

A PACAP szemészeti hatásainak kísérletes vizsgálata

Ph.D. értekezés tézisei

dr. Gaál Valéria

Témavezetők: Dr. Reglódi Dóra egyetemi docens

Dr. Lubics Andrea egyetemi docens

Programvezető: Prof. Dr. Csernus Valér

Pécsi Tudományegyetem

Anatómiai Intézet

Pécs, 2011

Tartalomjegyzék

Fontosabb rövidítések jegyzéke	2
I. Bevezetés	3
I.1. PACAP	3
I.2. A PACAP receptorai és előfordulásuk	4
I.3. A PACAP élettani hatásai	4
I.4. A PACAP előfordulása és hatásai a szemben	5
I.5. A PACAP hatása a könnytermelésre	7
I.6. PACAP és a cornea	10
I.7. 1. PACAP a retinában	13
2. PACAP receptorok a retinában	14
3. A PACAP hatása a retinában	15
4. In vitro retinoprotekció	17
5. A PACAP in vivo retinoprotektív hatása	17
6. UV-A sugárzás okozta retina degeneráció	19
II. A PACAP könny fehérje összetételére kifejtett hatásának vizsgálata	21
II.1. Anyagok és módszerek	21
II.2. Eredmények	24
II.3. Megbeszélés	30
III. A PACAP hatásának vizsgálata a cornea regenerációjára	32
III.1. Anyagok és módszerek	32
III.2. Corneális sebgyógyulás, eredmények	33
III.3. Megbeszélés	38
IV. A PACAP védő szerepének vizsgálata UV-A sugárzás indukálta retina degenerációban	39
IV.1. Anyagok és módszerek	39
IV.2. Eredmények	41
IV.3. Megbeszélés	43
A PACAP retinoprotektív hatásának feltételezett mechanizmusa	44
V. Új eredmények összefoglalása	46
VI. Irodalomjegyzék	47
VII. Publikációk jegyzéke	58

Fontosabb rövidítések jegyzéke

AC: adenilát cikláz

cAMP: ciklikus adenzil monofoszfát

CREB: cAMP reszponzív elem-kötő fehérje

ERK ½: extracelluláris szignál regulálta kináz

GCL: ganglion cell layer (ganglionsejtek rétege)

IL: interleukin

ILM: inner limiting membrane (belső határmembrán)

INL: inner nuclear layer (belső magvas réteg)

ip.: intraperitoneális

IPL: inner plexiform layer (belső rostos réteg)

iv.: intravénás

MAPK: mitogén aktiválta protein kináz

mRNS: messenger RNS

NFL: nerve fiber layer (optikus rostok rétege)

OLM: outer limiting membrane (külső határmembrán)

ONL: outer nuclear layer (külső magvas réteg)

OPL: outer plexiform layer (külső rostos réteg)

PACAP: pituitary adenylate cyclase activating polypeptide

PAC1R: PACAP1 receptor

PE: pigment epithelium

PKA: protein kináz A

PKC: protein kináz C

PLC: foszfolipáz C

RT-PCR: reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció

VIP: vasoactive intestinal peptide

VPAC1R: VIP-PACAP receptor 1

VPAC2R: VIP-PACAP receptor 2

I. Bevezetés

I.1. PACAP (*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*)

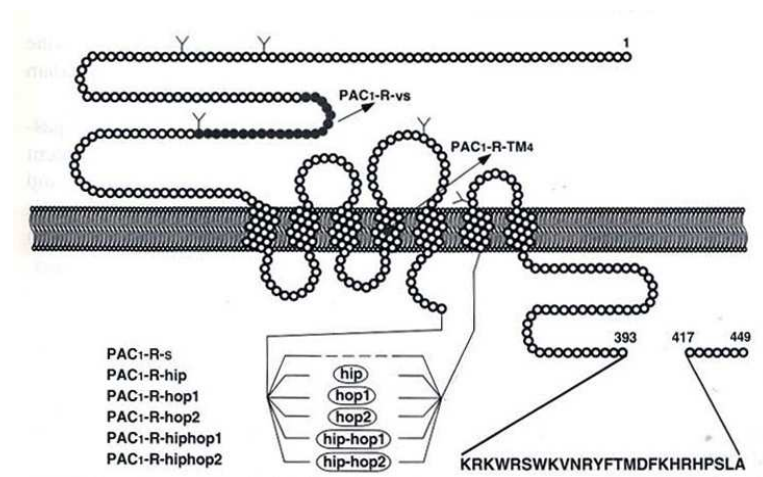
A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptidet 1989-ben izolálták birka hypothalamusból a hypophysisben kifejtett adenilát-cikláz aktiváló hatása alapján. A PACAP felfedezésének története a hormont izoláló munkacsoport közelmúltban elhunyt vezetője, Akira Arimura professzor által, illetve emlékére írt közleményekben olvasható (Arimura 2007; Shioda et al. 2008).

A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinális polipeptid (VIP) peptidcsalád tagja (Arimura 1998; Mustafa et Eiden 2006). A szervezetben két biológiailag aktív formában található meg: a korábban izolált, 38 aminosavból álló forma (PACAP38) és az 1 évvel később azonosított 27 aminosavból álló polipeptid (PACAP27). Az emlős szervezetben előforduló PACAP 90%-át a PACAP38 teszi ki. A PACAP szerkezete rendkívül konzervált: az eddig vizsgált emlősállatokban teljesen azonos, míg az alacsonyabbrendű gerinces állatokban mindössze 1-4 aminosav eltérés mutatkozik (Vaudry et al. 2009; Vincze és Köves 2001). Ez a megfigyelés azt bizonyítja, hogy a peptidnek alapvető élettani folyamatokban lehet szerepe.

A PACAP legnagyobb koncentrációban a központi és perifériás idegrendszerben található, de a legtöbb szervben előfordul. Kimutatható az endokrin mirigyekben, a gasztrointestinális rendszer teljes hosszában, a cardiovascularis, urogenitalis és respiratorikus rendszerben is. A központi idegrendszeren belül nagy mennyiségben van jelen a hypothalamusban, de a kéregállományban, a középgagyban, az agytörzsben, a thalamusban, a hypophysisben és a kisagyban is jelentős mennyiségű PACAP tartalmú sejt található. A perifériás idegrendszerben a spinális ganglionok egyes sejtjei, valamint a prae- és postganglionáris neuronok tartalmazzák PACAP-ot (Arimura 1998; Köves et al. 1990; Vaudry et al. 2009).

I.2. A PACAP receptorai és előfordulásuk

A PACAP G-protein receptorokon keresztül fejt ki hatását. Receptorainak két csoportja van: a PAC1 és a VPAC receptorok. A PAC1 receptor a PACAP-ra specifikus, a PACAP-pal rokon peptideket kisebb affinitással köti meg, a receptort kódoló gén a 7. kromoszómán található. A PAC1 receptornak jelenleg 8 splice variánsa ismert. A VPAC1 és VPAC2 receptorok a PACAP-ot és a VIP-t hasonló erősséggel kötik (Arimura 1998; Laburthe et al. 2007). A receptorok közül a PAC1 receptor elsősorban az agyban, a gerincvelőben, az adenohypophysisben, a mellékvesevelőben és a herékben található meg (I/1. ábra). A VPAC1 receptor a KIR mellett a májban, tüdőben, lépben, ováriumban, a thymusban és a gastrointestinális rendszerben mutatható ki (Hashimoto et al. 1996; Joo et al. 2004).



I/1. ábra: A PAC1 receptor 8 variánsának szerkezete (Arimura, 1998)

I.3. A PACAP élettani hatásai

A PACAP-ot a hypophysisben kifejtett adenilát cikláz aktiváló hatása alapján izolálták, azonban a felfedezése után már rövid idővel nyilvánvalóvá vált, hogy hatása ennél jóval sokrétűbb. Az idegrendszerben fontos szerepet tölt be a fejlődésben, a szinaptikus plaszticitásban, a neuronális excitabilitásban, befolyásol számos

magatartási jelet, valamint stimulálja a memóriefolyamatokat. A PACAP neuroprotektív hatását a peptid felfedezése óta számos kísérlet bizonyította. In vitro védi a neuronokat különféle toxikus hatással szemben, például glutamát, etanol, oxidatív stressz, ceramid, hypoxia. Neuroprotektív, sejt túlélést segítő hatását in vivo vizsgálatok is megerősítik (Bourgault et al. 2011; Reglödi et al. 2011). Traumás vagy ischaemiás agykárosodás, Parkinson kór és stroke állatmodelljeiben jelentős védő hatást mutat. Endokrin hatásai is ismertek: központi szerepe van a hypothalamikus releasing hormonok szabályozásában, a hypophysis-hormonok elválasztásában, a mellékvese és a gonádok hormontermelésében. Ezeken kívül a PACAP részt vesz a napi ritmus szabályozásában, a belső szervek simaizom kontrakciójának és mirigyelválasztásának irányításában, általános anti-inflammatorikus hatása van, befolyásolja a fájdalomingerek perifériás és centrális folyamatait és hatékony vasodilatátor (Arimura 1998; Sherwood et al. 2000; Vaudry et al. 2009; Vincze és Köves 2001).

I.4. A PACAP előfordulása és hatásai a szemben

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

A PACAP a szem számos szövetében kimutatható. A peptid és receptorainak előfordulását elsősorban a retinában vizsgálták. Megtalálható a retina több rétegében, a Müller-féle glia sejtekben is (Hannibal et Fahrenkrug 2004; Seki et al. 2000a). A PAC1 receptor legerősebben a ganglionsejtek rétegében és a belső magvas rétegben expresszálódik, míg a külső rostos és külső magvas rétegekben gyengébb expresszió mutatható ki (Seki et al. 2000a). A PACAP a glutamát mellett a retino-hypothalamikus pálya egyik fő transzmittere. Ez a pálya a ganglionsejtektől húzódik a suprachiasmaticus magba, és a fény diurnális ritmust befolyásoló hatásait közvetíti (Hannibal és Fahrenkrug 2004).

A PACAP nemcsak a retinában, hanem a szem egyéb szöveteiben is kimutatható, megtalálható az irisben, corpus ciliareban és a conjunctivában. Ismert a

simaizomkontrakcióra, vasodilatációra, gyulladásszerű folyamatokra és a cAMP szint szabályozására kifejtett hatása (Nilsson 1994; Nilsson et al. 1994; Yoshitomi et al. 2002; Wang et al. 1995). Jelen van a PACAP a trigeminális, sphenopalatinális és ciliáris ganglionokban is, melyeken keresztül befolyásolja a mirigyek szekrécióját.

Kísérleti célkitűzéseink 3 fő témakört érintenek.

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

Az alábbiakban e 3 témakör irodalmi áttekintését és háttérét vázolom, majd a kísérleti módszereket és eredményeket külön fejezetekben írom le, tekintettel a témakörök és azok kísérletes megközelítésének különbözőségeire.

I.5. A PACAP hatása a könnytermelésre – irodalmi háttér

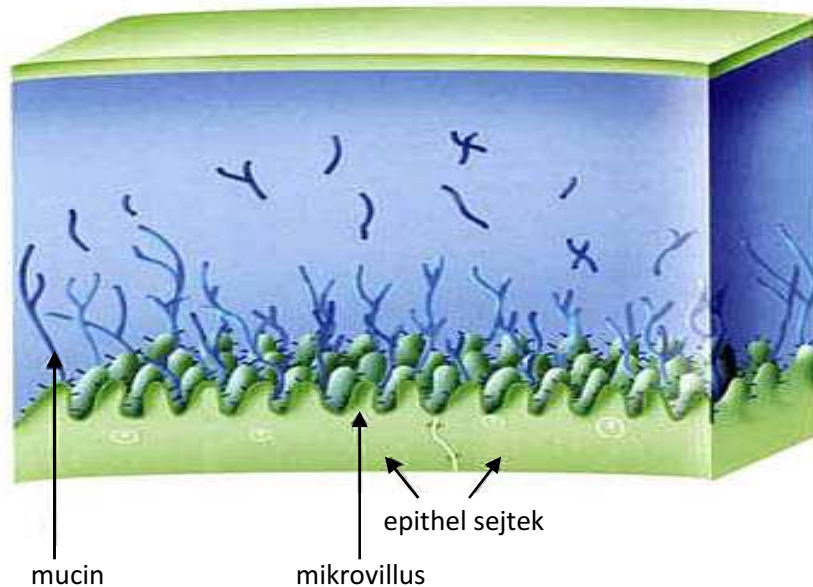
A könny összetett folyadék, mely a szemfelszínt beborítva védi, táplálja azt. Fő feladatai a következők: a cornea táplálása, optikailag sima törőfelszín létrehozása, a cornea és a conjunctiva nedvesen tartása, ezáltal a súrlódás csökkentése, a szembe jutó idegentestek kimosása, valamint antibakteriális hatóanyagai (pl.: lizozim, laktoferrin, immunglobulinok, béta-lizin) révén a kórokozók elpusztítása.

A könny átlátszó, erősen sós ízű, enyhén lúgos kémhatású folyadék. Az átlagos, a látás biztosításához szükséges könnytermelés 1-2 μl /perc, azaz napi 1-3 ml. Az alap-könnytermelés során képződő könny összetétele viszonylag állandó. A könny összetételét, mivel termelése alapanyagául a vérplazma szolgál, szokás annak összetételéhez hasonlítani. A benne levő összetevők kisebb - nagyobb mértékben megtalálhatók a plazmában is. Az oldott sók és ionok közül a legfontosabbak a vérplazmához hasonló arányban jelenlévő (3%) nátrium- és kloridionok, a sokkal nagyobb koncentrációjú mangán-, kálium- és hidrogénkarbonát-ionok. A vérplazma fehérjéi közül jó néhány képviselteti magát a könnyben, ilyenek az albumin, az immunglobulinok, antitestek, az antibakteriális hatású lizozim, továbbá a laktoferrin, a lipokain és a lakritin. A szemfelszín sejtjei számára fontos hormonok és növekedési faktorok is megtalálhatók a könnyben.

A szemet borító könnyfilm háromrétegű, s csak együtt tudják ellátni a már említett feladatokat (I/2. ábra).

1. Külső, olajos réteg, melyet a szemhéj szélén elhelyezkedő Meibom-mirigyek (módosult faggyúmirigyek) termelnek. Váladékuk kissé összekeveredik az alatta levő réteggel, így stabilizálja azt és megvédi a párolgástól. Vastagság: 0,1 μm .
2. A vizes réteg alkotja a könnyfilm vastagságának 90 százalékát. A könnymirigyek termelik. 98%-a víz, melyben a már említett fehérjék, enzimek, ionok, oxigén, tápanyagok oldott állapotban vannak jelen. Ez a réteg biztosítja a cornea oxigénellátását, fő feladata a szemfelszín nedvesen tartása. Vastagság: 8,0 μm .

3. A vékony mucinréteg rögzíti a könnyfilmet a szemfelszínhez, segíti annak tapadását és eloszlását. A conjunctivában elhelyezkedő kehelysejtek váladéka.
Vastagság: 0,8 μm .



I/2. ábra: A könnyfilm felépítése

A könnymirigy (glandula lacrimalis) savós nyálmirigyhez hasonló mirigy, az orbita felső, halánték felőli sarkában, a felső szemhéj alatt található, és egy nagyobb felső, valamint egy kisebb alsó részre tagolódik, benne elszórtan nyiroksejt csoportosulások vannak. A nagy könnymirigyben termelődik a könny vizes fázisát adó folyadék 95-98%-a. A felső mirigy kivezető csövei áthaladnak az alsó mirigyen, majd az összes cső (6-14) a felső szemhéj kötőhártya-redőjének (fornix conjunctivae superior) elülső falába nyílik. A könnytermelésben a kötőhártya alatti szövetben elhelyezkedő, kisebb járulékos mirigyek is részt vesznek. Felépítésük, működésük megegyezik a nagy könnymirigyével.

