

A PACAP szerepének vizsgálata retina pigmenthám sejtekben

Doktori (Ph. D.) értekezés tézisei

Fábián Eszter



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Anatómia Intézet

Pécs, 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

I. Bevezetés

1. A retina és a retinális pigmenthám

A retina a szem legbelső burka, annak fényérzékeny rétege. A szem optikai rendszere által idenfókuszált fény különböző elektromos és kémia reakciókat indít be, melynek segítségével a fény, mint elektromos impulzus, a nyakszirtleányben található látóközpontba kerül. A retinán belül tíz réteget különböztetünk meg egymástól. A retinális pigmenthám (RPE) a neuroretina és a choroidea között található egyrétegű hám, a recehártya legkülső rétege. 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. Az egymással szomszédos RPE és endothel sejtek közötti tight junction-ök elengedhetetlenek a vér-retina gáton átjutó folyadékok 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.

A pigmenthám sejtek különféle növekedési faktorokat, valamint a retina és a lamina choriocapillaris szerkezeti egységének megtartásához nélkülözhetetlen egyéb fehérjéket szekretálnak. Tehát az RPE sejtek a fotoreceptorok túlélését szolgáló molekulákat termelnek, valamint biztosítják a retina megfelelő vérellátását a choroidea felől. A pigmenthám által termelt igen fontos faktor a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor, a VEGF. Az egészséges szemben alacsony koncentrációban termelődik, feladata az endothel sejtek apoptózisának gátlása és ezzel fontos szerepet tölt be a choriocapillaris endothelium integritásának megőrzésében. A VEGF az endothel sejtek fenestráltságának stabilizálásával befolyásolja a sejtek permeabilitását. Az egészséges szemben a VEGF-et a bazális felszínre szekretálja a sejt és a choroidea endotheliumára hat elsősorban. A túlzott VEGF termelés a proliferatív diabéteszes retinopátia egyik legfőbb kiváltója. A fejlődő országokban, dolgozó korú egyéneknél a diabéteszes retinopátia a vakság vezető oka. Az egyes 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 az utóbbi károsodás az oka legtöbbször. Mindezek mellett azt is kimutatták, hogy a kettes típusú diabéteszes betegeknél a PDR mellett

szinte mindig kialakul makulaödéma is. A betegségek patogenezisének legfontosabb komponensei a proliferatív diabéteszes retinopátiában a hipoxiát követő neovaszularizáció, míg makulaödéma esetén a vér-retina gát sérülése miatt bekövetkező folyadékbeáramlás. 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 és a sejtek által szekretált faktorok szabályozási útvonalainak megismerésére.

A makulaödéma patogenezise még kevésbé ismert, de a VEGF és más gyulladáscitokinek részt vesznek a kialakulásában. Ezért a VEGF szekréció gátlása hatékony módszer lehet a diabéteszes retinopátia és a makulaödéma kezelésében is.

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. 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 polipeptiddel (VIP), mely alapján a PACAP-ot a VIP/glükagon/szekretin szuperfamilia sorolták. 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. A peptidnek ezen rendkívüli konzerváltsága arra enged következtetni, hogy alapvető élettani folyamatokban lehet szerepe.

A PACAP előfordulása a szemben

A PACAP-szerű immunreaktivitást (PACAP-IR) a szemben radioimmunassay módszerrel mérték és a legnagyobb koncentrációkat a musculus sphincter pupillae-ban és a corpus ciliare-ban találták a retinán kívül. PACAP pozitív idegrostokat mutattak ki a retina stratum nervi optici-jában, a stratum ganglionare-ban és a stratum plexiforme internum-ban. Ezen kívül az amakrin és a horizontális sejtek perikaryonjai a stratum granulosum internumban, és a ganglionsejtek is jelölődtek immunhisztokémiás módszerekkel. 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. A ganglionsejtek bizonyos csoportjaiban, melyek a nucleus suprachiasmaticusba projiciálnak, a PACAP a glutamáttal együtt tárolódik és a cirkadián ritmus szabályozásában is szerepet játszik. A szemben PAC1 receptort és mRNS-ét a legnagyobb mennyiségben a retina ganglionsejtes rétegében és a belső magvas rétegben detektálták. A pigmentsejtes rétegben mindhárom PACAP receptor mRNS-ét ki tudták mutatni, míg egy másik tanulmányban a VPAC receptorok jelenlétét bizonyították patkány retinában.

