

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

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

# **I. Bevezetés**

## **1 A retina**

A retina több rétegből álló, fényérzékelésre specializálódott szövet. Több millió sejtet tartalmaz, amelyek együttesen a fénysugarak felfogására és azok kémiai energiává történő átalakítására képesek. Az emlős retina 10 rétegből épül fel, melyek kívülről befelé haladva a következők:

1. Pigmenthám rétege (PE; az itt található sejtek, a retinális idegsejtek támasztására szolgálnak).
2. Fotoreceptor sejtek rétege (PL; a fény- és színérzékeny sejtek: csapok és pálcikák).
3. Külső határmembrán (OLM; a réteg a fotoreceptorok sejttesteit választja el a belső szegmenseiktől).
4. Külső sejtés réteg (ONL; a csapok és pálcikák sejttesteit tartalmazza).
5. Külső rostos réteg (OPL; az első réteg, ahol a fotoreceptorok, bipoláris sejtek, valamint horizontális sejtek nyúlványai szinaptizálódnak).
6. Belső sejtés réteg (INL; a horizontális-, a bipoláris-, az amakrin- valamint a Müller-sejtek sejttesteit tartalmazza).
7. Belső rostos réteg (IPL; a bipoláris sejtek axonjai, az amakrin sejtek nyúlványai, illetve a dúcsejtek dendritjei itt kapcsolódnak).
8. Ganglionsejtek rétege (GCL; a ganglionsejtek sejttesteit és az ún. „displaced” amakrin sejtek alkotják).
9. Optikus rostok rétege (NFL; a ganglionsejtek axonjaiból összeszedődő rostköteg, amely az ingerületet a felsőbb központok felé továbbítja).
10. Belső határmembrán (ILM; a retinát az üvegtesttől a Müller-sejtek végtalpaiból létrejövő határhártya választja el).

A retina szerkezeti felépítése biztosítja a szemben a látás neuronális háttérét, első lépést képezve a szín, illetve a kontraszt érzet kialakulásának. A retina vérellátását az arteria ophthalmica biztosítja. A szemet közvetlenül ellátó erek az artéria centralis retinae és a ciliaris arteriák.

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

### ***Elektroretinográfia (ERG)***

Az elektroretinográfia a látás funkcionális vizsgálati módszere, amely a retina sejtjeinek aktivitását méri fény inger hatására. A módszer információt nyújt a retina fotoreceptorainak, illetve bipoláris- és horizontális sejtjeinek funkcionalitásáról. Az első mérhető paraméter az a-hullám, amely amplitúdója a késői receptor potenciált adja meg, ami a retina külső részében elhelyezkedő fotoreceptorok működéséről és állapotáról ad jelzést. Míg a b-hullám amplitúdója a retina belső rétegeinek állapotát tükrözi, úgy mint az ON bipoláris és a Müller sejtek. A klinikumban gyakran regisztrálják továbbá a pigment epitéliumból induló c-hullám paramétereit is.

### ***Optikai koherencia tomográfia (OCT)***

A spektrál-domain optikai koherencia tomográfia (SD-OCT) egy olyan rutin diagnosztikában alkalmazott képalkotó eljárás, amely noninvazív módon a teljes szem szerkezeti vizsgálatát teszi lehetővé (retinális rétegvastagságok meghatározása). Alapja az infravörös fénysugár, amely a szem szövetein visszatükröződik és az ebből származó reflexiók/fényszórási tulajdonságok térbeli eloszlása szerint rajzolja ki a vizsgált struktúrát. A mérés során számítógép segítségével a mélységi információk leképezését A-scannek hívják. Az A-scannek sorozatából generált longitudinális képet pedig B-scannek nevezik. A B-scan adatok sorozata pedig 3D modell megjelenítésére is alkalmas a vizsgált objektumról.

## **2. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)**

A peptidet először a hipofízisben kifejtett adenilát-cikláz aktiváló és ebből adódó ciklikus adenzin-monofoszfát emelő hatása alapján azonosították. A PACAP a szekretin/glükagon/ vazoaktív intesztinális peptidcsaládhoz (VIP) tartozik. Kettő biológiailag aktív formában fordul elő emlős szervezetben, az egyik a 38 aminosav hosszú szekvenciából álló PACAP38, a másik a rövidebb 27 aminosavból felépülő PACAP27. A gerincesek szervezetében előforduló PACAP közel 90% a PACAP38. A PACAP N-terminális felépítése az evolúció során egy rendkívül konzervált aminosav-szekvenciát mutat.