A könnytermelés szabályozása összetett, a mirigyek működését hormonális és idegi (szimpatikus és paraszimpatikus) hatások egyaránt befolyásolják. Ha idegen test vagy irritáló anyag kerül a conjunctivára, corneára, esetleg az orrjáratba, e mechanikai ill. kémiai inger hatására több könny kezd termelődni, mely akár százszoros mennyiséget is jelenthet. A reflexes könnytermelést a látóideg ingerei (erős fény) is

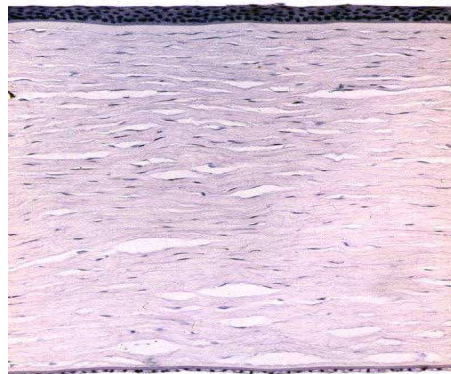
kiválthatják. Érzelmeink magasabb szintű agyi központok segítségével azonnali könnytermelést tudnak kiváltani. Az ingereket a n.trigeminus n.lacimalis ágával haladó paraszimpatikus, valamint a ganglion cervicale superiusból származó szimpatikus idegek közvetítik valamennyi könnymirigynek. A vizes fázis aránya megnő, több lesz a nátrium, kevesebb a kálium a fenti reflexek által termelődött könnyben, de egyéb összetevők aránya is megváltozhat, attól függően, hogy milyen idegrendszeri jel váltotta ki a fokozott képződést. Egyes fehérjékből mindig csak ugyanannyit választanak ki a könnymirigyek, pl.: immunglobulinok, így ezek aránya kevesebb lesz. Más fehérjék mennyisége viszont változik, így az antibakteriális lizozim, vagy a baktériumok számára is fontos vas megkötésére képes laktoferrin mennyisége megemelkedik „könnyfakasztó” ingerek hatására.

PACAP-immunreaktív rostokat mutattak már ki a könnymirigyben is, melyek a ganglion sphenopalatinumból erednek, ahol a neuronok 10%-a PACAP tartalmú (Elsas et al. 1996). A nyálmirigyekben és más exocrin mirigyekben leírt hatásai valószínűsítik, hogy a serosus nyálmirigyhez hasonló felépítésű könnymirigyben is kifejti valamilyen, eddig ismeretlen hatást. A nyálmirigyekben PACAP tartalmú rostok mutathatók ki, PACAP adása fokozza a nyálszekréciót, a protein szekréciót és gátolja a Ca^{2+} csatornákat (Calvert et al. 1998; Kamaishi et al. 2004; Mirfendereski et al. 1997). Azok az anyagok, amelyek emelik a cAMP vagy a cGMP szintet, hatással vannak a könnytermelésre (Gilbard et al. 1990). Ez a megfigyelés szintén valószínűsíti azt, hogy a PACAP szerepet játszik a könnymirigy működésében.

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

I.6. A PACAP és a cornea – irodalmi áttekintés

Szemünk fő törőközege a cornea, törőereje 43 dioptria. Az ép cornea tiszta, transzparens, egy kör alakú ablak a sclerában. A patkány és humán cornea felépítése hasonló, csupán méreteikben különböznek egymástól (I/3. ábra).



I/3. ábra: A patkány szaruhártyájának méretarányos és szövettani képe

A szaruhártyának 5 rétegét különíthetjük el.

1. Epithelium: vastagsága 50-100 μm , basalis sejtek után 2-3 réteg ún. szárnyas sejt, majd 2 réteg felszíni sejt alkotja. Ezen sejteken elektronmikroszkóppal mikrovillusok láthatók, melyek a könnyfilm alsó rétegével vannak kapcsolatban.
2. Bowman membrán: a stromából specializálódott 10 μm vastagságú, fénymikroszkóppal amorfnak tűnő réteg, az epithelsejtek basalis membránja ezen a rétegen fekszik.
3. Stroma: a cornea 90 százalékát alkotja, rendezett struktúrájú kollagén fibrillumok lamellái glycosaminoglycan alapanyagba ágyazva.
4. Descemet membrán: finom kollagén fibrillumokból áll, a gyulladásszerű folyamatoknak sokáig ellenáll. Életünk során folyamatosan vastagodik.
5. Endothelium: mesodermális eredetű kb. 5 μm vastag réteg, mely a Descemet membránt szekretálja. Egyetlen sejtsor, mely hatszög alakú sejtekből áll; a sejtek száma az életkor emelkedésével folyamatosan csökken. A stroma alapállományából a

felesleges vizet az endothelium aktív pumpa mechanizmusa távolítja el, mely rendkívül fontos a cornea átlátszóságának fenntartásában (Newell, 1982).

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

A fájdalom-, tapintás-, hőérzékelés a széli részek felé csökken. A cornea a magas hőt fájdalomként érzékeli. A corneahám folyamatosan fizikai, kémiai, biológiai ingereknek van kitéve (Yu et al. 2010). A cornea egy esetleges hámsérülésre gyors gyógyulással reagál. A sérülés területében a keratocyták apoptózist szenvednek és a sebszélek mentén új sejtek proliferációja figyelhető meg. Az apoptotikus és a proliferációs utak egyensúlya rendkívül fontos a sebgyógyulás szempontjából (Lu 2006; Netto et al. 2005). Számos növekedési faktor, transzkripciós faktor és citokin szerepét igazolták már e folyamatban (Baldwin et Marshall 2002; Lyu et Joo 2005; Saika et al. 2004; Yu et al. 2010). Nem megfelelő corneális sebgyógyulás és /vagy fokozott apoptózis számos esetben kialakulhat, pl.: cukorbetegség, kontaktlencse viselés, refraktív sebészeti szövödmény (Netto et al. 2005; Wilson et al. 2007; Zagon et al. 2006).

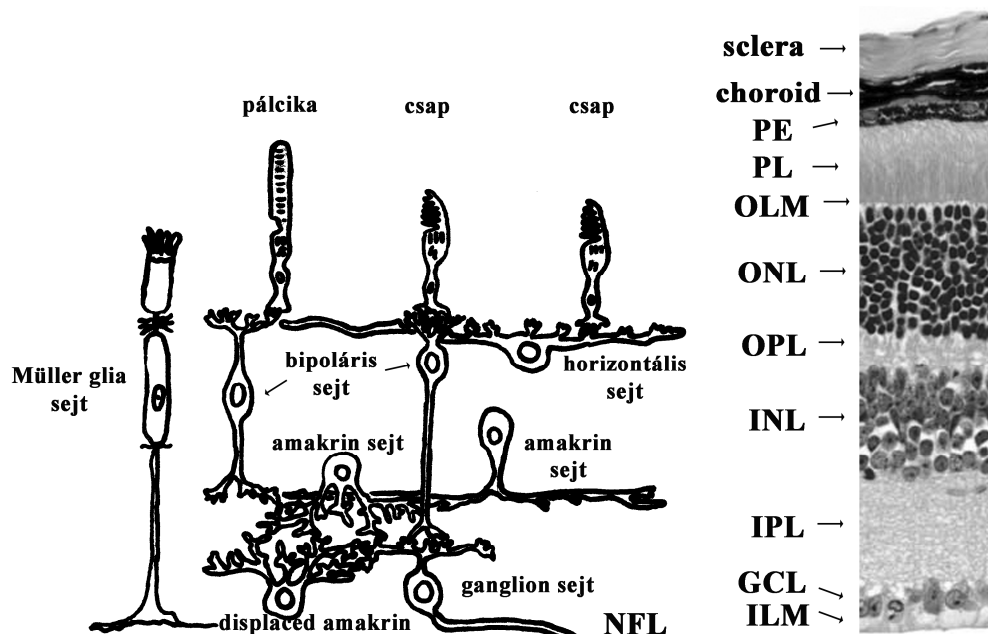
Az apoptotikus és proliferációs folyamatok egyensúlya tehát fontos a sebgyógyulás mechanizmusában. A PACAP az idegrendszer fejlődése során növekedési faktorként működik, sérülések esetén sejtvédő hatása is van (Reglödi et al. 2011). A PACAP corneális hatásai kevésbé ismertek, annak ellenére, hogy a peptidnek és receptorainak jelenlétét már kimutatták a corneában (Staines 2008; Wang et al. 1995). A cornea epithelsejtjei gyorsan reagálnak környezeti ártalmakra s a gyors sebgyógyuláshoz vezető szabályzó útvonalak egyensúlya elengedhetetlen. Egy korábbi vizsgálatban a PACAP27 szemcseppel idegvégződés növekedését serkentették nyúl corneájában és felgyorsították a cornea érzékenységének helyreállítását (Fukiage et al. 2007). Bár ez a vizsgálat csak a neuronális regenerációra fókuszált, felhívta a

figyelmet arra a lehetőségre, hogy a PACAP szemcsepp formájában fokozhatja a cornea hámosodását.

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

I.7.1. PACAP a retinában – irodalmi áttekintés

A retina a központi idegrendszer „kihelyezett” része. Kísérleteinkben a patkány retinát vizsgáltuk, melynek rétegeit, sejtípusait az alábbi ábrán láthatjuk. A patkányok retinája hasonlít a humán retinához jó vascularizáltsága és a három fő sejtes és két szinaptikus rétege miatt (I/4. ábra). Nincs csapokban gazdag központi része, bár itt is megfigyelhető egy centripériális grádiens, azaz a centrális rész felé a photoreceptor-sűrűség megnövekszik a perifériához képest (Szél et Röhlich 1992).



I/4. ábra: Az emlős retina felépítése

PE: pigment epithelium, PL: fotoreceptorok tétege, OLM: külső határmembrán, ONL: külső magvas réteg, OPL: külső rostos réteg, INL: belső magvas réteg, IPL: belső rostos réteg, GCL: ganglionsejtek rétege, ILM: belső határmembrán, NFL: idegrost réteg.

Számos tanulmány bizonyította, hogy a PACAP és receptorai jelen vannak a retina rétegeiben. PACAP immunpozitivitás figyelhető meg patkány retinában az amacrin-, horizontális-, és ganglionsejtekben, valamint az idegvégződésekben és a belső rostos rétegben (Izumi et al. 2000; Seki et al. 2000a). PACAP immunreaktivitás igazolható a PACAP pozitív neuronok plazmamembránjában, a durva felszínű endoplazmás retikulumban és a citoplazmában (Izumi et al. 2000). Csirke retinájában a PACAP immunreaktivitás cirkadián változást mutat (Józsa et al. 2001). Emlősökben a retino-hypothalamikus pálya a retina ganglionsejtjeiből ered és a hypothalamus suprachiasmaticus magjában végződik, mely az emlősök biológiai órája. Ezen ganglionsejtek melanopszin tartalmuk miatt direkt fényérzékenyek (Hannibal et al. 2004). Melanopszin kizárólag a PACAP-ot tartalmazó sejtekben termelődik. A ganglionsejtek PACAP termelése részben dopamin-irányítás alatt áll (Sakamoto et al. 2005; Wan et al. 2006). A PACAP immunreaktivitás a retina fejlődésének korai szakaszában jelenik meg (Bagnoli 2003). A csirkeretina belső magvas rétegében az embrionális élet 8. napjától már kimutatható a PACAP (Borba et al. 2005). Patkány retina ganglionsejt rétegében a fejlődés 20. napján jelenik meg a PACAP mRNS (Skoglosa et al. 1999).

1.7.2. PACAP receptorok a retinában

Szelektív PACAP receptorok felelősek a PACAP retinális kötődésének 80%-áért (Nilsson et al. 1994). Humán foetális retinában immunhisztokémiai vizsgálatok PACAP és receptorainak jelenlétét igazolták, melyet a PACAP receptor mRNS kimutatásával is megerősítettek RT-PCR kísérlettel (Olianas et al. 1997). A human retinoblastoma sejtek is tartalmaznak PACAP receptorokat (Olianas et al. 1996).

PAC1 receptor mRNS-t és protein expressziót találtak újszülött patkány retinájának minden rétegében (Silveira et al. 2002). Csirkeretinában az embrionális fejlődés 6. napjától már jelen van a PAC1 receptor és mRNS. A retina pigment epithel sejtjeiben mindegyik PACAP receptor mRNS-ét megtalálták (Zhang et al. 2005). Pontos lokalizációra irányuló vizsgálatok szerint különösen erős PAC1 receptor

mRNS expresszió észlelhető a ganglionsejt, a belső magvas és idegrost rétegben, míg gyengébb receptor jelenlét mutatható ki a belső és külső rostos, a külső magvas rétegben és a photoreceptorok külső tagjaiban (Seki et al. 2000b; Seki et al. 1997). Más vizsgálat megerősítette a VPAC receptorok jelenlétét a retinában (D'Agata et Cavallaro 1998). Sejtenyészetben már a retina Müller sejtjeiben is kimutattak PAC1 receptorokat (Kubrusly et al. 2005).

1.7.3. PACAP hatása a retinában

A PACAP27 és 38 a cAMP termelődését kb. ötszörösére fokozza a retinában (Nilsson et al. 1994). A PACAP mindkét módosulatának adenilát cikláz (AC) serkentő hatását számos fajban megfigyelték (patkány, nyúl, sertés, borjú). A PACAP38 hatékonyabb, mint a PACAP27 és mindkét fehérje erősebb hatással bír, mint a VIP (Onali et Orianas 1994). A PACAP27 és 38 a cAMP képződést és az inositol monofoszfát szintet is fokozza (D'Agata et Cavallaro 1998). Ezt a hatást észlelték fejlődő patkány, csirke és humán retinában is (Borba et al. 2005; Orianas et al. 1997; Silveira et al. 2002). Humán retinoblasztóma sejtekben is kimutatták a PACAP cAMP-t fokozó hatását (Orianas et al. 1996).

A cAMP response element binding protein (CREB), egy olyan transzkripciósz fehérje, melyet az intracelluláris cAMP aktivál. A PACAP a CREB foszforilációját újszülött patkány retina kezelése után 5 perccel már indukálja (Silveira et al. 2002). Intravitreálisan adott PACAP27 és 38 elektroretinográfiával érzékelhető fotoreceptor aktivitást okozott nyulakban (Jarkman 1998). Pigment epithel sejtekben a PACAP gátolja az interleukin-1beta indukálta IL-6,-8 és a monocyta kemotaktikus protein-1 expresszióját (Zhang et al. 2005). A Müller glia sejtek is a PACAP célsejtjeinek számítanak. E sejtek PAC1 receptorral rendelkeznek. A PACAP igen kis koncentrációban (pmol) is serkenti a Müller sejtenyészetek IL-6 kibocsátását (Kubrusly et al. 2005; Nakatani et al. 2006; Seki et al. 2006). PACAP adását követően 2 és 3 nappal IL-6 expresszió figyelhető meg az egész retinában (Nakatani et al. 2006).

Nagyobb koncentrációban a PACAP a Müller sejtek proliferációját, a cAMP termelődését stimulálja (Nakatani et al. 2006).

A PACAP szerepet játszik a retina fejlődésében: PACAP kezelés fokozza a tirozin hidroxiláz aktivitását fejlődő csirke retinájában, mely a dopaminerg idegsejtek fejlődésére utal (Borba et al. 2005). Egy közelmúltban PAC1 transzgenikus egereken végzett vizsgálat kimutatta, hogy megfelelő PACAP-indukálta jelátvitel szükséges a retina és a vizuális funkció fejlődéséhez (Lang et al. 2010).

A PACAP a glutamáttal kölcsönhatásba lépve, nagyon fontos szerepet játszik a fényinger elvezetésében és a cirkadián ritmus szabályozásában. A PACAP ezen hatásaival foglalkozó cikkek nagy száma bizonyítja, hogy a ganglion sejtek e PACAP tartalmú alcsoportja igen fontos biológiai szereppel bír (Hannibal et Fahrenkrug 2004; Köves et al. 2000; Son 2007). PACAP szükséges pl.: a fény szignál normál integrációjáért a suprachiasmaticus magban (Beaule et al. 2009). A corpus pinealéban található módosult fotoreceptorok a pinealocyták, melyekben a PACAP jelenlétét és aktivitását szintén kimutatták (Csernus et al. 2004, Faluhelyi et al. 2004; Nagy et Csernus 2007; Rácz et al. 2008; Rékási et Czömpöly 2002).

A retina véráramlását a kapillárisok körüli pericyták kontraktilitása befolyásolja. A PACAP ezen pericyták relaxációját váltja ki a protein kináz A (PKA) és foszfolipáz C (PLC) mediálta úton (Markhotina 2007).

A PACAP-nak számos más szemben található szövet keringésére és simaizomműködésére is hatása van. A PACAP27 és 38 csökkenti az uveális vasculáris rezisztenciát, fokozva ezzel a chorioidea véráramlását (Nilsson 1994). Mindkét hormon fokozza a m. sphincter iridis cholinerg transmissióját, a PACAP27 indukálja a m. dilatator pupillae relaxációját (Yoshitomi et al. 2002). A PACAP e hatásait majmokban is kimutatták. Helyi PACAP kezelés a corneát beidegző idegtörzs sérülése esetén serkenti az ideg regenerációját és a cornea érzékenységének helyreállítását (Fukiage et al. 2007).

