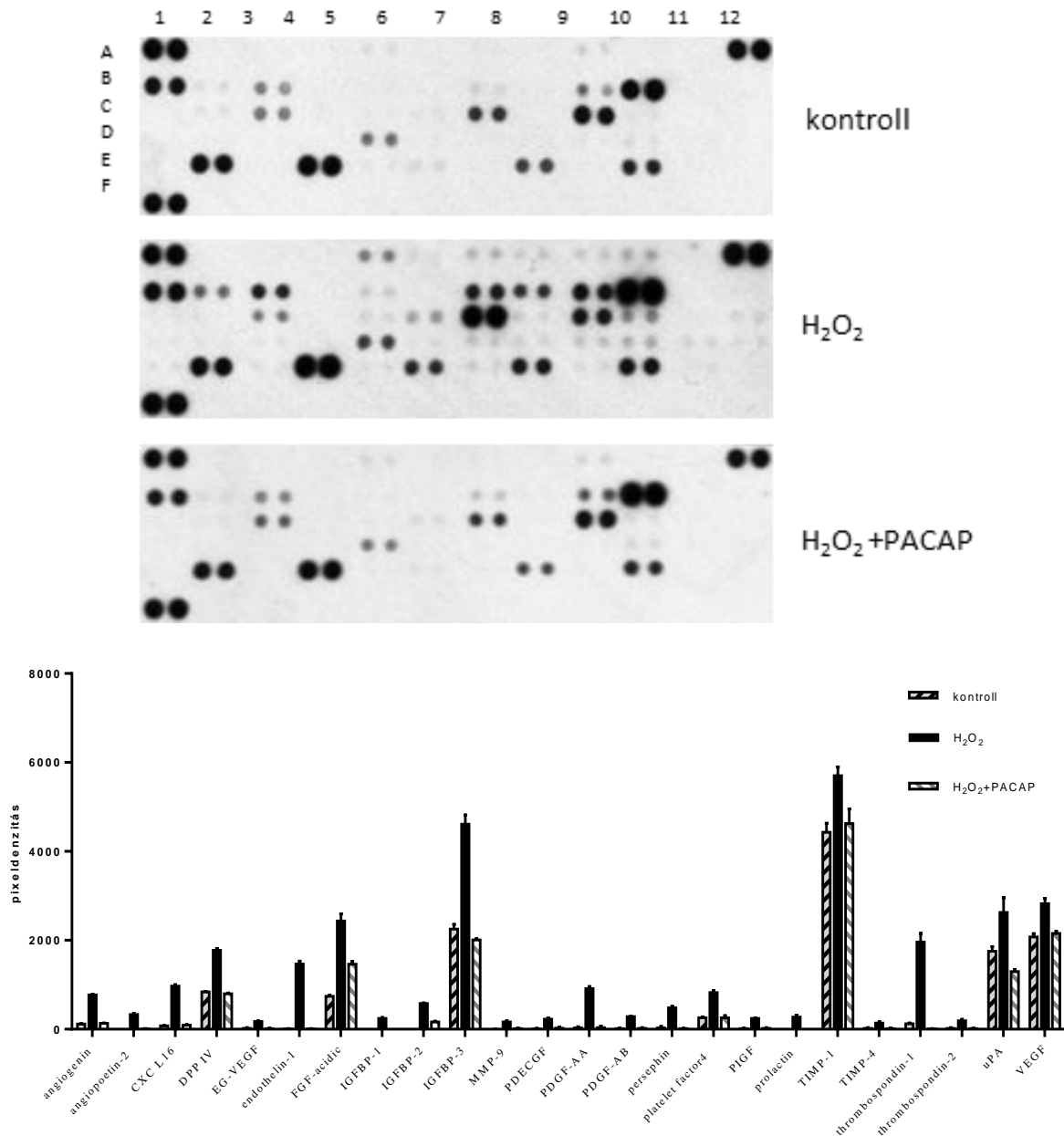
A másik modellünknel a hiperozmotikus körülmények létrehozása céljából 200 mM szacharózzal kezeltük a sejteket, 24 órán keresztül. Ahogy azt az MTT teszt eredményeinél láthattuk, a szacharóz indukálta hiperozmózis károsította sejteket, növelte az apoptotikus sejtek számát, míg a PACAP kezelés ezt megakadályozta. Az angiogenesis array-vel is hasonló eredményekre számítottunk. A membránok elemzése során azt láttuk, hogy a szacharóz több angiogenikus faktor koncentrációját megemelte a felülúszóban. A DPP IV, a TIMP-1, az MCP-1, a VEGF, az EG-VEGF, az IL-8, az IGFBP-1 és 3, az MMP-9, a PIGF, a serpin B5 és az uPA szintje is megnövekedett szacharóz kezelés hatására. A PACAP minden egyes megemelkedett faktor szintjét csökkenteni tudta (21. ábra).



21. ábra. Felül: Az angiogenesis array reprezentatív képe –szacharóz kezelés
 alul: a szacharóz hatására változó angiogénikus faktorok (n=3)
 vs. kontroll * $P < 0,5$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$
 vs. kezelt # $P < 0,5$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$

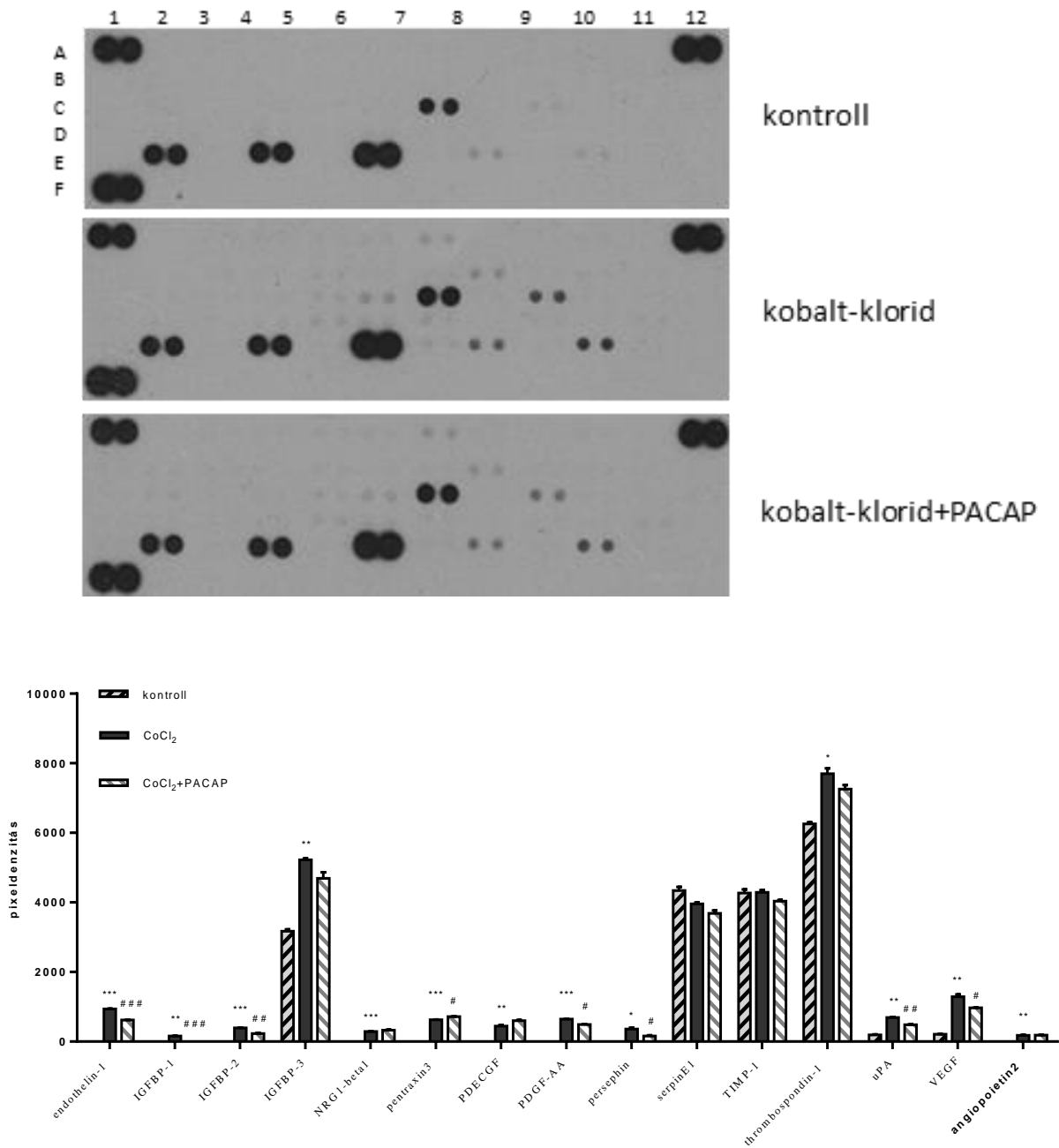
b. Az oxidatív stressz hatása

A 24 órás hidrogén-peroxid kezelés hatására számos pro-angiogenikus faktor koncentrációja jelentős mértékben megemelkedett. Ezek közül az érújdonképződés folyamatában legfontosabbak a VEGF, az FGF, az angiopoietin-1 és 2, a vérlemezke eredetű növekedési faktorok (PDGF) valamint a thrombospondin-1.



22. ábra. Felül: Az angiogenesis array reprezentatív képe – hidrogén-peroxid kezelés
 alul: Az oxidatív stressz hatása az angiogenikus faktorokra (n=3)
 minden ábrázolt marker szignifikánsan változott:
 kontroll vs. H₂O₂ p<0,001
 H₂O₂ vs. H₂O₂+PACAP p<0,05

Ezeknek, és az ábrán látható többi faktornak a felülúszóban mért, oxidatív stressz hatására megnövekedett szintje PACAP kezeléssel számottevő mértékben csökkent, sok esetben a kontroll szintekhez közeli értéket közelítette meg (22. ábra)



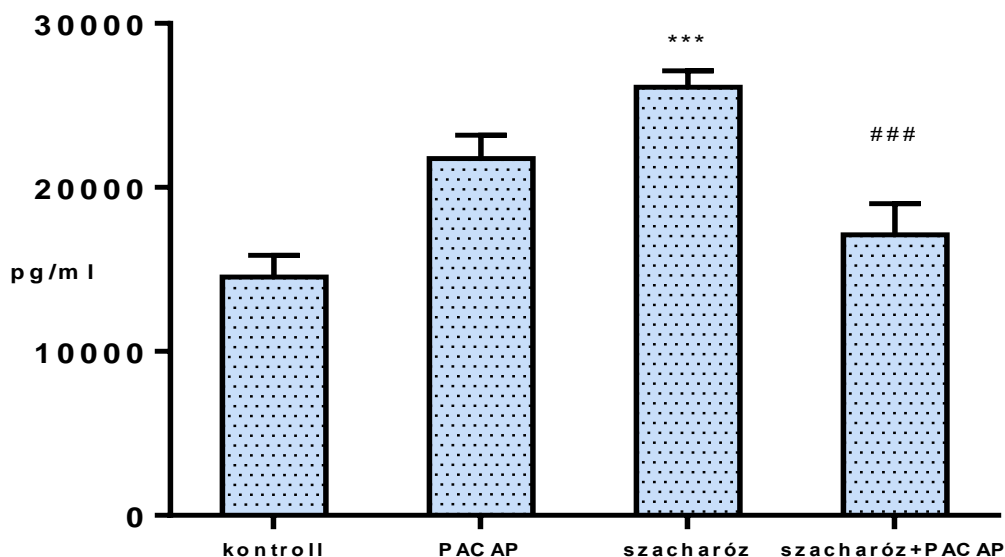
23. ábra. Felül: az angiogenesis array reprezentatív képe – kobalt-klorid kezelés
 alul: a hipoxia hatása az angiogénikus faktorokra (n=2)
 vs. kontroll * P<0,5; ** P<0,01; *** P<0,001
 vs. kezelt # P<0,5; ##P<0,01; ### P<0,001

c. A hipoxia hatása

A hipoxiás állapotot 24 órás 0,2 mM-os kobalt-klorid kezeléssel értük el. Sok angiogenikus faktor, mint az IGFBP család tagjai, a PDGF, a trombospondin-1, a μ PA és a VEGF koncentrációja megemelkedett az oxigénszegény állapot alatt (23. ábra). A PACAP minden fent említett citokin expresszióját szignifikánsan csökkentette. Az endothelin-1 egy főként endothel sejtek által termelt peptid, amelynek megemelkedett koncentrációja többek között magas vérnyomás betegség, illetve kettes típusú diabétesz kialakulásában játszik szerepet. A kobalt-klorid hatására a peptid szintje jelentősen megnőtt, de a PACAP szignifikánsan visszaszorította. Mindezek alapján elmondható, hogy a PACAP egyértelmű védő hatással van a pigmenthám sejtekre kobalt-klorid indukálta hipoxia esetén.

2.5. Az áramlási citometriás mérés eredményei

Áramlási citometriával a sejtek által szekretált VEGF koncentrációját mértük szacharóz kezelés, vagyis hiperozmózis hatására. Eredményeink alapján az egy napos 200 mM-os szacharóz kezelés szignifikánsan emelte a felülúszóban található VEGF mennyiségét. A 100 nM-os PACAP-pal történő együttes alkalmazás azonban a kontroll értékekhez hasonló szintre csökkentette a VEGF koncentrációját (24. ábra).



