

**A hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (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**

## **I. Bevezetés**

### ***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 a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinális polipeptid (VIP) peptidcsalád tagja. 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. Ez a megfigyelés arra utal, 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.

### ***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. A receptorok közül a PAC1 receptor elsősorban az agyban, a gerincvelőben, az adenohypophysisben, a mellékvesevelőben és a herékben található meg. A VPAC receptorok a KIR mellett a májban, tüdőben, lépben, ováriumban, a thymusban és a gasztrointestinális rendszerben mutatható ki.

### ***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 memóriafolyamatokat. 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. 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. Ezekon 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.

### ***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. 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. 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.

A PACAP nemcsak a retinában, hanem az irisben, corpus ciliareban és a conjunctivában is megtalálható. Ismert a simaizomkontrakcióra, vasodilatációra, gyulladásozó folyamatokra és a cAMP szint szabályozására kifejtett hatása. 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?

I.1. 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. Érzelmek magasabb szintű agyi központok segítségével azonnali könnytermelést tudnak kiváltani. Az ingereket a n. oculomotorius ggl. ciliare-ban átkapcsolódó, majd 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, 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 sphenopalatinum-ból erednek, ahol a neuronok 10%-a PACAP tartalmú.

A nyálmirigyekben és más exocrin mirigyekben leírt hatásai valószínűsítik, hogy a serosus nyálmirigyhez hasonló felépítésű könnymirigyben is kifejt 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. Azok az anyagok, amelyek emelik a cAMP vagy a cGMP szintet, hatással vannak a könnytermelésre. 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.

1.2. 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. 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. Számos növekedési faktor, transzkripciós faktor és citokin szerepét igazolták már e folyamatban. Nem megfelelő corneális sebgyógyulás és/vagy fokozott apoptózis számos esetben kialakulhat, pl.: cukorbetegség, kontaktlencse viselés, refraktív sebészeti szövődmény.

A PACAP az idegrendszer fejlődése során növekedési faktorként működik, sérülések esetén sejtvédő hatása is van. A PACAP corneális hatásai kevésbé ismertek, annak ellenére, hogy a peptidnek és receptorainak jelenlétét már kimutatták a corneában. A cornea epithelsejtjei gyorsan reagálnak környezeti ártalmakra s a gyors sebgyógyuláshoz vezető szabályzó útvonalak egyensúlya elengedhetetlen. Egy korábbi vizsgálatban a PACAP27 szemcseppel idegvégződéses növekedését serkentették nyúl corneájában és felgyorsították a cornea érzékenységének helyreállítását. Bár ez a vizsgálat csak a neuronális regenerációra fókuszált, felhívta a figyelmet arra a lehetőségre, hogy a PACAP szemcsepp formájában fokozhatja a cornea hámosodását.

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 sejt túlélésben és a regenerációban egyaránt fontos szerepük van.

1.3. A retina a központi idegrendszer „kihelyezett” része. Kísérleteinkben a patkány retinát vizsgáltuk, mely hasonlít a humán retinához jó vascularizáltsága és a három fő sejtes és két szinaptikus rétege miatt. Nincs csapokban gazdag központi része, bár itt is megfigyelhető centripériális gradiens, azaz a centrális rész felé a photoreceptor-sűrűség megnövekszik a perifériához képest.

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 idegvégzésekben és a belső rostos

rétegben. PACAP immunreaktivitás igazolható a PACAP pozitív neuronok plazmamembránjában, a durva felszínű endoplazmás retikulumban és a citoplazmában. Csirke retinájában a PACAP immunreaktivitás cirkadián változást mutat. Emlősökben a retino-hypothalamikus pálya a retina ganglionsejtjeiből ered és a hypothalamus suprachiasmatikus magjában végződik, mely az emlősök biológiai órája. Ezen ganglionsejtek melanopszin tartalmuk miatt direkt fényérzékenyek. Melanopszin kizárólag a PACAP-ot tartalmazó sejtekben termelődik. A ganglionsejtek PACAP termelése részben dopamin-irányítás alatt áll. A PACAP immunreaktivitás a retina fejlődésének korai szakaszában jelenik meg. A csirkeretina belső magvas rétegében az embrionális élet 8. napjától már kimutatható a PACAP. Patkány retina ganglionsejt rétegében a fejlődés 20. napján jelenik meg a PACAP mRNS.

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

PAC1 receptor mRNS-t és protein expressziót találtak újszülött patkány retinájának minden rétegében. 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. 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. Más vizsgálat megerősítette a VPAC receptorok jelenlétét a retinában. Sejttenyészetben már a retina Müller sejtjeiben is kimutattak PAC1 receptorokat.