1.7.4. In vitro retinoprotekció

Az első olyan tanulmány, mely a PACAP retinoprotektív hatásával foglalkozik, arról számol be, hogy a PACAP-nak védő hatása van retinális idegsejt-tenyészetekben glutamát toxicitással szemben (Shoge et al. 1999). Korábban már bizonyították a VIP hasonló hatását (Shoge et al. 1998). Az emelkedett glutamát koncentráció excitotoxikus sejthalált okoz az idegrendszerben, beleértve a retinát is (Rácz et al. 2006a, 2006b, 2007). Shoge és munkatársai szerint 10 nM/L-1 μ M/L PACAP27 és 38 a glutamát-indukálta sejthalált dózisfüggő módon gyengítette. Ezt a hatást a PACAP antagonistá PACAP6-38 és a PKA gátló H-89 egyidejű kezelés megakadályozta (Shoge et al. 1999).

Újszülött patkányokból származó retina neuroblast rétegében anizomycin sejthalált okoz (Silveira et al. 2002). PACAP38 kezelés dózisfüggő mértékben kivédte a sejthalált: az 1-10 nM/L koncentrációjú PACAP38 a sejthalál teljes gátlását eredményezte.

Teknős szemserleg preparátumban a luminozítás típusú horizontális sejtek kifejezetten fényérzékenyek. Kimutatták, hogy a preparátumot PACAP-ot tartalmazó oldatba helyezve, gyengül az anoxia miatti fényérzékenység csökkenés (Rábl et al. 2002). A 42 óra múlva mért intracelluláris válaszok szignifikánsan magasabbak voltak, mint a kontroll horizontális sejtekben. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PACAP neuroprotektív hatással bír a hypoxia-anoxiának kitett teknős retinában.

1.7.5. A PACAP in vivo retinoprotektív hatása

Az idegrendszer legfontosabb serkentő transzmittere, a glutamát nagy koncentrációban toxikus hatású. Az excitotoxikus sérülés a retina számos betegségének fő faktora, így a glaucomának és az ischaemiás retinopathiának is. A nátrium-glutamát (monosodium-glutamát=MSG) újszülött patkánynak szisztémásan adva átlépi a vér-retina gátat és súlyos retinadegenerációt okoz, és a belső

retinarétegek súlyos károsodása mutatható ki (Babai et al. 2006; Szabadfi et al. 2009). Ezt a súlyos laesiót 3x-i MSG kezeléssel már ki lehet váltani (posztnatális 1.,5.,9.nap) (Babai et al. 2005, 2006). A külső-belső határhártya közti távolság a felére csökken, 3 hetes korban vizsgálva. Az IPL csaknem teljes eltűnése, az INL és a GCL fúziója figyelhető meg. Fénymikroszkóppal látható, hogy a GCL-ben a 100 mikrométer retinahosszra jutó sejtszám kb. a fele a normálisnak (a papillától azonos távolságban mérve). Bár a PACAP átlép a vér-agy gáton, a szisztémás PACAP kezelés az MSG indukálta retina degenerációt csak mérsékelten csökkentette. Ugyanakkor lokális PACAP38 kezelés (intravitreális 1-100 pmol PACAP) a degeneratív morfológiai elváltozások szignifikáns csökkenését eredményezte (Babai et al. 2005, 2006; Tamás et al. 2004). Míg 1 pmol PACAP csekély javulást hoz, 100 pmol PACAP csaknem intakt retina megjelenést biztosított. Hasonló védőhatás figyelhető meg PACAP27 kezelésnél is (Atlasz et al. 2009). PACAP antagonisták, a PACAP6-38 és a PACAP6-27 az MSG indukálta degeneráció fokozódását eredményezik, jelezve, hogy az endogén PACAP a retina természetes védekezésében fontos szerepet játszik (Atlasz et al. 2009). Az MSG okozta degenerációt elszenvedő neuronok csökkent immunreaktivitást mutatnak vesiculáris glutamát transzporter 1-re (OPL, IPL), tyrozin hydroxilázra (dopaminerg amacrin sejtek és INL), vezikuláris GABA transzporterre (OPL, IPL), parvalbuminra (AII amacrin sejtek, INL és GCL), calbindinre (horizontális sejtek, INL), calretininre (kolinerg amacrin sejtek, INL és GCL) és PKC α -ra (bipoláris sejtek, INL). Ez a jelenség a belső sejtrétegekben található struktúrák pusztulásával magyarázható. Az eredmények alapján a PACAP valamennyi vizsgált sejtben véd az MSG hatásától, azt sugallva, hogy ez a védelem nem típus-specifikus, hanem valamennyi neuronban, mint általános defenzív mechanizmus jelen van (Atlasz et al. 2008).

A glutamát receptor agonista kainát intravitreális adását követően is megfigyelhető a retina excitotoxikus sejt-károsodása. Ennek mértéke csökkenthető 10 pmol intravitreális PACAP előkezeléssel (Seki et al. 2006). E megfigyelések azt jelzik, hogy a PACAP az excitotoxikus retinakárosodásokkal szemben protektív hatású felnőtt és újszülött patkányban is.

Az excitotoxikus sérüléseken kívül további modellekben is igazolták a PACAP retinoprotektív hatását, például nervus opticus átvágása esetén és ischemiás retinakárosodásban is. Mindkét arteria carotis communis lekötése után krónikus hypoperfúzió jön létre és a retinában ischemiás degeneráció figyelhető meg (Atlasz et al. 2010). PACAP kezelés a retina degenerációját mérsékelte, és a hatás ebben a modellben sem volt sejtspecifikus. A PACAP ezen kísérleti előzmények alapján erőteljes retinális védő hatással rendelkezik, melyet UV-A indukálta károsodásban teszteltünk.

I.7.6. UV-A sugárzás okozta retina degeneráció

Az atmoszféra változásai növelhetik az UV sugárzás mértékét a Földön. Ezáltal a szem UV expozíciója is emelkedni fog. A szem UV fény indukálta károsodásait mind humán, mind állatkísérletekben bizonyították (Zrenner 1990; Dillon 1991). A rövidhullámú UV-C sugárzást (<280 nm) a cornea nyeli el. Nagyfokú UV-C expozíció a cornea károsodását, valamint neoplasztikus elváltozását is okozhatja (Schein 1992). A cornea epitheliumban az UV-C sugárzás gátolja a mitózist, nucleáris fragmentációt és desquamációt okoz (Buschke 1945).

A hosszúhullámú UV-B sugárzás (297-320 nm) nagy százalékát a szemlencse elnyeli. Nyúl lencse epithelsejt-kultúrában az UV-B sugárzás 297 nm-es tartománya bizonyult a legcitotoxikusabbnak (Andley et al. 1994). Számos epidemiológiai vizsgálat igazolta, hogy a tartós UV-B expozíció a humán szemlencsében cataractát indukál. Ezt a hatást figyelték meg albino egereken végzett kísérletben is (Jose 1986; Dillon 1991). In vitro vizsgálatokban a lencse epithel sejtjeiben kimutatták azokat az aminosavakat és DNS-t, melyek az UV-B sugárzás célpontjai és azonosították azokat a membrán alterációkat és DNS-szál töréseket, melyek a cataracta képződés molekuláris mechanizmusában szerepelhetnek (Kleiman et al. 1990; Hightower et McCready 1992).

A hosszúhullámú UV-A (315-440 nm) sugarak minden optikai közegen képesek áthatolni és a retina fotokémiai károsodását okozni. Humán vizsgálatok azt

mutatták, hogy a napfény expozíció, különösen az UV-A, photoaktív gyógyszerekkel együtt rendkívül phototoxikus (Correia et al. 1994). A phototoxicitás reaktív szabadgyökök (pl.: H_2O_2), singlet oxigén és hydroxil gyökök képződését jelenti, mely fokozottan figyelhető meg UV-A sugárzás és photoszenzitív gyógyszerek együttes jelenlétekor (Rosen et al. 1997; Verna et al. 1998). A reaktív oxigén szabadgyökök fehérje és DNS károsodást okozhatnak (Halliwell 1988). A szabadgyökfogó glutathion (Winkler et Giblin 1983), C és E vitamin (Woodford et al. 1983; Penn et al. 1987) a fény-indukálta retinakárosodást csökkenteni próbáló endogén védelmi rendszert szolgálnak. Az endogén neuroprotekción további elemei a retinában található neurotrophikus faktorok, melyek közé tartozik a PACAP is.

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

Részletes kísérleti leírás

II. A PACAP könny fehérjeösszetételére kifejtett hatásának vizsgálata

II.1. Anyagok és módszerek

Kísérleti állatmodell

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

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

Microchip Electrophoresis

A könnymintákat feldolgozásig 0,5 ml-es steril Eppendorf csövekben -20 °C fokon tároltuk. A papírcsíkok által megkötött fehérjéket 30 µl mintapufferben oldottuk ki (0,125 M Tris/HCl, pH:6,8, 4% nátrium dodecil szulfát-SDS-, és 10% β-mercaptoetanol). Erős vortexelés után a szűrőpapírokat eltávolítottuk a csövekből. Az így kapott oldatot microchip electrophoresisra készítettük elő (Kustos et al. 2005). A patkánykönny fehérje összetételének analízisére, és a PACAP módosító hatásának elemzésére Agilent 2100 Bioanalyzer rendszert alkalmaztunk. A vizsgálat során a Protein 230-as fehérje chipet használtuk. A protein chip mikrokapillárisait a

kihez tartozó gél-festék keverékkel töltöttük fel. A gél egy lineáris polimert tartalmaz szűrő ágensként, amely biztosítja a 14-230 kDa tartományban a fehérjék molekulatömeg alapján történő szétválasztását. A festék lehetővé teszi a fehérje-SDS komplexek chipen belüli jelölését. Az előkészített oldatokból 4-4 µl-t 2 µl denaturáló oldattal kevertünk össze, mely a pontos méret-meghatározáshoz szükséges kis és nagy molekulatömegű (16 és 210 kDa) belső standardokat is tartalmazta.

A mintákat 5 percig 100 °C-on főztük, centrifugálással koncentráltuk, majd 14 µl desztillált vízzel hígítottuk. Minden mintából 6-6 µl mennyiséget vittünk fel a chip megfelelő helyeire. Egy chip 10 fehérjeminta elemzésére alkalmas. Az ismeretlen fehérjék molekulatömegének pontos meghatározásához a Chip Kit molekulatömeg markereit használtuk. A méréseket háromszor ismételtük meg a reprodukálhatóság bizonyítására. Az eredmények kiértékelését a protein 230-as assay software segítségével végeztük el.

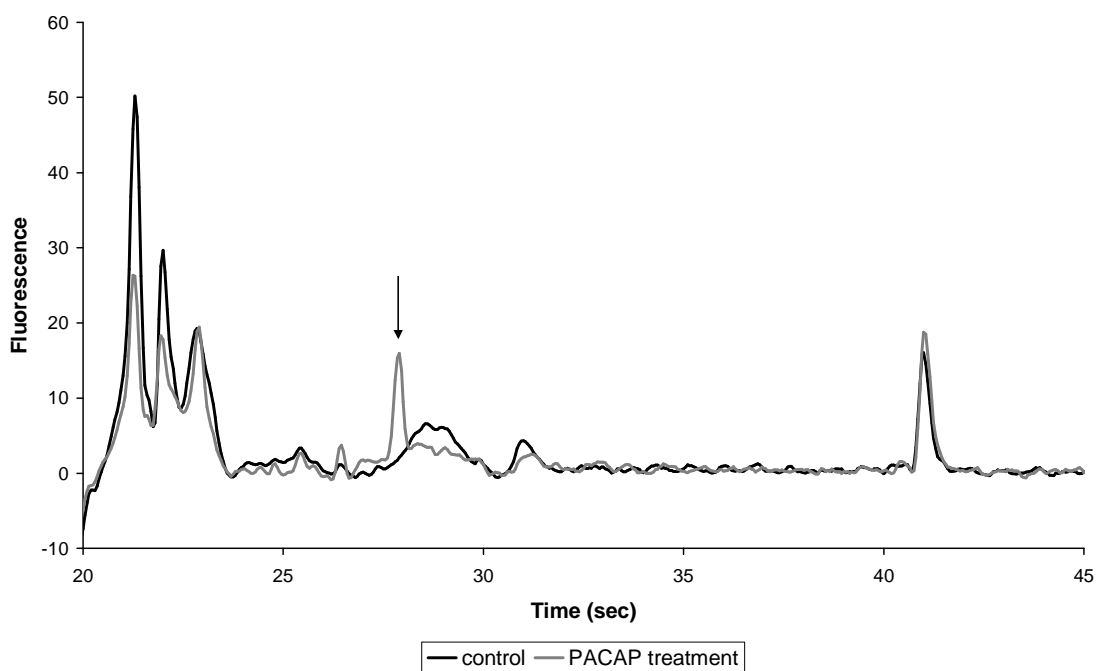
A könnymintákból származó fehérjék triptikus peptidjeinek MALDI TOF tömegspektrometriája

A gélelectrophoresis során szétválasztott fehérjéket a gélből kivágtuk, majd Eppendorf csőbe helyezve 3x 10 percig 200 µl 50%-os acetonitril és 50 mmol NH₄CO₃ oldattal mostuk. A géldarabokat szobahőmérsékleten dehidratáltuk és 10µl 0,04 mg/cm³ cc. tripszinoldattal (pH 8,5, 2,5 mmol Trispuffer) kezeltük 37 °C-on 12 órán keresztül. A tripszines emésztés után a peptideket ultrahang segítségével oldottuk ki. Oldószerként 15 µl víz-acetonitril-hangyasav (49:50:1 v/v/v) oldatot használtunk. Az extrakció után a peptideket tartalmazó oldatot liofilizáltuk, majd 10 µl desztillált vízbe oldottuk vissza. A vizes peptidoldatok 1 µl-ét azonos térfogatú telített CHCA (alfa-ciano-4-hidroxi fahéjsav) mátrix oldattal mintatartó tálcára csepegtettük. A peptidek tömegeit + módban reflektor detektorral mértük. A könnymintákban található fehérjék azonosítására Mascot adatbázis keresőt használtunk. A fehérjék szekvencia-egyezéseinek vizsgálatát a Chestal W II program segítségével végeztük el.

Humán könnymintákat egészséges felnőtt önkéntesektől vettünk Schirmer próbával (kor: 25-40, mindkét nem, ismert szemészeti betegség nélkül). A humán csarnokvizet (n=10, 65-85 év közötti, mindkét nem) önkéntesektől nyertük cataracta ellenes műtétek alkalmával. Natív mintáinkat, illetve a PACAP38 vizes oldatú standardjának (Sigma-Aldrich) 1-1 µl-ét felvittük a Bruker rozsdamentes acél mintatartó tálcára (MTP 384 massive target T, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Vizsgálataink során mátrixként α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav (CHCA) telített 0,1 %-os trifluor-ecetsav (TFA) – acetonitril (2/1 V/V) oldatát alkalmaztuk, melyből mintáinkhoz 1-1 µl-t csepegtettünk. Kalibráló oldatként minden esetben a Bruker Peptidkalibráló Standardot alkalmaztuk (#206195 Peptide Calibration Standard; Bruker Daltonics). A minták beszáradását követően az elemzéseket a már fent említett Bruker Daltonics Autoflex II típusú MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel reflektor detektálási módban végeztük el. Az ionizáláshoz 337 nm-es nitrogén lézert alkalmaztunk (MNL-205MC model; LBT- Lasertechnik Berlin GmbH.; Berlin; Németország), ennek frekvenciája 50 Hz, a gyorsító feszültség 20 kV és a késleltetési idő pedig 120 ns volt. A tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban 1000 és 10000 m/z tartomány között regisztráltuk. Minden minta esetében a peptidkeverékre jellemző tömegspektrumokat (1000 lövés/minta) összesítettük. A műszer ellenőrzését Bruker FlexContol 2.4 szoftverrel, az értékelést pedig Bruker FlexAnalysis 2.4 szoftverrel végeztük (Börzsei et al. 2009).

