

# **Különböző neuropeptidok protektív szerepe retinális károsodások esetén**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Szabó Edina Ivett



Témavezetők: Dr. Atlasz Tamás, egyetemi docens  
Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár  
Doktori Iskola vezetője: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár  
Programvezető: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar  
Anatómiai Intézet

Pécs, 2022

# Tartalomjegyzék

1 Bevezetés .....	6
1.1 A látószerv felépítése .....	6
1.2 Iszkémia okozta retinális károsodások, a kétoldali arteria carotis communis okklúzió.....	9
1.3 Glaukóma .....	11
1.3.1 Ismert glaukóma típusok .....	11
1.3.2 Különböző glaukóma állatmodellek.....	13
1.4 A vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP)/szekretin/glukagon peptidcsalád .....	15
1.5 A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP).....	16
1.5.1 A PACAP előfordulása.....	17
1.5.2 A PACAP hatásai .....	18
1.5.3 A PACAP receptorai .....	18
1.6 A vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP).....	19
1.7 TAT .....	20
1.8 A VIP/szekretin/glukagon peptidcsalád lehetséges alkalmazási módszerei .....	21
1.9 A retina in vivo vizsgálati módszerei.....	22
1.9.1 Optikai koherencia tomográfia (OCT) .....	22
1.9.2 Elektroretinográfia (ERG) .....	23
2 Problémafelvetés.....	25
3 Célkitűzések.....	26
4 Kísérlet I – PACAP-TAT és VIP-TAT protektív szerepének vizsgálata iszkémiás modellben.....	27
4.1 Anyagok és módszerek .....	27
4.1.1 Kísérleti állatok .....	27
4.1.2 BCCAO által kialakított retina degenerációs modell és szemcseppes kezelés .....	27
4.1.3 A retina minták szövettani analízise.....	28
4.1.4 Statisztikai analízis .....	29
4.2 Eredmények.....	30

4.2.1 A retina morfológiai változása a PACAP-TAT és VIP-TAT szemcsepp kezelést követően BCCAO modellben .....	30
4.2.2 A retina morfometriai analízise PACAP-TAT szemcsepp kezelést követően BCCAO modellben .....	31
4.2.3 A retina morfometriai analízise a VIP-TAT szemcsepp kezelést követően BCCAO modellben .....	33
4.3 Diszkusszió .....	35
5 Kísérlet II – PACAP szemcsepp protektív hatásának vizsgálata glaukóma modellben.....	38
5.1 Anyagok és módszerek .....	38
5.1.1 Kísérleti állatok .....	38
5.1.2 Mikrogyöngy-indukálta glaukóma modell .....	38
5.1.3 A szemnyomás monitorozása és a szemcseppes kezelés .....	39
5.1.4 Optikai koherencia tomográfia vizsgálat.....	39
5.1.5 A retina minták rutin morfológiai és morfometriai analízise .....	40
5.1.6 Immunhisztokémia .....	41
5.1.7 Whole-mount retina minták.....	41
5.1.8 Elektroretinográfia.....	42
5.1.9 Statisztikai analízis .....	43
5.2 Eredmények.....	44
5.2.1 A PACAP szemcsepp hatása az szemnyomás változására.....	44
5.2.2 A PACAP szemcsepp hatása a retina szöveti szerkezetére .....	45
5.2.3 Az immunhisztokémiai jelölések eredményei.....	47
5.2.4 Elektroretinográfia (ERG) eredményei .....	49
5.3 Diszkusszió .....	51
6 Új eredmények összefoglalása.....	55
7 Irodalomjegyzék .....	56
8 Publikációs lista .....	72
8.1 Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények .....	72
8.2 Egyéb tudományos közlemények.....	72
9 Köszönetnyilvánítás.....	75

## Rövidítések jegyzéke

AC: adenylate cyclase, adenilát-cikláz

ADNP: activity-dependent neuroprotective protein, aktivitásfüggő neurotróf fehérje

BCCAO: bilateral common carotid artery occlusion, kétoldali arteria carotis communis okklúzió

BDNF: brain-derived neurotrophic factor, agyi eredetű növekedési faktor

BSA: bovine serum albumin, szarvasmarha szérum albumin

Brn3a: brain-specific homeobox/POU domain protein 3A

cAMP: cyclic adenosine monophosphate, ciklikus adenzin-monofoszfát

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium, Dulbecco szerint módosított Eagle médium

DPPIV: dipeptidyl peptidase IV, dipeptidil-peptidáz IV enzim

ERG: electroretinography, elektroretinográfia

GCL: ganglion cell layer, stratum gangliosum, ganglionsejtek rétege

GFAP: glial fibrillary acidic protein, gliális fibrilláris savas fehérje

GHRH: growth-hormone releasing hormone, növekedési hormont szabályozó hormon

GIP: glucose-dependent insulintropic polypeptide, glükóz-függő inzulinotróp polipeptid

GLP: glucagon-like peptide, glükagonhoz hasonló peptid

HIV-1: human immunodeficiency virus 1, humán immundeficiencia vírus 1

ILM: inner limiting membrane, membrana limitans interna, belső határmembrán

IL-6: interleukin 6, interleukin-6

INL: inner nuclear layer, stratum granulosum internum, belső magvas réteg

IOP: intraocular pressure, belső szemnyomás

IPL: inner plexiform layer, stratum plexiforme internum, belső rostos réteg

MCAO: middle cerebral artery occlusion, arteria cerebri media okklúzió

NDS: normal donkey serum, normál szamár szérum

NFL: nerve fibre layer, stratum fibrarum nervearum, optikus rostok rétege

OCT: optical coherence tomography, optikai koherencia tomográfia

OLM: outer limiting membrane, membrana limitans externa, külső határmembrán

ONL: outer nuclear layer, stratum granulosum externum, külső magvas réteg

OPL: outer plexiform layer, statum plexiforme externum, külső rostos réteg

PAC1: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor, hipofízis adenilát-cikláz receptor 1

PACAP: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid

PBS: phosphate-buffered saline, foszfát pufferelt sóoldat

PE: pigment epithelium, stratum pigmenti retinae, pigmenthám

PHM: peptide histidine methionine, hisztidin – metionin peptid

PI: propidium iodide, propídium-jodid

PL: photoreceptor layer, stratum bacilli et coni, fotoreceptorok rétege

SD: Sprague Dawley patkánytörzs

SEM: standard error of mean, középérték közepes hibája

SHAM: placebo surgery group, áloperált csoport

SOCB: solutio ophthalmica cum benzalkonio

TAT: transactivator of transcription, transzkripció transzaktivátor

TrkB: tropomyosin receptor kinase B, tropomiozin receptor kináz B

VIP: active intestinal polypeptide, vazoaktív intesztinális polipeptid

VPAC1: vasoactive intestinal polypeptide receptor 1, vazoaktív intesztinális peptid receptor 1

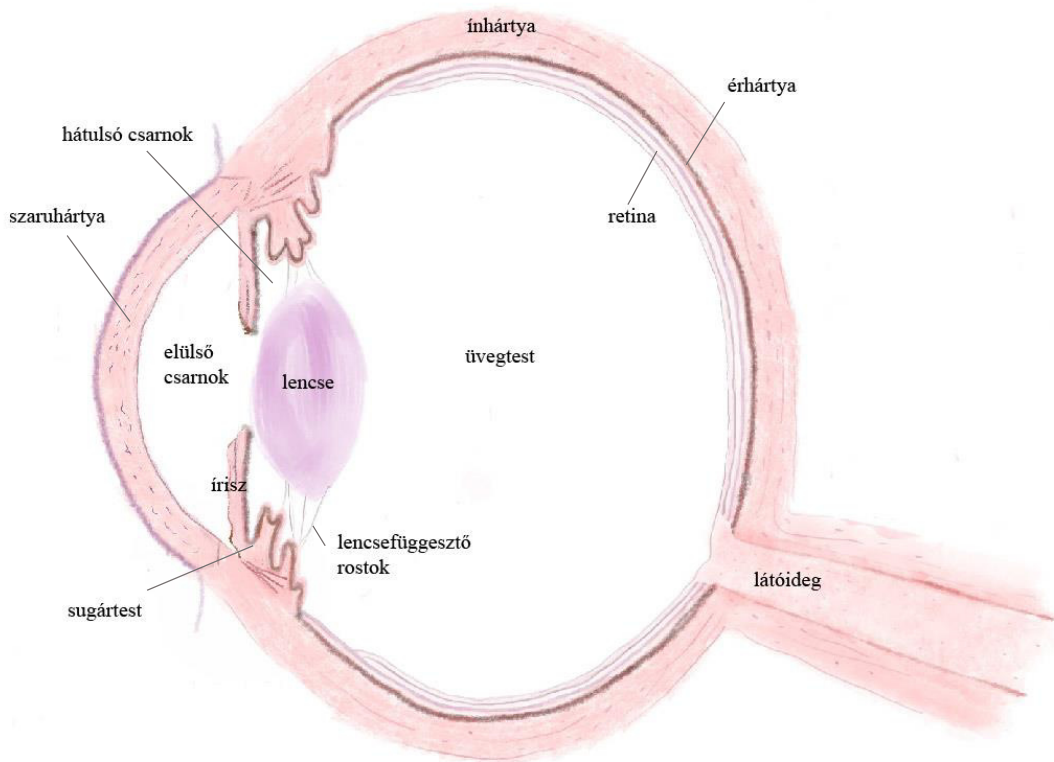
VPAC2: vasoactive intestinal polypeptide receptor 2, vazoaktív intesztinális peptid receptor 2

4VO: 4 vessel occlusion, négy ér elzárás modell

# 1 Bevezetés

## 1.1 A látószerv felépítése

Az emlős látószerv egy összetett érzékszerv, mely a szemgolyóból (*bulbus oculi*), a látóidegből (*nervus opticus*) és számos járulékos szervből áll (1. ábra). A szemgolyót három burok határolja. A burkokon belül helyezkednek el a szemcsarnokok, a lencse és az üvegtest. A szem külső, rostos burkát a szem belső nyomása tartja feszesen. Két fő részt különböztetünk meg, hátrafelé tekint az ínhártya (*sclera*), előrefelé az ínhártyába óraüvegszerűen illeszkedő szaruhártya (*cornea*). A középső burok vagy érhártya (*choroidea*) a szemgolyó hátsó kétharmadát borítja, dús érhalózata felelős a retina külső rétegeinek oxigénellátásáért. Az érhártya előrefelé a sugártestben (*corpus ciliare*) folytatódik, a kettő közötti határvonalnak az ora serratát tekintjük. A középső burok elülső része a szivárványhártya (*iris*), mely egy gyűrűszerű lemez, ami a szemcsarnokot két részre osztja. Középen helyezkedik el a pupilla, ami a megvilágítás mértékétől függően változtatja átmérőjét (Szentágothai és Réthelyi 2002). A szem elülső csarnoka a szaruhártya és a szivárványhártya között található, míg a hátsó csarnok a szivárványhártya és a lencse között helyezkedik el. A két csarnok adja a szem elülső szegmensét, mely csarnokvízzel van kitöltve. A csarnokvíz egy áttetsző folyadék, amit a sugártest termel a hátsó csarnokba. Innen a csarnokvíz az elülső csarnok felé áramlik, majd a szivacsos szerkezetű, endothellel borított hálózaton keresztül a Schlemm-csatorna irányába folyik el, ami végül a vénás rendszerbe kerül vissza (Crawley et al. 2012). A szem belső, fényérzékeny burka az ideghártya vagy retina (*recehártya*). Fejlődéstani szempontból a retina az elülső agyhólyag önmagába visszatüremkedett, kettős falú képződményének származéka. A kettős falú serleg külső rétege pigmenthámréteggé (*stratum pigmenti retinae*) alakult, a belső réteg pedig nagyrészt (hátsó 4/5; *pars optica retinae*) idegszervvé differenciálódott. A szem optikai rendszerének segítségével összegyűjtött fényinformációt idegi impulzussá alakítja, amit a látóideg szállít a központ felé (Szentágothai és Réthelyi 2002).

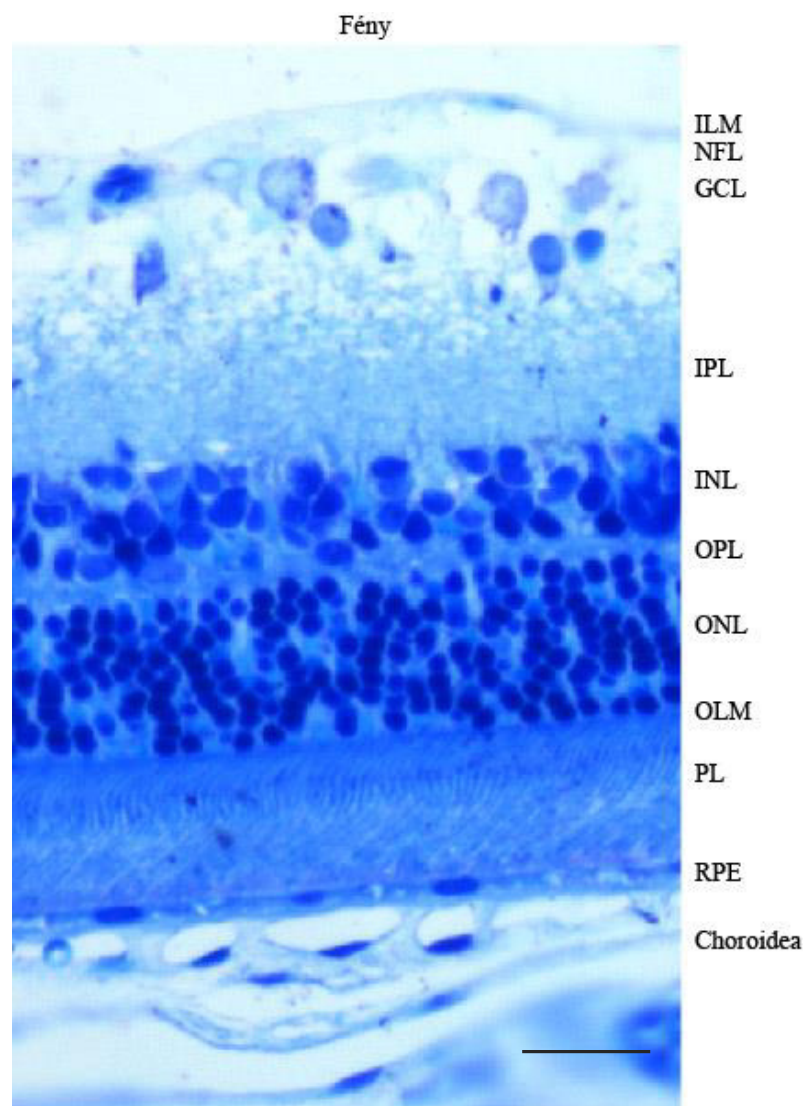


**1. ábra: A szemgolyó felépítésének sémás ábrázolása (forrás: Patko et al. 2022 alapján módosítva)**

A retinán belüli ingerület továbbítás és feldolgozás két síkban történik. A vertikális neuronrendszer a retina síkjára merőleges, az információ továbbításában három neurontípus vesz részt: a fotoreceptorok, a bipoláris sejtek és a ganglionsejtek, melyek axonjai összeszedődve a látóideget hozzák létre. A horizontális neuronhálózat a retina síkjával párhuzamos, a résztvevő neuronok nyúlványai egy rétegen belül maradnak. Ebben az esetben a horizontális- és az amakrin sejtek, a bipoláris sejtekkel egy rétegben foglalnak helyet (Szél 2006).