24. ábra. A szacharóz indukálta hiperozmózis hatása a VEGF koncentrációra

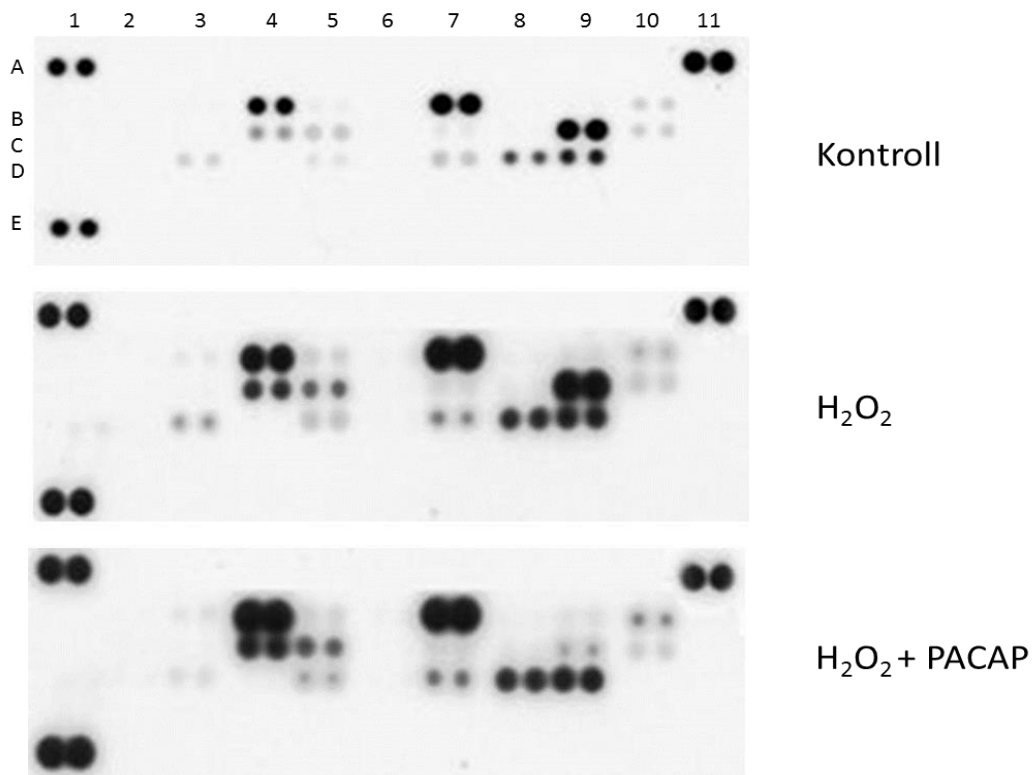
*** vs kontroll $P < 0,001$

vs szacharóz kezelt $P < 0,01$

2.6. A cell stressz array eredményei

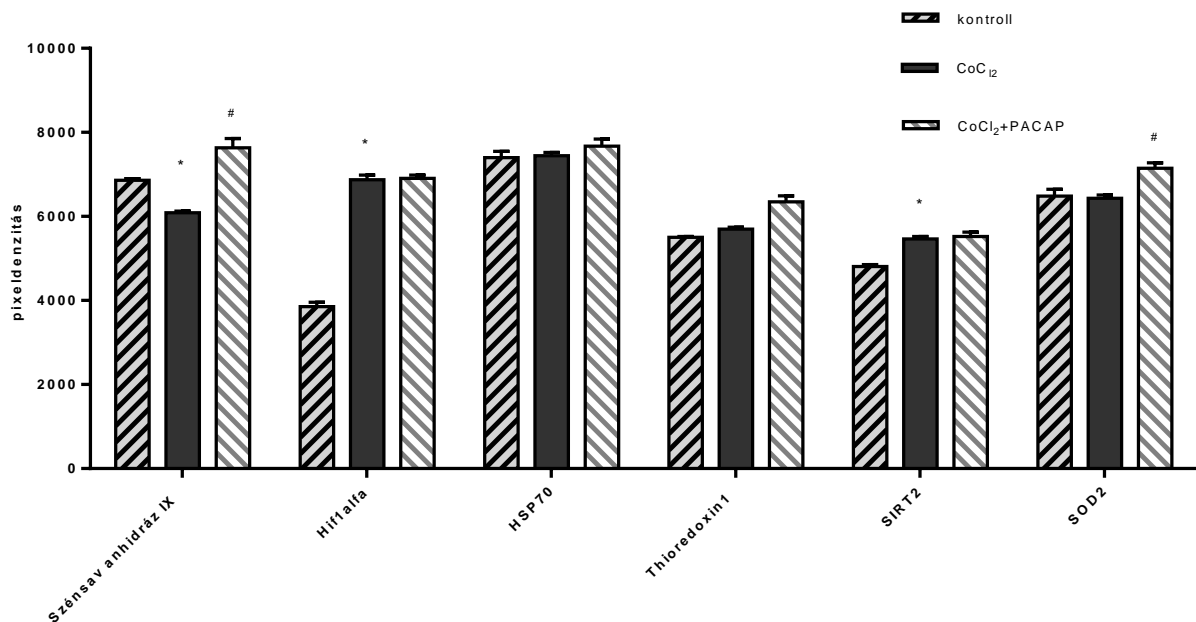
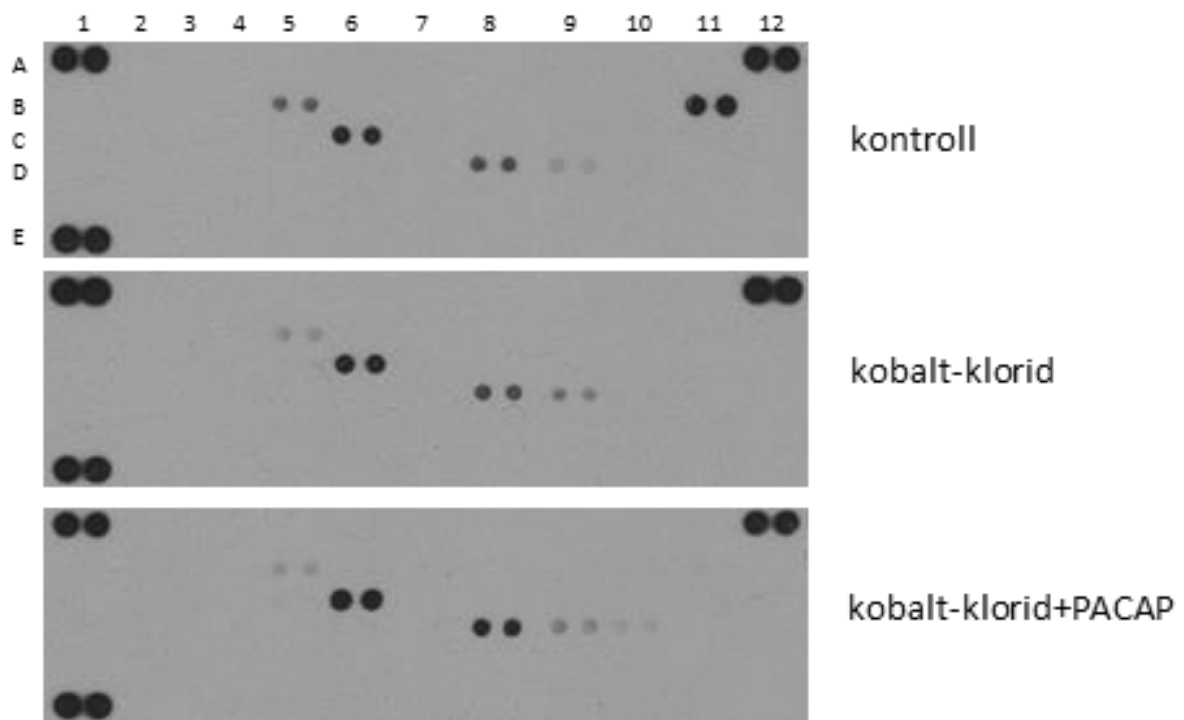
a. Az oxidatív stressz hatása

A cell stressz array-t kétféle modellen hajtottuk végre. Elsőként az oxidatív stressz okozta változásokra koncentráltunk (25. ábra). A hidrogén peroxid kezelés hatására néhány hősock fehérje, a citokró-m-c, a foszforilált p53 és p38 aktiválódott. Ezek a faktorok fontos szerepet játszanak az apoptotikus folyamatok beindulásában. Mindezen fehérjék koncentrációját csökkenteni tudta a 100 nM PACAP, így anti-apoptotikusnak bizonyult ebben a modellben is.



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|------------------|----------------|--------|-------|---------|-------|---------------|---------------|----------|------------------|------------------|
| A | Pozitív kontroll | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Pozitív kontroll |
| B | - | ADAMTS1 | Bcl-2 | CA9 | Cited-2 | Cox-2 | Citokró-m-C | Dkk-4 | FABP-1 | HIF-1 α | - |
| C | - | HIF-2 α | pHSP27 | HSP60 | HSP70 | IDO | pJNK pan | NF κ B | P21/CIP1 | p27 | - |
| D | - | p-p38a | p-p53 | PON1 | PON2 | PON3 | Thioredoxin-1 | SIRT2 | SOD2 | Negatív kontroll | - |
| E | Pozitív kontroll | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

25. ábra. Felül: A cell stressz array reprezentatív képe - oxidatív stressz
alul: a cell stressz array-vel mérhető faktorok táblázata



26. ábra. Felül: a cell stress array reprezentatív képe – kobalt-klorid kezelés
 alul: a hipoxia hatása a stressz markerekre (n=2)
 vs. kontroll * P<0,5; ** P<0,01; *** P<0,001
 vs. kezelt # P<0,5; ##P<0,01; ### P<0,001

b. A hipoxia hatása

A kobalt-klorid kezelés nem okozott nagy változásokat cell stressz array-vel mérhető faktorok koncentrációjában. A szénsav-anhidráz a sav-bázis egyensúly beállításában játszik elengedhetetlen szerepet. A hipoxia hatására jelentősen lecsökkent ennek az enzimnek a koncentrációja. Ezt a PACAP a kontroll szintre emelte vissza. Oxigénhiány állapotban a hif1 alfa és a SIRT1 szintjei szignifikánsan megemelkedtek, ezekre a PACAP-nak nem volt jelentős hatása. A HSP70 hősokk fehérje és a thioredoxin koncentrációja kis mértékben, de nem szignifikánsan változott. A PACAP tovább fokozta mindkét fehérje kobalt-klorid indukálta expressziónövekedését (26. ábra).

VI. Megbeszélés

In vivo eredmények megbeszélése

A tanulmányban bemutatott eredmények alapján a PACAP képes volt kivédeni az iszkémiás és oxidatív stressz által előidézett károsodást követő változásokat a MAPK és citokinek foszforilációjában patkány retinán. Korábbi irodalmi adatokból ismert a PACAP agyi, és perifériás szöveteket érintő iszkémiás károsodásokban, sejt túlélésre és különböző gyulladási útvonalakra kifejtett hatása (Ferencz et al. 2010; Ohtaki et al. 2008; Reglődi et al. 2012; Szakály et al. 2011; Shioda és Nakamachi 2015). A PACAP szerepe ezen folyamatokban már régóta ismert, de a pontos hatása a gyulladási folyamatokban nagyban függ a sejtípustól, szövetről, kortól, patológiai körülményektől és egyéb tényezőktől. Ezzel együtt a PACAP-ot általában gyulladáscsökkentőként ismerik (Delgado et al. 2003). A kutatásaink során mi is azt találtuk, hogy iszkémiás retinakárosodáskor a PACAP csökkentette számos citokin és kemokin szintjében bekövetkező növekedést. Általánosságban elmondható, hogy az iszkémiát követően drámaian megemelkedett a citokinek expressziója, míg a PACAP ezen változásokat a legtöbb citokin esetében kivédte. Ezalól kivételt képez a VEGF és a tímusz kemokin, melyek szintje tovább nőtt a PACAP hatására. A BCCAO-t követő erős citokin aktiváció nem volt váratlan, összhangban áll több, korábbi tanulmányban találtakkal (Gustavsson et al. 2008; Yoneda et al. 2001). A PACAP által a citokinek koncentrációjában előidézett változások arra engednek következtetni, hogy a retina iszkémiás károsodásában a PACAP gyulladásgátló szerepet tölthet be, nem megfelelően az arról a tényről, hogy a mérést csak egy időpontban, 24 órával a károsodást követően végeztük el.

A CINC (CINC 1-3) család a gyulladási kemokinek közé tartozik, számos gyulladási folyamatban, általában az akut gyulladási válaszreakcióban játszik szerepet (Ghaly et al. 2010). Kimutatták, hogy a retina véráramlási zavarai emelik a CINC család expresszióját (Yoshida et al. 1998). A jelen tanulmány az első, amely azt igazolja, hogy a PACAP képes mérsékelni a CINC kemokinek szintjét iszkémiát követően. Egy másik kemoattraktáns, a fraktalkin szintje is csökkent PACAP kezelés hatására. A PACAP interleukinokra kifejtett hatása változó volt. A legtöbb interleukin megemelkedett expresszióját a PACAP mérsékelni tudta, míg néhány interleukin szintjében nem következett be változás.

Összefoglalva, a PACAP csökkentette az IL-1 család tagjainak aktivációját, mely folyamat jótékony hatásúnak bizonyult retinát ért iszkémiás károsodást követően (Dvorientchikova et al. 2010; Ji et al. 2006).

A RANTES is szerepet játszik a retina gyulladós folyamataiban, a T-memória sejtek vándorlásának befolyásolásával, valamint elősegíti a monociták vér-retina gáton való átjutását gyulladós szembetegségek esetén (Crane et al. 1998). Kutatásaink során kimutattuk, hogy a PACAP csökkentette az iszkémia indukálta RANTES aktivációt a retinában. Korábbi tanulmányok közlései alapján a PACAP elősegítette a RANTES szekrécióját asztrocitákban (Brenneman et al. 2002), és kortikális neuronokban (Sanchez et al. 2009). Ezekben a kutatásokban a RANTES szekréciója a megnövekedett neuroprotekciónal állt összefüggésben. A retinában azonban az eredményeink alapján a RANTES expressziója megemelkedik a gyulladós reakciók során, amely ellen a PACAP hatásos védelmet nyújt. Ez összhangban áll egy másik, mikroglia sejteken folytatott kísérlet eredményeivel, mely során azt találták, hogy a PACAP és a VIP gátolja a kemokinek szekrécióját (Delgado et al. 2002). A PACAP számos egyéb faktor szintjére hatással volt, de ezekről egyelőre keveset tudunk.

Több szembetegség patomechanizmusában is szerepet játszhatnak különböző adhéziós molekulák, mátrix metalloproteázok, valamint a MIP-1 α (Jonas et al. 2010; Mathalone et al. 2007; Yoshida et al. 2003). A mi eredményeink azt mutatták, hogy a PACAP meggátolta az ICAM, a szelektin, a MIP-1 α , a TIMP-1 aktivációját, ezzel szemben emelte a VEGF expresszióját. A PACAP VEGF szintet emelő hatását egy korábbi közleményben már leírták tüdő karcinóma sejtek (Moody et al. 2002), valamint hipofízis follikuláris sejtek esetében (Gloddek et al. 1999). A VEGF egy sokat tanulmányozott angiogenikus faktor, amely számos retinopátia hátterében áll (koraszülött és diabéteszes retinopátia), de ezek mellett neuroprotektív funkciója is van (Zheng et al. 2012). Iszkémiás retinakárosodás esetén a VEGF expresszió az időtől, reperfüziótól, és a VEGF lokalizációjától függ (Cervia et al. 2012).

További kutatásokra van szükség annak megállapítására, hogy a PACAP indukálta VEGF expresszió növekedés neuroprotektív funkcióval bír-e, vagy a gyulladós folyamatokban játszik-e szerepet.

In vitro eredmények megbeszélése

A programozott sejthalál fiziológiás körülmények között is lezajló folyamat. Az egyedfejlődés során bizonyos időszakokban nélkülözhetetlen a normális fejlődés eléréséhez, például az ujjak egymástól való elválása esetén. Az öregedésben betöltött szerepe is

vitathatatlan. Ezen kívül azonban számos betegség patomechanizmusában is részt vesz. Az apoptózis egyensúlyának megbomlása súlyos következményekkel jár, az apoptotikus folyamatok serkentése, sejtvesztéssel járó rendellenességekhez, míg az apoptotikus folyamatok lassulása, leállása kontrollálatlan sejtburjánzáshoz, rákhoz és autoimmun betegségek kialakulásához vezethet. Az apoptózis molekuláris mechanizmusában több, egymástól független jelátviteli útvonal azonosítható, amelyek egy közös végrehajtó rendszer felé konvergálnak. A folyamat végrehajtó elemei a kaszpázok, amelyek inaktív prekuzorként várják az aktiválódásukat jelentő szignált (Strasser et al. 2000). A kaszpázaktiválódás két különböző úton mehet végbe: a halálligand-halálreceptor úton vagy a mitokondriális citokróm-c kibocsátással előidézett úton.