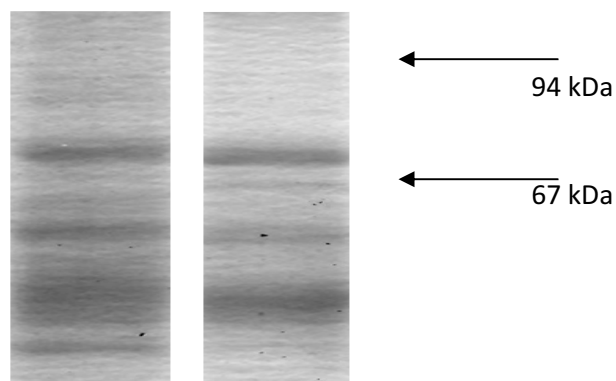
II.2. Eredmények

A szűrőpapír csíkokból nyert fehérjemennyiség elegendőnek bizonyult a fehérjeösszetétel microchipeken történő elemzésére. A chip-technológia segítségével 45 másodperc alatt kvantitatív adatokat nyertünk a könny fehérje-összetételéről. A patkánykönnyből több fehérjecsúcsot tudtunk kimutatni a 14-80 kDa molekulatömegű tartományban. A humán könnyhöz hasonlóan a patkánykönnyben is detektálhatók a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjék, a lizozim, az albumin, a laktoferrin és az IgA. Ezen fehérjék mennyiségében nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és a PACAP- kezelt állatok között. Azonban már 1 órával a kezelés után egy új csúcsot figyeltünk meg a 60-70 kDa tartományban mindegyik PACAP-kezelt állat könnyében. Ez a fehérjecsúcs 6 és 24 órával a kezelés után is megfigyelhető volt (II/1. ábra).



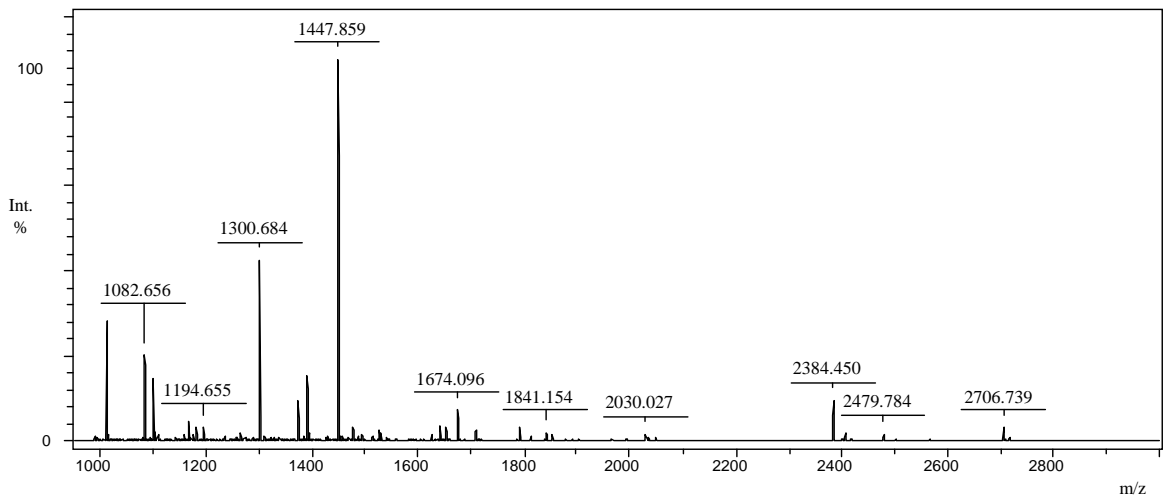
II/1. ábra: A patkány könny fehérjeösszetétele microchip elektroforesissel. A főbb csúcsok a könny fontosabb fehérjéit mutatják, balról jobbra lizozim, lactoferrin, IgA könnyű lánc. A PACAP hatására jelentősen megemelkedett csúcs a 60 kD tartományban jelent meg (nyíl), mely után az albumin csúcs látható. A magas molekulatömegű tartományban a belső standard látható.

Az SDS gélelectrophoresis során a kontroll és PACAP-kezelt minták között talált különbségek megegyeztek a microchippel detektált különbségekkel, melyek az 50-70 kDa molekulatömegű tartományban voltak a legkifejezettebbek (II/2. ábra). Az e tartományba eső fehérjék azonosítását MALDI TOF tömegspektrometriával végeztük el (II/3. ábra).

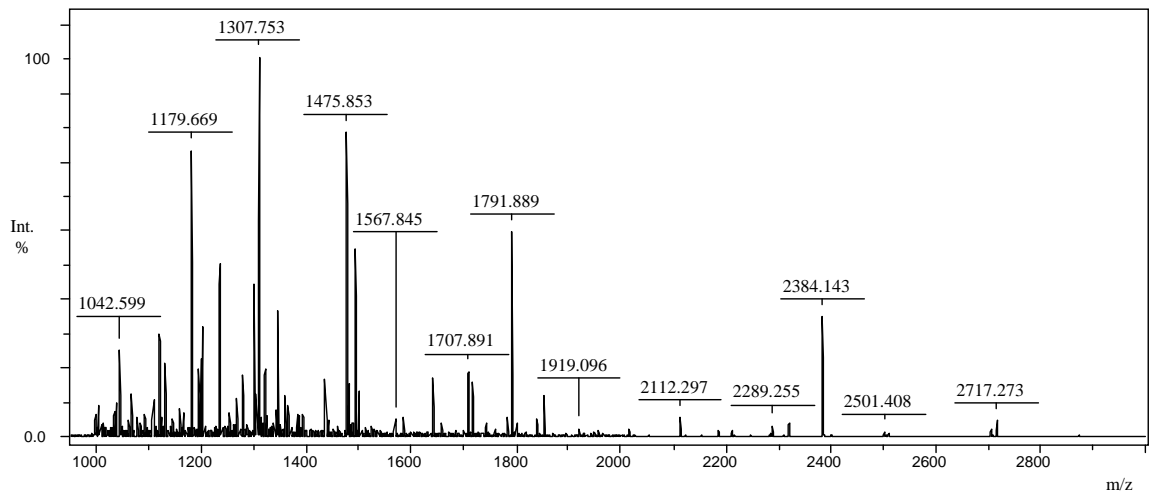


II/2. ábra: SDA gélelektroforesis a 30-90 kD fehérjetartományban. A bal oszlop egy kontroll, a jobb oszlop egy PACAP kezelt reprezentatív patkány könnymintából származik.

A



B



II/3. ábra: A 65 kDa tripszinnel emésztett fehérje MALDI TOF tömegspektruma kontroll (A) és PACAP-kezelt (B) könnymintákban

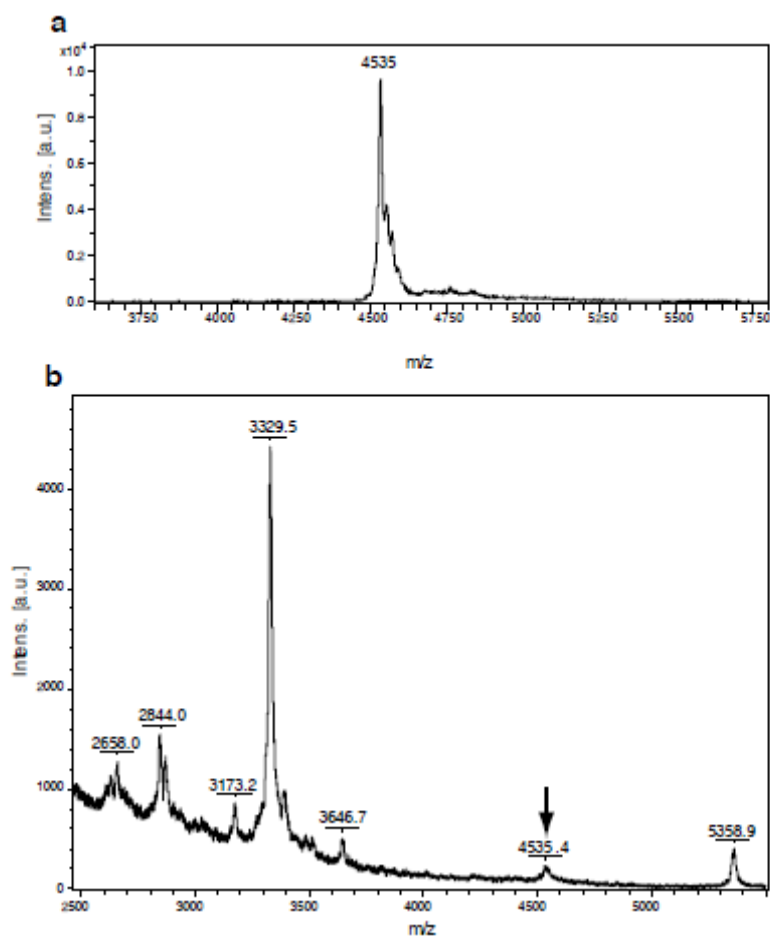
A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a PACAP kezelés hatására az adott molekulatömeg tartományban a könny fehérje-összetétele jelentősen megváltozott (I. táblázat). Egyes fehérjék/peptidek eltűntek, míg mások megjelentek. Jelentősen megváltozott a könnyben található keratintípusok aránya is. A PACAP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

Fehérje név	NCBI adatbázis kód	elméleti tömeg Da	Mascot érték	peptidek száma	szekvencia lefedettség %	változás
Actin beta	gi 13592133	41724	143	10	33	↓
Actin gamma 1	gi 111332	41766	143	10	33	↓
Aldehyde dehydrogenase (NAD(P)+) class 3, chain A	gi 2392056	49439	112	10	23	↓
Aldehyde dehydrogenase (NADP)	gi 91936	50307	111	10	23	↓
Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring	gi 118507	50176	111	10	23	↓
Keratin complex 2, basic, gene 5	gi 33519156	61889	64	10	22	↓
Keratin complex 2, basic, gene 6a isoform 1	gi 123781839	59213	76	11	15	-
Keratin, type II cytoskeletal 5	gi 38303961	61788	91	22	30	↓
Keratin 1	gi 11935049	66027	85	15	28	↑
Keratin 10	gi 57012436	58792	115	18	24	↑
Keratin type I, KA10	gi 74790754	56470	111	24	39	↑
Keratin, type I cytoskeletal 13	gi 81891678	47699	70	9	21	↑
Serotonin 5-HT2c	gi 81910520	33631	62	6	31	↑

I. táblázat: A könny fehérje összetételének változása PACAP hatására az 50-70 kDa molekulatömegű tartományban.

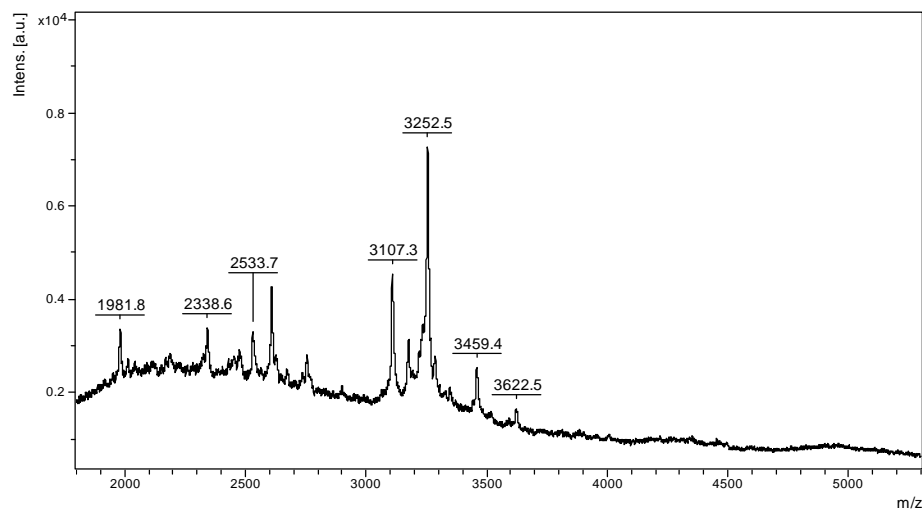
PACAP vizsgálata humán könnyben és csarnokvízben

A PACAP jelenlétét humán könnyből sikerült igazolnunk MALDI tömegspektrometriai analízissel (II/4. ábra). Ezzel szemben a humán csarnokvíz minták nem tartalmaztak PACAP-ot a kimutathatósági határon belül (II/5. ábra).



II/4. ábra: PACAP jelenléte a humán könnyben tömegspektrometriai analízissel.

(a): PACAP38 standard MALDI analízissel. (b): A könny tömegspektrometriai analízise is mutatja a PACAP jelenlétét (nyíl).



II/5. ábra: Humán csarnokvíz tömegspektruma a PACAP38-ra jellemző csúcs nélkül.

II.3. Megbeszélés

Kimutattuk, hogy a PACAP kezelés megváltoztatja a könny fehérje összetételét. A könny proteomika egy ígéretes technika humán betegségek biomarkereinek azonosítására. A könny proteomikai vizsgálata különösen előnyös a noninvazív mintavétel miatt. A PACAP-hoz hasonlóan több neuropeptidról, pl. a substance P és a szomatosztatin, kimutatták már, hogy megváltoztatják bizonyos fehérjék szekrécióját a könnyben (Kapicioglu et al. 1998; Kovács et al. 2005).

A MALDI TOF tömegspektrometria érzékeny, nagy hatékonyságú technika, mely jól alkalmazható különböző biológiai minták fehérjeösszetételének vizsgálatára. Eddig csak pheochromocytoma-sejtek (PC12) fehérjéinek, PACAP kezelés utáni megváltozott összetételét vizsgálták tömegspektrometriás elemzéssel (Lebon et al. 2006). Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP kezelés hatására a könnyben az 50-70 kDa tartományban számos keratintípus expressziója megváltozott. A keratin 1 és 10 a felszíni differenciálódott epitheliális sejtekre jellemző. Ezen fehérjék mennyiségét a PACAP kezelés növelte. A különböző corneális keratinok szerepe a reepithelizációban jelentős, melyeket növekedési faktorok is befolyásolnak (Kurpakus et al. 1990; Nagano et al. 2003). A keratin 13 mennyisége is emelkedett PACAP hatására, ugyanezt tapasztalhatjuk A vitamin jelenléte esetén is.

Az aldehid dehidrogenáz a cornea átlátszóságában játszik szerepet, megakadályozza a citotoxikus anyagok felszaporodását és védi a corneát az UV sugárzással szemben (Kays et Piatigorsky 1997). PACAP hatására ennek az enzimnek a termelődése csökkent, ami meglepő, hiszen a PACAP általában citoprotektív tulajdonságokkal bír. Ugyanakkor az aldehid dehidrogenáz sebgyógyulásban betöltött szerepe valóban minimális és működése inkább az endothel réteghez kötődik.

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

A PACAP, mint általános sejtvédő és regenerációt elősegítő peptid, számos helyen fordul elő a szervezetben. Endogén védő hatását több kísérlet is bizonyította. Többek között PACAP génhiányos (knockout) egerekben azt találták, hogy PACAP hiányában a sérülések fokozott mértékű károsodást idéznek elő. Kimutatták, hogy PACAP génhiányos egerek szemében a retina ischemiás károsodása jóval nagyobb mértékű, mint vad társaikban. Agyi sérülésekben és perifériás szervekben, mint pl. vesében is igazolták már a PACAP védő hatását (Reglódi et al. 2011). Az endogén PACAP szintje sérülések hatására az idegrendszer számos területén megemelkedik, mely ugyancsak ezt az endogén védő szerepet támasztja alá. Ennek alapján feltételezzük, hogy a könnyben előforduló PACAP a cornea regenerációjában és sérülés elleni védelmében játszhat szerepet. Ezt a lehetőséget második kísérletsorozatunkban vizsgáltuk.

III. A PACAP hatásának vizsgálata a cornea regenerációjára

III.1. Anyagok és módszerek

Hím Wistar patkányokat használtunk (250-300 gramm, n=20). Az állatok szemét 50 mg/kg pentobarbital ip. adása után mikroszkóp alatt megvizsgáltuk, majd cornea trepánnal 2 mm-es átmérőjű körkörös hámsérülést ejtettünk a cornea centrumában (Zagon et al. 2006). A körbevágott epitheliumot csipesszel, operációs mikroszkóp alatt távolítottuk el.

PACAP27 20, 100 és 200 µg-ját oldottuk fel 800 µl desztillált vízben. Ezzel a cseppel kezeltük a szemeket a beavatkozás után közvetlenül és minden 2. órában. Minden egyes csepp 1, 5 ill. 10 µg PACAP27-et tartalmazott 40 µl vivőanyagban. Mindegyik állatnak csak az egyik szemét csepegtettük PACAP27-tel, a másik szem kontroll sérült szemként szerepelt és desztillált víz „kezelésben” részesült a fenti időintervallumokban. Normál, intakt corneákat 2 állatból távolítottunk el. Korábbi tanulmányok alapján, a szemeket a beavatkozás után 6 órával vizsgáltuk, amikor már szignifikáns sebgyógyulás volt jelen (Nakamura et al. 2003).

