

# **Endogén PACAP és PAC1-receptor retinoprotektív szerepének vizsgálata retinális gyulladásban**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Váczy Alexandra

Témavezető: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Programvezető: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Doktori iskola vezetője: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár



Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet

Pécs, 2021

# Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>Bevezetés</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>A retina</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1.1</b>	<b>A retina <i>in vivo</i> vizsgálómódszerei</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2</b>	<b>A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2.1</b>	<b>A PACAP előfordulása a szervezetben</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2.2</b>	<b>A PACAP előfordulása a szemben</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2.3</b>	<b>A PACAP receptorai</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2.4</b>	<b>A PACAP általános hatásai</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2.5</b>	<b>A PACAP hatásai a szemben</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>Maxadilán</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4</b>	<b>Bilateralis carotis communis okklúzió (BCCAO)</b> .....	<b>24</b>
<b>1.5</b>	<b>Bakteriális lipopoliszaharid endotoxin (LPS)</b> .....	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>Célkitűzések</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>PAC1 receptor retinoprotektív hatásának vizsgálata iszkémiás retinopátia esetén</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Anyagok és módszerek</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Kísérleti állatok</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.2</b>	<b>A bilaterális arteria carotis communis permanens lekötésével kialakított retina degenerációs modell</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.3</b>	<b>A retina minták rutin szövettani vizsgálata</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.4</b>	<b>A retina minták citokin array analízise</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Statisztikai analízis</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Eredmények</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2.1</b>	<b>A retina minták rutin szövettani analízise</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2.2</b>	<b>A retina minták citokin array analízise</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Diszkusszió</b> .....	<b>35</b>

<b>4</b>	<b>Endogén PACAP, valamint a PAC1 receptor védő hatásának vizsgálata LPS indukálta retinagyulladásban .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Anyagok és módszerek .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Kísérleti állatok .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Állatok kezelése .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.3</b>	<b>A retina minták rutin szövettani vizsgálata .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Optikai koherencia tomográfia vizsgálat .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Immunhisztokémiai GFAP jelölés .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Western blot analízis .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.7</b>	<b>A retina minták citokin array analízise .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.8</b>	<b>Elektroretinográfia (ERG) .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.9</b>	<b>Statisztikai analízis .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Eredmények .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.1</b>	<b>A retina minták rutin szövettani vizsgálata .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Optikai koherencia tomográfia vizsgálat eredménye .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Az immunhisztokémiai GFAP jelölés eredménye .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.4</b>	<b>A retina minták citokin array analízis eredménye .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Western blot analízis eredménye .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Elektroretinográfia eredményei .....</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>Diskusszió .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Új eredmények összefoglalása .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>Publikációs lista .....</b>	<b>87</b>
<b>8.1</b>	<b>Az értekezés alapjául szolgáló publikációk .....</b>	<b>87</b>
<b>8.2</b>	<b>Az értekezés témájához nem illeszkedő egyéb közlemények .....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>90</b>

## Rövidítések jegyzéke

- 6OHDA:** 6-hidroxidopamin
- AC:** adenilát-cikláz
- AIF:** apoptózis indukáló faktor
- Akt/PKB:** protein kináz B
- ANOVA:** variancia analízis teszt
- Bad:** Bcl-2-függő sejthalál promóter
- Bax:** Bcl-2-függő X-protein
- BCCAO:** kétoldali arteria carotis communis okklúzió
- Bcl-2:** B sejt limfóma 2
- BDNF:** agy-asszociált neurotróp faktor
- BSA:** szarvasmarha szérum albumin
- cAMP:** ciklikus 3',5'-adenozin-monofoszfát
- CINC-1:** citokin-indukált neutrofil kemoattraktáns-1
- CREB:** cAMP-reszponzív elem kötő fehérje
- DePeX:** disztrén + trikrezil-foszfát + xilénből álló műgyanta ragasztó
- DPP-IV:** dipeptidil peptidáz IV enzim
- ERG:** elektroretinográfia vizsgálat
- ERK:** extracelluláris szignál-regulált kináz
- eye-cup:** szemserleg
- GCL:** ganglionsejtek rétege
- GFAP:** gliális fibrilláris savas fehérje
- HIF-1a:** hipoxia indukált faktor 1-alpha
- ivi:** intravitreális
- IL-1:** interleukin-1
- ILM:** belső határhártya
- INL:** retina belső magvas rétege
- IL:** interleukin
- IPL:** retina belső rostos rétege
- JE/MCP-1:** monocita kemoattraktáns fehérje
- JNK:** c-Jun N-terminális kináz
- LPS:** lipopoliszaharid
- M65:** PAC1 receptor antagonist

**MAPK:** mitogén-aktivált protein kináz  
**Max:** maxadilán  
**MIP-3 $\alpha$ :** makrofág gyulladáscsökkentő fehérje 3  
**MMP:** metalloproteináz  
**MSG:** monoszódium-glutamát  
**NDS:** normál szemér szérum  
**NFL:** optikus rostok rétege  
**NMDA:** N-metil-D-aszparaginát  
**OCT:** optikai koherencia tomográfia vizsgálat  
**SD-OCT:** spektrál-domain optikai koherencia tomográfia  
**OLM:** külső határhártya  
**ON:** látóideg  
**ONL:** retina külső magvas rétege  
**OPL:** retina külső rostos rétege  
**PAC1:** hipofízis adenilát-cikláz receptor 1  
**PACAP knock out/KO egér:** PACAP gén hiányos egér  
**PACAP:** hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid  
**PBS:** foszfát pufferelt sóoldat  
**PE:** retina pigment epitél rétege  
**PFA:** paraformaldehid  
**PI:** propídiium-jodid  
**PI3K:** foszfatidilinozitol-3-kináz  
**PKA:** protein kináz A  
**PKC:** protein kináz C  
**PL:** retina fotoreceptorok rétege  
**PLC:** foszfolipáz C  
**SDS:** nátrium-dodecilszulfát  
**SEM:** középérték közepes hibája  
**sham:** áloperált állatok csoportja  
**sICAM-1:** szolubilis intercelluláris adhéziós molekula  
**TIMP-1:** szöveti metalloproteináz gátló fehérje  
**TLR:** Toll-like receptor  
**TNF $\alpha$ :** tumor nekrozis alfa faktor  
**VEGF:** érfa endothel növekedési faktor

**VIP:** vazóaktív intesztinális polipeptid

**VPAC1:** vazóaktív intesztinális peptid receptor 1

**VPAC2:** vazóaktív intesztinális peptid receptor 2

**Wt:** vad típusú egerek csoportja

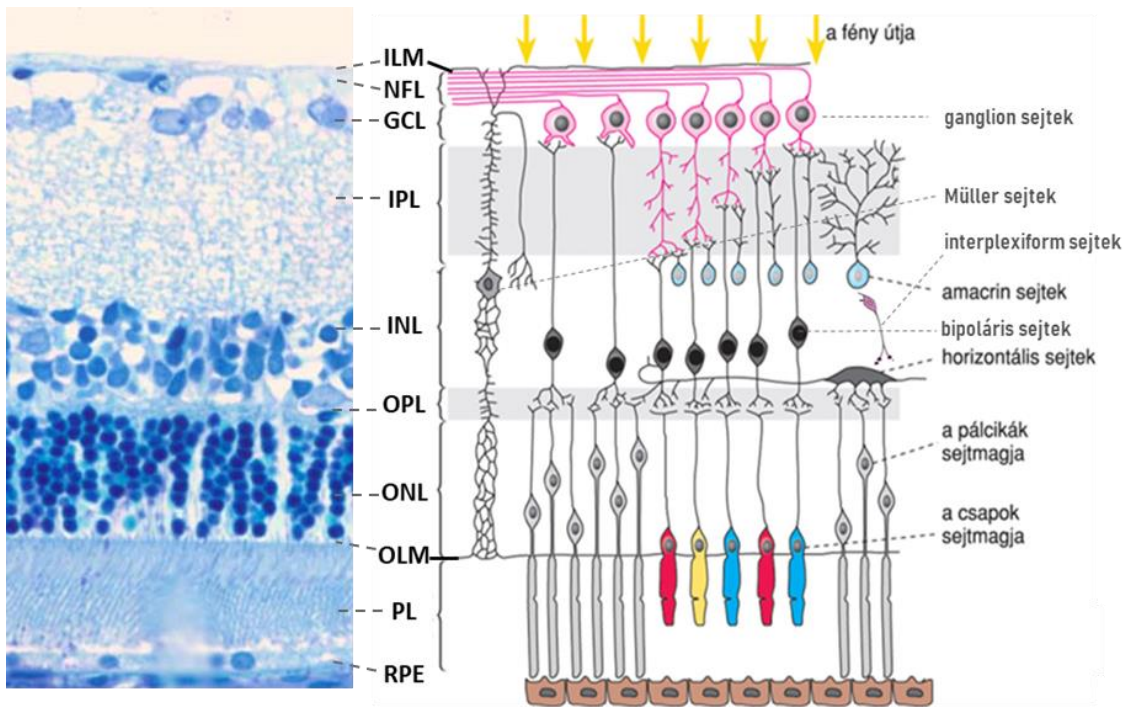
# 1 Bevezetés

## 1.1 A retina

A retina a kettős falú szemserleg származéka, amely az agyhólyag kitüremkedéséből jön létre. Ezáltal agyszövetnek tekinthető, ami miatt idegtudományi kutatásokhoz igen elterjedten alkalmazzák. Kialakulása során a szemserleg külső, valamint a belső fala az ora serrata előtti területig egyrétegű marad, azonban a belső fal hátsó 4/5-e fényérzékeny ideghártyává differenciálódik (Röhlich 2014). A retinát kettő nagy részre oszthatjuk környezeti energia elektromos potenciállá történő átalakítása szempontjából. Az egyik a neurális retina, ami sejttesteket és nyúlványokat tartalmaz és egymástól jól elkülönülő rétegeket hoz létre. Ide sorolhatóak a bipoláris-, horizontális- és amakrin sejtek, valamint a vizuális információ feldolgozásában szerepet játszó ganglion sejtek. A másik csoportban a fototranszdukcióban szerepet játszó retina szenzoros részét alkotó fotoreceptorok, a csapok és pálcikák tartoznak, amelyek feladata a fény felfogása és idegingerületté való átalakítása (Ryan 2013). Ingerület feldolgozás és továbbítása szempontjából elkülönítünk a retinában horizontális, valamint vertikális rendszert. A horizontális neuronrendszert a fotoreceptorok összekapcsolásában szerepet játszó horizontális sejtek, valamint a bipoláris sejtek összekötésében részt vevő amakrin sejtek alkotják. A vertikális neuronrendszerrel a fotoreceptorok a bipoláris sejteknek továbbítják az információt, melyek szinaptizálnak a ganglionsejtekkel, és axonjai a látóidegbe szedődnek össze, haladnak tovább a magasabb agyi központok felé (Süveges 2010).

A retina anatómiai szempontból 10 rétegből épül fel (1. ábra). A belső rétegektől haladva először az optikus rostok rétege (nerv fiber layer: NFL) található, amit a belső határmembrán (inner limiting membrane: ILM), a ganglionsejtek rétege (ganglion cell layer: GCL), a belső rostos- (inner plexiform layer: IPL) és magvas réteg (inner nuclear layer: INL), a külső rostos- (outer plexiform layer: OPL) és magvas réteg (outer nuclear layer: ONL) követ. Ezt a külső határmembrán (outer limiting membrane: OLM) határolja, amit a fotoreceptorok belső valamint külső szegmense (photoreceptor layer: PL) és a pigment epitélium (pigment epithelium: PE) követ. A belső határhártya az üvegtesttől választja el a három magvas réteget, a köztük elhelyezkedő két szinaptikus réteget, valamint az optikus rostok rétegét. A külső határhártya a fotoreceptor sejtek perikarionjait zárja le a fotoreceptor nyúlványok irányába. A hártyákban hosszan elnyúlt, különleges gliasejtek, a Müller-sejtek találhatóak. A Müller-sejtek vitreális irányba haladó nyúlványai talpszerű megvastagodással

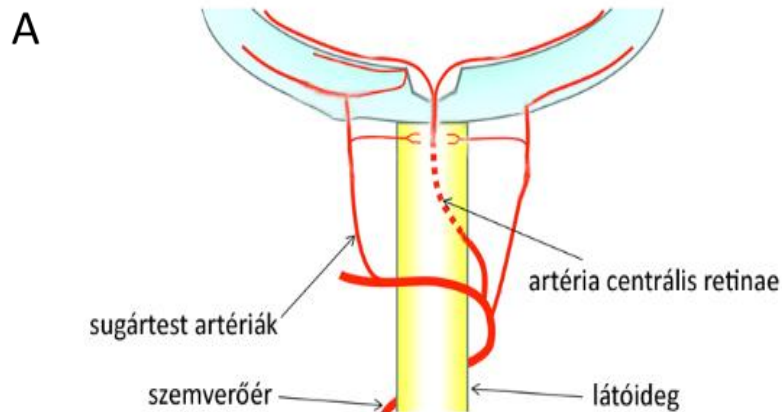
hozzák létre a belső határhártyát, a sclerális nyúlványuk pedig a fotoreceptorok közé illeszkedik be (Ryan 2013). A dolgozatban a továbbiak során a nemzetközi gyakorlatban elterjedt angol rövidítés kerül feltüntetésre a retina szövettani rétegeiről.



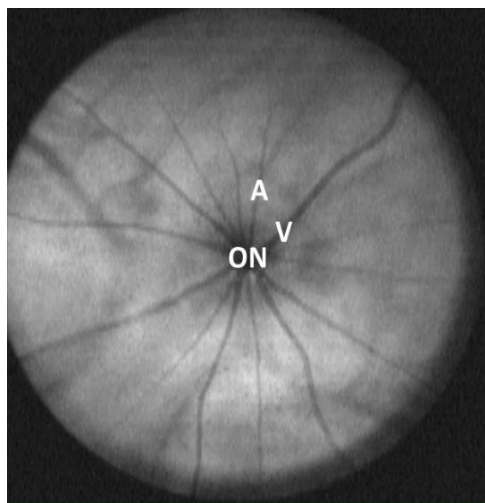
**1. ábra: A: Emlős retina metszet** toluidinkék festéssel (forrás: saját felvétel). **B: Retina szerkezetének sematikus ábrázolása.** ILM: belső határhártya, NFL: optikus rostok rétege, GCL: ganglionsejtek rétege, IPL: belső rostos réteg, INL: belső magvas réteg, OPL: külső rostos réteg, ONL: külső magvas réteg, OLM: külső határhártya, PL: fotoreceptorok rétege, (forrás: Süveges I. (2010) Szemészet tankönyv ábrája alapján módosítva).

A retina vérellátásáról kettős artériás rendszer gondoskodik (2.A ábra). A retinális érrendszer közül az egyik részét a sugártest artériák (arteriae ciliares) képezik, amelyek sűrűn szerteágzóan alkotják az érhártyát és oxigénben, tápanyagban gazdag vért szállítanak a retina fotoreceptorokat tartalmazó rétegeihez. A másik érrendszer a látóideg közepén belépő, majd négy nagyobb ágra oszló arteria centralis retinae, amelyek az üvegtest és a retina legbelső rétegei között futnak és a belső területek táplálását látják el (Röhlich 2014). Az ideghártya vénás elvezetéséért a vena centralis retinae felel (2.B ábra).



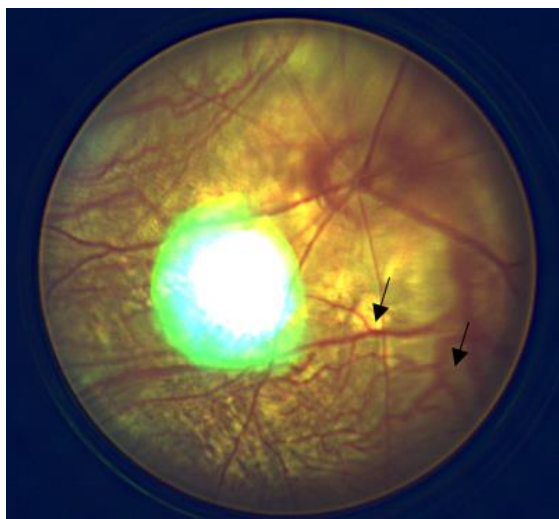


B



**2. ábra: A: A retina artériás vérellátásának sematikus ábrája** (forrás: Aslam et al. 2010 ábrája alapján módosítva). **B: Szemfenék tükrözés segítségével készült felvétel egészséges emlős retináról.** A felvétel jól mutatja az artériák és vénák normál lefutását a retina felszínén. A: arteria centralis retinae; V: vena centralis retinae; ON (optic nerve): látóideg (forrás: saját mérés alapján).

Amennyiben a retina vérellátása valami oknál fogva lecsökken, szerkezetében iszkémiás károsodás jön létre. Ennek hatására degeneratív elváltozások, súlyos látáskárosodás alakul ki, ilyen például a diabéteszes- (3. ábra) vagy koraszülött retinopátia is (Osborne et al. 2004; Chen et al. 2006; Pournaras et al. 2008; Kaur et al. 2008; Feigl 2009; Kvarik et al. 2016)

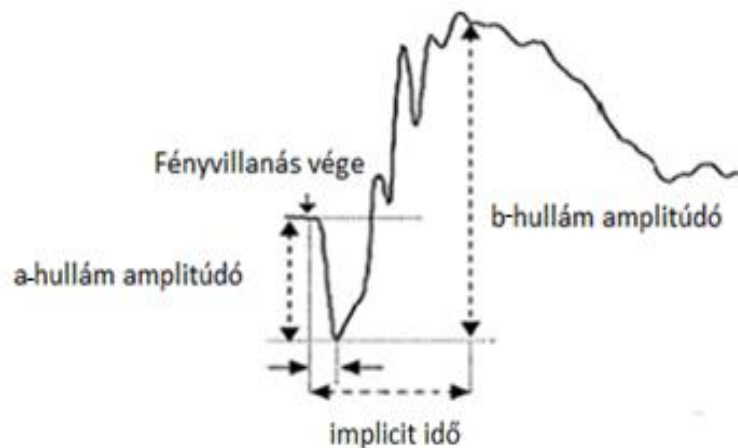


**3. ábra: Abnormális erek kialakulása 2-es típusú diabéteszes retinopátia esetén patkány modellben.** A szemfenéki képen fekete nyilak jelölik a tágult, kanyargós erek megjelenését, mely az egész retina területére már kiterjed (forrás: saját mérés alapján).

### **1.1.1 A retina *in vivo* vizsgálómódszerei**

#### **1.1.1.1 Elektroretinográfia (ERG)**

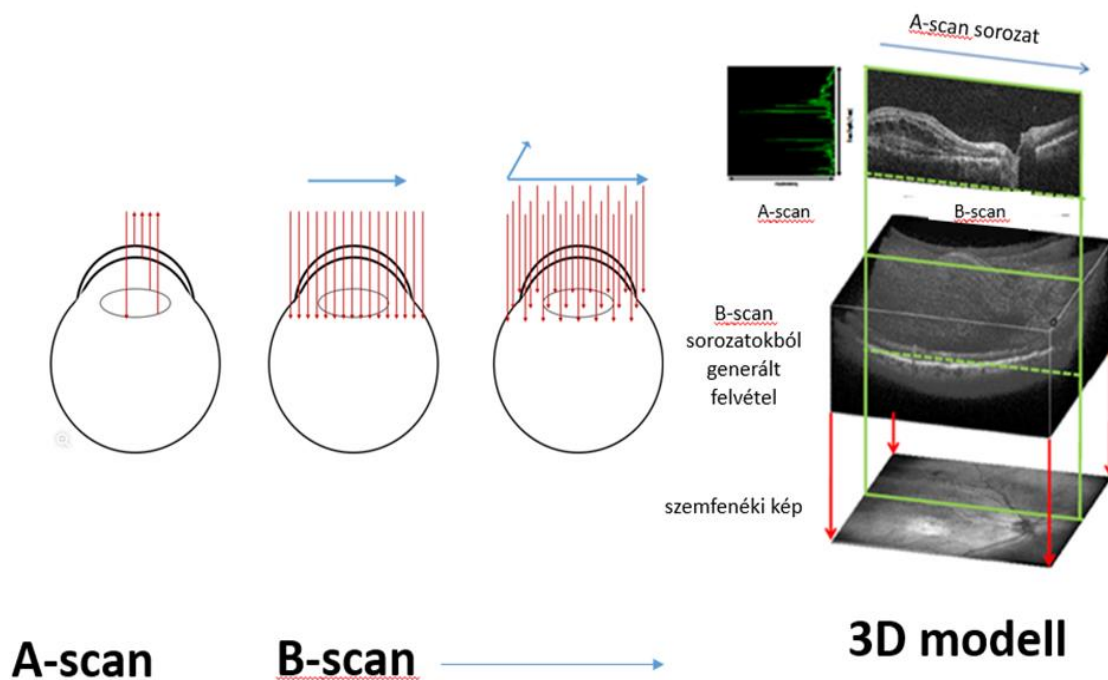
Az elektroretinográfia a látás funkcionális vizsgálati módszere, amely a retina sejtjeinek aktivitását méri fény inger hatására és ez elektroretinogramok formájában kerül ábrázolásra. A módszer információt nyújt a retina fotoreceptorainak, illetve bipoláris- és horizontális sejtjeinek funkcionalitásáról (Noailles et al. 2019). Az elektroretinogrammon különböző hullámokat különítünk el (4. ábra). Az a-hullám amplitúdója a késői receptor potenciált adja meg, amely a retina külső részében elhelyezkedő fotoreceptorok működéséről és állapotáról ad jelzést, míg a b-hullám amplitúdója a retina belső rétegeinek állapotát tükrözi, mint az ON bipoláris és a Müller sejtek (Miller és Dowling 1970). A klinikumban gyakran regisztrálják továbbá a pigment epitéliumból induló c-hullám paramétereit is, illetve az OFF bipoláris sejtek által indukálódó d-hullámot (Hu és Marmor 1982). Az amplitúdókon kívül mérhető paraméter még a-hullámok implicit ideje, amely az adott sejtek aktiválódási idejével egyenesen arányos. A pálcikák és csapok szummált választ az ERG mérés során egymástól elkülönítve Ganzfeld-módszerrel (szkotopikus vagy fotopikus adaptációban) végezhetjük el. Kutatásunk során sötét adaptált méréseket hajtottunk végre, ahol az a és b-hullám amplitúdóját és implicit idejüket monitoroztuk.



**4. ábra: Reprezentatív elektroretinogram és annak paramétereit.** A különböző hullámkomponensek elhelyezkedésének és azok paramétereinek meghatározása a fekete szaggatott nyilakkal jelölve (forrás: saját mérés alapján).

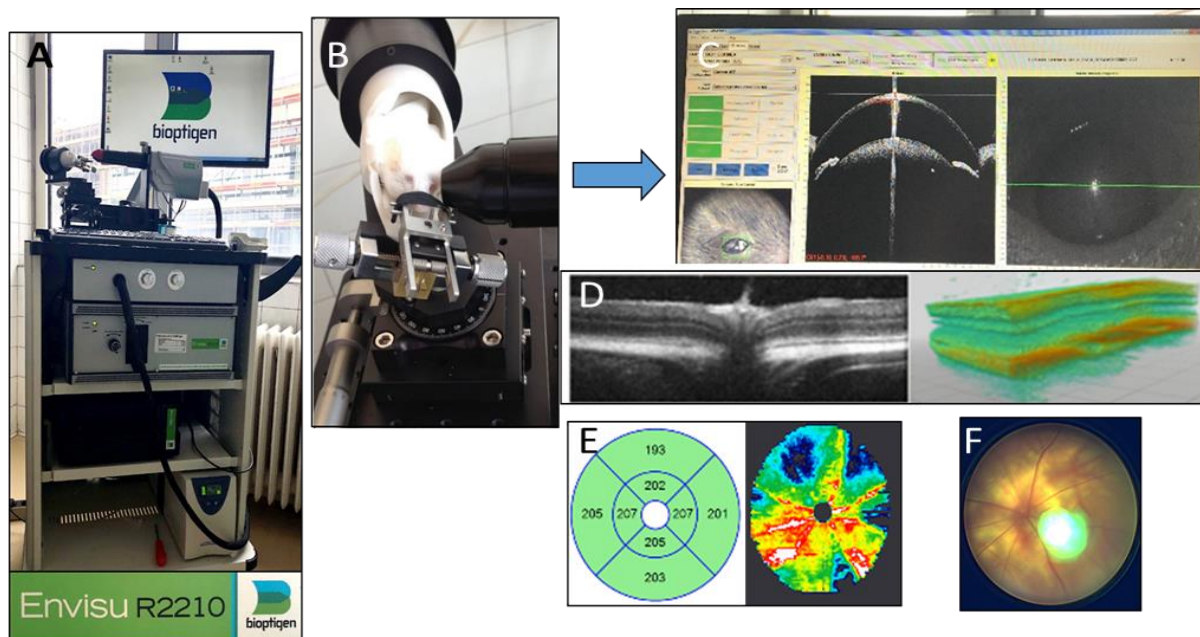
### 1.1.1.2 Optikai koherencia tomográfia (OCT) vizsgálata

Az optikai koherencia tomográfia egy olyan képalkotó eljárás, amely noninvazív módon a teljes szem szerkezeti vizsgálatát teszi lehetővé. Napjainkra a szemészet területén a spektrál-domain OCT (SD-OCT) használata igen elterjedté vált a rutin diagnosztika során. Alapja az infravörös fénysugár, amely a szem szövetein visszatükröződik és az ebből származó reflexiós/fényszórási tulajdonságok térbeli eloszlása rajzolja ki a vizsgált struktúrát (5. ábra). A mérés során számítógép segítségével a mélységi információk leképezését A-scannek hívják. Az A-scanek sorozatából generált longitudinális képet pedig B-scannek nevezik. A B-scan adatok sorozata egy térbeli modellezést tesz lehetővé, mely során az így kialakult 3D modellben mind vertikális, mind pedig horizontális irányban a vizsgált objektum egy egy szelete könnyen kiválaszthatóvá és elemezhetővé válik (5. ábra).



**5. ábra: OCT készülék scanning típusainak sematikus ábrázolása.** Piros nyilak az infravörös fényel megvilágított, szövetről visszaverődő sugarakat jelzi. Az A-scan a mélységi adatokat szolgáltatja pontról-pontra letapogatva. Az ebből nyert longitudinális felvételt a B-scan reprezentálja, melyből 3D térszerkezet hozható létre. A 2D felvételeken a sötétebb árnyalatok (sötét szürkés) a fényt kevésbé visszaverő területeket jellemzik, míg a világosabb árnyalatok (fehéres) az erősebben reflektált rétegeket mutatják (forrás: Wildeman és Dhalla 2016 ábrája alapján módosítva).

A módszer kiválóan alkalmas a cornea sérülések detektálására a retinális elváltozások kimutatására egyaránt. A mérést követően azonnal információt szolgáltat a készülék a retinális rétegek vastagságáról (6.E ábra), a doppler funkciónak köszönhetően a retina szöveteinek érellátásáról, valamint képes háromdimenziós modellt leképezni a felvétel során nyert adatokból (6.D ábra). A technika továbbá alkalmas még a szemfenék tükrözés elvégzésére is, mellyel a retinális érhálózat további feltérképezésére is lehetőség nyílik (6.F ábra). Ezek alapján jól látható, hogy a módszer kiválóan alkalmas számos retinopátia kialakulásának gyors, noninvazív módon történő diagnosztizálására, és azok nyomonkövetésére (Guerra et al. 2019).



**6. ábra: OCT mérés demonstrálása.** **A:** Az OCT készülék. **B:** Az állattartó padon elhelyezett altatásban lévő egér a mérés ideje alatt. **C:** A készülék szoftverének kezelő felülete cornea vizsgálat során. **D:** A kontroll egér retina rétegeiről készített kétdimenziós felvétel, valamint az abból generált 3D ideghártya modell. **E:** A retina teljes rétegvastagságának az automatikus meghatározása a különböző quadránsokban  $\mu\text{m}$ -ben megadva. A rétegek vastagságának adataiból a kiértékelő program segítségével hőtérkép elkészítése az egész retina területére nézve. **F:** A méréssel egyidőben elkészített szemfenéki kép demonstrálása kontroll szem vizsgálat esetén (forrás: saját mérés alapján).

## 1.2 A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) először Miyata és munkatársai izolálták birka hipotalamuszból 1989-ben. A peptidet először a hipofízisben kifejtett adenilát-cikláz (AC) aktiváló és ebből adódó ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) emelő hatása alapján azonosították (Miyata et al. 1989). Kettő biológiailag aktív formában fordul elő emlős szervezetben, melyek közül az egyik a 38 aminosav hosszú szekvenciából álló PACAP38 (Miyata et al. 1989). A másikat egy évvel később fedezték fel, ami rövidebb, mindössze 27 aminosavból felépülő (PACAP27) szerkezettel rendelkezik (Miyata et al. 1990; Fahrenkrug 2010). A PACAP humán génje a 18. kromoszóma rövid karján helyezkedik el, melyről egy 176 aminosav hosszúságú prepro-PACAP íródik át.

Proteolitikus és amidációs lépéseket követően egymástól független módon képződik belőle a PACAP27 és 38 (Hosoya et al. 1992). A PACAP bomlásáért a dipeptidil peptidáz IV (DPP-IV) enzim felelős a szervezetben (Zhu et al. 2003; Bourgault et al. 2008; Al-Badri et al. 2018). A gerincesek szervezetében előforduló PACAP közel 90%-át a 38 aminosav tartalmú peptid teszi ki és csak kisebb mennyiségben van jelen a PACAP27 (Arimura et al. 1991; Arimura 1998; Vaudry et al. 2000; Shioda et al. 2016). A PACAP a szekretin/ glükagon/ vasoaktív intesztinális peptidcsaládhoz (VIP) tartozik (Arimura és Shioda 1995; Lee et al. 2007; Lugo et al. 2019). Így nem meglepő, hogy a peptid aktív formái 68%-os homológiát mutatnak a VIP-el, amely leginkább az N-terminális (1-3, 6-8) és a centrális régiókban (14-23) mutatkozik meg (7. ábra). Irodalmi adatok alapján továbbá az is ismert, hogy a PACAP AC emelő hatása 1.000-10.000-szer nagyobb a peptidcsalád többi tagjához viszonyítva (Vaudry et al. 2009).



**7. ábra: PACAP38 és VIP fehérje szerkezetének összehasonlítása.** Az ábrán a fehérjéket felépítő aminosavak számát, valamint a fehérjék oldalláncai alapján kék színnel a bázikus- és piros színnel a savas aminosavakt jelöltük. (forrás: Liao et al. 2019 ábrája alapján módosítva).

A PACAP N-terminális felépítése az evolúció során egy rendkívül konzervált aminosav-szekvenciát mutat. Ezt jól bizonyítja az, hogy a gerincesek szervezetéből izolált PACAP szerkezetében mindössze csupán 1-4 aminosav eltérés található, amely kiválóan igazolja a peptid elengedhetetlenül fontos élettani szerepét (8. ábra) (Campbell és Scanes 1992; Bourgault et al. 2011; Reglodi et al. 2019; Denes et al. 2019a). A PACAP 1-38 C-terminális régiója azonban (29-38) a peptidcsalád többi tagjával összehasonlítva egyedi, így semmiféle szerkezeti hasonlóságot nem mutat a VIP-vel. (Robberecht et al. 1992; Fahrenkrug 2010; Atlasz et al. 2016).



Faj	%	Szekvencia																																					
		1	5	10	15	20	25	30	35	38																													
		H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L	G	K	R	Y	K	Q	R	V	K	N	K
Ember	100	-----																																					
Egér	100	-----																																					
Patkány	100	-----																																					
Bárány	97.4	-	I	-----																																			
Béka	97.4	-----																										I	----										
Lazac	89.5	-----																										R	--		Y	R	S	--					
Macskacápa	89.5	-----																										R	--		R	--		F	R	--			

**8. ábra: A PACAP38 szerkezeti összehasonlítása gerincesekben.** Az ábra bal oldalán a fajnevek, középen a szekvencia homológia százalékos aránya, jobb oldalon pedig a fehérje aminosav sorrendje és az aminosavak pozíciója van feltüntetve (forrás: Dénes et al. 2019a ábrája alapján módosítva).

### 1.2.1 A PACAP előfordulása a szervezetben

A PACAP nagy mennyiségben a központi idegrendszerben fordul elő, ahol expresszióját már bizonyították a kétéltűek, halak, madarak és emlősök szervezetében egyaránt (Lugo et al. 2019). Legnagyobb koncentrációban a hipotalamuszban található meg, azonban más agyterületeken is leírták jelenlétét többek között a középagy, kisagy, agytörzs, híd vagy az agykéreg területén (Arimura et al. 1991; Yon et al. 1992; Ghatei et al. 1993; Peeters et al. 1998; Hannibal 2002; Jakab et al. 2004; Bonaventura et al. 2018). Perifériás idegrendszerben azonosították a vegetatív pre- és postganglionáris neuronokban, valamint a spinális ganglionok területén is (Köves et al. 1990; Tsuchida et al. 2014). Számos más helyről is kimutatták jelenlétét, így például a lépből, nyirokszövetből, méhből, emlő szövetéből, a petefészekből, a heréből, a mellékveséből vagy a hasnyálmirigyből egyaránt (Skakkebaek et al. 1999; Squillacioti et al. 2006; Vaudry et al. 2009; Csanaky et al. 2012). A kardiovaszkuláris, gasztrointesztinális, légző- illetve immunrendszer területén szintén találhatunk PACAP tartalmú idegrostokat (Uddman et al. 1991a; Uddman et al. 1991b, Gaytan et al. 1994; Czeglédi et al. 2011; Jansen-Olesen és Hougaard Pedersen 2018).

### 1.2.2 A PACAP előfordulása a szemben

A PACAP jelentős mennyiségben található az íriszben és a sugártestben (Wang et al. 1995). Leírták továbbá a peptid jelenlétét radioimmunoassay módszerével a szaruhártya, kötőhártya, ínhártya, érhártya, könnyesatorna, valamint a szem belső simaizmainak beidegzéséért felelős ganglion ciliare területéről is (Wang et al. 1995; Elsás et al. 1996; Shioda et al. 2016). A PACAP a különböző állatfajok retinájában már a fejlődés korai stádiumában is megjelenik (Denes et al. 2019b). Zebrahalak esetén megfigyelték a peptid jelenlétét a megtermékenyítést követő 72. órában a ganglionáris sejtrétegben (Mathieu et al. 2005). Nyolc napos csirkeembrióból is kimutatható a retina belső nukleáris rétegéből már a PACAP pozitivitás (Carrazzoni et al. 2005). Rágcsálók esetén leírták, hogy a 20. fejlődési naptól a ganglionáris sejtrétegben megjelenik a fehérje jelenléte (Skoglösa et al. 1999), ami a felnőtt egyedek retinájában már az NFL, a GCL és az OPL területén (Seki et al. 1997; Shioda et al. 2016), valamint az INL és IPL rétegében is azonosítható lesz (Izumi et al. 2000; Seki et al. 2000b; Gábriel et al. 2019). Továbbá ismert, hogy a retinában a PACAP mennyiség a cirkadián ritmusnak megfelelően oszcillációt mutat (Józsa et al. 2001).

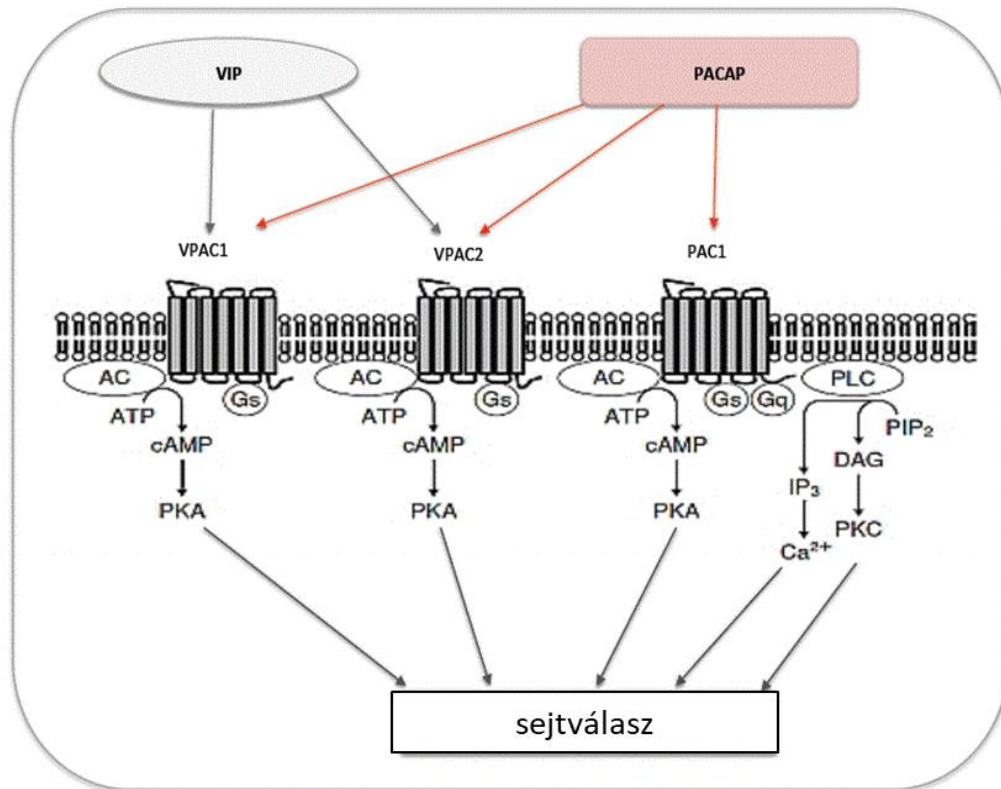
### 1.2.3 A PACAP receptorai

A PACAP receptorai a PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorok, amelyek a G-proteinhez kapcsolt receptor családba tartoznak. Egyik szerkezeti jellegzetességük, hogy 7 transzmembrán domén építi fel őket, extra- (N-terminális) és intracelluláris (C-terminális) régióik váltakozásával (9. ábra). Az intracelluláris részen G-protein kötő domén található (Ishihara et al. 1992; Pisegna és Wank 1993; Lutz et al. 1993). A PACAP 1000-szer nagyobb mértékben képes kötődni a PAC1 receptorához a VIP-el szemben, míg a VPAC1 és VPAC2 receptor esetén a két polipeptid közel azonos affinitást mutat (Arimura 1992; Sherwood et al. 2000; Shioda et al. 2016).

A PACAP protektív hatását számos egymással konvergáló jelátviteli úton keresztül fejti ki (9. ábra) (Gábriel et al. 2019). Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a PACAP három receptora közül a citoprotektív hatás közvetítéséért szinte kizárólag a PAC1 receptora felelős (Somogyvári-Vigh és Reglodi 2004; Meyer 2006; Botia et al. 2007). A PACAP a PAC1 receptorát aktiválva indukálja az adenilát-cikláz (AC) ami cAMP expressziós szintemelkedést idéz elő, és mellyel a protein kináz A (PKA) által közvetített útvonalakat is beindítja. A foszfolipáz C (PLC) indukálásával a  $Ca^{2+}$  mobilizációt képes stimulálni, mellyel



egy időben a protein kináz C (PKC) szignalizációt is serkenti. A PAC1 receptor képes AC-függő, valamint AC független módon is befolyásolni a MAPK útvonalat (9. ábra). A fent leírt és egyéb más útvonalak PAC1 receptoron keresztüli szabályozása nagymértékben függ a PACAP koncentrációjától, valamint a PAC1 receptor splice variánsainak sejttípus függő előfordulásától (Shioda et al. 2016).



**9. ábra: A PACAP és a VIP receptorai, valamint az azokról indukált főbb szignalizációs útvonalak (Diané et al 2014 ábrája alapján módosítva).**

A PAC1 receptor a szervezet számos területén megtalálható, így többek között az agyban, az adenohipofízisben, a gerincvelőben, a vesében, a szemben és azon belül is a szaruhártyában és a retinában egyaránt (Usdin et al. 1994; Filipsson et al. 1998; Joo et al. 2004; Vaudry et al. 2009; Shioda et al. 2016). A PAC1 receptor a retina mind a 10 rétegében előfordul, ahol kifejezetten magas expressziós mintázatot találtak a GCL-, INL rétegében és a Müller glia- valamint amakrin sejtek esetén (Seki et al. 1997). Ezzel ellentétben kisebb mennyiségben észlelték a PAC1 receptor jelenlétét az IPL, OPL, ONL és a fotoreceptorok külső szegmensének területén (Seki et al. 1997; Izumi et al. 2000; Seki et al. 2000a; Silveira et al. 2002; Kubrusly et al. 2005; Shioda et al. 2016).

#### 1.2.4 A PACAP általános hatásai

A PACAP neuropeptid szerteágazó hatást képes kifejteni és alapvető biológiai funkciók ellátásában vesz részt, melyek háttérében a filogenetikailag igen konzervált szerkezete, valamint a szervezetben való széleskörű előfordulása áll (Campbell és Scanes 1992; Vaudry et al. 2009; Shioda et al. 2016; Horvath et al. 2019). A PACAP-ra gyors felezési idő jellemző, hasításáért a DPP IV enzim felelős (Green et al. 2006). A fehérje számos biológiai folyamatot képes befolyásolni úgy, mint például a táplálkozás, nyál szekréció, a cirkadián ritmus, termoreguláció, memória-, stressz- valamint immunfolyamatok szabályozása (Gray et al. 2002; Hannibal 2006; Murck et al. 2007; Matsuda és Maruyama 2007; Vaudry et al. 2009; Matsuda et al. 2013; Banki et al. 2014; Rudecki és Gray 2016; Matoba et al. 2016; Toth et al. 2020a). Képes a szervezet folyadékháztartását befolyásolni a folyadék felvétel fokozásával, a hipofízis hormontermelését is regulálja, továbbá fokozza a pankréász inzulin-, pajzsmirigy tiroxin szintézisét, ezen kívül pedig már leírták fontos vazodilatátor és hörgőtágító szerepét (Warren et al. 1991; Chen et al. 1993; Lindén et al. 1999; Isobe et al. 2003; Reglodi et al. 2003; Otto et al. 2004; Okada et al. 2007; Winzell és Ahrén 2007; Sándor et al. 2009; Pirger et al. 2010; Tumurbaatar et al. 2019).