A retina 10 szövettani rétegből áll (2. ábra). A fény útjának megfelelően, belülről kifelé haladva az üvegtesttel (corpus vitreum) a belső határmembrán (membrana limitans interna, ILM: inner limiting membrane) érintkezik, amit a Müller sejtek belső végtalpai hoznak létre. Ezt követően az optikus rostok rétegét (stratum neurofibrarum, NFL: nerve fiber layer), a ganglionsejtek rétegét (stratum ganglionare, GCL: ganglion cell layer), a belső rostos- (stratum plexiforme internum, IPL: inner plexiform layer) és magvas (stratum granulosum internum, INL: inner nuclear layer) rétegeket találjuk. Az INL réteg

a horizontális-, a bipoláris-, az amakrin-és a Müller sejtek sejttestjeit tartalmazza. A következőkben a külső rostos- (stratum plexiforme externum, OPL: outer plexiform layer) és magvas (stratum granulosum externum, ONL: outer nuclear layer) rétegeket találjuk. Az ONL réteg a fotoreceptorok sejttestjeit tartalmazza. Ezután szintén a Müller sejtek külső nyúlványai által kialakított külső határmembránt (membrana limitans externa, OLM: outer limiting membrane) különböztetjük meg, majd a fotoreceptorok bel- és kültagjainak (stratum bacilli et coni, PL: photoreceptor layer) rétegét találjuk, ahol megtörténik a fényinformáció elektromos jellé való alakítása. Végül a pigmenthám (stratum pigmenti retinae, PE: pigment epithelium) helyezkedik el (Szél 2006) (2. ábra).



**2. ábra:** A patkány retina keresztmetszeti képe toluidinkék festéssel.  
Mérték: 20  $\mu\text{m}$  (forrás: saját kutatási anyag)



A dolgozatban a továbbiakban az angol nomenklatúrából származó rövidítéseket használjuk a szövettani rétegek említésekor (2. ábra).

A rágcsálók retinájának felépítése szinte megegyezik a humán ideghártya felépítésével, így a szemészeti kutatások adekvát célpontjává váltak. Az ideghártya belső rétegeit külön érhálózat, az arteria et vena centralis retinae látja el. Az artéria a látóideg rostjai között fut és lép be a retinába, a véna ugyanitt lép ki a szemgolyóból. A retinális rendszer ellátja a retinát a belső magvas rétegegig vérrel. Az ezen kívüli rétegek vérellátása diffúzió útján történik a choroidea-ban elhelyezkedő ciliaris artériás rendszer felől (Süveges 2010). A retina esetében nincs oxigéntárolás, így folyamatos perfúzióra van szükség. A vérellátás romlásának következményeként iszkémiás károsodás jön létre a retinában, mely a szöveti funkció romlásához, illetve a szövet elhalásához vezet (Hayreh 2001). A szem vérellátása elsődlegesen a fent említett arteria carotis interna ágrendszerén keresztül történik meg, de iszkémia esetén az arteria vertebralis rendszer felől az arteria basilaris részlegesen biztosítja a vérellátást (Szentágothai és Réthelyi 2002).

## 1.2 Iszkémia okozta retinális károsodások, a kétoldali arteria carotis communis okklúzió (BCCAO)

A jelenlegi előregedő társadalmakra jellemzően növekvő problémát jelentenek a kor előrehaladtával megjelenő idegrendszeri, ezen belül látórendszeri neurodegenerációs károsodások. Ezért a retinadegenerációs kutatások egyre nagyobb jelentőséggel rendelkeznek. Ezen kutatások egyik fő irányvonala a metabolikus változások által okozott retinális sérülések, mint például a glaukóma, az iszkémia okozta károsodások, vagy a diabéteszes retinopathia (Osborne et al. 1999).

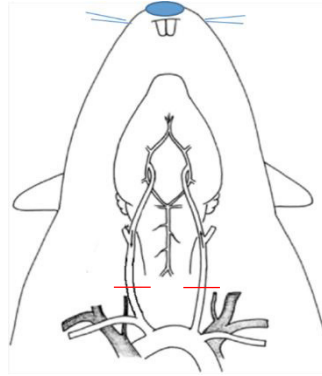
Az iszkémiás állapot során a perfúzió csökkenése miatt az oxigén és az anabolikus metabolitok hiányállapota lép fel vagy katabolikus metabolitok felhalmozódása figyelhető meg. Számos kutatás igazolja, hogy az agyi keringést érintő vérellátási zavarok idegrendszeri károsodáshoz vezetnek (Trick és Berkowitz 2005). A humán retinális iszkémia modellezés akadályá, hogy a különböző fajokban eltérő a vaszkularizáció megjelenése. A laboratóriumi munka során a leggyakrabban felhasznált fajok közül a patkányok retinája rendelkezik hasonló szerkezettel, mint a humán retina (Osborne et al. 2004). A patkányban történő akut iszkémia modellezése hasonló patofiziológiával rendelkezik, mint az emberi arteria carotis communis akut elzáródása (Spertus et al.

1984). Korábbi tanulmányok számos kísérleti modellt használnak a retinális iszkémia tanulmányozására. Gyakran használt tranziens modell a szem belső nyomásának megemelése (Seki et al. 2011). Különböző iszkémiás állatmodelleket a retina vérellátását biztosító erek átmeneti vagy permanens okklúziójával alakítanak ki. Az arteria centralis retinae elzárásával és a látóideg együttes, átmeneti lekötésével izolált retinális iszkémia hozható létre (Kuroiwa et al. 1998). Az arteria cerebri media lekötése (MCAO) során fokális cerebrális iszkémia jön létre, mely során a retina, az írisz, az érhártya és a sugártest vérellátása egyaránt érintett (Steele et al. 2008). A négy ér elzárás modellben (4VO) a kétoldali arteria vertebralis és carotis communis egyidejű okklúziója történik, így komplett iszkémia idézhető elő (Stetler et al. 2010).

A retinában az iszkémia létrehozásához elegendő a perfúzió részleges csökkenése, nem szükséges a vérellátást biztosító erek teljes elzárása. A retinális iszkémia (pl. magas belső szemnyomás, diabéteszes retinopathia, arteria centralis retinae okklúzió) modelljei közül a kétoldali arteria carotis communis elzárása (3. ábra) (bilateral common carotid artery occlusion; BCCAO) az egyik leggyakrabban használt állatmodell (Osborne et al. 2004; Hayreh et al. 2004; Flammer és Mozaffarieh 2007; Atlasz et al. 2010; Szabadfi et al. 2012b; Vaczy et al. 2016; Werling et al. 2017). Iszkémia során a perfúziós zavar miatt kezdetben a szöveti funkció romlása, majd a szövet elhalása figyelhető meg. Mivel a szervezetünk egyik legnagyobb folyamatos oxigénellátást igénylő szöve az ideghártyánk, ennek következtében már a perfúzió csökkenése is retinális diszfunkciót okoz (Hayreh 2001; Trick és Berkowitz 2005). A BCCAO létrehozása lehet rövid idejű- vagy végleges. Az arteria carotis communis-ok permanens lekötése retinális hipoperfúziót idéz elő, melynek következtében patkány BCCAO modellben csökkent agyi vérellátás figyelhető meg. A lecsökkent agyi keringés mellett az arteria basilaris rendszerén keresztül a vérellátás egy része biztosított marad, azonban ennek következtében inkomplett iszkémia jön létre, ami a retina vérellátásában súlyos zavarokat okoz. Ezen iszkémiás retina degenerációs modell alkalmazásakor a retina morfológiája bizonyíthatóan megváltozik, valamint a funkció is jelentősen csökken (Block et al. 1992; Osborne et al. 2004; Szabadfi et al. 2010). A modell számos humán retinát érintő betegség folyamatait reprodukálhatja (pl.: artériás okklúzió, diabéteszes retinopathia) (Chen és Miller 2007).

Kutatócsoportunk ezidáig több tanulmányban is vizsgálta a BCCAO modellt. Kéthetes posztoperatív időszak után a szövettani eredményeink a retinális rétegek vastagságbeli csökkenését mutatták, a legnagyobb mértékű károsodás a rostos rétegekben

volt detektálható. Több esetben látható volt a magvas rétegek (ONL, INL) összeolvadása a külső rostos réteg (OPL) eltűnése miatt. Jellemzően a GCL rétegben is szignifikáns sejtszámcsökkenés volt megfigyelhető (Atlasz et al. 2007a, b; Szabadfi et al. 2009; Mester et al. 2009; Vaczy et al. 2016; Werling et al. 2016).



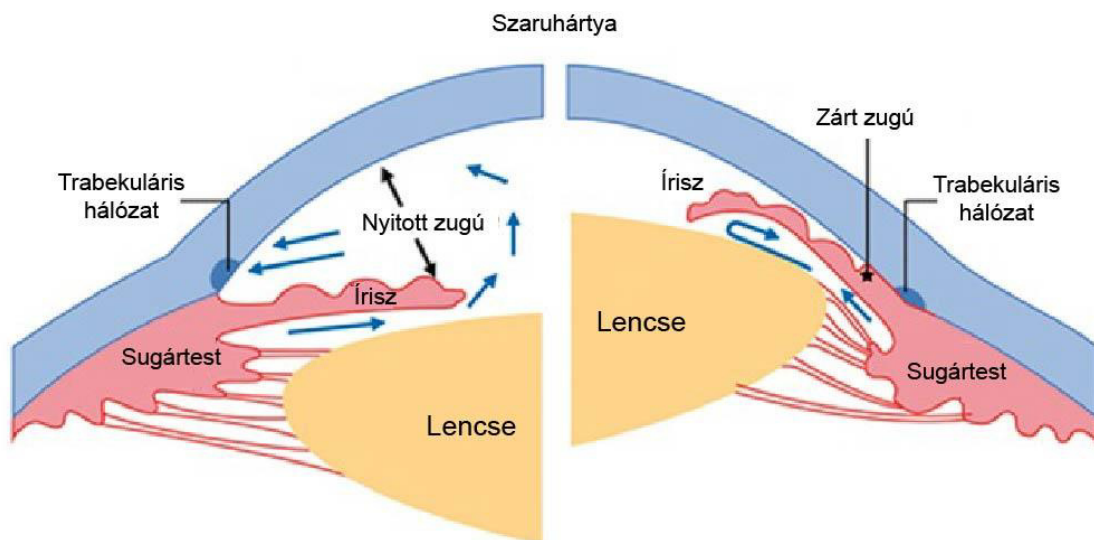
**3. ábra: A BCCAO műtét sematikus ábrázolása.** Az ábrán a piros vonalak az *arteria carotis communis*-ok elzárását reprezentálják. (forrás: León-Moreno et al. 2020 alapján módosítva)

## 1.3 Glaukóma

### 1.3.1 Ismert glaukóma típusok

A glaukóma vagy zöldhályog egy heterogén betegségcsoport összefoglaló neve, egyike az opticus neuropathiáknak. Jellemzően a retinális ganglionsejtek és azok axonjai sérülnek a betegség progresszív lefolyása során, ezáltal kezdetben a látás funkciójának csökkenése, későbbiekben pedig a látás irreverzibilis elvesztése figyelhető meg. Napjainkban körülbelül 67 millió embert érint a glaukóma valamely formája (Mantravadi és Vadhar 2015). Hozzávetőlegesen 4,5 millió vak beteg esetében a zöldhályog okozta a látásvesztést. Ezzel ez a betegség a második szemészeti kórkép, ami vaksághoz vezet (Quigley 2006; Johnson és Tomarev 2010). A glaukóma kórkép esetén alapvetően primer és szekunder formát különböztetünk meg. A szekunder típus esetében a glaukóma más szemészeti vagy általános betegséghez kapcsolódik. Mindkét csoporton belül két további altípust találunk a csarnokzug, illetve az írisz és a cornea által bezárt, iridocornealis szög alapján (nyitott- és zárt zugú glaukóma, 4. ábra). Az elsődleges nyitott zugú glaukóma esetében az iridocornealis szög nyitott, de a csarnokvíz elfolyása akadályoztatott, ennek

hatására emelkedik meg az belső szemnyomás (intraocular pressure, IOP) (Mantravadi és Vadhar 2015). A szemnyomás emelkedése általában nem jár fájdalommal. A megemelkedett IOP kezdetben a látóideg külső régiójának károsodását okozza, mely a perifériás látáscsökkenést magyarázza. A krónikus szemnyomás emelkedés károsítja a látóideg középső régióját, így a centrális látótér kiesését okozza (Vidal-Sanz et al. 2012). A zárt zugú glaukóma esetében az iridocornealis szög túl kicsi, a lencse az íriszhez nyomódik ezáltal akadályozva a csarnokvíz elfolyását. Ebben az esetben hirtelen emelkedik a belső szemnyomás, mely fájdalmat, szem kipirosodást és a centrális látótér kiesését okozza (Mantravadi és Vadhar 2015).



**4. ábra: A nyitott és a zárt zugú glaukóma szematikusan ábrázolása** (forrás: Wiggs és Pasquale 2017 alapján módosítva)

Az egyik leggyakrabban előforduló típus az elsődleges nyitott zugú glaukóma, ahol a progresszió számos tényezővel magyarázható, úgymint a megemelkedett belső szemnyomás, az életkor, a szaruhártya vastagsága, a genetikai hajlam vagy a hosszútávú szteroid kezelés (McMonnies 2017). A patogenezis hátterében az endothellel bélelt trabekuláris hálózat elzáródása figyelhető meg. Normál anatómiai körülmények között a csarnokvíz ezen a hálózaton keresztül folyik el a Schlemm-csatorna felé. Glaukóma esetében a trabekuláris hálózat elzáródik, ami a csarnokvíz felhalmozódásához vezet az elülső csarnokban. A megnövekedett mennyiségű csarnokvíz pedig a szemnyomás emelkedését okozza, ami végül a látóideg sérüléséhez vezet (Morgan és Tribble 2015).