### *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. Korábban már bizonyították a VIP hasonló hatását. Az emelkedett glutamát koncentráció excitotoxikus sejthalált okoz az idegrendszerben, beleértve a retinát is. 10 nM/L-1 µM/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.

Újszülött patkányokból származó retina neuroblast rétegében anizomycin sejthalált okoz. PACAP38 kezelés dóziszfüggő mértékben kivédte a sejthalált: az 1-10 nM/L koncentrációjú PACAP38 a sejthalál teljes gátlását eredményezte.

#### *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 súlyos retinadegenerációt okozva, a belső retinarétegek súlyos károsodása mutatható ki. 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 (intravitrealis 1-100 pmol PACAP) a degeneratív morfológiai elváltozások szignifikáns csökkenését eredményezte. Míg 1 pmol PACAP csekély javulást hoz, 100 pmol PACAP csaknem intakt retina megjelenést biztosított. Hasonló védőhatás figyelhető meg PACAP27 kezelésnél is. 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. A PACAP az excitotoxikus retinakárosodásokkal szemben protektív hatású felnőtt és újszülött patkányban is.

Az excitotoxikus sérüléseken kívül nervus opticus átvágása esetén és ischaemiás retinakárosodásban is igazolták a PACAP retinoprotektív hatását. Mindkét arteria carotis communis lekötése után krónikus hypoperfúzió jön létre és a retinában ischaemiás degeneráció figyelhető meg. 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.

### *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 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. A phototoxicitás reaktív szabadgyökök (pl.: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singlet oxigén és hydroxil gyökök képződését jelenti. A reaktív oxigén szabadgyökök fehérje és DNS károsodást okozhatnak. A szabadgyökfogó glutathion, C és E vitamin a fény-indukálta retinakárosodást csökkenteni próbáló endogén védelmi rendszert szolgálnak. Az endogén neuroprotekciónak 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**

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 átitatódása 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.

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). Az így kapott oldatot microchip electrophoresisra készítettük elő (Agilent 2100 Bioanalyzer). A vizsgálat



során a Protein 230-as fehérje chipet használtuk. A gél egy lineáris polimert tartalmaz szűrő ágensként, amely biztosítja a 14-230 kDa tartományban a fehérjék molekulatömeg alapján történő szétválasztását. 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 tömegspektrometriai mérésekhez a gélelectrophoresis során szétválasztott fehérjéket a gélből kivágtuk, majd Eppendorf csőbe helyezve 3x 10 percig 200 µl 50%-os acetonitril és 50 mmol NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> oldattal mostuk. A géldarabokat szobahőmérsékleten dehidratáltuk és 10 µl 0,04 mg/cm<sup>3</sup> cc. tripszinoldattal kezeltük. 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 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. A minták beszáradását követően az elemzéseket Autoflex II típusú MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel reflektor detektálási módban végeztük el. Az ionizáláshoz 337 nm-es nitrogén lézert alkalmaztunk (50 Hz, 20 kV, késleltetési idő: 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.

## **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.

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. Az e tartományba eső fehérjék azonosítását MALDI TOF tömegspektrometriával végeztük el.

A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a PACAP kezelés hatására az adott molekulásúly tartományban a könny fehérje-összetétele jelentősen megváltozott. 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.

### **PACAP vizsgálata humán könnyben és csarnokvízben**

A PACAP jelenlétét humán könnyből sikerült igazolnunk MALDI tömegspektrometriai analízissel. Ezzel szemben a humán csarnokvíz minták nem tartalmaztak PACAP-ot a kimutathatósági határon belül.

### **II.3. Megbeszélés**

Kimutattuk, hogy a PACAP kezelés megváltoztatja a könny fehérje összetételét. A könny proteomika előnyös a noninvazív mintavétel miatt és egy ígéretes technika humán betegségek biomarkereinek azonosítására. A PACAP-hoz hasonlóan több neuropeptidről, pl. a substance P és a szomatosztatin, kimutatták már, hogy megváltoztatják bizonyos fehérjék szekrécióját a könnyben.

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. 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. 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. 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 általános sejtvédő és regenerációt elősegítő peptid, melynek endogén védő hatását több kísérlet is bizonyította. Többek között PACAP génhíányos (knockout) egerekben azt találták, hogy PACAP hiányában a sérülések fokozott mértékű károsodást idéznek elő. 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. 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  $\mu\text{g}$  PACAP27-et tartalmazott 40  $\mu\text{l}$  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.