Szabályozó funkciói mellett mégis a legkiemelkedőbb hatásai közé a neuroprotektív, citoprotektív és anti-inflammatórikus hatásait soroljuk (Rácz et al. 2006; Atlasz et al. 2010a; Reglodi et al. 2012b; Masmoudi-Kouki et al. 2018; Maugeri et al. 2020), melyeket számos neuronális sérülést modellező in vivo és in vitro kutatással is alátámasztottak (Atlasz et al. 2010a; Shioda et al. 2016; Toth et al. 2020b). In vivo tanulmányok alapján ismert számos idegrendszeri megbetegedésnél az exogén PACAP kezelés védő hatása, így többek között a Parkinson-kórban, Huntington kórban, agyi iszkémia, trauma esetén, depresszió kialakulásánál és egyéb neurodegeneratív betegségeknél (Somogyvári-Vigh és Reglodi 2004; Shioda et al. 2006; Ohtaki et al. 2008; Vaudry et al. 2009; Reglodi et al. 2011; Gaszner et al. 2012; Shioda és Nakamachi 2015; Reglodi et al. 2015; Kormos et al. 2016; Reglodi et al. 2018b; Kovacs et al. 2019). Számos tanulmány foglalkozik az endogén PACAP protektív szerepének vizsgálatával is, ahol a kísérletek során a PACAP knock out (KO) egerek alkalmazása szolgál a legtöbb bizonyítékkal (Hashimoto et al. 2001; Ivic et al. 2019; Barrett et al. 2020). Megfigyelték, hogy sérülés vagy negatív külső ingerek hatására nagyobb mértékű károsodás alakul ki a PACAP KO egerek szervezetében vad típusú társaikhoz viszonyítva (Szabadfi et al. 2012a; Reglodi et al. 2012b; Reglodi et al. 2018a; Józsa et al.

2019; Rivnyak et al. 2018). Leírták, hogy a PACAP gén és ennek következtében a peptid hiánya a szervezet számos területén rendellenes működést eredményez, mint például a hőháztartás egyensúlyának megbomlása, csontosodási folyamatok, fogfejlődés és a könny termelési zavara, vagy az öregedés korai tüneteinek megjelenése (Gray et al. 2002; Reglodi et al. 2012b; Nakamachi et al. 2016; Kovács-Valasek et al. 2017; Farkas et al. 2017; Abad és Tan 2018; Cline et al. 2018; Reglodi et al. 2018a; Józsa et al. 2018; Szegeczki et al. 2019; Fulop et al. 2019). A PACAP neuroprotektív hatásait in vitro kísérletek is igazolják, ahol különböző károsító tényezőkkel (glutamát, etanol, nikotin, ceramid, vagy oxidatív stressz, 6OHDA) szemben bizonyult protektívnek (Somogyvári-Vigh és Reglodi 2004; Rácz et al. 2006; Kasica et al. 2016; Huang et al. 2017; Manavalan et al. 2017).

Kutatások alapján továbbá ismert, hogy a peptid kiemelten fontos gyulladáscsökkentő és immunmodulátor hatással is rendelkezik (Velázquez et al. 2020), ilyen például az endotoxin indukálta citokinek termelődésének (tumor nekrosis alfa faktor (TNF $\alpha$ , interleukin (IL)1, IL-6, IL-12) gátlása (Delgado et al. 1999). Serkenti az immunsejtek migrációját, a fagocitózis folyamatát, valamint befolyásolja a természetes immunitásért felelős antigén felismerő receptornak, a Toll-like receptornak (TLR) a szabályozását is (Delgado et al. 2003; Baranowska-Bik et al. 2006; Bik et al. 2006; Lugo et al. 2019). Az eredmények azt mutatják, hogy a PACAP fontos szerepet tölt be mind a veleszületett, mind pedig a szerzett immunitás folyamataiban, például képes egy kialakuló szepszis mértékét is csökkenteni (Delgado et al. 1999; Ganea és Delgado 2002). Ezt a mérséklést elsődlegesen a PAC1 receptorán keresztül mediálja az endotoxin indukálta interleukinek (IL), adhéziós molekulák és a neutrofil infiltráció gátlása révén (Martinez et al. 2002). Kong és munkatársai a központi idegrendszerből származó primer kevert neuron/glia sejtenyészeten vizsgálta a PACAP hatását lipopoliszaharid (LPS) indukálta gyulladással szemben (Kong et al. 1999). Az endotoxin kezelés következtében nitrogén-monoxid és laktát-dehidrogenáz felszabadulás alakul ki, ami sejtkárosodást idéz elő. A PACAP kezelés képes volt meggátolni a fent említett vegyületek megjelenését, ezzel biztosítva az idegszöveti sejtek túlélését és kialakítva a gyulladáscsökkentő hatását (Kong et al. 1999). Egy másik in vitro tanulmányban LPS-indukálta neurotoxicitással szemben bizonyult protektívnek a peptid mindkét aktív biológiai formája (Yang et al. 2006). Képes volt lecsökkenteni a dopaminerg sejtek gyulladását, gátolta a kaspáz aktivációt és növelte az anti-apoptotikus szignálút vonal elemeinek expresszióját, mint az agyi eredetű növekedési faktor (BDNF), valamint a CREB foszforiláció (Brown et al. 2014).

A PACAP általános sejtvédő hatását az apoptotikus és inflammatórikus folyamatok gátlása révén (apoptózis indukáló faktor (AIF), mitokondriális citokróm C, kaszpáz 3, p38 mitogén-aktiváló protein kináz (MAPK), a c-Jun N-terminális kináz (JNK), a Bcl-2- függő sejthalál promóter (Bad), a Bcl-2-függő X-protein (Bax), a hypoxia indukált faktor 1-alfa (HIF-1 $\alpha$ )), valamint ezzel párhuzamosan az anti-apoptotikus útvonalak (extracelluláris szignál regulációs kináz (ERK1/2), protein kináz B (PKB/Akt), foszfolipáz C, cAMP-reszponzív elem kötő fehérje (CREB)) serkentésével képes kifejteni (Yada et al. 1993; Vaudry et al. 2009; Moody et al. 2011; Reglodi et al. 2012b; D'Amico et al. 2015; Shioda et al. 2016; Perényi et al. 2020). Ilyen védő hatást írtak le többek között kisagyi szemcsesejteken, az agyalapi mirigy adenómasejtjein, tüdő alveoláris sejtjein, valamint a halló- és látószervekben egyaránt (Chang et al. 1996; Cavallaro et al. 1996; Lee et al. 1999; Oka et al. 1999; Delgado és Ganea 2001; Onoue et al. 2004; Szabadfi et al. 2010; Nemeth et al. 2014; Masmoudi-Kouki et al. 2018).

### **1.2.5 A PACAP hatásai a szemben**

Ismert, hogy a PACAP elengedhetetlenül fontos szerepet tölt be a normál retinogenezis folyamatában és a látás funkciójának kialakításában is, mindemellett számos tanulmány vizsgálja a protektív szerepét is különböző retinát érintő degenerációkban egyaránt (Njaine et al. 2014; Atlasz et al. 2016; Shioda et al. 2016; Nyisztor et al. 2018; Denes et al. 2019a).

In vitro kísérletek igazolták az anti-apoptotikus tulajdonságát retinális neuronokban glutamát okozta károsodással szemben, ahol a PACAP kezelés képes volt növelni a cAMP koncentrációját amellyel aktiválta a MAPK rendszerét (Shoge et al. 1998; Shoge et al. 1999). Továbbá leírták újszülött patkányok retina explantátumainak neuroblast sejtjeiben kifejtett védő hatását is, ahol a PACAP kezelés képes volt kivédeni a tapszigargin okozta apoptózist a fotoreceptorok rétegében (Silveira et al. 2002). D'Alessandro és munkatársai nátrium-aziddal előidézett iszkémiás károsodásban in vitro modellben figyelték meg a PACAP kezelés indukálta metabolikus változásokat, ahol azt tapasztalták, hogy a peptid képes a proinflammatórikus faktorok és a peroxidálódott lipidek akkumulációját megakadályozni, ezzel kifejtve a protektív hatását (D'Alessandro et al. 2014).

Kutatócsoportunk in vivo kísérletekkel vizsgálta a PACAP szisztémás monoszódiüm-glutamát (MSG) kezelését patkányok retinakárosodásánál, ahol mind a szisztémás, mind pedig a lokális terápia egyaránt sikeresnek bizonyult (Babai et al. 2005; Babai et al. 2006;

Rác et al. 2006; Atlasz et al. 2009). A modell során alkalmazott intravitreális módszer azonban nagyobb fokú védelmet volt képes kifejteni az MSG okozta toxicitással szemben. A PACAP lokális alkalmazása koncentráció függést mutatott. Azt tapasztaltuk, hogy míg az 1 pikomól intravitreális PACAP-nak alig van védő hatása, addig a 100 pikomólos koncentráció szinte teljes mértékű védelmet biztosít a glutamát okozta toxicitás ellen (Tamás et al. 2004; Babai et al. 2005; Babai et al. 2006). Egyéb toxikus ágensekkel szemben is igazolták retinoprotektív hatását úgy, mint N-metil-D-aszparaginát (NMDA) vagy kainát okozta károsodás, továbbá protektívnek bizonyult a koraszülött retinopátiában és az UV-A sugárzás indukálta degenerációban is egyaránt (Seki et al. 2006; Varga et al. 2011; Atlasz et al. 2011; Kiss et al. 2011; Endo et al. 2011; Shioda et al. 2016; Kvarik et al. 2016). A diabéteszes retinopátia korai szakaszában a dopaminerg és amakrin sejtek degeneratív elváltozásai detektálhatóak, amelyet az intravitreális PACAP kezelés szintén képes volt elhárítani a sztreptozotocin-indukálta diabéteszes modellben (Seki et al. 2004; Szabadfi et al. 2014; Szabadfi et al. 2016; Maugeri et al. 2017a; Maugeri et al. 2017b).

A PACAP védő hatását számos iszkémia okozta retinális degenerációban vizsgálták már. Ilyen a magas szemnyomás okozta retinakárosodás, ahol többek között a cAMP és MAPK útvonal aktiválásával képes volt megakadályozni a ganglion sejtek apoptózist (Seki et al. 2008; Seki et al. 2011; Cheng et al. 2018). Patkány modellen bilaterális arteria carotis communis (BCCAO) lekötés hatására agyi hipoperfúzió alakul ki, amely súlyos maradandó károsodást eredményez, amihez jelentős iszkémiás retina degeneráció is társul (Atlasz et al. 2007; Mester et al. 2009; Reglodi et al. 2018b; Qin et al. 2019). A BCCAO a retina összes rétegét érinti, így jelentős mértékben károsítja a sejteket, amely hatására lecsökken az OLM-ILM közötti távolság (Atlasz et al. 2007). Számos tanulmány igazolta, hogy a PACAP protektív funkciót képes kifejteni a fent említett modellben, ahol az eddig alkalmazott intravitreális terápia mellett már a non-invazív szemcseppel történő kezelése is hatékonynak bizonyult (Mester et al. 2009; Atlasz et al. 2007; Szabadfi et al. 2010; Atlasz et al. 2010; Werling et al. 2016; Werling et al. 2017; Kovacs et al. 2020). Molekuláris biológiai szinten sikerült igazolni azt is, hogy a hipoperfúziós károsodást követően a p38MAP kináz és JNK aktivációját a PACAP lecsökkentette, míg a protektív Akt valamint ERK foszforilációját megnövelte (Szabo et al. 2012). Mindemellett a PACAP képes volt meggátolni az iszkémiás károsodásra megemelkedett citokinek (úgy, mint, citokin-indukált neutrofil kemoattraktáns-1 (CINC-1), ciliáris neurotróf faktor, fractalkine, szolubilis intercelluláris adhéziós molekula (sICAM), IL-1, CXC kemokin, makrofág gyulladáscsökkentő fehérje 1 (MIP-1), kemokin ligand 5 és a szöveti metalloproteináz gátló fehérje 1 (TIMP-1)) expresszióját is, mellyel

párhuzamosan emelte a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor és a tímusz kemokin szintjét (Szabo et al. 2012). Funkcionális vizsgálatok is alátámasztották retinoprotektív hatását, ahol az a- és b-hullám iszkémiás károsodásra bekövetkező amplitúdó csökkenését a PACAP kezelés képes volt meggátolni és a kontroll állapothoz közeli hullám amplitúdó értékeket biztosítani (Danyadi et al. 2014).

Szabadfi és munkatársai leírták azt is, hogy PACAP génhányos egerek iszkémia hatására sokkal érzékenyebben reagálnak vad típusú társaikhoz viszonyítva, ezáltal nagyobb mértékű retina degeneráció alakul ki náluk, mely jól bizonyítja az endogén PACAP elengedhetetlenül fontos szerepét is az oxigénhiányos állapotban (Szabadfi et al. 2012a).

### 1.3 Maxadilán

A maxadilán fehérjét a leismaniázist terjesztő homoki légy (*Lutzomyia longipalpis*) nyálából izolálták először (Lerner et al. 1991), mely gerincesek szervezetében egyáltalán nem fordul elő. A peptid fő tulajdonsága, hogy potens vazodilatációt eredményez (10. ábra) a homoki légy okozta csípés helyén ezzel elősegítve a vérszívás folyamatosságát (Titus & Ribeiro 1988; Ribeiro 1987; Gillespie et al. 2000; Thakur et al. 2020).

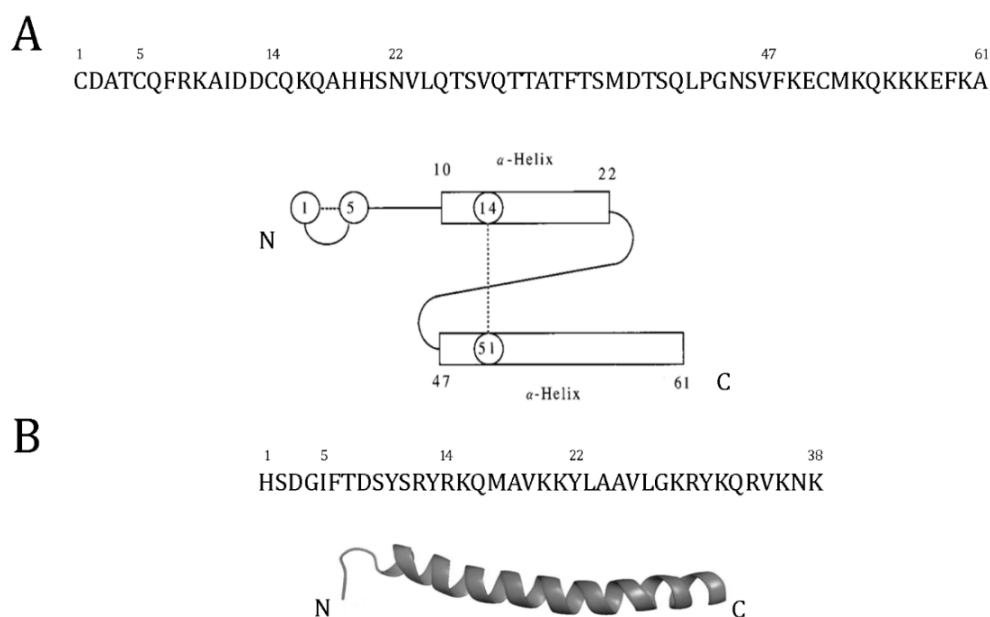


**10. ábra: Homoki légy csípése eredményezte lokális vazodilatáció megjelenése a bőr felszínén (Lerner et al. 2007 ábrája alapján).**

A maxadilán egy 61 aminosavból felépülő fehérje, mely szekvenciája a homoki légy földrajzi előfordulásának tekintetében széles divergenciát mutat. A Közép- és Dél-Amerika területeiről izolált populációkban a maxadilánt kódoló gén szekvenciája 12,8%-os nukleotid

variabilitással bír, ami 23%-os aminosav eltérést eredményezhet (Lanzaro et al. 1999; Souza et al. 2017).

Szerkezetét tekintve két alfa-hélixet összekötő béta-lemez motívumot tartalmaz. Ezenkívül két darab diszulfid gyűrű is található benne négy darab cisztein aminosav között, amely az 1-5 és 14-51 pozíciókban helyezkedik el (11.A ábra). A C-terminális lizin aminosavai biztosítják a maxadilánnak a PAC1 receptorához való kötődést, treonin aminosavai pedig a PAC1 receptor aktivációját, mellyel vazodilatáció hatást képes indukálni. Az első gyűrű eltávolítása vagy az ott található két cisztein alaninnal való helyettesítése nem befolyásolja a peptid hatását. A második diszulfid gyűrű ciszteinjeinek alaninnal való cseréje viszont a fehérje aktivitásának elvesztésével jár. Ez a megfigyelés bizonyítja a második gyűrű fontosságát a strukturális integritás megtartásában és a megfelelő konformáció fenntartásában, melyet igazol továbbá az is, hogy a diszulfid gyűrű konzervált szerkezeti elemként van jelen a fehérje természetben előforduló változataiban (Reddy et al. 2006).



**11. ábra: A: A maxadilán fehérje felépítése és B: a PACAP elsődleges és másodlagos szerkezetével való összehasonlítása (Moro et al. 1999 és Tchoumi et al. 2014 ábra alapján módosítva).**

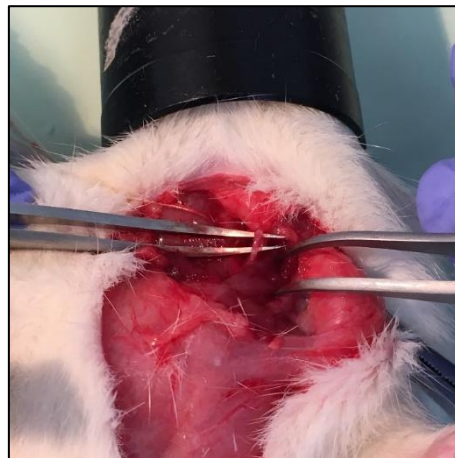
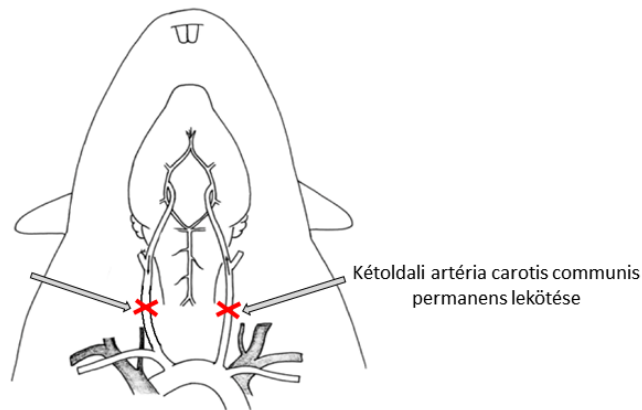
A maxadilán szerkezetéből adódóan kizárólag a PAC1 receptoron keresztül képes kifejteni a hatását (szelektív PAC1 receptor agonista), ami miatt kiválóan alkalmas a PACAP

ugyanezen receptorán kifejtett protektív folyamatainak feltérképezéséhez (Clason et al. 2016). Szerkezetileg azonban a maxadilán semmiféle hasonlóságot nem mutat a PACAP fehérjével (11.A,B ábra). Kutatások alapján ismert, hogy a maxadilán értágító hatása az intracelluláris cAMP simaizomsejtekben bekövetkező emelkedéséhez köthető (Grevelink et al. 1995; Lerner et al. 2007). A maxadilán rövidebb formái, mint ami a Max.d.4 (maxadilán 24-42) vagy az M65 (maxadilán 25-41), melyek szintén szelektíven kapcsolódnak a PAC1 receptorhoz, antagonistaként funkcionálnak, és ezzel képesek teljesen felfüggeszteni a PAC1 receptor indukálta cAMP emelő hatását (Moro et al. 1999). Továbbá a maxadilán képes a PAC1 receptoron keresztül növelni a pankreász béta sejteiben a kalcium koncentrációt, ezzel befolyásolva a glükóz indukálta inzulin szekréciót (Yamada et al. 2004). Egy másik tanulmányban sikeresen demonstrálták a maxadilán fehérjének a neuronális őssejt proliferációban betöltött elengedhetetlenül fontos szerepét is (Mercer et al. 2004). Számos vizsgálat irányult a gyulladásgátló hatásának feltérképezésre (Soares et al. 1998; Lauenstein et al. 2011). A LPS indukálta gyulladás hatására a peptid a PAC1 receptoron keresztül cAMP szintet emelt, melynek következtében a makrofágok TNF $\alpha$ -termelése lecsökken, ezzel párhuzamosan a IL-10 és IL-6 expresszió növekedés mutatható ki belőlük. Ezek együttes hatása eredményezi a PAC1 receptor letális endotoxémia elleni védő mechanizmusát (Soares et al. 1998).

#### **1.4 Bilateralis carotis communis okklúzió (BCCAO)**

Retinális iszkémia kialakításához számos modell ismert, ilyen például a szemüregi arteria leköttése, magas intraokuláris nyomás alkalmazása vagy a kétoldali arteria carotis communis elzárása (Osborne et al. 2004). A BCCAO létrehozása történhet egy rövid ideig tartó- vagy végleges leköttéssel (12. ábra). Az időszakos leköttetés iszkémiás/reperfúziós elváltozásokhoz vezet, míg permanens elzárása egy krónikus, retinális hipoperfúziót alakít ki. A kétoldali arteria carotis communis permanens elzáródása patkányoknál csupán csökkentett agyi vérellátást eredményez a kollaterális keringést biztosító arteria basilarisnak köszönhetően, azonban ez az állapot a retina vérellátásában igen súlyos zavarokat okoz, mellyel iszkémiás retina degenerációs modell hozható létre (Block et al. 1992; Osborne et al. 1999; Stevens et al. 2002; Yamamoto et al. 2006; Szabadfi et al. 2010).





**12. ábra: A: A BCCAO modell kialakításának sematikus ábrája** (forrás: Lim és Lee 2014 ábra alapján módosítva). **B: A BCCAO műtét során a baloldali arteria carotis izolálása látható** (forrás: saját ábra).

### 1.5 Bakteriális lipopoliszaharid endotoxin (LPS)

A bakteriális sejtfal jelentős szereppel bír a baktériumok életben maradása során. Sejtfaluk összetétele alapján elkülönítünk Gram pozitív és Gram negatív baktériumokat (Salton 1963). A két csoport struktúrális felépítése eltér egymástól. A G(+) baktériumok egy egyszerűbb teiko-sav tartalmú peptidoglükán réteggel rendelkeznek, ezzel ellentétben a G(-) baktériumok esetében ez bonyolultabb felépítésű, mivel a külső membránján antigén karakterrel rendelkező LPS réteg is található (Costerton et al. 1974). Ez az endotoxin réteg a következőkből áll: O-antigén specifikus poliszaharid oldallánc, oligoszaharid és glikolipid mag régió, illetve egy lipid A komponens (Willey et al. 2009). Az LPS toxicitásáért a lipid A komponens felel, melynek köszönhetően erős immunmodulátor és immunstimuláló

vegyületnek számít. Gazdaszervezetbe jutva proinflammatorikus citokinek termelését, makrofágok aktivációját eredményezi (Muta és Takeshige 2001; Willey et al. 2009; Lin et al. 2013; Khan et al. 2018), ezáltal alkalmas gyulladásos folyamatok vizsgálatára (Bhavsar et al. 2008; Wisniewski et al. 2019; Nova et al. 2019). Modell állatok szisztémás, valamint lokális LPS kezelése a szemben uveitisz kialakulását eredményezi, amelyhez súlyos retinális gyulladás társul, így az endotoxin kiválóan alkalmas retina inflammatorikus folyamatainak modellezésére (Jabs et al. 2005; Caspi 2006).

## 2 Célkitűzések

- I. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy az exogén módon alkalmazott PACAP, illetve a szervezetben megtalálható endogén formája is retinoprotektív hatással bír iszkémiás retinopátia esetén (Atlasz et al. 2007; Atlasz et al. 2010b; Szabadfi et al. 2012a; Szabo et al. 2012; Danyadi et al. 2014; Werling et al. 2016).

Kísérletünk első felében így célul tűztük ki a retinoprotektív hatásokért felelős PAC1 receptor védő hatásának igazolását maxadilán kezelés segítségével a kétoldali arteria carotis communis permanens lekötésével kialakított iszkémiás retinopátia patkánymodelljében.

- II. A kutatómunka második felében az endogén PACAP, valamint az anti-inflammatórikus hatásokért felelős PAC1 receptor védő szerepét vizsgáltuk maxadilán segítségével LPS indukálta retinális gyulladás egérmodelljében.

### **3 PAC1 receptor retinoprotektív hatásának vizsgálata iszkémiás retinopátia esetén**

#### **3.1 Anyagok és módszerek**

##### **3.1.1 Kísérleti állatok**

Kísérletünk során 3 hónapos felnőtt hím Wistar patkányokat használtunk (n=36), melyek súlya átlagosan 250-300g volt. Az állatok laboratóriumi tartásánál megfelelő páratartalmat és állandó 24-25°C-os hőmérsékletet biztosítottunk, valamint 12 órás világos és sötét periódusban voltak, mely idő alatt mindvégig szabad hozzáférést biztosítottunk számukra a táplálékhoz és az ivóvízhez. A patkányokat érintő összes kísérleti beavatkozásnál betartottuk az Intézeti Állatetikai Kódexében foglaltakat (engedélyszám: ZOHU0104L 07).

##### **3.1.2 A bilaterális arteria carotis communis permanens lekötésével kialakított retina degenerációs modell**

Az állatok közös nyaki verőereit izoflurános altatás alatt sztereomikroszkóp segítségével a középvonali nyaki metszéstől mindkét oldal irányában feltártuk, majd a bolygóidegtől óvatosan elválasztva, 3-0-s nem felszívódó sebészi fonál segítségével permanens ligatúrát alkalmaztunk. Kontroll csoportként álműtött (sham) állatokat alkalmaztunk, ahol a patkányok a műtéti beavatkozáson átestek, azonban náluk az arteria carotis communis nem került lekötésre. Ezt követően mind a két csoportnál az állatok sztereomikroszkóp alatt a jobb szemükbe intravitreálisan 5 mikroliter maxadilán (Bachem) oldatot kaptak Hamilton fecskendő segítségével. A maxadilánt 0,1 mikromólos (n=9) és 1 mikromólos (n=9) koncentrációban foszfát pufferelt sóoldatban (PBS) oldva alkalmaztuk. Citokin array analízisnél már csak a szövettani eredményeknél effektívebbnek bizonyult 1 mikromólos maxadilán koncentrációt alkalmaztuk. Az állatok bal szeme mindig a kezelés kontrolljaként szolgált, melybe minden esetben azonos módon és mennyiségben a vivőanyagot, PBS-t injektáltuk.

##### **3.1.3 A retina minták rutin szövettani vizsgálata**

A patkányokat két hét posztoperatív időszak után ketamin, xylazil és fiziológiás sóoldat megfelelő arányú keverékével túlaltattuk. Ezt követően a szemeket eltávolítottuk,

majd bemetszést ejtve a sclerán, óvatosan körbemetsztük az ínhártya és a szaruhártya határát, így eltávolítva a szaruhártyát és ezt követően kigördítve a szemlencsét, a szemserlegeket (eye-cup) kaptuk meg. A mintákat utána 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, majd mosási-dehidrálni folyamatokat követően Durcupan ACM-gyantába (Sigma) ágyasztuk és Reichert Ultracut E ultramikrotommal 2-3 mikrométeres vastagságú félvékony metszeteket készítettünk. Ezt követően toluidinkék festéssel kontrasztosítottunk (1%-os festőoldat, Toluidine Blue O, Certified, Sigma + 1g nátriumborát), és DePeX-el (DPX, Sigma) lefedtünk. Az így elkészült metszeteinket Nikon Eclipse 80i fénymikroszkóp segítségével lefotóztuk. Retina minták rétegvastagságának lemérését Q Capture programmal végeztük, ahol minden esetben a mérés a különböző csoportokból azonos helyről készült (a centrális retinális régióból a látóidegtől 1mm-re) (Atlasz et al. 2007). A képeket Adobe Photoshop CS6 segítségével további feldolgozásnak (elforgatás, feliratozás) vetettük alá. A mérések folyamán meghatároztuk a teljes retina vastagságát, azaz a külső és belső határhártya közötti- (OLM-ILM), a külső és belső rostos- (OPL, IPL), illetve a külső és belső nukleáris rétegek (ONL, INL) vastagságát. Ezután a metszeteken a ganglionsejtek rétegében (GCL) 100 mikrométeres szakaszon leszámoltuk az átlagosan elhelyezkedő sejtek számát is.

### **3.1.4 A retina minták citokin array analízise**

A citokin array kitek működési elve az antitestek nitrocellulóz membránhoz való kötődésén alapul. A patkány citokin array szemikvantitatív mérésének elvégzéséhez 24 órával a BCCAO műtétet követően az állatok retina mintáit izoláltuk, majd csoportonként 4 db állat egy-egy retina mintáját egyesítettük. Ezt követően sejtfeltárást hajtottunk végre késes homogenizátor segítségével 400µl PBS és 10 µl proteáz inhibitor hozzáadásával. Detergensként Triton X-100-at alkalmaztunk. A továbbiakban a citokin array kitben (Rat Cytokine Array Panel A kit R&D Systems, Biomedica) található protokoll alapján jártunk el az arrayben található oldatok segítségével. A membránok blokkolását, antitesttel történő inkubálását, majd a mintáinkkal folytatott reagáltatásukat mosási eljárások követték. Ezt a sztreptavidin-tormaperoxidáz kemilumineszcens reakciója és a film kazettára történő előhívása követte a sötét szobában. A filmek denzitometriás elemzéshez Protein Array Analyzer programot (Image J-NIH software) használtunk.

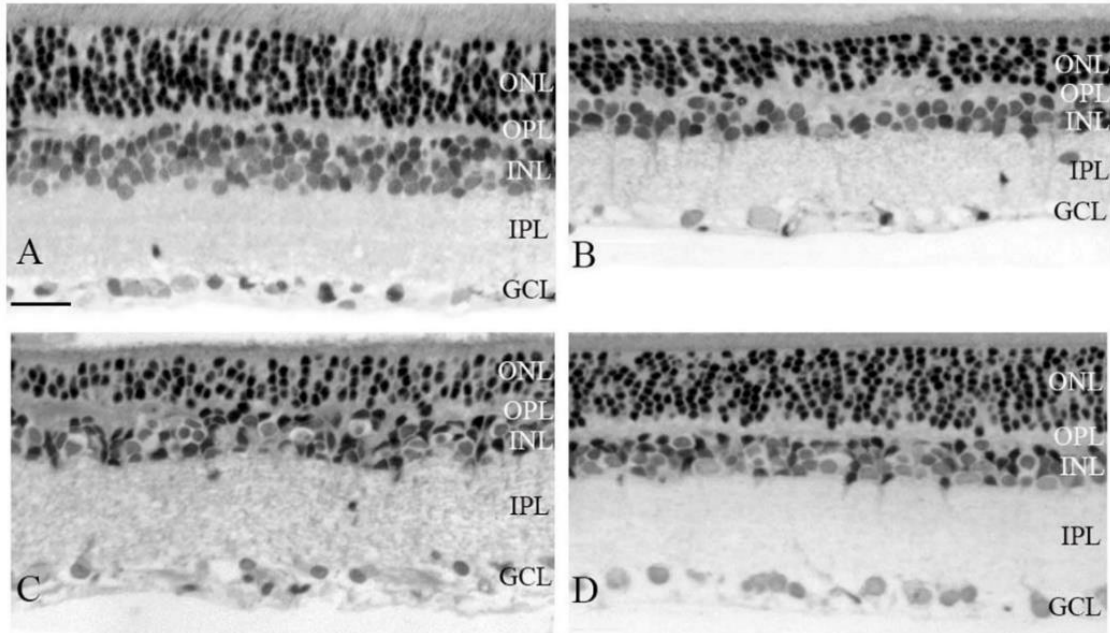
### **3.1.5 Statisztikai analízis**

A diagrammokon az adatokat az átlag  $\pm$  standard hiba (SEM) feltüntetésével ábrázoltuk. A szövettani eredmények és a citokin array mérések kiértékeléséhez Kolmogorov-Smirnov normalitás tesztet követően ANOVA tesztet és Fisher LSD post hoc analízist használtunk, az OriginPro 2016 nevű programban. A szignifikancia értéket minden esetben  $p < 0,05$  határoztuk meg.

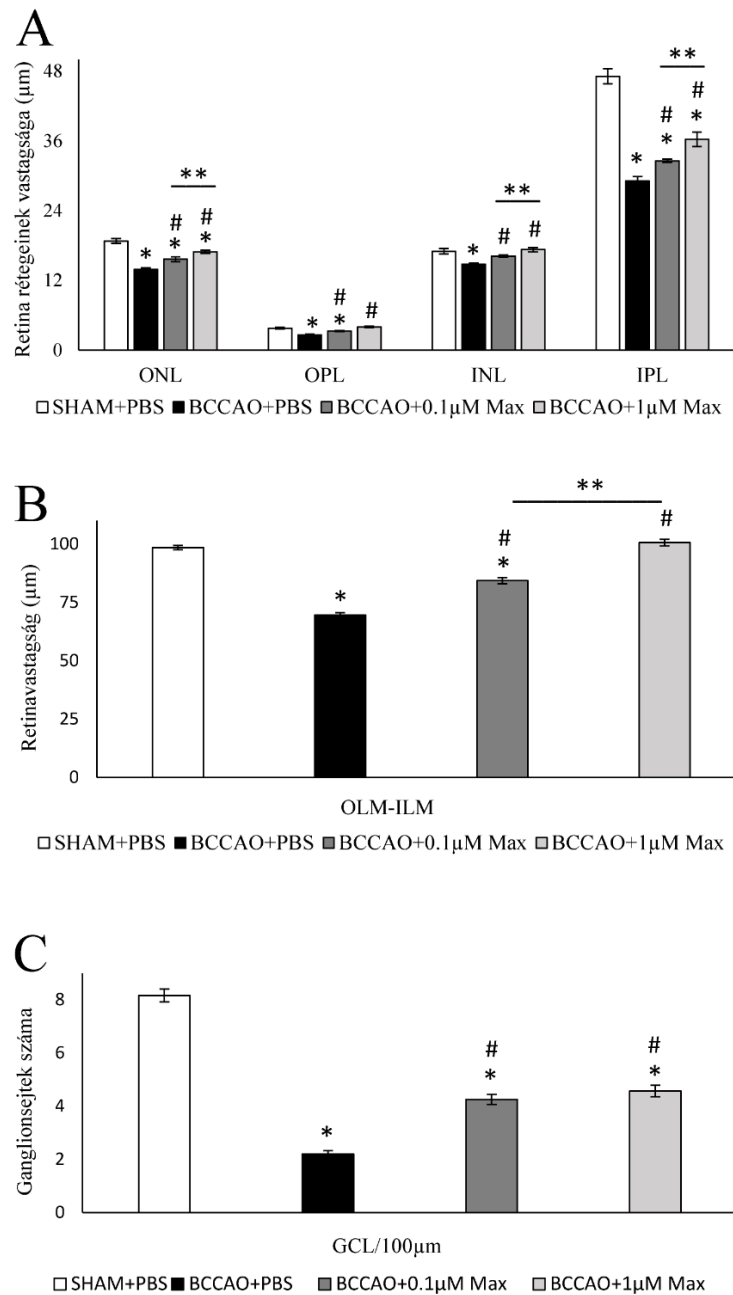
## 3.2 Eredmények

### 3.2.1 A retina minták rutin szövettani analízise

A kétoldali arteria carotis communis lekötés szignifikánsan csökkentette a retina teljes- (OLM-ILM), valamint az egyes rétegeinek vastagságát az áloperált PBS-kezelte kontroll csoporthoz viszonyítva (13.A,B ábra, 14.A,B ábra). A legnagyobb mértékű csökkenés az IPL rétegében volt megfigyelhető, de szignifikáns redukciót mértünk az INL, az OPL és az ONL rétegeiben is (14.A ábra). Az iszkémiás károsodás további jele, hogy szignifikánsan lecsökkent a sejtek száma a GCL réteg 100  $\mu\text{m}$  szakaszára vetítve (GCL/100  $\mu\text{m}$ ) a kontroll csoporthoz képest (14.C ábra). Mindkét vizsgált maxadilán koncentrációban (0,1 és 1  $\mu\text{M}$ ) protektív hatás mutatkozott az OLM-ILM, illetve a külön-külön vizsgált retina rétegeinek vastagságában egyaránt (13.C,D ábra, 14.A,B ábra). Az 1  $\mu\text{M}$  koncentrációnál bizonyult a leghatékosabbnak a protektív hatás az összes réteg tekintetében, kivéve az OPL réteget (13.C,D ábra, 14.A ábra). A maxadilán a GCL rétegben lévő sejtek elhalását is sikerrel kivédte a kezelést nem kapott BCCAO csoporthoz viszonyítva (14.C ábra).



**13. ábra: Fénymikroszkópos reprezentatív felvételek a retina rétegeiből toluidinkék festéssel. A: Sham + PBS kezelés, B: BCCAO + PBS, C: BCCAO + 0,1  $\mu\text{M}$  maxadilán, D: BCCAO + 1  $\mu\text{M}$  maxadilán. ONL: külső határhártya, OPL: külső rostos réteg, INL: belső nukleáris réteg, IPL: belső rostos réteg, GCL: ganglionsejtek rétege, hosszlépték: 20 mikrométer**

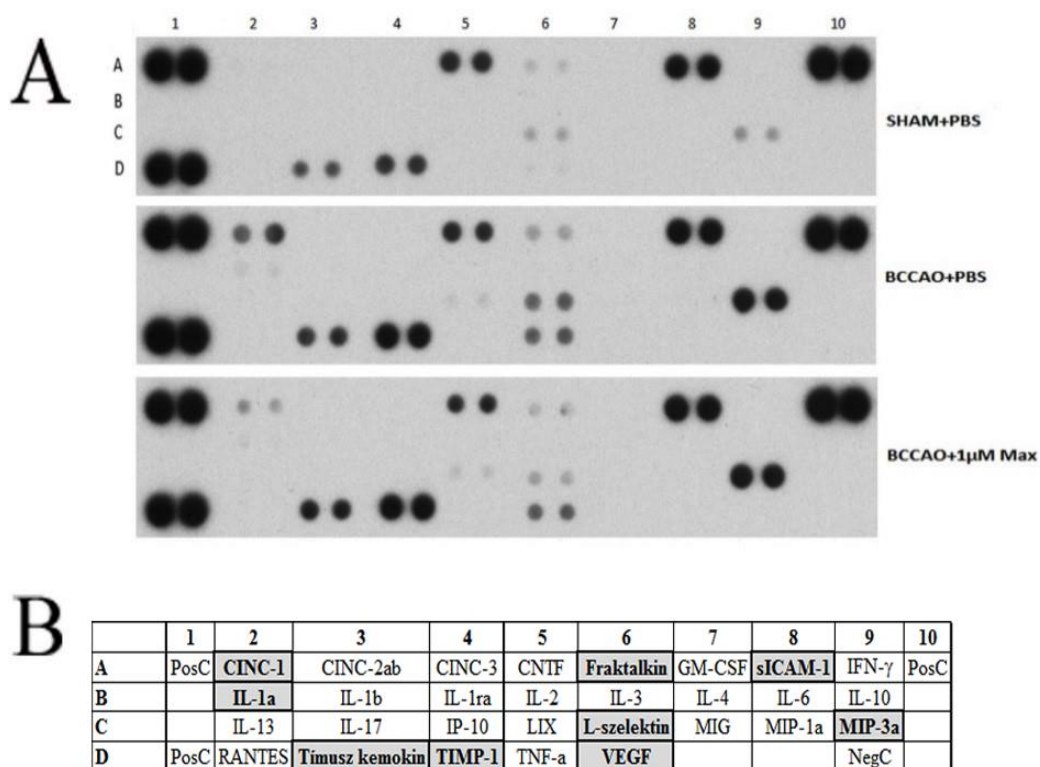


**14. ábra: A retina minták morfometriai analízise. A:** A retina 4 szövettani rétegének analízise. **B:** A belső és külső határhártya keresztmetszeti hosszának statisztikai elemzése (OLM-ILM) **C:** A GCL rétegben átlagosan detektálható sejtek száma 100 mikrométer horizontális távolságon. ONL: külső határhártya, OPL: külső rostos réteg, INL: belső nukleáris réteg, IPL: belső rostos réteg, GCL: ganglionsejtek rétege. Az oszlopdiagramokon az átlag ± SEM értékeket ábrázoltuk. \* $p < 0,05$  az áloperált csoport retináihoz képest, \*\* $p < 0,05$  a BCCAO + 0,1 µM maxadilán (Max) kezelt retinamintákhoz viszonyítva, # $p < 0,05$  a BCCAO okozta iszkémiás csoporthoz képest.