A PACAP pigmenthámra kifejtett in vitro védő hatása

Az első eredményeket Zhang és munkatársai publikálták 2005-ben. Kezeletlen pigmenthám tenyészetben (ARPE-19 sejtvonal) 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 mikromoláros 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, dózisfüggően javult hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz hatására. 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 hatástalank voltak.

Egy kísérletben a közelmúltban azt találták, hogy a PACAP befolyásolja a pigmenthám sejtek semaphorin4A expresszióját. A semaphorin fehérjecsalád egyes tagjai befolyással vannak az agy és a retina fejlődésére. A semaphorin4A a fotoreceptor sejtek és pigmenthám sejtek közötti kapcsolatok kialakulásának idején a ganglionsejtek rétegében, a belső magvas rétegben és a pigmenthám sejtekben 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 (PACAP antagonist) 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.

Egy másik tanulmány a PACAP és a VIP retinasejtek közötti zonula occludens felszakadására kifejtett védő hatását vizsgálta. Ez a folyamat fontos szerepet játszik a diabéteszes retinopátia során kialakuló makulaödéma létrejöttében. Az ARPE-19 sejteket IL-1 β gyulladáscitokin jelenlétében normál és magas glükóz tartalmú médiumban tenyésztették. A sejtek permeabilitásának változásait transzepiteliális elektromos ellenállás és a fluoreszcenciaisotociánát (FITC) dextrán sejtben történő mozgásának mérésével becsülték meg. 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. Összefoglalva, mind a két peptid képes volt megakadályozni a magas glükóz és IL-1 β okozta károsodást az ARPE-19 sejtekben, ami arra a feltételezésre enged következtetni, hogy a diabéteszes retinopátia során kialakuló makulaödéma során fontos szerepet játszhatnak a külső vér-retina gát fenntartásában.

Ezek az eredmények összhangban vannak egy *in vitro* vér-agy gát modellnél megfigyeltekkel. 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 occludens fenntartásában.

II. Célkitűzések

1. A kétoldali arteria carotis communis lekötés (BCCAO) által indukált súlyos degenerációt és a PACAP hatására bekövetkező szignifikáns morfológiai javulást már több közlemény leírta. Kutatásaink során vizsgáltuk, hogy a pigmenthám sejtek 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 pigmenthám sejtekre (ARPE-19 sejtvonala) kifejtett hatásának jobb megismerését, a molekuláris biológia folyamatok feltérképezését oxidatív stressz, valamint hipoxiás és hiperozmotikus károsodás esetén.
3. Mivel több, retinát érintő patológiás folyamat hátterében a pigmenthám által termelt VEGF, és egyéb angiogénikus faktorok hatására bekövetkező neovaszkularizáció áll, vizsgáltuk a PACAP angiogenezisre kifejtett hatásait oxidatív stressz, hipoxiás és hiperozmotikus károsodás modellnél.