## **A PACAP előfordulása a szervezetben**

A PACAP nagy mennyiségben a központi idegrendszerben fordul elő. A legnagyobb koncentrációban a hipotalamuszban található meg, azonban más agyterületeken is leírták jelenlétét többek között a középagy, kisagy, agytörzs, híd vagy az agykéreg területén. A perifériás idegrendszerből is kimutatták előfordulását a vegetatív pre- és postganglionáris neuronokban, valamint a spinális ganglionok területén is. Számos más helyről is azonosították jelenlétét, így például a lépből, nyirokszövetből, méhből, emlő szövetéből, a mellékveséből vagy a hasnyálmirigyből egyaránt. A kardiovaszkuláris, gasztrointesztinális, légző- illetve immunrendszer területén szintén találhatunk PACAP tartalmú idegrostokat.

## **A PACAP előfordulása a szemben**

A PACAP jelentős mennyiségben található az íriszben és a sugártestben, de leírták jelenlétét továbbá a szaruhártya, a kötőhártya, az ínhártya, az érhártya és a retina területéről is. A PACAP a különböző állatfajok retinájában már a fejlődés korai stádiumában is kimutatható. Zebrahalak esetén megfigyelték a peptid jelenlétét a megtermékenyítést követő 72. órában a ganglionáris sejtrétegben. Rágcsálók esetén leírták, hogy a 20. fejlődési naptól a ganglionáris sejtrétegben jelenik meg a fehérje jelenléte, ami a felnőtt egyedek retinájában már az NFL, a GCL és az OPL területén, valamint az INL és IPL rétegében is azonosítható lesz.

## **A PACAP receptorai**

A PACAP receptorai a PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorok, amelyek a G-proteinhez kapcsolt receptor családba tartoznak. 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. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a PACAP három receptora közül a citoprotektív hatás közvetítéséért főként a PAC1 receptora felelős. A PAC1 receptor a szervezet számos területén megtalálható, így többek között a szem retina szövetében is. A PAC1 receptor a retina összes rétegében előfordul. Kifejezetten magas expressziós mintázatot találtak a NFL-, GCL-, INL rétegében és a Müller glia- valamint amakrin sejtek esetén is. Ezzel ellentétben kisebb mennyiségben észlelték a PAC1 receptor jelenlétét az IPL, OPL, ONL és a fotoreceptorok külső szegmensének területén. A PACAP a PAC1 receptorát

aktiválva indukálja az adenilát-cikláz, ami cAMP expresszió növekedését idézi elő, és mellyel a protein kináz A által közvetített útvonalakat serkenti. A PACAP képes a  $Ca^{2+}$  mobilizációt is stimulálni különféle sejtípusokban. A fent leírt és egyéb más útvonalak PAC1 receptoron keresztüli szabályozása nagymértékben függ a PACAP koncentrációjától, valamint a PAC1 receptor splice variánsainak sejtípus függő előfordulásától.

### **A PACAP általános hatásai**

A fehérje számos biológiai folyamatot képes befolyásolni úgy, mint például a táplálkozás, a nyál szekréció, a cirkadián ritmus, termoreguláció, memória-, stressz- valamint immunfolyamatok szabályozása. Képes a szervezet folyadékháztartását befolyásolni a folyadék felvétel fokozásával, a hipofízis hormontermelését is regulálja, továbbá fokozza a pankréasz inzulin-, valamint a pajzsmirigy tiroxin szintézisét. Ezen kívül pedig már leírták fontos vazodilatátor és hörgőtágító szerepét is egyaránt. A PACAP neuroprotektív funkcióját számos toxikus hatással szemben is igazolták különböző sejtípusban úgy, mint az oxidatív stressz, a glutamát vagy a 6-hidroxidopamin elleni védelme. In vivo kísérletek azt is bizonyították, hogy a PACAP véd a globális és fokális agyi ischaemia ellen, valamint traumás agysérülés és neurodegeneratív megbetegségek esetén is. A PACAP egy másik fontos szerepe az immunmodulátor hatása baktériumok által indukált akut és krónikus gyulladás során. Számos tanulmány foglalkozik az endogén PACAP protektív szerepének vizsgálatával, ahol a kísérletek során PACAP knock out (KO) egerek alkalmazása szolgál a legtöbb bizonyítékkal. Megfigyelték, hogy sérülés vagy negatív külső ingerek hatására nagyobb mértékű károsodás alakul ki a PACAP KO egerek szervezetében vad típusú társaikhoz viszonyítva