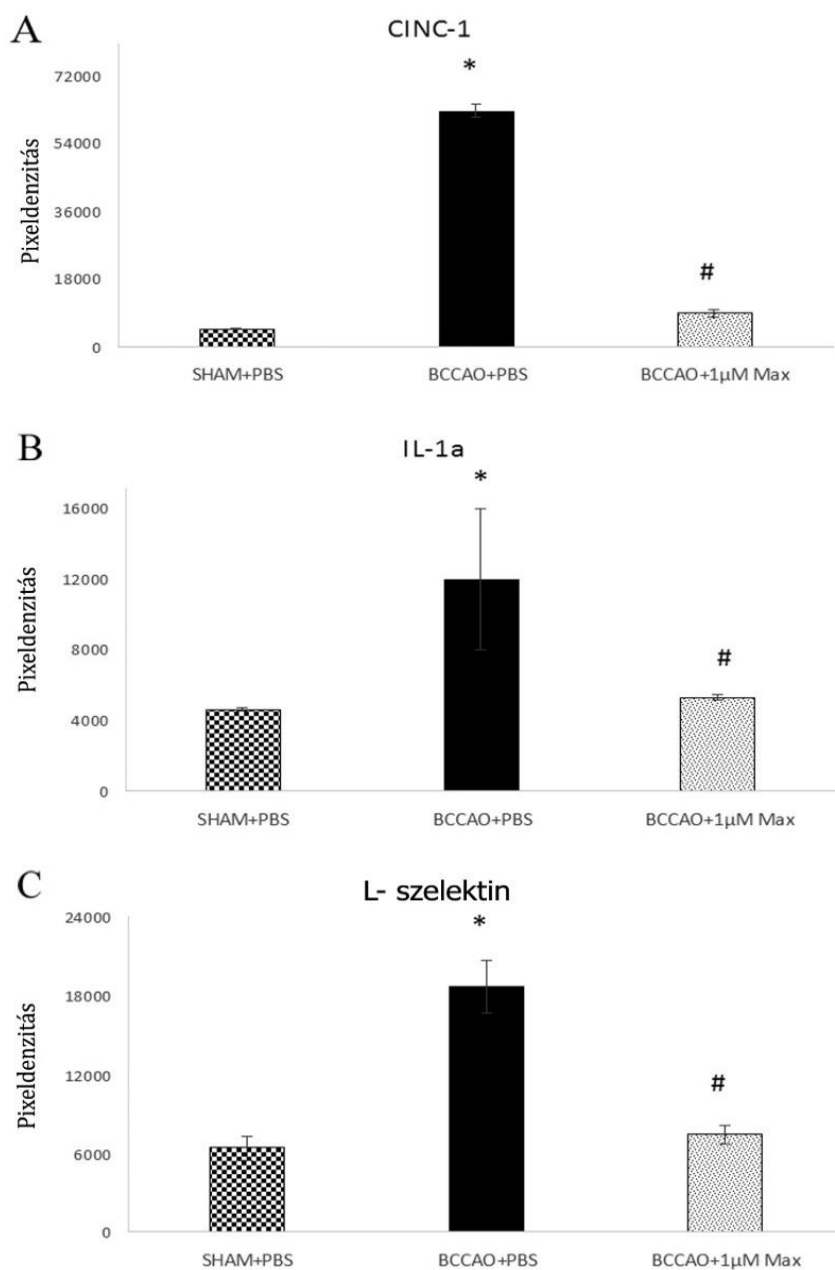
### 3.2.2 A retina minták citokin array analízise

Az iszkémiás kezelést követően számos citokin fokozott expressziója volt detektálható. Az IL-1 $\alpha$  szintje megemelkedett, a többi interleukin (IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10) esetében azonban nem volt változás megfigyelhető. A kemoattraktáns fehérjék, mint a CINC-1, a MIP-3 $\alpha$ , a fraktalkin, az L-szelektin, a tímusz-kemokin, a TIMP-1 és a VEGF (érfali endotél növekedési faktor) citokinek expressziója szignifikánsan növekedést mutatott BCCAO hatására, a kontroll sham csoporthoz viszonyítva (15. ábra).



**15. ábra:** **A:** Citokin array panelek reprezentatív felvételei a PBS-kezelt sham, a PBS-kezelt BCCAO és a BCCAO + 1  $\mu$ M maxadilán (Max) kezelt csoportokban. **B:** A táblázatban a kiten található citokineket ábrázoltuk, kiemelve szürkével azokat, melyek szintje a BCCAO + PBS csoportban szignifikáns növekedést mutatott a sham+PBS csoporthoz viszonyítva.

Az intraokuláris 1 mikromólos maxadilán kezelés a BCCAO csoportban képes volt megakadályozni a CINC-1, az IL-1 $\alpha$  és az L-szelektin citokinek expressziós emelkedését (16. ábra). A BCCAO aktiválta többi citokin esetén azonban nem találtunk szignifikáns változást a kezelés hatására.



**16. ábra: A maxadilán kezelés által szignifikánsan befolyásolt citokinek kvantitatív elemzése a sham+PBS, a BCCAO+PBS és a BCCAO + 1  $\mu$ M maxadilán (Max) kezelt csoportokban. A: citokin indukálta kemoattraktáns protein-1 (CINC-1), B: interleukin-1-alfa (IL-1-a), C: L-szelektin. Az oszlopdigramokon az átlag  $\pm$  SEM értékeket ábrázoltuk. \*p<0,05 sham+PBS csoporthoz képest, #p<0,05 a BCCAO+PBS csoporthoz viszonyítva.**

### 3.3 Diszkusszió

Jelen tanulmányunk célja a retinoprotektív tulajdonságú PACAP PAC1 receptorának vizsgálata iszkémiás retinopátiában egy szelektív PAC1 receptor agonista, maxadilán nevű fehérje segítségével. A cerebrális iszkémia gyakran vezet irreverzibilis agyi károsodáshoz, idegpusztuláshoz és ér eredetű retinakárosodásokhoz (Atlasz et al. 2007; Dreixler et al. 2009; Szabo et al. 2012; Sun et al. 2015). A kísérletünk során alkalmazott BCCAO modellünknel enyhe agyi hipoperfúzió alakul ki, melyhez jelentős retinát érintő elváltozások is társulnak (Farkas et al. 2007; Qin et al. 2019). Kutatócsoportunk korábbi tanulmányaiban már több neuroprotektív kezelést tesztelt sikerrel a BCCAO okozta agyi hipoperfúzió ellensúlyozására úgy, mint az illó anesztetikumok, PARP gátlók, mitokondriális ATP-szenzitív kálium csatorna agonista diazoxid és urokortin alkalmazásával (Atlasz et al. 2007; Szabadfi et al. 2009; Mester et al. 2009; Szabadfi et al. 2010; Szabadfi et al. 2012b; Kovacs et al. 2019).

Ismert, hogy az exogén módon alkalmazott PACAP retinoprotektív szereppel bír iszkémiás károsodás során, mind a magas szemnyomás-, mind a BCCAO okozta retina degeneráció esetében (Atlasz et al. 2007; Atlasz et al. 2010a; Seki et al. 2011; Szabo et al. 2012). Továbbá a PACAP tízszer potensebb retinoprotektív hatást képes kifejteni a vele rokon VIP-hez viszonyítva egy iszkémiás károsodásnál (Szabadfi et al. 2012a). Egy másik tanulmányból ismert az is, hogy BCCAO modellben a PACAP nem csupán a retina szerkezetének megóvásában, hanem a látás funkciójának megőrzésében is kulcsfontosságú szerepet lát el (Danyadi et al. 2014).

A PACAP receptorok különböző betegségeknél ígéretes terápiás célpontok lehetnek, ezért kiemelten fontos a PACAP receptorok degenerációs modelleken betöltött szerepének ismerete (Dejda et al. 2011; Reglodi et al. 2015; Shioda et al. 2016; Atlasz et al. 2016; Toth et al. 2020b; Perényi et al. 2020). Jelenleg a BCCAO indukálta retinális károsodásban a PAC1 receptor szerepe alig ismert. A PACAP38 molekula származékai rendelkezhetnek agonista és antagonisták hatással is. A peptid csonkolása a C-terminálison rövidebb fragmenseket hoz létre, amelyek kisebb affinitásúak a PACAP receptorokkal szemben, míg az N-terminálison rövidített peptidok antagonistaként viselkednek (Robberecht és mtsai. 1992). A fragmensek közül a PACAP6-38 a leghatékonyabban ismert antagonisták, mely nem csupán a PAC1-re, hanem a VPAC2 receptorra is hatással van (Couvineau és Laburthe 2012). Azonban a PACAP6-38 agonistaként is ismert egyes szövetekben. Ilyen hatást képes kifejteni a koriokarcinóma-, az oszteoszarkóma- és a retinoblasztóma sejt kultúrákon,

valamint a porcsejteken is (Reglodi et al. 2008; Juhász et al. 2014; Wojcieszak és Zawilska 2014; Juhász et al. 2015). Mindezek alapján döntöttünk úgy, hogy kísérletünkhöz egy kizárólag a PAC1 receptorra szelektív, agonista hatással bíró fehérjét, a maxadilánt alkalmazzuk a PACAP származékaival szemben.

A maxadilán növeli a cAMP szintjét humán neuroblasztóma-, patkány PC12-, egér MILE hasnyálmirigy- és nyúl aorta simaizom sejtjeiben (Grevelink et al. 1995; Jackson et al. 1996; Moro et al. 1996; Moro és Lerner 1997). Kardiális neuronokban bizonyították a fehérje AC/cAMP/PKA útvonalon keresztüli MEK/foszfo-ERK expressziós szintjének növelését is (Clason et al. 2016). A PACAP-hoz hasonlóan a maxadilán protektív hatását is számos tanulmányban vizsgálták már. Szubkután injektált maxadilán gyulladásellenes hatását figyelték meg *Leishmania major*-ral fertőzött egerekben, ahol a peptid növelte az IL-6 citokin szintjét, ezzel párhuzamosan gátolta a TNF $\alpha$  expresszióját is (Soares et al. 1998; Morris et al. 2001; Guilpin et al. 2002). Továbbá a maxadilán képes volt a humán zsírsejtből származó őssejtekben serkenteni a sejttúlélést a kaszpáz-3 és kaszpáz-9 szintjének csökkentésével, illetve a Bcl-2 expresszió növelésével, ami az apoptotikus sejthalál gátlását eredményezte (Guo et al. 2016). Mind az olfaktórikus plakod és nyálkahártya sejtek TNF $\alpha$  okozta károsodását (Kanekar et al. 2010), mind a retina neuroblaszt rétegének anizomycin-indukálta sejthalálát (Silveira et al. 2002) képes megakadályozni a fehérje. A maxadilán a fent említett tanulmányok alapján PAC1 receptoron keresztül befolyásolja a sejttúlélési és gyulladásellenes szignáltranszdukciós utakat, amelyet jelen tanulmányunk is sikeresen bizonyít retinális iszkémiás károsodás során.

Kísérletünkben a BCCAO által előidézett degeneráció drasztikus morfológiai változásokat okozott a retina szövettani szerkezetében, amit számos citokin expresszióváltozás is alátámasztott. Intravitreális maxadilán kezelés hatására a hipoxiás állatok retina mintáiban, a kontroll csoporthoz hasonló szövettani morfológiát sikerült megőrizni (kivétel ONL, IPL rétege). Ennek hátterében valószínűleg a PAC1 receptor egyenlőtlen eloszlása állhat a különböző retinális rétegekben (Seki et al. 1997). Mindemellett a peptid számos gyulladásban szabályozó szerepet játszó citokinek (IL-1-alfa, L-szelektin és a CINC-1) expressziós növekedését is képes volt gátolni.

Az interleukin-1 fehérjecsald tagjai főleg az immun- és gyulladásos válaszok mediálásában játszanak szerepet, úgy mint a különböző fertőzések és az iszkémiás károsodás (Dinarello 1994; Laszlo et al. 2015). Az IL-1-alfa tehát egy fontos proinflammatorikus fehérje, ami kulcsfontosságú, mind az akut, mind a krónikus gyulladás folyamatainál (Jander et al. 1998; Dinarello 2011). Ezen túl az említett citokin a szöveti elváltozások és a

gyulladásos folyamatok mellett igen fontos szerepet lát el a sejteket érintő nekrozisban is. Különböző károsodások alkalmával nagyon hamar elkezdnek expresszálni és a korai védőmechanizmusok mielőbbi aktiválására serkentik a sejteket (Cohen et al. 2010; Lamacchia et al. 2013). Az általunk tapasztalt IL-1-alfa csökkenése maxadilán hatására egybevetve más kutatócsoportok korábbi eredményeivel az interleukin alosztályok vizsgálatait illetően (Martínez et al. 2006; Scuderi et al. 2015). Hasonló citokin expressziós változásokat tapasztalt munkacsoportunk a PACAP iszkémiás retinoprotekciójának vizsgálatakor is (Szabo et al. 2012).

A szelektin fehérjecsald tagjai a T-sejtek, leukociták és vaszkuláris endotél sejtek kommunikációjának fő résztvevői. Képesek mikrovaszkuláris diszfunkciót és reperfüziós károsodást indukálni (Vollmar és Menger 2011). Az L-szelektinnek megnövekedett expresszióját figyelték meg iszkémiás károsodást követően, több különböző szervi elváltozásnál is. Továbbá meggátolva a citokin-indukálta leukocita inváziót, csökkent gyulladási folyamat volt megfigyelhető neurológiai betegségek során (Toker et al. 1998; Nedvig et al. 2012). A PACAP kezelése több degenerációs modell esetén is csökkenti a sejtadhéziós molekulák expresszióját (Horvath et al. 2010; Szabadfi et al. 2012b; Reglodi et al. 2012b), melyet jelen kísérletünkben mi is tapasztaltunk a maxadilán kezelés hatására.

A CINC-1 ugyancsak szerepet játszik a retina gyulladásos folyamataiban. Proinflammatórikus kemokinként az alfa-kemokin család tagja és leginkább oxidatív stressz, iszkémia és reperfüzió hatására expresszálnodik. Számos gyulladásos folyamatban vesz részt és általában az akut fázisban aktiválódik, ezzel meghatározó szerepet játszva a neutrofil granulociták migrációjában (Ghaly és Marsh 2010). A javuló vérátáramlás hatására a CINC-1 szintjének csökkenése detektálható, ami általában a károsodás mértékének csökkenésével függ össze (Yoshida et al. 1998; Junnarkar et al. 2010). A CINC-1 szintjének fokozódását figyelték meg streptozocin-indukálta diabéteszes nefropátiában is, ahol a kemokin megemelkedett szintje szignifikánsan csökkenthető volt a PACAP kezelés hatására (Banki et al. 2013). A PACAP CINC-1 citokinre gyakorolt hatását leírták BCCAO-indukálta retinakárosodás során is (Szabo et al. 2012), mely teljesen megegyezik az általunk tapasztaltakkal, ahol a maxadilán kezelés képes volt lecsökkenteni a citokin szintjét, ezzel redukálva a retinát ért gyulladási folyamatokat.

Ezen megfigyeléseink alapján a PAC1 receptoron keresztül a maxadilán (PAC1 receptor agonista) alkalmazásával erős gyulladáscsökkentő hatás érhető el iszkémiás retinakárosodás során.

## **4 Endogén PACAP, valamint a PAC1 receptor védő hatásának vizsgálata LPS indukálta retinagyulladásban**

### **4.1 Anyagok és módszerek**

#### **4.1.1 Kísérleti állatok**

Munkánk során 3 hónapos CD-1 vad típusú (Wt) és PACAP génhányos hím egereket (PACAP KO) alkalmaztunk (n=124 állat). Az állatok laboratóriumi tartása az előző kísérletnél leírtakkal megegyező módon történt és minden esetben betartottuk a PTE-MÁB állatkísérleti etikai kódexében előírt irányelveket (engedélyszám: BA02/2000-38/2017).

#### **4.1.2 Állatok kezelése**

Kísérletünkhöz *Escherichia coli*ből izolált O55:B5 szerotípusú LPS endotoxint használtunk, melyet fiziológiás sóoldatban oldottunk. A Wt és PACAP KO állatok fertőzéséhez egyszeri 6 mg/ttkg koncentrációjú intraperitoneális injekciót alkalmaztunk (n=37; Wt+LPS; n=25 PACAP KO+LPS csoport), a kontroll csoportunk PBS kezelésben részesült (n=37 Wt; n= 25 PACAP KO csoport). A PAC1 receptor gyulladásos folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatához a kontroll és az endotoxinnal kezelt vad típusú egerek egy részének (n=24) a jobb szemébe intravitreálisan (ivi) 1 $\mu$ M maxadilán kezelést alkalmaztunk (Wt+ ivi 1 $\mu$ M maxadilán; Wt+LPS+ ivi 1 $\mu$ M maxadilán), míg a bal szemük minden esetben csak vivőanyaggal (PBS-t) kezelt volt (Wt+ ivi PBS; Wt+LPS+ ivi PBS).

#### **4.1.3 A retina minták rutin szövettani vizsgálata**

Az endogén PACAP védő funkciójának rutin hisztológiai vizsgálatához az LPS kezelést követő 7. napon dolgoztuk fel a mintáinkat (n=6/csoportonként: Wt; PACAP KO; Wt+LPS; PACAP KO+LPS). A PAC1 receptor protektív szerepének elemzéséhez az endotoxin kezelést követő 5. héten altattuk túl az állatainkat (n=24 állat, az alábbi csoportokban: Wt+ ivi 1 $\mu$ M maxadilán; Wt+LPS+ivi1 $\mu$ M maxadilán, Wt+ ivi PBS; Wt+LPS+ ivi PBS). A feldolgozás protokollját az első kísérletsorozatnál már részletesen ismertetett eljárás alapján hajtottuk végre.

#### 4.1.4 Optikai koherencia tomográfia vizsgálat

Az állatok retináját (n=24) az LPS kezelés előtt, majd ezt követően heti egyszer 5 héten keresztül OCT (Leica-Envisu™ R-Series SDOIS) készülékünkkel nyomon követtük az alábbi csoportokban: Wt+ ivi 1µM maxadilán, Wt+LPS+ ivi.1µM maxadilán, Wt+ ivi PBS, Wt+LPS+ ivi PBS. A készülék 1,7 mikrométeres felbontási érzékenységgel másodpercenként 32.000 felvételt készít, melyből kialakult a végső felvételünk. A gyulladástól számított 5 hét legendó volt a maradandó retinakárosodás kialakulásához, így eredményeinknél a kontroll, majd az azt követő 5. héten készített felvételek kerülnek bemutatásra. A méréshez az állatokat ketamin koktéllal elaltattunk és 5 m/V%-os ciklopentolát tartalmú pupillatágító szemcseppet (Humapent-TEVA) adtunk nekik. A mérés ideje alatt a szaruhártyájukra műkönnygél (Oftagél, Santen Pharmaceutical) vittünk fel a szem kiszáradásának elkerülése céljából. Az alvó egereket állattartó padon helyeztük el és a megfelelő pozícióba forgatva a retinájukról felvételt készítettünk. Ezután készülékünk fundus kamerájának segítségével szemfenék tükrözést végeztünk el.

#### 4.1.5 Immuhisztokémiai GFAP jelölés

Az immunhisztokémiai vizsgálatokra való feldolgozás az LPS kezelést követő 24 óra elteltével történt (n=5/csoportonként). A preparált egér szemserleget először 4%-os paraformaldehidben (PFA) fixáltuk 30 percig, majd víztelenítés céljából felszálló cukoroldat sorba helyeztük. Ezt követően beágyazó médiumba (Leica) tettük és -18°C-on kriosztáttal (Leica) 16 µm vastagságú metszeteket készítettünk zselatinos tárgylemezre. A retina metszeteket ezt követően 0,1%-os TritonX-100 tartalmú (Sigma) PBS-ben (0,1 M) 6x5 percig mostuk, majd normál szamárserumban (NDS) előinkubáltuk (1%-os NDS (Sigma); 0,1%-os BSA (Sigma); 0,1% nátrium-azid (Sigma) PBS-ben feloldva). A metszetekre ezután monoklonális egér primer antitestet (anti-GFAP, 1:1000) helyeztünk, amit ismét mosás, majd antitesthígítóval oldott (1:200) szekunder anti-egér antitesttel (fluoreszcens festék: Alexa Fluor 488, Sigma) való bevonás követett. Az inkubálás lejárta után propídium-jodidos háttérkontrasztosítást (2 µl/ml (1:500) PI + fiziológiás sóoldattal) végeztünk és a mintákat Fluoroshild (Sigma) segítségével lefedtük. A metszetekről Nikon Eclipse 80i fénymikroszkóppal fényképeket készítettünk, amelyeket Image J (NIH) program segítségével kiértékelünk.

#### **4.1.6 Western blot analízis**

Vizsgálatunkhoz az endotoxin kezelést követően 24 órával dolgoztuk fel az állatainkat (n=7/csoportonként). Izolált retina mintáinkat homogenizáltuk 50 mM TRIS; 50mM EDTA; 50mM Na-ortovanadát; 0,5 (v/v)% proteáz gátló koktél; 0,5 (v/v)% foszfatáz gátló koktél hozzáadásával, majd DC™ Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules) felhasználásával meghatároztuk a minták fehérjetartalmát. Az SDS PAGE gél-elektroforézishez csoportonként 300 µg/minta fehérjét vittünk fel. Ezt a membránra történő blottolás követte, ami után a próbákat 4°C-on 24h keresztül reagáltattuk az elsődleges antitestekkel: foszfospecifikus anti-Akt-1 Ser473 (pAkt; 1:1000; R&D Systems); foszfospecifikus glikogén szintáz kináz-3β Ser9 (pGSK; 1:1000; Cell Signaling Technology), valamint kontrollként nem foszforilált totál-Akt (tAkt; 1:1000) antitestet alkalmaztunk. A membránokra ezt követően felvittük az anti-egér tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitesteket (1:3000; BioRad). Az antigén-antitest komplexeket a kemilumineszcencia reakció tette láthatóvá. Kvantifikálhatóság céljából ImageJ (NIH) programmal denzitometrás méréseket végeztük.

#### **4.1.7 A retina minták citokin array analízise**

Retina mintáinkat az LPS beadását követően 24 órával dolgoztuk fel (n=7/csoportonként) az első kísérletsorozatnál ismertetett protokoll alapján a Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit (R&D Systems) alkalmazásával.

#### **4.1.8 Elektroretinográfia (ERG)**

Az állatok (n=6/csoportonként) lemérése kontroll állapotban, valamint 24 órával az LPS kezelést követően történt. A kísérlet előtt az egereket 24 órán át sötétben tartottuk. A méréshez az állatokat elaltattuk, szemüket pupillatágító szemcseppel (Humapent-TEVA) kezeltük, majd sztereotaxiás padra helyeztük. Ezt követően 4 elektródát rögzítettünk rájuk: kettő darab szaruhártya elektródot (jobb és bal szemre), egy referencia elektródot, amit a két szem közötti szakaszon a bőr alá helyeztünk el, illetve a föld elektródát, amit a farok feletti részbe subcután rögzítettünk (Perlman 1995). Az állatok elektroretinogramját ezután zöld fényimpulzusok mellett regisztráltuk az 50 fényfelvillanásig. A kísérletet 632 nm hullámhosszú vörös fényben végeztük, a fényfelvillanáshoz 503 nm-es zöld LED-et



használtunk, amelyen egy felvillanás 1 mp-ig tartott, és azt 2 mp szünet követte (5cd s/m<sup>2</sup>; 0,25 Hz) (Zhang et al. 2013). Az így érkező jelet amplifikáltuk, és rögzítettük egy A/D konverter segítségével (Danyadi et al. 2014), majd a konverter szoftverével (Ratsoft) átlagoltuk a fényválaszokat. Eredményeink kiértékelését, a- és b-hullám amplitúdó értékeit Origin2016 (Macasoft) software segítségével mértük le.

#### **4.1.9 Statisztikai analízis**

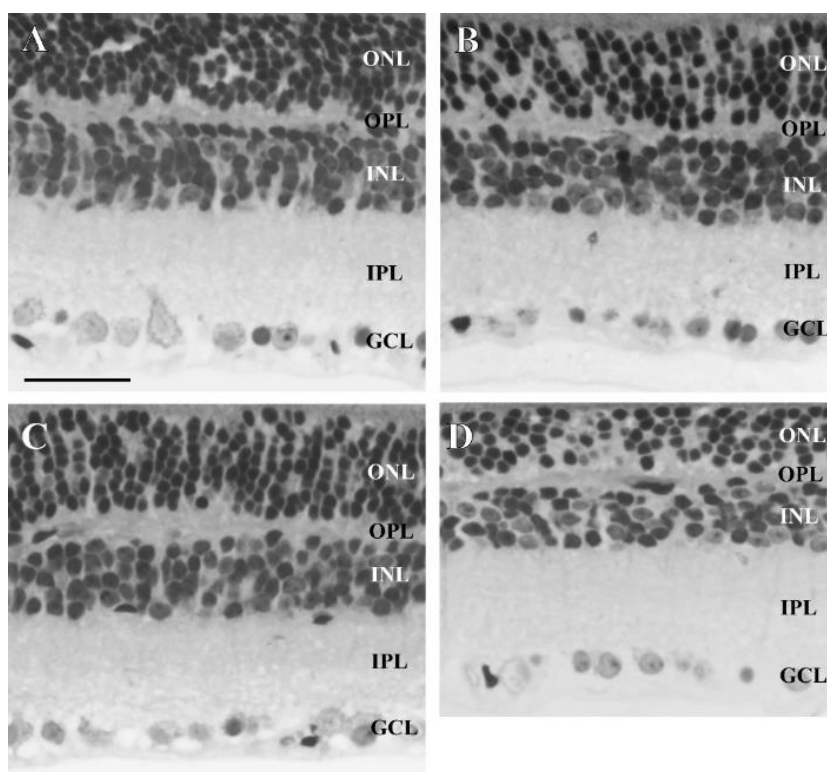
A diagrammokra az átlag  $\pm$  standard hiba (SEM) került feltüntetésre. Az eredményeknél Kolmogorov-Smirnov normalitás tesztet követően ANOVA- és Fisher LSD post hoc analízist használtunk, az OriginPro 2016 nevű programban. A szignifikancia értéket  $p < 0,05$  határoztuk meg.

## 4.2 Eredmények

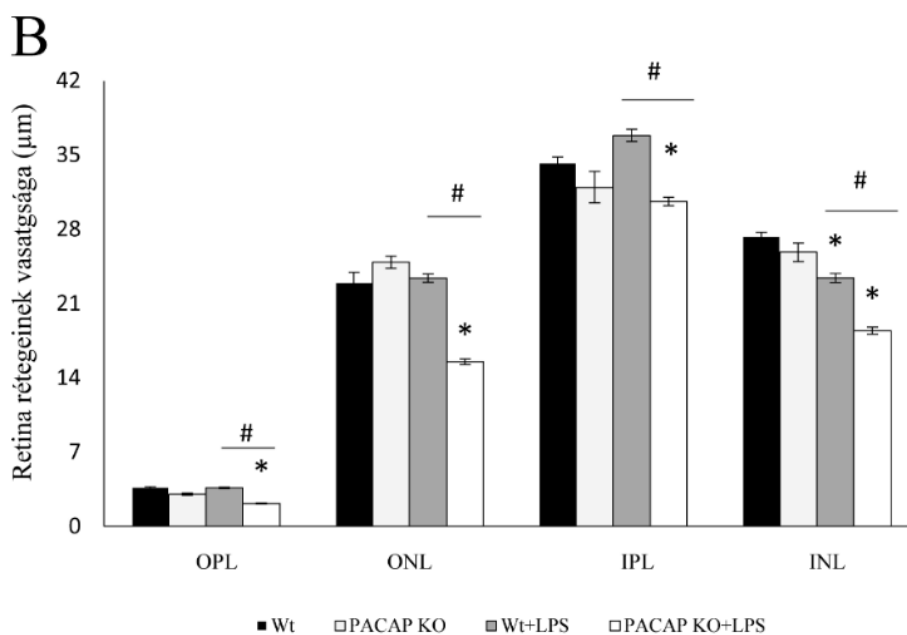
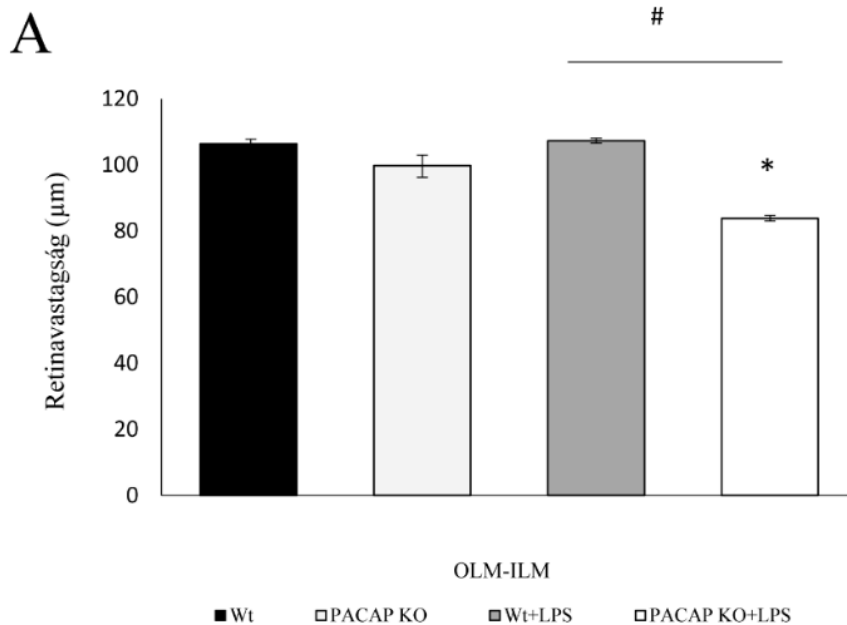
### 4.2.1 A retina minták rutin szövettani vizsgálata

A kontroll csoportok (Wt, PACAP KO) esetén nem volt detektálható a retina rétegvastagságában különbség (17.A,B ábra, 18.A,B ábra). Az LPS kezelés a vad típusú állatoknál az INL réteget leszámítva (18.B ábra) nem okozott jelentős változást a kontroll csoportokhoz viszonyítva (17.A,C ábra, 18.A,B ábra). Azonban a PACAP KO csoportban az endotoxin jelentős retina degenerációt indukált (17.D ábra) a két kezeletlen csoporthoz (17.A,B ábra), valamint az LPS kezelt vad típusú állatokéhoz (17.C ábra) képest egyaránt.

Statisztikai elemzésünket követően azt tapasztaltuk, hogy a két rostos- (OPL, IPL), valamint a két nukleáris (ONL, INL) rétegben jelentős szignifikáns rétegvastagság csökkenés alakult ki az LPS kezelés hatására a géniüti állatoknál mind a három másik csoporthoz viszonyítva (18.B ábra), melyből adódik, hogy az OLM-ILM távolságában is jelentős redukció volt mérhető (18.A ábra).



**17. ábra: Reprezentatív retinametszetek a vizsgált csoportokból. A: Wt, B: PACAP KO, C: Wt+LPS, D: PACAP KO+LPS, ONL: külső határhártya, OPL: külső rostos réteg, INL: belső nukleáris réteg, IPL: belső rostos réteg, GCL: ganglionsejtek rétege, hosszlépték: 20 mikrométer**

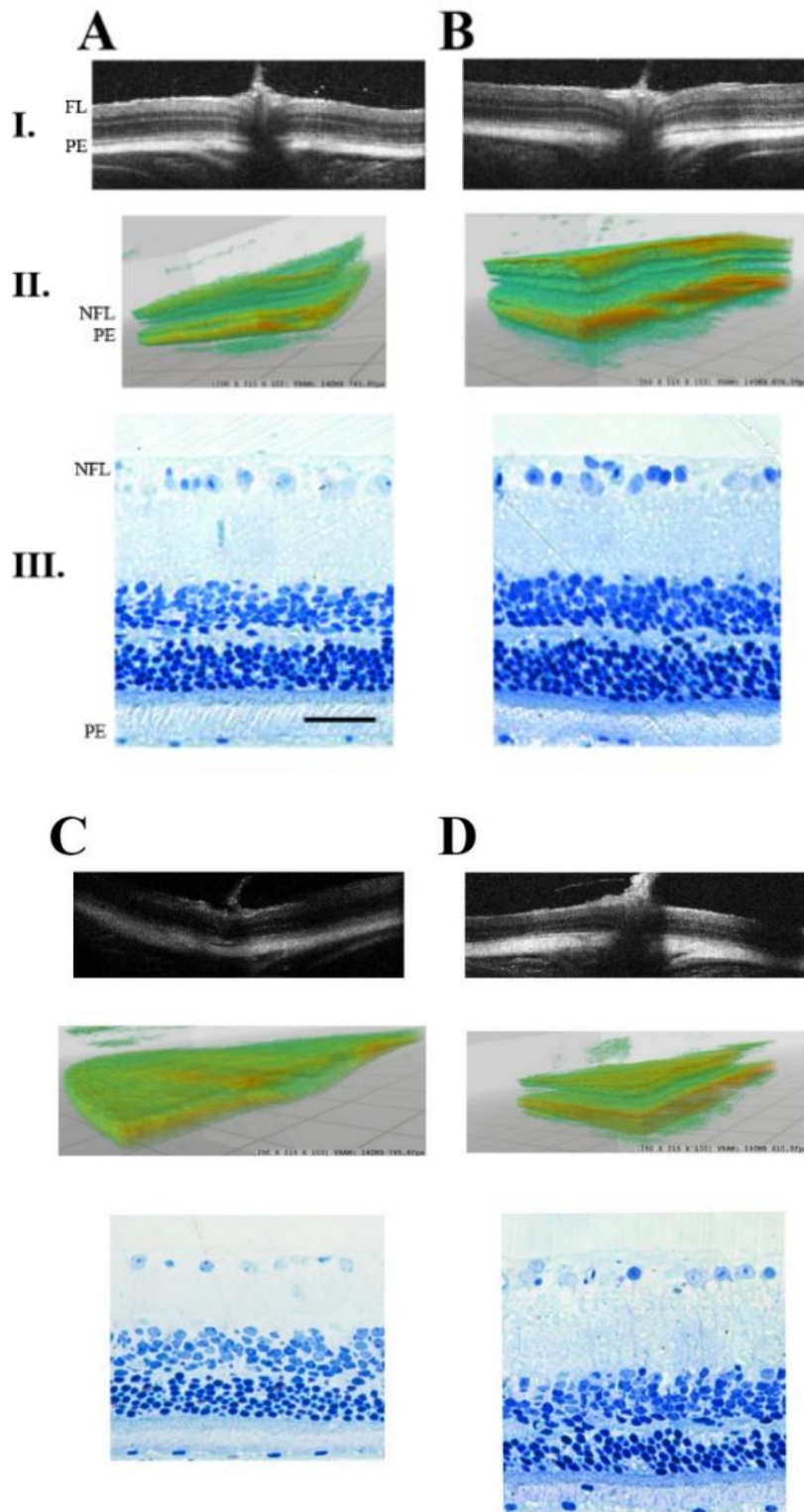


**18. ábra: A retina külső és a belső határhártya közötti távolsága (A) valamint a különböző rétegek (B) vastagság változása a vizsgálati csoportokban. Az oszlopdiagramokon az átlag  $\pm$  SEM értékeket ábrázoltuk. OLM-ILM: belső és külső határhártya, OPL: külső rostos réteg, ONL: külső határhártya, IPL: belső rostos réteg, INL: belső nukleáris réteg, \* $p < 0,05$  Wt csoporthoz képest, # $p < 0,05$  a Wt+LPS csoporthoz viszonyítva**

#### 4.2.2 Optikai koherencia tomográfia vizsgálat eredménye

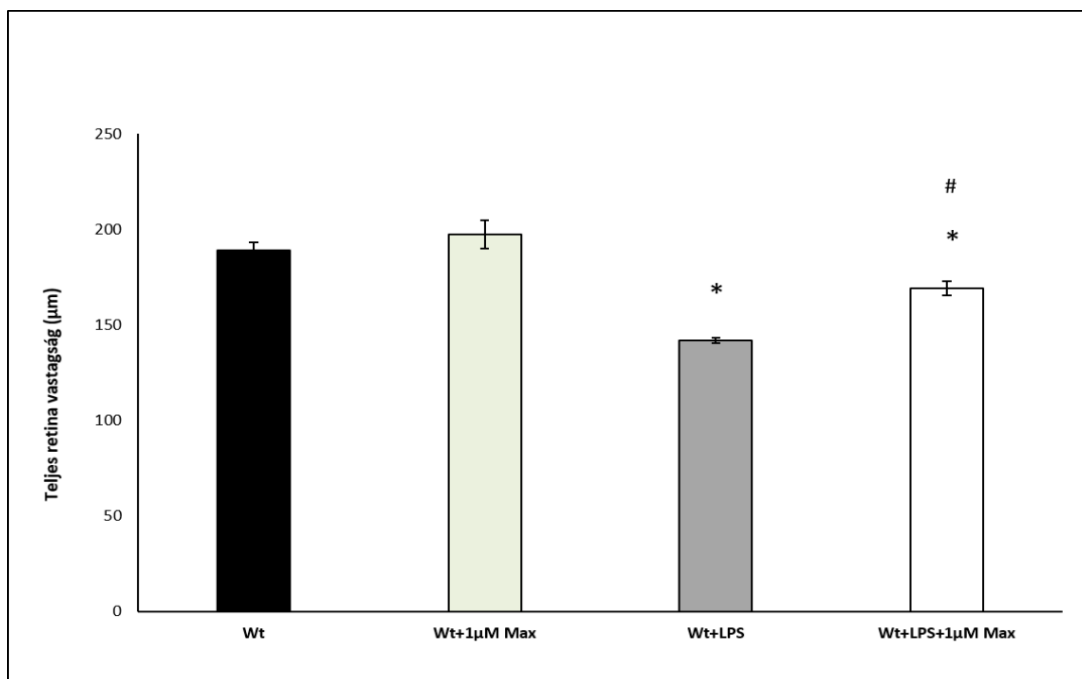
OCT készülék segítségével az állatok retinájáról B-scan sorozatot készítettünk (19. ábra, I. sor). Jól látható a fekete-fehér reprezentatív felvételeinken, hogy kontroll körülmények között önmagában a maxadilán intrevitreális kezelése semmilyen elváltozást nem indukált a retina szerkezetében (19. ábra, I. sor A,B). A retinális rétegvastagságok közel megegyezőnek bizonyultak. A felvételek éles kontrasztjaiból pedig jól kivehető a szöveti integritás, mind a PBS, mind a maxadilán kezelt csoportok esetén (19. ábra, I. sor A,B). Ezen megfigyelésünket a B-scan sorozatokból leképezett 3D reprezentatív retina modelljeink, valamint a kezeléstől számított 5 hét elteltével készített, toluidinkékkel kontrasztosított gyantás retinametszeteink is jól szemléltetnek (19. ábra II. sor A,B).

Az ip. LPS-t kapott kettő csoportunk esetén azonban jól kivehető az endotoxin okozta maradandó retinakárosodás a fertőzéstől számított 5. héten (19. C,D ábra). A B-scan sorozatokból rögzített ábráinkon nagyfokú rétegvastagság csökkenés jelentkezett az LPS okozta krónikus gyulladás hatására a kontroll csoportokhoz viszonyítva (19. ábra). Ezen megfigyeléseinket a retina 3D modelljéről készített felvételeink is igazoltak (19. ábra, II. sor C,D). Mivel a gyulladás a szem egész területére kiterjedt, így az OCT felvételeinken már gyengébb kontraszttal rajzolódtak ki a retinális rétegek (19. ábra, I. sor C,D). Ez a megfigyelésünk az LPS-t kapott PBS kezelt csoport esetén még kifejezettebb volt az endotoxinnal fertőzött maxadilánt injektált társaikhoz képest (19. ábra, I. sor C,D). Rutin hisztológiai vizsgálatunk során pedig jól látszik a különböző nukleáris rétegekben bekövetkező sejtelhalások, a plexiform rétegek drasztikus csökkenése, ami a retina szövetének elvékonyodását eredményezte (19. ábra. III. sor C,D). A szöveti integritás megbomlása az LPS+maxadilán kezelt egerek esetén kevésbé alakult ki, amely háttérben a PAC1R protektív szerepe állhat (19. ábra III. sor C,D).



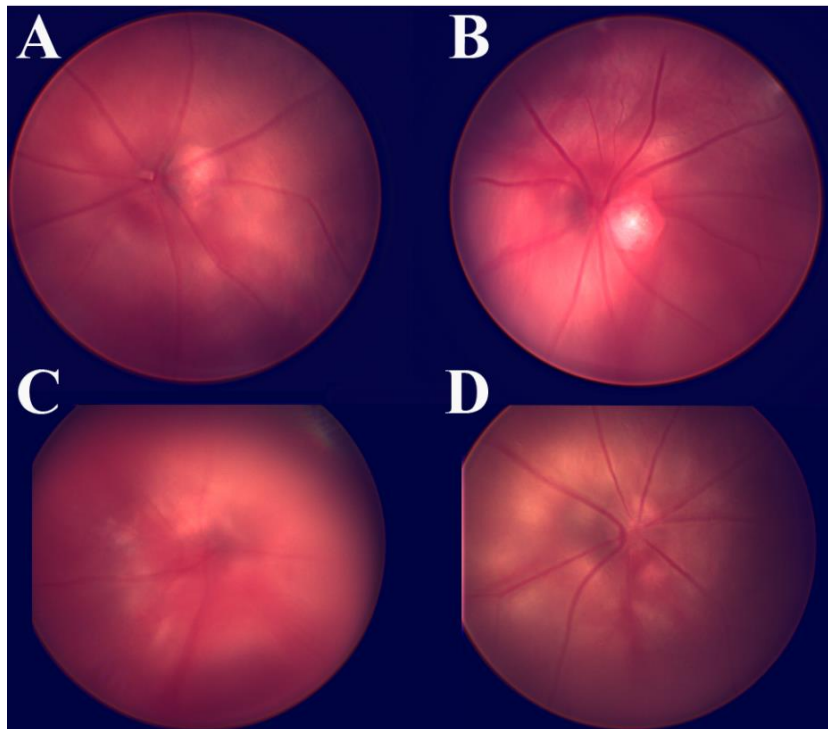
**19. ábra:** (I. sor:) OCT készülékkel készített retina rétegeit ábrázoló felvétel, (II. sor:) majd az abból létrehozott 3D retina modell, valamint (III. sor:) a toluidinkék festéssel kontrasztosított szövettani metszet a különböző csoportokban. **A:** Wt, **B:** Wt+1 $\mu$ M maxadilán, **C:** Wt+LPS, **D:** Wt+LPS+1 $\mu$ M maxadilán, NFL: optikus rostok rétege, PE: pigment epítél réteg, hosszlépték: 50 mikrométer

A reprezentatív felvételeinken tapasztalt retinális rétegvastagság csökkenését statisztikailag is alátámasztottuk. A teljes retina rétegvastagságában (NFL-PE közötti rétegek csökkenése) mindkét intravitrealisan kezelt csoportban a kontroll állatok retinamintáihoz viszonyítva szignifikáns rétegvastagság csökkenés figyelhető meg (20. ábra). Ez a redukció azonban fokozottabb mértékű volt az LPS PBS kezelt csoportban az LPS maxadilán kezelt csoporthoz viszonyítva (20. ábra).