III. Anyagok és módszerek

1. In vivo kísérletek

1.1. Kísérleti állatok és szövettani elemzés

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 PACAP-ot (100 nmol/ 3 l sóoldat) injektáltunk intravitrealisan. 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 állatokként. Az állatok elhelyezését, gondozását és a kísérletek kivitelezését az etikai szabályoknak és az egyetemi protokollnak megfelelően végeztük (BA02/2000-15024/2011, Pécsi Tudományegyetem). Az állatok túlaltatását követően a szemeket eltávolítottuk és jéghideg PBS-ben kiperaráltuk a retinát, majd 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk. A szöveteket Durcupan ACM gyantába (Fluka, Svájc) ágyaztuk, 2 µm-es metszeteket készítettünk, majd toluidin kézzel (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 opticusról 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 mértük a következő paramétereket: 1. a retina vastagsága a belső és külső határhártya között, 2. az egyes retinarétegek vastagsága és 3. a pigmenthám sejtek száma 100 µm-en. Az értekezésben, részleteiben csak a harmadik paraméterre térünk 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 használható. 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 gyártó leírása alapján végeztük el. A sejteket proteáz inhibitor tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk mini homogenizátor segítségével egy Eppendorf csőben. Ezt követően jégen szonikáltuk a sejteket 2 percen keresztül, majd centrifugáltuk 5 percig 14 000-es fordulatszámon. A felülúszóból fehérjemérést végeztünk. A mintákat pufferoldatba vettük fel, és az elsődleges antitestek keverékéből 15 µl adtunk hozzájuk, majd egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Eközben a membránokat szintén 1 órán keresztül blokkoltuk. Ezután minden membránra 1,5 ml minta került és így inkubáltuk egy éjszakán át 2-8 fokon rázatógépen. Háromszori, egyenként 10 perces PBS-ses mosást követően tormaperoxidáz konjugált sztreptavidint tettünk a membránokra, majd megismételtük a 3*10 perces mosást. Ezután a membránokra 2 ml kemilumineszcens reagenst pipettáztunk, majd röntgenfilmre előhívtuk. Ezeknek a szkennelését követően ImageJ szoftver segítségével analizáltuk az adatokat.

2. In vitro kísérletek

A humán ARPE-19 (ATCC, Manassas, VA) sejtvonal egy 19 éves férfi donorból intakt szeméből származik, aki egy motorbalesetben szerzett koponyasérülés következtében hunyt el. 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 H_2O_2 alkalmazásával vizsgáltuk. Így a következő kísérleti csoportokat kaptuk:

1. Kontrol
2. 100 nM PACAP
3. 200 μM CoCl_2
4. 200 μM CoCl_2 + 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 H_2O_2
10. 250 μM H_2O_2 + 100 nM PACAP

Minden csoportból a mintákat 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 inkubáltuk termosztátban, 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 teszttel analizáltuk Bonferroni féle poszt teszttel.

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 0,25 mM hidrogén-peroxid és 100 nM PACAP kezelésnek vetettük alá 24 órán keresztül. A kezelések koncentrációit korábbi mérések alapján határoztuk meg. A PACAP erősen citoprotektívnek bizonyult nanomólos koncentrációban több kutatás eredménye alapján, és mi is ezt találtuk korábbi ARPE sejtes kísérleteink során. Az alkalmazott hidrogén-peroxid koncentráció is optimálisnak bizonyult, mivel szignifikáns, de javítható sejtkárosodást okozott. 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 kezeltük egy napon keresztül, majd sejthomogenizátumot készítettünk és a fent leírtaknak megfelelően végrehajtottuk az array protokollját.

2.4. Angiogenezis array

Az angiogenezis array során a felülúszóba szekretált angiogénikus faktorok mennyiségi változásait vizsgáltuk, különböző kezelések hatására. Az ARPE sejteket 24 órán át kezeltük 0,25 mM hidrogén-peroxiddal az oxidatív stressz okozta változások megfigyelésére. 200mM CoCl₂-ot alkalmaztunk a hipoxia modellezéséhez, valamint 200 mM szacharózt és 100 mM NaCl-ot a hiperozmotikus körülmények létrehozásához. A magas sókoncentráció megváltoztatja az ozmotikus viszonyokat, aminek hatására a szemben a vér-retina gát sérülhet, ezáltal többek között ödéma képződés és makuladegeneráció léphet fel. A humán angiogenezis array kit (R&D Systems; Biomedica Hungaria, Magyarország) során a felülúszót használtuk mintaként és szintén a citokin array-nél 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 mikrogöngyöket tartalmaz, amely az előkészítés során kötődik a megfelelő kötőhelyekre, majd ezt fikoeritrinnel konjugált másodlagos antitesthez kötve mérhetővé válik. A mintákból származó felülúszókból 50 µl-t összekevertünk szintén 50 µl VEGF konjugált mikrogönggyel, majd egy órán keresztül sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután még 50 µl fikoeritrin konjugált antitestet adtunk a mintáinkhoz és további 3 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten, sötétben. Ezt követően 1 ml mosópufferben centrifugáltuk a sejteket 1100-as fordulatszámon 5 percig, majd a felülúszót óvatosan leöntve 300 µl mosópufferben felvettük az üledéket. Közben standard sort készítettünk a kalibrációs görbe felvételéhez, ennek segítségével kvantifikáltuk a mérés során kapott eredményeket. Az adatokat két-utas ANOVA-val és Bonferroni poszt teszt segítségével analizáltuk.