A Bcl-2 fehérjecsaldon belül két csoportot különböztetünk meg az apoptózisban betöltött szerepüknek megfelelően: az anti-apoptotikus fehérjék közé tartozik többek között a Bcl-2 és a Bcl-XL, míg Bcl-2 család egyes képviselői pro-apoptotikus funkcióval rendelkeznek, mint pl. a Bax, Bad, Bak, Bik stb. A család pro-és anti-apoptotikus tagjai az élő, intakt sejtben (halálszignál nélkül) külön kompartmentekben, szeparáltan helyezkednek el: az anti-apoptotikus molekulák többnyire membránhoz (mitokondrium, endoplazmás retikulum, stb.) kötve, a pro-apoptotikus molekulák pedig szabadon a citoszólban. A pro-apoptotikus Bax molekula vagy a citoszólban, vagy membránokhoz lazán kapcsolódva monomer formában van jelen. Amennyiben a sejtet apoptózist indukáló hatás éri, a citoszólban lévő monomer szerkezetű Bax transzlokálódik a mitokondriumba, ahol integráns membrán proteinné alakul és homodimert képez (Gross et al. 1998; Wolter et al. 1997), majd kifejti pro-apoptotikus hatását. Hatására a mitokondriális membránpotenciál és permeabilitás megváltozik, majd az addig a mitokondriális térbe zárt citokróm-c 9 felszabadul. Ezt követően több lépés eredményeként a végrehajtó kaszpázok aktiválódnak és a sejt az apoptózis következtében elpusztul. Az anti-apoptotikus Bcl-2 és Bcl-XL jelenléte képes meggátolni a Bax aktivációját (Gross et al. 1998). A szintén pro-apoptotikus Bad fehérje a citoplazmában található, foszforilált formában, 14-3-3 fehérjéhez kötötten. Amennyiben a Bad defoszforilálódik, a 14-3-3 fehérjével való kapcsolata megszakad, lehetővé téve transzlokációját a mitokondriumba, ahol az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjéhez kötődve gátolja azok funkcióját. A Bcl-2 és Bcl-XL proteinek a mitokondrium membránjában lévő integráns proteinek, amelyek megakadályozzák a citokróm-c kibocsátását a citoszólba, megelőzve ezzel a sejt apoptózisát. Az idegi szövetekben, így a retinában bekövetkező apoptózisnak különböző kiváltó okai lehetnek: neurotrófikus faktorok hiánya, DNS károsodás

és toxikus behatások. Általánosságban azt mondhatjuk, hogy ezek a tényezők a kaszpáz-3 molekula indukálásával vezetnek a sejthalálhoz (Morrison et al. 2002).

Több publikációban közöltek adatokat a mitokondriális Bcl család szerepéről a PACAP citoprotktív hatásmechanizmusában különböző károsító hatásoknak kitett sejtek esetén. PACAP munkacsoportunk közölte, hogy a PACAP a retinában ezen anti-apoptotikus családnak az expresszióját indukálta, míg a pro-apoptotikus jelátviteli molekulák, mint a Bad szintjét is csökkentette (Rác et al. 2007). Hasonló hatásokról számoltak be kisagyi szemcsesejteken és egyéb idegsejteken is (Aubert et al. 2008; Seaborn et al. 2011). A PACAP Bad és Bax molekulákkal szemben kifejtett szerepét nem csak neuronális sejtek esetében, de egyéb perifériás sejttypusnál, így például sztreptozotocin indukálta apoptózis során inzulinóma sejteken (Onoue et al. 2008), valamint szérum deprivációnak kitett Schwann sejteknél is leírták (Castorina et al. 2008). Az apoptotikus kaszkád aktivációjakor a mitokondriális membrán átjárhatóbbá válik és számos pro-apoptotikus faktor, mint a citokróm-c vagy a SMAC ki választódik a citoszólba. Kutatásunk során elsőként sikerült kimutatnunk, hogy a PACAP képes a SMAC megemelkedett szintjét lecsökkenteni.

A dolgozatban bemutatásra került, hogy a PACAP oxidatív stressz indukálta sejtkárosodás esetén képes védő hatást gyakorolni a retina pigmenthámsejtjeire. Jelen munkámban igyekeztem részletesebben feltárni a háttérben húzódó jelátviteli folyamatokat. Korábbi pigmenthámsejtes kísérleteink során, oxidatív stressz okozta apoptotikus folyamatokban már fény derült a PACAP védő funkciójára (Mester et al. 2011), de mindezidáig a molekuláris háttér ismeretlen volt. A jelen értekezésben az apoptózis array eredményei azt mutatták, hogy a hidrogén-peroxid kezelésnek kitett ARPE-19 sejtekben jelentős mértékben emelkedett számos apoptotikus marker expressziója. PACAP-pal történő együttes kezelés esetén viszont a kontroll körülményeknek megfelelő szinteket találtunk.

A neuronális apoptózis a retinában a nervus opticus átvágásával modellezhető felnőtt központi idegrendszerben (Quigley et al. 1995). Seki és munkatársai arról számoltak be, hogy a nervus opticus átvágása a ganglionsejtek 55%-ának elhalásával jár. A műtét előtt intravitrealisan 10 és 100 pmol PACAP-pal kezelt állatok ganglionsejtjeinek száma a tizennegyedik posztoperatív napon a kontroll csoporthoz képest viszont szignifikánsan magasabb volt (Seki et al. 2008). Ezen eredmények egybevágnak az apoptózis array során találtakkal, miszerint a PACAP anti-apoptotikus hatást fejt ki a retinában. Az apoptózis array ábráján láthattuk, hogy kísérletünk során a mitokondriális pro-apoptotikus fehérjék (Bad, Bax) koncentrációja erősen megemelkedett. Ezt a hatást a PACAP teljes mértékben ki tudta védeni. Emellett a PACAP mérsékelte az oxidatív stressz hatására aktiválódó Trail, FADD,

Fas, SMAC diablo és számos hősokk fehérje expresszióját is. Az apoptózis során több különböző kaszkád játszódik le, melyeket különféle extracelluláris és intracelluláris szignálmolekulák indukálnak. A TNF, illetve a Fas aktivációja is ilyen, mely számos pro-apoptotikus faktort is működésbe hoz. A pro- és anti-apoptotikus folyamatok közötti egyensúly elengedhetetlenül fontos nemcsak az egyedfejlődés, de egész életünk során. Ennek az egyensúlynak a felbomlásával jellemezhetőek a sejtpusztulással járó betegségek, köztük több, retinát érintő megbetegedés is.

A PACAP számos szinten képes az apoptózis folyamatára hatni. Korai kutatások már megerősítették a PACAP MAP kinázok szabályozásában betöltött szerepét, ami a legtöbb vizsgált sejt esetében anti-apoptotikus hatással járt együtt (Dejda et al. 2008; Somogyvári-Vígh és Reglődi 2004; Vaudry et al. 2002). A MAPK család valószínűsíthetően fontos szerepet tölt be a PACAP indukálta sejtvédő folyamatokban, amit több különböző modellben igazoltak már (May et al. 2010; Vaudry et al. 2012). A kisagyi szemcsesejtekben az ERK és JNK MAP kinázok között fennálló egyensúly kritikus szerepet játszik a sejt túlélésben. A PACAP elősegíti az ERK foszforilációját, míg gátolja a JNK aktivációt, ezáltal csökkenti a ceramid indukálta sejthalált (Vaudry et al. 2003). A MAP kinázok szerepe az apoptotikus folyamatokban vitathatatlan a pigmenthámsejtek esetében is (Glotin et al. 2006).

Seki és munkatársai kimutatták az intravitreálisan adott PACAP ganglionsejtekre kifejtett védő hatását magas intraokuláris nyomás okozta iszkémiás károsodás esetén. Ennél a modellenél a PACAP két koncentráció tartományban (10 fmol és 10-100 pmol) is hatásosnak bizonyult. Mindkét dózis esetén cAMP antagonistákkal blokkolható volt ez a védő hatás, míg a MAP kináz gátlók csak az alacsony dózisban adott PACAP hatását semlegesítették. Így valószínűsíthető, hogy különböző PACAP koncentrációk különböző jelátviteli utakat aktiválnak (Seki et al. 2011).

A MAPK család harmadik fontos tagja a p38, amelyet pro-apoptotikus faktorként tartanak számon. Foszforilációja számos sejt károsodás esetén megfigyelhető. Több tanulmány alapján elmondható, hogy a PACAP gátolni képes a p38 aktivációját (Rácz et al. 2006 a, b).

A már korábban tárgyalt ERK-en kívül néhány egyéb fehérje, mint például az Akt szintjét a PACAP tovább növelte. Az Akt indukálta folyamatokat általában az anti-apoptotikus jelátviteli útvonalak között említik, és a PACAP hatására megnövekedő Akt foszforilációt már más sejt típusoknál is leírták (Rácz et al. 2008). Az Akt jelátviteli útvonalak beindulása sejtvédő hatással bír retinális iszkémiában is (Dreixler et al. 2009). A jelen tanulmányban a PACAP egy korábbi, excitatórikus retinakárosodás modellenél, valamint egyéb PACAP mediált neuronális károsodásnál (May et al. 2010; Rácz et al. 2008) leírtakhoz

hasonlóan szintén elősegítette az Akt foszforilációját. Már számos sejttípusra vonatkozóan közölték, hogy PACAP kezelést követően az anti-apoptotikus jelátvitel aktivációja fokozott CREB foszforilációhoz vezet (Bhave és Hoffman 2004; Rácz et al. 2006b). Ezt az eredményt jelen kutatásunk is megerősítette. Mindezen felül azt találtuk, hogy a PACAP mérsékelte az oxidatív stressz hatására megnövekedő Trail, FADD és Fas szinteket, amelyek mind az apoptotikus kaszkád beindításáért felelősek. A PACAP és a Fas ligand egyensúlya igen fontos tényező a kisagyi szemcsesejtek pusztulásában a fejlődés során (Allais et al. 2010). Ezen kívül a PACAP indukálta Fas expresszió csökkenést perifériás sejteknél is leírták, többek között bél karcinóma sejteknél és limfocitáknál (Delgado és Ganea 2001; Le et al. 2002). Az általunk talált hatások is összhangban vannak ezekkel a közleményekkel.

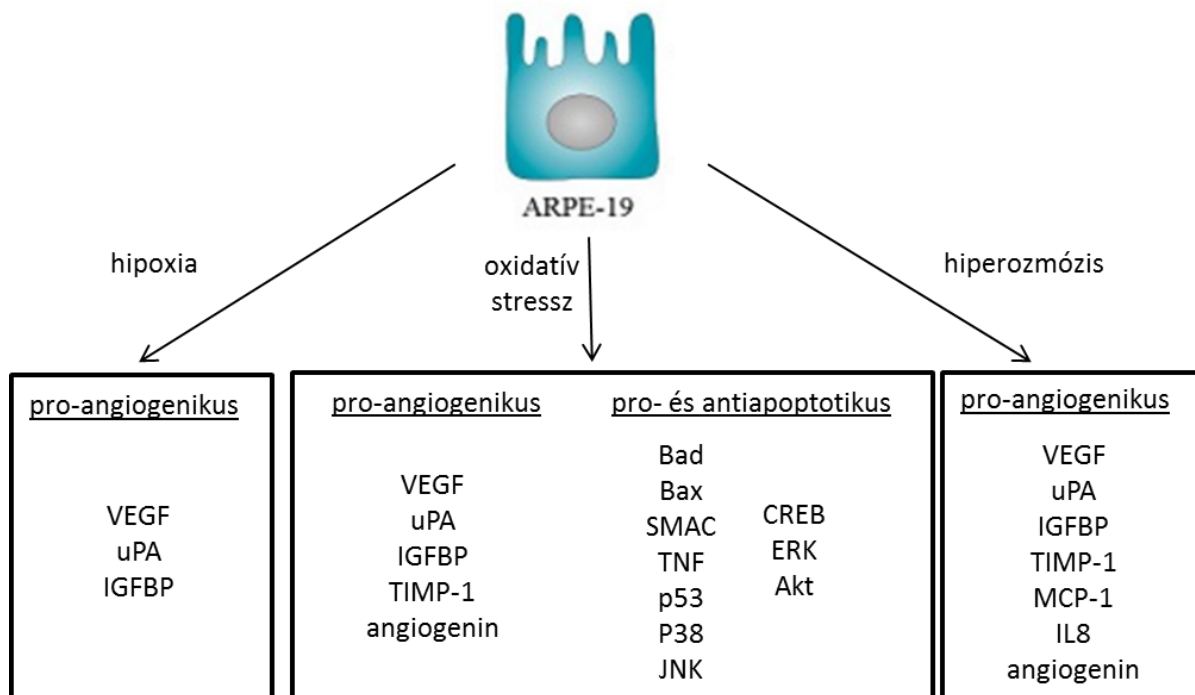
A p53 szintén igen fontos az apoptózis folyamatában. A p53 szabályozásában bekövetkező bármilyen zavar apoptózishoz vezet (Di Giovanni and Rathore 2012). Az oxidatív stressz különböző formáinál leírták, hogy a p53 függő Bax szintézis apoptózist indukál azáltal, hogy hozzákötődik a Bcl-2-höz, inaktíválva annak anti-apoptotikus képességét (Cheng et al. 2001; Yang et al. 2003). Azt találtuk, hogy a PACAP enyhén csökkentette az oxidatív stressz hatására megnövekedett p53 szinteket. Más egyéb faktorok koncentrációja is csökkent, így például a PLC, eNOS, STAT, RSK, és a cIAP-1. PACAP génhiányos egereknél megfigyelték a STAT szintek változását az agyban (Ohtaki et al. 2006), míg mikroglia sejtek esetében a PACAP-nak nem volt hatása a STAT expressziójára (Lee és Suk 2004). Pillanatnyilag túl kevés információ áll rendelkezésre a PACAP és az előbb felsorolt faktorok között fenálló kapcsolatokról ahhoz, hogy mélyremenő következtetéseket vonjunk le. A PACAP retinavédő hatását és jelen eredményeinket figyelembe véve az mindenesetre elmondható, hogy a PACAP képes csökkenteni az oxidatív stressz során aktiválódó faktorok szintjét.

Az ARPE-19 sejteken végrehajtott foszfo-kináz array eredményeink is összhangban állnak a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a PACAP ellentétes hatással bír az ERK és JNK szintekre (Rácz et al. 2006 a, b). A foszfo-kináz array-ben a PACAP néhány olyan molekula aktivációját is növelte, amely szintjének PACAP hatására bekövetkező változásáról irodalom eddig még nem ismert. Az Src családba tartozó kinázok sokféle sejtfolyamat szabályozásában részt vesznek, többek között a növekedési faktorok jelátvitelében, a citoskeletális dinamika fenntartásában és a sejtproliferációban is szerepet játszanak. A Lyn egy, az Src családba tartozó tirozin-kináz, melyről tudjuk, hogy anti-apoptotikus folyamatokban szerepel és fontos a mitokondriumok integritásának fenntartásában (Gringeri et al. 2009; Tibaldi et al. 2011; Takadera et al. 2012). Az Src család másik fontos tagja, a Yes szintje is emelkedett PACAP

kezelés hatására. Ezeken kívül a fokális adhéziókhöz elengedhetetlen szignál transzdukciós molekula, a paxillin (Turner et al. 1990), és a sejtciklus szabályozásában részt vevő Chk2 expressziója is nőtt az oxidatív stressznek kitett ARPE-19 sejtekben PACAP kezelést követően. Ezen faktorok apoptózisban betöltött pontos funkciója még nem ismert, további vizsgálatot igényel a PACAP e molekulákra kifejtett hatásának szerepe.