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

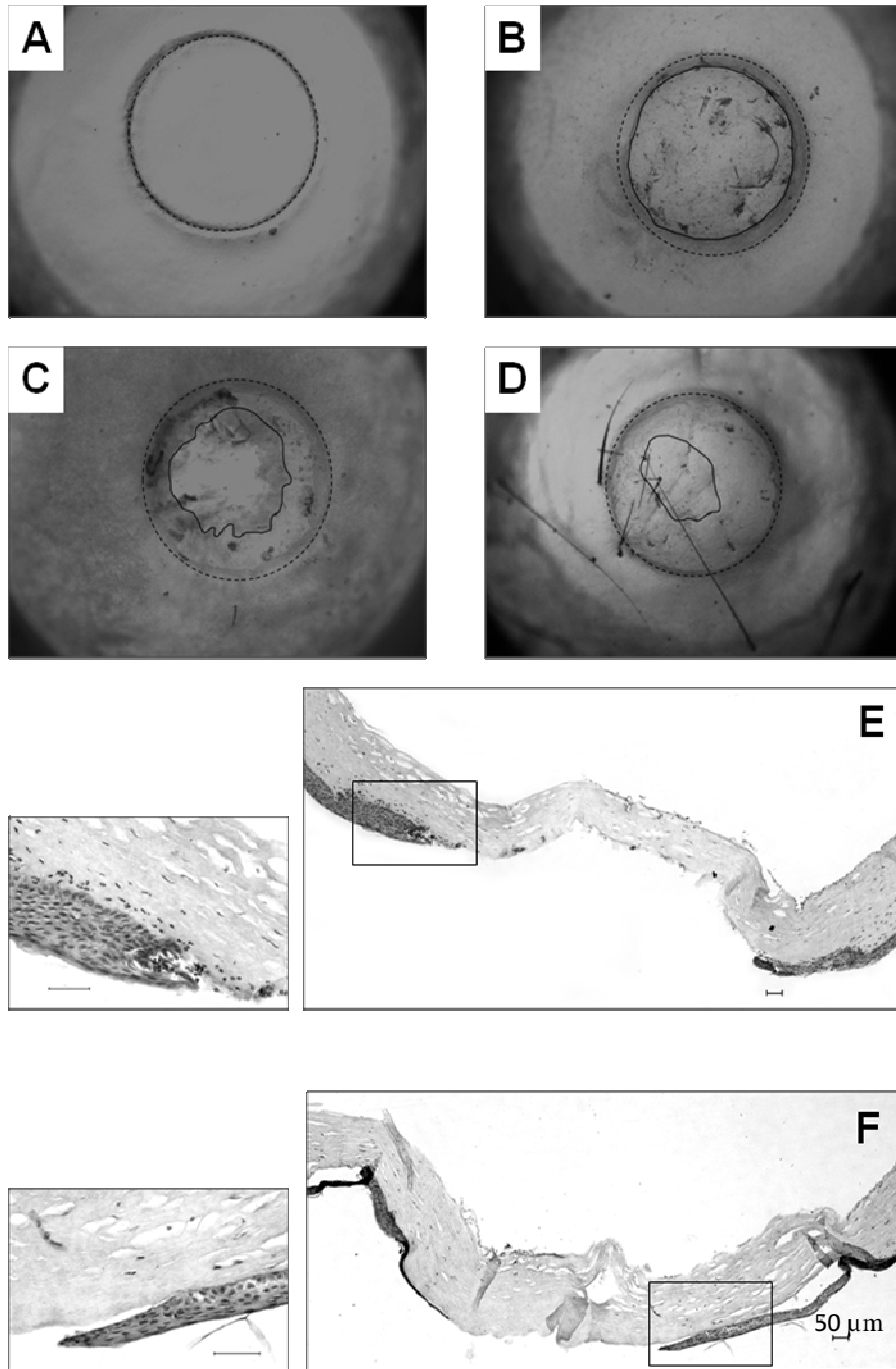
Western blot vizsgálathoz cornea abrúziót végeztünk a korábban leírt módon, a corneákat 4 óra múlva eltávolítottuk a protektív mechanizmusok megítélés céljából (n=7). Normál, intakt corneák is eltávolításra kerültek 4 állatból, hogy az Akt és az ERK1/2 foszforiláció alapértékét megmérjük. A mintákon Western blot analízist végeztünk (Rácz et al. 2007). A membránokat 4 °C-on 12 órán át a következő antitestekkel kezeltük: foszfospecifikus anti-Akt-1 Ser473 (1:1000 higítás; R&D Systems, Budapest), foszfospecifikus anti-ERK1/2 Thr202/Tyr204 (1:1000 higítás; R&D Systems, Budapest) és anti-Aktin (1:5000 higítás; Sigma-Aldrich Chemical Co., Budapest). A membránokat 6 alkalommal 5 percig Tris puffert tartalmazó fiziológiás sóoldatban mostuk (pH= 7,5), amely 0,2 % Tween-et és kecskében termelt anti-nyúl tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitestet tartalmazott (higítás: 1:3000, Biorad, Budapest). Az antigén-antitest komplexet kemoluminescenciával tettük láthatóvá. Az eredményeket NIH ImageJ programmal értékeltük. A kísérletet minimum 4 alkalommal ismételtük. Statisztikai analízis Anova próbával történt, melyet Bonferroni post hoc analízis követett. Szignifikánsnak tekintettük az eredményeket, amennyiben $p < 0,05$.

III.2. Corneális sebgyógyulás, eredmények

6 órával a cornea sérülése után a gyógyulási folyamat a fluoresceinnel festett szemeken valamennyi állatban jól látható volt. A kontroll corneákban a sebgyógyulás a sebszélektől koncentrikusan zajlott (III/1. ábra). A sérült terület a Spot advance programmal számolva szignifikánsan kisebb volt az 5 ill. 10 µg PACAP27-tel kezelt corneákban, mint a kontroll szemekben (III/2. ábra). A hámosodás mértéke kb. 20% ($p < 0,05$) és 25% ($p < 0,01$) az 5 és 10 µg PACAP-pal kezelt szemeken. A PACAP kisebb dózisa (1 µg) szintén csökkentette a sérülés méretét (15%), de ez nem volt szignifikáns, összevetve a kontroll corneákkal. Ezeket az eredményeket a rutin szövettani vizsgálat is megerősítette (III/1. ábra).

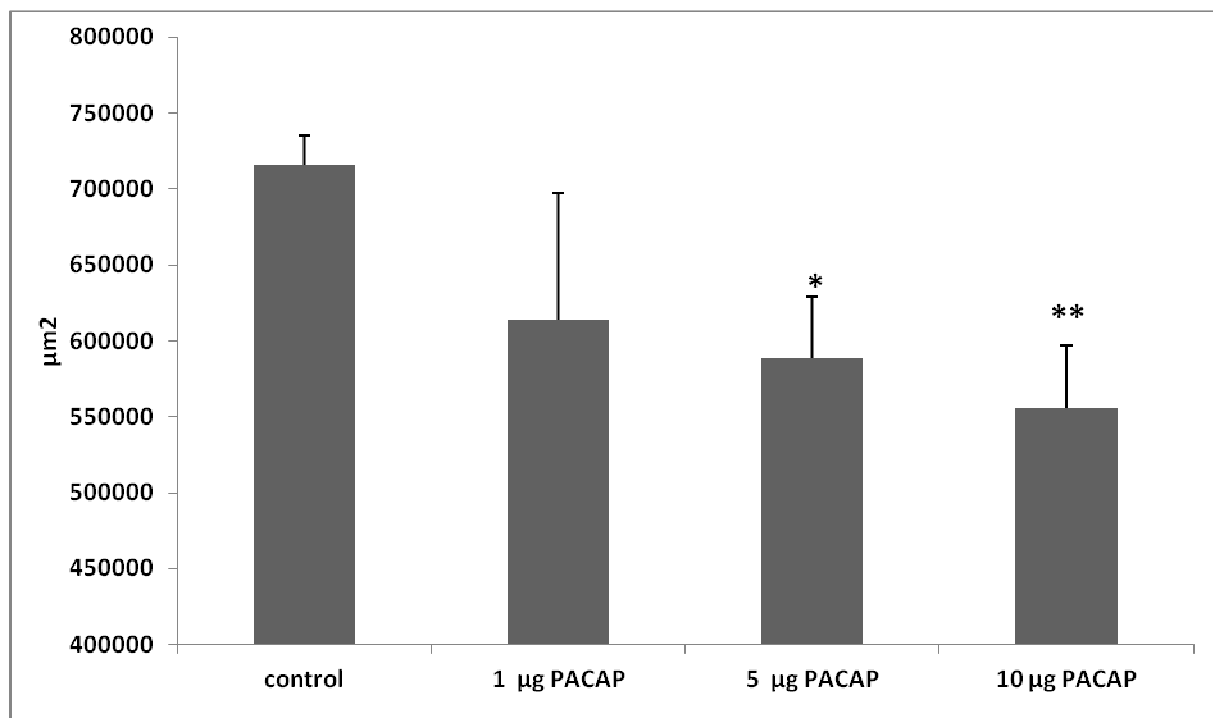
Az ERK1/2 és Akt foszforilációja

Mind az Akt, mind az ERK1/2 foszforilációja alacsony szinten maradt a normál corneákban (III/3. ábra). Az ERK1/2 foszforilációja szignifikánsan megemelkedett cornea abráziót követően. A foszforilációt PACAP27 adása szignifikánsan fokozta mind a sértetlen, mind a sértett corneákban. Az Akt foszforilációját önmagában a sérülés nem fokozta, de PACAP27 szignifikánsan stimulálta a foszforilációját mind az intakt, mind a sérült mintákban.

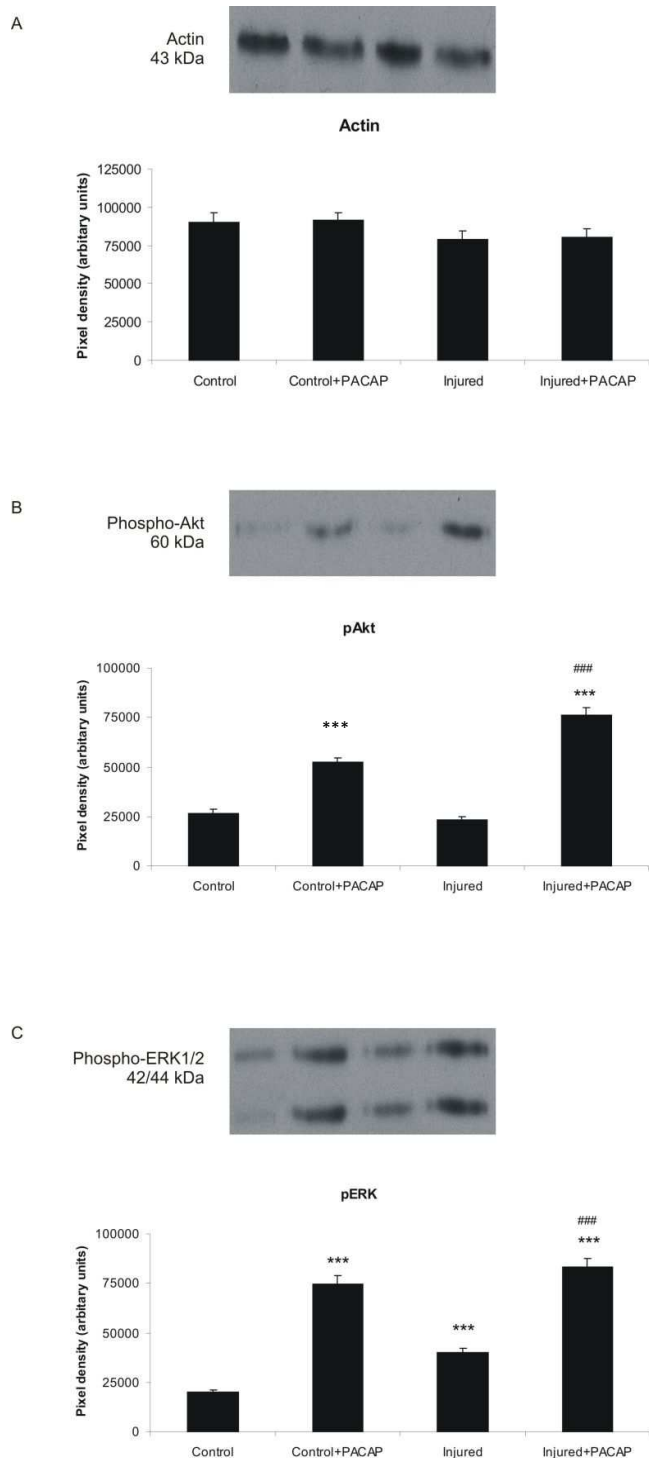


III/1. ábra: (A-D): Fluoresceinnel festett cornea fotói. A: Intakt szem képe az abrázió helyének jelölésével. B: A kontroll, vivőanyaggal kezelt cornea 6 órával a sérülés után. C: 5 μg PACAP27-tel kezelt cornea, 6 órával a sérülés után. D: 10 μg PACAP27-tel kezelt cornea, 6 órával a sérülés után (13x-os nagyítás). A szaggatott vonal jelzi a sérülés eredeti határát, a folyamatos vonal a még nem hámosodott cornea területét mutatja. E-F: a haematoxin-eosinnal festett cornea mikroszkópos fotója az

epithelsérülésről 6 órával az abrázió után a kontroll (B) és az 5 µg PACAP27-tel kezelt corneában (C) (aránymérték: 50µm).



III/2. ábra: Az oszlopok a cornea hámsérülés kiterjedését mutatják 6 órával az abrázió után a kontroll, és a különböző koncentrációjú PACAP27 kezelés mellett. Az adatokat az átlag $\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$



III/3. ábra: Cornea sérülés és PACAP kezelés hatása az Akt és ERK aktivációra. Reprerzentatív immunoblot képek és kvantitavív értékelésük. (A): Módszer kontroll actin; (B) Akt foszforiláció; (C): ERK1/2 foszforiláció. *** $p < 0,001$ versus kontroll, ### $p < 0,001$ vs sérült cornea

III.3. Megbeszélés

Korábban nem volt ismeretes, hogy a PACAP hatással lenne a cornea epitheliális regenerációjára. Vizsgálatunkban a lokális PACAP27 kezelés serkentette a corneális sebgyógyulást. Számos vizsgálat bizonyítja, hogy a PACAP elsősorban PAC1 receptorokon keresztül fejti ki ezen citoprotektív hatását (Dejda et al. 2008; Somogyvári-Vigh et Reglődi 2004; Vaudry et al. 2009). A cAMP indukálta folyamatok fontos szerepet játszanak a corneális sebgyógyulásban és homeosztázisban (Grueb et al. 2008; Nakamura et Nishida 2003). A cAMP fokozni tudja a növekedési faktorok hatását, ezt epidermális növekedési faktor és corneális epidermális migráció kapcsolatában írták le (Nakamura et Nishida 2003). Számos növekedési faktor esetében igazolódott, hogy fontos szerepük van a cornea sebgyógyulásában (Baldwin et Marshall 2002; Lyu et Joo 2005; Saika et al. 2004; Yu et al. 2010).

A foszfatidil-inositol-3-kinase (PI3K)-Akt útvonalak és a mitogén aktivált protein kinase (MAPK) család a corneális sebgyógyulás fő mediátorai (He et al. 2006). Az Akt aktivitását írták le számos olyan növekedési faktor működésekor (inzulin-szerű növekedési faktor 1,2 típusa, epidermális növekedési faktor, hepatocita növekedési faktor), melyek a corneális mitózisra, migrációra és sebgyógyulásra hatnak (Kakazu et al. 2004; Yanai et al. 2006). Ehhez hasonlóan a MAPK család tagjai, beleértve az ERK1/2-t is, fontos szerepet játszanak e folyamatokban. Igazolták, hogy a gliasejt eredetű növekedési faktor (GDNF) ERK1/2-t indukál a cornea epithelsejtjeiben (Yu et al. 2001). A PACAP erőteljes cAMP stimuláló hatását már ismerjük, de az ERK foszforilációját serkentő hatását is leírták retinában (Rácz et al. 2006), endothel sejtekben (Rácz et al. 2007), astrocytákbán (Hashimoto et al. 2003), corticalis neuronokban (Stumm et al. 2007) és kisagyi szemcsesejtékben (Vaudry et al. 2002). Igazolták a PACAP Akt foszforilációt fokozó hatását cardiomyocytákbán (Rácz et al. 2008), monocytákbán (El Zein et al. 2007), és szimpatikus neuron sejtekben (May et al. 2010).