2.6. Cell stress array

Az oxidatív stressz mellett a hipoxia hatásaira is kíváncsiak voltunk. 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 retina iszkémiás károsodása több betegség patomechanizmusában is szerepet játszik, például a diabéteszes retinopátia, az öregkori makuladegeneráció és a koraszülött retinopátia esetében. A CoCl_2 alkalmazásával ilyen iszkémiás modellt tudunk létrehozni és vizsgálni tudjuk a PACAP esetleges védő hatását. A humán cell stressz array-t (R&D Systems; Biomedica Hungaria, Magyarország) sejthomogenizátumból a citokin array-nél leírt módszerrel hajtottuk végre.

IV. Eredmények

1. In vivo kísérletek

1.1. A szövettani analízis eredményei

A kétoldali arteria carotis communis lekött állatok retináján 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. 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 pigmenthám sejtek számában, a vártak megfelelően (átlagban 5,6 db) nem következett be változás.

1.2 A citokin array eredményei

A kétoldali arteria carotis communis lekött 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 gyulladási protein) családba tartozó: CINC-1, CINC-2 α/β , CINC-3 és 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 adhéziós 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. 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.

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.

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%).

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.

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. 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-indukálta ligand), FADD (Fas-asszociált halál domén), Fas TNFR SF, HIF-1 α (hipoxia indukálta faktor), néhány hősök

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.

2.3. A foszfo-kináz array eredményei

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. 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 (riboszomális 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.

2.4. Az angiogenezis array eredményei

A hiperozmózis hatása

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

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 a 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.

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. Ezeknek, és több egyéb faktornak a felülúszóban mért, oxidatív stressz hatására megnövekedett szintje PACAP kezeléssel számottevő mértékben csökkent, sok esetben a kontroll szintekhez közeli értéket közelítette meg.

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. 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.

2.6. A cell stress array eredményei

Az oxidatív stressz hatása

A cell stress array-t kétféle modellen hajtottuk végre. Elsőként az oxidatív stressz okozta változásokra koncentráltunk. A hidrogén peroxid kezelés hatására néhány hőszokk fehérje, a citokróm-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.

A hipoxia hatása

A kobalt-klorid kezelés nem okozott nagy változásokat cell stress 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 hőszokk fehérje és a thioredoxin koncentrációja kis mértékben, de nem szignifikánsan változott. A PACAP tovább fokozta mindkét fehérje kobalt-klorid indukálta expressziónövekedését.

V. 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 gyulladásos útvonalakra kifejtett hatása. A kutatásaink során mi is azt találtuk, hogy iszkémiás retinakárosodáskor a PACAP közömbösítette 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 PACAP által a citokinek koncentrációjában előidézett változások arra engednek következtetni, hogy a retina iszkémiás károsodásában a PACAP gyulladásgátló szerepet tölthet be.

A CINC (CINC 1-3) család a gyulladásos kemokinek közé tartozik, számos gyulladásos folyamatban, általában az akut gyulladásos válaszreakcióban játszik szerepet. A jelen tanulmány az első, amely azt igazolja, hogy a PACAP képes mérsékelni a CINC kemokinek szintjét iszkémiát követően.

Összefoglalva, a PACAP csökkentette az IL-1 család tagjainak aktivációját, mely folyamat jótékony hatásának bizonyult retinát ért iszkémiás károsodást követően.