### **A PACAP hatásai a szemben**

A PACAP neuroprotektív hatásai a retina szövetében is igazoltást nyertek. A PACAP védő funkcióját mutatták ki különböző patológiás elváltozások során, mint például diabéteszes retinopátia, UV-fény által kiváltott degeneráció, excitotoxikus retina-sérülés, látóideg-sérülés és oxigén-indukálta retinopátia. Iszkémiás retinopátia kapcsán kutatásaink kimutatták, hogy az intravitrealisan alkalmazott PACAP védő szerepet lát el bilaterális carotis communis okklúzió (BCCAO) okozta retinális károsodás elhárításában. A PACAP mérsékelte a retina rétegvastagságának csökkenését a hipoxiás állapot során és megakadályozta a sejtelhalását is a GCL rétegben. Ez a morfológiai védelem funkcionális vizsgálatokkal is bizonyítható volt.

Ezen felül sikerült igazolnunk, hogy az eddig alkalmazott intravitreális terápia mellett már a non-invazív szemcseppel történő kezelés is hatékony a betegség kezelésénél. Szaikrodalmi adatok alapján továbbá ismert, hogy az endogén PACAP-nak kulcsfontosságú protektív szerepe van a BCCAO okozta károsodásban is. Ezek az eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy az endogén PACAP a retina különböző negatív inzultusok elleni védelemhez nélkülözhetetlen.

### **3. Maxadilán**

A maxadilán 61 aminosavból álló fehérje, melyet először a homoklégy nyálmirigyből azonosítottak erős értágító hatása révén. Természetes módon nem található meg emlős szervezetben, és nem mutat semmi szekvencia-homológiát a PACAP-val. Hatását a PAC1 receptorán keresztül fejt ki, melyből adódik, hogy mint a PAC1 receptor szelektív agonistája kiválóan alkalmas a receptoron mediált folyamatok tanulmányozására.

### **4. Bilateralis carotis communis okklúzió**

BCCAO patkányokban agyi véráramlás csökkenést eredményezi. Ez kihatással lesz az agyukban zajló biokémiai folyamatok megváltozására is, melyhez az egyedekben viselkedésbeli abnormalitások is társulni fognak. Kimutatták azt is, hogy ez az állapot hosszú távon szürkeállományi elváltozást, idegsejtek degenerációját, mikroglia aktivációt, valamint asztrocitózist indukál. A retinában a humán esetekhez hasonlóan az artéria carotis elzáródása az iszkémiás retinopátia kialakulását eredményezi.

### **5. Bakteriális lipopoliszaharid endotoxin (LPS)**

Az LPS a gram-negatív baktériumok külső membránjának komponense. A bakteriális fertőzés a gazdaszervezetben a humorális immunválaszt indukálja, mely hatására gyulladásgátló jelátviteli utak aktiválódnak. Az endotoxinokat a humán uveitis állatmodellének kialakításához is alkalmazzák, ahol gyulladásgátló folyamatok válnak vizsgálhatóvá a szem anterior és posterior szegmensében egyaránt.

## **II. Célkitűzések**

I.) Korábbi tanulmányok igazolták, hogy az exogén módon alkalmazott PACAP, illetve a szervezetben megtalálható endogén formája is retinoprotektív hatással bír iszkémiás retinopátia esetén. Kísérletünk első felében így célul tűztük ki a retinoprotektív hatásokért felelős PAC1 receptor védő szerepének igazolását maxadilán kezelés segítségével BCCAO indukálta retinopátias elváltozás 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.

## **III. PAC1 receptor retinoprotektív hatásának vizsgálata iszkémiás retinopátia esetén**

### **1. Anyagok és módszerek**

#### **Kísérleti állatok kezelése**

Kísérletünk során 3 hónapos felnőtt hím Wistar patkányokat használtunk (n=36), melyek súlya átlagosan 250-300g volt. 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 hoztunk létre, ahol a patkányok a műtéti beavatkozáson átestek, azonban náluk az arteria carotis communis nem került lekötésre. Ezt követően mind két csoportnál az állatok sztereomikroszkóp alatt a jobb szemükbe intravitreálisan 5 µl maxadilán oldatot kaptak Hamilton fecskendő segítségével. A maxadilánt 0,1 µM (n=9) és 1 µM (n=9) koncentrációban foszfát pufferelt sóoldatban (PBS) oldva alkalmaztuk.