Munkacsoportunk nemrégiben ismét megerősítette a PACAP apoptózisban betöltött védő szerepét. Az intraokuláris PACAP injekció jelentősen csillapította a diabéteszes retinakárosodást: növelte az anti-apoptotikus p-Akt, p-ERK1, pERK2, PKC, Bcl-2, míg csökkentette az pro-apoptotikus p-p38 MAPK és az aktivált kaszpázok szintjét. A diabéteszes retina minden rétegében nőtt az apoptotikus sejtek száma, ezt a PACAP szignifikánsan lecsökkentette. Az eredményekből kiderül, hogy a PACAP az apoptotikus folyamatok gátlásával fejt ki védő hatását (Szabadfi et al. 2014a). Egy másik tanulmány is alátámasztotta a PACAP anti-apoptotikus hatását MSG indukálta retinális lézió esetén. Újszülött patkányoknál a PACAP csökkenteni tudta a kaszpáz-3 és a kaszpáz-9 szintjét is (Lakk et al. 2015). Ezen kívül kimutatták, hogy a PACAP antagonistá PACAP6-38 emelte a citokróm-c, kaszpáz-3 és JNK aktivációt és csökkentette a foszfo-PKA, foszfo-Bad, Bcl-xL és 14-3-3 fehérje expressziót (Rácz et al. 2006b, 2007). Ezek az in vivo eredmények, hasonlóan Atlasz és munkatársai (2009a) eredményeihez, az endogén PACAP retinoprotektív hatását támasztják alá MSG okozta excitotokus károsodás esetén. Az NMDA (N-metil-D-aszparaginsav) kezelés hasonló léziót eredményez. Radioimmunassay mérések kimutatták, hogy a VIP-vel ellentétben a retinális PACAP szintek nem változnak intravitreális NMDA injekció hatására, amit valószínűleg a BDNF kompenzatórikus expresszió növekedése okozza (Teuchner et al. 2011). Egy nemrégiben közölt tanulmány igazolta, hogy a PACAP mediálta útvonalak védő hatásúak NMDA indukálta retinális lézió esetében. Cheng és munkatársai (2014) kimutatták, hogy az intravitreális NMDA kezelés hatására az elektroretinogrammon csökkennek az "a" és "b" hullámok, ami negatív fotopikus válasszal jár együtt. Ezek a változások ciklikus PACAP1-5 kezelés alkalmazásával megfordíthatóak. Ez utóbbi az apoptotikus folyamatok gátlásával a ganglionsejtek túlélését is segítette (Cheng et al. 2014). Hasonló védő hatást írtak le 100 pmol-os PACAP kezelést alkalmazva egereknél. Az NMDA injekció következményeként a mikroglia/makrofág szám megemelkedett, míg a PACAP kezelt csoportokban a PACAP csökkentette azt, és emellett a ganglionsejtek túlélését is segítette. A PACAP6-38-cal történő együttes kezelés ezeket a jótékony hatásokat kivédte az IL-10 génhányos egereknél. A PACAP ezen kívül megemelte két védő hatású citokin, az IL-10 és a TGF- β mRNS expresszióját (Wada et al. 2013). Összeségében elmondható, hogy a

PACAP jelentős szerepet tölt be az apoptotikus folyamatok szabályozásában és a pigmenthámsejtek esetében a MAP kinázok szignalizációját befolyásolva fejti ki ezen hatását (27. ábra).



27. ábra. Az oxidatív stressz, a hpxia és a hiperozmózis hatására megemelkedő pro- és anti-apoptotikus, valamint pro-angiogenikus faktorok. A felsorolt faktorok koncentrációja 100 nM PACAP kezelés hatására a kontroll szintre csökkent.

A PACAP angiogenesis szabályozásában betöltött szerepe egyelőre kevésbé ismert. Leginkább a PACAP VEGF szintekre gyakorolt hatását vizsgálták. A vaszkuláris endotheliális növekedési faktor expressziója az angiogenikus folyamatok beindulásakor jelentősen növekszik, míg ezek hiányában csökken (Hoeben et al. 2004). Tüdőkarcinóma sejtekben a PACAP1-27 és a VIP fokozta a VEGF aktivációt (Moody et al. 2002). Egy másik tanulmányban a PACAP szintén fokozta a VEGF mRNS exprsszióját prosztatacarcinóma sejteknél (Collado et al., 2004, 2005). Kísérleteink során mi ezzel ellentétes hatásokat találtunk. Hiperozmózis hatására mind NaCl kezelés, mind a szacharóz kezelés esetében erőteljes VEGF szint növekedést tapasztaltunk, melyet a PACAP hatásosan visszaszorított. A szacharóz kezelés eredményeit áramlási citometriás mérésekkel is megrősítettük. Egy nemrégiben közölt cikk nátrium-azid okozta retinális iszkémia során vizsgálta a PACAP

hatását a metabolikus változásokra egy ex vivo egér modellen (D'Alessandro et al. 2014). Amellett, hogy a PACAP különböző változásokat indukált, csökkentette az iszkémia okozta sejthalált, a glutamát kibocsátást és a VEGF expressziót is, így összhangban áll az általunk találtakkal is. A TUNEL módszerrel mért apoptózis a külső és belső magvas rétegben, valamint a ganglionsejtek rétegében csökkent jelentősen. Az iszkémia hatására megemelkedett kaspáz-3 mRNS szinteket is redukálta a PACAP. A glutamin expressziója iszkémiás behatásra szignifikánsan növekedett, a PACAP ezt is képes volt ellensúlyozni. Az iszkémia oxidatív károsodással jár együtt, így a szerzők a retinatenyészet oxidatív állapotát is feltérképezték. Azt találták, hogy a PACAP emelte a glutation és csökkentette az oxidált glutation szintjét. Emellett a peptid a gyulladáshoz vezető faktorok és peroxidált lipidek felhalmozódását is gátolta. Három nitrogén-monoxid metabolit expressziója is megemelkedett az iszkémiás retinában: arginin, ornitin és citrullin, míg a cAMP szintek szignifikánsan lecsökkentek. A PACAP kezelés visszafordította ezeket a változásokat (D'Alessandro et al. 2014).

Diabéteszes retinopátia esetén a megnövekedett glükóz szint a vérben nemcsak hiperglikémiás, de hiperozmotikus állapotok létrejöttéhez vezet. A PACAP az angiogenezis array-k mérései alapján csökkenteni tudta a megváltozott ozmotikus viszonyok hatására aktiválódó pro-angiogenezis faktorok szintjét. A PACAP munkacsoportunk legutóbbi tanulmánya további részleteket világított meg a peptid retinoprotektív hatásával kapcsolatban. Elektronmikroszkópos analízis kimutatta, hogy a diabétesz során a pigmenthámsejtek struktúrája, a ribbon szinapszisok és más szinaptikus kapcsolatok is változásokat szenvedtek. A PACAP-pal kezelt retinákban több intakt bipoláris ribbon szinapszist találtak, mint a diabéteszesekben. A ribbon szinapszisokat C-terminális kötő fehérje 2/Bassoon-nal jelölték, amik patkó alakú szalagokat formáltak. Ezeknek a struktúrája a PACAP-pal kezelt retinákban jobban megőrzött volt, mint a diabéteszes állatoknál. A bipoláris és ganglionsejtek szelektív degenerációját a PACAP megakadályozta. A pigmenthámsejtek elektronmikroszkópos képe sztreptozotocin kezelés után a sejtek megváltozott struktúráját mutatta, vörös vértetek voltak láthatóak az RPE sejtek belsejében. PACAP kezeléssel ez a degeneráció kiküszöbölhető volt.

Összegzésként elmondható, hogy az intravitreálisan adott PACAP terápiás lehetőség lehet sztreptozotocin indukálta diabéteszes retinopátiában, mivel a PACAP segít a szinapszisok és a pigmenthámsejtek integritásának megőrzésében (Szabadfi et al. 2016).

A VEGF-en kívül több más angiogenezisben részt vevő faktor expressziója megnövekedett NaCl kezelés hatására. Az angiogenezisről elsőként írták le azon képességét, hogy képes serkenteni az érújdonképződést. Ezen tulajdonsága mellett fény derült egyéb, igen

szerteágazó funkcióira is. Szerepet játszik a túlélési folyamatok, sejtproliferáció és migráció szabályozásában is (Sheng és Xu 2015). A PACAP egy tanulmányunkban leírtak szerint képes volt csökkenteni a megnövekedett angiogenin koncentrációt humán trophoblast sejtek esetén, emellett számos más faktor expressziója csökkent a normál színre PACAP kezelés hatására: angiopoietin, EG-VEGF, IL-8 és TIMP-1 (Horváth et al. 2014). Az angiogenin szintek csökkenését PACAP hatására mi is tapasztaltuk az angiogenezis array mérések kiértékelésekor NaCl-dal és hidrogén-peroxiddal történő kezelést követően. Az EG-VEGF expressziója mindhárom kísérleti modellnél (NaCl, szacharóz és H₂O₂) mérséklődött PACAP kezelés hatására, míg az IL-8 szint csökkenését csak a szacharózos hiperozmotikus modellnél tapasztaltuk.

A TIMP-1 molekula a mátrix metalloproteázok gátlójaként ugyancsak angiogenikus tulajdonságokkal bír (Ma et al. 2016). Méréseink során mi is azt találtuk, hogy a a szacharóz és hidrogén-peroxid kezelést követő TIMP-1 koncentráció növekedést a PACAP képes volt kivédeni. A konyhasó a fentiekén kívül még az artemin, a pentraxin-3 és a platelet faktor-4 aktivációját is elősegítette, a PACAP a kontroll szintre csökkentette ezt az aktivációt. Ezeknek a molekuláknak az angiogenezisben betöltött pontos szerepe még tisztázásra vár.

A szacharóz és a hidrogén-peroxid a NaCl-nál jóval több faktor expresszióját fokozta, köztük több inzulin-szerű növekedési faktort kötő fehérjét (IGFBP) is. Glioblastoma sejtek esetén azt találták, hogy az IGFBP-1 stimulálja az angiogenezist (Nijaguna et al. 2015). Ezzel összhangban állnak a mi eredményeink is, miszerint szacharóz és hidrogén-peroxid kezelést követően fokozódott az IGFBP-k szekréciója, míg a PACAP kezelés ezt csökkenteni tudta.

Egy másik molekula, az urokináz plazminogén aktivátor (uPA) esetén is hasonló változásokat találtunk. Egy közlemény alapján az uPA receptor kötődése a VEGF receptorhoz különböző jelátviteli utakat aktivál, amely többek között angiogenezishez vezet (Herkenne et al. 2015). Esetünkben a PACAP csökkentette a megemelkedett uPA expressziót, így anti-angiogenikus hatást fejtett ki.

Az angiogenezis array által mérhető számos molekula PACAP-pal való pontos kapcsolata még nem ismert, de összességében az array olyan képet mutatott, miszerint a PACAP csökkenteni tudta az angiogenezis kialakulásában szerepet játszó faktorok expresszióját a retina pigmenthámsejtjeinél. Ennek tudatában elmondható, hogy a PACAP képes lehet számos olyan retinopátia kezelésére, melynek hátterében az angiogenikus folyamatok aktivációja áll.

A cell stressz array-vel a PACAP stresszmolekulákra kifejtett hatását vizsgáltuk. D'Amico és munkatársai a hipoxia indukálta faktorokat (hif) vizsgálták szreptozotocinnal

kiváltott diabétesz harmadik hetében. Azt találták, hogy a diabétesz patkányoknál szignifikánsan fokozódott a hif-1 α és a hif-2 α expressziója, ami megelőzhető volt egy intravitreális PACAP kezeléssel. Ezzel ellentétben a hif-3 α koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt a diabéteszes állatok retinájában, amit a PACAP kezelés szintén megemelt. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a PACAP retinoprotektív hatását többek között a hif molekulák szintjének befolyásolásával éri el, amely faktorok igen fontos szerepet töltenek be a diabétesz során kialakuló patológiás vaszkulogenezisben (D'Amico et al. 2015). Méréseink alapján az oxidatív stressz nem, de a hipoxia fokozta a hif molekulák expresszióját, azonban ezt a PACAP nem tudta csökkenteni. Oxidatív stressz hatására növekedtek a különböző hősokk fehérjék (HSP60 és HSP70), valamint olyan pro-apoptotikus faktorok, mint a citokróm-c, a p38 és a p53 koncentrációi. A hipoxia az angiogenesis array-vel ellentétben nem okozott jelentős változásokat a cell stressz array-ben.

A szénsav-anhidráz IX szintje nélkülözhetetlen a sav-bázis egyensúly beállításához. Több tanulmány foglalkozott a szénsav-anhidráz IX rákos megbetegedésekben betöltött szerepével. Azt találták, hogy az enzim megemelkedett szintje rontja számos karcinóma, többek között a prosztatarák prognózisát (Ambrosio et al. 2016). Kutatásaink során azt találtuk, hogy kobalt-klorid kezelésre a szénsav-anhidráz koncentrációja csökkent, ezt a PACAP visszaemelte a kontroll szintre. A PACAP ezen hatásának megismerésére további kísérletek szükségesek.

A SOD2 a szuperoxid-dizmutázok családjába tartozó protein, amely a reaktív oxigéngyököket távolítja el, ezzel véd a sejthalál ellen. A hipoxia nem változtatott ezen fehérje szintjén, viszont a PACAP kezelés szignifikánsan megnövelte az expresszióját, így védő hatást gyakorolt.

Mindezeket figyelembe véve kijelenthetjük, hogy a korábbi kutatásainkkal összhangban a PACAP a pigmenthámsejtek esetében is citoprotektív hatást fejt ki különböző károsító tényezőkkel szemben. A peptid anti-apoptotikus hatása megmutatkozott abban, hogy csökkenteni tudta számos pro-apoptotikus faktor (Bad, Bax, citokróm-c, Fas, JNK, p38, p53) és emelni az apoptózis folyamatának gátlásában résztvevő molekulák (ERK, Bcl-2, CRB, Akt, Src, Lyn és Yes) szintjét oxidatív stressz és hipoxia indukálta sejtkárosodás esetén is. Az angiogenezisre kifejtett hatásai alapján elmondhatjuk, hogy a PACAP több modellben is csökkentette az egyik legfontosabb angiogenikus faktor, a VEGF expresszióját. Ez önmagában igen fontos eredmény, mivel más sejttípusokon a PACAP ezzel ellentétes hatást fejt ki, így elsőként közöltük a PACAP VEGF aktivációt gátló hatását pigmenthámsejtek esetében. Emellett azonban számos más pro-angiogenikus faktor szintjét is képes volt

mérsékelni (uPA, IGFBP, TIMP-1, EG-VEGF, angiogenin, angiopoietin). Konklúzióként levonható, hogy a PACAP alkalmazása igen sokrétű terápiás lehetőségeket rejt magában a két leggyakoribb vaksághoz vezető betegség, a diabéteszes retinopátia és a makuladegeneráció kezelésében.