In vitro eredmények megbeszélése

A programozott sejthalál fiziológias körülmények között is lezajló folyamat. Az egyedfejlődés során bizonyos időszakokban nélkülözhetetlen a normális fejlődés eléréséhez, például az ujjak egymástól való elválása esetén. Az apoptózis molekuláris mechanizmusában több, egymástól független jelátviteli útvonal azonosítható, amelyek egy közös végrehajtó rendszer felé konvergálnak. A folyamat végrehajtó elemei a kaspázok, amelyek inaktív prekurzorként várják az aktiválódásukat jelentő szignált. Az apoptotikus kaspád aktivációjakor a mitokondriális membrán átjárhatóbbá válik és számos pro-apoptotikus faktor, mint a citokrom-c vagy a SMAC kiválasztódik 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 pigmenthám sejtjeire. Korábbi pigmenthám sejt kísérleteink során, oxidatív stressz okozta apoptotikus folyamatokban már fény derült a PACAP védő funkciójára, de mindeztidáig 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.

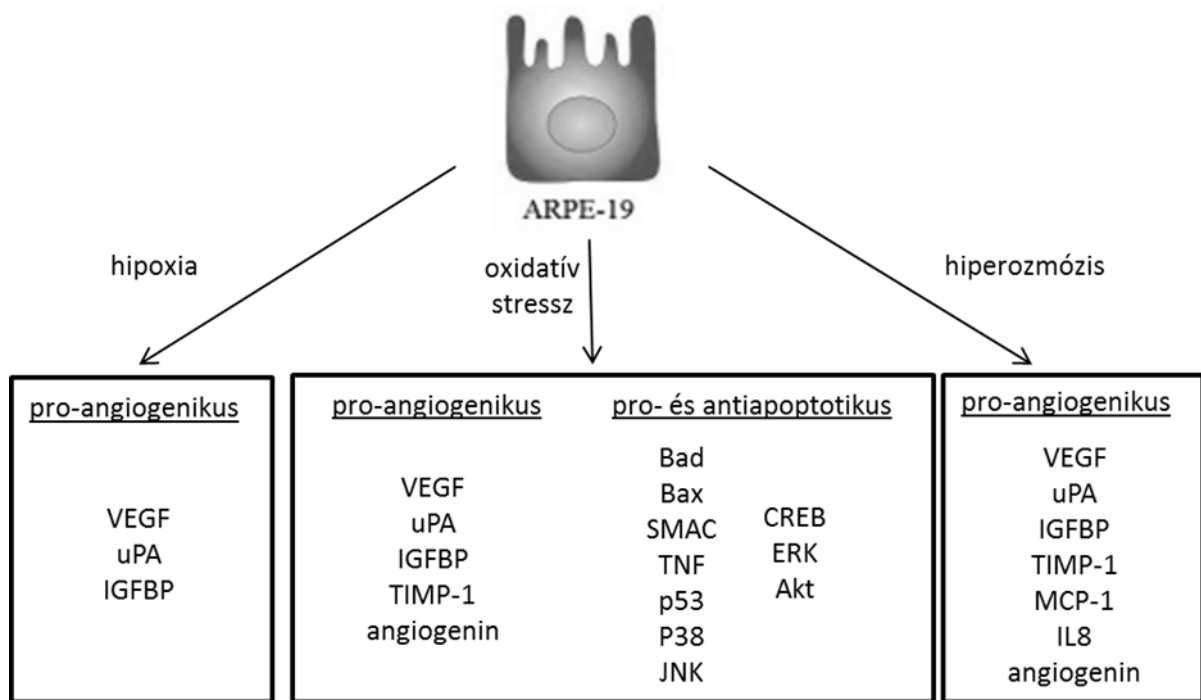
A neuronális apoptózis a nervus opticus átvágásával modellezhető felnőtt központi idegrendszerben. Seki és munkatársai arról számoltak be, hogy a nervus opticus átvágása a ganglionsejtek 55%-ának elhalásával jár. A műtét előtt intravitrealisan 10 és 100 pmol PACAP-pal kezelt állatok ganglionsejtjeinek száma a tizennegyedik posztoperatív napon a kontroll csoporthoz képest viszont szignifikánsan magasabb volt. Ezen eredmények egybevágóan az apoptózis array során találtakkal, miszerint a PACAP anti-apoptotikus hatást fejt ki a retinában. Az apoptózis array-nél 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 hőszokk 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. A MAPK család valószínűsíthetően fontos szerepet tölt be a PACAP indukálta sejtvédő folyamatokban, amit több különböző modellben igazoltak már. 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 sejt halált. A MAP kinázok szerepe az apoptotikus folyamatokban vitathatatlan a pigmenthám sejt esetében is. 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 sejttípusoknál is leírták. A jelen tanulmányban a PACAP egy korábbi, excitatórikus retinakárosodás modellnél, valamint egyéb PACAP mediált neuronális károsodásnál leírtakhoz hasonlóan szintén elősegítette az Akt foszforilációját. 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 p53 szintén igen fontos az apoptózis folyamatában. A p53 szabályozásában bekövetkező bármilyen zavar apoptózishoz vezet. 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. 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. Pillanatnyilag túl kevés információ áll rendelkezésre a PACAP és az előbb felsorolt faktorok között fennálló 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. 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. 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. Összességében elmondható, hogy a PACAP jelentős szerepet tölt be az apoptotikus folyamatok szabályozásában és a pigmenthám sejtek esetében a MAP kinázok szignalizációját befolyásolva fejt ki ezen hatását.