**20. ábra: A retina teljes vastagsága (NFL-PE rétegig) a vizsgálati csoportokban.** Az oszlopdiagramokon az átlag  $\pm$  SEM értékeket ábrázoltuk. NFL: optikus rostok rétege, PE: pigment epitél rétege, \* $p < 0,05$  Wt csoporthoz képest, # $p < 0,05$  a Wt+LPS csoporthoz viszonyítva

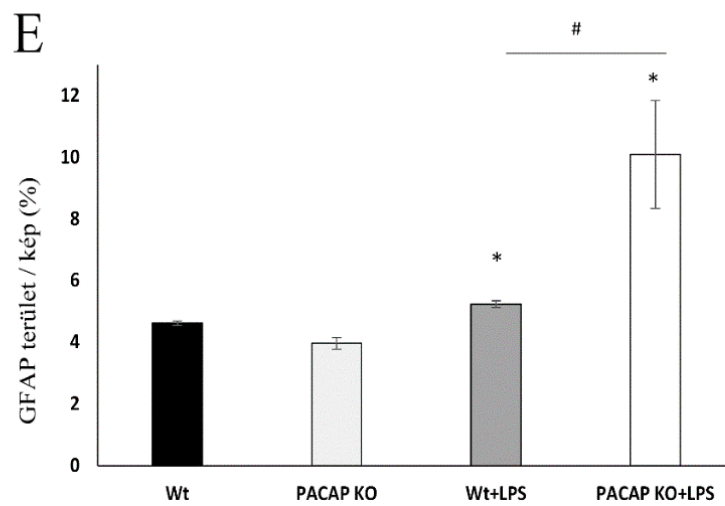
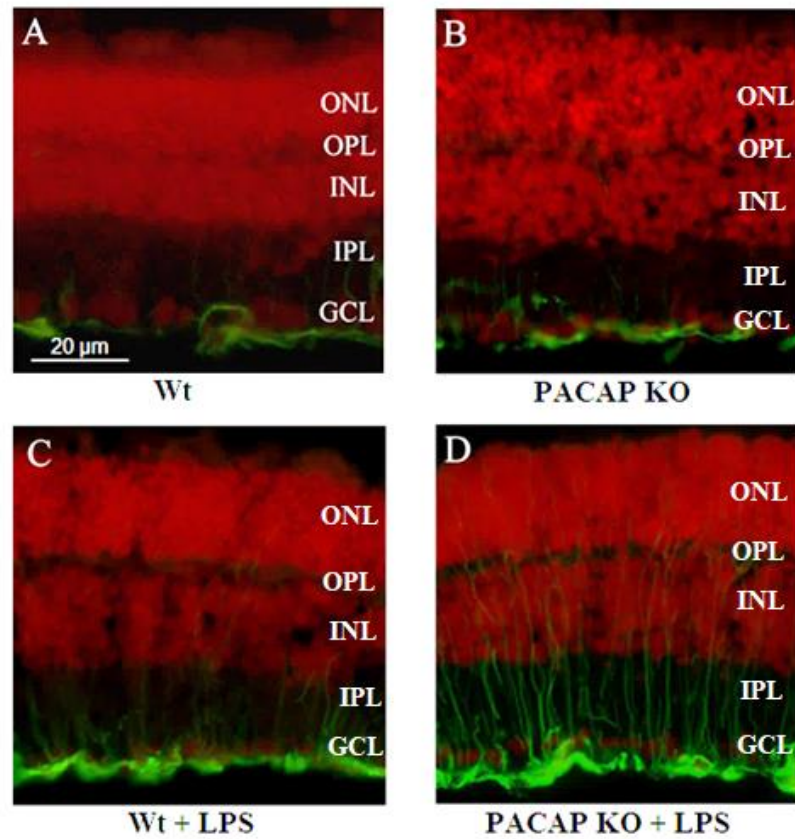
Szemfenék vizsgálatról készült reprezentatív felvételeink jól mutatják, hogy amíg kontroll állapotban a retina érhálózata tökéletesen kirajzolódik és a két intravitrealisan kezelésben részesült csoportban eltérés nem tapasztalható (21.A,B ábra), addig az LPS PBS kezelt csoportban a szem egészére kiterjedő gyulladás figyelhető meg (21.C ábra). Ez a retina egész területének homályos megjelenésében, valamint a fehéres retinális léziók feltűnésében nyilvánul meg (21.C ábra). Az OCT vizsgálat és a szövettani analízisünk során megfigyelteket tapasztalhattuk itt is, miszerint az intravitrealisan alkalmazott maxadilán képes volt kivédeni az LPS indukálta gyulladós folyamatokat és a kontroll csoportok szemfenéki képéhez közeli állapotot őrzött meg (21.D ábra).



**21. ábra:** Szemfenék vizsgálatról készült reprezentatív felvételek a kísérleti csoportokban. **A:** Wt, **B:** Wt+1 $\mu$ M maxadilán, **C:** Wt+LPS, **D:** Wt+LPS+1 $\mu$ M maxadilán

#### 4.2.3 Az immunhisztokémiai GFAP jelölés eredménye

GFAP expresszivitás a Müller sejtekben kontroll körülmények között csak a végtalpakra, valamint a retina belső részeire korlátozódik, így a fehérje csak a retina ILM rétegében lesz kimutatható. Kezeletlen állatok (Wt, PACAP KO) retina mintái esetén egymáshoz viszonyítva nem mutatnak jelentős immunfluoreszcencia változást (22.A,B,E ábra). Azonban LPS kezelés hatására egy fokozódó expresszió növekedés volt megfigyelhető mindkét endotoxin kezelt csoportban (22.C,D,E ábra). Az expresszió növekedés sokkal nagyobb mértékű volt az OLM-ILM területén, mely háttérben a Müller sejtek nyúlványainak jelölődése áll az LPS kezelt PACAP KO egerek csoportjában az LPS kezelt vad típusú társaikhoz viszonyítva (22.C,D,E ábra).



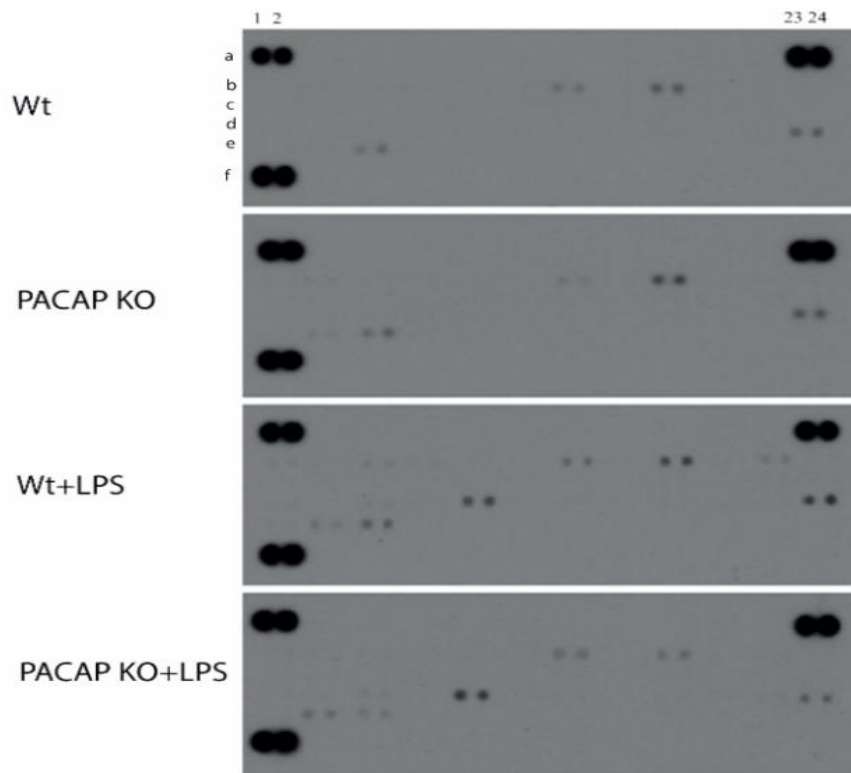
**22. ábra: Reprezentatív retina metszetek GFAP fluoreszcens jelöléssel a különböző csoportokban: A: Wt, B: PACAP KO, C: LPS kezelt Wt, D: LPS kezelt PACAP KO csoport, E: a GFAP expresszió denzitometriás mérése. Az oszlopdiagramokon az átlag ± SEM értékeket ábrázoltuk. \* $p < 0,05$  a Wt csoporthoz képest, # $p < 0,05$  a Wt+LPS csoporthoz viszonyítva. ONL: külső határhártya, OPL: külső rostos réteg, INL: belső nukleáris réteg, IPL: belső rostos réteg, GCL: ganglionsejtek rétege, GFAP: gliális fibrilláris savas protein (zöld szín), PI: propidium-jodid (piros szín), hosszlépték: 20 mikrométer**



#### 4.2.4 A retina minták citokin array analízis eredménye

Citokin array mérésünk során azt tapasztaltuk, hogy míg kontroll állapotban a két csoport között nem volt detektálható különbség, addig az LPS kezelés hatására néhány citokin expressziós változást mutatott (23. ábra). Az sICAM-1, a JE (monocita kemotaktikus fehérje 1) és TIMP-1 citokinek esetén az LPS kezelés expresszió növekedést indukált mindkét endotoxin kezelést kapott csoportban a kontroll csoportokhoz viszonyítva (24. ábra). Az LPS kezelt PACAP KO egerek esetén ez azonban még jelentősebb emelkedést mutatott az LPS kezelt Wt csoporthoz képest is (24. ábra).

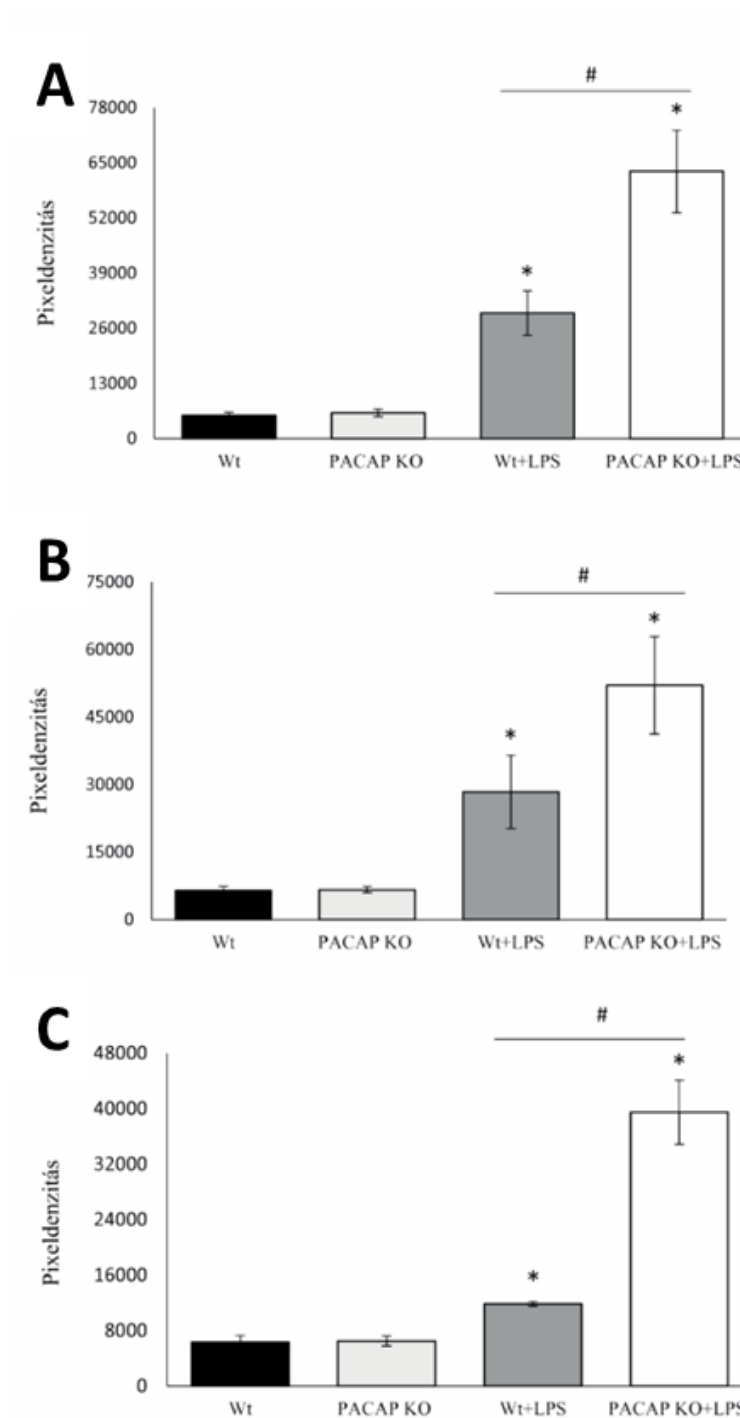
**A**



**B**

	1;2	3;4	5;6	7;8	9;10	11;12	13;14	15;16	17;18	19;20	21;22	23;24
a	Reference											Reference
b	BLC	C5/CSa	G-CSF	GM-CSF	I-309	Eotaxin	s-Icam1	IFN-γ	IL-1a	IL-1	IL-1ra	IL-2
c	IL-3	IL-4	I-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2 p70	I-16	IL-17	IL-23	IL-7
d	IP-10	I-TAC	KC	M-CSF	JE	MCP-5	MiG	MIP-1a	MIP-1b	Mi-2	RANTES	SDF-1
e	TA C	TIMP-1	TNF-α	TREM-1								
f	Reference											Neg. Control

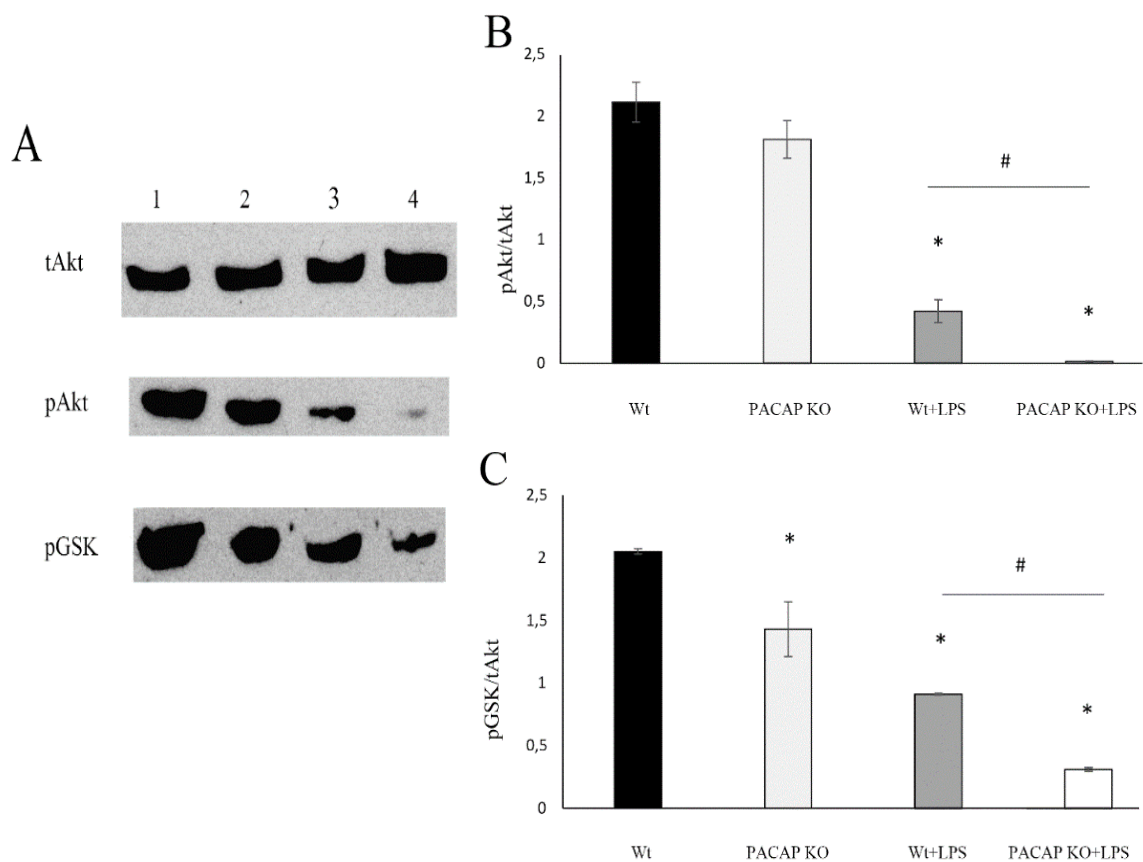
**23. ábra: A: Reprezentatív felvételek a vizsgált csoportok citokin paneljeiről. B: A kiten rögzített citokinek nevei táblázatba foglalva. A táblázatban bekeretezett citokineknel szignifikáns expresszió változást tapasztaltunk az LPS kezelés hatására a kontroll csoportokhoz képest.**



**24. ábra: Denzitometriás mérés eredménye. A: TIMP-1** (szöveti metalloproteináz gátló fehérje 1)-, **B: sICAM-1** (szolubilis intercelluláris adhéziós molekula) és **C: JE** (monocita kemotaktikus fehérje 1) esetén a négy vizsgált csoportban. Az oszlopdiagramokon az átlag  $\pm$  SEM érték került feltüntetésre. \* $p < 0,05$  Wt csoporthoz képest, # $p < 0,05$  a Wt+LPS csoporthoz viszonyítva az eltérés.

#### 4.2.5 Western blot analízis eredménye

Kontroll körülmények között a két kezeletlen csoportban nem volt detektálható változás a fehérjék expressziójában (25. ábra). Azonban 24 órával az LPS kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy a gyulladás a pAkt fehérje esetén csökkent expresszivitást eredményezett mindkét kezelt csoportban, ami a PACAP KO egerek esetén még jelentősebb mértéket mutatott (25.A,B ábra). Hasonló megfigyelés volt mérhető az Akt downstream célpontjánál, a pGSK-nál is (25.A,C ábra).

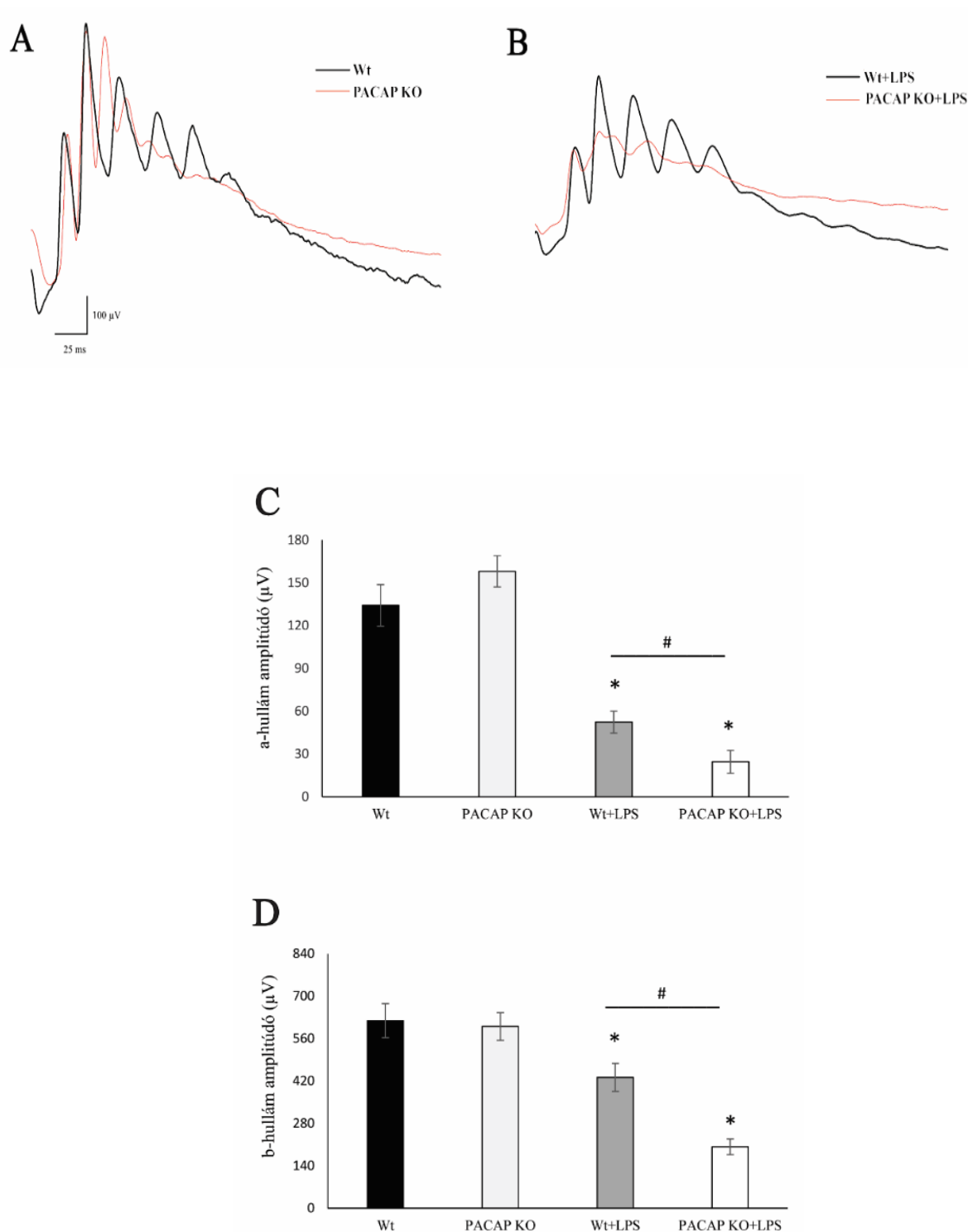


**25. ábra: Reprezentatív felvétel a vizsgált fehérjék expressziós változásáról a különböző kezelési csoportokban (A), 1: Wt, 2: PACAP KO, 3: Wt+LPS, 4: PACAP KO+LPS. tAkt (totál Akt) belső kontrollként szolgál a (B) pAkt (foszfo Akt) és (C) pGSK (foszfo GSK) fehérjék denzitometriás mérése során kapott értékeinek normalizálásához. Az oszlopdiaagramokon az átlag  $\pm$  SEM érték került feltüntetésre. \* $p < 0,05$  a Wt kontroll csoporthoz viszonyítva, # $p < 0,05$  az LPS kezelt Wt csoporthoz viszonyítva.**

#### 4.2.6 Elektroretinográfia eredményei

Az ERG mérés eredményeinknél mindkét kontroll csoport esetén hasonló lefutású elektroretinogram hullámokat tapasztaltunk (26.A ábra). Ebből arra következtethettünk, hogy a két kezeletlen csoport ERG hullámainak az a- és b-hullám amplitúdója, valamint az azok aktiválódási ideje közel megegyezőek kontroll körülmények között (26.A ábra). A funkcionális analízis az LPS kezelés hatására azonban egy jelentős negatív változást mutatott mind a két hullámkomponens esetén a Wt és a PACAP KO egereknél egyaránt (26.B ábra). Az endotoxin indukálta retinális gyulladás gátolta a fotoreceptorok, bipoláris sejtek, valamint a Müller glia sejtek bioelektromos aktivitását, ezzel működési zavart eredményezve funkciójukban. Ez látásromláshoz vezetett, ami az ERG regisztrátumokon alacsonyabb hullámamplitúdók megjelenésével nyilvánult meg a kontroll társaikhoz képest (26.A,B ábra). Reprezentatív ábráinkon jól látható az is, hogy az LPS kezelt PACAP KO egerek elektroretinogramján a hullámok magassága még redukáltabb volt az LPS kezelt Wt társaikkal szemben (26.A,B ábra). Ennek háttérében a kialakult nagyobb mértékű inflammáció állt, ami nagyobb mértékű sejtkárosodást eredményezett a PACAP génhányos LPS kezelt állatoknál.

Ezen megfigyelésünket statisztikai elemzéssel is alátámasztottuk, ahol igazoltuk, hogy valóban szignifikánsan csökkentek a hullám amplitúdók (mind az a- és mind a b-hullám esetén) az LPS kezelés hatására. Továbbá a retina sejtjeinek fényre adott válasza statisztikailag még nagyobb mértékű hullámamplitúdó csökkenést eredményezett a gyulladás hatására a PACAP KO egerek retinájában a Wt társaikhoz viszonyítva (26.C,D ábra).



**26. ábra: Reprezentatív elektroretinogram felvétel az ERG vizsgálat során 24 óra sötétbe adaptált egereknél (A): Wt és PACAP KO csoportban, (B): Wt+LPS és PACAP KO+LPS csoport esetén. (C) az a-hullám-, valamint a (D) b-hullám amplitúdó változását ábrázoltuk oszlopdiagramokon a csoportjainknál. Az átlag  $\pm$  SEM értékek kerültek feltüntetésre az oszlopokon. \* $p < 0,05$  a Wt kontroll csoporthoz viszonyítva, # $p < 0,05$  az LPS kezelt Wt csoporthoz képest mutatja az eltérést.**

## 5 Diszkusszió

A PACAP jelentős protektív tulajdonsággal rendelkezik, amik közül az anti-inflammatórikus hatásai kiemelten fontosak, melyeket főként a PAC1 receptorán keresztül képes mediálni. Ilyen védő funkciót lát el számos helyen a szervezetben az agyban és a retinában, valamint perifériás szervekbenegyaránt. Korábbi tanulmányok alapján ismert, hogy az exogén módon alkalmazott PACAP retinoprotektív hatásokkal rendelkezik UV-A sugárzás- (Atlasz et al. 2011)-, glutamát- (Babai et al. 2005; Atlasz et al. 2009), NMDA- (Cheng et al. 2014) és kainát okozta (Seki et al. 2006) excitotoxikus károsodásnál. Ismert az is, hogy védő hatást képes kifejteni a hipoperfúzió- (Werling et al. 2016) és látóideg sérülés okozta (Seki et al. 2008) degenerációban, valamint a sztreptozotocin indukálta diabéteszes- (Szabadfi et al. 2012b) és koraszülött retinopátia (Kvarik et al. 2016) esetén.

Az endogén PACAP a szervezetben számos szabályozó folyamatban részt vesz úgy, mint a testhőmérséklet szabályozása (Banki et al. 2014; Gray et al. 2002), a reprodukció regulálása (Isaac és Sherwood 2008; Reglodi et al. 2012c; Reglodi et al. 2018a) vagy a stressz adaptáció elősegítése (Kormos et al. 2016). Az endogén PACAP továbbá képes enyhíteni a szemszárazság tüneteit a könnytermelés fokozásával (Nakamachi et al. 2016), valamint védi a retinát az iszkémia okozta károsodástól is (Szabadfi et al. 2012a). Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a PACAP KO egerek érzékenyebben reagálnak negatív hatásokra, úgy mint a fájdalom vagy gyulladásra adott reakciók vad típusú társaikhoz képest (Hashimoto et al. 2001; Matsuyama et al. 2003; Hashimoto et al. 2009; Kawaguchi et al. 2010; Kemény et al. 2010; Sándor et al. 2010; Reglodi et al. 2012b). Azonban a szervezetben megtalálható PACAP szerepe egy endotoxin által indukált retinális károsodás során még ismeretlen. Így jelen kísérletünk az első, ahol az endogén PACAP és PAC1 receptorának védő és anti-inflammatórikus hatását vizsgáltuk LPS indukálta retinális gyulladásban, PACAP KO egerek felhasználásával.

Eredményeink alapján jól látszik, hogy míg kontroll körülmények között a Wt és PACAP KO állatok retinaszerkezete, citokin expressziós profilja, valamint a látás vizsgálatuk során tapasztaltak teljes mértékben megegyeztek, addig gyulladás hatására számos eltérés volt detektálható a két LPS kezelt csoport között. Ezen eredményeink korrelálnak kutatócsoportunk által korábban közölt adatokkal is, ahol a fiatal PACAP KO állatoknál még nem-, azonban a korai öregedés tüneteit mutató egereknél már jelentős

különbségek, retinális abnormalitások jelentek meg vad típusú társaikhoz viszonyítva (Kovács-Valasek et al. 2017; Reglodi et al. 2018a).

A Müller gliasejtek fokozott GFAP expresszivitását mutattuk ki az LPS által kiváltott gyulladás során, amely a PACAP KO csoportban még fokozottabb mértéket mutatott. Ennek hátterében a GABA és a glutamát csökkent felvétele áll, amely a fehérjék felhalmozódásához vezet, ezzel rendellenességeket kialakítva a retinális neuronokban (Ishikawa et al. 1996; Ambati et al. 1997; Li és Puro 2002; Lewis és Fisher 2003; Kurihara et al. 2006). A PACAP retinoprotektívnek bizonyult a Müller gliasejtek esetén iszkémiás- és excitotoxikus agyi lézióknál is, ahol az interleukin-6 felszabadulását képes stimulálni (Nakatani et al. 2006; Ohtaki et al. 2008; Liu et al. 2011).

Kísérletünk során a retina gyulladása néhány citokin expressziójában változást okozott (TIMP-1, sICAM-1 és JE szabályozó fehérjék). Ismert, hogy a TIMP család tagjai fontos szerepet játszanak a sejtproliferációban, az apoptózisban, és gátló hatást gyakorolnak a mátrix metalloproteinázokra (MMP), amelyek képesek az extracelluláris mátrix lebontására (Reichenstein et al. 2004; Szentlélek et al. 2019). Az inflammatorikus folyamatok során az MMP-gátló TIMP-1 gyulladással mediátorok felszabadulását indukálja (Nedvig et al. 2012). Kísérletünknel 24 órával az LPS kezelés után a TIMP-1 szint mindkét endotoxin kezelt csoportban erősen megemelkedett, azonban ez az érték a PACAP KO egerek esetén fokozottabb szintet mutatott. Ezen megállapításunk összhangban van más korábbi vizsgálatokkal is, ahol a TIMP-1 fokozott expressziója minden esetben kóros elváltozásokhoz társult úgy, mint például a diabéteszes nefropátia (Banki et al. 2013), az iszkémia által kiváltott vesekárosodás (Laszlo et al. 2015), az akut mezenterialis iszkémia (Nedvig et al. 2012; Nedvig et al. 2013), a glaukóma (Guo et al. 2012) vagy iszkémiás retinopátia (Szabo et al. 2012).

Jelen kísérletünkben az sICAM-1 aktivációja volt megfigyelhető a PACAP KO egerekben az endotoxin kezelés hatására. A gyulladással citokinek, köztük a TNF $\alpha$  fokozzák az sICAM-1 citokin termelődését és proinflammatorikus folyamatokat indukálnak, mint például a leukociták gyulladás helyére történő áramlása (Webster et al. 1998; Vollmar és Menger 2011). Továbbá ismert az is, hogy magas sICAM-1 expressziós mintázat mindig degeneratív elváltozásokhoz társul, ilyen például a vitreoretinopátia (Webster et al. 1998; Limb és Chignell 1999), az uveitis (de Visser et al. 2017) vagy a sarlósejtes retinopátia (Cruz et al. 2015). Tanulmányok támasztják alá azt is, hogy az exogén PACAP kezelés az iszkémia/reperfúzió (I/R) indukálta károsodásnál több szerv esetén is képes volt a

megnövekedett sICAM-1 szintjét részben vagy teljesen elhárítani (Reglodi et al. 2012a; Szabo et al. 2012; Nedvig et al. 2012; Banki et al. 2013).

A monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1 / CCL2) a C-C kemokin család tagja, mely egy erős kemotaktikus faktorként vesz részt a monociták működésében (Deshmane et al. 2009). A humán MCP-1 neve megegyezik az egerekben JE-vel elnevezett citokinnel, amely expressziós szintje az akut és krónikus gyulladásos betegségeknél, mint például az ateroszklerózis (Lu et al. 1998), a glomerulonefritisz (Chen et al. 1998), a diabéteszes retinopátia (Murugeswari et al. 2014), az Eales-betegség (Atmaca et al. 2002), az iszkémiás retinopátia (Yoshida et al. 2003) vagy az LPS által kiváltott uveitis (Barbour et al. 2014) jelentősen megemelkedik. A fent említett citokinnek a megnövekedett szintjét számos egyéb gyulladásos folyamatnál is megfigyelték már, ilyen volt például a hipoxia által kiváltott vese sérülésében (Hashimoto 2002) vagy az akut ileitisznél (Heimesaat et al. 2014), ahol az exogén módon alkalmazott PACAP képes volt lecsökkenteni az akut gyulladás szintjét, mellyel egy csökkentett expresszivitást eredményezett az MCP-1 citokin esetén.

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy retinakárosodás hatására a PACAP anti-apoptotikus útvonalakat indukál, mely hatására a proapoptotikus útvonalak gátlás alá kerülnek (Rácz et al. 2006). Egy tanulmányunk a retinális iszkémia folyamán azt mutatja be, hogy az exogén PACAP kezelés részben az Akt és a MAPK útvonalak indukálásán keresztül fejt ki a retinoprotektív és gyulladás csökkentő hatását (Szabo et al. 2012). Az Akt ami PKB (protein kináz B) néven is ismert, egy szerin-treonin típusú protein-kináz, mely extracelluláris szignálok hatására képes elősegíteni a szignalizációs útvonalán keresztül a sejtek túlélését (Nakazawa et al. 2003; Dreixler et al. 2009; Szabo et al. 2012; Werling et al. 2016) és részt vesz a gyulladásos folyamatok szabályozásában. A szervezetet érő káros hatásokra, mint iszkémiás retinopátia, az exogén PACAP a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) downstream targetjeként aktiválja az Akt-t ami a GSK-3 gátló foszforilációját indukálja, mellyel a CREB aktiválását eredményezi (Wang et al. 2011), így lecsökkentve a károsodás mértékét (Gong et al. 2013). Tanulmányok alapján ismert, hogy az LPS okozta gyulladás Akt aktivitás csökkenését, valamint a GSK foszforilált szintjének redukcióját eredményezi, mely minél nagyobb mértékű, annál nagyobb szöveti károsodás létrejöttét eredményezi (Guha és Mackman 2002; Williams et al. 2006; Yin et al. 2016). Ezen vizsgálatok összhangban vannak a jelen tanulmányunkban tapasztaltakkal.

Számos tanulmány igazolta azt is, hogy az exogén módon alkalmazott PACAP fontos szerepet játszik a látás funkciójának megőrzésében különböző retinát érintő sérüléseknél, úgy mint az excitotoxicitás vagy az iszkémia (Varga et al. 2011; Danyadi et al. 2014).



Korábbi megfigyelésekhez hasonlóan ERG kísérletünknel mi is azt tapasztaltuk, hogy az endotoxin kezelés által kialakított gyulladás a látás funkciójának jelentős zavarát eredményezi (Kurihara et al. 2006; Sasaki et al. 2009). Az endogén PACAP hiánya az ERG a- és b-hullám amplitúdó drasztikus csökkenését eredményezte az LPS kezelés hatására. Ez a változás nagyobb mértékű volt a PACAP KO csoportban Wt társaikhoz viszonyítva, mely háttérben a fotoreceptorok és a Müller gliasejtek sejtek fokozottabb működési zavara áll. Az endogén PACAP tehát a retinális sejtek integritásának megőrzésével volt képes az LPS által kialakított retinális gyulladás alacsonyabb mértékét eredményezni.

Kutatások alapján ismert, hogy a PACAP retinális kötődésének 80%-áért a PAC1 receptor felelős, amely a protektív hatások fő mediátoraként vesz részt különböző degeneratív elváltozások kivédésében (Nilsson 1994). Az endogén PACAP LPS indukálta retinális gyulladás folyamán mutatott védő hatását receptorain keresztül képes kifejteni, melyek közül a PAC1 receptor protektív szerepének bizonyításához a szelektív PAC1 receptor agonista maxadilán nyújt segítséget (Lauenstein et al. 2011).

Az uveitis a szem inflammációval járó megbetegedése, mely kezdetben akut- majd később az abból kialakuló krónikus gyulladás maradandó retina károsodás kialakulását eredményezheti (Abrar et al. 2014). A szem hátsó szegmensében megjelenő gyulladás a funduskamerás felvételen a retina érhálózatának homályos megjelenési formáját okozza, ennek háttérben a fehérje és alakos elemek megjelenése áll a csarnokvízben (Proekt et al. 2016; Santeford et al. 2016; Chu et al. 2016; Nakamura et al. 2017). A megnövekedett fehérjetartalom miatt a csarnokvíz opaleszkál és jól kivehető fehér foltok formájában detektálhatóvá válik az intraretinális folyadék, ödéma megjelenése is (Rageh et al. 2014), amelyet mi is tapasztaltunk jelen tanulmányunkban az LPS kezelt vad típusú egerek csoportjánál. Ezen elváltozások viszont maxadilán kezelés segítségével elháríthatónak bizonyultak, ami és a kontroll csoport felvételeihez hasonló képet eredményezett. OCT felvételünk- és rutin szövettani analízisünk során kapott retina rétegvastagságánál azt tapasztaltuk, hogy, ahogy az a szakirodalomban is szerepel (Koizumi et al. 2003; Halder et al. 2013), az LPS kezelés önmagában egy drasztikus rétegvastagság csökkenést indukált, amit a maxadilán kezelés képes volt kivédeni.

Összefoglalva tehát a fent bemutatott eredményeinkkel elsőként sikerült igazolnunk, hogy az endogén PACAP fontos retinoprotektív szerepet lát el az LPS okozta retinális gyulladás esetén. További vizsgálataink (OCT, szemfenéki kép elemzése, rutin szövettan) bizonyították azt is, hogy a PACAP ezen hatását elsősorban PAC1 receptorán keresztül mediálhatja.

## 6 Új eredmények összefoglalása

- I) Ph.D. munkám első részében a PAC1 receptor retinoprotektív szerepét bizonyítottuk maxadilán fehérje segítségével BCCAO okozta retinakárosodásban.

Kimutattuk szövettani analízisünk során, hogy az intravitreálisan alkalmazott maxadilán szignifikánsan gátolja a hipoperfúzió okozta retinális károsodás mértékét az általunk vizsgált modellben. Citokin array eredményeink továbbá alátámasztották azt is, hogy a PAC1 receptor fontos gyulladáscsökkentő szereppel rendelkezik az iszkémiás retina degenerációban.

- II) Az értekezés második felében az endogén PACAP, valamint az anti-inflammatorikus hatásokért felelős PAC1 receptor védő szerepét igazoltuk maxadilán fehérje segítségével LPS indukálta retinális gyulladás modelljében.

A komplex morfológiai-, morfometriai- valamint funkcionális analízisünk eredményei bebizonyították az endogén PACAP protektív szerepét endotoxin okozta retina degenerációban. Továbbá az intravitreális maxadilán kezelés képes volt az LPS okozta szöveti károsodás mértékét lecsökkenteni, ezzel alátámasztva a PAC1 receptor anti-inflammatorikus hatását egy endotoxin okozta retinakárosodás során.

Összefoglalásként tehát elmondhatjuk, hogy, az ideghártyát érintő különböző károsodások hatásaival szemben mind az endogén, mind pedig az exogén módon alkalmazott PACAP jelentős citoprotektív és antiinflammatorikus hatásokat volt képes kifejteni.

## 7 Irodalomjegyzék

- Abad C, Tan YV (2018) Immunomodulatory Roles of PACAP and VIP: Lessons from Knockout Mice. *J Mol Neurosci* 66:102–113.
- Rageh A; Roehrich H; Abdullah S; Burckhard B; Ferrington AD; Montezuma S (2014) In Vivo Scoring of the Endotoxin-Induced Uveitis Model using Optical Coherence Tomography: Comparison with Fundus Imaging and Histology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:2856.
- Al-Badri G, Leggio GM, Musumeci G, Marzagalli R, Drago F, Castorina A (2018) Tackling dipeptidyl peptidase IV in neurological disorders. *Neural Regen Res* 13:26–34.
- Ambati J, Chalam K V, Chawla DK, D'Angio CT, Guillet EG, Rose SJ, Vanderlinde RE, Ambati BK (1997) Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 115:1161–6.
- Arimura A (1998) Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn. J. Physiol.* 48:301–331.
- Arimura A (1992) Receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: comparison with vasoactive intestinal peptide receptors. *Trends Endocrinol Metab* 3:288–94.
- Arimura A, Shioda S (1995) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front Neuroendocrinol* 16:53–88.
- Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129:2787–9.
- Aslam SA, Ramkissoon YD, Ali N, MacLaren RE (2010) Arterial occlusion after scleral buckling. *Br J Ophthalmol* 94:503–503.
- Atlasz T, Vaczy A, Werling D, Kiss P, Tamas A, Kovacs K, Fabian E, Kvarik T, Mammel B, Danyadi B, Lokos E, Reglodi D (2016) Protective Effects of PACAP in the Retina. In: Dora Reglodi AT (ed) *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, 11th edn. Springer, Cham, New York, pp 501–527.

- Atlasz T, Babai N, Kiss P, Reglődi D, Tamás A, Szabadfi K, Tóth G, Hegyi O, Lubics A, Gábrriel R, Reglodi D, Tamás A, Szabadfi K, Tóth G, Hegyi O, Lubics A, Gábrriel R (2007) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *Gen Comp Endocrinol* 153:108–114.
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Racz B, Gallyas F, Tamas A, Gaal V, Marton Z, Gabriel R, Reglodi D (2010a) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the retina: Focus on the retinoprotective effects. *Ann N Y Acad Sci* 1200:128–139.
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Marton Z, Griecs M, Hamza L, Gaal V, Biro Z, Tamas A, Hild G, Nyitrai M, Toth G, Reglodi D, Gabriel R (2011) Effects of PACAP in UV-A Radiation-Induced Retinal Degeneration Models in Rats. *J Mol Neurosci* 43:51–57.
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Tamas A, Toth G, Reglodi D, Gabriel R (2010b) Evaluation of the protective effects of PACAP with cell-specific markers in ischemia-induced retinal degeneration. *Brain Res Bull* 81:497–504.
- Atlasz T, Szabadfi K, Reglodi D, Kiss P, Tamás A, Tóth G, Molnár A, Szabó K, Gábrriel R (2009) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its fragments on retinal degeneration induced by neonatal monosodium glutamate treatment. *Ann N Y Acad Sci* 1163:348–352.
- Atmaca LS, Batioglu F, Atmaca Sonmez P (2002) A long-term follow-up of Eales' disease. *Ocul Immunol Inflamm* 10:213–21.
- Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglődi D, Tóth G, Kiss P, Gábrriel R (2005) Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retinal degeneration. *Neurotox Res* 8:227–33.
- Babai N, Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglodi D, Tóth G, Kiss P GR, Atlasz T, Tamás A, Reglodi D, Tóth G, Kiss P, Gábrriel R (2006) Search for the Optimal Monosodium Glutamate Treatment Schedule to Study the Neuroprotective Effects of PACAP in the Retina. *Ann N Y Acad Sci* 1070:149–155.
- Banki E, Degrell P, Kiss P, Kovacs K, Kemeny A, Csanaky K, Duh A, Nagy D, Toth G, Tamas A, Reglodi D (2013) Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides* 42:125–30.
- Banki E, Pakai E, Gaszner B, Zsiboras C, Czett A, Bhuddi PRP, Hashimoto H, Toth G, Tamas A, Reglodi D, Garami A (2014) Characterization of the thermoregulatory response to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rodents. *J Mol Neurosci* 54:543–54.