#### **Szövetteni vizsgálat**

A patkányokat két hét posztoperatív időszak után túlaltattuk. Ezt követően a szemeket eltávolítottuk, majd a mintákat 4%-os paraformaldehidben fixáltuk és Durcupan ACM-gyantába beágyaztuk. Ezt követően az elkészített 2 µm metszeteinken toluidinkék festéssel kontrasztosítottunk és DePeX-el lefedtünk. Az így elkészült metszeteinket Nikon Eclipse 80i

fénymikroszkóp segítségével lefotóztuk. Retina minták rétegvastagságának lemérését Q Capture programmal végeztük el, ahol minden esetben a mérés a különböző csoportokból azonos helyről készült (a centrális retinális régióból, azaz a látóidegtől 1mm-re). A mérések folyamán meghatároztuk a retina rétegeinek vastagságát, azaz OLM-ILM, OPL, IPL, illetve az ONL, INL nagyságát. Ezután a metszeteken a GCL réteg 100 mikrométeres szakaszán leszámoltuk az átlagosan elhelyezkedő sejtek számát is.

### **Citokin array analízis**

A citokin array szemikvantitatív mérésének elvégzéséhez 24 órával a BCCAO műtétet követően az állatok retina mintáit izoláltuk és a Rat Cytokine Array Panel kitben leírt protokollt elvégeztük. A retinák homogenizálását, a membránok blokkolását, antitesttel történő inkubálását, majd a mintáinkkal folytatott reagáltatásukat a mosási eljárások követték. Ezt a sztreptavidin-tormaperoxidáz kemilumineszcens reakciója és a film kazettára történő előhívása zárta le. A filmek denzitometriás elemzéshez Protein Array Analyzer programot (Image J-NIH software) használtunk. A méréseinket háromszor ismételtük meg független mintákból.

### **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.

## **2. Eredmények**

### **Maxadilan kezelés hatása a retina szövettani változásaira**

A maxadilan-kezelés önmagában nem okozott semmilyen morfológiai elváltozást az álműtött állatok csoportjában. A retina rétegei a BCCAO csoportban azonban súlyos degeneráció jeleit mutatták sham PBS-sel kezelt kontrollokhoz képest. A BCCAO szignifikánsan csökkentette az OLM-ILM, valamint az egyes rétegek vastagságát az áloperált PBS-kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva. A legnagyobb mértékű csökkenés az IPL rétegében volt megfigyelhető, de szignifikáns redukción mértünk az INL, az OPL és az ONL



rétegeiben is. Az iszkémiás károsodás további jele, hogy szignifikánsan lecsökkent a sejtek száma a GCL rétegben a kontroll csoporthoz képest. Mindkét vizsgált maxadilán koncentráció (0,1 és 1  $\mu$ M) protektív hatást mutatott az OLM-ILM, illetve a külön-külön vizsgált retina rétegeinek vastagságában. Az 1  $\mu$ M koncentráció azonban még effektívebbnek bizonyult. A maxadilán a GCL rétegben jelentkező sejtek elhalását is sikerrel kivédte a kezelést nem kapott BCCAO csoporthoz viszonyítva.

### **Maxadilán kezelés hatása a retina citokin expressziós változásaira**

Az iszkémiás kezelést követően számos citokin fokozott expressziója volt detektálható úgy, mint az IL-1 $\alpha$  is. A többi interleukin (IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10) esetén 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) expressziója szintén szignifikáns növekedést mutatott BCCAO hatására, a kontroll sham csoporthoz viszonyítva. Az intraokuláris 1  $\mu$ M maxadilán kezelés azonban a BCCAO csoportban képes volt megakadályozni a CINC-1, az IL-1 $\alpha$  és az L-szelektin citokinek expressziós emelkedését. A BCCAO aktiválta többi citokin esetén azonban nem találtunk szignifikáns változást a kezelés hatására.