Egy másik fontos kockázati tényező a genetikai hajlam. A myocilin nevezetű gént azonosították először, mint a glaukómáért felelős gén (Chitranshi et al. 2018). Az utóbbi években kiderült, hogy a genetikai determináltság mellett a gyógyszeres kezelések mellékhatásaként is megjelenhet a zöldhályog. Bizonyított, hogy hosszútávú glükokortikoid kezelés is elsődleges nyitott zugú glaukómához vezethet (Dey et al. 2018).

A harmadik glaukóma típus a normotenzív glaukóma, amikor a belső szemnyomás mértéke nem változik. Ebben az esetben a retinális ganglionsejtek károsodásának mechanizmusa ismeretlen, jelenleg genetikai eredetű hiperszenzitivitással magyarázzák (Trivli et al. 2018). Az orvostudomány jelenlegi állása szerint a zöldhályog nem gyógyítható, de a korai felismerésével és megfelelő terápiával a funkcionálisan jelentős látásromlás lassítható.

### 1.3.2 Különböző glaukóma állatmodellek

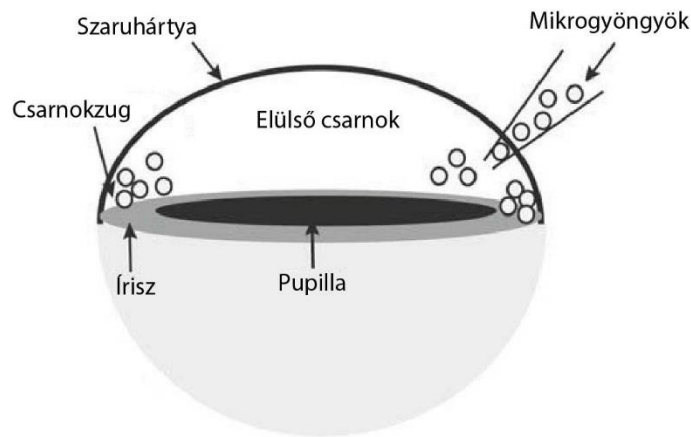
Multifaktoriális betegségként a glaukóma számos molekuláris útvonalon keresztül valósul meg. A pontos molekuláris okok vizsgálata nehezen kivitelezhető humán betegekben, ezért a patomechanizmusok megértéséhez szükségesek és elengedhetetlenek az állatmodellek. Többféle állatmodell létezik, melyek segítségével nemcsak a patofiziológia tanulmányozása, de a későbbi lehetséges hatóanyagok tesztelése is megtörténhet. Ismert, hogy rágcsálókban a glaukóma során bekövetkező változások összevethetőek a főemlősök adataival, mivel a csarnokvíz elfolyása hasonlóan történik (Aihara et al. 2003; Morrison et al. 2008; Bouhenni et al. 2012). A glaukóma tüneteinek létrehozásához használt modellek kialakítása többféle úton megvalósítható, legtöbbször a modellek csoportosítása az alapján történik, hogy a csarnokvíz elfolyás útján melyik ponton manipulálunk (Dey et al. 2018).

A szemnyomás emelése lehetséges az elülső csarnokba injektált hialuronsavval (Lerner et al. 1997), paramágneses- vagy polisztirol (későbbi munkánk alapját képező technika) mikrogöngyökkel (Sappington et al. 2010; Samsel et al. 2011) egyaránt (5. ábra). Ebben az esetben a befecskendezett anyag megakad a trabekuláris hálózatban, ami végül a csarnokvíz elfolyásának zavarához és a belső szemnyomás emelkedéséhez vezet. A modell kialakításának egyik nehézsége, hogy többszöri befecskendezésre van szükség a hosszantartó IOP növeléshez (Pang és Clark 2020). A lézeres fotokoaguláció alkalmazásakor a létrejövő sejttörmelék egy membránt hoz létre a trabekuláris hálózat terében, ezzel akadályozva a csarnokvíz áramlását (Levkovitch-Verbin et al. 2002). Az

emelkedett szemnyomás csak a lézeres kezelés ideje alatt áll fenn. A modell hatékonyságát ronthatja, hogy a lézer alkalmazása fokozhatja a trabekuláris hálózat sejtostódását, ami a regeneráció fokozódásához és a csarnokvíz kiáramlás emelkedéséhez vezet (Dey et al. 2018). Szintén korlátozza a lézer felhasználását, hogy a másodszori alkalmazás szövődményeket okozhat, mint a szemszárazság, a szaruhártya elhomályosodása, a szürkehályog kialakulása vagy akár magasabb halálozási arány (Kwong et al. 2011).

A vírusvektor kezelés egy új módszer a glaukóma modellezésében. A szemnyomás emelés hatékonysága nagymértékben függ a kísérleti állattörzstől és a kortól egyaránt. Mivel a metodika kivitelezéséhez speciális műszerekre és felszerelésre van szükség, ez nagymértékben megnöveli a kutatás költségeit (Almasieh et al. 2012). Szerkezetileg és funkcionálisan a humán glaukómához hasonló modell az episzklerális vénák fotokoagulációval történő elzárásakor hozható létre (Ueda et al. 1998). Az előbbi metodika az egyik legkorábbi hipertenzív glaukóma modell (Urcola et al. 2006). Az IOP növekedés előidézhető a vénás rendszerbe injektált hipertóniás sóoldattal, ami a ganglionsejtek elhalását és a látóideg axonjainak elvesztését okozza. Mindeközben a trabekuláris hálózat szklerotikus elváltozása figyelhető meg, ami végül az intraokuláris nyomás emelkedéséhez vezet (Joos et al. 2010). Az episzklerális vénák közvetlen lektőzése is az IOP emelkedéséhez vezet (Pang és Clark 2020).

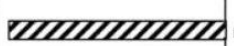
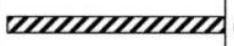
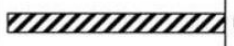







A csarnokvíz elfolyási irányát tekintve a trabekuláris hálózat utáni képleteket érintő beavatkozások előnye, hogy egyszeri műtéttel megfelelő hatékonysággal előidézhető a zöldhályog. Ezekben az esetekben a neuroprotektív szerek hatékonyságának vizsgálata kedvező. Hátránya, hogy a vénás elvezetés elzáródása iszkémiát okozhat a retinában. A fokozódó neovaszkularizáció megváltoztathatja a zöldhályog patofiziológiáját és különböző védőmechanizmusokat indukálhat a retina sejtjeiben (Dey et al. 2018). Ismert, hogy kortikoszteroid kezelések mellékhatásaként okuláris hipertónia jöhet létre. Így a kortikoszteroidok alkalmazása egy egyszerű lehetőséget nyújt a glaukóma modellezésére (Overby és Clark 2015; Dey et al. 2018). Végül több kutatás foglalkozik transzgenikus rágszáló modellekkel, mint például a DBA/2J, Tg.Collal, Tg.Tyr 423 His valamint Tg.MYOCY437H egerek. Esetükben a szemnyomás kismértékű emelkedése a limitáló tényező, illetve az hogy a törzsek kialakítása munka- és költségigényes (Senatorov et al. 2006; Zhou et al. 2008; Zode et al. 2011; Pang et al. 2015; Pang és Clark 2020).



**5. ábra: A mikrogyöngy-indukálta glaukóma modell sematikus ábrázolása**  
(forrás: Calkins et al. 2018 alapján módosítva)

#### 1.4 A vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP)/szekretin/glukagon peptidcsalád

A vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP)/szekretin/glukagon peptidcsalád (6. ábra) kilenc peptidet/hormont foglal magában, melyek hasonló szerkezetük, eloszlásuk, funkciójuk és hét transzmembrán domént tartalmazó receptoraik alapján kerültek osztályozásra. A peptidcsalád tagjai a glukagon, a glukagonhoz hasonló peptid (glucagon-like peptide, GLP) - 1 és 2, a növekedési hormont szabályozó hormon (growth-hormone releasing hormone, GHRH), a VIP, a hisztidin – metionin peptid (peptide histidine methionine, PHM), a szekretin, a glükóz-függő inzulinotróp polipeptid (glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GIP) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PACAP) (Arimura és Shioda 1995; Lee et al. 2007). A szuperfamilia tagjainak eredete a gerinctelenek megjelenésével azonos időszakra tehető, a legősibb és leginkább konzervált tagja a glukagon és a PACAP (96% 700 millió év alatt) (Sherwood et al. 2000).

<b>PACAP</b>		<b>27</b>
<b>Secretin</b>		<b>27</b>
<b>PHM</b>		<b>27</b>
<b>VIP</b>		<b>28</b>
<b>Glucagon</b>		<b>29</b>
<b>GLP- 1</b>		<b>30</b>
<b>GLP- 2</b>		<b>35</b>
<b>PACAP</b>		<b>38</b>
<b>GIP</b>		<b>42</b>
<b>GRF</b>		<b>44</b>

**6. ábra:** *A peptidcsalád tagjai aminosav hosszúság szerint (forrás: Sherwood et al. 2000 alapján módosítva)*

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

Miyata és munkatársai 1989-ben izolálták elsőként a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet (PACAP) birka hipotalamuszból. Emlős szervezetben két biológiailag aktív formája van jelen, a 27 és a 38 aminosav hosszúságú izoforma. A PACAP élettani hatásáról kezdetben a hipofízisben kifejtett adenilát-cikláz (AC) aktiváló, illetve a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) emelő hatását bizonyították (Miyata et al. 1989, 1990). A két izoforma N-terminálisa megegyezik (Miyata et al. 1990). Az emlős szervezetben túlnyomórészt a 38 aminosav hosszúságú forma található meg (Arimura et al. 1991; Vaudry et al. 2009). A rövidebb izoforma 68%-os homológiát mutat a VIP-pel, de az adenilát-cikláz aktiváló hatásuk között nagyságrendi különbségek mutatkoznak (Vaudry et al. 2009). A polipeptid aktív N-terminális vége extrém módon konzervált maradt a filogenezis során (Sherwood et al. 2000). Az aminosav szekvencia emlősökben teljesen azonos, az alacsonyabb rendű gerinceseknél 1-4 aminosav eltérés jellemző (Vaudry et al. 2000; Vincze és Köves 2001). A konzervált szekvencia bizonyítja, hogy a PACAP alapvető élettani folyamatokban fontos szereppel bír (Sherwood et al. 2000; Reglodi et al. 2019). 1992-ben, Hosoya és munkatársai igazolták, hogy a humán PACAP génjéről egy 176 aminosav hosszúságú prepro-PACAP íródik át. A két izoforma erről a prekuzorról egymástól független módon hasítódik le (Hosoya et al. 1992). A PACAP bontásáért a dipeptidil-peptidáz IV enzim felel, a szisztémás keringésben a PACAP



féléletideje mindössze néhány perc (Zhu et al. 2003; Bourgault et al. 2008). A PACAP biológiai hozzáférhetősége és a gyors lebomlása korlátozza a terápiás alkalmazás lehetőségét, emiatt kutatócsoportunk a rövidebb fragmensek és PACAP analógok hatását vizsgálta retinális hipoperfúzió esetén. Ismert, hogy az N terminálisan rövidebb fragmensek általában antagonistá hatással rendelkeznek, de vannak olyan kutatások, melyek sejt- és szövetfüggő módon agonista hatást írtak le (Reglodi et al. 2008; Bourgault et al. 2008, 2011; Dejda et al. 2011; Werling et al. 2014; Walker et al. 2014). Korábban igazoltuk, hogy a PACAP 6-38 antagonistá súlyosbítja a retina excitotoxikus lézióját (Atlasz et al. 2009). Ellenben a C terminálisan rövidebb fragmensekre az jellemző, hogy különböző erősséggel kötődnek a receptorokhoz (Dejda et al. 2011). Ezért vált fontossá az eltérő hosszúságú fragmensek vizsgálata (Werling et al. 2014).

### 1.5.1 A PACAP előfordulása

A PACAP felfedezését követően a korai vizsgálatok a hipotalamuszban mutatták ki a legnagyobb koncentrációban. Jelenlegi ismereteink szerint nagy mennyiségben fordul elő a központi idegrendszerben és a perifériás idegrendszerben, de a perifériás szervekben is kimutatható (Tsuchida et al. 2014; Bonaventura et al. 2018; Lugo et al. 2019; Toth et al. 2020). A peptid jelenlétét azonosították többek között nyirokszervekben, a méhben, az emlőben és a petefészekben, a herében, a mellékvesében és a hasnyálmirigyben is (Vaudry et al. 2009). Számos szervrendszer (emésztőtraktus, kardiovaszkuláris rendszer, légzőrendszer, immunrendszer) esetében is igazoltak PACAP tartalmú sejteket és idegrostokat (Uddman et al. 1991b, a; Gaytan et al. 1994; Czeglédi et al. 2011; Jansen-Olesen és Hougaard Pedersen 2018). A PACAP a szem számos szövetében szintén kimutatható, például a retinában, az íriszben, a szaruhártyában, a sugártestben, de kimutatták jelenlétét a kötőhártyában, az ínhártyában, a könnycsatornában és a ganglion ciliare területén is (Wang et al. 1995; Seki et al. 1997; Shioda et al. 2016). A PACAP-ot és receptorait számos faj (nyúl, patkány, egér) szemében leírták (Wang et al. 1995; Troger et al. 2007). Ismert, hogy a peptid a különböző fajok esetében már az egyedfejlődés nagyon korai szakaszában megjelenik (Mathieu et al. 2005; Denes et al. 2019). A szakirodalomban nagyon kevés adat áll rendelkezésre a humán szemben lévő PACAP és receptorainak eloszlásáról. Évtizedeken keresztül csak Orianas és munkatársai (1997) által publikált eredményekből ismertük, hogy a PACAP megemelte a cAMP szintet a magzati retinában, illetve kimutatható volt a PACAP

mRNS-e a humán retina homogenizátumban (Olianas et al. 1997). Kutatócsoportunk 2022-ben ismertette eredményeit, melyben a PACAP, illetve a specifikus receptor, PAC1 eloszlását mutatta be humán szemben (Patko et al. 2022).