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

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

IV.1. Anyagok és módszerek

Kísérleteinkben felnőtt hím Wistar patkányokat (250-300 gramm) használtunk az állatetikai bizottság engedélyében foglaltak szabályok betartásával (BA02/2000-20/2006). Általános anesztéziában (pentobarbital, Nembutal, Sanofi-Phylaxia, Hungary) pupillatágítást végeztünk 1 csepp 5%-os phenylephrinnel és egy csepp cyclopentolattal (10 mg/ml). A cornea kiszáradását lassú áramlású fiziológiás sóoldattal előztük meg. Az UV-A expozíció előtt 570 nm hullámhosszúságú fényrel pozicionálást és fókuszálást végeztünk, a retina besugárzását a Calkins és Hochheimer (Calkins et Hochheimer 1980) által leírt módszerrel számítottuk ki. Az UV-A sugárzás 45 percig (315-400 nm, 1.5 mW/cm²) tartott, XLPS-10 típusú Xenon lámpával (MSZ 808, Hungary) (IV/I. ábra). Közvetlenül utána 100 pmol PACAP38-at 5 µl fiziológiás sóoldatban feloldva intravitreálisan (IV/2. ábra) adtuk a jobb szembe (n=22). A másik, kontroll szembe 5 µl vivőanyagot adtuk. A besugárzást követő 1, 2 vagy 7 nappal az állatokat túlaltatás után enucleáltuk, a szemeket hideg foszfát puffer fiziológiás sóoldatba raktuk és foszfátpufferben oldott 4%-os paraformaldehidben fixáltuk (Sigma, Hungary). A szöveteket Durcupam ACM gyantába (Fluka, Switzerland) ágyasztuk be, 2 µm-es szeletekre vágtuk és toluidin kézzel megfestettük (Sigma, Hungary). A metszeteket Depex közegben rögzítettük és Nikon Eclipse 80 típusú mikroszkóppal vizsgáltuk meg. Digitális CCD kamerával Spot program segítségével fényképeket készítettünk a megfelelő retinaterületekről. A képek feldolgozásához Adobe Photoshop 7.0 programot használtunk. A méréseket NIH Image 1.55 programmal végeztük. A mérési minták minimum 3 állatból származtak, preparátumonként legalább 6-6 szövetblokkot tartalmaztak (n=2-5 mérés 1 szövetblokkon belül). A következő paramétereket mértük: (1) a retina vastagsága a külső és belső határhártya között (OLM-ILM); (2) a külső és belső magvas, a külső és belső rostos réteg vastagsága (ONL, INL, OPL, IPL); (3) az 500 µm²-re eső sejtek

száma az ONL-ben; (4) az $500 \mu\text{m}^2$ -re jutó sejtek száma az INL-ben; (5) a ganglion sejtek rétegében (GCL) a $100 \mu\text{m}$ retinahosszra jutó sejtek száma. Statisztikai értékelést ANOVA teszttel végeztünk, melyet Tukey-B post hoc analízis követett.



IV/1. ábra: XLPS-10 típusú Xenon lámpa



IV/2. ábra: Intravitreális injectio

IV.2. Eredmények

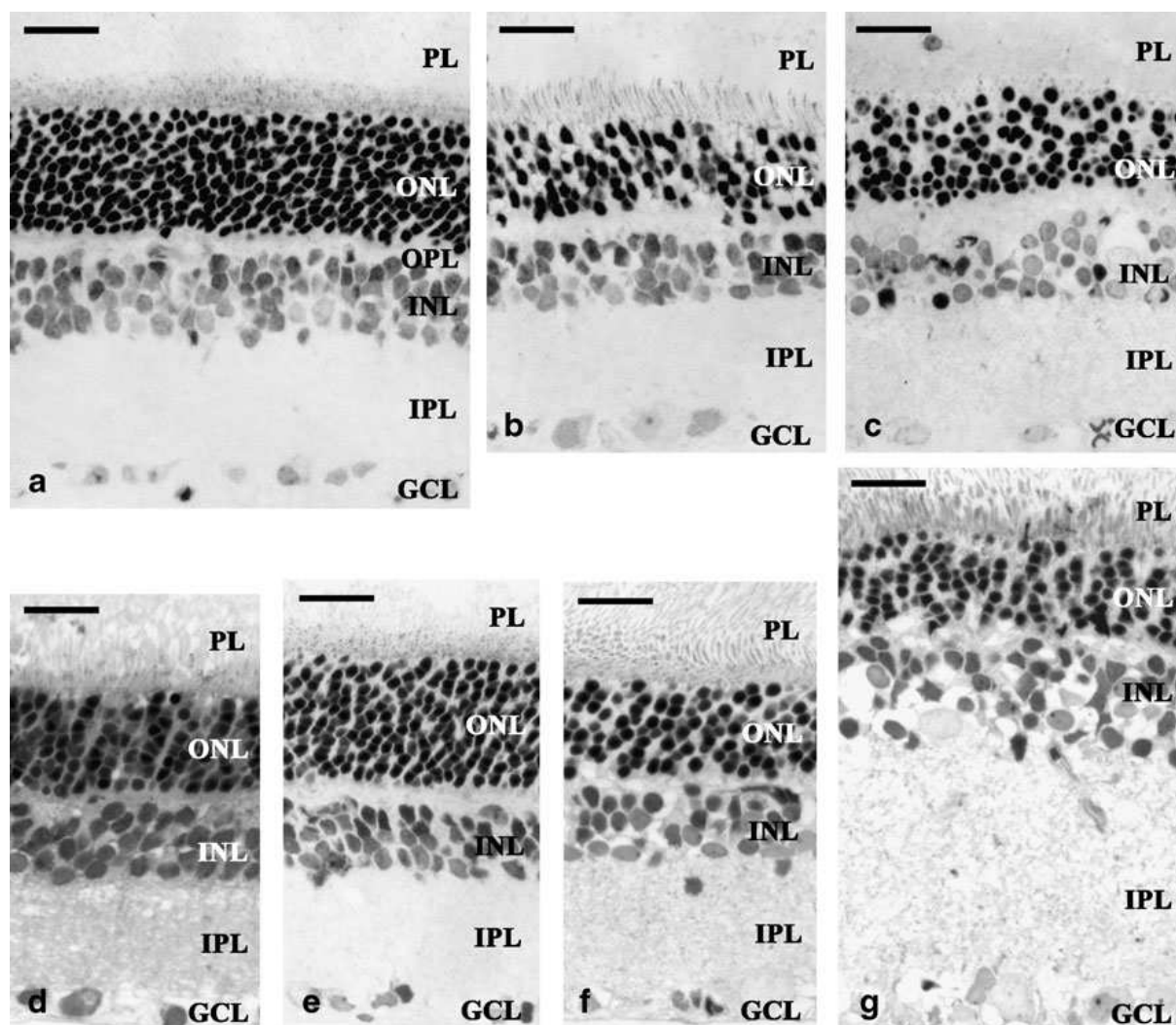
A kontroll készítményekben a patkányretina minden rétege jól elkülöníthető volt. Megfigyelhető a ganglionsejtek rétege, a belső rostos réteg, melyet a bipoláris sejtek, amacrin és horizontális sejtek rétege követ (belső magvas réteg). Ezt követi a vékony külső rostos réteg és a photoreceptorok sejttestjeinek több sora (külső magvas réteg). Végül következik a photoreceptor réteg és a pigmentepithelium (PE) (IV/3.a. ábra). Már 1 nappal a besugárzás után megfigyelhető a retina károsodása (IV/3.b. ábra). Főleg az ONL-ben számos sejt sérült, de üres sejttesteket találtunk az INL-ben is. Az ONL, INL sejteinek száma szignifikánsan csökkent (42% és 27% a kontrollhoz viszonyítva). A retina rétegeinek vastagsága csökkent. Az intravitreális PACAP kezelés hatására az ONL megőrizte struktúráját és a GCL sejtszáma is változatlan maradt (IV/3.d. ábra).

2 nappal a besugárzás után degeneratív elváltozások figyelhetők meg az ONL és INL rétegekben. A sejtszám mindkét rétegben markánsan csökkent (42% és 47%) a kontroll retinához képest. Piknotikus sejteket, üres sejttesteket láthatunk mindkét magvas rétegben (IV/3.c. ábra). Intravitreális PACAP szignifikánsan emelte az ONL és INL sejtszámát (70% és 74%) (IV/3.e. és IV/4. ábra).

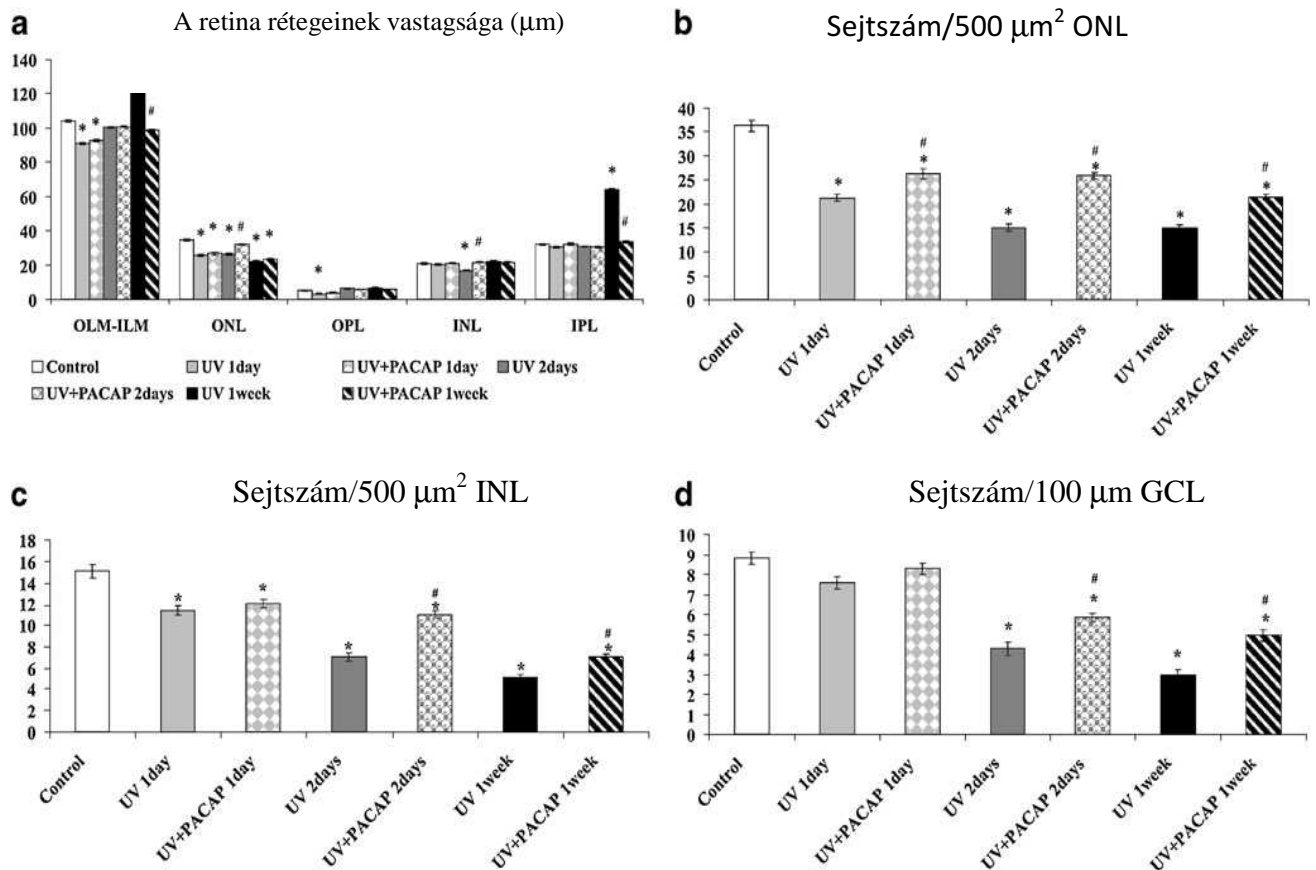
A GCL-ben a retina 100 μm -ére jutó sejtszám kb. 50%-a volt a normál retináénak. A PACAP-pal kezelt szemekben a GCL-ben a sejtek száma szignifikánsan emelkedett az UV-A sugárzásnak kitett retinához képest. (IV/4. ábra).

1 héttel a diffúz UV-A sugárzást követően súlyos károsodást figyeltünk meg a retinában. Az ONL-ben és az INL-ben a degeneráció jeleit láthatjuk, piknotikus sejteket, üres sejttesteket és az egyes rétegek struktúra vesztését. A photoreceptorok külső tagjai is szignifikánsan károsodtak. Az IPL erősen megduzzadt és ebben a rétegben a bipoláris sejtek károsodását jelző denz pontokat lehet látni (IV/3.g. ábra). A sejtek száma szignifikánsan csökkent az ONL-ben (42%), az INL-ben (33%) és a GCL-ben (34%) (IV/4. ábra).

Az intravitreális PACAP kezelés szignifikáns védelmet biztosított, a retina rétegei jól kivehetők voltak, a magvas rétegekben a sejtek épek maradtak, az IPL duzzadása csökkent (IV/3.f. ábra). Az ONL-ben a sejtszám 60%-ra, az INL-ben 47%-ra, a GCL-ben 56%-ra nőtt és a retina vastagsága is szignifikánsan nőtt (IV/4. ábra).



IV/3. ábra: Az UV-A sugárzás indukálta retinadegeneráció szövettani feldolgozása: a: patkányretina rétegei kontroll állatból, b,c,g: diffúz UV-A sugárzás hatása a retinára, d,e,f: diffúz UV-A sugárzás és intravitreális PACAP együttes hatása. A besugárzás után 1 nappal (b), 2 nappal (c) és 1 héttel (g) különböző fokú károsodást találtunk. Az intravitreális PACAP injectio jelentősen csökkentette az UV-A okozta károsodás mértékét a besugárzás után 1 nappal (d), 2 nappal (e) és 1 héttel (f). Aránymérték: 20 μ m.



IV/4. ábra: Az UV-A és az UV-A + PACAP kezelt retinák morphometriai vizsgálata. A diffúz UV-A besugárzás okozta retina degeneráció mértéke és a PACAP neuroprotektív hatása a retina rétegeinek vastagsága alapján; a: OLM-ILM, ONL, OPL, INL és IPL keresztmetszet, valamint a sejtek száma/ $500 \mu\text{m}^2$ b: ONL-ben, c: az INL-ben és d: a $100 \mu\text{m}$ GCL hosszban. * $p < 0,05$ a kontroll retinához képest, # $p < 0,05$ a diffúz UV-A besugárzott retinához képest.

IV.3. Megbeszélés

Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a PACAP protektív hatású az UV-A sugárzás kiváltotta retinális károsodással szemben. A sérülés fő jelei a photoreceptorok degenerációja, amit sejtszámuk csökkenése mutatott. Későbbi időpontokban a bipoláris és ganglionsejtek száma is jelentősen csökkent. A fenti változások mindegyike csökkenthető volt PACAP intravitreális adásával. Emellett a

neuroprotektív hatás mellett megfigyeltük, hogy a PACAP szignifikánsan csökkentette az oedémát 7 nappal az irradiációt követően. E hatás mechanizmusa ismeretlen, de a közelmúltban ischaemiás agyi oedémánál figyelték meg ugyanezen hatást (Nakamachi et al. 2010). A PACAP indukálta retinoprotekció általános neuroprotektív mechanizmusra utal ebben az esetben is, és nem fenotípus specifikus sejtprotekcióra (Atlasz et al. 2008, 2010). A retina egyes neuronjait jelző sejtmarkereket használva nem találtak korrelációt a PACAP sejtípus specificitása és protektív hatása között sem MSG, sem ischaemia által kiváltott degenerációban. A PACAP retinát érő különböző noxákkal szembeni hatékonysága szintén támogatja ezt a megfigyelést. Jelen vizsgálatunk - melyben először mutattuk ki a PACAP diffúz UV-A besugárzás elleni védő hatását – is azt bizonyítja, hogy a PACAP széleskörű retinoprotektív hatással bír. Mindezek alapján remény van arra, hogy későbbiekben a PACAP-ot sikeresen lehet alkalmazni a retinát ért bizonyos károsodásokkal szemben.