### **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 ér eredetű retinakárosodásokhoz. Kutatócsoportunk korábbi tanulmányaiban már igazolta, hogy az exogén módon alkalmazott PACAP retinoprotektív szereppel bír iszkémiás károsodás során. Továbbá ismert az is, hogy BCCAO modellben a PACAP nem csupán a retina szerkezetének megóvásában, hanem a látás funkciójának megőrzésében is kulcsfontosságú szerepet lát el. Ezért a PACAP és receptorai különböző betegségeknel ígéretes terápiás célpont lehetnek, melyből adódóan kiemelten fontos a PACAP receptorok degenerációs modelleken betöltött szerepének ismerete. Jelenleg a BCCAO indukálta retinális károsodásban a PAC1 receptor szerepe nem tisztázott, ezért kísérletünkhöz egy kizárólag a PAC1 receptorra szelektív, agonista hatással bíró fehérjét, a maxadilánt alkalmaztuk. A maxadilán növeli a cAMP szintjét humán neuroblasztóma, patkány PC12 és nyúl aorta simaizom sejtjeiben. Kardiális neuronokban

bizonyították a fehérje AC/cAMP/PKA útvonalon keresztüli MEK/foszfo-ERK expressziós szintjeinek növelését is. A PACAP-hoz hasonlóan a maxadilán protektív hatását is számos tanulmányban vizsgálták már. Szubkután injektált maxadilán gyulladáscsökkentő 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. Továbbá a maxadilán képes volt a humán zsírsejtből származó őssejtekben serkenteni a sejttúlélést a kaspáz-3 és kaspáz-9 szintjének csökkentésével, illetve a Bcl-2 expresszió növelésével, ami az apoptotikus sejthalál gátlását eredményezte. A fehérje továbbá képes a retina neuroblaszt rétegének anizomycin-indukálta sejthalálát is elhárítani. A maxadilán a fent említett tanulmányok alapján PAC1 receptoron keresztül befolyásolja a sejttúlélési és gyulladáscsökkentő 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. Mindemellett a peptid számos gyulladáscsökkentő szabályozó szerepet játszó citokinek (IL-1-alfa, L-szelektin és a CINC-1) expressziós növekedését is képes volt gátolni. Az interleukin-1 fehérjecsald tagjai a korai immun- és gyulladáscsökkentő válaszreakciók mediálásában játszanak szerepet. Az általunk megfigyelt IL-1-alfa csökkenése maxadilán kezelés hatására azonos eredményt mutatott a PACAP iszkémiás retinoprotekciójának vizsgálatánál tapasztaltakkal. A szelektin fehérjecsald tagjai a T-sejtek, leukociták és vaszkuláris endotél sejtek kommunikációjának fő résztvevői, melyek képesek mikrovaszkuláris diszfunkciót és reperfúziós károsodást indukálni. Az L-szelektinnek megnövekedett expresszióját figyelték meg iszkémiás károsodást követően, több különböző szervi elváltozásnál is. Továbbá meggátolja a citokin-indukálta leukocita inváziót, csökkent gyulladáscsökkentő folyamat volt megfigyelhető neurológiai betegségek során. A PACAP kezelése több degenerációs modell esetén is csökkenti a sejtadhéziós molekulák expresszióját, melyet jelen kísérletünkben mi is tapasztaltunk a maxadilán kezelés hatására. A CINC-1 ugyancsak szerepet játszik a retina gyulladáscsökkentő folyamataiban. Proinflammatorikus kemokinként az alfa-kemokin család tagja és leginkább oxidatív stressz, iszkémia és reperfúzió hatására expresszálódik. Számos gyulladáscsökkentő folyamatban vesz részt és általában az akut fázisban aktiválódik, ezzel meghatározó szerepet játszva a neutrofil granulociták migrációjában. A javuló vérátáramlás hatására a CINC-1 szintjének csökkenése detektálható, ami általában a károsodás mértékének csökkenésével függ össze. A CINC-1 szintjének fokozódását figyelték meg streptozocin-indukálta diabéteszes nefropátiában is, ahol a kemokin megemelkedett szintje szignifikánsan

csökkenthető volt a PACAP kezelés hatására. A PACAP CINC-1 citokinre gyakorolt hatását leírták BCCAO-indukálta retinakárosodás során is, mely teljesen megegyezik az általunk tapasztaltakkal, ahol a maxadilán kezelés képes volt lecsökkenteni a szintjét, ezzel redukálva a retinát ért gyulladásos folyamatokat. Ezen megfigyeléseink alapján a PAC1 receptoron keresztül a maxadilánnal erős gyulladáscsökkentő hatás érhető el iszkémiás retinakárosodás során.