VII. Új eredmények összefoglalása

1. Kimutattuk a PACAP pigmenthámsejtekre kifejtett általános sejtvédő hatását kobalt-klorid indukálta hipoxiás, hidrogén-peroxid kezeléssel előidézett oxidatív stressz és szacharózzal kiváltott hiperozmotikus stressz esetén.
2. Igazoltuk, hogy a PACAP képes az egyik legjelentősebb angiogenikus faktor, a VEGF szintjét csökkenteni ARPE-19 sejtvonalon. Ezt a hatását a peptid többféle károsító tényező: hiperozmózis, hipoxia, valamint oxidatív stressz esetén is kifejti.
3. Esőként közöltük, hogy a PACAP a pro-apoptotikus SMAC expresszióját is gátolta hidrogén-peroxid kezeléssel előidézett oxidatív stressz esetén
4. A jelen tanulmány az első, amely azt igazolja, hogy a PACAP képes mérsékelni a CINC kemokinek szintjét patkány retinán. E gyulladásos citokinek koncentrációja kétoldali carotis communis lekötést követő iszkémia esetén jelentős mértékben megnövekedett, ezt a PACAP jelentős mértékben csökkentette.

VIII. Irodalomjegyzék

Adamik A, Telegdy G. Involvement of different receptors in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide induced open field activity in rats. *Neuropeptides* 2004, 38(1):16-20.

Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, Yeo TK, Brown LF, Berse B, D'Amore PA, Folkman J. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993, 193(2):631-8

Agarwal A, Halvorson LM, Legradi G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Molecular Brain Research* 2005, 138(1):45-57.

Agnese M, Valiante S, Rosati L, Andreuccetti P, Prisco M. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and PAC1 receptor in the testis of cartilaginous fish *Torpedo marmorata*: A molecular and phylogenetic study. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 2016, 191:26-35.

Ahuja P, Caffé AR, Holmqvist I, Söderpalm AK, Singh DP, Shinohara T, van Veen T. Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) delays photoreceptor degeneration in explants of rd/rd mouse retina. *Neuroreport* 2001, 12(13):2951-5

Alexander JP, Bradley JM, Gabourel JD, Acott TS. Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1990, 31(12):2520-8.

Allais A, Burel D, Roy V, Arthaud S, Galas L, Isaac ER, Desfeux A, Parent B, Fournier A, Chapillon P, Sherwood NM, Vaudry H, Gonzalez BJ. Balanced effect of PACAP and FasL on granule cell death during cerebellar development: a morphological, functional and behavioural characterization. *Journal of Neurochemistry* 2010, 113(2):329-40

Amato R, Biagioni M, Cammalleri M, Dal Monte M, Casini G. VEGF as a survival factor in ex vivo models of early diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2016, 57(7):3066-76.

Ambrosio MR, Di Serio C, Danza G, Rocca BJ, Ginori A, Prudovsky I, Marchionni N, Del Vecchio MT, Tarantini F. Carbonic anhydrase IX is a marker of hypoxia and correlates with higher Gleason scores and ISUP grading in prostate cancer. *Diagnostic Pathology* 2016, 11(1):45.

Apa R, Lanzone A, Miceli F, Vaccari S, Macchione E, Stefanini M, Canipari R. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates plasminogen activator expression in rat granulosa cell. *Biology of Reproduction* 2002, 66(3):830-5.

Arimura A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Japanese Journal of Physiology* 1998, 48(5):301-31.

Arimura A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Frontiers of Neuroendocrinology* 1995, 16(1):53-88.

Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 1991, 129(5):2787-9.

Atlasz T, Kőszegi Z, Babai N, Tamás A, Reglődi D, Kovács P, Hernádi I, Gábrriel R. Microiontophoretically applied PACAP blocks excitatory effects of kainic acid in vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1070:143-8.

Atlasz T, Babai N, Kiss P, Reglődi D, Tamás A, Szabadfi K, Tóth G, Hegyi O, Lubics A, Gábrriel R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *General and Comparative Endocrinology* 2007, 153(1-3):108-14.

Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Babai N, Kőszegi Z, Tamás A, Reglődi D, Gábrriel R. PACAP-mediated neuroprotection of neurochemically identified cell types in MSG-induced retinal degeneration. *Journal of Molecular Neuroscience* 2008, 36(1-3):97-104.

Atlasz T, Szabadfi K, Reglődi D, Kiss P, Tamás A, Tóth G, Molnár A, Szabó K, Gábrriel R. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its fragments on retinal degeneration induced by neonatal monosodium glutamate treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009, 1163:348-52.

Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Rácz B, Gallyas F, Tamás A, Gaál V, Márton Z, Gábrriel R, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the retina: focus on the retinoprotective effects. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010, 1200:128-39.

Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Marton Z, Griecs M, Hamza L, Gaál V, Bíró Z, Tamás A, Hild G, Nyitrai M, Tóth G, Reglődi D, Gábrriel R. Effects of PACAP in UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats. *Journal of Molecular Neuroscience* 2011, 43(1):51-7.

Atlasz T, Balogh M, Werling D, Zhang Y, Reglődi D, Bloomfield S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents monosodium glutamate (MSG) induced functional disturbances in the mouse retina. Presented at 9th FENS Forum of Neuroscience 2014, Milan, Italy

Atlasz T, Váczy A, Kovács K, Lőkös E, Kvárik T, Werling D et al. The protective role of the endogenous PACAP in LPS-induced inflammation in the retina. Presented at 12th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, 2015, Cappadocia, Turkey

Aubert N, Vaudry D, Falluel-Morel A, Desfeux A, Fisch C, Ancian P, de Jouffrey S, Le Bigot JF, Couvineau A, Laburthe M, Fournier A, Laudénbach V, Vaudry H, Gonzalez BJ. PACAP prevents toxicity induced by cisplatin in rat and primate neurons but not in

proliferating ovary cells: involvement of the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiology of Disease* 2008, 32(1):66-80.

Azuma M, Suzuki T, Mochida H, Tanaka S, Matsuda K. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates release of somatolactin (SL)- α and SL- β from cultured goldfish pituitary cells via the PAC₁ receptor-signaling pathway, and affects the expression of SL- α and SL- β mRNAs. *Peptides*. 2013, 43:40-7.

Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglödi D, Tóth G, Kiss P, Gábríel R. Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retinal degeneration. *Neurotoxicity Research* 2005, 8(3-4):227-33.

Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglödi D, Tóth G, Kiss P, Gábríel R. Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1070:149-55.

Bánki E, Degrell P, Kiss P, Kovács K, Kemény A, Csanaky K, Düh A, Nagy D, Tóth G, Tamás A, Reglödi D. Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides* 2013, 42:125-30.

Bánki E, Kovács K, Nagy D, Juhász T, Degrell P, Csanaky K, Kiss P, Jancsó G, Tóth G, Tamás A, Reglödi D. Molecular mechanisms underlying the nephroprotective effects of PACAP in diabetes. *Journal of Molecular Neuroscience* 2014, 54(3):300-9.

Bánki E, Sosnowska D, Tucsek Z, Gautam T, Tóth P, Tarantini S, Tamás A, Helyes Z, Reglödi D, Sonntag WE, Csiszár A, Ungvári Z. Age-related decline of autocrine pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial cells. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 2015, 70(6):665-74.

Barberi M, Muciaccia B, Morelli MB, Stefanini M, Cecconi S, Canipari R. Expression localisation and functional activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, vasoactive intestinal polypeptide and their receptors in mouse ovary. *Reproduction* 2007, 134(2):281-92.

Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. Review. *Advances of cancer research* 1992, 59:115-65.

Becerra SP, Fariss RN, Wu YQ, Montuenga LM, Wong P, Pfeffer BA. Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution. *Experimental Eye Research* 2004, 78(2):223-34.

Behling KC, Surace EM, Bennett J. Pigment epithelium-derived factor expression in the developing mouse eye. *Molecular Vision* 2002, 18:8:449-54.

Bhave SV, Hoffman PL. Phosphatidylinositol 3'-OH kinase and protein kinase A pathways mediate the anti-apoptotic effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in cultured cerebellar granule neurons: modulation by ethanol. *Journal of Neurochemistry* 2004, 88(2):359-69.

Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, Alitalo K, Kroon ME, Kijlstra A, van Hinsbergh VW, Schlingemann RO. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *The American Journal of Pathology* 1999, 155(2):421-8.

Bouloumié A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circulation Research* 1998, 83(10):1059-66.

Bourgault S, Vaudry D, Guilhaudis L, Raoult E, Couvineau A, Laburthe M, Ségalas-Milazzo I, Vaudry H, Fournier A. Biological and structural analysis of truncated analogs of PACAP27. *Journal of Molecular Neuroscience* 2008, 36(1-3):260-9.

Börzsei R, Márk L, Tamás A, Bagoly T, Bay C, Csanaky K, Bánki E, Kiss P, Vázy A, Horváth G, Németh J, Szauer E, Helyes Z, Reglődi D. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *European Journal of Endocrinology* 2009, 160:561–565

Brenneman DE, Hauser J.M, Spong C., Phillips T.M., Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity *Neuropeptides* 2002, 36:271–80.

Brubel R, Reglődi D, Jámbor E, Koppán M, Várnagy A, Bíró Z, Kiss P, Gaál V, Matkovits A, Farkas J, Lubics A, Bódis J, Bay C, Veszprémi B, Tamás A, Németh J, Márk L. Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2011, 46:189–94

Brubel R, Boronkai A, Reglődi D, Rácz B, Németh J, Kiss P, Lubics A, Tóth G, Horváth G, Varga T, Szőgyi D, Fónagy E, Farkas J, Barakonyi A, Bellyei S, Szereday L, Koppán M, Tamás A. Changes in the expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. *Journal of Molecular Neuroscience* 2014, 42(3):450-8.

Burns MS, Hartz MJ. The retinal pigment epithelium induces fenestration of endothelial cells in vivo. *Current Eye Research* 1992, 11(9):863-73.

Campbell RM, Scanes CG. Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regulation* 1992, 2(4):175-91.

Campochiaro PA, Sugg R, Grotendorst G, Hjelmeland LM. Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media. *Experimental Eye Research* 1989, 49(2):217-27.

Campochiaro PA, Hackett SF, Viores SA, Freund J, Csaky C, LaRochelle W, Henderer J, Johnson M, Rodriguez IR, Friedman Z. Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *Journal of Cell Science* 1994, 107 (9):2459-69.

Canonico PL, Copani A, D'Agata V, Musco S, Petralia S, Travali S, Stivala F, Cavallaro S. Activation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors prevents apoptotic

cell death in cultured cerebellar granule cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996, 805:470-2.

Cao J, Zhang H, Liu N. The modulation of cell proliferation induced by growth factors in human retinal pigment epithelial cells. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 1997, 33(5):360-2.

Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, Mrazek D, Elias R, McGinnis JF. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *Journal of Neuroscience Research* 1999, 57(6):789-800.

Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, McGinnis JF. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2001, 42(7):1646-52.

Casibang M, Purdom S, Jakowlew S, Neckers L, Zia F, Ben-Av P, Hla T, You L, Jablons DM, Moody TW. Prostaglandin E2 and vasoactive intestinal peptide increase vascular endothelial cell growth factor mRNAs in lung cancer cells. *Lung Cancer* 2001, 31(2-3):203-12.

Castorina A, Tiralongo A, Giunta S, Carnazza ML, Rasi G, D'Agata V. PACAP and VIP prevent apoptosis in schwannoma cells. *Brain Research* 2008, 1241:29-35.

Cervia D, Catalani E, Monte Md, Casini G. Vascular endothelial growth factor in the ischemic retina and its regulation by somatostatin. *Journal of Neurochemistry* 2012 120:818-29.

Cervia D, Casini G. The Neuropeptide Systems and their Potential Role in the Treatment of Mammalian Retinal Ischemia: A Developing Story. *Current Neuropharmacology* 2013, 11(1):95-101.

Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell* 2001, 8(3):705-11.

Cheng H, Ding Y, Yu R, Chen J, Wu C. Neuroprotection of a novel cyclopeptide C*HSDGIC* from the cyclization of PACAP (1-5) in cellular and rodent models of retinal ganglion cell apoptosis. *PLoS one* 2014, 9(10):1080-90.

Chiodera P, Volpi R, Capretti L, Coiro V. Effects of intravenously infused pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on arginine vasopressin and oxytocin secretion in man. *Neuroreport* 1995, 6(11):1490-2.

Collado B, Gutiérrez-Cañas I, Rodríguez-Henche N, Prieto JC, Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide increases vascular endothelial growth factor expression and neuroendocrine differentiation in human prostate cancer LNCaP cells. *Regulatory Peptides* 2004, 119(1-2):69-75.

Collado B, Sánchez MG, Díaz-Laviada I, Prieto JC, Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces c-fos expression in LNCaP prostate cancer cells through a mechanism

that involves Ca²⁺ signalling. Implications in angiogenesis and neuroendocrine differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005, 1744(2):224-33.

Congdon NG, Friedman DS, Lietman T. Important causes of visual impairment in the world today. Review. *JAMA* 2003, 290(15):2057-60.

Counis R, Laverrière JN, Garrel-Lazayres G, Cohen-Tannoudji J, Larivière S, Bleux C, Magre S. What is the role of PACAP in gonadotrope function? Review. *Peptides* 2007, 28(9):1797-804.

Crane I.J., Kuppner M.C., McKillop-Smith S., Knott R.M., Forrester J.V., Cytokine regulation of RANTES production by human retinal pigment epithelial cells. *Cellular Immunology* 1998, 184:37-44.

Csaba Z, Csernus V, Gerendai I. Local effect of PACAP and VIP on testicular function in immature and adult rats. *Peptides* 1997, 18(10):1561-7.

D'Alessandro A, Cervia D, Catalani E, Gevi F, Zolla L, Casini G. Protective effects of the neuropeptides PACAP, substance P and the somatostatin analogue octreotide in retinal ischemia: a metabolomic analysis. *Molecular Biosystem* 2014, 10(6):1290-304.

D'Amico AG, Maugeri G, Reitano R, Bucolo C, Saccone S, Drago F, D'Agata V. PACAP modulates expression of hypoxia-inducible factors in streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Journal of Molecular Neuroscience* 2015, 57(4):501-9.

D'Agata V, Cavallaro S. Functional and molecular expression of PACAP/VIP receptors in the rat retina. *Molecular Brain Research* 1998, 54(1):161-4.

Dányádi B, Szabadfi K, Reglódi D, Mihalik A, Dányádi T, Kovács Z, Bártai I, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gábel R. PACAP application improves functional outcome of chronic retinal ischemic injury in rats-evidence from electroretinographic measurements. *Journal of Molecular Neuroscience* 2014, 54(3):293-9.

Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999, 285(5425):245-8.