A PACAP retinoprotektív hatásának feltételezett mechanizmusa

Számos tanulmány vizsgálta a PACAP indukálta sejtvédelem hatásmechanizmusát (Vaudry et al. 2009; Somogyvári-Vigh et Reglődi 2004; Falluel-Morel et al. 2007). A PACAP protektív hatását döntően PAC1 receptorokon keresztül közvetíti, magában foglalva a PKA és PKC utakat. Ebben a hatásban döntő szerepe van a PKA/MAPK utaknak és az apoptotikus caspase-3 gátlásnak.

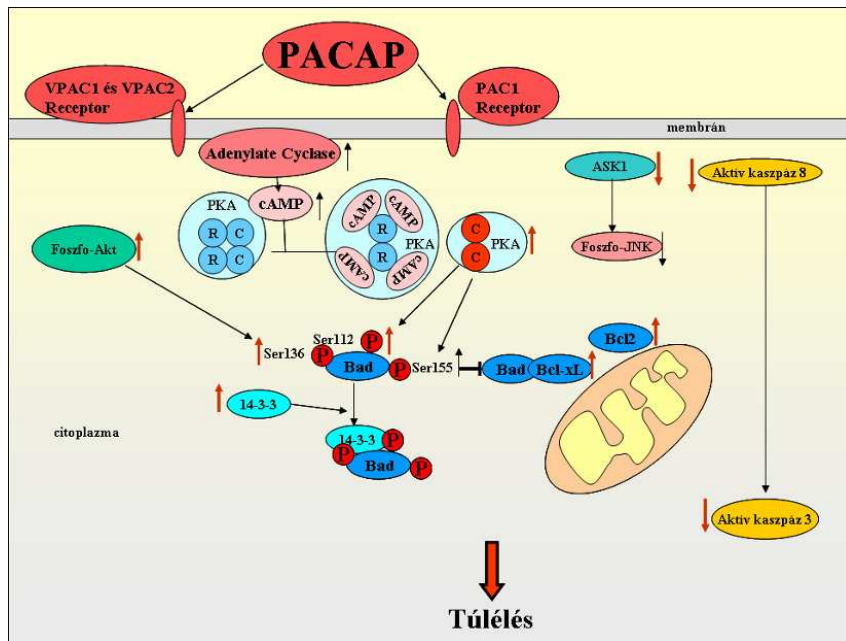
A retinában ennek a komplex neuroprotektív mechanizmusnak a jelenlétét igazolták az MSG indukálta degenerációval. MSG kezelés hatására a proapoptotikus folyamatok felerősödtek, az antiapoptotikusak lecsökkentek. Western blot analízissel bizonyították a c-JUN-N-terminál-kináz (JNK) proapoptotikus molekula, az apoptózist indukáló faktor (AIF) és a caspase-3 aktiválódását, valamint a mitokondriális citokróm-c kiáramlását a citoszolba (Rácz et al. 2007; Rácz et al. 2006a, 2006b). A protektív hatású PKA, CREB és az extracelluláris szignál-regulálta protein-kináz

(ERK) foszforilációja erősen lecsökkent. Az intravitreális PACAP kezelés e változásokat ellensúlyozza és hatása PACAP6-38-cal gátolható.

Az MSG kezelés utáni változások során a PACAP eddig ismeretlen neuroprotektív hatását is leírták a PKA/Bad/14-3-3 protein kaszkádra (IV/5. ábra). Ha a 14-3-3 protein megköti a foszforilált Bad-et, az így nem tudja megkötni - és ezzel inaktiválni - a Bcl család protektív hatású tagjait, a Bcl-xL-t és a Bcl-2-t. Az MSG csökkenti a 14-3-3 fehérje szintjét és a Bad foszforilációjának a mértékét, melyeket a PACAP szignifikánsan fokoz (Rácz et al. 2007).

Mindezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a PACAP képes ellensúlyozni a glutamát-indukálta antiapoptotikus jelátvitelnek a csökkenését és a proapoptotikus jelátvitelnek a növekedését. Ezek a megfigyelések alátámasztják a PACAP retinában mutatott citoprotektív hatásait és magyarázzák a más vizsgálatokban ismertetett sejt-szubsztípus-specificitás hiányát.

A PACAP fokozza az interleukin-6 szekrécióját a Müller-féle gliasejtekben (Nakatani et al. 2008). Az IL-6 az idegrendszer számos patológiás folyamatában, így az agyi és retinális ischemiában is neuroprotektív hatással bír, annak ellenére, hogy egy gyulladásszerű citokin (Ohtaki et al. 2008; Nakatani et al. 2006; Pucci et al. 2008). Agyi ischaemiás modellekben a PACAP IL-6 stimuláló hatását figyelték meg, míg a neuroprotektív hatás hiányzott IL-6 knock out egerekben. Ahhoz, hogy a PACAP neuroprotektív hatásainak pontos mechanizmusát megfejtjük, még számos vizsgálatra lesz szükség, de az eddigi eredmények alapján ígéretes retinoprotektív szer lehet.



IV/5. ábra: A PACAP lehetséges hatásmechanizmusa

V. Új eredmények összefoglalása

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

VI. Irodalomjegyzék

- Andley U.P. et al.: Action spectrum for cytotoxicity in the UVA- and UVB-wavelength region in cultured lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 367-373.
- Arimura A.: PACAP: the road to discovery. *Peptides* 2007; 28: 1617-1619.
- Arimura A.: Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol* 1998; 48: 301-331.
- Atlasz T. et al.: PACAP-mediated neuroprotection of neurochemically identified cell types in MSG-induced retinal degeneration. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 97-104.
- Atlasz T. et al.: Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP1-38) and its fragments on retinal degeneration induced by neonatal MSG treatment. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1163: 348-352.
- Atlasz T. et al.: Evaluation of the protective effects of PACAP with cell-specific markers in ischemia-induced retinal degeneration. *Brain Res Bull* 2010; 81: 497-504.
- Babai N. et al.: Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070: 149-155.
- Babai N. et al.: Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retina degeneration. *Neurotox Res* 2005; 8: 227-322.
- Bagnoli P. et al.: Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals. *Histol Histopathol* 2003; 18: 1219-1242.
- Baldwin H.C., Marshall J: Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: a review. *Acta Ophthalmol Scand* 2002; 80: 238-247.
- Beaule C. et al.: Temporally restricted role of retinal PACAP: integration of the phase-advancing light signal to the SCN. *J Biol Rhythms* 2009; 24: 126-134.

- Borba J.C. et al.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) can act as a determinant of the tyrosine hydroxylase phenotype of dopaminergic cells during retina development. *Dev Brain Res* 2005; 156: 193-201.
- Bourgault S. et al.: Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Curr Pharm Des* 2011,17:1002-1024.
- Börzsei R. et al.: Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 (PACAP-38) in human plasma and milk. *Eur J Endocr* 2009; 160: 561-565.
- Buschke W. et al.: Effects of ultraviolet irradiation on corneal epithelium: mitosis, nuclear fragmentation, post-traumatic cell movements, loss of tissue cohesion. *J Comp Physiol* 1945; 26: 147-164.
- Calkins J.L., Hochheimer B.F.: Retinal light exposure from ophthalmoscope, slit lamps, and overhead surgical lamps. An analysis of potential hazards. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980; 19: 1009-1015.
- Calvert P.A. et al.: Autonomic control of submandibular protein secretion in the anaesthetized calf. *Exp Physiol* 1998; 83: 545-556.
- Correia O. et al.: Bullous photodermatosis after lomefloxacin. *Arch Dermatol* 1994, 130: 808-809.
- Csernus V. et al.: The effect of PACAP on rhythmic melatonin release of avian pineals. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 135: 62-69.
- D'Agata V. et Cavallaro S.: Functional and molecular expression of PACAP/VIP receptors in the rat retina. *Mol Brain Res* 1998; 54: 161-164.
- Dejda A. et al.: Inhibitory effect of PACAP on caspase activity in neuronal apoptosis: a better understanding towards therapeutic applications in neurodegenerative diseases. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 26-37.
- Dillon J.: The photophysics and photobiology of the eye. *J Photochem Photobiol* 1991; 10: 23-40.
- Elsas T. et al.: Pituitary adenylate cyclase activating peptide-immunoreactive nerve fibers in the cat eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234: 573-580.

- El Zein N. et al.: The neuropeptide pituitary adenylyl cyclase activating protein stimulates human monocytes by transactivation of the Trk/NGF pathway. *Cell Signal* 2007; 19: 152-162.
- Falluel-Morel A. et al.: The neuropeptide pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide exerts anti-apoptotic and differentiating effects during neurogenesis: focus on cerebellar granule neurones and embryonic stem cells. *J Neuroendocrinol* 2007; 19: 321-327.
- Faluhelyi N. et al.: Development of the circadian melatonin rhythm and the effect of PACAP on melatonin production in the embryonic chicken pineal gland. An in vitro study. *Regul Pept* 2004; 123: 23-28.
- Fukiage C. et al.: PACAP induced neurite outgrowth in cultured trigeminal ganglion cells and recovery of corneal sensitivity after flap surgery in rabbits. *Am J Ophthalmol* 2007; 143: 255-262.
- Gilbard J.P. et al.: Stimulation of tear secretion by topical agents that increase cyclic nucleotide levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 1381-1388.
- Grueb M. et al.: Adrenergic regulation of cAMP-protein kinase A pathway in corneal epithelium and endothelium. *Ophthalmic Res* 2008; 40: 322-328.
- Halliwel B. et al.: The resistance of transferrin, lactoferrin and caeruloplasmin to oxidative damage. *Biochem J* 1988; 256: 311-312.
- Hannibal J., Fahrenkrug J.: Target areas innervated by PACAP immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell and Tissue Res* 2004; 316: 99-113.
- Hashimoto H. et al.: Distribution of the mRNA for a pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 1996; 371: 567-577.
- He H. et al.: Signaling-transduction pathways required for ex vivo expansion of human limbal explants on intact amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 151-157.
- Hightower K., McCready J.: Mechanisms involved in cataract development following near-ultraviolet radiation of cultured lenses. *Curr Eye Res* 1992; 11: 679-689.

- Hughes A., Wassle H.: An estimate of image quality in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979, 18: 878-881.
- Izumi S. et al.: Ultrastructural localization of PACAP immunoreactivity in the rat retina. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 921: 317-320.
- Jarkman S. et al.: Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on the direct-current electroretinogram of the rabbit eye. *Ophthalmol Res* 1998; 30: 199-206.
- Joo K.M. et al.: Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol* 2004; 476: 388-413.
- Jose J.G.: Posterior cataract induction by UV-B radiation in albino mice. *Exp Eye Res* 1986; 42: 11-20.
- Józsa R. et al.: Distribution and daily variations of PACAP in the chicken brain. *Peptides* 2001; 22: 1371-1377.
- Kakazu A. et al.: HGF protects corneal epithelial cells from apoptosis by the PI-3K/Akt-1/Bad- but not the ERK1/2-mediated signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 3485-3492.
- Kamaishi H. et al.: Multiple signal pathways coupling VIP and PACAP receptors to calcium channels in hamster submandibular ganglion neurons. *Autonomic Neuroscience* 2004; 111: 15-26.
- Kapicioglu Z. et al.: Effect of a somatostatin analogue (SMS 201-995) on tear secretion in rats. *Intern Ophthalmol* 1998; 22: 43-45.
- Kays W.T., Piatigorsky J.: Aldehyde dehydrogenase class 3 expression: identification of cornea-preferred gen promoter in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13594-13599.
- Kleiman N.J. et al.: Ultraviolet light induced DNA damage and repair in bovine lens epithelial cells. *Curr Eye Res* 1990; 9: 1185-1193.
- Kovács I. et al.: Substance P released from sensory nerve endings influences tear secretion and goblet cell function in the rat. *Neuropeptides* 2005; 39: 395-402.

- Köves K. et al.: Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 1990; 127: 264-271.
- Köves K. et al.: PACAP and VIP in the photoneuroendocrine system. From the retina to the pituitary gland. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 921: 321-326.
- Kubrusly R.C. et al.: Expression of functional receptors and transmitter enzymes in cultured Muller cells. *Brain Res* 2005; 1038: 141-149.
- Kurpakus M.A. et al.: Expression of the 55-kD-64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 448-456.
- Kustos I. et al.: Effect of iron restriction on outer membrane protein composition of *Pseudomonas* strains studied by conventional and microchip electrophoresis. *Electrophoresis* 2005; 26: 3789-3795.
- Laburthe M. et al.: Class II G protein/coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 2007; 28: 1631-1639.
- Lang B. et al.: GABAergic amacrine cells and visual function are reduced in PAC1 transgenic mice. *Neuropharmacology* 2010; 58: 215-225.
- Lebon A. et al.: Identification of proteins regulated by PACAP in PC12 cells by 2D gel electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070: 380-387.
- Lu L.: Stress-induced corneal epithelial apoptosis mediate by K⁺ channel activation. *Prog Retin Eye Res* 2006; 25: 515-538.
- Lyu J., Joo C.K.: Wnt-7a upregulates matrix metalloproteinase-12 expression and promotes cell proliferation in corneal epithelial cells during wound healing. *J Biol Chem* 2005; 280: 21653-21660.
- Markhotina N. et al.: Contractility of retinal pericytes grown on silicone elastomer substrates is through a protein kinase A-mediated intracellular pathway in response to vasoactive peptides. *IET Nanobiotechnol* 2007; 1: 44-51.
- May V. et al.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PAC1/HOP1 receptor activation coordinates multiple neurotrophic

- signaling pathways: Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase gamma and vesicle endocytosis for neuronal survival. *J Biol Chem* 2010; 26: 9749-9761.
- Mirfendereski S. et al.: Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in salivary glands of the rat: origin, and secretory and vascular effects. *Acta Physiol Scandinav* 1997; 160: 15-22.
- Mustafa T., Eiden L.E.: Secretin superfamily: PACAP, VIP, and Related Peptides. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Ed: Lajtha A. Springer. 2008; pp: 463-500.
- Nagano T. et al.: Effects of substance P and IGF-1 in corneal epithelial barrier function and wound healing in a rat model of neurotrophic keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 4: 3810-3815.
- Nagy A.D. et Csernus V.J.: The role of PACAP in the control of circadian expression of clock genes in the chicken pineal gland. *Peptides* 2007; 28: 1767-1774.
- Nakamachi T. et al.: Endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is involved in suppression of edema in the ischemic brain. *Acta Neurochir Suppl* 2010; 106: 43-46.
- Nakamura M., Nishida T.: Potentiation by cyclic AMP of the stimulatory effect of epidermal growth factor on corneal epithelial migration. *Cornea* 2003; 22: 355-358.
- Nakamura S. et al.: Protective effect of D-beta-hydroxybutyrate on corneal epithelia in dry eye conditions through suppression of apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4682-4688.
- Nakatani M. et al.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates production of interleukin-6 in rat Muller cells. *Peptides* 2006; 27: 1871-1876.
- Netto M.V. et al.: Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea* 2005; 24: 509-522.
- Newell F.W.: *Ophthalmology*. Mosby Company 1982.

- Nilsson S.F.: PACAP-27 and PACAP-38: Vascular effects in the eye and some other tissues in the rabbit. *Eur J Pharmacol* 1994; 253: 17-25.
- Nilsson S.F. et al.: Characterization of ocular receptors for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and their coupling to adenylate cyclase. *Exp Eye Res* 1994; 58: 459-467.
- Ohtaki H. et al.: Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 16-25.
- Olianas M.C. et al.: Expression of pituitary adenylate cyclase polypeptide (PACAP) receptors and PACAP in human fetal retina. *J Neurochem* 1997; 69: 1213-1218.
- Olianas M.C. et al.: Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in Y-79 human retinoblastoma cells. *J Neurochem* 1996; 67: 1293-1300.
- Onali P. et Olianas M.C.: PACAP is a potent and highly effective stimulator of adenyl cyclase activity in the retinas of different mammalian species. *Brain Res* 1994; 641:132-134.
- Penn J.S. et al.: Effect of light history on retinal antioxidants and light damage susceptibility in the rat. *Exp Eye Res* 1987; 44: 779-788.
- Pucci S. et al.: Neuroprotection: VEGF, IL-6, and clusterin: the dark side of the moon. *Progr Brain Res* 2008; 173: 555-573.
- Rábl K. et al.: PACAP inhibits anoxia-induced changes in physiological responses in horizontal cells in the turtle retina. *Regul Pept* 2002; 109: 71-74.
- Rácz B. et al.: The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involves inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul Pept* 2006a; 137: 20-26.
- Rácz B. et al.: Involvement of ERK and CREB signaling pathways in the protective effect of PACAP on monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Ann N Y Acad Sci* 2006b; 1070: 507-511.
- Rácz B. et al.: 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. *Neurotox Res* 2007; 12: 95-104.