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

##### **1. Anyagok és módszerek**

###### **Kísérleti állatok kezelése**

A Munkánk során 3 hónapos CD-1 vad típusú (Wt) és PACAP KO hím egereket alkalmaztunk (n=124 állat). Kísérletünkhöz Escherichia coliból izolált 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).

###### **Szöveti vizsgálat**

Az endogén PACAP védő funkciójának rutin hisztológiai elemzéséhez 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 vizsgálatához 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 során a szemeket 4 % PFA-ban fixáltunk, majd gyantás metszeteket készítettünk belőlük. A feldolgozás protokollját az első kísérletsorozatnál részletesen ismertetett eljárás alapján hajtottunk végre.

## **Optikai koherencia tomográfia vizsgálat**

Az állatok retináját (n=24) az LPS kezelés előtt, majd ezt követően heti egyszer 5 héten keresztül OCT készülékünkkel nyomon követtük az alábbi csoportokban: Wt+ ivi 1 $\mu$ M maxadilán, Wt+LPS+ ivi.1 $\mu$ M maxadilán, Wt+ ivi PBS, Wt+LPS+ ivi PBS. A gyulladástól számított 5 hét legendő volt a maradandó retinakárosodás kialakulásához. A mérés során az állatokat elaltattuk és 1%-os atropin tartalmú pupillatágító szemcseppet, valamint műkönnygél vittünk fel a szaruhártyájukra. Ezután az alvó egereket állattartó padon helyeztük el és a retinájukról felvételt készítettünk. A fundus kamera segítségével pedig szemfenék tükrözést végeztünk.

## **Gliális fibrilláris savas protein (GFAP) immunhisztokémiai jelölése**

Az immunhisztokémiai vizsgálatokra való feldolgozás az LPS kezelést követő 24 óra elteltével történt (n=5/csoportonként). A preparált egér szemszerlegetek először fixáltuk, majd mosási lépések után dehidráltuk. Ezt követően kriosztát segítségével 16  $\mu$ m vastagságú metszeteket készítettünk zselatinos tárgylemezre belőlük. A retina metszeteket a permeabilizálás után monoklonális egér primer antitesttel (anti-GFAP, 1:1000) reagáltattunk. A következő napon Alexa Fluor 488-al jelölt másodlagos anti-egér antitesttel (1:200) történt az inkubálásuk. Ezt mosási lépések, majd propídiium-jodidos háttérkontrasztosítás (1:500) követett és a mintákat Fluoroshild (Sigma) segítségével lefedtük. A retina minták centrális régiójáról fluoreszcens mikroszkóppal fényképeket készítettünk, amelyeket Image J (NIH) program segítségével kiértékelünk.

## **Citokin array analízis**

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

## **Western blot analízis**

Vizsgálatunkhoz az endotoxin kezelést követően 24 órával dolgoztuk fel az állatainkat (n=7/csoportonként). Izolált retina mintáinkat homogenizáltuk, majd fehérjetartalmát

meghatároztuk. Ezt a gélelektroforézis és a membránra történő blottolás követett, ami után a próbákat 4°C-on 24h keresztül reagáltattuk az elsődleges antitestekkel: foszfospecifikus anti-Akt-1 Ser473 (pAkt; 1:1000); foszfospecifikus glikogén szintáz kináz-3 $\beta$  Ser9 (pGSK; 1:1000). Kontrollként nem foszforilált totál-Akt (tAkt; 1:1000) antitestet alkalmaztunk. A membránokra ezt követően felvittük az anti-egér tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitesteket (1:3000). Az antigén-antitest komplexeket a kemilumineszcencia reakció tette láthatóvá. Kvantifikálhatóság céljából ImageJ (NIH) programmal denzitometriás méréseket végeztük.