Dejda A, Jolivel V, Bourgault S, Seaborn T, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D. Inhibitory effect of PACAP on caspase activity in neuronal apoptosis: a better understanding towards therapeutic applications in neurodegenerative diseases. *Journal of Molecular Neuroscience* 2008, 36(1-3):26-37.

Della NG, Campochiaro PA, Zack DJ. Localization of TIMP-3 mRNA expression to the retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1996, 37(9):1921-4.

Delgado M, Jonakait GM, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia* 2002, 39:148-61.

Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Leceta J, Ganea D, Gomariz RP. PACAP in immunity and inflammation. Review. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003, 992:141–57

Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit expression of Fas ligand in activated T lymphocytes by regulating c-Myc, NF-kappa B, NF-AT, and early growth factors 2/3. *Journal of Immunology* 2001, 166(2):1028-40

Diané A, Payne GW, Gray SL. Multifaces of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): from neuroprotection and energy homeostasis to respiratory and cardiovascular systems. *Journal of Metabolic Syndrome* 2014, 3:162.

Dickson L, Finlayson K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacology & Therapeutics* 2009, 121(3):294-316.

Di Giovanni S, Rathore K. p53-Dependent pathways in neurite outgrowth and axonal regeneration. *Cell Tissue Research* 2012, 349(1):87-95.

Ding Y, Cheng H, Yu R, Tang C, Liu X, Chen J. Effects of cyclopeptide C*HSDGIC* from the cyclization of PACAP (1-5) on the proliferation and UVB-induced apoptosis of the retinal ganglion cell line RGC-5. *Peptides* 2012, 36(2):280-5.

Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circulatory Research* 2000, 86(3):286-92.

Dow RC1, Bennie J, Fink G. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP)-38 is released into hypophysial portal blood in the normal male and female rat. *Journal of Endocrinology* 1994, 142(1):1-4.

Dreixler J.C., Hemmert J.W., Shenoy S.K., Shen Y., Lee H.T., Shaikh A.R., Rosenbaum D.M., Roth S. The role of Akt/protein kinase B subtypes in retinal ischemic preconditioning *Experimental Eye Research* 2009, 88:512–21.

Dunn KC, Marmorstein AD, Bonilha VL, Rodriguez-Boulan E, Giordano F, Hjelmeland LM. Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1998, 39(13):2744-9.

Dvorientchikova G, Barakat D.J., Hernandez E., Shestopalov V.I., Ivanov D. Liposome-delivered ATP effectively protects the retina against ischemia–reperfusion injury. *Molecular Vision* 2010, 16:2882–90.

Eichler W, Friedrichs U, Thies A, Tratz C, Wiedemann P. Modulation of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression by cytokines in human RPE cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2002, 43(8):2767-73.

El-Gehani F, Tena-Sempere M, Huhtaniemi I. Evidence that pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent regulator of fetal rat testicular steroidogenesis. *Biology of Reproduction* 2000, 63(5):1482-9.

Endo K, Nakamachi T, Seki T, Kagami N, Wada Y, Nakamura K, Kishimoto K, Hori M, Tsuchikawa D, Shinntani N, Hashimoto H, Baba A, Koide R, Shioda S. Neuroprotective effect of PACAP against NMDA-induced retinal damage in the mouse. *Journal of Molecular Neuroscience* 2011, 43(1):22-9.

Engelund A, Fahrenkrug J, Harrison A, Luuk H, Hannibal J. Altered pupillary light reflex in PACAP receptor 1-deficient mice. *Brain Research* 2012, 1453:17-25.

Evans JJ. Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endocrine Reviews* 1999, 20(1):46-67.

Fahrenkrug J, Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide immunoreactivity in capsaicin-sensitive nerve fibres supplying the rat urinary tract. *Neuroscience* 1998, 83:1261-72.

Ferencz A, Rácz B, Tamás A, Reglődi D, Lubics A, Németh J, Nedvig K, Kalmár-Nagy K, Horváth OP, Weber G, Róth E. Influence of PACAP on oxidative stress and tissue injury following small bowel autotransplantation. *Journal of Molecular Neuroscience* 2009, 37:168-76.

Ferencz A, Kiss P, Wéber Gy, Helyes Zs, Shintani N, Baba A, Reglődi D. Comparison of intestinal warm ischemic injury in PACAP knock-out and wild-type mice. *Journal of Molecular Neuroscience* 2010, 42:435–42.

Fernandez LA, Twickler J, Mead A. Neovascularization produced by angiotensin II. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1985, 105(2):141-5.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Review. *Endocrine Reviews* 2004, 25(4):581-611.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Review. *Nature Medicine* 1995, 1(1):27-31.

Gábril R. Neuropeptides and diabetic retinopathy. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2013, 75(5):1189-201

Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Z. The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 2012, 202:283-99.

Ghaly A, Marsh DR. Ischaemia–reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. *International Journal of Experimental Pathology* 2010, 91:244–55.

Ghatei MA, Takahashi K, Suzuki Y, Gardiner J, Jones PM, Bloom SR. Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its

precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *Journal of Endocrinology* 1993, 136(1):159-66.

Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. Review. *Cell Death & Differentiation* 2004, 1:37-44.

Gloddek J., Pagotto U., Paez Pereda M., Arzt E., Stalla G.K., Renner U Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *Journal of Endocrinology* 1999, 160:483-90.

Glotin AL, Calipel A, Brossas JY, Faussat AM, Tréton J, Mascarelli F. Sustained versus transient ERK1/2 signaling underlies the anti- and proapoptotic effects of oxidative stress in human RPE cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006, 10:4614-23.

Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, 17:6624-8.

Gräs S, Høst E, Fahrenkrug J. Role of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the cyclic recruitment of immature follicles in the rat ovary. *Regulatory Peptides* 2005, 128(1):69-74.

Gringeri E, Carraro A, Tibaldi E, D'Amico FE, Mancon M, Toninello A, Pagano MA, Vio C, Cillo U, Brunati AM. Lyn-mediated mitochondrial tyrosine phosphorylation is required to preserve mitochondrial integrity in early liver regeneration. *Biochemical Journal* 2009, 425(2):401-12.

Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *The EMBO Journal* 1998, 17(14):3878-85.

Gustavsson C., Agardh C.D., Hagert P., Agardh E. Inflammatory markers in nondiabetic and diabetic rat retinas exposed to ischemia followed by reperfusion. *Retina* 2008, 28:645-52.

Gutierrez-Canas I, Rodriguez-Henche N, Bolanos O, Carmena MJ, Prieto JC, Juarranz MG. VIP and PACAP are autocrine factors that protect the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 from apoptosis induced by serum withdrawal. *British Journal of Pharmacology* 2003, 139:1050-58

Hannibal J. Roles of PACAP-containing retinal ganglion cells in circadian timing. Review *International Review of Cytology* 2006, 251:1-39.

Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU, Mikkelsen JD. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *Journal of Neuroscience* 1997, 17(7):2637-44.

Hannibal J, Georg B, Fahrenkrug J. Altered circadian food anticipatory activity rhythms in pacap receptor 1 (pac1) deficient mice. *PLoS One* 2016, 11(1):1469-81

Hannibal J, Fahrenkrug J. Melanopsin containing retinal ganglion cells are light responsive from birth. *Neuroreport* 2004, 15(15):2317-20.

Hannibal J, Mikkelsen JD, Clausen H, Holst JJ, Wulff BS, Fahrenkrug J. Gene expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat hypothalamus. *Regulatory Peptides* 1995, 55(2):133-48.

Hashimoto H, Nogi H, Mori K, Ohishi H, Shigemoto R, Yamamoto K, Matsuda T, Mizuno N, Nagata S, Baba A. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology* 1996, 371(4):567-77.

Hauser-Kronberger C, Albegger K, Saria A, Hacker GW. Neuropeptides in human salivary (submandibular and parotid) glands. *Acta Otolaryngologica* 1992, 112(2):343-8.

Herkenne S, Paques C, Nivelles O, Lion M, Bajou K, Pollenus T, Fontaine M, Carmeliet P, Martial JA, Nguyen NQ, Struman I. The interaction of uPAR with VEGFR2 promotes VEGF-induced angiogenesis. *Science Signalling* 2015, 8(403):117.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological Reviews* 2004, 56(4):549-80.

Hollborn M, Vogler S, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A, Kohen L. Regulation of the hyperosmotic induction of aquaporin 5 and VEGF in retinal pigment epithelial cells: involvement of NFAT5. *Molecular Vision* 2015, 21:360-77.

Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R, de Vos AF. Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes. *Progress in Retinal and Eye Research* 2001, 20(1):29-48.

Horváth G, Reglődi D, Brubel R, Halász M, Barakonyi A, Tamás A, Fábíán E, Opper B, Tóth G, Cohen M, Szereday L. Investigation of the possible functions of PACAP in human trophoblast cells. *Journal of Molecular Neuroscience* 2014, 54(3):320-30.

Horváth G, Kiss P, Németh J, Lelesz B, Tamás A, Reglődi D. Environmental enrichment increases PACAP levels in the CNS of adult rats. *Neuroendocrinology Letters* 2015, 36(2):143-7.

Horváth G, Illés A, Heimesaat MM, Bárdosi A, Bárdosi S, Tamás A, Fülöp DB, Opper B, Németh J, Ferencz A, Reglődi D. Protective intestinal effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP*, edited by Dora Reglodi and Andrea Tamas. New York: Springer Nature, 2016 in press.

Huang Q, Wang S, Sorenson CM, Sheibani N. PEDF-deficient mice exhibit an enhanced rate of retinal vascular expansion and are more sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration. *Experimental Eye Research* 2008, 87(3):226-41.

Iruela-Arispe ML, Bornstein P, Sage H. Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, 88(11):5026-30.

Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Amano S, Ogura Y, Hida T, Oguchi Y, Ambati J, Miller JW, Gragoudas ES, Ng YS, D'Amore PA, Shima DT, Adamis AP. VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *The Journal of Experimental Medicine* 2003, 198(3):483-9.

Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 1992, 8(4):811-9.

Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA, Iannaccone A. Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *Journal of Neuroscience* 2000, 20(19):7149-57.

Ji Q, Zhang L, Lv R, Jia H, Xu J. Pentoxifylline decreases up-regulated nuclear factor kappa B activation and cytokine production in the rat retina following transient ischemia. *Ophthalmologica* 2006, 220:217-24.

Jonas J.B., Tao Y., Neumaier M., Findeisen P. Monocyte chemoattractant protein 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 in exudative age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology* 2010, 128:1281-86.

Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, Cha CI. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1-receptor) in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 2004, 476(4):388-413.

Joussen AM, Smyth N, Niessen C. Pathophysiology of diabetic macular edema. Review. *Developments in Ophthalmology* 2007, 39:1-12.

Józsa R, Hollósy T, Németh J, Tamás A, Lubics A, Jakab B, Oláh A, Arimura A, Reglódi D. Presence of PACAP and VIP in embryonic chicken brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1070:348-53.

Juel HB, Faber C, Udsen MS, Folkersen L, Nissen MH. Chemokine expression in retinal pigment epithelial ARPE-19 cells in response to coculture with activated T cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2012, 53 (13):8472-80.

Juhász T, Helgadottir SL, Tamás A, Reglódi D, Zákány R. PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides* 2015, 66:51-7.

Kántor O, Molnár J, Arimura A, Köves K. PACAP38 and PACAP27 administered intracerebroventricularly have an opposite effect on LH secretion. *Peptides* 2000, 21(6):817-20.

King GL, Suzuma K. Pigment-epithelium-derived factor-a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions. Review. *The New England Journal of Medicine* 2000, 342(5):349-51.

Kiss T, Pirger Z Multifunctional role of PACAP-like peptides in molluscs. *Protein & Peptide Letters* 2013, 20(6):628-35.

Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Hauser D, Horváth ZS, Rácz B, Gábrriel R, Babai N, Tóth G, Reglődi D. Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1070:365-70.

Kiss P, Atlasz T, Szabadfi K, Horváth G, Griecs M, Farkas J, Matkovits A, Tóth G, Lubics A, Tamás A, Gábrriel R, Reglődi D. Comparison between PACAP- and enriched environment-induced retinal protection in MSG-treated newborn rats. *Neuroscience Letters* 2011, 487(3):400-5.

Kitaoka T, Bost LM, Ishigooka H, Aotaki-Keen AE, Hjelmeland LM. Increasing cell density down-regulates the expression of acidic FGF by human RPE cells in vitro. *Current Eye Research* 1993, 12(11):993-9.

Kitaoka T, Aotaki-Keen AE, Hjelmeland LM. Distribution of FGF-5 in the rhesus macaque retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1994, 35(8):3189-98.

Ko JA, Hirata J, Yamane K, Sonoda KH, Kiuchi Y. Up-regulation of semaphorin 4A expression in human retinal pigment epithelial cells by PACAP released from cocultured neural cells. *Cell Biochemistry and Function* 2015, 33(1):29-36.

Koppán M, Várnagy A, Reglődi D, Brubel R, Németh J, Tamás A, Márk L, Bódis J. Correlation between oocyte number and follicular fluid concentration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in women after superovulation treatment. *Journal of Molecular Neuroscience* 2012, 48:617–22

Köves K, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Miller J. Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 1990, 127(1):264-71.

Köves K, Arimura A, Görös TG, Somogyvári-Vigh A. Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 1991, 54(2):159-69.

Köves K, Kántor O, Scammell JG, Arimura A. PACAP colocalizes with luteinizing and follicle-stimulating hormone immunoreactivities in the anterior lobe of the pituitary gland. *Peptides* 1998, 19(6):1069-72.

Köves K, Kántor O, Molnár J, Heinzlmann A, Szabó E, Szabó F, Nemeskéri A, Horváth J, Arimura A. The role of PACAP in gonadotropic hormone secretion at hypothalamic and pituitary levels. *Journal of Molecular Neuroscience* 2003, 20(2):141-52.

Kvanta A. Expression and secretion of transforming growth factor-beta in transformed and nontransformed retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Research* 1994, 26(6):361-7.

Laburthe M, Couvineau A, Tan V. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. Review. *Peptides* 2007, 28(9):1631-9.

Lakk M, Dénes V, Gábel R. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors signal via phospholipase c pathway to block apoptosis in newborn rat retina. *Neurochemistry Research* 2015, 40(7):1402-9.

Lang B, Zhao L, Cai L, McKie L, Forrester JV, McCaig CD, Jackson IJ, Shen S. GABAergic amacrine cells and visual function are reduced in PAC1 transgenic mice. *Neuropharmacology* 2010, 58(1):215-25.

Lee H, Suk K. Selective modulation of microglial signal transduction by PACAP. *Neuroreport* 2004, 15(9):1469-74.

Lee J, Park HJ, Choi HS, Kwon HB, Arimura A, Lee BJ, Choi WS, Chun SY. Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of PACAP as a follicle survival factor. *Endocrinology* 1999, 140:818-26.

Le Noble FA, Hekking JW, Van Straaten HW, Slaaf DW, Struyker Boudier HA. Angiotensin II stimulates angiogenesis in the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. *European Journal of Pharmacology* 1991, 195(2):305-6.