### 1.5.2 A PACAP hatásai

A PACAP egy széles spektrumú hatásokkal rendelkező polipeptid. Bizonyítottan szerepet játszik a neuronális ingerlékenységben (May et al. 2021), a húgyhólyag aktivitásában (Girard et al. 2021), az emésztőrendszer motilitásában és szekréciójában (Reglodi et al. 2018a; Rytel et al. 2020; Karpiesiuk és Palus 2021), a porc- és a csontszövet kialakulásában (Józsa et al. 2021), a reprodukcióban és az embrionális növekedésben (Ross et al. 2018; Köves et al. 2020; Shan et al. 2021), valamint az immunszabályozásban (Abad és Tan 2018). A PACAP egyik legjobban kutatott területe a neuroprotektív és általános citoprotektív hatása, amit számos *in vivo* és *in vitro* kísérletben már bizonyítottak (Reglodi et al. 2011, 2017). A PACAP hatásosnak bizonyult például Parkinson kór, illetve stroke modellekben (Ohtaki et al. 2008; Reglodi et al. 2018b, Zheng et al. 2021), magzati alkohol szindrómában (Shili et al. 2021) és diabéteszes neuropathiában (Kiss et al. 2021). A látórendszer esetében a PACAP fontos a retina fejlődésében és a látás kialakulásában, emellett sokrétű funkcióval is rendelkezik (Atlasz et al. 2016; Pöstyéni et al. 2021). Szerepet játszik a könnytermelésben, megakadályozza a szaruhártya hiperkeratinizációját (Nakamachi et al. 2016), fontos a pupilla méretének szabályozásában (Keenan et al. 2016), illetve részt vesz a cirkadián ritmus szabályozásban (Vereczki et al. 2006). Bizonyított általános protektív hatása mellett Wang és munkatársai (1997) a PACAP gyulladáskeltő hatását írták le a szemben (Wang et al. 1997). A PACAP protektívnek bizonyult excitotoxikus károsodásban (Atlasz et al. 2008, 2009), UV-indukálta degenerációban (Atlasz et al. 2011), diabéteszes- (Szabadfi et al. 2014; Maugeri et al. 2019), iszkémia okozta- és gyulladásos retinopathiak (Atlasz et al. 2010; Vaczy et al. 2018) esetében, valamint koraszülött retinopathiában (Kvarik et al. 2021) egyaránt.

### 1.5.3 A PACAP receptorai

A felfedezése óta eltelt több mint 30 évben bizonyításra került a PACAP széleskörű megjelenése a szervezetben. A PACAP G-protein kapcsolt receptorokon keresztül fejti ki hatását. Szerkezetükre jellemző, hogy hét transzmembrán doménből és

egy intracellulárisan G-proteint kötő doménből épülnek fel (Pisegna és Wank 1993). Receptorai két csoportba oszthatók, a specifikus hipofízis adenilát-cikláz receptor 1 (PAC1), illetve a vazóaktív intesztinális peptid receptor 1 és vazóaktív intesztinális peptid receptor 2 (VPAC1 és VPAC2). A PAC1 receptor a PACAP-ra specifikus, míg a VPAC receptorokat a VIP és a PACAP is egyaránt aktiválja. Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy a PACAP ezerszer nagyobb kötődési affinitást mutat a PAC1 receptorhoz, mint a VIP. A VPAC1 és VPAC2 receptorok esetében az előbb említett peptidek azonos affinitással kötődnek (Laburthe et al. 2007; Vaudry et al. 2009; Moody és Jensen 2021). A VPAC1 és -2 receptorok aktiválódása cAMP vagy ciklikus guanozin-monofoszfát szint emelkedéshez vezet (Murthy et al. 1997; Zhou et al. 2002). A PACAP citoprotektív hatásáért elsősorban a specifikus PAC1 receptor felelős (Somogyvári-Vigh és Reglodi 2004; Botia et al. 2007). A specifikus PAC1 receptort aktiválva az adenilát cikláz, a foszfolipáz C és a protein kináz C által közvetített jelátviteli utak aktiválódnak. Ismert, hogy a PACAP protektív hatása több egymással összefüggő jelátviteli úton keresztül érvényesül (Gábrriel et al. 2019, Langer et al. 2022). A peptid protektív hatása koncentrációfüggést mutat, illetve függ a PAC1 receptor splice sejtípus függő előfordulásától is.

A PACAP receptorok szinte az összes szervrendszerben expresszálódnak, kimutathatók például az idegrendszerben (agy, gerincvelő), az endokrin szervekben (pl. hipofízis), a nyálmirigyekben, a gonádokban, a vesében és a látószervben egyaránt (Vaudry et al. 2009; Shioda et al. 2016). A PACAP specifikus citoprotektív hatásait közvetítő PAC1 receptor a retina összes rétegében kimutatható. Magas expresszió figyelhető meg a GCL és az INL rétegekben, illetve a Müller gliasejtekben, valamint az amakrin sejtekben egyaránt (Seki et al. 1997). Kisebb mértékben kimutatható az IPL, az OPL, az ONL rétegekben és a fotoreceptor sejtek külső szegmensében (Seki et al. 1997; Shioda et al. 2016). A VPAC1 a központi idegrendszeren kívül szintén több szervben expresszálódik (tüdő, máj, lép), míg a VPAC2 receptor a pancreas beta sejtjein, a mellékvese kéregállományában és a gonádokban is megjelenik (Joo et al. 2004; Vaudry et al. 2009).

## 1.6 A vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP)

A PACAP mellett a VIP szintén a VIP/szekretin/glukagon peptidcsalád tagja. Ismert pleiotrófikus tulajdonságáról, valamint neuromodulátor és neuroprotektív hatással

is rendelkezik. Elsőként 1970-ben izolálták sertés vékonybélből, elnevezését a vazodilatatív hatásáról kapta (Said és Mutt 1970). A neuropeptid 28 aminosavból áll, mely szerkezeti hasonlóságot mutat a PACAP-pal (Miyata et al. 1990). Szerteágazó szisztémás hatásokkal rendelkezik, köztük fontos szerepe van a neuronális fejlődésben és a veleszületett és szerzett immunitásban (Moody et al. 2003). A PACAP-hoz hasonlóan kimutatható a perifériás és a központi idegrendszer több területén, a cortexben, a hippocampusban, az amygdalában, a hipotalamuszban és a suprachiasmaticus magban. Bizonyítottan szerepet játszik a kognitív folyamatokban, a tanulásban és a memória kialakulásában (Lorén et al. 1979; Acsády et al. 1996; Fahrenkrug és Hannibal 2004; Gozes 2008; Harmar et al. 2012). Hatása szintén a VPAC1 és -2, illetve a PAC1 receptorokon keresztül érvényesül. Mindhárom receptoron keresztül képes kifejteni retinoprotektív hatását, de a PACAP specifikus (PAC1) receptorhoz ezerszer gyengébb affinitással kötődik, mint a peptidcsalád fentebb említett tagja. A retinopathia esetén a VIP szintén retinoprotektív hatással rendelkezik, mint a PACAP, csak többszörös koncentrációban kell alkalmazni (Szabadfi et al. 2012b).

## 1.7 TAT

A transzkripciós transzaktivátor (TAT) 11 aminosavból álló peptid, mely a sejtbe való penetrációs képessége miatt került a kutatások középpontjába. Az elmúlt évtizedben számos publikáció foglalkozott azzal, hogy a humán immundeficiencia vírus 1 (HIV-1) fehérjéből származó TAT peptidhez különböző biológiailag aktív molekulákat kapcsolva milyen mértékben lehet fokozni a sejtbe való penetrációt. A TAT egyfajta transzdukciós domén, mely képes hatékonyan áthaladni a sejtmembránokon, akár önmagában, akár más molekulákkal összekapcsolva. A TAT nemcsak különböző típusú molekulákat (peptidek, nagyméretű fehérjék, DNS) tud átvinni különböző sejttypusokba, hanem számos biológiai barrieren keresztül is képes átvinni a kapcsolódó molekulákat (Fittipaldi és Giacca 2005; Kleemann et al. 2005; Dietz 2011).

Korábbi kutatások bizonyították, hogy a PACAP és a VIP is képes átjutni a vér-agy gáton (Schwarze et al. 1999; Dogrukol-Ak et al. 2004; Werling et al. 2017). A központi idegrendszerben való alkalmazásukat azonban nehezíti, hogy nagyon gyorsan lebomlanak (Zhu et al. 2003). Yu és munkatársai több ízben bizonyították, hogy a PACAP és a VIP TAT-hoz kapcsolva hatékonyabban jutnak át a biológiai barrieren (Yu et al. 2012b, a, 2014). A VIP C-terminálisához kötött TAT peptidet fluoreszcens jelölést

követően intraperitoneálisan egerekbe injektálták, majd a vér-agy gáton való átjutását vizsgálták. Eredményeik szerint a VIP-TAT fehérje egyrészt hatékonyabban penetrál a vér-agy gáton, másrészt hatékonyabb protekcióra képes scopolamin-indukálta amnéziában. Szintén bizonyításra került, hogy a TAT kapcsolt peptid nagyobb affinitással kötődött a PAC1 receptorhoz, mint a VIP önmagában (Yu et al. 2014).

## 1.8 A VIP/szekretin/glukagon peptidcsalád lehetséges alkalmazási módszerei

Mind a PACAP, mind a VIP igazoltan széleskörű biológiai hatással rendelkezik. A peptidek receptorainak splice variánsai életkor-, környezet- és szövetfüggő módon expresszálódnak, ezzel is növelve a biológiai hatások változatosságát (El Zein et al. 2008; Shi et al. 2010). A terápiás lehetőség a peptidek neuroprotektív és általános citoprotektív hatásának köszönhető (Reglodi et al. 2012). Vizsgálataink szempontjából legfőképp a különböző retinadegenerációs modellekben kifejtett pozitív hatásokkal foglalkozunk. Ezen adatok alapján a vizsgált peptidek az idegrendszer trofikus faktorának tekinthetőek (Maduna és Lelievre 2016). Exogén módon történő alkalmazásuk az idegrendszeri kóros állapotok kezelésében terápiás potenciállal bírnak. A továbbiakban a peptidek lehetséges, természetben is megjelenő alkalmazási módjaira szeretnénk kitérni. Kutatócsoportunk korábban bizonyította a PACAP-ról, hogy a lokálisan alkalmazott kezelés nagyobb fokú védelmet képes kialakítani a károsodásokkal szemben, mint a szisztémás kezelési forma (Atlasz et al. 2009). A neuropeptideket invazív, intravitrealis injekció formájában sikeresen alkalmazták excitotoxikus ágens indukálta retina lézióban (Tamás et al. 2004; Rácz et al. 2006; Atlasz et al. 2008, 2009; Varga et al. 2011), retinális hipoperfúzióban (Atlasz et al. 2007a, 2010; Szabadfi et al. 2012b; Werling et al. 2014; Danyadi et al. 2014), UV-indukálta retinadegenerációban (Atlasz et al. 2011), macula ödéma esetében (Maugeri et al. 2017), diabéteszes - és koraszülött retinopáthiában (Szabadfi et al. 2012a, 2014, 2016; Kvarik et al. 2016) valamint látóideg sérülések (Seki et al. 2008) esetén. Kutatócsoportunk korábban igazolta, hogy az intravitreális VIP kezelés a PACAP-hoz képest csak tízszeres dózisban (1000 pmol/5 $\mu$ l) nyújtott védelmet BCCAO-indukálta iszkémia esetén (Szabadfi et al. 2012b).

Számos kutatás igazolta, hogy a non-invazív módon, szemcseppként alkalmazott PACAP protektív hatást képes kifejteni különböző retina degenerációs modellekben (Atlasz et al. 2016; Werling et al. 2017). A peptidcsalád másik két tagja, a szekretin és a

glukagon intravitrealisan alkalmazva nem mutatott retinoprotektív hatást krónikus hipoperfúziós modellben (Werling et al. 2014). Ezért jelen kísérleteink során a PACAP és a VIP neuropeptidek hatásainak vizsgálatát választottuk.

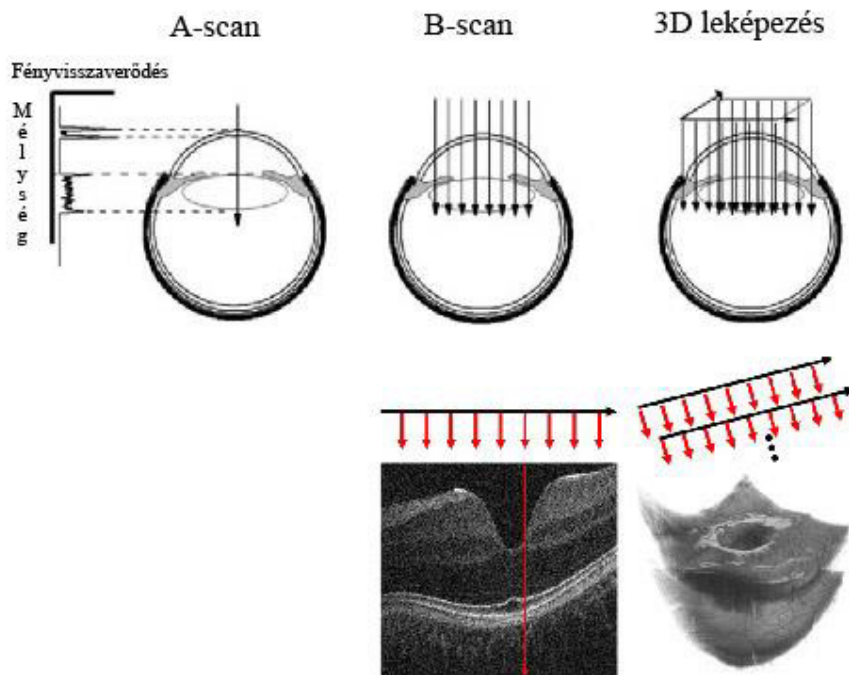
## 1.9 A retina in vivo vizsgálati módszerei

A szem különböző betegségei, illetve egyes szisztémás betegségek részben vagy teljes egészében a retina károsodásával járnak. A patológiai vizsgálatok miatt ma már ismert, hogy ezen kórképek a retina mely rétegében okoznak elváltozást. A szövettani vizsgálatok megfelelő információt nyújtanak a retina különböző sejtjeinek hiányáról vagy elváltozásáról. A továbbiakban taglalt szemészeti képalkotó és vizsgáló módszerek segítségével szolgálhatnak a retinális elváltozások pontosabb mértékének meghatározásában, illetve lehetővé teszik a betegségek progressziójának monitorozását.

### 1.9.1 Optikai koherencia tomográfia (OCT)

Az optikai koherencia tomográfia (OCT) a szemészeti diagnosztikában egy elterjedt non-invazív képalkotó módszer, mellyel a teljes szem struktúrája vizsgálható. Az OCT lehetővé teszi az ideghártya nagy felbontású, keresztmetszeti leképezését. A vizsgálat a közeli infravörös fénysugár használatán alapszik. A szem különböző szövetei eltérő módon tükrözik vissza a fényt, ezen fényszórási tulajdonságok alapján rajzolódik ki a vizsgált rész felépítése. Az OCT egy számítógéphez csatlakoztatva az A-scan mérések során adja meg a vizsgált rész mélységére vonatkozó adatokat. Ezen A-scan felvételek longitudinális sorozata pedig kirajzolja a B-scan képét. A B-scan képek összeillesztése pedig a térbeli modellezést teszi lehetővé. (7. ábra).