## **Elektroretinográfia**

A retina funkcionális vizsgálatához szkotópikus ERG-t alkalmaztunk a Wt és a PACAP KO egerek csoportjában. Az állatok (n=6/csoportonként) lemérése kontroll állapotban, valamint 24 órával az LPS kezelést követően történt. A kísérlet előtt az egereket 12 órán át sötétben tartottuk. A méréshez az állatokat elaltattuk, szemüket pupillatágító szemcseppel kezeltük. Ezt követően 4 elektródát rögzítettünk rájuk: kettő darab szaruhártya elektródát, egy referencia elektródát, illetve egy föld elektródát, ez utóbbi kettő subcután volt elhelyezve az állatokon. Az egerek fényfelvillanásra (50 fényfelvillanás/szem) adott válaszát ezután a Ratsoft software segítségével regisztráltuk. Eredményeink kiértékelésénél az a- és b-hullám amplitúdó értékeit Origin2016 software segítségével mértük le.

## **Statisztikai analízis**

A diagrammokra az átlag  $\pm$  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.

## **2. Eredmények**

### **A retina szövettani változásai LPS kezelés hatására**

A Wt és PACAP KO egerek kontroll csoportjánál nem volt detektálható a retina rétegvastagságában eltérés. Az LPS kezelés a vad típusú állatokban az INL réteget leszámítva nem okozott jelentős változást a kontroll csoportokhoz viszonyítva. Azonban a PACAP KO csoportban az endotoxin jelentős retina degenerációt indukált a két kezeletlen csoporthoz,

valamint az LPS kezelt vad típusú társaikhoz képest. Statisztikai elemzésünket követően azt tapasztaltuk, hogy a retina két rostos-, valamint a két nukleáris rétegében drasztikus rétegvastagság csökkenés keletkezett, amelyet az OLM-ILM távolságában mért redukció is jól jelez.

### **Optikai koherencia tomográfia vizsgálat eredménye a retina szövettani változásairól**

A kísérlet során az alkalmazott endotoxin krónikus gyulladást okozott a szemben, és ez a retina végleges degenerációjához vezetett. A maxadilan kezelés képes volt ezt részben kivédeni és a különböző retinarétegek vastagságát megőrizni, ami a teljes retina vastagságának megóvásában is megnyilvánult. A kontroll egerek szemfenéktükör képe nem mutatott vaszkuláris diszfunkciót. Azonban a LPS + PBS-sel kezelt egyedekben a szemgyulladás tüneteit figyelhettük meg. A maxadilan kezelés azonban képes volt megakadályozni ezt a folyamatot.

### **Gliális fibrilláris savas protein immuhisztokémiai jelölésének eredménye**

A GFAP expressziója megnövekedett az LPS kezelés hatására a Wt és a PACAP KO egerek csoportjában. Ez az expresszió emelkedés szignifikánsan fokozottab mértékű volt a PACAP KO egerek esetén, ahol a Müller sejtek végtalpai mellett már a nyúlványrendszer is jelölődést mutatott.

### **Citokin array analízis eredménye**

Mérésünk során azt tapasztaltuk, hogy míg kontroll állapotban a két csoport között nem volt detektálható különbség, addig az LPS kezelés hatására az sICAM-1, a JE és TIMP-1 citokinek expressziója növekedést indukált mindkét endotoxin kezelést kapott csoportban a kontroll csoportokhoz viszonyítva. Az LPS kezelt PACAP KO egerek esetén ez azonban még jelentősebb emelkedést mutatott az LPS kezelt Wt társaikhoz képest.

## **3. Diskusszió**

Jelen kísérletünk volt az első, ahol az endogén PACAP és PAC1 receptorának védő és anti-inflammatórikus hatását sikerült igazolnunk LPS indukálta retinális gyulladás során. Az LPS által kiváltott gyulladás a retinarétegek nagyobb mértékű degenerációját eredményezte a