- Baranowska-Bik A, Bik W, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Martynska L, Baranowska B (2006) Can PACAP-38 modulate immune and endocrine responses during lipopolysaccharide (LPS)-induced acute inflammation? *Ann N Y Acad Sci* 1070:156–160.
- Barbour M, Allan D, Xu H, Pei C, Chen M, Niedbala W, Fukada SY, Besnard AG, Alves-Filho JC, Tong X, Forrester J V., Liew FY, Jiang HR (2014) IL-33 attenuates the development of experimental autoimmune uveitis. *Eur J Immunol* 44:3320–3329.
- Barrett KT, Hasan SU, Scantlebury MH, Wilson RJA (2020) Impaired cardiorespiratory responses to hypercapnia in neonatal mice lacking PAC1 but not VPAC2 receptors. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* ajpgu.00161.2020. doi: 10.1152/ajpgu.00161.2020
- Bhavsar T, Liu XJ, Patel H, Stephani R, Cantor JO (2008) Preferential recruitment of neutrophils by endothelin-1 in acute lung inflammation induced by lipopolysaccharide or cigarette smoke. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 3:477–81.
- Bik W, Wolinska-Witort E, Pawlak J, Skwarlo-Sonta K, Chmielowska M, Martynska L, Baranowska-Bik A, Baranowska B (2006) PACAP 38 as a modulator of immune and endocrine responses during LPS-induced acute inflammation in rats. *J Neuroimmunol* 177:76–84.
- Block F, Schwarz M, Sontag KH (1992) Retinal ischemia induced by occlusion of both common carotid arteries in rats as demonstrated by electroretinography. *Neurosci Lett* 144:124–6.
- Bonaventura G, Iemmolo R, D’Amico AG, La Cognata V, Costanzo E, Zappia M, D’Agata V, Conforti FL, Aronica E, Cavallaro S (2018) PACAP and PAC1R are differentially expressed in motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients and support survival of iPSC-derived motor neurons. *J Cell Physiol* 233:3343–3351.
- Botia B, Basille M, Allais A, Raoult E, Falluel-Morel A, Galas L, Jolivel V, Wurtz O, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Burel D, Gonzalez BJ, Vaudry D (2007) Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* 28:1746–52.
- Bourgault S, Chatenet D, Wurtz O, Doan ND, Leprince J, Vaudry H, Fournier A, Vaudry D (2011) Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Curr Pharm Des* 17:1002–24.
- Bourgault S, Vaudry D, Botia B, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H, Fournier A (2008) Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 29:919–932.

- Brown D, Tamas A, Reglodi D, Tizabi Y (2014) PACAP protects against inflammatory-mediated toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *Neurotox Res* 26:230–9.
- Campbell RM, Scanes CG (1992) Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regul* 2:175–91.
- Carrazzoni Borba J, Pereira Henze I, Souza Silveira M, Cussa Kubrusly RC, Franca Gardino P, Fialho De Mello MC, Nora Hokoç J, Garcia De Mello F (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) can act as determinant of the tyrosine hydroxylase phenotype of dopaminergic cells during retina development. *Dev Brain Res* 156:193–201.
- Caspi RR (2006) Animal models of autoimmune and immune-mediated uveitis. *Drug Discov Today Dis Model* 3:3–9.
- Cavallaro S, Copani A, D'Agata V, Musco S, Petralia S, Ventra C, Stivala F, Travali S, Canonico PL (1996) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide prevents apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *Mol Pharmacol* 50:60–6.
- Chang JY, Korolev V V, Wang JZ (1996) Cyclic AMP and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevent programmed cell death of cultured rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 206:181–4.
- Chen S, Bacon KB, Li L, Garcia GE, Xia Y, Lo D, Thompson D a, Siani M a, Yamamoto T, Harrison JK, Feng L (1998) In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J Exp Med* 188:193–8.
- Chen W, Inui T, Hachiya T, Ochi Y, Nakajima Y, Kajita Y (1993) Stimulatory action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on thyroid gland. *Biochem Biophys Res Commun* 194:923–9.
- Chen Y, Samal B, Hamelink CR, Xiang CC, Chen Y, Chen M, Vaudry D, Brownstein MJ, Hallenbeck JM, Eiden LE (2006) Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regul Pept* 137:4–19.
- Cheng H-H, Ye H, Peng R-P, Deng J, Ding Y (2018) Inhibition of retinal ganglion cell apoptosis: regulation of mitochondrial function by PACAP. *Neural Regen Res* 13:923.
- Cheng H, Ding Y, Yu R, Chen J, Wu C (2014) Neuroprotection of a novel cyclopeptide C\*HSDGIC\* from the cyclization of PACAP (1-5) in cellular and rodent models of retinal ganglion cell apoptosis. *PLoS One* 9:1–11.

- Chu CJ, Gardner PJ, Copland DA, Liyanage SE, Gonzalez-Cordero A, Kleine Holthaus S-M, Luhmann UFO, Smith AJ, Ali RR, Dick AD (2016) Multimodal analysis of ocular inflammation using the endotoxin-induced uveitis mouse model. *Dis Model Mech* 9:473–81.
- Clason TA, Girard BM, May V, Parsons RL (2016) Activation of MEK/ERK Signaling by PACAP in Guinea Pig Cardiac Neurons. *J Mol Neurosci* 59:309–316.
- Cline DL, Short LI, Forster MAM, Gray SL (2018) Adipose Tissue Expression of PACAP, VIP, and Their Receptors in Response to Cold Stress. *J Mol Neurosci* 1–12.
- Cohen I, Rider P, Carmi Y, Braiman A, Dotan S, White MR, Voronov E, Martin MU, Dinarello CA, Apte RN (2010) Differential release of chromatin-bound IL-1 discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci* 107:2574–2579.
- Costerton JW, Ingram JM, Cheng KJ (1974) Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol Rev* 38:87–110.
- Couvineau A, Laburthe M (2012) VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol* 166:42–50.
- Cruz PRS, Lira RPC, Pereira Filho SAC, Souza BB, Mitsuushi FN, Menea F, Fertrin KY, Vasconcellos JPC, Conran N, Costa FF, Melo MB (2015) Increased circulating PEDF and low sICAM-1 are associated with sickle cell retinopathy. *Blood Cells Mol Dis* 54:33–37.
- Csanaky K, Banki E, Szabadfi K, Reglodi D, Tarcai I, Czeglédi L, Helyes Z, Ertl T, Gyarmati J, Szanto Z, Zapf I, Sipos E, Shioda S, Tamas A (2012) Changes in PACAP immunoreactivity in human milk and presence of PAC1 receptor in mammary gland during lactation. *J Mol Neurosci* 48:631–7.
- Czeglédi L, Tamas A, Borzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horvath G, Brubel R, Nemeth J, Szalontai B, Szabadfi K, Javor A, Reglodi D, Helyes Z (2011) Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *Gen Comp Endocrinol* 172:115–9.
- D'Alessandro A, Cervia D, Catalani E, Gevi F, Zolla L, Casini G (2014) Protective effects of the neuropeptides PACAP, substance P and the somatostatin analogue octreotide in retinal ischemia: a metabolomic analysis. *Mol Biosyst* 10:1290–304.

- D'Amico AG, Maugeri G, Reitano R, Bucolo C, Saccone S, Drago F, D'Agata V, D'Amico AG, Maugeri G, Reitano R, Bucolo C, Saccone S, Drago F, D'Agata V (2015) PACAP Modulates Expression of Hypoxia-Inducible Factors in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Retina. *J Mol Neurosci* 57:501–9.
- Danyadi B, Szabadfi K, Reglodi D, Mihalik A, Danyadi T, Kovacs Z, Batai I, Tamas A, Kiss P, Toth G, Gabriel R (2014) PACAP Application Improves Functional Outcome of Chronic Retinal Ischemic Injury in Rats-Evidence From Electoretinographic Measurements. *J Mol Neurosci* 54:293–299.
- de Visser L, H. de Boer J, T. Rijkers G, Wiertz K, van den Ham H-J, de Boer R, M. van Loon A, Rothova A, de Groot-Mijnes JDF (2017) Cytokines and Chemokines Involved in Acute Retinal Necrosis. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 58:2139.
- Dejda A, Seaborn T, Bourgault S, Touzani O, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D (2011) PACAP and a novel stable analog protect rat brain from ischemia: Insight into the mechanisms of action. *Peptides* 32:1207–1216.
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Leceta J, Ganea D, Gomariz RP (2003) PACAP in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 992:141–57.
- Delgado M, Ganea D (2001) Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Inhibit Expression of Fas Ligand in Activated T Lymphocytes by Regulating c-Myc, NF- $\kappa$ B, NF-AT, and Early Growth Factors 2/3. *J Immunol* 166:1028–1040.
- Delgado M, Leceta J, Abad C, Martinez C, Ganea D, Gomariz RP (1999) Shedding of membrane-bound CD14 from lipopolysaccharide-stimulated macrophages by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *J Neuroimmunol* 99:61–71.
- Denes V, Geck P, Mester A, Gabriel R (2019a) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide: 30 Years in Research Spotlight and 600 Million Years in Service. *J Clin Med*.
- Denes V, Hideg O, Nyisztor Z, Lakk M, Godri Z, Berta G, Geck P, Gabriel R (2019b) The Neuroprotective Peptide PACAP1-38 Contributes to Horizontal Cell Development in Postnatal Rat Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 60:770–778.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009) Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interf Cytokine Res* 29:313–326.



- Diané A, Payne GW; Gray SL Abdoulaye Diané GWP and SLG (2014) Multifaces of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP): From Neuroprotection and Energy Homeostasis to Respiratory and Cardiovascular Systems. *J Metab Syndr*. 3:4.
- Dinarello CA (1994) The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 8:1314–25.
- Dinarello CA (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117:3720–32.
- Dreixler JC, Hemmert JW, Shenoy SK, Shen Y, Lee HT, Shaikh AR, Rosenbaum DM, Roth S (2009) The role of Akt/protein kinase B subtypes in retinal ischemic preconditioning. *Exp Eye Res* 88:512–21.
- Elsås T, Uddman R, Sundler F (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-immunoreactive nerve fibers in the cat eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234:573–80.
- Endo K, Nakamachi T, Seki T, Kagami N, Wada Y, Nakamura K, Kishimoto K, Hori M, Tsuchikawa D, Shinntani N, Hashimoto H, Baba A, Koide R, Shioda S (2011) Neuroprotective Effect of PACAP Against NMDA-Induced Retinal Damage in the Mouse. *J Mol Neurosci* 43:22–29.
- Fahrenkrug J (2010) VIP and PACAP. *Results Probl Cell Differ* 50:221–34.
- Farkas E, Luiten PGM, Bari F (2007) Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 54:162–80.
- Farkas, J., Sandor, B., Tamas, A., Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, Fulop BD, Juhasz T, Manavalan S, Reglodi D (2017) Early Neurobehavioral Development of Mice Lacking Endogenous PACAP. *J Mol Neurosci* 61, 468–478.
- Feigl B (2009) Age-related maculopathy - linking aetiology and pathophysiological changes to the ischaemia hypothesis. *Prog Retin Eye Res* 28:63–86.
- Filipsson K, Sundler F, Hannibal J, Ahrén B (1998) PACAP and PACAP receptors in insulin producing tissues: localization and effects. *Regul Pept* 74:167–75.
- Fulop BD, Sandor B, Szentleky E, Karanyicz E, Reglodi D, Gaszner B, Zakany R, Hashimoto H, Juhasz T, Tamas A (2019) Altered Notch Signaling in Developing Molar Teeth of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)-Deficient Mice. *J Mol Neurosci* 68:377–388.

- Gábríel R, Pöstyéni E, Dénes V (2019) Neuroprotective Potential of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide in Retinal Degenerations of Metabolic Origin. *Front Neurosci.* 13:1-12.
- Ganea D, Delgado M (2002) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:229–37.
- Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z (2012) The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus. *Neuroscience* 202:283–99.
- Gaytan F, Martinez-Fuentes AJ, Garcia-Navarro F, Vaudry H, Aguilar E (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunolocalization in lymphoid tissues of the rat. *Cell Tissue Res* 276:223–7.
- Ghaly A, Marsh DR (2010) Ischaemia-reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. *Int J Exp Pathol* 91:244–55.
- Ghatei MA, Takahashi K, Suzuki Y, Gardiner J, Jones PM, Bloom SR (1993) Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J Endocrinol* 136:159–66.
- Gillespie MD, Mbow ML, Titus RG (2000) The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol* 22:319–331.
- Gong JH, Gong JP, Li JZ, He K, Li PZ, Jiang XW (2013) Glycogen synthase kinase 3 inhibitor attenuates endotoxin-induced liver injury. *J Surg Res* 184:1035–1044.
- Gray SL, Yamaguchi N, Vencová P, Sherwood NM (2002) Temperature-sensitive phenotype in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology* 143:3946–54.
- Green BD, Irwin N, Flatt PR (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP): Assessment of dipeptidyl peptidase IV degradation, insulin-releasing activity and antidiabetic potential. *Peptides* 27:1349–1358.
- Grevelink SA, Osborne J, Loscalzo J, Lerner EA (1995) Vasorelaxant and second messenger effects of maxadilan. *J Pharmacol Exp Ther* 272:33–7.

- Guerra RL, Leitão Guerra CL, Bastos MG, de Oliveira AHP, Salles C (2019) Sickle cell retinopathy: What we now understand using optical coherence tomography angiography. A systematic review. *Blood Rev.* 35:32-42.
- Guha M, Mackman N (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem* 277:32124–32.
- Guilpin VO, Swardson-Olver C, Nosbisch L, Titus RG (2002) Maxadilan, the vasodilator/immunomodulator from *Lutzomyia longipalpis* sand fly saliva, stimulates haematopoiesis in mice. *Parasite Immunol* 24:437–446.
- Guo M-S, Wu Y-Y, Liang Z-B (2012) Hyaluronic acid increases MMP-2 and MMP-9 expressions in cultured trabecular meshwork cells from patients with primary open-angle glaucoma. *Mol Vis* 18:1175–81.
- Guo X, Yu R, Xu Y, Lian R, Yu Y, Cui Z, Ji Q, Chen JJ, Li Z, Liu H, Chen JJ (2016) PAC1R agonist maxadilan enhances hADSC viability and neural differentiation potential. *J Cell Mol Med* 10:1–17.
- Halder SK, Matsunaga H, Ishii KJ, Akira S, Miyake K, Ueda H (2013) Retinal cell type-specific prevention of ischemia-induced damages by LPS-TLR4 signaling through microglia. *J Neurochem* 126:243–260.
- Hannibal J (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 453:389–417.
- Hannibal J (2006) Roles of PACAP-containing retinal ganglion cells in circadian timing. *Int Rev Cytol* 251:1–39.
- Hashimoto H (2002) Physiological significance of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the nervous system. *Yakugaku Zasshi* 122:1109–21.
- Hashimoto H, Hashimoto R, Shintani N, Tanaka K, Yamamoto A, Hatanaka M, Guo X, Morita Y, Tanida M, Nagai K, Takeda M, Baba A (2009) Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. *J Neurochem* 110:595–602.
- Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A (2001) Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13355–60.

- Heimesaat MM, Dunay IR, Schulze S, Fischer A, Grundmann U, Alutis M, Kühl AA, Tamas A, Toth G, Dunay MP, Göbel UB, Reglodi D, Bereswill S (2014) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates experimental acute ileitis and extra-intestinal sequelae. *PLoS One* 9:e108389.
- Horvath G, Reglodi D, Opper B, Brubel R, Tamas A, Kiss P, Toth G, Csernus V, Matkovits A, Racz B (2010) Effects of PACAP on the oxidative stress-induced cell death in chicken pinealocytes is influenced by the phase of the circadian clock. *Neurosci Lett* 484:148–52.
- Horvath G, Opper B, Reglodi D (2019) The Neuropeptide Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) is Protective in Inflammation and Oxidative Stress-Induced Damage in the Kidney. *Int J Mol Sci* 20:4944.
- Hosoya M, Kimura C, Ogi K, Ohkubo S, Miyamoto Y, Kugoh H, Shimizu M, Onda H, Oshimura M, Arimura A (1992) Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim Biophys Acta* 1129:199–206.
- Hu KG, Marmor MF (1982) The relationship between the c-wave and light response of the rabbit eye. *Acta Ophthalmol* 60:998–1005.
- Huang J, Waters KA, Machaalani R (2017) Hypoxia and nicotine effects on Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor 1 (PAC1) in the developing piglet brainstem. *Neurotoxicology* 62:30–38.
- Isaac ER, Sherwood NM (2008) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice. *Mol Cell Endocrinol* 280:13–19.
- Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S (1992) Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 8:811–9.
- Ishikawa A, Ishiguro S, Tamai M (1996) Changes in GABA metabolism in streptozotocin-induced diabetic rat retinas. *Curr Eye Res* 15:63–71.
- Isobe K, Tatsuno I, Yashiro T, Nanmoku T, Takekoshi K, Kawakami Y, Nakai T (2003) Expression of mRNA for PACAP and its receptors in intra- and extra-adrenal human pheochromocytomas and their relationship to catecholamine synthesis. *Regul Pept* 110:213–7.
- Ivic I, Balasko M, Fulop BD, Hashimoto H, Toth G, Tamas A, Juhasz T, Koller A, Reglodi D, Solymár M (2019) VPAC1 receptors play a dominant role in PACAP-induced vasorelaxation in female mice. *PLoS One* 14:e0211433.

- Izumi S, Seki T, Shioda S, Zhou CJ, Arimura a, Koide R (2000) Ultrastructural localization of PACAP immunoreactivity in the rat retina. *Ann N Y Acad Sci* 921:317–20.
- Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT, Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group (2005) Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol* 140:509–16.
- Jackson TS, Lerner E, Weisbrod RM, Tajima M, Loscalzo J, Keaney JF (1996) Vasodilatory properties of recombinant maxadilan. *Am J Physiol* 271:H924-30.
- Jakab B, Reglodi D, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Oroszi G, Szilvássy Z, Szolcsányi J, Németh J (2004) Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Methods* 61:189–98.
- Jander S, Sitzler M, Schumann R, Schroeter M, Siebler M, Steinmetz H, Stoll G (1998) Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization. *Stroke* 29:1625–30.
- Jansen-Olesen I, Hougaard Pedersen S (2018) PACAP and its receptors in cranial arteries and mast cells. *J Headache Pain* 19:16.
- Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, Cha CI (2004) Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol* 476:388–413.
- Józsa G, Fülöp BD, Kovács L, Czibere B, Szegeczki V, Kiss T, Hajdú T, Tamás A, Helyes Z, Zákány R, Reglodi D, Juhász T (2019) Lack of Pituitary Adenylate Cyclase–Activating Polypeptide (PACAP) Disturbs Callus Formation. *J Mol Neurosci*. doi: 10.1007/s12031-019-01448-z
- Józsa G, Szegeczki V, Pálfi A, Kiss T, Helyes Z, Fülöp B, Cserhádi C, Daróczi L, Tamás A, Zákány R, Reglodi D, Juhász T (2018) Signalling Alterations in Bones of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Gene Deficient Mice. *Int J Mol Sci* 19:2538.
- Józsa R, Somogyvári-Vigh A, Reglodi D, Hollósy T, Arimura A (2001) Distribution and daily variations of PACAP in the chicken brain. *Peptides*. 9:1371-7.
- Juhász T, Helgadottir SL, Tamás A, Reglodi D, Zákány R (2015) PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides* 66:51–7.

- Juhász T, Matta C, Katona É, Somogyi C, Takács R, Hajdú T, Helgadottir SL, Fodor J, Csernoch L, Tóth G, Bakó É, Reglodi D, Tamás A, Zákány R (2014) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) signalling enhances osteogenesis in UMR-106 cell line. *J Mol Neurosci* 54:555–73.
- Junnarkar SP, Tapuria N, Mani A, Dijk S, Fuller B, Seifalian AM, Davidson BR (2010) Attenuation of warm ischemia-reperfusion injury in the liver by bucillamine through decreased neutrophil activation and Bax/Bcl-2 modulation. *J Gastroenterol Hepatol* 25:1891–9.
- Kanekar S, Gandham M, Lucero MT (2010) PACAP protects against TNF $\alpha$ -induced cell death in olfactory epithelium and olfactory placodal cell lines. *Mol Cell Neurosci* 45:345–354.
- Kasica N, Podlasz P, Sundvik M, Tamas A, Reglodi D, Kaleczyc J (2016) Protective Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Against Oxidative Stress in Zebrafish Hair Cells. *Neurotox Res* 30:633–647.
- Kaur C, Foulds WS, Ling EA (2008) Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Prog Retin Eye Res* 27:622–47.
- Kawaguchi C, Isojima Y, Shintani N, Hatanaka M, Guo X, Okumura N, Nagai K, Hashimoto H, Baba A (2010) PACAP-deficient mice exhibit light parameter-dependent abnormalities on nonvisual photoreception and early activity onset. *PLoS One* 5:1–9.
- Kemény Á, Reglodi D, Cseharovszky R, Hashimoto H, Baba A, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficiency enhances oxazolone-induced allergic contact dermatitis in mice. *J Mol Neurosci* 42:443–449.
- Khan MM, Ernst O, Sun J, Fraser IDC, Ernst RK, Goodlett DR, Nita-Lazar A (2018) Mass Spectrometry-based Structural Analysis and Systems Immunoproteomics Strategies for Deciphering the Host Response to Endotoxin. *J Mol Biol* 430:2641–2660.
- Kiss P, Atlasz T, Szabadfi K, Horvath G, Griecs M, Farkas J, Matkovits A, Toth G, Lubics A, Tamas A, Gabriel R, Reglodi D (2011) Comparison between PACAP- and enriched environment-induced retinal protection in MSG-treated newborn rats. *Neurosci Lett* 487:400–5.
- Koizumi K, Poulaki V, Doehmen S, Welsandt G, Radetzky S, Lappas A, Kociok N, Kirchhof B, Joussen AM (2003) Contribution of TNF- $\alpha$  to Leukocyte Adhesion, Vascular Leakage, and Apoptotic Cell Death in Endotoxin-Induced Uveitis In Vivo. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 44:2184.

- Kong LY, Maderdrut JL, Jeohn GH, Hong JS (1999) Reduction of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mixed cortical neuron/glia cultures by femtomolar concentrations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience* 91:493–500.
- Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Z, Gaszner B (2016) Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience* 330:335–358.
- Kovács-Valasek A, Szabadfi K, Dénes V, Szalontai B, Tamás A, Kiss P, Szabó A, Setalo G, Reglődi D, Gábrriel R (2017) Accelerated retinal aging in PACAP knock-out mice. *Neuroscience* 348:1–10.
- Kovacs AK, Atlasz T, Werling D, Szabo E, Reglodi D, Toth GK (2020) Stability Test of PACAP in Eye Drops. *J Mol Neurosci*.
- Kovacs K, Váczy A, Fekete K, Kővári P, Atlasz T, Reglődi D, Gabriel R, Gallyas F, Vaczy A, Fekete K, Kovari P, Atlasz T, Reglodi D, Gabriel R, Gallyas F, Sumegi B (2019) PARP Inhibitor Protects Against Chronic Hypoxia/Reoxygenation-Induced Retinal Injury by Regulation of MAPKs, HIF1 $\alpha$ , Nrf2, and NF $\kappa$ B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 60:1478.
- Köves K, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Miller J (1990) Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 127:264–71.
- Kubrusly RCC, da Cunha MCC, Reis RA de M, Soares H, Ventura ALM, Kurtenbach E, de Mello MCF, de Mello FG (2005) Expression of functional receptors and transmitter enzymes in cultured Muller cells. *Brain Res* 1038:141–9.
- Kurihara T, Ozawa Y, Shinoda K, Nagai N, Inoue M, Oike Y, Tsubota K, Ishida S, Okano H (2006) Neuroprotective Effects of Angiotensin II Type 1 Receptor (AT1R) Blocker, Telmisartan, via Modulating AT1R and AT2R Signaling in Retinal Inflammation. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 47:5545.
- Kvarik T, Mammel B, Reglodi D, Kovacs K, Werling D, Bede B, Vaczy A, Fabian E, Toth G, Kiss P, Tamas A, Ertl T, Gyarmati J, Atlasz T (2016) PACAP Is Protective in a Rat Model of Retinopathy of Prematurity. *J Mol Neurosci* 60:179–185.
- Lamacchia C, Rodriguez E, Palmer G, Gabay C (2013) Endogenous IL-1 $\alpha$  is a chromatin-associated protein in mouse macrophages. *Cytokine* 63:135–44.

- Lanzaro GC, Lopes AHCS, Ribeiro JMC, Shoemaker CB, Warburg A, Soares M, Titus RG (1999) Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Insect Mol Biol* 8:267–275.
- Laszlo E, Varga A, Kovacs K, Jancso G, Kiss P, Tamas A, Szakaly P, Fulop B, Reglodi D (2015) Ischemia/reperfusion-induced Kidney Injury in Heterozygous PACAP-deficient Mice. *Transplant Proc* 47:2210–5.
- Lauenstein HD, Quarcoo D, Plappert L, Schleh C, Nassimi M, Pilzner C, Rochlitzer S, Brabet P, Welte T, Hoymann HG, Krug N, Müller M, Lerner EA, Braun A, Groneberg DA (2011) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 1 mediates anti-inflammatory effects in allergic airway inflammation in mice. *Clin Exp Allergy* 41:592–601.
- Lee HW, Hahm SH, Hsu CM, Eiden LE (1999) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulation of vasoactive intestinal polypeptide transcription requires Ca<sup>2+</sup> influx and activation of the serine/threonine phosphatase calcineurin. *J Neurochem* 73:1769–72.
- Lee LTO, Siu FKY, Tam JK V, Lau ITY, Wong AOL, Lin MCM, Vaudry H, Chow BKC (2007) Discovery of growth hormone-releasing hormones and receptors in nonmammalian vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2133–8.
- Lerner EA, Iuga AO, Reddy VB, Ethan A. Lerner, Aurel O. Iuga and VBR, Lerner EA, Iuga AO, Reddy VB, Ethan A. Lerner, Aurel O. Iuga, Vemuri B R (2007) Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. *Peptides* 28:1651–1654.
- Lerner EA, Ribeiro JM, Nelson RJ, Lerner MR (1991) Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 266:11234–6.
- Lewis GP, Fisher SK (2003) Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 230:263–90.
- Li Q, Puro DG (2002) Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 43:3109–3116.
- Liao C, de Molliens MP, Schneebeli ST, Brewer M, Song G, Chatenet D, Braas KM, May V, Li J (2019) Targeting the PAC1 Receptor for Neurological and Metabolic Disorders. *Curr Top Med Chem* 19:1399–1417.
- Lim SH, Lee J (2014) Hot water extract of wheat bran attenuates white matter injury in a rat model of vascular dementia. *Prev Nutr food Sci* 19:145–55.



- Limb GA, Chignell AH (1999) Vitreous levels of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) as a risk indicator of proliferative vitreoretinopathy. *Br J Ophthalmol* 83:953–6.
- Lin X, Fang D, Zhou H, Su SB (2013) The expression of Toll-like receptors in murine Müller cells, the glial cells in retina. *Neurol Sci* 34:1339–46.
- Lindén A, Cardell LO, Yoshihara S, Nadel JA (1999) Bronchodilation by pituitary adenylate cyclase-activating peptide and related peptides. *Eur Respir J* 14:443–51.
- Liu Z, Qiu YH, Li B, Ma SH, Peng YP (2011) Neuroprotection of interleukin-6 against NMDA-induced apoptosis and its signal-transduction mechanisms. *Neurotox Res* 19:484–495.
- Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ (1998) Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 187:601–8.
- Lugo JM, Tafalla C, Oliva A, Pons T, Oliva B, Aquilino C, Morales R, Estrada MP (2019) Evidence for antimicrobial and anticancer activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) from North African catfish (*Clarias gariepinus*): Its potential use as novel therapeutic agent in fish and humans. *Fish Shellfish Immunol* 86:559–570.
- Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, Harmar AJ (1993) The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett* 334:3–8.
- Manavalan S, Getachew B, Manaye KF, Khundmiri SJ, Csoka AB, McKinley R, Tamas A, Reglodi D, Tizabi Y (2017) PACAP Protects Against Ethanol and Nicotine Toxicity in SH-SY5Y Cells: Implications for Drinking-Smoking Co-morbidity. *Neurotox Res* 32:8–13.
- Martinez C, Abad C, Delgado M, Arranz A, Juarranz MG, Rodriguez-Henche N, Brabet P, Leceta J, Gomariz RP (2002) Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1053–1058.
- Martínez C, Arranz A, Juarranz Y, Abad C, García-Gómez M, Rosignoli F, Leceta J, Gomariz RP (2006) PAC1 receptor: Emerging target for septic shock therapy. *Ann NY Acad Sci* 1070:405–410.
- Masmoudi-Kouki O, Zhao W, Vaudry D, Reglodi D, Illes A, Opper B, Schafer E, Tamas A, Horvath G (2018) Presence and effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Under Physiological and Pathological Conditions in the Stomach. 9:1–12.

- Mathieu M, Girosi L, Vallarino M, Tagliafierro G (2005) PACAP in developing sensory and peripheral organs of the zebrafish, *Danio rerio*. *Eur J Histochem* 49:167–178.
- Matoba Y, Nonaka N, Takagi Y, Imamura E, Narukawa M, Nakamachi T, Shioda S, Banks WA, Nakamura M (2016) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhances saliva secretion via direct binding to PACAP receptors of major salivary glands in mice. *Anat Rec* 299:1293–1299.
- Matsuda K, Azuma M, Maruyama K, Shioda S (2013) Neuroendocrine control of feeding behavior and psychomotor activity by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in vertebrates. *Obes Res Clin Pract* 7:e1-7.
- Matsuda K, Maruyama K (2007) Regulation of feeding behavior by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in vertebrates. *Peptides* 28:1761–6.
- Matsuyama S, Matsumoto A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A (2003) Impaired long-term potentiation in vivo in the dentate gyrus of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) or PACAP type 1 receptor-mutant mice. *Neuroreport* 14:2095–8.
- Maugeri G, D’Amico AG, Gagliano C, Saccone S, Federico C, Cavallaro S, D’Agata V (2017a) VIP Family Members Prevent Outer Blood Retinal Barrier Damage in a Model of Diabetic Macular Edema. *J Cell Physiol* 232:1079–1085.
- Maugeri G, D’Amico AG, Musumeci G, Reglodi D, D’Agata V (2020) Effects of PACAP on Schwann Cells: Focus on Nerve Injury. *Int J Mol Sci* 21:8233.
- Maugeri G, D’Amico AG, Saccone S, Federico C, Cavallaro S, D’Agata V (2017b) PACAP and VIP Inhibit HIF-1 $\alpha$ -Mediated VEGF Expression in a Model of Diabetic Macular Edema. *J Cell Physiol* 232:1209–1215.
- Mercer A, Rönnholm H, Holmberg J, Lundh H, Heidrich J, Zachrisson O, Ossoinak A, Frisén J, Patrone C (2004) PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J Neurosci Res* 76:205–215.
- Mester L, Szabo A, Atlasz T, Szabadfi K, Reglodi D, Kiss P, Racz B, Tamas A, Gallyas F, Sumegi B, Hocsak E, Gabriel R, Kovacs K (2009) Protection against chronic hypoperfusion-induced retinal neurodegeneration by PARP inhibition via activation of PI-3-kinase Akt pathway and suppression of JNK and p38 MAP kinases. *Neurotox Res* 16:68–76.
- Meyer DK (2006) The effects of PACAP on neural cell proliferation. *Regul Pept* 137:50–7.

- Miller RF, Dowling JE (1970) Intracellular responses of the Müller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *J Neurophysiol* 33:323–41.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567–574.
- Miyata A, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A (1990) Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 170:643–648.
- Moody TW, Ito T, Osefo N, Jensen RT (2011) VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18:61–67.
- Moro O, Lerner EA (1997) Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem* 272:966–70.
- Moro O, Tajima M, Lerner EA (1996) Receptors for the vasodilator maxadilan are expressed on selected neural crest and smooth muscle-derived cells. *Insect Biochem Mol Biol* 26:1019–1025.
- Moro O, Wakita K, Ohnuma M, Denda S, Lerner EA, Tajima M (1999) Functional characterization of structural alterations in the sequence of the vasodilatory peptide maxadilan yields a pituitary adenylate cyclase-activating peptide type 1 receptor-specific antagonist. *J Biol Chem* 274:23103–10.
- Morris R V., Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG (2001) Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* 167:5226–30.
- Murck H, Steiger A, Frieboes RM, Antonijevic IA (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide affects homeostatic sleep regulation in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E853-7.
- Murugeswari P, Shukla D, Kim R, Namperumalsamy P, Stitt AW, Muthukkaruppan V (2014) Angiogenic potential of vitreous from proliferative diabetic retinopathy and Eales' disease patients. *PLoS One* 9:1–8.
- Muta T, Takeshige K (2001) Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur J Biochem* 268:4580–9.

- Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, Yofu S, Kagami N, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Mark L, Lanekoff I, Kiss P, Farkas J, Reglodi D, Shioda S (2016) PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat Commun* 7:12034.
- Nakamura YK, Janowitz C, Metea C, Asquith M, Karstens L, Rosenbaum JT, Lin P (2017) Short chain fatty acids ameliorate immune-mediated uveitis partially by altering migration of lymphocytes from the intestine. *Sci Rep* 7:11745.
- Nakatani M, Seki T, Shinohara Y, Taki C, Nishimura S, Takaki A, Shioda S (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) stimulates production of interleukin-6 in rat Müller cells. *Peptides* 27:1871–1876.
- Nakazawa T, Shimura M, Tomita H, Akiyama H, Yoshioka Y, Kudou H, Tamai M (2003) Intrinsic activation of PI3K/Akt signaling pathway and its neuroprotective effect against retinal injury. *Curr Eye Res* 26:55–63.
- Nedvig K, Szabó G, Csukás D, Sándor J, Németh J, Kovács K, Reglődi D, Kemény A, Wéber G, Ferencz A (2013) Examination of cytoprotective and anti-inflammatory effect of PACAP-38 on small bowel autotransplantation. *Magy Seb* 66:250–5.
- Nedvig K, Weber G, Nemeth J, Kovacs K, Reglodi D, Kemeny A, Ferencz A (2012) Changes of PACAP immunoreactivities and cytokine levels after PACAP-38 containing intestinal preservation and autotransplantation. *J Mol Neurosci* 48:788–94.
- Nemeth A, Szabadfi K, Fulop B, Reglodi D, Kiss P, Farkas J, Szalontai B, Gabriel R, Hashimoto H, Tamas A (2014) Examination of calcium-binding protein expression in the inner ear of wild-type, heterozygous and homozygous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-knockout mice in kanamycin-induced ototoxicity. *Neurotox Res* 25:57–67.
- Nilsson SFE (1994) PACAP-27 and PACAP-38: vascular effects in the eye and some other tissues in the rabbit. *Eur J Pharmacol* 253:17–25.
- Njaine B, Rocha-Martins M, Vieira-Vieira CH, De-Melo LDB, Linden R, Braas K, May V, Martins RAP, Silveira MS (2014) Pleiotropic functions of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide on retinal ontogenesis: involvement of KLF4 in the control of progenitor cell proliferation. *J Mol Neurosci* 54:430–42.
- Noailles A, Kutsyr O, Maneu V, Ortuño-Lizarán I, Campello L, de Juan E, Gómez-Vicente V, Cuenca N, Lax P (2019) The Absence of Toll-Like Receptor 4 Mildly Affects the Structure and Function in the Adult Mouse Retina. *Front Cell Neurosci* 13:59.

- Nova Z, Skovierova H, Calkovska A (2019) Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci* 20(4):831.
- Nyisztor Z, Denes V, Kovacs-Valasek A, Hideg O, Berta G, Gabriel R (2018) Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP1–38) Exerts Both Pro and Anti-Apoptotic Effects on Postnatal Retinal Development in Rat. *Neuroscience* 385:59–66.
- Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S (2008) Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci* 36:16–25.
- Oka H, Jin L, Kulig E, Scheithauer BW, Lloyd R V (1999) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in a human pituitary adenoma cell line. *Am J Pathol* 155:1893–900.
- Okada R, Yamamoto K, Ito Y, Mochida H, Tonon M-C, Fournier A, Leprince J, Vaudry H, Kikuyama S (2007) VIP and PACAP stimulate TSH release from the bullfrog pituitary. *Peptides* 28:1784–9.
- Onoue S, Ohmori Y, Endo K, Yamada S, Kimura R, Yajima T (2004) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide attenuate the cigarette smoke extract-induced apoptotic death of rat alveolar L2 cells. *Eur J Biochem* 271:1757–67.
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JPM, Chidlow G, Graham M, Melena J (2004) Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 23:91–147.
- Osborne NN, Safa R, Nash MS (1999) Photoreceptors are preferentially affected in the rat retina following permanent occlusion of the carotid arteries. *Vision Res* 39:3995–4002.
- Otto C, Hein L, Brede M, Jahns R, Engelhardt S, Gröne H-J, Schütz G (2004) Pulmonary hypertension and right heart failure in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *Circulation* 110:3245–51.
- Peeters K, Berghman LR, Vandesande F (1998) Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the chicken forebrain. *Ann N Y Acad Sci* 839:417–9.
- Perényi H, Szegeczki V, Horváth G, Hinnah B, Tamás A, Radák Z, Ábrahám D, Zákány R, Reglodi D, Juhász T (2020) Physical Activity Protects the Pathological Alterations of Alzheimer’s Disease Kidneys via the Activation of PACAP and BMP Signaling Pathways. *Front Cell Neurosci*.

- Pirger Z, László Z, Kemenes I, Tóth G, Reglodi D, Kemenes G (2010) A homolog of the vertebrate pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is both necessary and instructive for the rapid formation of associative memory in an invertebrate. *J Neurosci* 30:13766–73.
- Pisegna JR, Wank SA (1993) Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6345–9.
- Pourmaras CJ, Rungger-Brändle E, Riva CE, Hardarson SH, Stefansson E (2008) Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 27:284–330.
- Proekt I, Miller CN, Jeanne M, Fasano KJ, Moon JJ, Lowell CA, Gould DB, Anderson MS, DeFranco AL (2016) LYN- and AIRE-mediated tolerance checkpoint defects synergize to trigger organ-specific autoimmunity. *J Clin Invest* 126:3758–3771.
- Qin Y, Ji M, Deng T, Luo D, Zi Y, Pan L, Wang Z, Jin M (2019) Functional and morphologic study of retinal hypoperfusion injury induced by bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Sci Rep* 9:80.
- Rácz B, Gallyas F, Kiss P, Tóth G, Hegyi O, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Róth E, Tamás A, Lengvári I, Lubics A, Reglódi D (2006) The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involve inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul Pept* 137:20–26.
- Reddy VB, Iuga AO, Kouniga K, Lerner EA (2006) Functional analysis of recombinant mutants of maxadilan with a PAC1 receptor-expressing melanophore cell line. *J Biol Chem* 281:16197–201.
- Reglodi D, Atlasz T, Szabo E, Jungling A, Tamas A, Juhasz T, Fulop BD, Bardosi A (2018a) PACAP deficiency as a model of aging. *GeroScience* 40:437–452.
- Reglodi D, Borzsei R, Bagoly T, Boronkai A, Racz B, Tamas A, Kiss P, Horvath G, Brubel R, Nemeth J, Toth G, Helyes Z (2008) Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J Mol Neurosci* 36:270–8.
- Reglodi D, Cseh S, Somoskoi B, Fulop B, Szentleleky E, Szegeczki V, Kovacs A, Varga A, Kiss P, Hashimoto H, Tamas A, Bardosi A, Manavalan S, Bako E, Zakany R, Juhasz T (2017) Disturbed spermatogenic signaling in PACAP deficient mice. *Reproduction*. 155(2):129-139.
- Reglodi D, Kiss P, Horvath G, Lubics A, Laszlo E, Tamas A, Racz B, Szakaly P (2012a) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the urinary system, with special emphasis on its protective effects in the kidney. *Neuropeptides* 46:61–70.

- Reglodi D, Kiss P, Lubics A, Tamas A (2011) Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des* 17:962–72.
- Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, Laszlo E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamas A (2012b) PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-Deficient mice. *J Mol Neurosci* 48:482–492.
- Reglodi D, Kiss P, Tamás A, Lengvári I (2003) The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. *Behav Brain Res* 140:131–9.
- Reglodi D, Renaud J, Tamas A, Tizabi Y, Socías SB, Del-Bel E, Raisman-Vozari R (2015) Novel tactics for neuroprotection in Parkinson’s disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Prog Neurobiol.* 155:120-148.
- Reglodi D, Tamas A, Koppan M, Szogyi D, Welke L (2012c) Role of PACAP in Female Fertility and Reproduction at Gonadal Level - Recent Advances. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:155.
- Reglodi D, Toth D, Vicena V, Manavalan S, Brown D, Getachew B, Tizabi Y (2019) Therapeutic potential of PACAP in alcohol toxicity. *Neurochem Int* 124:238–244.
- Reglodi D, Vaczy A, Rubio-Beltran E, MaassenVanDenBrink A (2018b) Protective effects of PACAP in ischemia. *J Headache Pain* 19(1):19.
- Reichenstein M, Reich R, Lehoux JG, Hanukoglu I (2004) ACTH induces TIMP-1 expression and inhibits collagenase in adrenal cortex cells. *Mol Cell Endocrinol* 215:109–114.
- Ribeiro JMC (1987) Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods. *Annu Rev Entomol* 32:463–478.
- Rivnyak A, Kiss P, Tamas A, Balogh D, Reglodi D, Rivnyak A, Kiss P, Tamas A, Balogh D RD (2018) Review on PACAP-Induced Transcriptomic and Proteomic Changes in Neuronal Development and Repair. *Int J Mol Sci* 19:1020.
- Robberecht P, Gourlet P, De Neef P, Woussen-Colle MC, Vandermeers-Piret MC, Vandermeers A, Christophe J (1992) Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. *Eur J Biochem* 207:239–46.
- Rhöllich Pál (2014) *Szövektan*, 4th edn. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, Budapest

- Rudecki AP, Gray SL (2016) PACAP in the Defense of Energy Homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 27:620–632.
- Ryan Stephen J. (2013) *Retina*, 5th edn. Elsevier Saunders, London
- Salton MR (1963) The relationship between the nature of the cell wall and the Gram stain. *J Gen Microbiol* 30:223–35.
- Sándor K, Böleskei K, McDougall JJ, Schuelert N, Reglodi D, Elekes K, Petho G, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z (2009) Divergent peripheral effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38 on nociception in rats and mice. *Pain* 141:143–50.
- Sándor K, Kormos V, Botz B, Imreh A, Böleskei K, Gaszner B, Markovics A, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D, Helyes Z (2010) Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice. *Neuropeptides* 44:363–371.
- Santeford A, Wiley LA, Park S, Bamba S, Nakamura R, Gdoura A, Ferguson TA, Rao PK, Guan J-L, Saitoh T, Akira S, Xavier R, Virgin HW, Apte RS (2016) Impaired autophagy in macrophages promotes inflammatory eye disease. *Autophagy* 12:1876–1885.
- Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, Noda K, Imamura Y, Kobayashi S, Ishida S, Tsubota K (2009) Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 50:1433–1439.
- Scuderi S, D'amico AG, Federico C, Saccone S, Magro G, Bucolo C, Drago F, D'Agata V (2015) Different Retinal Expression Patterns of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and Their Receptors in a Rat Model of Type 1 STZ-Induced Diabetes. *J Mol Neurosci* 56:431–9.
- Seki M, Tanaka T, Nawa H, Usui T, Fukuchi T, Ikeda K, Abe H, Takei N (2004) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats: therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor for dopaminergic amacrine cells. *Diabetes* 53:2412–9.
- Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Endo K, Wada Y, Nakamura K, Shioda S (2011) Suppression of Rat Retinal Ganglion Cell Death by PACAP Following Transient Ischemia Induced by High Intraocular Pressure. *J Mol Neurosci* 43:30–34.
- Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Shioda S (2008) Suppression of Ganglion Cell Death by PACAP Following Optic Nerve Transection in the Rat. *J Mol Neurosci* 36:57–60.
- Seki T, Izumi S, Shioda S, Zhou CJ, Arimura A, Koide R (2000a) Gene expression for PACAP receptor mRNA in the rat retina by in situ hybridization and in situ RT-PCR. *Ann N Y Acad Sci* 921:366–9.