OCT segítségével vizsgálható a szem elülső szegmense és a retina is, valamint ezen részek elváltozásai. A készülék segítségével a retinális érhálózat feltérképezésére is lehetőség nyílik. Ezért ez a módszer megfelelő eszköze lehet a különböző eredetű retinopathiak diagnosztizálására és folyamatos monitorozására (Choi et al. 2015; Leitão Guerra et al. 2019).

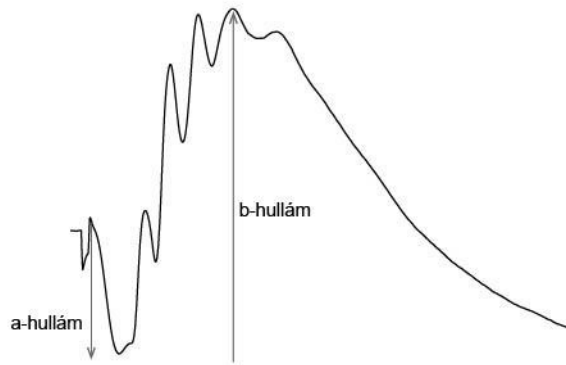


**7. ábra:** Az OCT készülék letérképezési mechanizmusának sematikus ábrázolása (forrás: Kraus et al. 2012; Molly Subhash és Wang 2013 alapján módosítva)

### 1.9.2 Elektroretinografia (ERG)

A látás képességének egyik non-invazív vizsgálómódszere az elektroretinográfia (ERG), amivel az ideghártya különböző sejtjeinek fényinger hatására adott elektromos válaszát mérjük. A rögzített válaszokat a corneáról vezetjük el és elektroretinogram formájában rajzoljuk ki, melynek során információt kapunk a retina normál fiziológiai állapotáról. A vizsgálat alatt a fotoreceptorok valamint a bipoláris, és a horizontális sejtek működését detektálhatjuk (Noailles et al. 2019). Az elektroretinogram hullámai a különböző retinális sejtek állapotát reprezentálják (8. ábra). Corneális elvezetéssel a fényfelvillanás után közvetlenül az a-hullám negatív irányba detektálható. Ezután egy nagy amplitúdójú, gyors pozitív b-hullám következik. Az a-hullám amplitúdója a késői receptor potenciált határozza meg, mely a fotoreceptorok állapotáról és működéséről ad információt. A b-hullám amplitúdója a retina belsőbb rétegeiben elhelyezkedő ON bipoláris és Müller sejtek állapotáról ad információt (Gurevich és Slaughter 1993). A

szkotopikusan vagy fotopikusan adaptált fotoreceptorok szummált válaszát a mérés során egymástól elkülönítve Ganzfeld-módszerrel végezhetjük el.



**8. ábra: Patkány elektroretinogram sematikus ábrázolása kontroll állapotban.**  
*A különböző hullámkomponensek elhelyezkedése és iránya a szürke nyilakkal jelölve. Az y tengelyen a hullámok intenzitása, az x tengelyen az idő ábrázolása látható. Az a-hullám jellemzi a fotoreceptorok állapotát, a b-hullám a retina belső rétegeinek állapotát tükrözi. (forrás: kutatócsoport saját mérése alapján)*



## 2 Problémafelvetés

A szakirodalomban számos olyan neurodegeneratív betegség ismert, ami az ideghártyát is érinti. A retina károsodását reprezentáló állatmodellek használata lehetőséget biztosít arra, hogy megismerjük a betegség pontosabb patomechanizmusát és a későbbiek során a lehetséges kezelési módokat vizsgáljuk. A progresszív lefutású kórképek esetén nemcsak a hatékony tüneti kezelés fontos, hanem a preventív jelleggel alkalmazott neuroprotekciónak is kiemelt szereppel bírhat.

Mind a PACAP, mind a VIP jól ismert sejtvédő szerepéről, lokálisan intravitreális injekció formájában alkalmazva számos retinadegenerációs modellben bizonyított hatásuk. Ismert, hogy az intravitreális alkalmazás hátránya, hogy több esetben másodlagos károsodásokat okozhat a szemben. Kutatócsoportunk korábban igazolta, hogy szemcseppes kezelés formájában a PACAP átjut az okuláris barrieréken, így eléri a retina sejtjeit (Werling et al. 2017). Mindezek alapján kutatásainkat a peptidek terápiás hatékonyságának növelése érdekében terveztük meg. Egyrészt az alkalmazási lehetőség non-invazív formáját választva, másrészt a peptidekhez kapcsolt vivőmolekulák használatával, amelyek segíthetik a barrieréken keresztül történő átjutás hatékonyságát.

### 3 Célkitűzések

Korábbi tanulmányok igazolták, hogy az intravitreálisan alkalmazott PACAP retinoprotektív hatással rendelkezik különböző retinális károsodások esetén (Atlasz et al. 2007a, 2009, 2011; Kvarik et al. 2016). Kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint a nem-invazív módon, szemcseppként alkalmazott PACAP1-38 átjut az okuláris barrieren, eléri a retina sejtjeit és ott retinoprotektív hatást fejt ki iszkémiás retinopathia esetén (Werling et al. 2017). Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a TAT peptid, elősegíti a hozzá kötött molekulák biológiai barrieréken való átjutását, illetve a sejtmembránon való átlépést (Yu et al. 2012b, a), így hatékonyabbá téve az esetleges neuroprotekción.

- I. Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy igazoljuk a TAT kapcsolt PACAP és VIP szemcseppként alkalmazva hatékonyabb retinoprotektív hatással rendelkezik iszkémiás retinopathia esetén, mint önmagában a PACAP és a VIP tartalmú szemcseppes kezelés.
- II. További célunk volt vizsgálni a PACAP1-38 szemcsepp retinoprotektív hatását mikrogöngy-indukálta glaukóma modellben.

## 4 Kísérlet I – PACAP-TAT és VIP-TAT protektív szerepének vizsgálata iszkémiás modellben

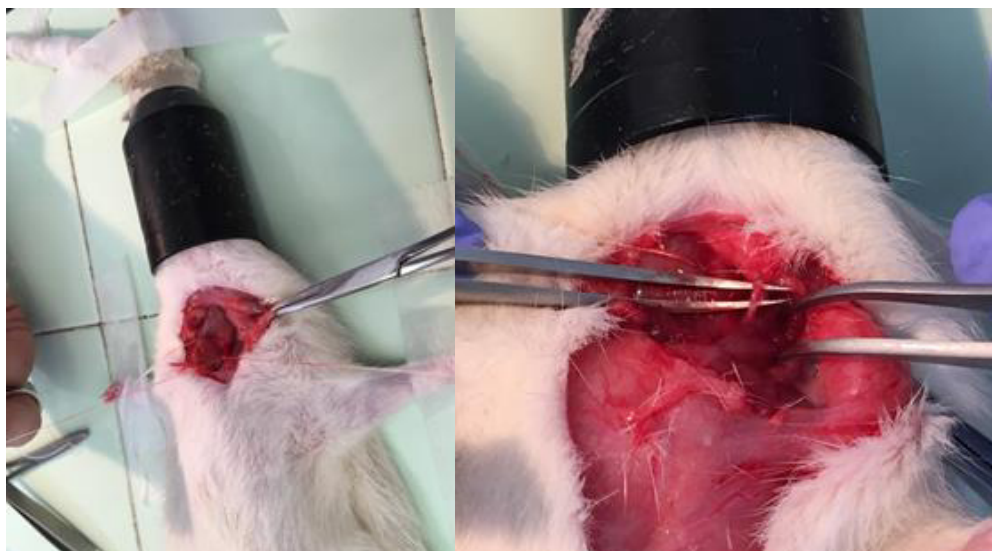
### 4.1 Anyagok és módszerek

#### 4.1.1 Kísérleti állatok

Kísérleteink során felnőtt hím Wistar patkányokat (160-180 g) használtunk (n=34). Állatainkat standard laboratóriumi körülmények között, 12 órás sötét/világos ciklusban, korlátlan ivóvíz és táplálék ellátás mellett tartottuk. A kísérleti állatokat érintő beavatkozásokat az etikai szabályoknak és az egyetemi protokollnak megfelelően végeztük el (a kísérleti projekt nyilvántartási száma: BA02/2000-26/2017).

#### 4.1.2 BCCAO által kialakított retina degenerációs modell és szemcseppes kezelés

A modell kialakításához az állatok nyakán mindkét oldali arteria carotis communis kipreparáltuk, majd 3-0-s fonállal permanensen lekötöttük (n=24) (9. ábra). Kontroll csoportként álműtött (SHAM; n=10) állatokat használtunk. A beavatkozás során az állatok átestek az erek feltárásán, de a permanens ligatúra nem történt meg. A műtét után közvetlenül az állatok jobb szemét TAT kapcsolt PACAP, illetve TAT kapcsolt VIP tartalmú szemcseppel (1 µg/csepp; GL Biochem Ltd., Kína) kezeltük. Vivőanyagként korábbi tanulmányaink alapján a solutio ophthalmica cum benzalkonio-t (SOCB) választottuk (Werling et al. 2016). Az állatok bal szeme kontrollként szolgált, melyek hatóanyag nélküli szemcseppet kaptak. A kezelés öt napon keresztül történt, naponta kettő cseppentés mellett (Werling et al., 2016).



**9. ábra: BCCAO műtét során az arteria carotis communis preparálása és lekötése (forrás: saját kutatási anyag)**

#### 4.1.3 A retina minták szövettani analízise

Két hét posztoperatív időszak után a patkányokat ketamin (90 mg/kg, Calypsol), xylazil (10 mg/kg, Sedaxylan) és fiziológiás sóoldat megfelelő keverékével túllaltattuk, majd a szemeken rutin szövettani vizsgálatot, valamint morfometriai analízist végeztünk. A szemek eltávolítását követően sztereomikroszkóp alatt eltávolítottuk a szaruhártyát, a szemlencsét, illetve az üvegtestet egyaránt. A kipreparált szemserleget 4%-os paraformaldehidben fixáltuk (1 hét). Ezt követően a mintákat rutin szövettani protokoll szerint dolgoztuk fel, mosást és dehidrációt követően Durcupan ACM-gyantába (Merck Life Science Kft., Magyarország) ágyaztuk, majd ultramikrotómmal (Reichert Ultracut E, Ausztria) 2  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket készítettünk. Metszeteinket 1%-os toluidinkék festőoldattal (Merck Life Science Kft., Magyarország) festettük, majd DePeX (Merck Life Science Kft., Magyarország) segítségével lefedtük. Fénymikroszkóp segítségével (Nikon Eclipse 80i, Nikon, USA) minden vizsgálati csoportból fotót készítettünk. A szövettani felvételek standard módon a látóideg kilépési helyétől számított 1 mm-es sugarú körbe estek. A morfometriai adatokhoz Spot programmal mértük a retina rétegeinek vastagságát, illetve számoltuk a sejteket a ganglionáris rétegben (db sejt/100  $\mu\text{m}$ ) valamint a sejteket a belső- és külső magvas réteg egységnyi (db sejt/500  $\mu\text{m}^2$ ) területében.

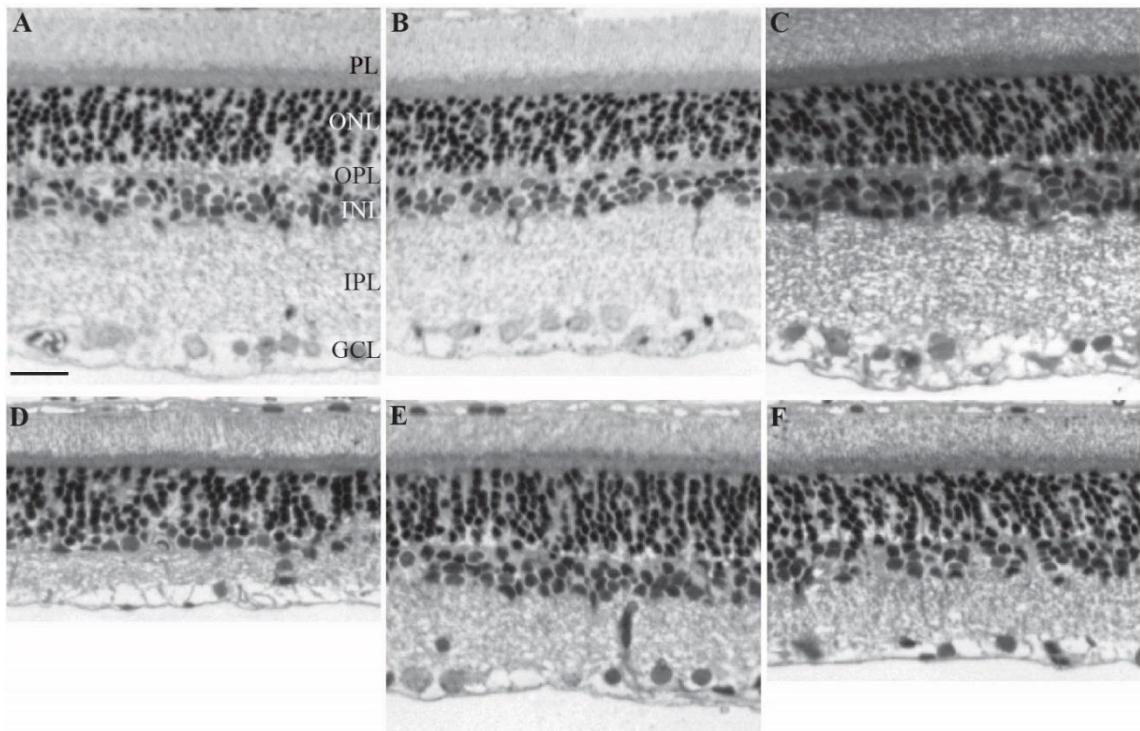
#### 4.1.4 Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai összehasonlításához OriginPro 2016 (Macasoft, Magyarország) programot használtunk, melyben kétutas-ANOVA tesztet, valamint Fisher- és Bonferroni post hoc analízist végeztünk. Szignifikancia szintként  $p < 0,05$  értéket fogadtuk el. A diagrammokon és az ábrákon az átlag  $\pm$  standard hiba (SEM) került feltüntetésre.