Le SV, Yamaguchi DJ, McArdle CA, Tachiki K, Pisegna JR, Germano P. PAC1 and PACAP expression, signaling, and effect on the growth of HCT8, human colonic tumor cells. *Regulatory Peptides* 2002, 109(1-3):115-25.

Li M, Funahashi H, Mbikay M, Shioda S, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-mediated intracrine signaling in the testicular germ cells. *Endocrinology* 2004, 23(1):59-75.

Lightman S, Towler HM. Diabetic retinopathy. Review. *Clinical Cornerstone* 2003, 5(2):12-21.

Liu N, Zhang Y, Xiong JY, Liu S, Zhu J, Lv S. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects adrenal function in septic rats administered etomidate. *Neuropeptides* 2016, in press.

Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1996, 37(5):855-68.

Love JA, Szbeni K. Histochemistry and electrophysiology of cultured adult rabbit pancreatic neurons. *Pancreas* 1999, 18(1):65-74.

Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucala R, Adamis AP. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *Journal of Clinical Investigation* 1998, 101(6):1219-24.

Luts L, Sundler F. Peptide-containing nerve fibers in the parathyroid glands of different species. *Regulatory Peptides* 1994, 50(2):147-58.

Ma F, Segundo PM, Barceló V, Morancho A, Gabriel-Salazar M, Giralt D, Montaner J, Rosell A. Matrix metalloproteinase-13 participates in neuroprotection and neurorepair after cerebral ischemia in mice. *Neurobiology of Disease* 2016, 91:236-46

Mao YK, Wang YF, Moogk C, Fox-Threlkeld JE, Xiao Q, McDonald TJ, Daniel EE. Locations and molecular forms of PACAP and sites and characteristics of PACAP receptors in canine ileum. *American Journal of Physiology* 1998, 27:217-25.

Martin DM, Yee D, Feldman EL. Gene expression of the insulin-like growth factors and their receptors in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Molecular Brain Research* 1992, 12(1-3):181-6

Marzagalli R, Scuderi S, Drago F, Waschek JA, Castorina A. Emerging role of PACAP as a new potential therapeutic target in major diabetes complications. *International Journal of Endocrinology* 2015, 2015:1609-28.

Masuo Y, Suzuki N, Matsumoto H, Tokito F, Matsumoto Y, Tsuda M, Fujino M. Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Research* 1993, 602(1):57-63.

Masuo Y, Noguchi J, Morita S, Matsumoto Y. Effects of intracerebroventricular administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on the motor activity and reserpine-induced hypothermia in murines. *Brain Research* 1995, 700(1-2):219-26.

Mathalone N, Lahat N, Rahat MA, Bahar-Shany K, Oron Y, Geyer O. The involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9 in rat retinal ischemia *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2007, 245:725– 32.

Matsuda K, Takei Y, Katoh J, Shioda S, Arimura A, Uchiyama M. Isolation and structural characterization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like peptide from the brain of a teleost, stargazer, *Uranoscopus japonicus*. *Peptides* 1997, 18(5):723-7.

Matsumoto M, Yoshimura N, Honda Y. Increased production of transforming growth factor-beta 2 from cultured human retinal pigment epithelial cells by photocoagulation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1994, 35(13):4245-52.

May V, Lutz E, MacKenzie C, Schutz KC, Dozark K, Braas KM. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PAC1HOP1 receptor activation coordinates multiple neurotrophic signaling pathways: Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase gamma and vesicle endocytosis for neuronal survival. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285:9749–61.

Mester L, Szabó A, Atlasz T, Szabadfi K, Reglődi D, Kiss P, Rác B, Tamás A, Gallyas F Jr, Sümegi B, Hocsák E, Gábrriel R, Kovács K. Protection against chronic hypoperfusion-induced retinal neurodegeneration by PARP inhibition via activation of PI-3-kinase Akt

pathway and suppression of JNK and p38 MAP kinases. *Neurotoxicity Research* 2009, 16(1):68-76.

Mester L, Kovács K, Rácz B, Solti I, Atlasz T, Szabadfi K, Tamás A, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is protective against oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells. *Journal of Molecular Neuroscience* 2011, 43(1):35-43.

Mikkelsen JD, Hannibal J, Larsen PJ, Fahrenkrug J. Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) mRNA in the rat neocortex. *Neuroscience Letters* 1994, 171(1-2):121-4.

Ming M, Li X, Fan X, Yang D, Li L, Chen S, Gu Q, Le W Retinal pigment epithelial cells secrete neurotrophic factors and synthesize dopamine: possible contribution to therapeutic effects of RPE cell transplantation in Parkinson's disease. *Journal of Translational Medicine* 2009, 28;7:53.

Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989, 164(1):567-74.

Moller K, Zhang YZ, Håkanson R, Luts A, Sjölund B, Uddman R, Sundler F. Pituitaryadenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience* 1993, 57:725-32.

Molnár L, Pollák E, Boros A, Reglődi D, Tamás A, Lengvári I, Arimura A, Lubics A. Comparative anatomy of PACAP-immunoreactive structures in the ventral nerve cord ganglia of lumbricid oligochaetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1070:427-30.

Montero M, Yon L, Rousseau K, Arimura A, Fournier A, Dufour S, Vaudry H. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the central nervous system of the European eel *Anguilla anguilla*: stimulatory effect of PACAP on GH secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998, 865:475-7

Moody TW, Leyton J, Casibang M, Pisegna J, Jensen RT. PACAP-27 tyrosine phosphorylates mitogen activated protein kinase and increases VEGF mRNAs in human lung cancer cells. *Regulatory Peptides* 2002, 109(1-3):135-40.

Morrison RS, Kinoshita Y, Johnson MD, Ghatan S, Ho JT, Garden G. Neuronal survival and cell death signaling pathways. Review. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2002, 513:41-86.

Mulder H, Uddman R, Moller K, Zhang YZ, Ekblad E, Alumets J, Sundler F. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide expression in sensory neurons. *Neuroscience* 1994, 63(1):307-12.

Nagy AD, Csernus VJ. The role of PACAP in the control of circadian expression of clock genes in the chicken pineal gland. *Peptides* 2007, 28(9):1767-74.

Nielsen HS, Hannibal J, Fahrenkrug J. Embryonic expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in sensory and autonomic ganglia and in spinal cord of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 1998, 394(4):403-15.

Nijaguna MB, Patil V, Urbach S, Shwetha SD, Sravani K, Hegde AS, Chandramouli BA, Arivazhagan A, Marin P, Santosh V, Somasundaram K. Glioblastoma-derived macrophage colony-stimulating factor (MCSF) induces microglial release of insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP1) to promote angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 2015, 290(38):23401-15.

Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103(19):7488-93.

Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S. Role of PACAP in ischemic neural death. *Journal of Molecular Neuroscience* 2008, 36:16–25.

Ogata N, Wang L, Jo N, Tombran-Tink J, Takahashi K, Mrazek D, Matsumura M. Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Current Eye Research* 2001, 22(4):245-52.

Oka H, Jin L, Kulig E, Scheithauer BW, Lloyd RV. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibits transforming growth factor- β 1-induced apoptosis in a human pituitary adenoma cell line. *American Journal of Pathology* 1999, 155:1893-900.

Okada R, Yamamoto K, Ito Y, Mochida H, Tonon MC, Fournier A, Leprince J, Vaudry H, Kikuyama S. VIP and PACAP stimulate TSH release from the bull frog pituitary. *Peptides* 2007, 28(9):1784-9

Ola MS, Ahmed MM, Ahmad R, Abuhashish HM, Al-Rejaie SS, Alhomida AS. Neuroprotective effects of rutin in streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Journal of Molecular Neuroscience* 2015, 56(2):440-8.

Olianas MC, Ennas MG, Lampis G, Onali P. Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in Y-79 human retinoblastoma cells. *Journal of Neurochemistry* 1996, 67(3):1293-300.

Onali P, Olianas MC. PACAP is a potent and highly effective stimulator of adenylyl cyclase activity in the retinas of different mammalian species. *Brain Research* 1994, 241(1):132-4.

Onoue S, Endo K, Yajima T, Kashimoto K. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide regulates the basal production of nitric oxide in PC12 cells. *Life Sciences* 2002, 71(2):205-14.

Onoue S, Endo K, Yajima T, Kashimoto K. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide attenuate glutamate-induced nNOS activation and cytotoxicity. *Regulatory Peptides* 2002, 107(1-3):43-7.

Onoue S, Endo K, Ohshima K, Yajima T, Kashimoto K. The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* 2002, 23(8):1471-8.

Onoue S, Hanato J, Yamada S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide attenuates streptozotocin-induced apoptotic death of RIN-m5F cells through regulation of Bcl-2 family protein mRNA expression. *The FEBS Journal* 2008, 275(22):5542-51.

Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95(10):5672-7.

Padgett LC, Lui GM, Werb Z, LaVail MM. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: vectorial secretion and regulation. *Experimental Eye Research* 1997, 64(6):927-38.

Palkovits M, Somogyvári-Vigh A, Arimura A. Concentrations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human brain nuclei. *Brain Research* 1995, 699(1):116-20.

Peeters K, Berghman LR, Vandesande F. Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the chicken forebrain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998, 839:417-9.

Piggins HD, Stamp JA, Burns J, Rusak B, Semba K. Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) immunoreactivity in the hypothalamus and extended amygdala of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 1996, 376(2):278-94.

Pirone A, Baoan D, Piano I, Della Santina L, Baglini A, Lenzi C. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunoreactivity distribution in the small intestine of the adult New Hampshire chicken. *Acta Histochemica* 2011, 113(4):477-83.

Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1995, 36(5):774-86.

Rábl K, Reglődi D, Bánvölgyi T, Somogyvári-Vigh A, Lengvári I, Gábel R, Arimura A. PACAP inhibits anoxia-induced changes in physiological responses in horizontal cells in the turtle retina. *Regulatory Peptides* 2002, 109(1-3):71-4.

Rácz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tóth G, Hegyi O, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Röth E, Tamás A, Lengvári I, Lubics A, Reglődi D. The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involves inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regulatory Peptides* 2006a, 137:20–26.

Rácz B, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Gallyas Jr F, Röth E, Reglődi D. Involvement of ERK and CREB signaling pathways in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006b, 1070:507–11.

Rácz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Röth E, Tóth G, Hegyi O, Verzál Z, Fabricsek C, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating

polypeptide (PACAP) on the PKA-Bad-14-3-3 signaling pathway in glutamate-induced retinal injury in neonatal rats. *Neurotoxicity Research* 2007, 12(2):95-104.

Rácz B, Gasz B, Gallyas JrF, Kiss P, Tamás A, Szántó Z, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Röth E, Reglődi D. PKA-Bad-14-3-3 Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regulatory Peptides* 2008, 145:105–15.

Rawlings SR, Hezareh M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. Review. *Endocrine Reviews* 1996, 17(1):4-29.

Reglődi D, Somogyvári-Vígh A, Vígh S, Kozicz T, Arimura A. Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 2000, 31:1411-17.

Reglődi D, Lubics A, Tamás A, Szalontay L, Lengvári I. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research* 2004, 151:303-12.

Reglődi D. A PACAP neuroprotektív és általános citoprotektív hatásainak vizsgálata in vitro és in vivo modellekben. *Doktori Értekezés* 2009

Reglődi D, Kiss P, Lubics A, Tamás A. Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. Review. *Current Pharmaceutical Design* 2011, 17(10):962-72.

Reglődi D, Tamás A, Koppán M, Szógyi D, Welke L. Role of PACAP in Female Fertility and Reproduction at Gonadal Level - Recent Advances. *Frontiers in Endocrinology* 2012, 3:155.

Reglődi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gábiel R, Horváth G, Szakály P, Sándor B, Lubics A, László E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamás A. PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *Journal of Molecular Neuroscience* 2012, 48(3):482-92.

Reichenstein M, Rehavi M, Pinhasov A. Involvement of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the mechanism of antidepressant action. *Journal of Molecular Neuroscience* 2008, 36(1-3):330-8.

Ribatti D, Nico B, Floris C, Mangieri D, Piras F, Ennas MG, Vacca A, Sirigu P. Microvascular density, vascular endothelial growth factor immunoreactivity in tumor cells, vessel diameter and intussusceptive microvascular growth in primary melanoma. *Oncology Reports* 2005, 14(1):81-4.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Review. *Nature* 1997, 386(6626):671-4.

Saucan L, Palade GE. Differential colchicine effects on the transport of membrane and secretory proteins in rat hepatocytes in vivo: bipolar secretion of albumin. *Hepatology* 1992, 15(4):714-21.

Ruiz A, Brett P, Bok D. TIMP-3 is expressed in the human retinal pigment epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996, 226(2):467-74.

Sághy É, Payrits M, Helyes Z, Reglődi D, Bánki E, Tóth G, Couvineau A, Szőke É. Stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 6-38, M65 and vasoactive intestinal polypeptide 6-28 on trigeminal sensory neurons. *Neuroscience* 2015, 308:144-56.

Sanchez A, Tripathy D, Grammas P. RANTES release contributes to the protective action of PACAP38 against sodium nitroprusside in cortical neurons. *Neuropeptides* 2009, 43:315–20.

Scuderi S, D'Amico AG, Castorina A, Imbesi R, Carnazza ML, D'Agata V. Ameliorative effect of PACAP and VIP against increased permeability in a model of outer blood retinal barrier dysfunction. *Peptides* 2013, 39:119-24.

Scuderi S, D'amico AG, Federico C, Saccone S, Magro G, Bucolo C, Drago F, D'Agata V. Different Retinal Expression Patterns of IL-1 α , IL-1 β , and Their Receptors in a Rat Model of Type 1 STZ-Induced Diabetes. *Journal of Molecular Neuroscience* 2015, 56(2):431-9.

Seaborn T, Masmoudi-Kouli O, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis. Review. *Current Pharmaceutical Design* 2011, 17(3):204-14.

Seegers HC, Hood VC, Kidd BL, Cruwys SC, Walsh DA. Enhancement of angiogenesis by endogenous substance P release and neurokinin-1 receptors during neurogenic inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003, 306(1):8-12.

Segre GV, Goldring SR. Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagonlike peptide 1, growth hormone-releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 1993, 4(10):309-14.

Seki T, Shioda S, Izumi S, Arimura A, Koide R. Electron microscopic observation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) - containing neurons in the rat retina. *Peptides* 2000, 21(1):109-13.

Seki T, Nakatani M, Taki C, Shinohara Y, Ozawa M, Nishimura S, Ito H, Shioda S. Neuroprotective effect of PACAP against kainic acid-induced neurotoxicity in rat retina. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1070:531-4.

Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Shioda S. Suppression of ganglion cell death by PACAP following optic nerve transection in the rat. *Journal of Molecular Neuroscience* 2008, 36(1-3):57-60.

Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Endo K, Wada Y, Nakamura K, Shioda S. Suppression of rat retinal ganglion cell death by PACAP following transient ischemia induced by high intraocular pressure. *Journal of Molecular Neuroscience* 2011, 43(1):30-4.

Sheng J, Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2015, 48(5):399-410.

Shioda S, Nakamachi T. PACAP as a neuroprotective factor in ischemic neuronal injuries. *Peptides* 2015, 72:202-7.