A kísérleti állatokat túlaltattuk, majd szemeiket eltávolítottuk és olyan csészébe helyeztük, mely lágy plasztilinnel volt kitöltve, biztosítva ezzel a pozicionálást. A corneákat fluorescein festékkel 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 softwearral 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  $\mu\text{m}$  vastagságú szeleteket készítettünk és haematoxin-eosinnal festettük meg.

Western blot vizsgálathoz cornea abráziót végeztünk a korábban leírt módon, a corneákat 4 óra múlva eltávolítottuk a protektív mechanizmusok megítélése 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. A membránokat 4  $^{\circ}\text{C}$ -on 12 órán át a következő antitestekkel kezeltük: foszfospecifikus anti-Akt-1 Ser473, foszfospecifikus anti-ERK1/2 Thr202/Tyr204 és anti-Aktin. A membránokat 6x5 percig mostuk ( $\text{pH}= 7,5$ ), majd anti-nyúl tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitestet használtunk, a 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. Eredmények**

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

Mind az Akt, mind az ERK1/2 foszforilációja alacsony szinten maradt a normál corneákban. 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.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 fejt ki ezen citoprotektív hatását. A cAMP indukálta folyamatok fontos szerepet játszanak a corneális sebgyógyulásban és homeosztázisban. A cAMP fokozni tudja a növekedési faktorok hatását, ezt epidermális növekedési faktor és corneális epidermális migráció kapcsolatában írták le. Számos növekedési faktor esetében igazolódott, hogy fontos szerepük van a cornea sebgyógyulásában.

A foszfatidil-inositol-3-kinase (PI3K)-Akt útvonalak és a mitogén aktivált protein kinase (MAPK) család a corneális sebgyógyulás fő mediátorai. 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. 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. A PACAP erőteljes cAMP stimuláló hatását már ismerjük, de az ERK foszforilációját serkentő hatását is leírták retinában, endothel sejtekben, astrocytáknak, corticalis neuronokban és kisagyi szemcsesejtekben. Igazolták a PACAP Akt foszforilációt fokozó hatását cardiomyocytáknak, monocytáknak és szimpatikus neuron sejtekben.

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. Pentobarbital anesztheziában pupillatágítást végeztünk 1 csepp 5%-os phenylephrinnel és egy csepp cyclopentolattal (10 mg/ml). Az UV-A expozíció előtt 570 nm hullámhosszúságú fényrel pozicionálást és fókuszálást végeztünk, a retina besugárzását a Calkins és Hochheimer által leírt módszerrel számítottuk ki. Az UV-A sugárzás 45 percig (315-400 nm, 1.5 mW/cm<sup>2</sup>) tartott, XLPS-10 típusú Xenon lámpával, majd 100 pmol PACAP38-at 5 µl fiziológiás sóoldatban feloldva intravitreálisan adtunk a jobb szembe (n=22). A másik, kontroll szembe 5 µl vivőanyagot adtunk. 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. A szöveteket Durcupam ACM gyantába ágyasztuk be, 2 µm-es szeletekre vágtuk és toluidin kézzel megfestettük. Digitális CCD kamerával Spot program segítségével fényképeket készítettünk a megfelelő retinaterületekről. 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 µm<sup>2</sup>-re eső sejtek száma az ONL-ben; (4) az 500 µm<sup>2</sup>-re jutó sejtek száma az INL-ben; (5) a ganglion sejtek rétegében (GCL) a 100 µm retinahosszra jutó sejtek száma. Statisztikai értékelést ANOVA teszttel végeztünk, melyet Tukey-B post hoc analízis követett.

### **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). Már 1 nappal a besugárzás után megfigyelhető a retina károsodása. Főleg az ONL-ben számos sejt sérült, de üres sejttesteket találtunk az INL-ben is. Az ONL, INL sejttestjeinek 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.

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. Intravitreális PACAP szignifikánsan emelte az ONL és INL sejtszámát (70% és 74%).

A GCL-ben a retina 100  $\mu\text{m}$ -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.

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. A sejtek száma szignifikánsan csökkent az ONL-ben (42%), az INL-ben (33%) és a GCL-ben (34%).

Az intravitreális PACAP kezelés szignifikáns védelmet biztosított, a retina rétegei jól kivehetők voltak, a magvas rétegekben a sejtek épek maradtak, az IPL duzzadása csökkent. 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.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. Neuroprotektív hatása mellett a PACAP szignifikánsan csökkentette az oedémát 7 nappal az irradiációt követően, ezt a hatását korábban ischaemiás agyi oedémánál figyelték meg. A PACAP indukálta retinoprotekció általános neuroprotektív mechanizmusra utal és nem fenotípus specifikus sejtprotekcióra. 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.