## 4.2 Eredmények

### 4.2.1 A retina morfológiai változása a PACAP-TAT és VIP-TAT szemcsepp kezelést követően BCCAO modellben

A BCCAO a retina összes rétegében szignifikáns rétegvastagság csökkenést idézett elő a kontroll (SHAM) állatokhoz viszonyítva. A legdrasztikusabb változás a külső és a belső rostos rétegekben volt detektálható, ezért értelemszerűen a két határmembrán közötti távolság is szignifikánsan csökkent a kontroll csoport retina mintáihoz képest (SHAM + SOCB:  $106,61 \pm 9,9 \mu\text{m}$ , illetve  $111,44 \pm 6,08 \mu\text{m}$ , BCCAO + SOCB:  $66,6 \pm 9,57 \mu\text{m}$ , illetve  $68,1 \pm 7,42 \mu\text{m}$ ) (10. ábra A, D). A BCCAO + SOCB (D) vívőanyaggal kezelt csoportban súlyos retinális károsodás volt megfigyelhető a SHAM + PACAP-TAT (B) és a SHAM + VIP-TAT (C) csoporthoz képest. A BCCAO műtétet követően a PACAP-TAT (E) és VIP-TAT (F) szemcseppes kezelés hatására enyhébb rétegvastagság csökkenéseket figyeltünk meg. A TAT kapcsolt PACAP és VIP önmagában alkalmazva nem okozott morfológiai változást a SHAM csoportokban, a teljes retinavastagság sem változott (SHAM + PACAP-TAT:  $103,78 \pm 7,47 \mu\text{m}$ , SHAM + VIP-TAT:  $108,32 \pm 4,01 \mu\text{m}$ ) (10. ábra B, C).

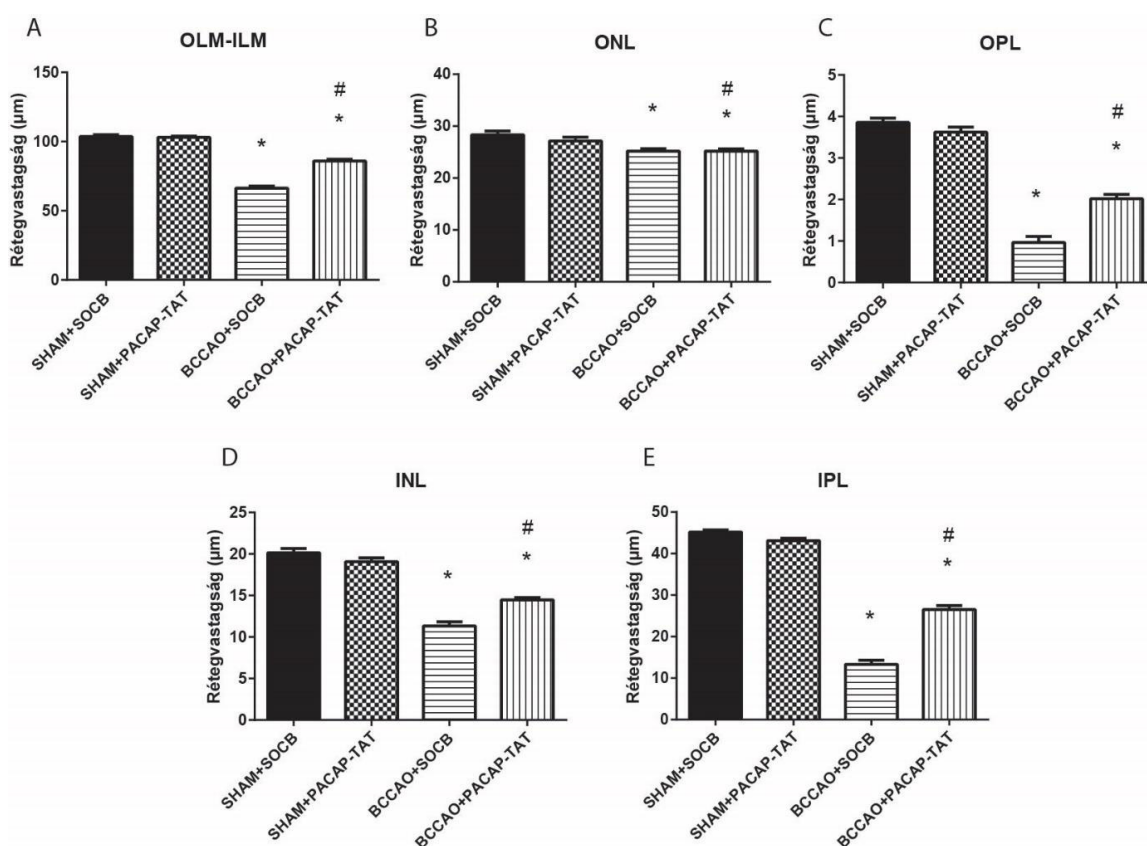


**10. ábra: Reprezentatív retina metszetek a különböző vizsgálati csoportokban. A: SHAM + SOCB. B: SHAM + PACAP-TAT. C: SHAM + VIP-TAT. D: BCCAO**

+ SOCB. **E:** BCCAO + PACAP-TAT. **F:** BCCAO + VIP-TAT. Mérték: 20  $\mu$ m.  
 (PL: fotoreceptorok rétege, ONL: külső magvas réteg, OPL: külső rostos réteg,  
 INL: belső magvas réteg, IPL: belső rostos réteg, GCL: ganglionsejtek rétege)

#### 4.2.2 A retina morfológiai analízise PACAP-TAT szemcsepp kezelést követően BCCAO modellben

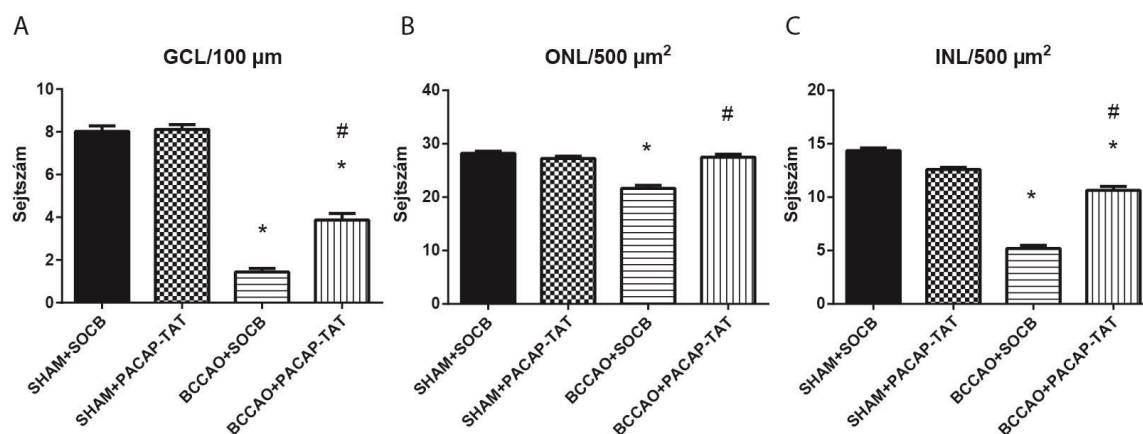
Két héttel a BCCAO műtétet követően minden vizsgált rétegben szignifikáns károsodás volt megfigyelhető a SHAM + SOCB csoporthoz viszonyítva. Ez különösen erősen megjelent az OPL rétegben, amely szinte teljesen eltűnt a BCCAO hatására sérült retinában (SHAM + PACAP-TAT:  $3,86 \pm 0,81 \mu$ m; BCCAO + SOCB  $0,96 \pm 1,15 \mu$ m). A műtét után öt napon keresztül PACAP-TAT szemcseppel kezelt csoportokban szignifikáns javulást figyeltünk meg a vizsgált rétegekben (11. ábra A-E). A BCCAO okozta károsodás miatt drasztikusan elvékonyodott OPL, a szemcseppes kezelés hatására detektálható maradt a szövettani mintáinkban ( $2,02 \pm 0,8 \mu$ m).



**11. ábra:** A retina rétegeinek morfológiai változásai a különböző vizsgálati csoportokban. Az adatok az átlag + SEM értéket ábrázolják. \* $p < 0,05$  vs. SHAM

+ SOCB; # $p < 0,05$  vs. BCCAO + SOCB. (SHAM: áloperált csoport, SOCB: solutio ophthalmica cum benzalkonio, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, TAT: transzkripciós transzaktivátor, BCCAO: kétoldali arteria carotis communis okklúzió)

A különböző retinarétegekben lévő sejtek száma is változott az általunk alkalmazott iszkémiás modellben. A BCCAO műtét után jelentős sejtszámcsökkenés volt megfigyelhető az ONL, az INL és a GCL rétegekben a SHAM + SOCB csoporthoz (ONL/500  $\mu\text{m}^2$ : 28,21  $\pm$  3,18; INL/500  $\mu\text{m}^2$ : 14,36  $\pm$  1,85, GCL/100  $\mu\text{m}$ : 8,02  $\pm$  1,79) viszonyítva. Az ONL/500  $\mu\text{m}^2$  területegységben iszkémia hatására 20%-kal (21,67  $\pm$  3,95), az INL/500  $\mu\text{m}^2$ -ben, több mint 60%-kal (5,19  $\pm$  2,3), a GCL/100  $\mu\text{m}$  egységben több, mint 80%-kal csökkent a sejtek száma (1,43  $\pm$  2,1). A PACAP-TAT-ot tartalmazó szemcsepp minden sejtes rétegben ellensúlyozta a BCCAO okozta hipoperfúzió káros hatását. A sejtszámok a GCL-, az ONL- és az INL rétegekben is szignifikánsan nagyobbak voltak (ONL/500  $\mu\text{m}^2$ : 24,47  $\pm$  4,02; INL/500  $\mu\text{m}^2$ : 10,63  $\pm$  2,66 GCL/100  $\mu\text{m}$ : 3,87  $\pm$  2,1), mint a BCCAO + SOCB csoportban regisztrált értékek (12. ábra).



**12. ábra: BCCAO okozta sejtszámváltozások különböző retinális rétegekben.**

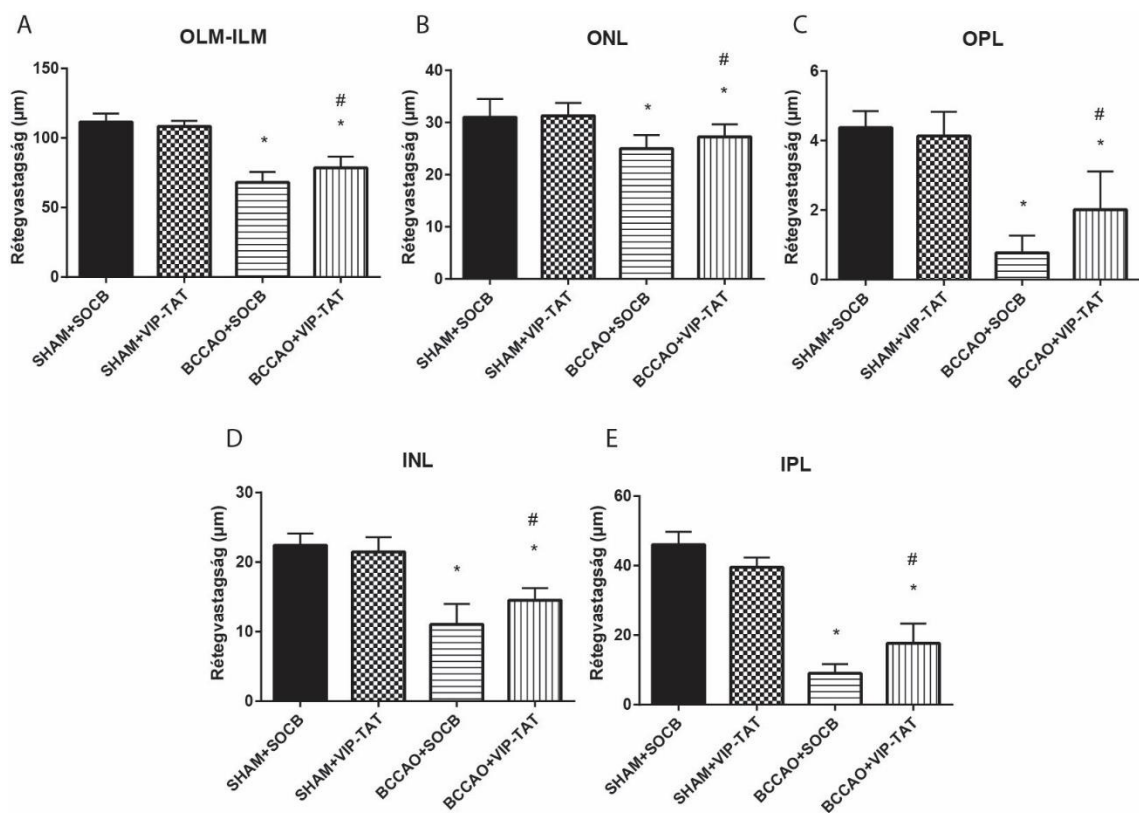
**A:** A ganglionsejtek számának változása 100  $\mu\text{m}$ -es egységben a különböző vizsgálati csoportokban. **B-C:** Az ONL és INL rétegben jelenlévő sejtek számának változása 500  $\mu\text{m}^2$ -es egységben. Az adatok az átlag + SEM értéket ábrázolják. \* $p < 0,05$  vs. SHAM + SOCB; # $p < 0,05$  vs. BCCAO + SOCB. (SHAM: áloperált csoport, SOCB: solutio ophthalmica cum benzalkonio, PACAP:



*hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, TAT: transzkripciósz transzaktivátor, BCCAO: kétoldali arteria carotis communis okklúzió)*

#### 4.2.3 A retina morfológiai analízise a VIP-TAT szemcsepp kezelést követően BCCAO modellben

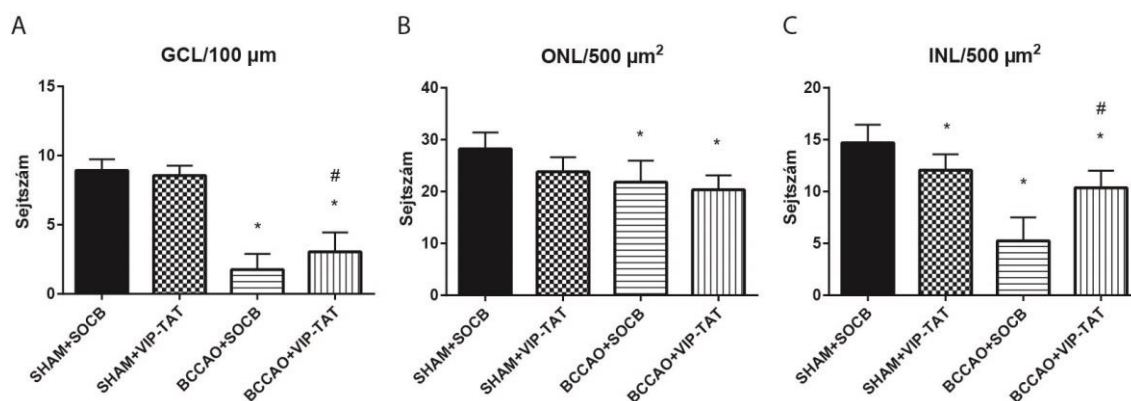
A VIP-TAT kezelés hatására hasonló protektív tendenciát figyelhettünk meg, mint a PACAP-TAT esetén. A BCCAO okozta iszkémia hatására minden retinális réteg szignifikáns különbséget mutatott a SHAM + SOCB csoporthoz képest. A teljes retina rétegvastagság (OLM-ILM)  $111,44 \pm 6,08 \mu\text{m}$ -ról  $68,1 \pm 7,42 \mu\text{m}$ -re redukálódott. Szöveti eredményeink szerint a VIP-TAT szemcseppes kezelés protektívnek bizonyult, összességében a két határmembrán távolsága szignifikánsan nagyobb ( $78,62 \pm 7,95 \mu\text{m}$ ) volt a BCCAO + SOCB csoporthoz ( $68,1 \pm 7,42 \mu\text{m}$ ) viszonyítva. A VIP-TAT önmagában nem okozott morfológiai változást a retina szerkezetében a SHAM + SOCB csoporthoz képest (13. ábra).