- Seki T, Nakatani M, Taki C, Shinohara Y, Ozawa M, Nishimura S, Ito H, Shioda S (2006) Neuroprotective effect of PACAP against kainic acid-induced neurotoxicity in rat retina. *Ann N Y Acad Sci* 1070:531–4.
- Seki T, Shioda S, Izumi S, Arimura A, Koide R (2000b) Electron microscopic observation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-containing neurons in the rat retina. *Peptides* 21:109–13.
- Seki T, Shioda S, Ogino D, Nakai Y, Arimura A, Koide R (1997) Distribution and ultrastructural localization of a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett* 238:127–30.
- Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE (2000) The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev* 21:619–70.
- Shioda S, Nakamachi T (2015) PACAP as a neuroprotective factor in ischemic neuronal injuries. *Peptides* 72:202–7.
- Shioda S, Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Watanabe J, Nakajo S, Arata S, Kitamura S, Okuda H, Takenoya F, Kitamura Y (2006) Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. *Ann N Y Acad Sci* 1070:550–60.
- Shioda S, Takenoya F, Wada N, Hirabayashi T, Seki T, Nakamachi T (2016) Pleiotropic and retinoprotective functions of PACAP. *Anat Sci Int* 91:313–324.
- Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, Ishihara K, Tamura Y, Shiomi H, Sasa M (1999) Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res* 839:66–73.
- Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, Ishihara K, Tamura Y, Shiomi H, Sasa M (1998) Protective effects of vasoactive intestinal peptide against delayed glutamate neurotoxicity in cultured retina. *Brain Res* 809:127–36.
- Silveira MS, Costa MR, Bozza M, Linden R (2002) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 277:16075–80.
- Skakkebaek M, Hannibal J, Fahrenkrug J (1999) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat mammary gland. *Cell Tissue Res* 298:153–9.
- Skoglösa Y, Takei N, Lindholm D (1999) Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 65:1–13.

- Soares MB, Titus RG, Shoemaker CB, David JR, Bozza M (1998) The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF- $\alpha$  and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol* 160:1811–6.
- Somogyvári-Vigh A, Reglodi D (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr Pharm Des* 10:2861–89.
- Souza NA, Brazil RP, Araki AS (2017) The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112:161–174.
- Squillaciotti C, Mirabella N, De Luca A, Paino G (2006) Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the primary lymphoid organs of the duck *Anas platyrhynchos*. *J Anat* 209:51–58.
- Stevens WD, Fortin T, Pappas BA (2002) Retinal and optic nerve degeneration after chronic carotid ligation: time course and role of light exposure. *Stroke* 33:1107–12.
- Sun L, Xu Y-W, Han J, Liang H, Wang N, Cheng Y (2015) 12/15-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid activate PPAR $\gamma$ : a possible neuroprotective effect in ischemic brain. *J Lipid Res* 56:502–514.
- Süveges Ildikó (2010) *Szemészet*, 1st edn. Medicina Könyvkiadó Zrt.
- Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Danyadi B, Tamas A, Helyes Z, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Toth G, Gabriel R, Reglodi D (2012a) Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotox Res* 21:41–8.
- Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglodi D, Szabo A, Kovacs K, Szalontai B, Setalo G, Banki E, Csanaky K, Tamas A, Gabriel R (2012b) Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell Tissue Res* 348:37–46.
- Szabadfi K, Atlasz T, Reglodi D, Kiss P, Dányádi B, Fekete ÉM, Zorrilla EP, Tamás A, Szabó K, Gábel R (2009) Urocortin 2 protects against retinal degeneration following bilateral common carotid artery occlusion in the rat. *Neurosci Lett* 455:42–45.
- Szabadfi K, Mester L, Reglodi D, Kiss P, Babai N, Racz B, Kovacs K, Szabo A, Tamas A, Gabriel R, Atlasz T (2010) Novel Neuroprotective Strategies in Ischemic Retinal Lesions. *Int J Mol Sci* 11:544–561.

- Szabadfi K, Reglodi D, Szabo A, Szalontai B, Valasek A, Setalo G, Kiss P, Tamas A, Wilhelm M, Gabriel R (2016) Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, A Potential Therapeutic Agent for Diabetic Retinopathy in Rats: Focus on the Vertical Information Processing Pathway. *Neurotox Res* 29:432–446.
- Szabadfi K, Szabo A, Kiss P, Reglodi D, Setalo G, Kovacs K, Tamas A, Toth G, Gabriel R (2014) PACAP promotes neuron survival in early experimental diabetic retinopathy. *Neurochem Int* 64:84-91.
- Szabo A, Danyadi B, Bogнар E, Szabadfi K, Fabian E, Kiss P, Mester L, Manavalan S, Atlasz T, Gabriel R, Toth G, Tamas A, Reglodi D, Kovacs K (2012) Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neurosci Lett* 523:93–8.
- Szegezcki V, Bauer B, Jüngling A, Fülöp BD, Vágó J, Perényi H, Tarantini S, Tamás A, Zákány R, Reglődi D, Juhász T (2019) Age-related alterations of articular cartilage in pituitary adenylate cyclase–activating polypeptide (PACAP) gene–deficient mice. *GeroScience* 41:775–793.
- Szentlélek E, Szegezcki V, Karanyicz E, Hajdú T, Tamás A, Tóth G, Zákány R, Reglődi D, Juhász T (2019) Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Reduces Oxidative and Mechanical Stress-Evoked Matrix Degradation in Chondrifying Cell Cultures. *Int J Mol Sci* 20:168.
- Tamás A, Gábrriel R, Rácz B, Dénes V, Kiss P, Lubics A, Lengvári I, Reglodi D (2004) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neurosci Lett* 372:110–113.
- Tchoumi NA, Nguyen PT, Chatenet D, Fournier A, Bourgault S (2014) Secondary conformational conversion is involved in glycosaminoglycans-mediated cellular uptake of the cationic cell-penetrating peptide PACAP. *FEBS Lett* 588:4590–6.
- Thakur S, Joshi J, Kaur S (2020) Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J Parasit Dis* 44:253–272.
- Titus R, Ribeiro J (1988) Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239:1306–1308.
- Toker E, Kazokoglu H, Sahin S (1998) Cell adhesion molecules in subretinal fluid: soluble forms of VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) and L-selectin. *Int Ophthalmol* 22:71–76.
- Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R (2017) Leishmaniasis: a review. *F1000Research* 6:750.

- Toth D, Szabo E, Tamas A, Juhasz T, Horvath G, Fabian E, Opper B, Szabo D, Maugeri G, D'Amico AG, D'Agata V, Vicena V, Reglodi D (2020a) Protective effects of PACAP in peripheral organs. *Front Endocrinol Lausanne* 11:377.
- Toth D, Tamas A, Reglodi D (2020b) The Neuroprotective and Biomarker Potential of PACAP in Human Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci* 21:827.
- Tsuchida M, Nakamachi T, Sugiyama K, Tsuchikawa D, Watanabe J, Hori M, Yoshikawa A, Imai N, Kagami N, Matkovits A, Atsumi T, Shioda S (2014) PACAP stimulates functional recovery after spinal cord injury through axonal regeneration. *J Mol Neurosci* 54:380–7.
- Tumurbaatar T, Kanasaki H, Oride A, Okada H, Hara T, Tumurgan Z, Kyo S (2019) Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the regulation of hypothalamic kisspeptin expression. *Gen Comp Endocrinol* 270:60–66.
- Uddman R, Luts A, Absood A, Arimura A, Ekelund M, Desai H, Håkanson R, Hambreaus G, Sundler F (1991a) PACAP, a VIP-like peptide, in neurons of the esophagus. *Regul Pept* 36:415–22.
- Uddman R, Luts A, Arimura A, Sundler F (1991b) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a new vasoactive intestinal peptide (VIP)-like peptide in the respiratory tract. *Cell Tissue Res* 265:197–201.
- Usdin TB, Bonner TI, Mezey E (1994) Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 135:2662–80.
- Varga B, Szabadfi K, Kiss P, Fabian E, Tamas A, Griecs M, Gabriel R, Reglodi D, Kemeny-Beke A, Pamer Z, Biro Z, Tosaki A, Atlasz T, Juhasz B (2011) PACAP improves functional outcome in excitotoxic retinal lesion: an electroretinographic study. *J Mol Neurosci* 43:44–50.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BKC, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61:283–357.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52:269–324.
- Velázquez J, Pérez G, Semple SL, Rodríguez-Ramos T, Díaz-Rosales P, Ordás M del C, Lugo JM, Dixon B, Tafalla C, Estrada MP, Carpio Y (2020) First in vivo evidence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide antiviral activity in teleost. *Fish Shellfish Immunol* 103:58–65.

- Vollmar B, Menger MD (2011) Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbeck's Arch Surg* 396:13–29.
- Wang H, Brown J, Martin M (2011) Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. *Cytokine* 53:130–40.
- Wang ZY, Alm P, Håkanson R (1995) Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rabbit eye. *Neuroscience* 69:297–308.
- Warren JB, Donnelly LE, Cullen S, Robertson BE, Ghatei MA, Bloom SR, MacDermot J (1991) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a novel, long-lasting, endothelium-independent vasorelaxant. *Eur J Pharmacol* 197:131–4.
- Webster L, Stanbury RM, Chignell AH, Limb GA, L. (1998) Vitreous intercellular adhesion molecule 1 in uveitis complicated by retinal detachment. *Br J Ophthalmol* 82:438–443.
- Werling D, Reglodi D, Banks WA, Salameh TS, Kovacs K, Kvarik T, Vaczy A, Kovacs L, Mayer F, Danyadi B, Lokos E, Tamas A, Toth G, Biro Z, Atlasz T (2016) Ocular Delivery of PACAP1-27 Protects the Retina From Ischemic Damage in Rodents. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 57:6683.
- Werling D, Banks WA, Salameh TS, Kvarik T, Kovacs LA, Vaczy A, Szabo E, Mayer F, Varga R, Tamas A, Toth G, Biro Z, Atlasz T, Reglodi D.(2017) Passage through the Ocular Barriers and Beneficial Effects in Retinal Ischemia of Topical Application of PACAP1-38 in Rodents. *Int J Mol Sci.* 18(3):675.
- Wildeman G, Dhalla H (2016) What is OCT and how can it help ophthalmologists acquire high resolution information on ocular tissue? *Leica Microsystem Article*, 3.
- Willey J, Sherwood L, Woolverton CJC (2009) *Prescott's Microbiology*, 9th edn. McGraw-Hill
- Williams DL, Ozment-Skelton T, Li C (2006) Modulation of the Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway Alters Host Response To Sepsis, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Shock* 25:432–439.
- Winzell MS, Ahrén B (2007) Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides* 28:1805–13.
- Wisniewski PJ, Dowden RA, Campbell SC (2019) Role of Dietary Lipids in Modulating Inflammation through the Gut Microbiota. *Nutrients.* 11(1):117.
- Wojcieszak J, Zawilska JB (2014) PACAP38 and PACAP6-38 Exert Cytotoxic Activity Against Human Retinoblastoma Y79 Cells. *J Mol Neurosci* 54:463–468.

- Yada T, Vigh S, Arimura A (1993) A Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) increases cytosolic-free calcium concentration in folliculo-stellate cells and somatotropes of rat pituitary. *Peptides* 14:235–9.
- Yamada H, Watanabe M, Yada T (2004) Cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses to sub-picomolar and nanomolar PACAP in pancreatic  $\beta$ -cells are mediated by VPAC2 and PAC1 receptors. *Regul Pept* 123:147–153.
- Yamamoto HH, Schmidt-Kastner R, Hamasaki DI, Yamamoto HH, Parel J-M (2006) Complex neurodegeneration in retina following moderate ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion in Wistar rats. *Exp Eye Res* 82:767–79.
- Yang S, Yang J, Yang Z, Chen P, Fraser A, Zhang W, Pang H, Gao XX, Wilson B, Hong J-SJ-S, Block ML (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP4-6 are neuroprotective through inhibition of NADPH oxidase: potent regulators of microglia-mediated oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 319:595–603.
- Yin H, Tan Y, Wu X, Yan H, Liu F, Yao Y, Jiang J, Wan Q, Li L (2016) Association between TLR4 and PTEN Involved in LPS-TLR4 Signaling Response. *Biomed Res Int.* 2016:6083178.
- Yon L, Feuilloley M, Chartrel N, Arimura A, Conlon JM, Fournier A, Vaudry H (1992) Immunohistochemical distribution and biological activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*. *J Comp Neurol* 324:485–9.
- Yoshida A, Yoshida S, Hata Y, Khalil AK, Ishibashi T, Inomata H (1998) The role of NF-kappaB in retinal neovascularization in the rat. Possible involvement of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC), a member of the interleukin-8 family. *J Histochem Cytochem* 46:429–36.
- Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T, Elnor SG, Elnor VM (2003) Role of MCP-1 and MIP-1alpha in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *J Leukoc Biol* 73:137–44.
- Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE, Schmidt K, Bagchi A, Griffin PR, Thornberry NA, Sinha Roy R (2003) The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *J Biol Chem* 278:22418–23.

## 8 Publikációs lista

### 8.1 Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

- **Váczy A**, Kővári P, Kovács K, Farkas K, Szabó E, Kvárik T, Kocsis B, Fülöp B, Atlasz T, Reglődi D. (2018) Protective role of endogenous PACAP in inflammation-induced retinal degeneration. *Curr Pharm Des* 24(30):3534-3542.

• **IF: 2,757**

- **Váczy A**, Reglődi D, Somoskeöy T, Kovács K, Lőkös E, Szabó E, Tamás A, Atlasz T. (2016) The protective role of PAC1-receptor agonist maxadilan in BCCAO-induced retinal degeneration. *J Mol Neurosci* 60(2):186-94.

**IF: 2,229**

- Reglődi D, **Váczy A**, Rubio-Beltran E, MaassenVanDenBrink A. (2018) Protective effects of PACAP in ischemia. *J Headache Pain* 19(1):19. (Review)

**IF: 3,403**

Témához kapcsolódó **eredeti** publikációk **összesített impakt faktora: 4,986**

### 8.2 Az értekezés témájához nem illeszkedő egyéb közlemények

- Kovács K, **Váczy A**, Fekete K, Kővári P, Atlasz T, Reglődi D, Gábrriel R, Gallyas F (2019) PARP Inhibitor Protects Against Chronic Hypoxia/Reoxygenation-Induced Retinal Injury by Regulation of MAPKs, HIF1 $\alpha$ , NRF2 and NF $\kappa$ B. *Ophthalmol Vis Sci* 19(60).

**IF: 3,388**

- Atlasz T, Werling D, Song S, Szabó E, **Váczy A**, Kővári P, Tamás A, Reglődi D, Yu R. (2018) Retinoprotective Effects of TAT-Bound Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide. *J Mol Neurosci* 18(12).

**IF: 2,454**

- Reglődi D, Tamás A, Jüngling A, Váczy A, Rivnyák A, Fülöp BD, Szabó E, Lubics A, Atlasz T. (2018) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide against neurotoxic agents. *Neurotoxicology* 66:185-194.

**IF: 3,076**

- Werling D, Banks WA, Salameh TS, Kvárik T, Kovács LA, Váczy A, Szabó E, Mayer F, Varga R, Tamás A, Tóth G, Biró Z, Atlasz T, Reglődi D. (2017) Passage through the Ocular Barriers and Beneficial Effects in Retinal Ischemia of Topical Application of PACAP1-38 in Rodents. *Int J Mol Sci* 18(3).

**IF: 3,687**

- Werling D, Reglődi D, Banks WA, Salameh TS, Kovács K, Kvárik T, Váczy A, Kovács L, Mayer F, Dányádi B, Lőkös E, Tamás A, Tóth G, Biró Z, Atlasz T. (2016) Ocular Delivery of PACAP1-27 Protects the Retina From Ischemic Damage in Rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(15):6683-6691.

**IF: 3,427**

- Kvárik T, Mammel B, Reglődi D, Kovács K, Werling D, Bede B, Váczy A, Fabián E, Tóth G, Kiss P, Taás A, Ertl T, Gyarmati J, Atlasz T. (2016) PACAP Is Protective in a Rat Model of Retinopathy of Prematurity. *J Mol Neurosci* 60(2):179-85.

**IF: 2,229**

- Atlasz T, Váczy A, Werling D, Kiss P, Tamás A, Kovács K, Fábíán E, Kvárik T, Mammel B, Dányádi B, Lőkös E, Reglődi D (2016) Neuroprotective effects of PACAP in the retina. in Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP, edited by Dóra Reglődi and Andrea Tamás. New York: *Springer Nature* 501-527.

- Budán F., Szabó I., Jám bor É., Bóna Á., Váczy A., Maász G., Ohmacht R., Kiss I., Márk L., Tényi T. (2010) A skizofrénia biomarkereinek kimutatása és azonosítása tömegspektrometriával új lehetőséget nyithat a megelőzésben. *Magyar Epidemiológia* 7: p.69.



- Márk L., Patonai Z., Váczy A., Lóránd T., Marcsik A. (2009): High-throughput mass spectrometric analysis of 1400-year old mycolic acidis as biomarkers for ancient tuberculosis infection. *J Archeol Sci* 37(2), 302-305.

**IF: 1.889**

- Montskó G, Váczy A., Maász G, Mernyák E, Frank E, Bay C, Kádár Z, Ohmacht R, Wolfling J, Mark L. (2009) Analysis of nonderivatized steroids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using C70 fullerene as matrix. *Anal Bioanal Chem* (3):869-74.

**IF: 3.778**

- Börzsei R, Márk L, Tamás A, Bagoly T, Bay C, Csanaky K, Bánki E, Kiss P, Váczy A., Horváth G, Németh J, Szauer E, Helyes Z, Reglódi D. (2009) Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur J Endocrinol* 160(4):561-5.

• **IF: 3.423**

Az eddig megjelent tudományos publikációk **összesített impakt faktora: 35,74**

## 9 Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek **Dr. Reglódi Dóra** egyetemi tanárnak, aki kezdetektől fogva mellettem állt, mindenben támogatta és irányította munkásságom és lehetővé tette, hogy egy kiváló kutatócsoport részesévé válhassak.

Köszönet illeti, férjemet **Dr. Atlasz Tamás** egyetemi docenst, aki mindenkor önzetlenül; időt és energiát nem kímélve támogatott és elindított tudományos munkám kibontakozását, segítette szakmai fejlődésemet, valamint megszerettette velem a kutatói pályát.

Hálásan köszönöm a sok segítséget **Szabó Edinának**, egyetemi tanársegédnek, barátomnak az időt és fáradságot nem kímélő közösen eltöltött kísérletezéseinket, valamint a mindenkor mellettem álló támogatását.

Köszönettel tartozom **Kővári Petra** és **Farkas Kinga** TDK hallgatónak, akik a kezdetektől fogva mellettem álltak és segítették kutatásom előre haladását.

Továbbá köszönöm a sok segítséget **Dr. Kovács Krisztina** egyetemi docensnek, aki a biokémiai vizsgálatokban és módszertanuk elsajátításában nyújtott fáradhatatlan segítséget.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Kocsis Béla** egyetemi docensnek is, aki kifogyhatatlan mennyiségű lipopoliszahariddal nyújtott támogatást a kísérleteim elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom az **Anatómiai Intézet** valamennyi dolgozójának, és kiemelten a **Retina Kutatócsoport** tagjainak, akik lehetővé tették szakmai tanácsaikkal és segítségükkel tudományos munkám és kísérleteim előrehaladását.

Kiemelt köszönettel és hálával tartozom **Családom** felé is, akik mindig mindenben szeretetükkel bíztattak és támogattak az eltelt években folytatott munkásságom ideje alatt.

*A disszertáció megvalósításához a következő támogók járultak hozzá: NKFIH FK129190, GINOP-2.3.2-15-2016-00050"PEPSYS", NAP 2017-1.2.1.-NKP-2017-00002, PTE-AOK TANDEM, MTA-TKI 14016, Bolyai Scholarship, New national Excellence Program of the Ministry of Human Capacities, FIKP II, .FIKP III, PTE-ÁOK KA 2017, NAP2017-1.2.1-NKP-2017-00002; MTA-TKI14016; EFOP-3.6.1-16-2016-00004, EFOP-362-00008, TAMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001, 20765-3/2018/FEKUTSTRAT.*

# The Protective Role of PAC1-Receptor Agonist Maxadilan in BCCAO-Induced Retinal Degeneration

A. Vaczy<sup>1</sup> · D. Reglodi<sup>1</sup> · T. Somoskeoy<sup>1</sup> · K. Kovacs<sup>3</sup> · E. Lokos<sup>1</sup> · E. Szabo<sup>1</sup> ·  
A. Tamas<sup>1</sup> · T. Atlasz<sup>1,2,4</sup>

Received: 4 July 2016 / Accepted: 10 August 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016

**Abstract** A number of studies have proven that pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is protective in neurodegenerative diseases. Permanent bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) causes severe degeneration in the rat retina. In our previous studies, protective effects were observed with PACAP1-38, PACAP1-27, and VIP but not with their related peptides, glucagon, or secretin in BCCAO. All three PACAP receptors (PAC1, VPAC1, VPAC2) appear in the retina. Molecular and immunohistochemical analysis demonstrated that the retinoprotective effects are most probably mainly mediated by the PAC1 receptor. The aim of the present study was to investigate the retinoprotective effects of a selective PAC1-receptor agonist maxadilan in BCCAO-induced retinopathy. Wistar rats were used in the experiment. After performing BCCAO, the right eye was treated with intravitreal maxadilan (0.1 or 1  $\mu$ M), while the left eye was injected with vehicle. Sham-operated rats received the same treatment. Two weeks after the operation, retinas were processed for standard morphometric and molecular analysis. Intravitreal injection of 0.1 or 1  $\mu$ M maxadilan caused significant protection in the thickness of most retinal layers and the

number of cells in the GCL compared to the BCCAO-operated eyes. In addition, 1  $\mu$ M maxadilan application was more effective than 0.1  $\mu$ M maxadilan treatment in the ONL, INL, IPL, and the entire retina (OLM-ILM). Maxadilan treatment significantly decreased cytokine expression (CINC-1, IL-1 $\alpha$ , and L-selectin) in ischemia. In summary, our histological and molecular analysis showed that maxadilan, a selective PAC1 receptor agonist, has a protective role in BCCAO-induced retinal degeneration, further supporting the role of PAC1 receptor conveying the retinoprotective effects of PACAP.

**Keywords** Ischemia · Retinoprotection · Maxadilan · PAC1 receptor

## Introduction

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is a phylogenetically conserved neuropeptide distributed throughout the body in addition to the hypothalamus, the original source of isolation (Miyata et al. 1989; Vu et al. 2015; Krajcs et al. 2015; Tamas et al. 2016). The peptide belongs to the vasoactive intestinal peptide (VIP)/glucagon/secretin peptide superfamily, showing the closest homology with VIP (Hashimoto 2002; Padua et al. 2016). PACAP exerts its actions through three distinct receptors: the PACAP receptor 1 (PAC1), as well as VPAC receptor 1 (VPAC1), and VPAC receptor 2 (VPAC2). The PAC1 receptor is specific to PACAP, while the VPAC receptors have similar affinity to PACAP and VIP (Ramos-Álvarez et al. 2015). This and the numerous splice variants of the PAC1 receptor are in the background of PACAP showing many different actions in various organs (Shioda and Nakamachi

---

✉ T. Atlasz  
attam@gamma.ttk.pte.hu

<sup>1</sup> Department of Anatomy, MTA-PTE PACAP Research Team, University of Pecs, Pecs, Hungary

<sup>2</sup> Department of Sportbiology, University of Pecs, Ifjusag Street 6, Pecs H-7624, Hungary

<sup>3</sup> Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pecs, Pecs, Hungary

<sup>4</sup> Janos Szentagothai Research Center, University of Pecs, Pecs, Hungary

2015; Ohnou et al. 2016; Matsumoto et al. 2016; Clason et al. 2016).

PACAP and its receptors have been shown in the tissues of the eye, including the retina. Seki and coworkers described the localization and strong expression of PAC1 receptor in different retinal layers of the rat (Seki et al. 1997; Seki et al. 2000), with different splice variants (short, hop) in the cell bodies and the processes of ganglion and amacrine cells (Seki et al. 1997). PAC1 receptor has also been demonstrated in Muller glial cells (Kubrusly et al. 2005; Seki et al. 2006). VPAC2 receptor expression has been described in the mouse retina (Harmar et al. 2004). The expression of the PAC1 and VPAC receptors has also been confirmed during the development of mammalian retina (Njaine et al. 2010).

From the point of view of future therapeutic possibilities, one of the most important actions of PACAP is its neuroprotective effect proven in various *in vitro* and *in vivo* models. This effect has also been demonstrated in the retina (Atlasz et al. 2016; Shioda et al. 2016). Protective actions of PACAP have been found in different pathological conditions such as diabetic retinopathy (D'Amico et al. 2015; Szabadfi et al. 2016), UV light-induced degeneration (Atlasz et al. 2011), excitotoxic retinal injury (Babai et al. 2006; Szabadfi et al. 2010; Endo et al. 2011), optic nerve injury (Seki et al. 2008), and oxygen-induced retinopathy (Kvarik et al. 2016). Regarding ischemic retinopathy, we have already shown that PACAP attenuates the reduction in thickness of all retinal layers and the loss of cells in the ganglion cell layer (GCL) in permanent bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO)-induced hypoperfusion of the retina (Atlasz et al. 2010, 2011). In this model of ischemic retinopathy, we have not only proven the protective effects of PACAP on retinal morphology (Atlasz et al. 2010) but also elucidated possible mechanisms, such as reduction of pro-apoptotic MAP kinases, stimulation of anti-apoptotic molecules, like Akt, ERK, and several anti-inflammatory cytokines (Szabo et al. 2012). Furthermore, we have shown with electroretinography that the morphological improvement is accompanied by functional amelioration (Danyadi et al. 2014).

In order to develop future therapeutic approaches with peptide analogs and derivatives (Bourgault et al. 2008; Chapter et al. 2010), it is essential that we reveal the receptor through which PACAP elicits its retinoprotective actions and thus elucidate receptorial mechanisms more in detail. VIP has been also proven to exert neuroprotective effects in several models of neuronal injuries (Tunçel et al. 1996; Shoge et al. 1998; Scuderi et al. 2013). We have found earlier that VIP, but not other member of the peptide family, protects the retina against ischemic injury but only at doses ten times higher than that of PACAP (Szabadfi et al. 2012a; Werling et al. 2014). Others have also described antioxidant effects of VIP in ischemia-induced retinopathy (Tunçel et al. 1996). This

implies that the PAC1 and VPAC receptors may both convey retinoprotective effects.

Maxadilan, a 61-amino acid peptide, was initially isolated from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Moro and Lerner 1997; Lerner et al. 2007), based on its vasodilator action. Although maxadilan does not occur naturally in the mammalian organism and has no sequence homology with PACAP, it is the only known selective agonist of the PAC1 receptor. It has been shown to be a useful peptide to study the diverse effects mediated by the PAC1 receptor (Uchida et al. 1998; Hoover et al. 2009; Kambe and Miyata 2012; Banki et al. 2014). The aim of the present study was, therefore, to examine the potential protective effects of maxadilan and thus the involvement of the specific PAC1 receptor, in BCCAO-induced retinal hypoperfusion.

## Materials and Methods

### Animals

Adult 3-month-old male Wistar rats ( $n = 36$ ) weighing 250–300 g were used in the experiments. Animals were maintained under 12-h light/dark cycle with free access to food and water. The procedures of whole experiment were performed following the institutional ethical guidelines (BA02/2000–24/2011).

### Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (BCCAO) and Maxadilan Treatment

The common carotid arteries on both sides were exposed through a cervical injection in the carotid triangle of the neck. Common carotid arteries were separated from the vagus nerve and then ligated with a 3-0 filament under isoflurane anesthesia. Following the operation, 5  $\mu$ l (0.1  $\mu$ M,  $n = 9$  or 1  $\mu$ M,  $n = 9$ ) maxadilan solution (Bachem, USA) was injected intravitreally into the right eye with Hamilton syringe. Left eye always served as controls, receiving the same volume of phosphate buffered saline (PBS). The control group of animals (sham) underwent anesthesia, all steps of the surgical procedure, except ligation of the carotid arteries. These animals were also injected with maxadilan solution (0.1 or 1  $\mu$ M) into the right eye and vehicle (PBS) into the left eye.

### Histological Analysis

Rats were sacrificed 2 weeks after BCCAO. Eyes were dissected in 0.1 M PBS and fixed in 4 % paraformaldehyde dissolved in 0.1 M phosphate buffer (PB) (Sigma, Hungary). Eyecup tissues were embedded in Durcupan ACM resin (Fluka, Switzerland) and cut at 2  $\mu$ m. The

samples were stained with toluidine blue (Sigma, Hungary) and mounted in DPX medium (Sigma, Hungary). Retinas were measured with Nikon Eclipse 80i microscope, using the Q-Capture Pro7 program. Four tissue blocks from animals were prepared and central retinal areas within 1 mm from the optic nerve were used for measurements ( $n = 5$  measurements from one tissue block). Retina sections were further processed with Adobe Photoshop program. The following parameters were measured: (i) cross section of the retina from the outer limiting membrane to the inner limiting membrane (OLM-ILM), (ii) the width of the outer and inner nuclear and outer and inner plexiform layers (ONL, INL, OPL, IPL, respectively), (iii) the number of cells/100  $\mu\text{m}$  section length in the ganglion cell layer (GCL).

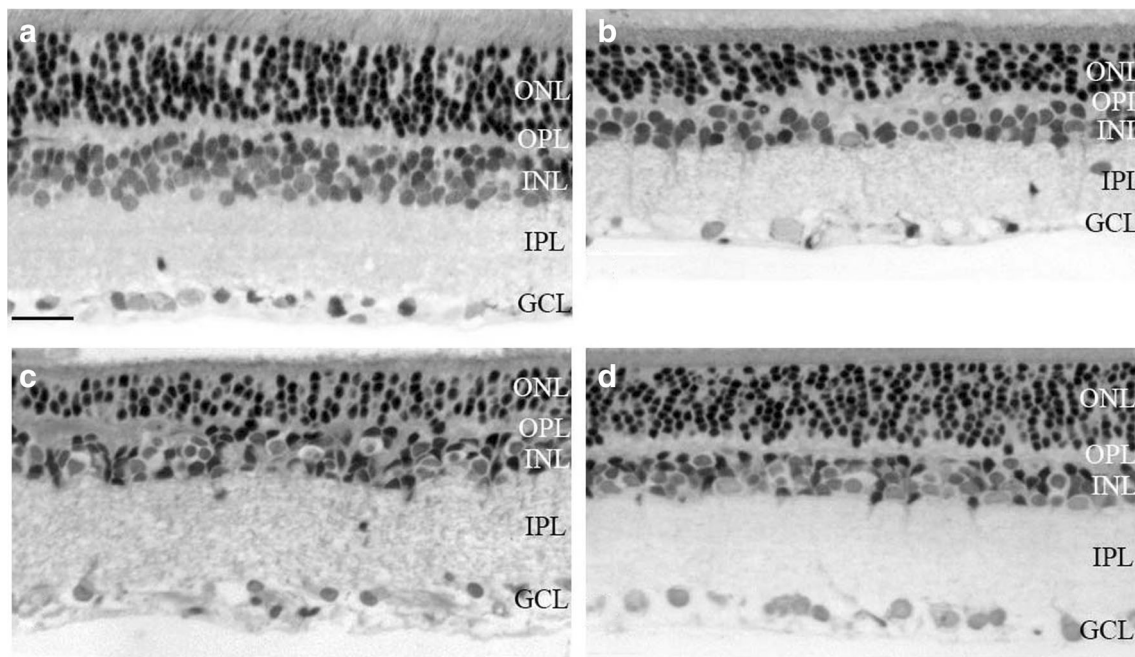
### Cytokine Measurements

For the semiquantitative cytokine array measurement, retinas were removed and analyzed using Rat Cytokine Array Panel A Array kit from R&D Systems (Biomedica, Budapest, Hungary). The arrays are based on antibodies binding with the nitrocellulose membranes. Twenty-four hours after the BCCAO retinas ( $n = 4$  from each group) from the ischemic and sham-operated groups were removed and pooled. The array was performed as

described by the manufacturer. The samples were homogenized in PBS with protease inhibitors. After homogenization, Triton X-100 was added to the final concentration of 1 %. The nitrocellulose membranes were blocked for 1 h and incubated with reconstituted detection antibody cocktail at room temperature for another 1 h. The membranes were incubated overnight with 1 mL of tissue homogenates containing 400  $\mu\text{g}$  proteins. After washing with buffer three times and adding streptavidin-HRP to each membrane, the plates were spread to a chemiluminescent detection reagent (Amersham Biosciences, Hungary). The membranes were placed facing up to an X-ray film cassette. Developed films were scanned and analyzed by densitometry using the Protein Array Analyzer program for Image J software. The array was repeated three times.

### Data Analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SEM). Data of the histological and the cytokine analysis were used in the Kolmogorov-Smirnov normality test followed by two-way ANOVA test and Fisher LSD's post hoc analysis with OriginPro 2016. Significant differences were considered at  $p$  values below 0.05.



**Fig. 1** **a–d** Light microphotographs showing toluidine blue-stained representative retinal sections (2  $\mu\text{m}$ ). **a** Sham-operated retina, treated with PBS. **b** BCCAO-induced retinal degeneration showing more noticeable damage compared to the sham retina. **c** BCCAO + 0.1  $\mu\text{M}$  maxadilan and **d** BCCAO + 1  $\mu\text{M}$  maxadilan treatment demonstrating

alleviation of BCCAO-induced damages, shown by width of retinal layers and cell profiles. *ONL* outer nuclear layer, *OPL* outer plexiform layer, *INL* inner nuclear layer, *IPL* inner plexiform layer, *GCL* ganglion cell layer (scale bar: 20  $\mu\text{m}$ )

## Results

### Effects of Maxadilan Treatment on Histological Changes of the Retina

Maxadilan treatment did not cause any morphological alteration in sham-operated animals (data not shown). Retinal layers in BCCAO animals showed signs of severe degeneration compared to sham-operated PBS-treated controls (Fig. 1a, b). All layers were significantly thinner than in the sham-operated group (Fig. 2a, b). Most marked reduction was observed in the IPL thickness but significant changes were also found in the INL, OPL, and ONL. Numerous empty cell body-shaped spaces were seen in the ONL. The reduction of the individual retinal layers added up to a severe reduction of whole retinal thickness between the OLM-ILM (Figs. 1b and 2a, b). The number of cells in the GCL/100  $\mu\text{m}$  was significantly decreased compared to the controls (Fig. 2c). Intraocular treatment of 0.1 or 1  $\mu\text{M}$  maxadilan caused protection in the thickness of different retinal layers, with 1  $\mu\text{M}$  being more effective (except in the OPL). This resulted in a significantly better preserved whole retinal distance between the OLM-ILM (Figs. 1c, d and 2b). Quantitative analysis demonstrated that the loss in the number of cells in the GCL was also attenuated in the maxadilan-treated groups compared to the BCCAO-operated samples (Fig. 2c).

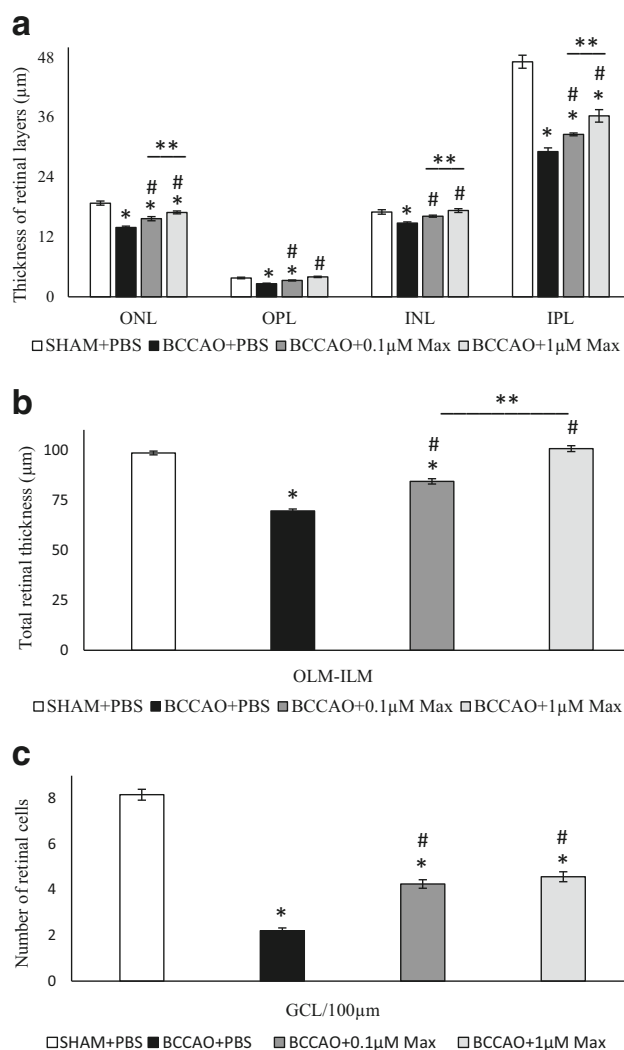
### Effects of Maxadilan Treatment on Cytokine Expression

The expression level of several cytokines was increased after ischemia, including chemoattractant proteins such as CINC-1 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) and MIP-3 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein). IL-1 $\alpha$  was also activated, while other interleukins remained unchanged, such as IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, and IL-10. The activation of fractalkine, sICAM-1 (intercellular adhesion molecule), L-selectin, thymus chemokine, TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase), and VEGF was increased in the retinas that underwent BCCAO compared to the control groups (Fig. 3). Maxadilan treatment attenuated the activation of CINC-1, IL-1 $\alpha$ , and L-selectin (Fig. 4). The expression of other cytokines did not show any marked alterations after maxadilan treatment (Fig. 3).

## Discussion

In the present study, we provide evidence for the involvement of the specific PAC1 receptor in the retinoprotective effects of PACAP in ischemic retinopathy using the PAC1 specific agonist, maxadilan.

Cerebral ischemia often causes irreversible brain damage, neuronal injury and several retinal vascular diseases (Atlasz et al. 2007a, b; Dreixler et al. 2009; Szabo et al.

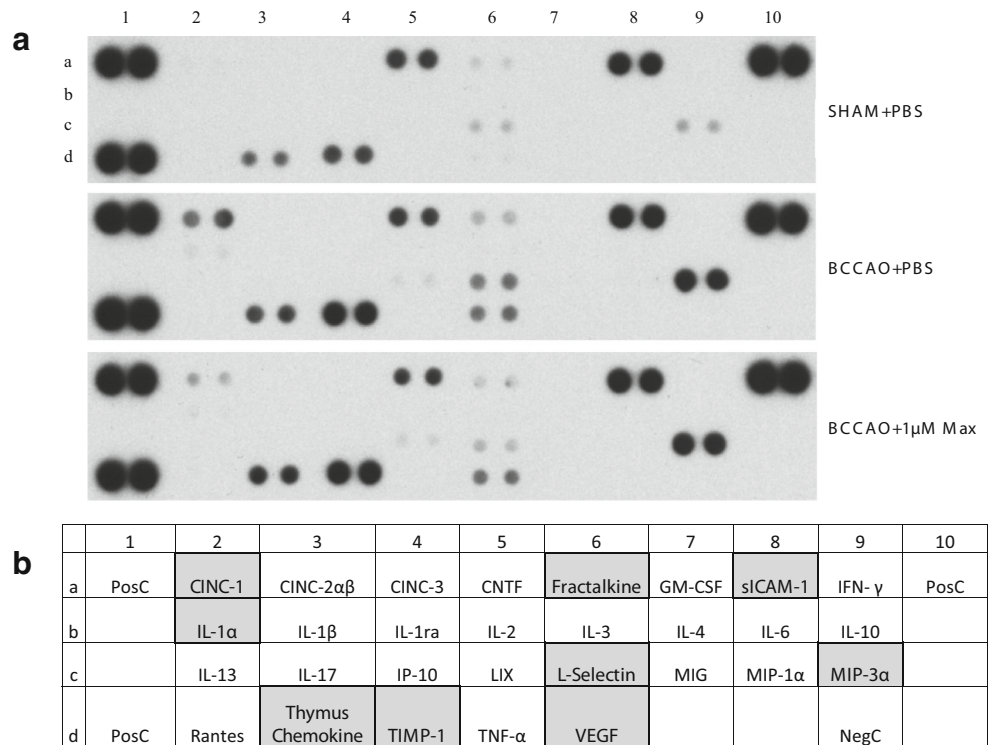


**Fig. 2** **a** Quantitative comparison of the retinal layers. **b** Cross section of the retina from the outer limiting membrane to the inner limiting membrane (OLM-ILM) length and **c** the number of cells/100  $\mu\text{m}$  in the GCL in PBS-treated sham and BCCAO-operated rats receiving different maxadilan concentrations (0.1 or 1  $\mu\text{M}$ ). ONL outer nuclear layer, OPL outer plexiform layer, INL inner nuclear layer, IPL inner plexiform layer. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared to sham-operated retinas; \*\* $P < 0.05$  compared to BCCAO + 0.1  $\mu\text{M}$  Max-treated retinas; # $P < 0.05$  compared to BCCAO-induced ischemic retinas

2012; Sun et al. 2015). BCCAO causes mild cerebral hypoperfusion (Farkas et al. 2007). We have previously studied different neuroprotective strategies in BCCAO-induced retinal degeneration, such as volatile anesthetics, PARP inhibitors, a mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel opener, diazoxide, and urocortin (Atlasz et al. 2007b; Mester et al. 2009; Szabadfi et al. 2009, 2010, 2012b). In a series of experiments, we have proven that PACAP is protective in BCCAO-induced ischemic retinal lesion, an effect later confirmed by others in a different model induced by high intraocular pressure (Seki et al.