## 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. 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*

### Egyéb publikációk

1. Szijártó Zs., Gaal V.: Zárt zúgú glaucoma és fejfájás. *Cefalea Hungarica* 1998/4.
2. Gaal 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., Gaal 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., Gaal V., Pálfi A., Koltai K., Juricskay I., Tóth K.: A krónikus ischaemiás agyérbetegségek haemorheológiai jellemzői. Agyérbetegségek 2003, 9: 2-7.
5. Szijártó Zs., Gaal 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

#### **Idézhető előadáskivonatok**

1. Szapary L., Horvath B., Martom 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. Szml. 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., Gaal V.: Elülső capsulotomia és IOL decentralizáció kapcsolata. Magyar szemorvos Társaság Kongresszusa, Gyöngyös 1993.
3. Szapáry L., Gaal V., Magyar H., Pál E.: Acut féloldali látásromlással jelentkező betegek klinikai vizsgálata Ifjú Neurológusok Kongresszusa, Debrecen 1994.
4. Gaal V., Sziujártó Zs.: Congestív glaucoma esetek retrospektív elemzése és differenciál diagnózisa. V. Fejfájás Kongresszus, Balatonalmádi 1998.
5. Sziujártó Zs., Gaal V.: Congestív glaucoma és fejfájás. V. Fejfájás Kongresszus, Balatonalmádi 1998.
6. Gaal 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. 6<sup>th</sup> 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. 11<sup>th</sup> European Stroke Conference, Geneva, Switzerland 2002.
9. Aschermann Zs., Szóts M., Szapáry L., Czopf J., Szabó I., Gaal V., Hudák I., Kövér F.: Traumás carotico-cavernosus fistula esete. Magyar Stroke Társaság VI. Kongresszusa, Zalakaros 2003.
10. Gaal 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. Sziujártó Zs., Gaal V., Kuhn F., Kovacs B.: Intravitreal copper foreign body EVRS Kongresszus, Sopron 2003.
12. Gaal V., Kustos I., Sziujártó 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 9<sup>th</sup> 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., Schwöller M., Hermann L.: Hyperglycaemia lehetséges szerepe a ROP kialakulásában. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, Szeged 2005.
16. Schwöller 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. Schwöller 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. Gaal V., Reglodi D., Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Hamza L., Ságvári O., Tamás A., Lubics A., Gábrriel 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., Reglodi D., Kiss P., Gaal V., Tamás A., Tóth G., Szabó K., Molnár A., Gábrriel 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., Reglodi D., Márton Zs., Hamza L., Gaal V., Tamás A., Hild G., Nyitrai M., Gábrriel 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., Gaal V., Reglodi 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., Szabadi 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.
37. Farkas J., Nakamachi T., Wada Y., Seki T., Tsuchikawa D., Hori M., Tsuchida M., Yoshikawa A., Kagami N., Imai N., Matkovits A., Gaal V., Kiss P., Reglodi D., Shioda S.: Effect of PACAP on mouse corneal healing. 10th International Symposium on VIP-PACAP and Related Peptides, Eilat, Izrael 2011.

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

## **Köszönetnyilvánítás**

A közös munkában nemcsak az a jó, ha sikerül valami értékeset, esetleg maradandót alkotni, hanem az is, hogy olyan emberekkel találkozhatunk és köthetünk barátságot, akikkel egyébként talán sosem sodort volna össze az élet. Ezek a legfontosabbak, amiért köszönetet kell mondanom mindenkinek, akik segítettek ennek a dolgozatnak a megszületését.

A legnagyobb köszönettel Reglődi Dórának tartozom hozzáértő segítségéért, szakértő felügyeletéért és baráti támogatásáért.

Köszönöm az Anatómiai Intézet munkatársainak az önzetlen segítséget: Lubics Andrea, Kiss Péter, Tamás Andrea köszönet Nektek az együtt végzett munkákért! Köszönöm Csernus Valér Professzor Úrnak is a támogatást. Köszönettel tartozom Gábrriel Róbert Professzor Úrnak és lelkes csapatának a szövettani feldolgozásokért; külön köszönet Atlasz Tamásnak, Szabadfi Krisztinának a kísérletekben nyújtott segítségért.

Köszönetet mondok Kustos Ildikónak, Márk Lászlónak az önzetlen segítségért.

Köszönöm Biró Zsolt Professzor Úr és a Szemklinika dolgozóinak támogatását, külön köszönet a „drámacsoportnak” a lelkesítésért.

Hálás vagyok a családnak a biztos háttérért és a türelemért.