**13. ábra:** A retina rétegeinek morfológiai változásai a különböző vizsgálati csoportokban. Az adatok az átlag + SEM értéket ábrázolják. \* $p < 0,05$  vs. SHAM

+ SOCB; # $p < 0,05$  vs. BCCAO + SOCB. (SHAM: áloperált csoport, SOCB: solutio ophthalmica cum benzalkonio, VIP: vazoaktív intesztinális polipeptid, TAT: transzkripciós transzaktivátor, BCCAO: kétoldali arteria carotis communis okklúzió)

Az iszkémia hatására markáns sejtszámcsökkenés volt megfigyelhető az ONL-, az INL- és a GCL rétegekben a SHAM + SOCB csoporthoz képest (ONL: ~20%, INL: ~60%, GCL: ~80%). Az INL- és a GCL rétegben a VIP-TAT szemcsepp alkalmazása szintén gátolta a sejtek elvesztését a BCCAO okozta retinális sérülés esetében (INL/500  $\mu\text{m}^2$ :  $10,43 \pm 1,75$ , GCL/100  $\mu\text{m}$ :  $3,03 \pm 1,33$ ). Ez a szignifikáns védő hatás az ONL/500  $\mu\text{m}^2$ -ben ( $22 \pm 3,02$ ) nem volt kimutatható (14. ábra).



**14. ábra: BCCAO okozta sejtszám változások a különböző retinális rétegekben.**

**A:** Ganglionsejtek számának változása 100  $\mu\text{m}$ -es egységben a különböző vizsgálati csoportokban. **B-C:** Az ONL és INL rétegben jelenlévő sejtek számának változása 500  $\mu\text{m}^2$ -es egységben. Az adatok az átlag + SEM értéket ábrázolják. \* $p < 0,05$  vs. SHAM + SOCB; # $p < 0,05$  vs. BCCAO + SOCB. (SHAM: áloperált csoport, SOCB: solutio ophthalmica cum benzalkonio, VIP: vazoaktív intesztinális polipeptid, TAT: transzkripciós transzaktivátor, BCCAO: kétoldali arteria carotis communis okklúzió)

### 4.3 Diszkusszió

Kutatásunk során igazoltuk a TAT kapcsolt PACAP és VIP peptidek retinoprotektív hatását patkány iszkémiás modellben. A PACAP különböző retinakárosodásokban kifejtett pozitív hatásaival korábban már több tanulmány is foglalkozott. Kimutatták, hogy az intravitrealisan alkalmazott PACAP erőteljes sejtvédő hatást fejt ki különböző állatmodellekben előidézett retinális károsodások esetén (Atlasz et al. 2016). A protektív hatások a retina minden idegsejttípusán érvényesülnek, a ganglionsejtektől (Shoge et al. 1999; Atlasz et al. 2010) a fotoreceptorok és a bipoláris sejteken át (Szabadfi et al. 2016), a két fő interneuron típus, az amakrin- és horizontális sejtek (Szabadfi et al. 2012b), illetve a fő gliasejtek, a Müller sejtek esetében egyaránt (Nakatani et al. 2006; Werling et al. 2016). Ismert az is, hogy a PACAP a retinális mikroglia sejtek és makrofágok fontos szabályozója NMDA-okozta retinális károsodásban (Wada et al. 2013). A PACAP nemcsak a retina idegsejtjeire és gliasejtjeire van protektív hatással, hanem segít megőrizni a vér-retina gát integritását egyaránt (Scuderi et al. 2013). Oxidatív stressz okozta sérülések esetén védi a retina pigmenthámsejtjeit, aminek következtében megőrizhető az ideghártya külső határa (Fabian et al. 2012). Kutatócsoportunk azt is kimutatta, hogy a PACAP befolyásolja a vaszkulogenezist, különösen patológiás körülmények (koraszülött retinopátia) között (Kvarik et al. 2016).

A PACAP mellett a VIP/szekretin/glukagon peptidcsalád tagjai közül a VIP lehetséges hatásait vizsgáltuk. Tanulmányok szerint a VIP hatással van a látórendszerre, a legtöbb eredmény a fény által kiváltott neuronális transzmisszióban való részvételével foglalkozik (Dragich et al. 2010; Webb et al. 2013; Akrouh és Kerschensteiner 2015; Pérez de Sevilla Müller et al. 2019). A VIP-ről ismert az is, hogy fontos neuromodulátor a vizuális jelátviteli utakban, nemcsak a retinában, hanem az agykéregben is, ahol befolyásolja a vizuális információfeldolgozást (Wilson és Glickfeld 2014; Galletti és Fattori 2018). Mindezek mellett vannak olyan tanulmányok, melyek a VIP trófikus hatását igazolják bizonyos retinális elváltozásokban. Többek közt bizonyították, hogy a VIP in vitro körülmények között képes megvédeni a retina ganglionsejtjeit az excitotoxikus károsodásoktól (Shoge et al. 1998). Iszkémiás reperfüziós modellben a VIP védő hatását igazolták (Tunçel et al. 1996), mind szisztémás, mind intravitreális alkalmazása csökkentette az oxidatív stressz szintjét, amit a malondialdehid szintjének detektálásával bizonyítottak. Ennek eredményeként a retina szerkezete kevésbé

károsodott, ami összhangban áll jelenlegi eredményeinkkel. Kutatócsoportunk korábbi hipoperfúziós modellben végzett kísérletei során az intravitrealisan alkalmazott VIP a retina morfológiai javulását eredményezte, de a PACAP-hoz viszonyítva tízszer nagyobb dózisban kellett alkalmazni a protekció eléréséhez (Szabadfi et al. 2012b). Jelenlegi tanulmányunkban hasonló fokú védelmet tapasztaltunk a TAT kapcsolt VIP alkalmazása esetében is. A VIP nagyfokú neuroprotektív szerepe nemcsak közvetlen, de közvetett módon egyaránt érvényesül, az aktivitásfüggő neurotróf fehérje (ADNP) és annak legkisebb aktív eleme, a NAP stimulációján keresztül. Mind az ADNP, mind a NAP erős védelmet nyújtott számos stressztényezővel szemben (Steingart et al. 2000). A retinában a NAP védelmet nyújtott a lézer-indukálta károsodásban (Belokopytov et al. 2011), csökkentette a hipoxia hatására megjelenő faktorokat diabéteszes retinopathia modellben (D'Amico et al. 2017, 2018; Maugeri et al. 2017), gátolta az apoptotikus sejthalált (Scuderi et al. 2014), valamint hipoxia-indukálta retinakárosodásban elősegítette a neuronális növekedést (Zheng et al. 2010). A VIP a retina vérellátását is szabályozza, mivel hatással van az autonóm reflexekre és a choroidea véráramlására is (Bill és Sperber 1990). Szakirodalmi ismereteink szerint a VIP képes szabályozni a növekedési faktorokat, az angiogén molekulákat és a defenzineket a cornea gyulladása esetén, ezzel elősegítve a szöveti gyógyulást (Jiang et al. 2011).

A BCCAO okozta iszkémiás sérülésben a PACAP a legtöbb retinális rétegben sejtvédő hatásúnak bizonyult. Korábbi kutatási eredményeink szerint a VIP hatékonysága töredéke a PACAP védő hatásának. A 100 pmol-os VIP kezelés nem javított a sérült retina szerkezetén, míg az azonos dózisban használt PACAP sikeresen ellensúlyozta a károsodást. Azonban a VIP esetében a protektív hatás csak 1000 pmol-os dózis mellett volt mérhető. Kísérleteink során kollaborációs partnereink segítségével sikerült bizonyítanunk, hogy a TAT peptidhez kötött VIP hatékonyan átjut az okuláris barrieréken és neuroprotektív hatást fejt ki a retinában. A PACAP-TAT kezelés nem nyújtott erősebb védelmet a retina sejteinek, mint az önmagában alkalmazott PACAP, azonban a VIP protektív hatása sokkal erősebbnek bizonyult a TAT-hoz kötve, mint önmagában alkalmazva. Ezen eredmények összhangban állnak egy korábbi tanulmány eredményeivel, miszerint a TAT, ami hasonló aminosav sorrenddel rendelkezik, mint a PACAP1-38 utolsó tizenegy (28-38) aminosava, nagyobb affinitást biztosított a VIP-nek a PAC1 receptorhoz való kötődéskor (Yu et al. 2014). A PACAP 38 aminosavas formája esetében a C terminálshoz csatolt TAT szükségtelenné válik és csak a receptorhoz való kötődést zavarhatja. Ezzel magyarázható, hogy a PACAP-TAT negatív hatással volt a

PAC1 receptor aktiválásában, ezáltal a citoprotektív hatás megjelenésében az általunk használt iszkémiás modellben. A VIP számos más szemészeti betegségben szerepet kapott, mint lehetséges terápiás megközelítés. *Pseudomonas aeruginosa* okozta cornea gyulladásban a VIP kezelés mérsékelte a sejtes beszűrődést, a stroma elvékonyodását, ezáltal a betegség jobb kimeneteléhez vezetett (Berger et al. 2010). Korábban bizonyították, hogy az intravitrealisan alkalmazott VIP gátló hatással rendelkezett a myopia kialakulásában (Cakmak et al. 2017). Továbbá kísérletekkel igazolták, hogy a VIP gátolja a cornea transzplantáció után az endothelsejtek számának csökkenését, illetve javítja az átültetett szaruhártya túlélését (Satitpitakul et al. 2018).

Mindezen kutatási eredményink megerősítik azt, hogy a PACAP és a VIP lokális, szemcseppként való alkalmazása új terápiás lehetőségeket nyithat meg.

Összefoglalva, jelen kutatásunk elsőként bizonyította, hogy a SOCB-ban oldott TAT kapcsolt PACAP és VIP lokális alkalmazása csökkenti az iszkémiás retinadegeneráció mértékét, feltehetően ennek háttérében egy multifaktoriális védőmechanizmus áll.

## 5 Kísérlet II – PACAP szemcsepp protektív hatásának vizsgálata glaukóma modellben

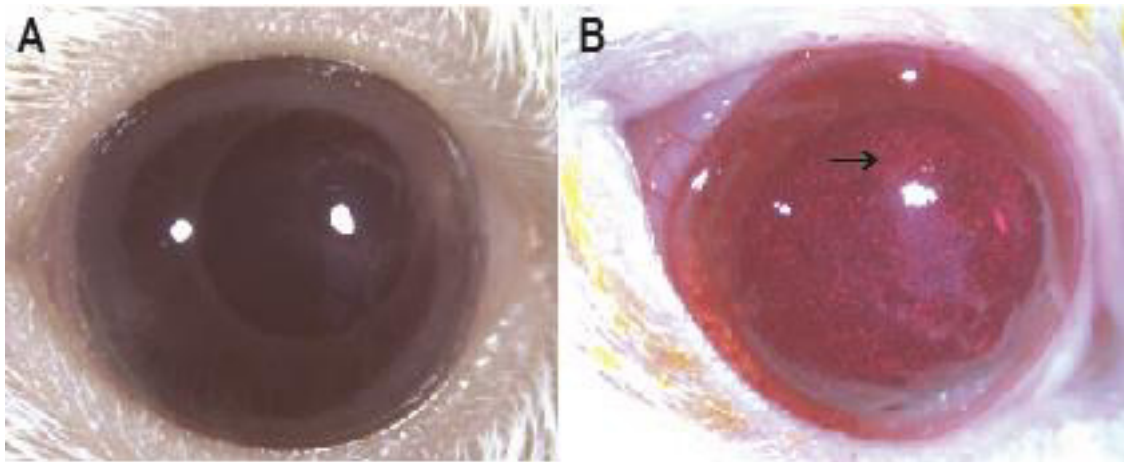
### 5.1 Anyagok és módszerek

#### 5.1.1 Kísérleti állatok

Kísérleteink során felnőtt (3 hónapos, 300-500 g) hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk (n=50). Állatainkat standard laboratóriumi körülmények között, 12 órás sötét/világos ciklusban, korlátlan ivóvíz és táplálék ellátás mellett tartottuk, figyelembe véve az Intézeti Állatetikai Kódexben foglaltakat (engedélyszám: ZOBU0104L 07). A kísérleti állatokat érintő beavatkozásokat az etikai szabályoknak és az egyetemi protokollnak megfelelően végeztük el (a kísérleti projekt nyilvántartási száma: BA02/2000-16/17). Kísérleti állatainkat véletlenszerűen négy vizsgálati csoportba osztottuk: PBS + vivőanyag (Systane (S) Alcon Laboratories, Belgium) n=8; PBS+PACAP1-38 (P) n=8; mikrogyöngy (gyöngy) +vivőanyag (S) n=17 és mikrogyöngy (gyöngy) +PACAP1-38 (P) (n=17).

#### 5.1.2 Mikrogyöngy-indukálta glaukóma modell

Kísérletünket Sappington és munkatársai által (2010) korábban leírt modell alapján állítottuk össze, melyben a belső szemnyomás emelkedését az elülső szemesarnokba injektált mikrogyöngyökkel érték el (Sappington et al. 2010). Állatainkat ketamin (90 mg/kg, Calypsol), xylazil (10 mg/kg, Sedaxylan) és fiziológiás sóoldat megfelelő arányú keverékével altattuk. A mikrogyöngyök injektálása előtt az állatok szemét és annak környékét Braunol oldattal (B. Braun Medical AG, Magyarország) fertőtlenítettük a későbbi gyulladások elkerülése miatt. Hamilton tű (33G) segítségével 10 µl, 10 µm-es átmérőjű fluoreszcens (582/603 nm) mikrogyöngy oldatot (Thermo Fisher Scientific, USA) ( $3,6 \times 10^6$  gyöngy/µl) injektáltunk a szem elülső csarnokába (15. ábra). A kontroll állatok esetében azonos mennyiségű PBS-t juttattunk a szemük elülső csarnokába. Az injekciót követően gyulladásgátló hatású szemcseppel kezeltük az állatokat. Két héttel az első gyöngybeadáskövetően megismételtük az injekciókat, mivel ismételt befecskendezésre van szükség a hosszantartó IOP emelkedéshez.