Az oxidatív stressz, a hipoxia 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 angiogenezis 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. Tüdőkarcinóma sejtekben a PACAP1-27 és a VIP fokozta a VEGF aktivációt. Egy másik tanulmányban a PACAP szintén fokozta a VEGF mRNA expresszióját prosztatacarcinóma sejteknél. Kísérleteink során mi ezzel ellentétes hatásokat találtunk. Hiperozmózis hatására mind NaCl, mind a szacharóz kezelés esetében erőteljes VEGF szint növekedést tapasztaltunk, melyet a PACAP hatásosan visszaszorított. A szacharóz kezelés eredményeit áramlási citometriás mérésekkel is megerősítettük. Egy nemrégiben közölt cikk nátrium-azid okozta retinális iszkémia során vizsgálta a PACAP hatását a metabolikus változásokra egy ex vivo egér modellen. 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. 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-angiogenikus faktorok szintjét.

A VEGF-en kívül több más angiogenezisben részt vevő faktor expressziója megnövekedett NaCl kezelés hatására. Az angiogeninről leírták, 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. 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 szintre PACAP kezelés hatására: angiopoietin, EG-VEGF, IL-8 és TIMP-1. A PACAP hatására történő angiogenin szintek csökkenését mi is tapasztaltuk az angiogenezis array mérések kiértékelésekor, NaCl 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. Méréseink során mi is azt találtuk, hogy 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 vérlémezke faktor-4 aktivációját is elősegítette, a PACAP a kontroll szintre csökkentette ezt. 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. 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 kötődése a VEGF receptorhoz különböző jelátviteli utakat aktivál, amely többek között angiogenezishez vezet. 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 pigmenthám sejtjeinél. Ennek tudatában elmondható, hogy a PACAP képes lehet számos olyan retinopátia kezelésére, melynek hátterében az angiogenikus folyamatok aktivációja áll.

A cell stress 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 diabetikus patkányoknál szignifikánsan fokozódott a hif-1 α és a hif-2 α expressziója, ami megelőzhető volt egy intravitrealis 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. 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 prosztaták prognózisát. 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 növelte az expresszióját, így védő hatást gyakorolt.

Mindezeket figyelembe véve kijelenthetjük, hogy a korábbi kutatásainkkal összhangban a PACAP a pigmenthám sejtek estében 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 angiogénikus faktor, a VEGF expresszióját. Ez önmagában igen fontos eredmény, mivel más sejtípusokon a PACAP ezzel ellentétes hatást fejt ki, így

elsőként közöltük a PACAP VEGF aktivációt gátló hatását pigmenthám sejtek 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.

A Ph.D. 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 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**, Tamas 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**

Köszönetnyilvánítás

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

A Ph. D. dolgozat elkészüléséért hálával tartozom témavezetőimnek, dr. Reglódi 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.