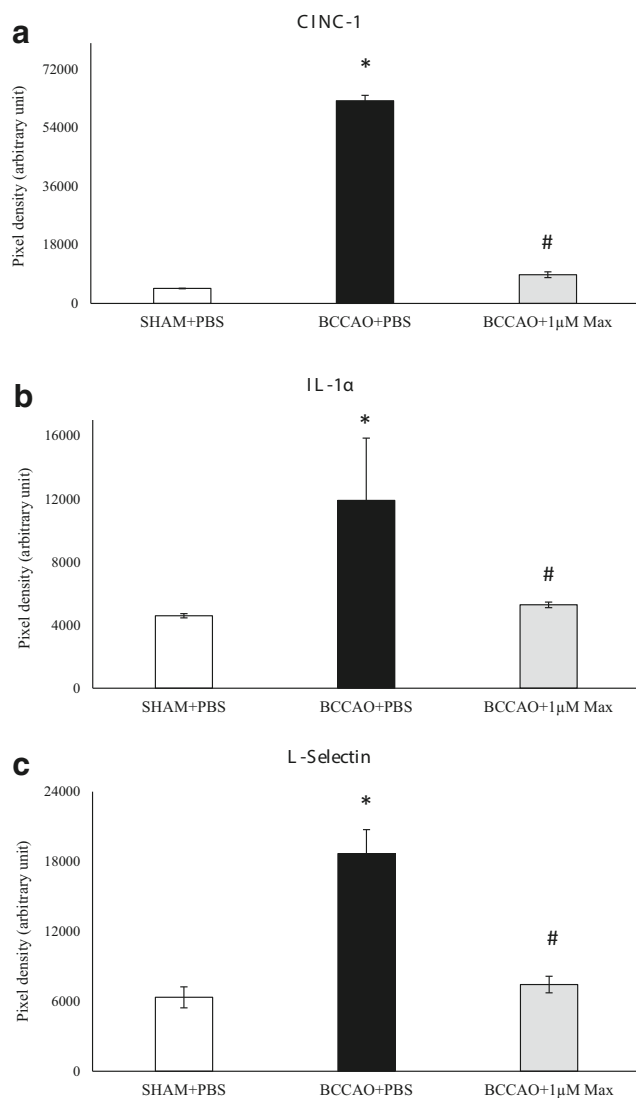
**Fig. 3** **a** Representative panels show cytokine arrays from homogenates of PBS-treated sham, BCCAO, and BCCAO + 1 μM maxadilan-treated retinas. **b** The table indicates the examined cytokines in each box, highlighting significant changes after BCCAO + PBS treatment



2011). First, we showed that PACAP protected the retinal layers, using a routine morphological approach and immunohistochemistry for several neuronal markers (Atlasz et al. 2007a, 2010). In subsequent studies, we have proven that the morphological amelioration paralleled the functional improvement (Danyadi et al. 2014) and that PACAP was ten times more potent than VIP in protecting the retina against ischemic injury (Szabadfi et al. 2012a). PACAP receptors are promising therapeutic targets in various pathologies (Dejda et al. 2011; Reglodi et al. 2015); therefore, it is essential to study the involvement of the different PACAP receptors in models of neuronal degeneration. As PACAP is also an emerging retinoprotective agent proven to be effective in various models, it is of utmost importance to identify the receptorial mechanism (Shioda et al. 2016; Atlasz et al. 2016). Derivatives of the PACAP1-38 molecule have been proven to have both agonistic and antagonistic effects. Truncation of the peptide at the C-terminal results in shorter fragments with less affinity to the PACAP receptors, while N-terminally shortened peptides have antagonistic effects (Robberecht et al. 1992). PACAP6-38 was found to be the most effective antagonist. Although in many studies PACAP6-38 is used as a PAC1 receptor antagonist, it is known that it also acts on VPAC2 receptors; so, it is more a PAC1/VPAC2 antagonist (Couvineau and Laburthe 2012). Furthermore, PACAP6-38 also has controversial effects in acting as an agonist in several cells and tissues. For example, several

tumor cells respond to PACAP1-38 and PACAP6-38 the same way, such as it was proven in choriocarcinoma cell lines, osteosarcoma, and retinoblastoma (Reglodi et al. 2008; Juhasz et al. 2014; Wojcieszak and Zawilska 2014). However, PACAP6-38 has been shown to act as an agonist not only in tumor cells but also in certain normal tissues and cells, such as chondrocytes (Juhasz et al. 2015). Therefore, we decided to use maxadilan, a selective PAC1 receptor agonist to test the involvement of PAC1 receptor in the retinoprotective effects of PACAP in hypoperfusion.

Maxadilan and its shorter form M65 act selectively on the PAC1 receptor, as an agonist and antagonist, respectively (Moro et al. 1999). Therefore, maxadilan has been widely used to study the effects conveyed by the PAC1 receptor. Maxadilan increases cyclic AMP (cAMP) formation in human neuroblastoma cells, rat PC12 pheochromocytoma cells, mouse MILE pancreatic and rabbit aortic smooth muscle cells (Grevelink et al. 1995; Jackson et al. 1996; Moro et al. 1996; Moro and Lerner 1997). It has been shown to elevate MEK/phospho ERK in cardiac neurons (Clason et al. 2016) involving both adenylate cyclase/cAMP/protein kinase A signaling pathways. Similarly to PACAP, maxadilan has been shown to exert protective effects in different tissues. Subcutaneously injected maxadilan has anti-inflammatory effects in Leishmania-infected mice by stimulating IL-6 and inhibiting TNF-alpha expressions (Soares et al. 1998;



**Fig. 4** Quantification of cytokine levels of PBS-treated sham, BCCAO, and BCCAO + 1  $\mu$ M maxadilan-treated groups. Each cytokine was measured by Protein Array Analyzer for Image J. **a** Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1). **b** Interleukin-1alpha (IL-1 $\alpha$ ). **c** L-selectin demonstrates the effects of 1  $\mu$ M maxadilan on BCCAO-induced ischemic retina. Graph values are given as means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared to sham-operated retinas, # $P < 0.05$  compared to BCCAO-induced ischemic samples

Morris et al. 2001; Guilpin et al. 2002). Maxadilan also inhibits apoptosis and promotes cell survival via caspase 3 and caspase 9 reduction as well as Bcl-2 upregulation in human adipose-derived stem cells (Guo et al. 2016). It prevents the olfactory placode cells from TNF-mediated damage (Kanekar et al. 2010) and protects the neuroblastic layer of retinal explants from anisomycin-induced cell death (Silveira et al. 2002). Maxadilan has been shown to influence cell survival and inflammatory pathways by PAC1 receptor which was confirmed in the present study in ischemic retinal lesion. In our study,

ischemia could dramatically change the morphology of the retina and induced several cytokines. Decreased activation was found in the CINC-1, IL-1 alpha, and L-selectin regulatory proteins after maxadilan treatment.

Members of the interleukin-1 family mainly regulate immune and inflammatory responses during infections and ischemic damages (Dinarello 1994; Laszlo et al. 2015). IL-1 alpha is an important pro-inflammatory cytokine and plays a key role during acute and chronic inflammation (Jander et al. 1998; Dinarello 2011). IL-1alpha is involved in cell necrosis during inflammatory processes and tissue damage. It is primarily released in the micro-environment as an alarming factor to the cell and to activate the early mechanisms of defense (Cohen et al. 2010; Lamacchia et al. 2013; Scuderi et al. 2015). Reduced level of these IL-1 subclasses by maxadilan is similar to what we found earlier with PACAP treatment in ischemic retinal injury (Szabo et al. 2012).

Members of the selectin family play important roles in the distinct cellular cross talk between leukocytes, T cells, and endothelial cells and can cause microvascular dysfunction and reperfusion damage (Vollmar and Menger 2011). Increased expression of L-selectin was observed in different model organs after ischemia, and blocking the cytokine-induced leukocyte recruitment can reduce the inflammatory process of neurological disorders (Toker et al. 1998; Nedvig et al. 2012). PACAP treatment could decrease these cell adhesion molecules in many different models (Horvath et al. 2010; Szabo et al. 2012; Reglodi et al. 2012), in accordance to our present findings with maxadilan.

CINC-1 also participates in the retinal inflammatory reactions. This is a pro-inflammatory chemokine belonging to the alpha-chemokine family stimulated by oxidative stress and ischemia/reperfusion. It is involved in several inflammatory processes, usually during the acute inflammatory response phase, and it plays a main role in the subsequent neutrophil migration (Ghaly and Marsh 2010). Compromise in blood flow has been shown to induce decreasing CINC levels in different tissues which are usually associated with decreased damages (Yoshida et al. 1998; Junnarkar et al. 2010). Banki and coworkers have described the elevated CINC-1 level in streptozotocin-induced diabetic nephropathy model where the upregulated chemokine was significantly reduced by PACAP treatment (Banki et al. 2013). The anti-inflammatory effects of PACAP were similar in BCCAO-induced retina degeneration model where the neuroprotective peptide diminished the damages (Szabo et al. 2012). Taken together, the maxadilan-induced cytokine alterations and the morphological amelioration are in agreement with other earlier reports, suggesting an anti-inflammatory role of the PAC1 receptor in ischemic retinal injury.



**Acknowledgments** This study was supported by OTKA K104984, K119759, Bolyai Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences, PTE AOK Research Grant, National Brain Research Program KTIA\_13\_NAP-A-III/5., “New National Excellence Program,” Astellas Foundation 2016, The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pecs, Hungary.

## References

- Atlasz T, Babai N, Kiss P et al (2007a) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *Gen Comp Endocrinol* 153:108–114
- Atlasz T, Babai N, Reglodi D et al (2007b) Diazoxide is protective in the rat retina against ischemic injury induced by bilateral carotid occlusion and glutamate-induced degeneration. *Neurotox Res* 12:105–111
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P et al (2010) Evaluation of the protective effects of PACAP with cell-specific markers in ischemia-induced retinal degeneration. *Brain Res Bull* 81:497–504
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P et al (2011) Effects of PACAP in UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats. *J Mol Neurosci* 43:51–57
- Atlasz T, Vaczy A, Werling D et al (2016) In: Reglodi D, Tamas A (eds) *Neuroprotective effects of PACAP in the retina*. Springer Nature, New York, pp 501–527
- Babai N, Atlasz T, Tamas A et al (2006) Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Ann N Y Acad Sci* 1070:149–155
- Banki E, Degrell P, Kiss P et al (2013) Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides* 42:125–130
- Banki E, Hajna Z, Kemeny A et al (2014) The selective PAC1 receptor agonist maxadilan inhibits neurogenic vasodilation and edema formation in the mouse skin. *Neuropharmacology* 85:538–547
- Bourgault S, Vaudry D, Botia B et al (2008) Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 29:919–932
- Chapter MC, White CM, DeRidder A et al (2010) Chemical modification of class II G protein-coupled receptor ligands: Frontiers in the development of peptide analogs as neuroendocrine pharmacological therapies. *Pharmacol Ther* 125:39–54
- Clason TA, Girard BM, May V, Parsons RL (2016) Activation of MEK/ERK signaling by PACAP in guinea pig cardiac neurons. *J Mol Neurosci* 59:309–316
- Cohen I, Rider P, Carmi Y et al (2010) Differential release of chromatin-bound IL-1 $\alpha$  discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2574–2579
- Couveineau A, Laburthe M (2012) VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol* 166:42–50
- D’Amico AG, Maugeri G, Reitano R et al (2015) PACAP modulates expression of hypoxia-inducible factors in streptozotocin-induced diabetic rat retina. *J Mol Neurosci* 57:501–509
- Danyadi B, Szabadfi K, Reglodi D et al (2014) PACAP application improves functional outcome of chronic retinal ischemic injury in rats—evidence from electroretinographic measurements. *J Mol Neurosci* 54:293–299
- Dejda A, Seaborn T, Bourgault S et al (2011) PACAP and a novel stable analog protect rat brain from ischemia: insight into the mechanisms of action. *Peptides* 32:1207–1216
- Dinarello CA (1994) The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 8:1314–1325
- Dinarello CA (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117:3720–3732
- Dreixler JC, Hemmert JW, Shenoy SK et al (2009) The role of Akt/protein kinase B subtypes in retinal ischemic preconditioning. *Exp Eye Res* 88:512–521
- Endo K, Nakamachi T, Seki T et al (2011) Neuroprotective effect of PACAP against NMDA-induced retinal damage in the mouse. *J Mol Neurosci* 43:22–29
- Farkas E, Luiten PGMM, Bari F (2007) Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 54:162–180
- Ghaly A, Marsh DR (2010) Ischaemia-reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. *Int J Exp Pathol* 91:244–255
- Grevelink SA, Osborne J, Loscalzo J, Lerner EA (1995) Vasorelaxant and second messenger effects of maxadilan. *J Pharmacol Exp Ther* 272:33–37
- Guilpin VO, Swardson-Oliver C, Nosbisch L, Titus RG (2002) Maxadilan, the vasodilator/immunomodulator from *Lutzomyia longipalpis* sand fly saliva, stimulates haematopoiesis in mice. *Parasite Immunol* 24:437–446
- Guo X, Yu R, Xu Y et al (2016) PAC1R agonist maxadilan enhances hADSC viability and neural differentiation potential. *J Cell Mol Med* 10:1–17
- Harmar AJ, Sheward WJ, Morrison CF et al (2004) Distribution of the VPAC 2 receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology* 145:1203–1210
- Hashimoto H (2002) Physiological significance of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the nervous system. *Yakugaku Zasshi* 122:1109–1121
- Hoover DB, Tompkins JD, Parsons RL (2009) Differential activation of guinea pig intrinsic cardiac neurons by the PAC1 agonists maxadilan and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 27 (PACAP27). *J Pharmacol Exp Ther* 331:197–203
- Horvath G, Racz B, Reglodi D et al (2010) Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci* 42:411–418
- Jackson TS, Lerner E, Weisbrod RM et al (1996) Vasodilatory properties of recombinant maxadilan. *Am J Phys* 271:H924–H930
- Jander S, Sitzer M, Schumann R et al (1998) Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization. *Stroke* 29:1625–1630
- Juhász T, Matta C, Katona E et al (2014) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) signalling enhances osteogenesis in UMR-106 cell line. *J Mol Neurosci* 54:555–573
- Juhász T, Helgadottir SL, Tamas A et al (2015) PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides* 66:51–57
- Junnarkar SP, Tapuria N, Mani A et al (2010) Attenuation of warm ischemia-reperfusion injury in the liver by buccillamine through decreased neutrophil activation and Bax/Bcl-2 modulation. *J Gastroenterol Hepatol* 25:1891–1899
- Kambe Y, Miyata A (2012) Role of mitochondrial activation in PACAP dependent neurite outgrowth. *J Mol Neurosci* 48:550–557
- Kanekar S, Gandham M, Lucero MT (2010) PACAP protects against TNF $\alpha$ -induced cell death in olfactory epithelium and olfactory placodal cell lines. *Mol Cell Neurosci* 45:345–354
- Krajcs N, Hernadi L, Pirger Z et al (2015) PACAP modulates acetylcholine-elicited contractions at nicotinic neuromuscular contacts of the land snail. *J Mol Neurosci* 57:492–500
- Kubrusly RCC, da Cunha MCC, de Reis RAM et al (2005) Expression of functional receptors and transmitter enzymes in cultured Muller cells. *Brain Res* 1038:141–149
- Kvarik T, Mammel B, Reglodi D et al (2016) PACAP is protective in a rat model of retinopathy of prematurity. *J Mol Neurosci* (in press)

- Lamacchia C, Rodriguez E, Palmer G, Gabay C (2013) Endogenous IL-1 $\alpha$  is a chromatin-associated protein in mouse macrophages. *Cytokine* 63:135–144
- Laszlo E, Varga A, Kovacs K et al (2015) Ischemia/reperfusion-induced kidney injury in heterozygous PACAP-deficient mice. *Transplant Proc* 47:2210–2215
- Lerner EA, Iuga AO, Reddy VB et al (2007) Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. *Peptides* 28:1651–1654
- Matsumoto M, Nakamachi T, Watanabe J et al (2016) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is involved in adult mouse hippocampal neurogenesis after stroke. *J Mol Neurosci* 59:270–279
- Mester L, Szabo A, Atlasz T et al (2009) Protection against chronic hypoperfusion-induced retinal neurodegeneration by PARP inhibition via activation of PI-3-kinase Akt pathway and suppression of JNK and p38 MAP kinases. *Neurotox Res* 16:68–76
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR et al (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567–574
- Moro O, Lerner EA (1997) Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem* 272:966–970
- Moro O, Tajima M, Lerner EA (1996) Receptors for the vasodilator maxadilan are expressed on selected neural crest and smooth muscle-derived cells. *Insect Biochem Mol Biol* 26:1019–1025
- Moro O, Wakita K, Ohnuma M et al (1999) Functional characterization of structural alterations in the sequence of the vasodilatory peptide maxadilan yields a pituitary adenylate cyclase-activating peptide type I receptor-specific antagonist. *J Biol Chem* 274:23103–23110
- Morris RV, Shoemaker CB, David JR et al (2001) Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* 167:5226–5230
- Nedvig K, Weber G, Nemeth J et al (2012) Changes of PACAP immunoreactivities and cytokine levels after PACAP-38 containing intestinal preservation and autotransplantation. *J Mol Neurosci* 48:788–794
- Njaine B, Martins RAP, Santiago MF et al (2010) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide controls the proliferation of retinal progenitor cells through downregulation of cyclin D1. *Eur J Neurosci* 32:311–321
- Ohnou T, Yokai M, Kurihara T et al (2016) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor signaling evokes long-lasting nociceptive behaviors through the activation of spinal astrocytes in mice. *J Pharmacol Sci* 130:194–203
- Padua D, Vu JP, Germano PM, Pisegna JR (2016) The role of neuropeptides in mouse models of colitis. *J Mol Neurosci* 59:203–210
- Ramos-Álvarez I, Mantey SA, Nakamura T et al (2015) A structure–function study of PACAP using conformationally restricted analogs: identification of PAC1 receptor-selective PACAP agonists. *Peptides* 66:26–42
- Reglodi D, Borzsei R, Bagoly T et al (2008) Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J Mol Neurosci* 36:270–278
- Reglodi D, Kiss P, Szabadi K et al (2012) PACAP is an endogenous protective factor—insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci* 48:482–492
- Reglodi D, Renaud J, Tamas A et al (2015) Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Prog Neurobiol* S0301-0082(15):00128–00128. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.10.004
- Robberecht P, Gourlet P, De Neef P et al (1992) Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. *Eur J Biochem* 207:239–246
- Scuderi S, D'Amico AG, Castorina A et al (2013) Ameliorative effect of PACAP and VIP against increased permeability in a model of outer blood retinal barrier dysfunction. *Peptides* 39:119–124
- Scuderi S, D'Amico AG, Federico C et al (2015) Different retinal expression patterns of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and their receptors in a rat model of type 1 STZ-induced diabetes. *J Mol Neurosci* 56:431–439
- Seki T, Shioda S, Ogino D et al (1997) Distribution and ultrastructural localization of a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett* 238:127–130
- Seki T, Izumi S, Shioda S et al (2000) Gene expression for PACAP receptor mRNA in the rat retina by in situ hybridization and in situ RT-PCR. *Ann N Y Acad Sci* 921:366–369
- Seki T, Hinohara Y, Taki C et al (2006) PACAP stimulates the release of interleukin-6 in cultured rat Müller cells. *Ann N Y Acad Sci* 1070:535–539
- Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Shioda S (2008) Suppression of ganglion cell death by PACAP following optic nerve transection in the rat. *J Mol Neurosci* 36:57–60
- Seki T, Itoh H, Nakamachi T et al (2011) Suppression of rat retinal ganglion cell death by PACAP following transient ischemia induced by high intraocular pressure. *J Mol Neurosci* 43:30–34
- Shioda S, Nakamachi T (2015) PACAP as a neuroprotective factor in ischemic neuronal injuries. *Peptides* 72:202–207
- Shioda S, Takenoya F, Wada N et al (2016) Pleiotropic and retinoprotective functions of PACAP. *Anat Sci Int* 91:313–324
- Shoge K, Mishima HK, Saitoh T et al (1998) Protective effects of vasoactive intestinal peptide against delayed glutamate neurotoxicity in cultured retina. *Brain Res* 809:127–136
- Silveira MS, Costa MR, Bozza M, Linden R (2002) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 277:16075–16080
- Soares MB, Titus RG, Shoemaker CB et al (1998) The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol* 160:1811–1816
- Sun L, Xu Y-W, Han J et al (2015) 12/15-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid activate PPAR $\gamma$ : a possible neuroprotective effect in ischemic brain. *J Lipid Res* 56:502–514
- Szabadi K, Atlasz T, Reglodi D et al (2009) Urocortin 2 protects against retinal degeneration following bilateral common carotid artery occlusion in the rat. *Neurosci Lett* 455:42–45
- Szabadi K, Mester L, Reglodi D et al (2010) Novel neuroprotective strategies in ischemic retinal lesions. *Int J Mol Sci* 11:544–561
- Szabadi K, Atlasz T, Kiss P et al (2012a) Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotox Res* 21:41–48
- Szabadi K, Danyadi B, Kiss P et al (2012b) Preconditioning with volatile anaesthetic sevoflurane in ischemic retinal lesion in rats. *J Mol Histol* 43:565–569
- Szabadi K, Reglodi D, Szabo A et al (2016) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, a potential therapeutic agent for diabetic retinopathy in rats: focus on the vertical information processing pathway. *Neurotox Res* 29:432–446
- Szabo A, Danyadi B, Bognar E et al (2012) Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neurosci Lett* 523:93–98
- Tamas A, Javorhazy A, Reglodi D et al (2016) Examination of PACAP-like immunoreactivity in urogenital tumor samples. *J Mol Neurosci* 59:177–183
- Toker E, Kazakoğlu H, Sahin S (1998) Cell adhesion molecules in subretinal fluid: soluble forms of VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) and L-selectin. *Int Ophthalmol* 22:71–76

- Tunçel N, Başmak H, Uzuner K et al (1996) Protection of rat retina from ischemia-reperfusion injury by vasoactive intestinal peptide (VIP): the effect of VIP on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity of retina and choroid. *Ann N Y Acad Sci* 805:489–498
- Uchida D, Tatsuno I, Tanaka T et al (1998) Maxadilan is a specific agonist and its deleted peptide (M65) is a specific antagonist for PACAP type 1 receptor. *Ann N Y Acad Sci* 865:253–258
- Vollmar B, Menger MD (2011) Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbeck's Arch Surg* 396:13–29
- Vu JP, Larauche M, Flores M et al (2015) Regulation of appetite, body composition, and metabolic hormones by vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *J Mol Neurosci* 56:377–387
- Werling D, Reglodi D, Kiss P et al (2014) Investigation of PACAP fragments and related peptides in chronic retinal hypoperfusion. *J Ophthalmol* 2014:1–7
- Wojcieszak J, Zawilska JB (2014) PACAP38 and PACAP6-38 exert cytotoxic activity against human retinoblastoma Y79 cells. *J Mol Neurosci* 54:463–468
- Yoshida A, Yoshida S, Hata Y et al (1998) The role of NF-kappaB in retinal neovascularization in the rat. Possible involvement of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC), a member of the interleukin-8 family. *J Histochem Cytochem* 46:429–436

## RESEARCH ARTICLE

# Protective Role of Endogenous PACAP in Inflammation-induced Retinal Degeneration

Alexandra Vaczy<sup>a</sup>, Petra Kovari<sup>a</sup>, Krisztina Kovacs<sup>b</sup>, Kinga Farkas<sup>a</sup>, Edina Szabo<sup>a</sup>, Timea Kvarik<sup>a</sup>, Bela Kocsis<sup>c</sup>, Balazs Fulop<sup>a</sup>, Tamas Atlasz<sup>\*,a,d,e,#</sup> and Dora Reglodi<sup>a,#</sup>

<sup>a</sup>Department of Anatomy, MTA-PTE PACAP Research Team, University of Pecs, Medical School, Pecs, Hungary; <sup>b</sup>Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pecs, Medical School, Pecs, Hungary; <sup>c</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Pecs, Medical School, Pecs, Hungary; <sup>d</sup>Department of Sportbiology; University of Pecs, Pecs, Hungary; <sup>e</sup>Janos Szentagothai Research Center, University of Pecs, Pecs, Hungary

**Abstract: Purpose:** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a neuroprotective peptide that has been shown to exert protective effects in different models of neurodegenerative diseases, including retinal degenerations. Data obtained from PACAP-deficient (PACAP KO) mice provide evidence that endogenous PACAP has a neuroprotective role in different pathologies. PACAP KO mice show enhanced sensitivity to different insults, such as oxidative stress, hypoxia and inflammation. The aim of the present study was to investigate the protective effects of endogenous PACAP in retinal inflammation.

**Methods:** Endotoxin-induced eye inflammation was induced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) in PACAP KO and wild-type (Wt) mice. After LPS treatment, retinas were processed for histological examination. To detect the alterations of different proteins and cytokines, immunohistochemical, western blot and cytokine array were used. We also performed dark-adapted electroretinography (ERG) to detect the functional differences.

**Results:** The thickness of nearly all layers was significantly less in LPS-injected PACAP KO mice compared to Wt animals. Increased expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was induced in Müller glial cells after LPS treatment, which was more intense in PACAP KO mice. The levels of pAkt and pGSK were decreased in PACAP KO group during inflammation. LPS treatment significantly increased cytokines (sICAM-1, JE, TIMP-1) in both treated groups, but it was more expressed in PACAP KO animals. Furthermore, ERG responses were disturbed after LPS injection in PACAP KO mice.

**Conclusion:** Our results showed that endogenous PACAP has a protective role in LPS-caused retinal inflammation.

## ARTICLE HISTORY

Received: July 5, 2018  
Accepted: September 18, 2018

DOI:  
10.2174/1381612824666180924141407

**Keywords:** Retina, PACAP, knock out, LPS, inflammation, neuroprotection.

## 1. INTRODUCTION

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is the most conserved member of the vasoactive intestinal peptide (VIP)/PACAP/glucagon superfamily [1-4]. Since its discovery in 1989 by Miyata and co-workers [5] in the hypothalamus, numerous functions have been attributed to PACAP in addition to its adenylate cyclase activation in pituitary cells. Five years after the peptide isolation, Arimura and co-workers [6] published its neurotrophic and neuroprotective effects. PACAP is now considered to be a potent neuroprotective and cytoprotective peptide with potential therapeutic use in numerous diseases [7-13]. The neuroprotective effects of PACAP have been shown in several different cell types *in vitro* against various toxic agents, such as oxidative stress, glutamate or 6-hydroxydopamine [14-16]. *In vivo* descriptions have also proven that PACAP is protective in global and focal cerebral ischemia [15, 17, 18], traumatic brain injury and neurodegenerative diseases [19, 20]. PACAP also has cytoprotective effects in different non-neuronal cells, such as endothelial cells, intestinal cells or pinealocytes [11, 16, 21, 22].

The important role of PACAP as a modulator in immunity has long been recognized in acute and chronic inflammatory conditions

[4, 23-25]. Kong and coworkers found that lipopolysaccharide (LPS)-induced release of nitric oxide and lactate dehydrogenase into the culture medium, indicative of cell injury, was decreased by PACAP and the protective effects were blocked by the potent PACAP antagonist, PACAP6-38 [26]. Using neuron-glia cultures, Yang and colleagues showed that PACAP38 and PACAP27 were neuroprotective against LPS-induced dopaminergic neurotoxicity [27]. Moreover, PACAP dose-dependently attenuated the LPS-caused inflammation in dopaminergic cells, reducing caspase activation and increasing BDNF expression as well as CREB phosphorylation [28]. Similarly, several studies have shown the neuroprotective roles of PACAP in the retina [29]. Protective actions of PACAP have been proven in different pathological conditions, such as excitotoxic retinal injury [30, 31], diabetic retinopathy [32-34], UV-A light-induced degeneration [35], ischemic damages [36, 37] and oxygen-induced retinopathy [38]. PACAP is upregulated upon numerous harmful stimuli, supporting its endogenous protective effects in restorative processes [11]. As it has been shown in numerous models, PACAP knock out (KO) mice are more vulnerable to different types of injuries, from hypoxia to oxidative stress, compared to wild-type (Wt) mice [39-41]. PACAP KO mice had significantly greater retinal damage in ischemia compared to Wt mice [42]. Furthermore, several degenerative changes were observed at an earlier age in PACAP KO mice retina [43].

All these above results indicate the function of endogenous PACAP as a stress-response peptide that is necessary for endoge-

\*Address correspondence to this author at the Department of Sportbiology, University of Pecs, Pecs, H-7624 Ifjusag str. 6, Hungary Tel: +36 72 536000; Fax: +36 72 536393; E-mail: attam@gamma.ttk.pte.hu

<sup>#</sup>These authors contributed equally to the present work.

nous protection against different retinal insults, however, the possible protective role of endogenous PACAP in retinal inflammation is yet unclear. The aim of the present study, using morphological, immunological, biochemical and functional techniques, was to investigate the protective and anti-inflammatory effects of endogenous PACAP in PACAP KO- and Wt mice in LPS-induced retinal inflammation.

## 2. METHODS

### 2.1. Animals

Adult male three-month-old (CD1 strain) Wt and PACAP KO mice (n=100 in 4 groups) were used in the experiments. Generation and maintenance of PACAP KO mice with a CD1 background were previously described [44]. Animals were backcrossed for ten generations with the CD1 strain, all were genotyped with PCR and only homozygous knock out mice were used to the experiments. Mice were maintained in a temperature- and humidity-controlled room under 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All animal protocols were approved by the institutional ethical guidelines (permission number: BA02/2000-38/2017).

### 2.2. LPS Treatment

Mice (n=50) received a single intraperitoneal injection of 6.0 mg/kg body weight of LPS from *Escherichia coli* in phosphate-buffered saline (PBS). Control groups (n=50) were injected PBS intraperitoneally. Mice were killed and investigated 24 h after injections. This time point was chosen for immunohistochemical, cytokine array, western blot and ERG analyses, as most of the pathological changes in the retina were detectable at this time-point. The morphological changes of the retina were measured on the 14<sup>th</sup> day after injections.

### 2.3. Histological Analysis

Mice were anesthetized with isoflurane and sacrificed 14 days after LPS treatment (n=6 animals/ each condition). Both eyes were removed and dissected in 0.1 M PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) dissolved in 0.1 M phosphate buffer (PB) (Sigma, Budapest, Hungary). Eye-cup tissues were embedded in resin (Durcupan ACM resin, Fluka, Switzerland). Retinas were cut at 2  $\mu$ m and stained with toluidine blue (Sigma, Budapest, Hungary). Sections mounted in DPX medium (Sigma, Budapest, Hungary) and examined in a Nikon Eclipse 80i microscope, measured with the Q-Capture Pro7 program (Q-Imaging, USA). Central retinal areas within 2 mm from the optic nerve were used for measurements (n=5 measurements from one tissue block and the blocks were compared). Images were further processed with Adobe Photoshop CS6 program. The following parameters were measured: (i) retinal cross-section between the outer and inner limiting membranes (OLM-ILM), as well as (ii) the width of individual retinal layers (ONL, INL, OPL, IPL).

### 2.4. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Immunohistochemistry in Müller Cells

Animals were sacrificed 24 h after LPS or vehicle (PBS) injections (n=5 animals/each condition). Immunohistochemistry was performed following the procedure described previously [36]. For measurement of glial fibrillary acidic protein (GFAP) activity in the Müller glial cells, eyes were dissected in ice-cold PBS and post-fixed in 4% PFA dissolved in 0.1 M PB (pH 7.4) for 4h at room temperature. Tissues were washed in 0.1 M PB, followed by dehydration procedures with graded sucrose solutions (2 h in 10%, 20% and overnight in 30%; Sigma, Budapest, Hungary) at 4 °C. The eyecups were vertically sectioned in tissue freezing medium (Cryomatrix, Shandon, USA) at 16  $\mu$ m thickness on a freezing microtome (Leica, Nussloch, Germany). Sections were collected on chrome-alum-gelatin-coated slides and stored at -20 °C until use then samples were rinsed in PBS, permeabilized with 0.1% Triton

X-100 (Sigma, Budapest, Hungary), and incubated in PBS containing 3% normal donkey serum and 0.1% Na-azide for 1 h to block the nonspecific binding sites. The samples were incubated with polyclonal antibodies against anti-GFAP (1:0000, Sigma, Budapest, Hungary) antibody at 4°C overnight. On the following day, the appropriate second fluorescent anti-rabbit antibody Alexa Fluor 488 (donkey anti-rabbit, 1:200, Life Technologies, Budapest, Hungary) was added in a dark room for 2 h. After washing, propidium iodide (PI, 1:500, Sigma, Budapest, Hungary) was used to detect the nuclear components. Preparations were mounted with Fluoroshield (Sigma, Budapest, Hungary) and detected by a fluorescent microscope (Nikon Eclipse 80i). Central retinal areas were used for immunohistochemical analysis. All images were further analyzed under masked conditions using Adobe Photoshop CS6 program and ImageJ software (NIH). Photographs were transferred into grayscale, the background was subtracted and upper and lower thresholds were set. The percentage of GFAP labeled area was measured in each picture using an ImageJ macro (NIH).

### 2.5. Cytokine Array Analysis

One day after the administration of LPS (n=4 animals/ each condition), retinas were dissected and kept at -80 °C until tested. Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, Panel A from R&D System (Biomedica, Budapest, Hungary) was used for the analysis. The array is based on antibodies binding with nitrocellulose membranes and it was performed as described by the manufacturer. Samples were pooled and homogenized in PBS with protease inhibitors. After homogenization, Triton X-100 was added to a final concentration of 1%. The nitrocellulose membranes were blocked and incubated with reconstituted detection antibody cocktail. Membranes were incubated overnight with 400  $\mu$ g protein containing homogenates. After washing and streptavidin-horseradish peroxidase in addition to the membranes, plates were spread to a chemiluminescent detection reagent (Amersham Biosciences, Hungary). Developed films were scanned and the mean intensities of the dot blots of the different cytokines were calculated by ImageJ software (NIH).

### 2.6. Western Blot Measurements

For western blot experiments, retinas were removed 24 h after LPS injection (n=4 animals/ each condition) and stored at -80 °C until analysis. Samples were processed for western blot as described earlier [45]. Frozen tissues were homogenized (50 mM TRIS, 50 mM EDTA, 50 mM sodium metavanadate, 0.5% protease inhibitor cocktail, 0.5% phosphatase inhibitor cocktail, pH = 7.4) and 300  $\mu$ g protein concentration was determined with a DC™ Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Membranes were probed overnight at 4 °C with the primary antibodies: phospho-specific anti-Akt-1 Ser473 (pAkt; 1:1000; R&D Systems, Hungary), phospho-specific glycogen synthase kinase-3 $\beta$  Ser9 (pGSK; 1:1000; Cell Signaling Technology, Beverly, USA). Non-phosphorylated total-Akt (tAkt; 1:1000) antibody was used as an internal control as described by Pitre *et al.* [46]. Membranes were washed six times for 5 min in Tris-buffered saline (pH = 7.5) containing 0.2% Tween prior to addition of goat anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000; BioRad, Hungary). The antibody-antigen complexes were visualized by means of enhanced chemiluminescence. For quantification of blots, band intensities were quantified by NIH ImageJ program.

### 2.7. Electroretinography

Scotopic ERGs were performed to assess retinal function in Wt- and PACAP KO groups. ERG flashes were recorded before LPS treatment and 24 h after LPS-induced inflammation (n=6 animals/ each condition). Mice were dark adapted for at least 12 h and prepared under dim red illumination (632 nm) [47], anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine 5% (w/v, Calypsol, Richter



Gedeon, Hungary, 90 mg/ BW kg) and xylazine 20% (w/v, Sedaxylan, Dechra, Netherlands, 10 mg/BW kg) [48]. Mice were placed on a heating pad throughout the experiment and pupils were dilated with one drop of 1% homatropine (w/v, Humapent- Teva, Hungary). ERGs were recorded by surface electrodes from the center of the cornea [49, 50]. The reference electrode was placed subcutaneously between the eyes, and the ground electrode was used subcutaneously under the skin of the back. The light pulses intensity (5cd s/m<sup>2</sup>, 0.25 Hz, 503 nm green LED light) was preamplified, amplified (2.000×, Bioamp SbA4-V6, Supertech, Hungary) and recorded with an A/D converter (Ratsoft-Solar Electronic) [51, 52]. Responses (n=50/eye) were averaged with Ratsoft software. The graphs were analyzed with OriginPro 2016 (Macasoft, Hungary). The following parameters were measured: amplitude of the a-wave (from baseline to the trough of the a-wave), amplitude of the b-wave (from the trough of the a-wave to the peak of the b-wave).

### 2.8. Data analysis

Data are expressed as mean ± standard error (SEM). Data were analyzed using Kolmogorov-Smirnov normality test followed by ANOVA test and Fisher LSD's post hoc analysis (OriginPro 2016, Macasoft, Hungary). Significant differences were considered at p-values below 0.05.

## 3. RESULTS

### 3.1. Effects of LPS Treatment on Histological Changes of the Retina

No differences were observed between the control retinas of Wt (Fig. 1 A) and PACAP KO mice (Fig. 1 B). Wt retinas in the LPS-treated group (Fig. 1 C) did not show remarkable differences (except in INL layer; Fig. 2 B) compared to control groups (Fig. 1 A, B). Retinal layers in LPS-treated PACAP KO group (Fig. 1 D) showed signs of severe degeneration compared to PBS-treated controls (Fig. 1 A, B) and the LPS-treated Wt (Fig. 1 C) groups.

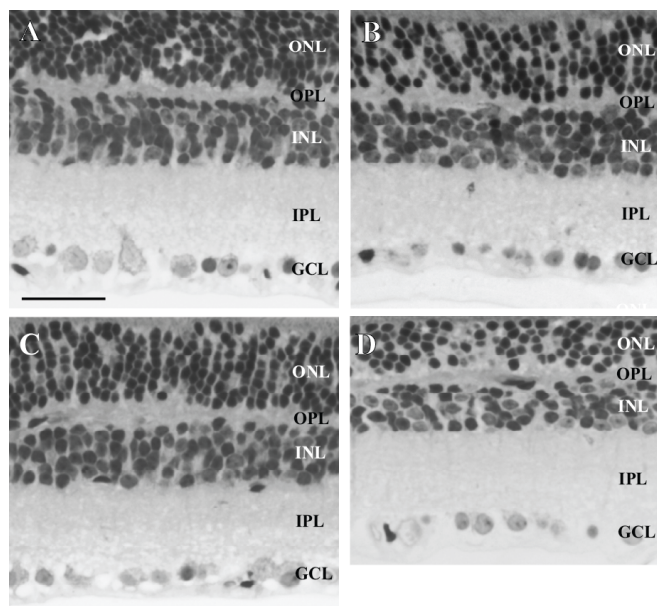
In LPS-treated KO animals, all retinal layers were significantly thinner than in the control and LPS-treated Wt groups (Fig. 2 A, B). The marked reduction was observed in the ONL, but significant changes were also found in the INL, OPL and IPL. We found a severe reduction of the whole retinal thickness between OLM-ILM in this group (Fig. 1 D, Fig. 2 A, B).

### 3.2. Analysis of Glial Fibrillary Acidic Protein in Müller Glial Cells

Under control conditions, the retinas did not show any remarkable immunofluorescent changes in either vehicle-treated Wt or PACAP KO groups (Fig. 3 A, B, E). GFAP was markedly upregulated following LPS treatment in the retinas of Wt and PACAP KO mice (Fig. 3 C, D, E). Expression was more intense in the entire cell from the OLM to ILM in LPS-treated PACAP KO animals compared to the LPS-injected Wt mice (Fig. 3 C, D, E).

### 3.3. Effects of LPS Treatment on Cytokine Expression Profile of the Retina

The expression level of several cytokines was increased after LPS treatment (Fig. 4). The activation of sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1), TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1) and JE (monocyte chemoattractant protein-1) was increased in the retinas that underwent LPS inflammation compared to control groups (Fig. 4). The expression level of these three cytokines was significantly stronger in the LPS-treated PACAP KO group compared to the LPS-injected Wt group (Fig. 4). Other spots, where no significant changes were observed are (from upper left corner, without numbers): BCL, C5/C5a, G-CSF, GM-CSF, I-309, Eotaxin, IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-12p70, IL-16, IL-17, IL-23, IL-27, IP-10, I-TAC, KC, M-CSF, MCP-5, MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, RANTES, SDF-1, TARC, TNF-α, TERM-1.