Shioda S, Legradi G, Leung WC, Nakajo S, Nakaya K, Arimura A. Localization of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid in the rat testis by light and electron microscopic immunocytochemistry and in situ hybridization. *Endocrinology* 1994, 135(3):818-25.

Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, Ishihara K, Tamura Y, Shiomi H, Sasa M. Protective effects of vasoactive intestinal peptide against delayed glutamate neurotoxicity in cultured retina. *Brain Research* 1998, 809(1):127-36.

Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, Ishihara K, Tamura Y, Shiomi H, Sasa M. Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Research* 1999, 839(1):66-73.

Silveira MS, Costa MR, Bozza M, Linden R. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(18):16075-80.

Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reviews* 2006, 2(1):71-98.

Slomiany MG, Rosenzweig SA. Autocrine effects of IGF-I-induced VEGF and IGFBP-3 secretion in retinal pigment epithelial cell line ARPE-19. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2004, 287(3):746-53.

Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. Review. *Current Pharmaceutical Design* 2004, 10(23):2861-89.

Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, Ribatti D, Nussdorfer GG. Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *International Journal of Molecular Medicine* 2006, 18(6):1107-12.

Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, 90(4):1526-30.

Steinberg RH. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. Review. *Documenta Ophthalmologica* 1985, 60(4):327-46.

Sternfeld MD, Robertson JE, Shipley GD, Tsai J, Rosenbaum JT. Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor. *Current Eye Research* 1989, 8(10):1029-37.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Review. *Annual Review of Biochemistry* 2000, 69:217-45.

Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. Review. *Physiological Reviews* 2005, 85(3):845-81.

Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Ng TF, Zamiri P. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Research* 2002, 42(4):487-95.

Szabadfi K, Atlasz T, Horváth G, Kiss P, Hamza L, Farkas J, Tamás A, Lubics A, Gábrriel R, Reglődi D. Early postnatal enriched environment decreases retinal degeneration induced by monosodium glutamate treatment in rats. *Brain Research* 2009, 1259:107-12.

Szabadfi K, Mester L, Reglődi D, Kiss P, Babai N, Rácz B, Kovács K, Szabó A, Tamás A, Gábrriel R, Atlasz T. Novel neuroprotective strategies in ischemic retinal lesions. *International Journal of Molecular Sciences* 2010, 11(2):544-61.

Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Dányádi B, Tamás A, Helyes Z, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Tóth G, Gábrriel R, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotoxicity Research* 2012a, 21(1):41-8.

Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglődi D, Szabó A, Kovács K, Szalontai B, Setaló G Jr, Bánki E, Csanaky K, Tamás A, Gábrriel R. Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell Tissue Research* 2012b, 348(1):37-46.

Szabadfi K, Dányádi B, Kiss P, Manavalan S, Gábrriel R, Reglődi D, Tamás A, Trasy D, Bártai I. Preconditioning with volatile anaesthetic sevoflurane in ischemic retinal lesion in rats. *Journal of Molecular Histology* 2012c, 43(5):565-9.

Szabadfi K, Dányádi B, Kiss P, Tamás A, Fábrián E, Gábrriel R, Reglődi D. Protective effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) in ischemic retinal degeneration. *Journal of Molecular Neuroscience* 2012d, 48(3):501-7.

Szabadfi K, Szabó A, Kiss P, Reglődi D, Setaló G Jr, Kovács K, Tamás A, Tóth G, Gábrriel R. PACAP promotes neuron survival in early experimental diabetic retinopathy. *Neurochemistry International* 2014a, 64:84-91.

Szabadfi K, Kiss P, Reglődi D, Fekete EM, Tamás A, Dányádi B, Atlasz T, Gábrriel R. Urocortin 2 treatment is protective in excitotoxic retinal degeneration. *Acta Physiologica Hungarica* 2014b, 101(1):67-76.

Szabadfi K, Reglődi D, Szabó A, Szalontai B, Valasek A, Sétaló G Jr, Kiss P, Tamás A, Wilhelm M, Gábrriel R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, a potential therapeutic agent for diabetic retinopathy in rats: focus on the vertical information processing pathway. *Neurotoxicity Research* 2016, 29(3):432-46.

Szabó A, Dányádi B, Bognár E, Szabadfi K, Fábrián E, Kiss P, Mester L, Manavalan S, Atlasz T, Gábrriel R, Tóth G, Tamás A, Reglődi D, Kovács K. Effect of PACAP on MAP

kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neuroscience Letters* 2012, 523(2):93-8.

Szakály P, László E, Kovács K, Rácz B, Horváth G, Ferencz A, Lubics A, Kiss P, Tamás A, Brubel R, Opper B, Baba A, Hashimoto H, Farkas J, Matkovits A, Magyarlaci T, Helyes Z, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides* 2011, 45:113–21.

Szántó Z, Sárszegi Z, Reglődi D, Németh J, Szabadfi K, Kiss P, Varga A, Bánki E, Csanaky K, Gaszner B, Pintér O, Szalai Z, Tamás A. PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *Journal of Molecular Neuroscience* 2012, 48(3):667-73.

Takadera T, Fujibayashi M, Koriyama Y, Kato S. Apoptosis induced by SRC-family tyrosine kinase inhibitors in cultured rat cortical cells. *Neurotoxicity Research* 2012, 21(3):309-16

Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Satoh F, Sone M, Ohneda M, Sasano H, Mouri T. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactivity in human hypothalamus: co-localization with arginine vasopressin. *Regulatory Peptides* 1994, 50(3):267-75.

Takei N, Skoglösa Y, Lindholm D. Neurotrophic and neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on mesencephalic dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience Research* 1998, 54(5):698-706.

Tamás A, Gábel R, Rácz B, Dénes V, Kiss P, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neuroscience Letters* 2004, 372(1-2):110-3.

Tanaka J, Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Yanaihara N, Kato Y. Neuronal protection from apoptosis by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Regulatory Peptides* 1997, 72(1):1-8.

Tanihara H, Yoshida M, Matsumoto M, Yoshimura N. Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1993, 34(2):413-9.

Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *The Journal of Cell Biology* 1990, 111(2):765-72.

Teuchner B, Dimmer A, Humpel C, Amberger A, Fischer-Colbrie R, Nemeth J, Waschek JA, Kieselbach G, Kralinger M, Schmid E, Bechrakis N, Troger J. VIP, PACAP-38, BDNF and ADNP in NMDA-induced excitotoxicity in the rat retina. *Acta Ophthalmologica* 2011, 89(7):670-5.

Tibaldi E, Brunati AM, Zonta F, Frezzato F, Gattazzo C, Zambello R, Gringeri E, Semenzato G, Pagano MA, Trentin L. Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2011, 25(11):1768-81.

Tong L, Vernon SA, Kiel W, Sung V, Orr GM. Association of macular involvement with proliferative retinopathy in Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine* 2001, 18(5):388-94.

Turner CE, Glenney JR Jr, Burrige K. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *The Journal of Cell Biology* 1990, 111(3):1059-68.

Usdin TB, Bonner TI, Mezey E. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 1994, 135(6):2662-80

Varga B, Szabadfi K, Kiss P, Fábrián E, Tamás A, Griecs M, Gábríel R, Reglódi D, Kemény-Beke Á, Pámer Z, Bíiro Z, Tosaki A, Atlasz T, Juhász B. PACAP improves functional outcome in excitotoxic retinal lesion: an electroretinographic study. *Journal of Molecular Neuroscience* 2011, 43(1):44-50.

Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. Review. *Pharmacological Reviews* 2000, 52(2):269-324.

Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ. PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *European Journal of Neuroscience* 2002, 15:1451–60.

Vaudry D, Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, 99(9):6398-403.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience Research* 2003, 72: 303–16.

Veltmann M, Hollborn M, Reichenbach A, Wiedemann P, Kohen L, Bringmann A. Osmotic induction of angiogenic growth factor expression in human retinal pigment epithelial cells. *PLoS One* 2016, 11(1):e0147312.

Vereczki V, Köves K, Csáki A, Grósz K, Hoffman GE, Fiskum G. Distribution of hypothalamic, hippocampal and other limbic peptidergic neuronal cell bodies giving rise to retinopetal fibers: anterograde and retrograde tracing and neuropeptide immunohistochemical studies. *Neuroscience* 2006, 140(3):1089-100

Vincze E, Köves K. Structure, localization and physiologic role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). Review. *Orvosi Hetilap* 2001, 142(10):491-6.

Vincze E, Kántor O, Kiss A, Gonda G, Gombás P, Kiss J, Juhász M, Arimura A, Köves K. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is present in human and cat gastric glands. *Peptides* 1999, 20(8):937-41.

Wada Y, Nakamachi T, Endo K, Seki T, Ohtaki H, Tsuchikawa D, Hori M, Tsuchida M, Yoshikawa A, Matkovits A, Kagami N, Imai N, Fujisaka S, Usui I, Tobe K, Koide R,

Takahashi H, Shioda S. PACAP attenuates NMDA-induced retinal damage in association with modulation of the microglia/macrophage status into an acquired deactivation subtype. *Journal of Molecular Neuroscience* 2013, 51(2):493-502.

Walsh N, Valter K, Stone J. Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. *Experimental Eye Research* 2001, 72(5):495-501.

Wang ZY, Alm P, Håkanson R. Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rabbit eye. *Neuroscience* 1995, 69(1):297-308.

Wenkel H, Streilein JW. Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2000, 41(11):3467-73.

Werling D, Reglődi D, Kiss P, Tóth G, Szabadfi K, Tamás A, Bíró Z, Atlasz T. Investigation of PACAP fragments and related peptides in chronic retinal hypoperfusion. *Journal of Ophthalmology* 2014, 2014:563812.

Werling D, Kvárik T, Varga R, Nagy N, Mayer F, Váczy A, et al. Investigating the retinoprotective effects of PACAP eye-drop in ischemic retinopathy. Presented at 12th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides 2015, Cappadocia, Turkey

Werner H, Koch Y, Fridkin M, Fahrenkrug J, Gozes I. High levels of vasoactive intestinal peptide in human milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1985, 133:228–32

Wilhelm I, Fazakas C, Tamás A, Tóth G, Reglődi D, Krizbai IA. PACAP enhances barrier properties of cerebral microvessels. *Journal of Molecular* 2014, 54(3):469-76.

Winzell MS, Ahrén B. Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides* 2007, 28(9):1805-13.

Wirostko B, Wong TY, Simó R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Progress in Retinal and Eye Research* 2008, 27(6):608-21.

Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 2003, 22(1):1-29.

Wojcieszak J, Zawilska JB. PACAP38 and PACAP6-38 exert cytotoxic activity against human retinoblastoma Y79 cells. *Journal of Molecular Neuroscience* 2014, 54(3):463-8.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 1997, 139(5):1281-92.

Yang S, Chen J, Guo Z, Xu XM, Wang L, Pei XF, Yang J, Underhill CB, Zhang L. Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors. *Molecular Cancer Therapeutics* 2003, 2(1):65-72.

Yoneda S, Tanihara H, Kido N, Honda Y, Goto W, Hara H, Miyawaki N. Interleukin-1beta mediates ischemic injury in the rat retina. *Experimental Eye Research* 2001, 73:661–7.

Yoshida, Yoshida S, Hata Y, Khalil AK, Ishibashi T, Inomata H. The role of NF-kappaB in retinal neovascularization in the rat. Possible involvement of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC), a member of the interleukin-8 family. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1998, 46:29–36.

Zheng XR, Zhang SS, Yin F, Tang JL, Yang YJ, Wang X, Zhong L. Neuroprotection of VEGF-expression neural stem cells in neonatal cerebral palsy rats. *Behavioural Brain Research* 2012, 230:108–15.

Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Fábián E, Reglődi D, Mester L, Szabó A, Szabadfi K, Tamás A, Tóth G, Kovács K. Effects of PACAP on intracellular signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *Journal of Molecular Neuroscience* 2012, 48:(3) 493-500. (IF: 2,891)

Szabó A, Dányádi B, Bognár E, Szabadfi K, **Fábián E**, Kiss P, Mester L, Manavalan S, Atlasz T, Gábrriel R, Tóth G, Tamás A, Reglődi D, Kovács K. Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neuroscience Letters* 2012, 523:(2) 93-98. (IF:2,026)

Atlasz T, Váczy A, Werling D, Kiss P, Tamás A, Kovács K, **Fábián E**, Kvárik T, Mammel B, Dányádi B, Lőkös E, Reglődi D. Neuroprotective effects of PACAP in the retina könyvejezet a Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide - PACAP című könyvben. New York: Springer Nature 2016 - nyomtatásban

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: **4,917**

Egyéb közlemények:

Varga B, Szabadfi K, Kiss P, **Fábián E**, Tamás A, Griecs M, Gabriel R, Reglődi D, Kemeny-Beke A, Pamer Z, Biro Z, Tosaki A, Atlasz T, Juhasz B. PACAP improves functional outcome in excitotoxic retinal lesion: an electroretinographic study. *Journal of Molecular Neuroscience* 2011, 43:(1) 44-50. (IF:2,504)

Szabadfi K, Dányádi B, Kiss P, Tamás A, **Fábián E**, Gábrriel R, Reglődi D. Protective effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) in ischemic retinal degeneration. *Journal of Molecular Neuroscience* 2012, 48:(3) 501-507. (IF:2,891)

Horváth G, Reglődi D, Brubel R, Halász M, Barakonyi A, Tamás A, **Fábián E**, Opper B, Tóth G, Cohen M, Szereday L. Investigation of the possible functions of PACAP in human trophoblast cells. *Journal of Molecular Neuroscience* 2014, 54:(3) 320-330. (IF:2,343)

A tudományos közlemények összesített impakt faktora: **12,655**

A PhD dolgozat alapjául szolgáló poszterek:

Fábián E, Mester L, Szabó A, Reglódi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gábrriel R, Tamás A, Kovács K. PACAP influences apoptotic and angiogenic pathways in human retinal pigment epithelial cells. 8th FENS Forum of Neuroscience 2012

Fábián E , Szereday L, Horváth G, Opper B, Reglódi D, Kovács K. PACAP protects the human retinal pigment epithelial cells against hyperglycaemic and hypoxic conditions. The 11th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides 2013

Fábián E, Kovács K , Horváth G, Szereday L, Tamás A, Reglódi D. PACAP Protects Human Retinal Pigment Epithelial Cells Against Oxidative Stress. VII. Neurotoxicity Society Meeting 2015

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondanék elsősorban családomnak, akik mindig büszkén támogattak és terelgettek a helyes úton.

A Ph. D. dolgozat elkészüléséért hálával tartozom témavezetőimnek, dr. Reglődi Dórának és dr. Kovács Krisztinának az anyagi és szellemi támogatásért. Dr. Horváth Gabriellának és dr. Opper Balázsnak, akiktől mindig tudtam tanácsot kérni a hogyan tovább-hoz, és akiktől a módszerek alapjait elsajátítottam. Mercz Tündének, akire mindig lehetett számítani a laborban, tudásával és tapasztalatával nélkülözhetetlen volt a munkám során. Dr. Szereday Lászlónak, akitől az áramlási citometria alapjait tanultam. Dr. Werling Dórának és dr. Atlasz Tamásnak a szövettani minták elkészítéséért. Végül köszönetet mondanék az Anatómia Intézet minden dolgozójának a segítségükért, biztatásukért.