- RÁCZ B. et al.: Effects of PACAP on the circadian changes of signaling pathways in chicken pinealocytes. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 220-226.
- Reglődi D. et al.: Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 962-972.
- Rékási Z. et Czömpöly T.: Accumulation of rat pineal serotonin N-acetyltransferase mRNA induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in vitro. *J Mol Endocrinol* 2000; 28: 19-31.
- Rosen J.E. et al.: A fluoroquinolone antibiotic with a methoxy group at the 8 position yields reduced generation of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine after ultraviolet-A irradiation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, 145: 381-387.
- Sakamoto K. et al.: Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 3129-3136.
- Saika S. et al.: Sonic hedgehog expression and role in healing corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2577-2585.
- Schein O.D.: Phototoxicity and the cornea. *J Natl Med Assoc* 1992; 84: 579-583.
- Seki T. et al.: Electron microscopic observation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-containing neuron in the rat retina. *Peptides* 2000a; 21: 109-113.
- Seki T. et al.: Gene expression for PACAP receptor mRNA in the rat retina by in situ hybridization and in situ RT-PCR. *Ann N Y Acad Sci* 2000b; 921: 366-369.
- Seki T. et al.: Distribution and ultrastructural localization of a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett* 1997; 238: 127-130.
- Seki T. et al.: PACAP stimulates the release of interleukin-6 in cultured rat Muller cells. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070: 535-539.
- Seki T. et al.: Neuroprotective effects of PACAP against kainic acid-induced neurotoxicity in rat retina. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070: 531-534.

- Sherwood N.M. et al.: The origin and function of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)/ glucagon superfamily. *Endocr Rev* 2000; 21: 619-670.
- Shioda S. et al.: In memory of our teacher, dr Akira Arimura. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 3-7.
- Shoge K. et al.: Protective effects of vasoactive intestinal peptide against delayed glutamate neurotoxicity in cultured retina. *Brain Res* 1998; 809: 127-136.
- Shoge K. et al.: Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res* 1999; 839: 66-73.
- Silveira M.S., et al.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2002; 277: 16075-16080.
- Skoglosa Y. et al.: Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain. *Mol Brain Res* 1999; 65: 1-13.
- Somogyvári-Vigh A., Reglődi D.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. Review. *Curr Pharm Des* 2004; 10:2861-2889.
- Son Y.J. et al.: TTF-1 expression in PACAP-expressing retinal ganglion cells. *Mol Cells* 2007; 23: 215-219.
- Staines D.R.: Does autoimmunity of endogenous vasoactive neuropeptides cause retinopathy in humans? *Med Hypotheses* 2008; 70: 137-140.
- Szabadfi K. et al.: Early postnatal enriched environment decreases retinal degeneration induced by monosodium glutamate treatment. *Brain Res* 2009; 1259: 107-112.
- Szél A. et Röchlích P.: Two cone types of the rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Exp Eye Res* 1992; 55: 47-52.
- Tamás A. et al.: Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neurosci Lett* 2004; 372: 110-113.

- Yanai R. et al.: Correlation of proliferative and antiapoptotic effects of HGF, insulin, IGF-2, and EGF in SV40-transformed human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2006; 83: 76-83.
- Yoshitomi T. et al.: Effect of pituitary adenylate cyclase activating peptide on isolated rabbit iris sphincter and dilator muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 780-783.
- You L. et al.: Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)-induced migration and signal transduction in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2496-2504.
- Yu F.S. et al.: Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res Bull* 2010; 81: 229-235.
- Vaudry D. et al.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 269-32.
- Vaudry D. et al.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 2009; 61:283-357.
- Verna L.K. et al.: Inhibition by singlet oxygen quenchers of oxidative damage to DNA produced in cultured cells by exposure to a quinolone antibiotic and ultraviolet A irradiation. *Cell Biol Toxicol* 1998; 14: 237-242.
- Vincze E., Köves K.: A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerkezete, előfordulása és szerepe az élettani működésekben. *Orv Hetil* 2001; 142: 491-496.
- Wang Z.Y. et al.: Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase activating peptide in the rabbit eye. *Neuroscience* 1995; 69: 297-308.
- Wan J. et al.: Acute photoreceptor degeneration down-regulates melanopsin expression in adult rat retina. *Neurosci Lett* 2006; 400: 48-52.
- Wilson S.E. et al.: Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing process. *Exp Eye Res* 2007; 85: 305-311.
- Winkler B.S., Giblin F.J.: Glutathione oxidation in retina: effects on biochemical and electrical activities. *Exp Eye Res* 1983; 36: 287-297.

- Woodford B.J. et al.: Reduced and oxidized ascorbates in guinea pig retina under normal and light-exposed conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24: 862-867.
- Zagon I.S. et al.: Insulin treatment ameliorates impaired corneal reepithelization in diabetic rats. *Diabetes* 2006; 55: 1141-1147.
- Zhang X.Y. et al.: Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on IL-6, and MCP-1 expression in human retinal pigment epithelial cell line. *Curr Eye Res* 2005; 30: 1105-1111.
- Zrenner E: Light-induced damage to the eye. Review. *Fortschr Ophthalmol* 1990; 87: 45-51.

VII. A dolgozat alapjául szolgáló saját publikációk

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

PhD alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 11.189

Idézhető előadáskivonatok

1. Szapary L., Horvath B., Marton Zs., Alexy T., Demeter N., Szots M., Klabuzai A., Juricskay I., Gaal V., Czopf J., Toth K. Hemorheological disturbances in chronic phase cerebrovascular patients. Cerebrovasc Dis 2002; 13 (Suppl.3), 37
2. Szapary L., Szots M., Horvath B., Marton Zs., Alexy T., Kesmarky G., Klabuzai A., Juricskay I., Gaal V., Czopf J., Toth K. The effects of

cardiovascular risk factors on hemorheological parameters in patients with chronic cerebrovascular diseases. *Eur J Neurol* 2002; 9 (Suppl. 2), 169

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

Konferencia szereplések

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

Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Budapest 2003. Legjobb fiatal előadói díj

11. Szijártó Zs., Gaal V., Kuhn F., Kovacs B.: Intravitreal copper foreign body EVRS Kongresszus, Sopron 2003.
12. Gaál V., Kustos I., Szijártó Zs., Kocsis B.: Baktériumok műlencséken való megtapadásának vizsgálata és klinikai tapasztalatok. Magyar Műlencse Implantációs Társaság Kongresszusa, Keszthely 2004. Legjobb fiatal előadó 3. díj
13. Ertl T., Gyarmati J., Gaal V.: Relationship between hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. European Society for Developmental Perinatal and Paediatric Pharmacology 9th Biennial Congress., Marburg, Germany 2004.
14. Gaál V., Szijártó Zs., Kiss Gy.: Excimer laser kezelés után kialakuló ideghártya leválások. Magyar Műlencse Implantációs és Refraktív Sebészeti Társaság Kongresszusa, Keszthely 2005.
15. Gaál V., Gyarmati J., Szabó I., Schvöller M., Hermann L.: Hyperglycaemia lehetséges szerepe a ROP kialakulásában. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Szeged 2005.
16. Schvöller M., Szijártó Zs., Gaál V., Gaál J.: Ablatio retinae, mint a ROP késői szövődménye-*esetismertetés*. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Szeged 2005.
17. Szasz O., Horvath G., Faludi P., Szepes E., Varju C., Gaal V.: Seronegative spondylarthritis linked with acne inversa and scleritis. Deutsch-Ungarischen Dermatologischen Gesellschaft 6. Kongresszusa, Münster 2006.
18. Gaal V., Szijarto Zs., Kustos I., Kocsis B.: Microbiological aspects of bacteria causing acut postoperative endophthalmitis after cataract surgery. EVRS ASRS, Cannes 2006.
19. Szijarto Zs., Gaal V., Kuhn F., Kovacs B.: Prognosis of penetrating eye injuries with posterior segment intraocular foreign body. EVRS ASRS, Cannes 2006.

20. Schvöller M., Gaal V., Gaal J., Szijarto Zs.: Retinal detachment as a late complication of ROP, case report. Word ROP Meeting, Vilnius 2006.
21. Gaal V., Atlasz T., Babai N., Tamas A., Kiss P., Szalai M., Gabriel R., Koppan M., Reglodi D.: Morphology of the retina in toxic and hypoxic/ischemic retinal degeneration and possible protection by the neuropeptide PACAP in the neonatal rat. Joint Congress of SOE/AAO, Vienna, Austria 2007.
22. Gaál V., Kustos I., Kiss P., Márk L., Tamás A., Reglódi D.: A PACAP hatása a könnyfilm fehérje összetételére patkányban. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Debrecen 2007.
23. Gaál V., Szijártó Zs., Kovács B.: Zóna I retinopathia - kezelési eredmények, indikációk. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Debrecen 2007.
24. Gaal V., Kustos I., Kiss P., Mark L., Tamas A., Toth G., Reglodi D.: Effects of PACAP on protein composition of rat tear film. 8th Symposium on VIP, PACAP, and Related Peptides, Manchester and Burlington, Vermont, USA 2007.
25. Gaál V., Reglódi D., Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Hamza L., Ságvári O., Tamás A., Lubics A., Gábriel R.: A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) protektív hatása UV besugárzás indukálta retinális degenerációban. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Pécs 2008.
26. Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Reglodi D., Gaal V., Tamas A., Molnar A., Lubics A., Szabo K., Gabriel R.: The neuroprotective effects of PACAP in several models of neurodegeneration in the rat retina. 4th Pannonian Symposium on Central Nervous System Injury, Pécs 2008.
27. Atlasz T., Szabadfi K., Reglódi D., Kiss P., Gaál V., Tamás A., Tóth G., Szabó K., Molnár A., Gábriel R.: The neuroprotective effects of PACAP in several models of neurodegeneration in the rat retina. Magyar Idegtudományi Társaság XII. Konferenciája, Budapest 2009.
28. Atlasz T., Szabadfi K., Molnár A., Kiss P., Reglódi D., Márton Zs., Hamza L., Gaál V., Tamás A., Hild G., Nyitrai M., Gábriel R.: Effects of PACAP in

- different UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats. Magyar Idegtudományi Társaság XII. Konferenciája, Budapest 2009.
29. Atlasz T., Szabadfi K., Molnar A., Kiss P., Reglodi D., Marton Zs., Hamza L., Gaal V., Tamas A. Hild G., Nyitrai M., Gabriel R.: PACAP protects rat retina from UV-A radiation-induced degeneration. Satellite Symposium of the 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Yakushima, Japan 2009.
 30. Kiss P., Mark L., Gaal V., Reglodi D., Vaczy A., Tamas A., Helyes Zs., Hashimoto H., Baba A., Shintani N., Opsahl M., Narve B., Lubics A.: Investigation on the presence of PACAP in rodent and human tear film and its possible functions in rats and PACAP knockout mice. Satellite Symposium of the 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Yakushima, Japan 2009.
 31. Reglodi D., Kiss P., Szabadfi K., Racz B., Horvath G., Farkas J., Banki E., Csanaky K., Gaal V., Lubics A., Tamas A., Gabriel R., Atlasz T.: Review of the retinoprotective effects of PACAP (plenary lecture) 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Kagoshima, Japan 2009.
 32. Kiss P., Márk L., Gaál V., Reglődi D., Váczy A., Tamás A., Helyes Zs., Hashimoto H., Baba A., Shintani N., Opsahl M., Braaten N., Biró Zs., Lubics A.: Investigation on the presence of PACAP in rodent and human tear film and its possible functions in rats and PACAP knockout mice. IBRO International Workshop, Pécs 2010.
 33. Kiss P., Farkas J., Matkovits A., Brubel R., Gaal V., Biro Zs., Reglodi D., Tamas A., Lubics A.: The effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the corneal regeneration of rats. Membrán-transzport konferencia, Sümeg 2010.
 34. Lubics A., Farkas J., Matkovits A., Gaal V., Biro Zs., Reglodi D., Tamas A., Kiss P.: The effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the corneal regeneration of rats. 7th Forum of European Neuroscience (FENS), Amsterdam 2010.

35. Gaál V.: Laser és kryopexia alkalmazása a ROP kezelésében. Magyar Perinatológiai Társaság IX. Kongresszusa, Pécs 2010.
36. Farkas J., Mester L., Kovacs K., Reglodi D., Matkovits A., Gaal V., Biro Zs., Szabo A., Racz B., Szabadfi K., Lubics A., Tamas A., Atlasz T., Shioda S., Nakamachi T., Kiss P: Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in corneal epithelial regeneration and signal transduction in rats. 5th International Peptide Symposium, Kyoto. Japan 2010.

Egyéb publikációk

1. Szijártó Zs., Gaál V.: Zárt zúgú glaucoma és fejfájás. Cefalea Hungarica 1998/4.
2. Gaál V., Szijártó Zs.: Akut zárt zúgú glaucoma néhány érdekes esete. Cefalea Hungarica 1998/4.
3. Szapáry L., Szóts M., Horváth B., Márton Zs., Késmárky G., Juricskay I., Gaál V., Pálfi A., Koltai K. és Tóth K.: A kardiovaszkuláris rizikófaktorok hatása az agyérbetegek haemorheológiai viszonyaira. (Effects of cardiovascular risk factors on hemorheologic parameters in cerebrovascular patients) Orv Hetil 2003; 144: 1085-1090.
4. Szapáry L., Horváth B., Márton Zs., Alexy T., Késmárky G., Szóts M., Gaál V., Pálfi A., Koltai K., Juricskay I., Tóth K.: A krónikus ischaemiás agyérbetegségek haemorheológiai jellemzői. Agyérbetegségek 2003, 9: 2-7.
5. Szijártó Zs., Gaál V., Kuhn F., Kovács B.: Ideghártyába csapódott réz idegentest Szemészet 2003; 140: 101-103.
6. Szapary L., Horvath B., Marton Zs., Alexy T., Demeter N., Szots M, Kesmarky G., Juricskay I., Gaal V., Czopf J., Toth K.: Hemorheological disturbances in patients with chronic cerebrovascular diseases. Clin Hemorheol Microcirc 2004; 31 (1):1-9. IF: 0,63

7. Ertl T., Gyarmati J., Gaal V., Szabó I., Sárkány I., Funke S., Vida G.: A hyperglycaemia szerepe koraszülöttek retinopathiájának kialakulásában. Orv Hetil 2007; 148 (48): 2279-2284.
8. Gaal V., Kilar F., Acs B., Szijarto Zs., Kocsis B., Kustos I.: In vitro study of antibiotic effect on bacterial adherence to acrylic intraocular lenses. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2005; 45: 125-130. IF:1,588
9. Ertl T., Gyarmati J., Gaal V., Szabó I.: Relationship between Hyperglycemia and Retinopathy of Prematurity in Very Low Birth Weight Infants. Biol Neonate 2005; 89 (1):56-59. IF: 1,36
10. Schvöller M., Gaal V., Gaál J., Szijártó Zs.: Retinal detachment as a late complication of retinopathy of prematurity. Acta Medica Ophth Lituanica 2006.04.
11. Mike A., Gaal V., Németh A., Kövér F., Komoly S., Illés Z.: Susac-szindróma: egy ritka autoimmun kórkép neurológiai, pszichiátriai, szemészeti, fül-orr-gégészeti és neuroradiológiai vonatkozásai. Orv Hetil 2007; 148 (19): 897-895.
12. Szijarto Zs., Gaal V., Kovacs B., Kuhn F.: Prognosis of penetrating eye injuries with posterior segment intraocular foreign body. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2008; 246 (1):161-165. IF: 1,59
13. Gyarmati J., Tokes-Fuzesi M., Kovacs G.L., Gaal V., Vida G., Ertl T.: Fructosamine Levels and Hyperglycemia in Preterm Neonates. Neonatology 2008; 95 (4): 267-270. IF: 1,92
14. Vekasi J., Koltai K., Gaal V., Toth A., Juricskay I., Kesmarky G.: The effect of aspirin on hemorheological parameters of patients with diabetic retinopathy. Clin Hemorheol Microcirc 2008, 39 (1-4): 385-389. IF: 0,977

Könyvfejezet

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