**Fig. (1).** (A–D) Light microphotographs showing toluidine blue-stained representative retinal sections (2 μm). The retinal damage is shown by the width of retinal layers and cell profiles. (A) Control Wt retina, treated with intraperitoneal PBS. (B) Control PACAP KO retina, treated with intraperitoneal PBS. (C) Wt + intraperitoneal LPS and (D) PACAP KO + intraperitoneal LPS treatment. LPS-induced retinal degeneration showed more apparent damage in PACAP KO group compared to the treated Wt and control groups. Abbreviations: Wt: wild type; PACAP KO: PACAP knock out; LPS: lipopolysaccharide; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer. (scale bar: 30 μm)

### 3.4. Western Blot Analysis

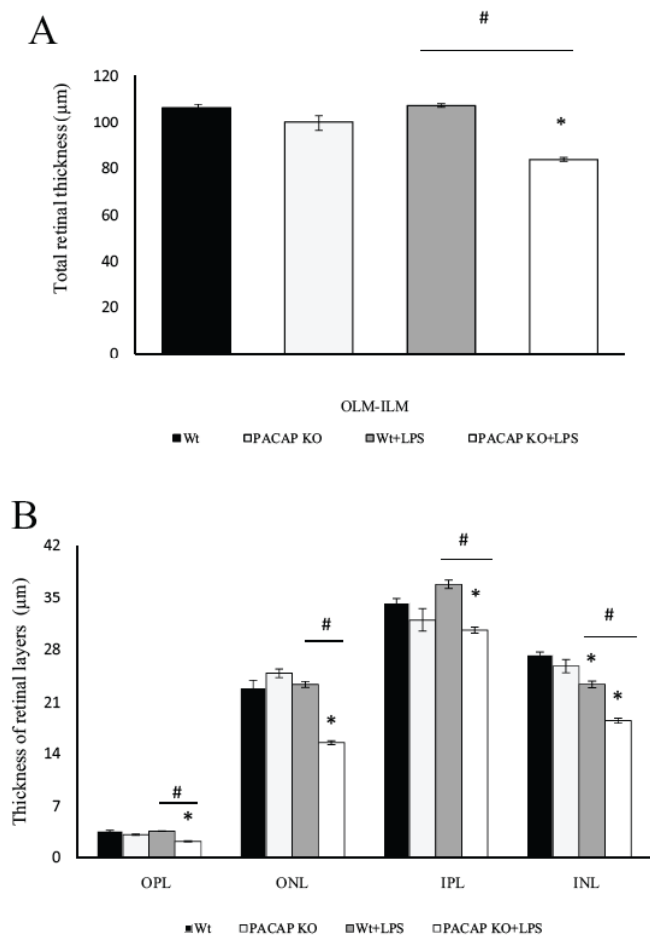
No differences were detected between the control groups, however, marked alterations were observed in retinas 24h after LPS injection (Fig. 5). Inflammation itself induced a decreased pAkt expression, which was more severe in the LPS-treated PACAP KO group compared to the LPS-injected Wt group (Fig. 5 A, B). Similar changes were observed in the glycogen synthase kinase (GSK)-3, the downstream target of Akt (Fig. 5 A, C).

### 3.5. Protective Effect of Endogenous PACAP on Visual Responses After Retinal Inflammation

Representative ERG was recorded 12h after dark adaptation (Fig. 6 A, B). In control situations, ERG waveforms were similar in Wt and PACAP KO mice (Fig. 6 A). Luminance-responses were reduced 24h after inflammation in both LPS-treated groups, but responses were more preserved in the Wt animals compared to the PACAP KO mice (Fig. 6 B). Amplitudes of a-wave and b-wave were significantly decreased after inflammation, but those changes were more severe in the LPS-treated PACAP KO group (Fig. 6 C, D). The latency of a/b waves was significantly decreased in both treated groups compared to their controls, but no differences could be observed between the LPS-treated Wt and PACAP KO mice (data not shown).

## 4. DISCUSSION

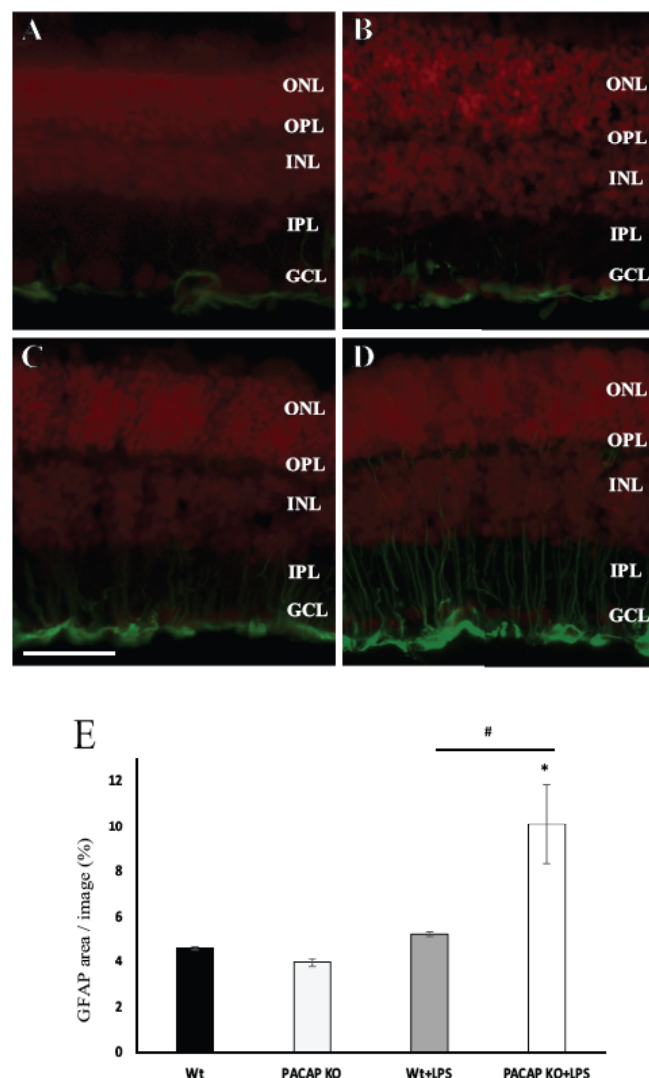
The neuropeptide PACAP exerts anti-inflammatory and protective effects in several organs, such as brain, immune system and eye. In the present study, we showed, for the first time, that endogenous PACAP is protective in LPS-induced ocular inflammation in the retina using PACAP KO mice. Based on our results, no



**Fig. (2).** (A) Cross section of the retina from the outer limiting membrane to the inner limiting membrane (OLM-ILM) and (B) quantitative comparison of the different retinal layers. ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared to the control Wt retinas; # $p < 0.05$  compared to LPS-treated retinas. Abbreviations: Wt: wild type; PACAP KO: PACAP knock out; LPS: lipopolysaccharide; OLM-ILM: whole retina thickness; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer.

major differences were found in the histological structure, cytokine expressions, or in visual function between the retinas of Wt and PACAP KO mice under normal conditions, whereas we detected several differences during inflammation. Earlier studies have proven that exogenously applied PACAP is retinoprotective in excitotoxic injury induced by glutamate [53, 54], N-methyl-D-aspartate (NMDA) [55], kainate [56], hypoperfusion-induced degeneration after carotid artery ligation [36, 37], UV-A light radiation [35], optic nerve transection [57], and streptozotocin-induced diabetic damages in the retina [33], as well as in retinopathy of prematurity [38].

Numerous studies have proven that endogenous PACAP plays an important role in several physiological functions such as regulation of body temperature [58] and fertility [59-61]. Furthermore, PACAP KO mice display behavioral abnormalities, altered pain and inflammatory reactions [44, 62-66]. Endogenous PACAP suppresses dry eye signs by regulation of tear secretion [67] and protects the retina during ischemia [42]. However, the role of endogenous PACAP in the LPS-induced retinal inflammation had not been tested yet.

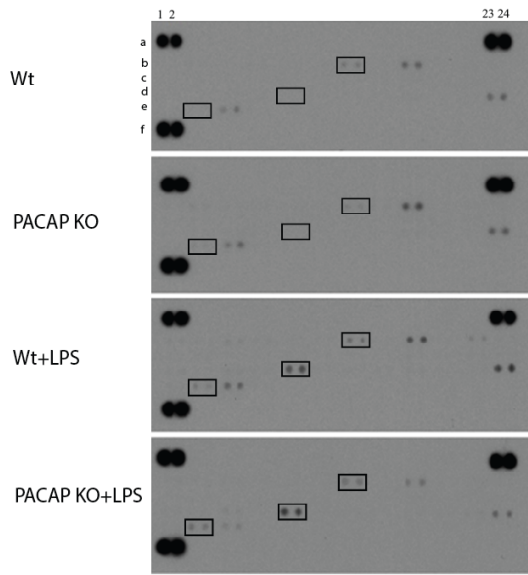


**Fig. (3).** Representative vertical retinal sections stained by GFAP antibody showing the effect of LPS in control Wt (A), control PACAP KO (B) retina and LPS-treated Wt (C) and LPS-injected PACAP KO (D) sample. PI (red) was used to detect the nuclear components. GFAP-immunoreactivity (green) was restricted only to the GCL and nerve fiber layer in control conditions (A, B). Retinal degeneration induced by LPS showed strong upregulation of immunoreactivity (C, D). GFAP immunopositivity was stretched into IPL, INL and OPL layers in LPS-treated PACAP KO retina (D). Quantitative comparison of GFAP immunoreactivity in control Wt, control PACAP KO retinas and LPS-treated Wt and LPS-injected PACAP KO samples (E). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared to the control Wt retinas; # $p < 0.05$  compared to LPS-treated Wt retinas; Abbreviations: Wt: wild type; PACAP KO: PACAP knock out; LPS: lipopolysaccharide; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; PI: propidium iodide; GFAP: glial fibrillary acidic protein. (scale bar: 30  $\mu$ m)

In our present study, we detected dramatic changes of the retinal layers after LPS-induced inflammation in the PACAP KO groups compared to the Wt ones. These findings correlated with results of other research groups, where PACAP KO mice showed increased severe retinal abnormalities in aging or ischemia [42, 43].

We showed an irregularity in Müller glial cells during LPS-induced inflammation, which was more intense in the PACAP KO group. The decreased uptake of GABA and glutamate results in

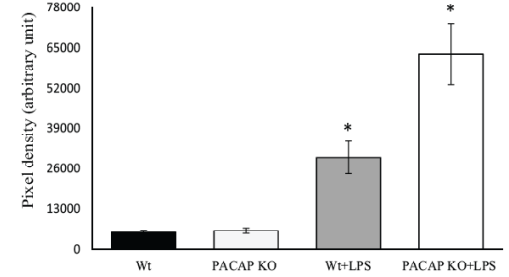
**A**



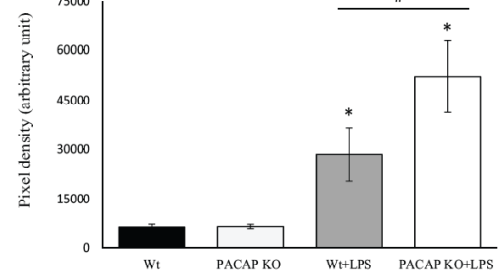
**B**

	1;2	3;4	5;6	7;8	9;10	11;12	13;14	15;16	17;18	19;20	21;22	23;24
a	Reference											Reference
b	BLC	CS/CSa	G-CSF	GM-CSF	I-309	Eotaxin	s-Icam1	IFN-γ	IL-1a	IL-1b	IL-1ra	IL-2
c	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-13	IL-12 p70	IL-16	IL-17	IL-23	IL-27
d	IP-10	I-TAC	KC	M-CSF	JE	MCP-5	MIG	MIP-1a	MIP-1b	MIP-2	RANTES	SDF-1
e	TARC	TIMP-1	TNF-α	TREM-1								
f	Reference											Neg. Control

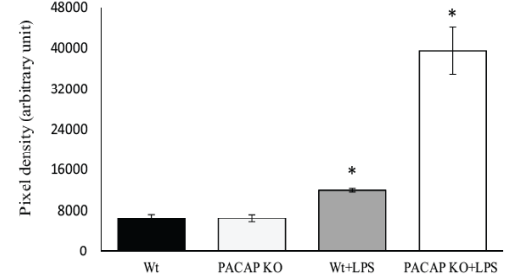
**C**



**D**

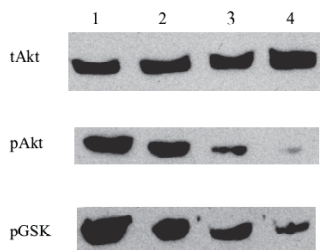


**E**

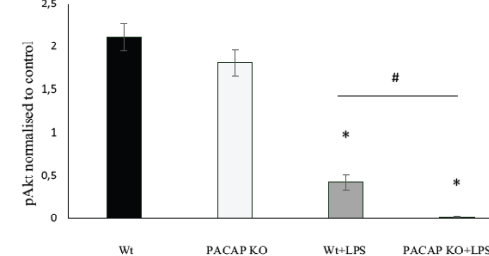


**Fig. (4).** (A) Representative panels show cytokine arrays from homogenates of control Wt, PACAP KO samples, LPS-treated Wt, and PACAP KO retinas. The panels show the examined cytokines in each box, highlighting changes after LPS-treatment. (B) The table indicates the examined cytokines in each box, highlighting changes after LPS-treatment. (C, D, E). Quantification of cytokine levels of control Wt, PACAP KO, LPS-injected Wt, and PACAP KO groups. Each cytokine was measured by Protein Array Analyzer for ImageJ. (C) TIMP-1, (D) sICAM-1 and (E) JE demonstrate the effects of LPS-induced retinal inflammation. Graph values are given as means ± SEM. \**p* < 0.05 compared to control Wt retinas; #*p* < 0.05 compared to LPS-treated Wt samples. Abbreviations: Wt: wild type; PACAP KO: PACAP knock out; LPS: lipopolysaccharide; TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinase-1; sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1; JE: mouse monocyte chemoattractant protein-1.

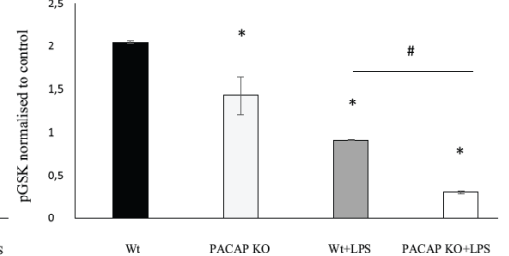
**A**



**B**



**C**

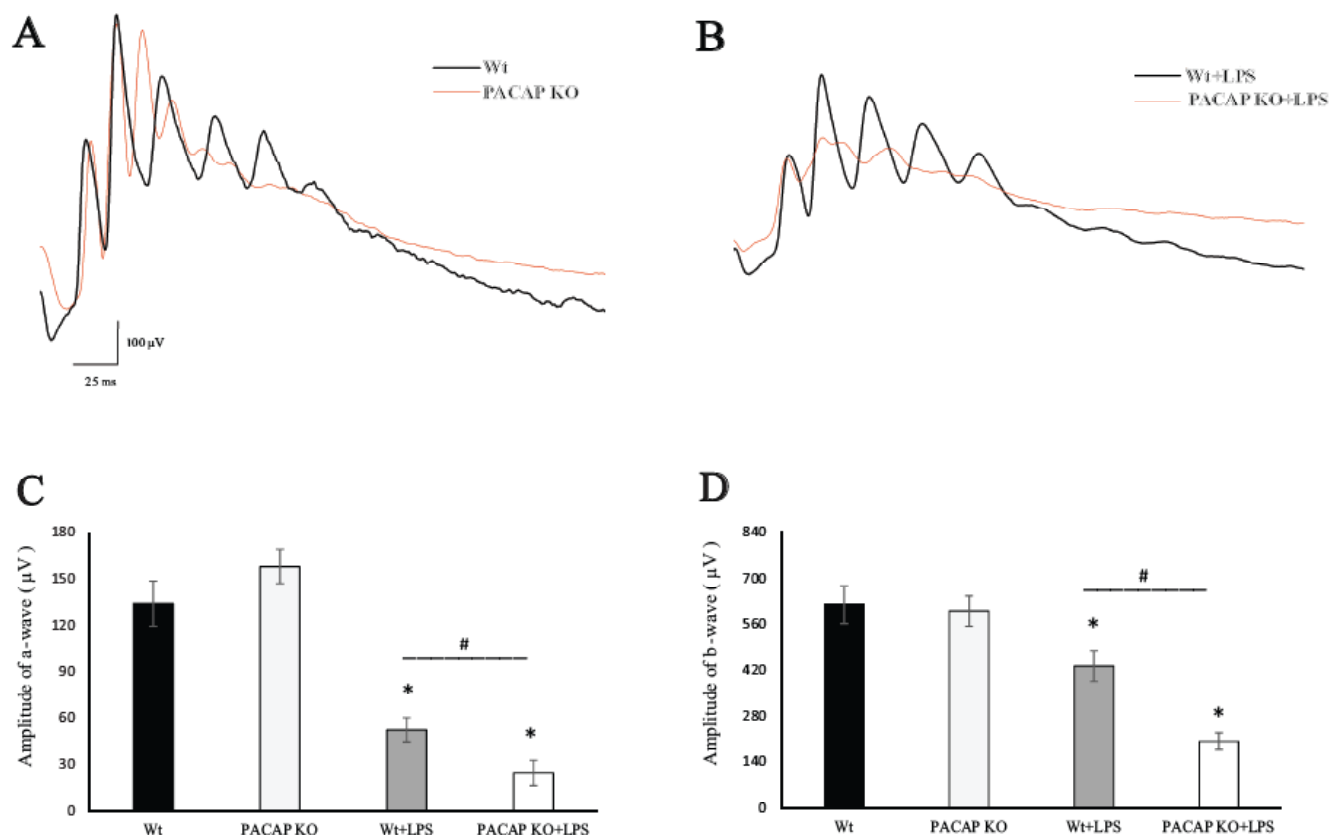


**Fig. (5).** (A) Representative panels show the results of western blot analysis (1-Wt, 2-PACAP KO, 3-LPS+Wt, 4-LPS+PACAP KO samples). (B) pAkt and (C) pGSK levels in control Wt, PACAP KO and LPS+Wt, LPS+PACAP KO retinas. tAkt was used as control for pAkt and pGSK. Data are given as mean ± SEM. \**p* < 0.05 compared to control Wt retinas; #*p* < 0.05 compared to LPS-treated Wt samples. Statistical analysis of protein levels was measured by ImageJ software. Abbreviations: Wt: wild type; PACAP KO: PACAP knock out; LPS: lipopolysaccharide; pAkt: phosphorylation of Akt; pGSK: phosphorylation of GSK; tAkt: total Akt.

accumulations of these proteins and causes abnormalities in the retinal neurons [68-72]. PACAP is retinoprotective on Müller glial

cells and stimulates the release of interleukin-6, which has been confirmed in ischemic and excitotoxic brain lesions [73-75].





**Fig. (6).** Representative panels show ERG responses after 24h of dark adaptation. (A) ERG response was similar in Wt and PACAP KO mice under healthy condition. (B) Abnormalities were detected during inflammation in both treated groups. ERG recording of LPS-injected PACAP KO mice was more reduced compared to the LPS+ Wt. (C) Comparative analysis of the average amplitudes of a-waves and (D) b-waves. The wave amplitudes were significantly altered during inflammation which were more severe in LPS+PACAP KO group. Data are given as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared to control Wt retinas; # $p < 0.05$  compared to LPS-treated Wt samples. Abbreviations: Wt: wild type; PACAP KO: PACAP knock out; LPS: lipopolysaccharide.

In our study, retinal inflammation-induced changes in several cytokines (TIMP-1, sICAM-1 and JE regulatory proteins). Members of the TIMP family play an important role in cell proliferation and apoptosis and they also have an inhibitory effect on matrix metalloproteinases (MMPs), which are able to degrade the extracellular matrix [76]. During inflammatory events, the transcription of MMPs inhibitor TIMP-1 is induced by pro-inflammatory mediators [77]. In our experiment, TIMP-1 level showed a strong activation 24h after the LPS treatment in both treated groups but was more severe in the PACAP KO mice. Our present findings are in accordance with earlier studies, where increased expression of TIMP-1 was associated with many pathological conditions, such as diabetic nephropathy [78], ischemia-induced kidney injury [79], mesenteric ischemia [77], glaucoma [80] or ischemic retinopathy [45]. Furthermore, exogenously administered PACAP attenuated the activation of TIMP-1 expression in diabetes-induced nephropathy [78], ischemia-induced kidney damage [79], small bowel [77, 81] and retinal injury [36]. In the present study, sICAM-1 activation was detectable in PACAP KO mice in inflammation. Upregulation of sICAM-1 is enhanced by inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and it produces pro-inflammatory effects such as recruited leukocytes into the site of the inflammation [82, 83]. High concentrations of sICAM-1 are described in patients in vitreoretinopathy [84, 85], in uveitis [86] or in sickle cell retinopathy [87]. Increased expression of sICAM-1 was also observed in ischemia/reperfusion (I/R)-induced injury in several organs, and PACAP treatment partially or totally blocked this cytokine [45, 77, 78, 88].

The monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) is a member of the C-C chemokine family and a potent chemotactic factor for monocytes [89]. MCP-1 is identical to JE in mice, where the upregulation of this cytokine has been implicated in a number of acute and chronic inflammatory diseases, such as atherosclerosis [90], glomerulonephritis [91], diabetic retinopathy [92], Eales' Disease [93], ischemic retinopathy [94] or LPS-induced uveitis [95]. An elevated level of this cytokine was observed in several models such as hypoxia-induced injury in the kidney [88] or acute ileitis [96], where exogenous PACAP administration ameliorates acute inflammation in the above-mentioned diseases. Akt is a kinase downstream phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), it is an important molecule that promotes cell survival in response to extracellular signals such as retinal ischemia [36, 45, 97, 98]. GSK-3 acts downstream of PI3K pathway/Akt and is involved in regulation of inflammation [99]. Inhibition of Akt activation by harmful stimuli, such as LPS-induced inflammation, prevents the inhibitory phosphorylation of GSK-3, promotes its kinase activity and increases the degree of organic injury [100]. Consistent with results generated from other studies, our observation showed a decreased level of phosphorylated Akt and GSK during LPS-induced inflammation [101-103]. In the PACAP KO animals, we detected slightly lower levels of pGSK. The reason for this phenomenon might be that exogenously applied PACAP induces pGSK [104] and thus the lack of endogenous PACAP results in lower baseline levels in untreated PACAP KO mice. The reduction of pAKT and pGSK was more severe in the LPS-treated PACAP KO group. This study tested the hypothesis that endogenous PACAP plays an anti-inflammatory

role in LPS-induced retinal damage through preservation of PI3K/Akt functional activity. Previous studies have shown the functional protective effects of exogenously applied PACAP in different kinds of retinal injuries, like excitotoxicity [105] or ischemia [48]. Response of the retina to harmful stimuli is measured by ERG, where an a-wave (initial negative deflection) followed by a b-wave (positive deflection) can be distinguished. The a-wave is produced by the photoreceptors, while the b-wave is produced mainly by ON-bipolar neurons, and also from amacrine, ganglion and Müller glial cells [106]. Similarly to earlier studies [68, 107], we demonstrated severe disturbance of visual function in the inflamed retinas by ERG. Endogenous PACAP successfully prevented pathologic changes, prevented the a-wave amplitude of ERG, thus protecting the photoreceptor cell function in LPS-induced retinal inflammation. The malfunction of Müller glial cells involved in the decreased responses of b-wave in ERG, which was also preserved in the presence of endogenous peptide.

Our findings further suggest that endogenous PACAP represents an important part of the natural defense mechanism against retinal inflammation.

#### CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

#### CONFLICT OF INTEREST

**Alexandra Vaczy:** No conflict of interest, **Petra Kovari:** No conflict of interest, **Krisztina Kovacs:** No conflict of interest, **Kinga Farkas:** No conflict of interest, **Edina Szabo:** No conflict of interest, **Tímea Kvarik:** No conflict of interest, **Bela Kocsis:** No conflict of interest, **Balazs Fulop:** No conflict of interest, **Tamas Atlasz:** No conflict of interest and **Dora Reglodi:** No conflict of interest

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by NKFIH FK129190 (Budapest, Hungary) to T.A., NAP 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 (Budapest, Hungary) to D.R., Bolyai Scholarship (MTA, Budapest, Hungary) to T.A., GINOP-2.3.2-15-2016-00050 "PEPSYS" (Budapest, Hungary) to D.R., MTA-TKI 14016 (Budapest, Hungary) to D.R., EFOP-3.6.3-VEKOP-16-15 2017-00008 "The role of neuro-inflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics" (Budapest, Hungary) to D.R., EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 (Budapest, Hungary) to D.R., EFOP-3.6.1.-16-2016-00004 Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs (Budapest, Hungary) to D.R., UNKP-18-4 (Budapest, Hungary) to T.A., UNKP-18-2 (Budapest, Hungary) to P.K., UNKP-16-4 (Budapest, Hungary) to T.A., UNKP-17-2-II New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities (Budapest, Hungary) to P.K., Centre for Neuroscience (Pecs, Hungary) to D.R., PTE AOK Research Grant KA-2017-15 (Pecs, Hungary) to T.A., Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities in Hungary, within the framework of the 20765-3/2018/FEKUTSTRAT (PTE, Pecs Hungary) to D.R.

#### AUTHORS' CONTRIBUTIONS ARE

Participated in research design: Vaczy, Atlasz and Reglodi,

Conducted experiments: Vaczy, Kovari, Kovacs, Farkas, Szabo, Kvarik, Atlasz and Reglodi

Contributed new reagents or analytical tools: Kocsis and Fulop

Collected data: Vaczy, Kovari, Kovacs, Farkas, Szabo, Kvarik and Atlasz

Performed data analysis: Vaczy, Kovari and Atlasz.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Vaczy, Atlasz and Reglodi

#### REFERENCES

[1] Padua D, Vu JP, Germano PM, *et al.* The role of neuropeptides in mouse models of colitis. *J Mol Neurosci* 2016; 59(2): 203-10.

- [2] Krajcs N, Hernadi L, Pirger Z, *et al.* PACAP modulates acetylcholine-elicited contractions at nicotinic neuromuscular contacts of the land snail. *J Mol Neurosci* 2015; 57(4): 492-500.
- [3] Hashimoto H. Physiological significance of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the nervous system. *Yakugaku Zasshi* 2002; 122(12): 1109-21.
- [4] Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev* 2000; 21(6): 619-70.
- [5] Miyata A, Arimura A, Dahl RR, *et al.* Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164(1): 567-74.
- [6] Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Weill C, *et al.* PACAP functions as a neurotrophic factor. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 739: 228-43.
- [7] Bourgault S, Vaudry D, Dejda A, *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective peptide. *Curr Med Chem* 2009; 16(33): 4462-80.
- [8] Brenneman DE. Neuroprotection: a comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Peptides* 2007; 28(9): 1720-26.
- [9] Dejda A, Jolivel V, Bourgault S, *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(1-3): 26-37.
- [10] Shioda S, Ohtaki H, Nakamachi T, *et al.* Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070: 550-60.
- [11] Somogyvari-Vigh A, Reglodi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr Pharm Des* 2004; 10(23): 2861-89.
- [12] Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates both c-fos gene expression and cell survival in rat cerebellar granule neurons through activation of the protein kinase A pathway. *Neuroscience* 1998; 84(3): 801-12.
- [13] Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 2009; 61(3): 283-357.
- [14] Kasica N, Podlasz P, Sundvik M, *et al.* Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against oxidative stress in zebrafish hair cells. *Neurotox Res* 2016; 30(4): 633-47.
- [15] Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(19): 7488-93.
- [16] Reglodi D, Kiss P, Lubics A, *et al.* Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des* 2011; 17(10): 962-72.
- [17] Chen Y, Samal B, Hamelink CR, *et al.* Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regul Pept* 2006; 137(1-2): 4-19.
- [18] Reglodi D, Somogyvari-Vigh A, Vigh S, *et al.* Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 2000; 31(6): 1411-17.
- [19] Mao SS, Hua R, Zhao XP, *et al.* Exogenous administration of PACAP alleviates traumatic brain injury in rats through a mechanism involving the TLR4/MyD88/NF-kappaB pathway. *J Neurotrauma* 2012; 29(10): 1941-59.
- [20] Feher M, Gaszner B, Tamas A, *et al.* Alteration of the PAC1 receptor expression in the basal ganglia of MPTP-induced parkinsonian macaque monkeys. *Neurotox Res* 2018; 33(4): 702-715.
- [21] Horvath G, Reglodi D, Opper B, *et al.* Effects of PACAP on the oxidative stress-induced cell death in chicken pinealocytes is influenced by the phase of the circadian clock. *Neurosci Lett* 2010; 484(2): 148-52.
- [22] Illes A, Opper B, Reglodi D, *et al.* Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on small intestinal INT 407 cells. *Neuropeptides* 2017; 65: 106-13.
- [23] Delgado M, Abad C, Martinez C, *et al.* PACAP in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 992: 141-57.
- [24] Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(3): 229-37.

- [25] Delgado M, Martinez C, Pozo D, *et al.* Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. *J Immunol* 1999; 162(2): 1200-05.
- [26] Kong LY, Maderdrut JL, Jeohn GH, *et al.* Reduction of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mixed cortical neuron/glia cultures by femtomolar concentrations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience* 1999; 91(2): 493-500.
- [27] Yang S, Yang J, Yang Z, *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP4-6 are neuroprotective through inhibition of NADPH oxidase: potent regulators of microglia-mediated oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319(2): 595-603.
- [28] Brown D, Tamas A, Reglodi D, *et al.* PACAP protects against inflammatory-mediated toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2014; 26(3): 230-39.
- [29] Atlasz T, Vaczy A, Werling D *et al.* Protective effects of PACAP in the retina. In: Reglodi D, Tamas A, Eds. *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide — PACAP*. 11th ed. Springer, Cham: New York 2016; pp. 501-27.
- [30] Endo K, Nakamachi T, Seki T, *et al.* Neuroprotective effect of PACAP against NMDA-induced retinal damage in the mouse. *J Mol Neurosci* 2011; 43(1): 22-29.
- [31] Babai N, Atlasz T, Tamas A, *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(1): 149-55.
- [32] D'Amico AG, Maugeri G, Reitano R, *et al.* PACAP modulates expression of hypoxia-inducible factors in streptozotocin-induced diabetic rat retina. *J Mol Neurosci* 2015; 57(4): 501-09.
- [33] Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, *et al.* Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell Tissue Res* 2012; 348(1): 37-46.
- [34] Szabadfi K, Reglodi D, Szabo A, *et al.* Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, a potential therapeutic agent for diabetic retinopathy in rats: focus on the vertical information processing pathway. *Neurotox Res* 2016; 29(3): 432-46.
- [35] Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, *et al.* Effects of PACAP in UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats. *J Mol Neurosci* 2011; 43(1): 51-57.
- [36] Werling D, Reglodi D, Banks WA, *et al.* Ocular delivery of PACAP1-27 protects the retina from ischemic damage in rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57(15): 6683-6691.
- [37] Vaczy A, Reglodi D, Somoskoey T, *et al.* The protective role of PAC1-receptor agonist maxadilan in BCCAO-induced retinal degeneration. *J Mol Neurosci* 2016; 60(2): 186-94.
- [38] Kvarik T, Mammel B, Reglodi D, *et al.* PACAP is protective in a rat model of retinopathy of prematurity. *J Mol Neurosci* 2016; 60(2): 179-85.
- [39] Nemeth A, Szabadfi K, Fulop B, *et al.* Examination of calcium-binding protein expression in the inner ear of wild-type, heterozygous and homozygous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-knockout mice in kanamycin-induced ototoxicity. *Neurotox Res* 2014; 25(1): 57-67.
- [40] Lacaille H, Duterte-Boucher D, Vaudry H, *et al.* PACAP protects the adolescent and adult mice brain from ethanol toxicity and modulates distinct sets of genes regulating similar networks. *Mol Neurobiol* 2017; 54(9): 7534-48.
- [41] Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, *et al.* Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. *J Mol Neurosci* 2010; 42(3): 397-403.
- [42] Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, *et al.* Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotox Res* 2012; 21(1): 41-48.
- [43] Kovacs-Valasek A, Szabadfi K, Denes V, *et al.* Accelerated retinal aging in PACAP knock-out mice. *Neuroscience* 2017; 348: 1-10.
- [44] Hashimoto H, Hashimoto R, Shintani N, *et al.* Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. *J Neurochem* 2009; 110(2): 595-602.
- [45] Szabo A, Danyadi B, Bognar E, *et al.* Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neurosci Lett* 2012; 523(2): 93-98.
- [46] Pitre A, Davis N, Paul M, *et al.* Synemin promotes AKT-dependent glioblastoma cell proliferation by antagonizing PP2A. *Mol Biol Cell* 2012; 23(7): 1243-53.
- [47] Zhang X-Y, Xiao Y-Q, Zhang Y, *et al.* Protective effect of pioglitazone on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(6): 3912-21.
- [48] Danyadi B, Szabadfi K, Reglodi D, *et al.* PACAP application improves functional outcome of chronic retinal ischemic injury in rats-evidence from electroretinographic measurements. *J Mol Neurosci* 2014; 54(3): 293-99.
- [49] Gouras P. *Electroretinography: Some basic principles*. *Invest Ophthalmol* 1970; 9(8): 557-69.
- [50] Perlman I. *The Electroretinogram: ERG: the organization of the retina and visual system*. Webvision 1995.
- [51] Jacobs GH, Fenwick JA, Williams GA. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J Exp Biol* 2001; 204(Pt 14): 2439-46.
- [52] Szabo-Salfay O, Palhalmi J, Szatmari E, *et al.* The electroretinogram and visual evoked potential of freely moving rats. *Brain Res Bull* 2001; 56(1): 7-14.
- [53] Atlasz T, Szabadfi K, Reglodi D, *et al.* Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its fragments on retinal degeneration induced by neonatal monosodium glutamate treatment. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1163: 348-52.
- [54] Babai N, Atlasz T, Tamas A, *et al.* Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retinal degeneration. *Neurotox Res* 2005; 8(3-4): 227-33.
- [55] Cheng H, Ding Y, Yu R, *et al.* Neuroprotection of a novel cyclopeptide C\*HSDGIC\* from the cyclization of PACAP (1-5) in cellular and rodent models of retinal ganglion cell apoptosis. *PLoS One* 2014; 9(10): 1-11.
- [56] Seki T. Neuroprotective effect of PACAP against kainic acid-induced neurotoxicity in rat retina. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070(1): 531-34.
- [57] Seki T, Itoh H, Nakamachi T, *et al.* Suppression of ganglion cell death by PACAP following optic nerve transection in the rat. *J Mol Neurosci* 2008; 36(1-3): 57-60.
- [58] Gray SL, Yamaguchi N, Vencova P, *et al.* Temperature-sensitive phenotype in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology* 2002; 143(10): 3946-54.
- [59] Reglodi D, Tamas A, Koppan M, *et al.* Role of PACAP in female fertility and reproduction at gonadal level - recent advances. *Front Endocrinol* 2012; 3: 155.
- [60] Reglodi D, Cseh S, Somoskoi B, *et al.* Disturbed spermatogenic signaling in PACAP deficient mice. *Reproduction* 2018; 155(2): 129-139.
- [61] Isaac ER, Sherwood NM. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 280(1-2): 13-19.
- [62] Sandor K, Kormos V, Botz B, *et al.* Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice. *Neuropeptides* 2010; 44(5): 363-71.
- [63] Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, *et al.* Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(23): 13355-60.
- [64] Kawaguchi C, Isojima Y, Shintani N, *et al.* PACAP-deficient mice exhibit light parameter-dependent abnormalities on nonvisual photoreception and early activity onset. *PLoS One* 2010; 5(2): 1-9.
- [65] Kemeny A, Reglodi D, Cseharovszky R, *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficiency enhances oxazolone-induced allergic contact dermatitis in mice. *J Mol Neurosci* 2010; 42(3): 443-49.
- [66] Matsuyama S, Matsumoto A, Hashimoto H, *et al.* Impaired long-term potentiation in vivo in the dentate gyrus of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) or PACAP type 1 receptor-mutant mice. *Neuroreport* 2003; 14(16): 2095-98.
- [67] Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, *et al.* PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat Commun* 2016; 7: 12034.
- [68] Kurihara T, Ozawa Y, Shinoda K, *et al.* Neuroprotective effects of angiotensin II type I receptor (AT1R) blocker, Telmisartan, via modulating AT1R and AT2R signaling in retinal inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(12): 5545-52.
- [69] Lewis GP, Fisher SK. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodel-

- ing and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 2003; 230: 263-90.
- [70] Li Q, Puro DG. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(9): 3109-16.
- [71] Ambati J, Chalam K V, Chawla DK, *et al.* Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1997; 115(9): 1161-66.
- [72] Ishikawa A, Ishiguro S, Tamai M. Changes in GABA metabolism in streptozotocin-induced diabetic rat retinas. *Curr Eye Res* 1996; 15(1): 63-71.
- [73] Liu Z, Qiu YH, Li B, *et al.* Neuroprotection of interleukin-6 against NMDA-induced apoptosis and its signal-transduction mechanisms. *Neurotox Res* 2011; 19(3): 484-95.
- [74] Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, *et al.* Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci* 2008; 36(1-3): 16-25.
- [75] Nakatani M, Seki T, Shinohara Y, *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) stimulates production of interleukin-6 in rat Muller cells. *Peptides* 2006; 27(7): 1871-76.
- [76] Reichenstein M, Reich R, Lehoux JG, *et al.* ACTH induces TIMP-1 expression and inhibits collagenase in adrenal cortex cells. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215(1-2): 109-14.
- [77] Nedvig K, Weber G, Nemeth J, *et al.* Changes of PACAP immunoreactivities and cytokine levels after PACAP-38 containing intestinal preservation and autotransplantation. *J Mol Neurosci* 2012; 48(3): 788-94.
- [78] Banki E, Degrell P, Kiss P, *et al.* Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides* 2013; 42: 125-30.
- [79] Laszlo E, Varga A, Kovacs K, *et al.* Ischemia/reperfusion-induced kidney injury in heterozygous PACAP-deficient mice. *Transplant Proc* 2015; 47(7): 2210-15.
- [80] Guo MS, Wu YY, Liang ZB. Hyaluronic acid increases MMP-2 and MMP-9 expressions in cultured trabecular meshwork cells from patients with primary open-angle glaucoma. *Mol Vis* 2012; 18: 1175-81.
- [81] Nedvig K, Szabo G, Csukas D, *et al.* Examination of cytoprotective and anti-inflammatory effect of PACAP-38 on small bowel autotransplantation. *Magy Seb* 2013; 66(5): 250-55.
- [82] Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbeck's Arch Surg* 2011; 396(1): 13-29.
- [83] Etienne-Manneville S, Chaverot N, Strosberg AD, *et al.* ICAM-1-coupled signaling pathways in astrocytes converge to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and TNF- $\alpha$  secretion. *J Immunol* 1999; 163(2): 668-74.
- [84] Limb GA, Chignell AH. Vitreous levels of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) as a risk indicator of proliferative vitreoretinopathy. *Br J Ophthalmol* 1999; 83(8): 953-56.
- [85] Webster L, Stanbury RM, Chignell AH, *et al.* Vitreous intercellular adhesion molecule 1 in uveitis complicated by retinal detachment. *Br J Ophthalmol* 1998; 82(4): 438-43.
- [86] Visser L de, H. de Boer J, T. Rijkers G, *et al.* Cytokines and chemokines involved in acute retinal necrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58(4): 2139-51.
- [87] Cruz PR, Lira RP, Pereira Filho SA, *et al.* Increased circulating PEDF and low sICAM-1 are associated with sickle cell retinopathy. *Blood Cells Mol Dis* 2015; 54(1): 33-37.
- [88] Reglodi D, Kiss P, Horvath G, *et al.* Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the urinary system, with special emphasis on its protective effects in the kidney. *Neuropeptides* 2012; 46(2): 61-70.
- [89] Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29(6): 313-26.
- [90] Lu B, Rutledge BJ, Gu L, *et al.* Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 1998; 187(4): 601-08.
- [91] Chen S, Bacon KB, Li L, *et al.* In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J Exp Med* 1998; 188(1): 193-98.
- [92] Murugeswari P, Shukla D, Kim R, *et al.* Angiogenic potential of vitreous from proliferative diabetic retinopathy and Eales' disease patients. *PLoS One* 2014; 9(10): 1-8.
- [93] Atmaca LS, Batioglu F, Atmaca Sonmez P. A long-term follow-up of Eales' disease. *Ocul Immunol Inflamm* 2002; 10(3): 213-21.
- [94] Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T, *et al.* Role of MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *J Leukoc Biol* 2003; 73(1): 137-44.
- [95] Barbour M, Allan D, Xu H, *et al.* IL-33 attenuates the development of experimental autoimmune uveitis. *Eur J Immunol* 2014; 44(11): 3320-29.
- [96] Heimesaat MM, Dunay IR, Schulze S, *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates experimental acute ileitis and extra-intestinal sequelae. *PLoS One* 2014; 9(9): e108389.
- [97] Nakazawa T, Shimura M, Tomita H, *et al.* Intrinsic activation of PI3K/Akt signaling pathway and its neuroprotective effect against retinal injury. *Curr Eye Res* 2003; 26(1): 55-63.
- [98] Dreixler JC, Hemmert JW, Shenoy SK, *et al.* The role of Akt/protein kinase B subtypes in retinal ischemic preconditioning. *Exp Eye Res* 2009; 88(3): 512-21.
- [99] Wang H, Brown J, Martin M. Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. *Cytokine* 2011; 53(2): 130-40.
- [100] Gong JH, Gong JP, Li JZ, *et al.* Glycogen synthase kinase 3 inhibitor attenuates endotoxin-induced liver injury. *J Surg Res* 2013; 184(2): 1035-44.
- [101] Williams DL, Ozment-Skelton T, Li C. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway alters host response to sepsis, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Shock* 2006; 25(5): 432-39.
- [102] Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem* 2002; 277(35): 32124-32.
- [103] Yin H, Tan Y, Wu X, *et al.* Association between TLR4 and PTEN involved in LPS-TLR4 signaling response. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 6083178.
- [104] Zhang W, Smith A, Liu JP, *et al.* GSK3 $\beta$  modulates PACAP-induced neurogenesis in PC12 cells by acting downstream of Rap1 in a caveolae-dependent manner. *Cell Signal* 2009; 21(2): 237-45.
- [105] Varga B, Szabadfi K, Kiss P, *et al.* PACAP improves functional outcome in excitotoxic retinal lesion: an electroretinographic study. *J Mol Neurosci* 2011; 43(1): 44-50.
- [106] Gurevich L, Slaughter MM. Comparison of the waveforms of the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res* 1993; 33(17): 2431-35.
- [107] Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, *et al.* Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(3): 1433-39.