PACAP KO csoportokban a Wt társaikhoz képest. Ezek az eredmények más kutatócsoportok korábbi adataival is korreláltak, ahol a PACAP KO egerek fokozottabb retina rendellenességeket mutattak az öregedés folyamatában vagy ischaemia során. A Müller gliasejtek fokozott GFAP expresszivitását mutattuk ki az LPS által kiváltott gyulladásban, 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. A PACAP retinoprotektívnek bizonyult a Müller gliasejtek esetén iszkémiás- és excitotoxikus agyi lézióknál is, ahol az interleukin-6 felszabadulását képes stimulálni. 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, az iszkémia által kiváltott vesekárosodás, a glaukóma vagy iszkémiás retinopátia. Jelen kísérletünkben az sICAM-1 aktivációja volt megfigyelhető a PACAP KO egerekben az endotoxin kezelés hatására. A gyulladásos citokinek, köztük a TNF $\alpha$  fokozzák az sICAM-1 citokin termelődését és proinflammatorikus folyamatokat indukálnak, mint például a leukociták gyulladás helyére történő áramlása. Tanulmányok alátámasztják azt is, hogy az exogén PACAP kezelés az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodásnál több szerv esetén is képes volt a megnövekedett sICAM-1 szintet redukálni. A humán MCP-1 neve megegyezik az egerekben JE-vel elnevezett citokinnel, amely expressziós szintje az akut és krónikus gyulladásos betegségeknél, mint például az iszkémiás retinopátia vagy az LPS által kiváltott uveitis jelentősen megemelkedik. Kísérletünknel az LPS kezelés hatására mi is a citokin emelkedett szintjét tapasztaltuk, ahol az endogén PACAP védő hatását mutatva képes volt mérsékelni azt. 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. Ezen vizsgálatok összhangban vannak a jelen tanulmányunkban tapasztaltakkal, ahol a pAKT és a pGSK csökkenése fokozottabb volt az LPS-sel kezelt PACAP KO csoportban. Ebből arra következtetünk, hogy az endogén PACAP a PI3K/Akt útvonal aktiválásán keresztül gyulladáscsökkentő szerepet játszik az LPS által. Számos tanulmány igazolta azt is, hogy az exogén módon alkalmazott PACAP fontos szerepet játszik a látás funkciójának megőrzésében. Korábbi megfigyelésekhez hasonlóan ERG kísérletünknel mi is azt tapasztaltuk, hogy az endotoxin kezelés által kialakított gyulladás a látás funkciójának jelentős zavarát eredményezi. Az endogén PACAP megakadályozta az a-hullám amplitúdójának csökkenését,

ezzel igazolva a fotoreceptor sejtek működésére gyakorolt védő hatását LPS által indukálta retinális gyulladás során. Az LPS miatt bekövetkező b-hullám amplitúdójának csökkenése a Müller-gliasejtek működési zavarából ered, amely az endogén peptid jelenlétében mérsékelt redukciót mutatott a PACAP génhiányos állatokhoz viszonyítva. Jelen tanulmányunkkal sikerült igazolnunk, hogy az endogén PACAP a természetes immunvédelem fontos részét képezi a retinális gyulladás során.

## **V. 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-inflammatórikus 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-inflammatórikus 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.



## 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 docent, aki mindenkor önzetlenül; időt és energiát nem kímélve támogatott és elindított tudományos munkám kibontakozását, segítette szakmai fejlődésemet, valamint megszerettette velem a kutatói pályát. Továbbá köszönöm a sok segítséget **Dr. Kovács Krisztina** egyetemi docensnek, aki a biokémiai vizsgálatokban és azok módszertanának elsajátításában nyújtott fáradhatatlan segítséget. Köszönetemet fejezem ki **Dr. Kocsis Béla** egyetemi docensnek is, aki kifogyhatatlan mennyiségű lipopoliszahariddal nyújtott támogatást a kísérleteim elvégzéséhez. Hálásan köszönöm a sok segítséget **Szabó Edinának**, egyetemi tanársegédnek, barátomnak az időt és fáradságot nem kímélő közösen eltöltött kísérletezéseinkért, valamint a mindenkor mellettem álló támogatásáért. Köszönettel tartozom **Kővári Petra** és **Farkas Kinga** TDK hallgatónak, akik a kezdetektől fogva mellettem álltak és segítették kutatásom előre haladását. Köszönettel tartozom az **Anatómiai Intézet** valamennyi dolgozójának, és kiemelten a **Retina Kutatócsoport** tagjainak, akik lehetővé tették szakmai tanácsaikkal és segítségükkel tudományos munkám és kísérleteim előremenetelét. Kiemelt köszönettel és hálával tartozom a **Családom** felé is, akik mindig mindenben a 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, FIKPII, .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.*

### **Az értekezés alapjául szolgáló (összesített impact faktor (IF): 4,986):**

- **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/

### **Az értekezés témájához nem illeszkedő egyéb közlemények (összesített IF: 27,351)**

- Kovács K, **Váczy A.** Fekete K, Kővári P, Atlasz T, Reglődi D, Gábiel 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., Jámbor 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, Reglődi 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.**