**15. ábra: Patkányszem mikrogyöngy injektálás előtt (A) és injektálást követően (B). A nyíl a beinjektált gyöngyöket mutatja. (forrás: saját kutatási anyag)**

### 5.1.3 A szemnyomás monitorozása és a szemcseppes kezelés

Az első mikrogyöngy injekciót megelőző napon tonométerrel (Tonolab, Finnország) rögzítettük a belső szemnyomás értékeket kontroll körülmények között. Mivel a szemnyomás is követi a cirkadián ritmust (Ciulla et al. 2020), ezért nyolc héten keresztül ugyanabban a napszakban (délelőtt 10 és 11 óra között) történt a szemnyomás mérése (hetente 1 alkalommal). Az első mikrogyöngy injekciót követően csak vivőanyaggal (Systane (S)) illetve, vivőanyagban oldott PACAP1-38 (P) tartalmú szemcseppel (1 $\mu$ g/csepp) kezeltük a szemeket. A szemcseppes kezelést az injektálást követő 4 héten át, naponta háromszor alkalmaztuk.

### 5.1.4 Optikai koherencia tomográfia vizsgálat

Az OCT segítségével nem-invazív módon vizsgálható a szem elülső szegmense, valamint a retina is. A kísérleti állatok retináját a mikrogyöngy injekció előtt, illetve az azt követő nyolcadik héten vizsgáltuk OCT készülékünkkel (Leica-Envisu<sup>TM</sup> R-Series SDOIS, USA) (16. ábra). A mérésekhez az állatokat ketamin/xylazil koktéllal (korábban említett dózis segítségével) elaltattuk. A mérések megkezdése előtt pupillatágító szemcseppet (0,01% atropin) alkalmaztunk. A mérés előtt és közben az állatok corneáját műkönyvel (Systane) tartottuk nedvesen, hogy a szem kiszáradását elkerüljük.



**16. ábra: A Leica-Envisu™ R-Series SDOIS típusú OCT készülék és a mérés során az állattartó padon elhelyezett altatásban lévő patkány (forrás: saját kutatási anyag)**

#### 5.1.5 A retina minták rutin morfológiai és morfometriai analízise

Nyolc héttel az első mikrogöngy injektálást követően az állatokat (n=16) túlaltattuk ketamin/xylazil/sóoldat segítségével. Az enukleálást követően sztereomikroszkóp segítségével eltávolítottuk a szaruhártyát, a szemlencsét, illetve az üvegtestet. A megmaradt szemserleget 4%-os paraformaldehidben fixáltuk (1 hét). Ezt követően a mintákat rutin szövettani protokoll szerint dolgoztuk fel, mosást és dehidrációt követően Durcupan ACM-gyantába (Merck Life Science Kft., Magyarország) ágyaztuk, majd ultramikrotómmal (Reichert Ultracut E, Ausztria) 2  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket készítettünk. Metszeteinket 1%-os toluidinkék festőoldattal (Merck Life Science Kft., Magyarország) festettük, majd DePeX felhasználásával (Merck Life Science Kft., Magyarország) lefedtük. Fénymikroszkóp segítségével (Nikon Eclipse 80i, Nikon, USA) minden vizsgálati csoportból fotót készítettünk. A szövettani felvételek standard módon a látóideg kilépési helyétől számított 2 mm-es sugarú körbe estek. A morfometriai



adatokhoz Nikon Nis-Elements programmal mértük a retina rétegeinek vastagságát, illetve számoltuk a sejteket a ganglionáris rétegben (db sejt/100  $\mu\text{m}$ ).

#### 5.1.6 Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokra szánt mintákat ( $n=32$ ) a gyöngybeadástól számított nyolc hét után preparáltuk. Fixálást (4% paraformaldehid, 2 óra) és mosást (PBS, 6 x 10 perc) követően a szemserlegeket felszálló koncentrációjú (10-20-30%) cukoroldatba helyeztük. A víztelenítési lépés után beágyazó médiumba (Leica Tissue Freezing Medium, USA) kerültek a minták, majd kriosztáttal 15-17  $\mu\text{m}$ -es vastagságú metszeteket készítettünk a retina centrális régiójából (látóidegtől 2 mm-re). Az elkészített metszeteket zselatinos tárgylemezre vettük fel, majd rehidrálás (PBS) után a mintákat blokkoltuk (2 óra, szobahőmérséklet) a nem-specifikus kötődések elkerülése miatt (5% normál szarvaszérum (NDS), 3% borjú szérum albumin (BSA) és 0,3% Triton<sup>TM</sup> X-100 PBS-ben feloldva). A metszeteket egy éjszakán keresztül elsődleges poliklonális antitestekkel (egér anti-Brn3a és nyúl anti-GFAP (gliális fibrilláris savas fehérje) (Merck Life Science Kft., Magyarország, 1:200) inkubáltuk (4°C, egy éjszakán keresztül). Mosást (6 x 10 perc PBS-ben) követően az immunreaktivitást másodlagos antitesttel tettük láthatóvá (Alexa Fluor-594 számár anti-egér és Alexa Fluor-488 számár anti-nyúl, 1:400 antitest hígítóban oldva, Jackson Immuno Research, Egyesült Királyság, 2 óra, szobahőmérséklet). Az inkubálási idő után propídiium-jodidos (PI) (Merck Life Science Kft., Magyarország, 1 perc, szobahőmérséklet) magfestést alkalmaztunk. Mosást (5 x 5 perc PBS-ben) követően Fluoroshield (Merck Life Science Kft., Magyarország) használatával fedtük le mintáinkat. A metszetekről Nikon Eclipse 80i fénymikroszkóppal fotókat készítettünk, melyeket Image J (NIH, USA) program segítségével elemeztünk. A reprezentatív fotókat Photoshop CS6 programmal (Adobe, USA) állítottuk össze.

#### 5.1.7 Whole-mount retina minták

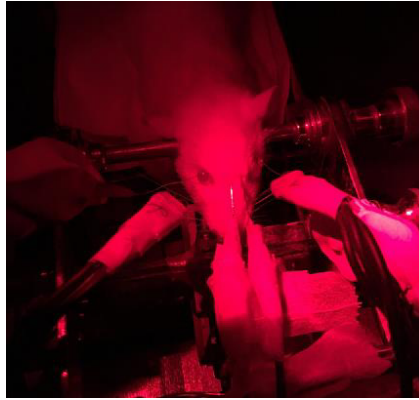
A glaukóma modell sikerességének megállapításához szükséges specifikus ganglionsejt jelölést teljes retina preparátumokon is (whole-mount) elvégeztük. A retinamintákat preparáltuk ( $n=36$ ), majd két órán keresztül 4%-os paraformaldehidben fixáltuk. Ezt követően PBS-ben (6 x 10 perc) mostuk a retinákat, majd 4 kis bevágást ejtettünk a retinaminták szélén. A teljes retina preparátumok blokkolása (0,3% Triton-X, 5% NDS, 3% BSA PBS-ben oldva) 24-es well plate-ben történt. Egér anti-Brn3a (Merck Life Science Kft., Magyarország) elsődleges antitesttel egy éjszakán át inkubáltuk a

mintákat (4°C), majd PBS-es mosást (6 x 10 perc) követően az immunreaktivitást Alexa Fluor-594 számár anti-egér antitesttel (1:400) tettük láthatóvá. A másodlagos jelölés után mostuk, tárgylemezre fektettük és Fluoroshield médium segítségével fedtük a mintákat. A Brn3a-pozitív ganglionsejteket négy régióban (50000  $\mu\text{m}^2$ ) számoltuk meg Image J program segítségével. A reprezentatív fotókat Photoshop CS6 szoftverrel állítottuk össze.

### 5.1.8 Elektroretinográfia

A látás funkciójának vizsgálatához elektroretinográfiát a mikrogyöngy injektálást megelőző napon és az azt követő nyolcadik héten végeztük el. A mérések előtt a kísérleti állatokat egy éjszakán keresztül sötétben tartottuk. A mérések előkészítését vörös fényben végeztük (632 nm). Ismert, hogy a patkányok retinájában mindkét fotoreceptor típus előfordul, de csak zöld és kék színspecifikus csappal rendelkeznek. Ezzel magyarázható az, hogy a patkányok nem adnak fényválaszt a piros színre (Jacobs et al. 1991) (17. ábra).

Az állatokat mélyaltatásban vizsgáltuk, melyet ketamin/xylazil koktél intraperitoneális adásával értünk el. Szemüket pupillatágító szemcseppel (0,01% atropin) kezeltük, majd sztereotaxiás készülékben (RWD Life Science, USA) rögzítettük az állatokat. A mérés során a jobb és a bal cornea felszínére 1-1 elektródot helyeztünk, valamint a fejen subcután egy-egy referencia elektródot rögzítettünk. Végül egy föld elektródot használtunk, amit a háton subcután helyeztünk el (Danyadi et al. 2014). Ezután az állatok elektroretinogramját 50 zöld (503 nm) fényfelvillanás alatt rögzítettük. Egy LED felvillanás 1 másodpercig tartott és azt 2 másodperc szünet követte (5 cd s/m<sup>2</sup>, 0,25 Hz), a rögzített fényválaszt amplifikáltuk és egy A/D konverter felhasználásával rögzítettük. A kapott eredményeket szoftver (Ratsoft) segítségével átlagoltuk. Az a- és b-hullám amplitúdó adatokat OriginPro 2018 (Macasoft, Magyarország) programmal értékeltük.



*17. ábra: Megfelelően rögzített állat ERG mérés során. (forrás: saját kutatási anyag)*

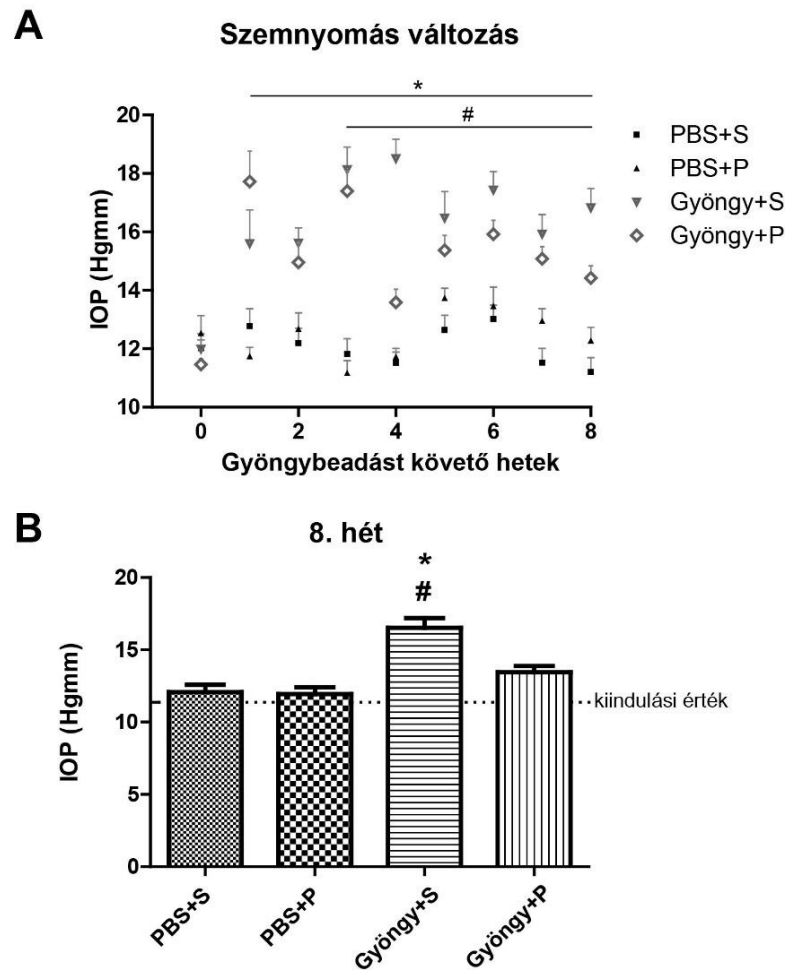
#### 5.1.9 Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai összehasonlításához OriginPro 2018 programot használtunk, melyben kétutas-ANOVA tesztet, valamint Fisher- (szöveti eredmények, ERG eredmények, Brn3a whole-mount eredmények összehasonlítása) és Bonferroni (szemnyomás eredmények-, Brn3a metszet eredmények összehasonlítása) post hoc analízist használtunk. Szignifikancia szintként  $p < 0,05$  értéket fogadtuk el. A diagrammokon és az ábrákon az átlag  $\pm$  standard hiba (SEM) került feltüntetésre.

## 5.2 Eredmények

### 5.2.1 A PACAP szemcsepp hatása az szemnyomás változására

A PBS + Systane (S) és a PBS + PACAP (P) kezelt csoportokban nem tapasztaltunk szemnyomás változást. Ezzel ellentétben a glaukómás Gyöngy+S kezelt csoportban szignifikáns szemnyomásemelkedés volt megfigyelhető a vizsgálati periódus során (18. ábra A), míg a Gyöngy + PACAP kezeltben mérséklődött a szemnyomás emelkedése. Egy héttel a mikrogyöngyök injektálása után több, mint 50%-os szemnyomásemelkedést tapasztaltunk a Systane és PACAP kezelt csoportokban is. A harmadik vizsgálati hét után jelent meg szignifikáns ( $p < 0,05$ ) különbség a mikrogyöngy injektált csoportok között. A Gyöngy + S csoportban a szemnyomásemelkedés 55%-os volt a PBS+S csoporthoz képest, míg a Gyöngy + PACAP kezelt csoportban ez az emelkedés mindössze 35%-os volt. Ez a tendencia a 8 hetes vizsgálati időszak alatt is megfigyelhető volt. A százalékos változások a következőképpen alakultak a Gyöngy+S és a Gyöngy+P csoportokban: a negyedik héten 53%, illetve 20%, az ötödik héten 45%, illetve 19%, a hatodik héten 33%, illetve 19%, a hetedik héten 56%, illetve 36%, a nyolcadik héten 38, illetve 12%. A 8. héten mért szemnyomásértékeket és a köztük lévő szignifikáns különbséget az 18. ábra B képe mutatja. A PBS injektált csoportokban a szemnyomásértékek a kiindulási érték (az összes kísérletbe bevont állat kontroll szemnyomásának átlaga) közelében maradtak a nyolcadik hét végén (PBS+S =  $12,08 \pm 0,5$  Hgmm; PBS+P =  $11,95 \pm 0,45$  Hgmm). A Gyöngy+S glaukómás csoportban ( $16,52 \pm 0,68$  Hgmm) szignifikánsan magasabb szemnyomás volt rögzíthető, mint a PACAP kezelt csoportban ( $13,46 \pm 0,42$  Hgmm).

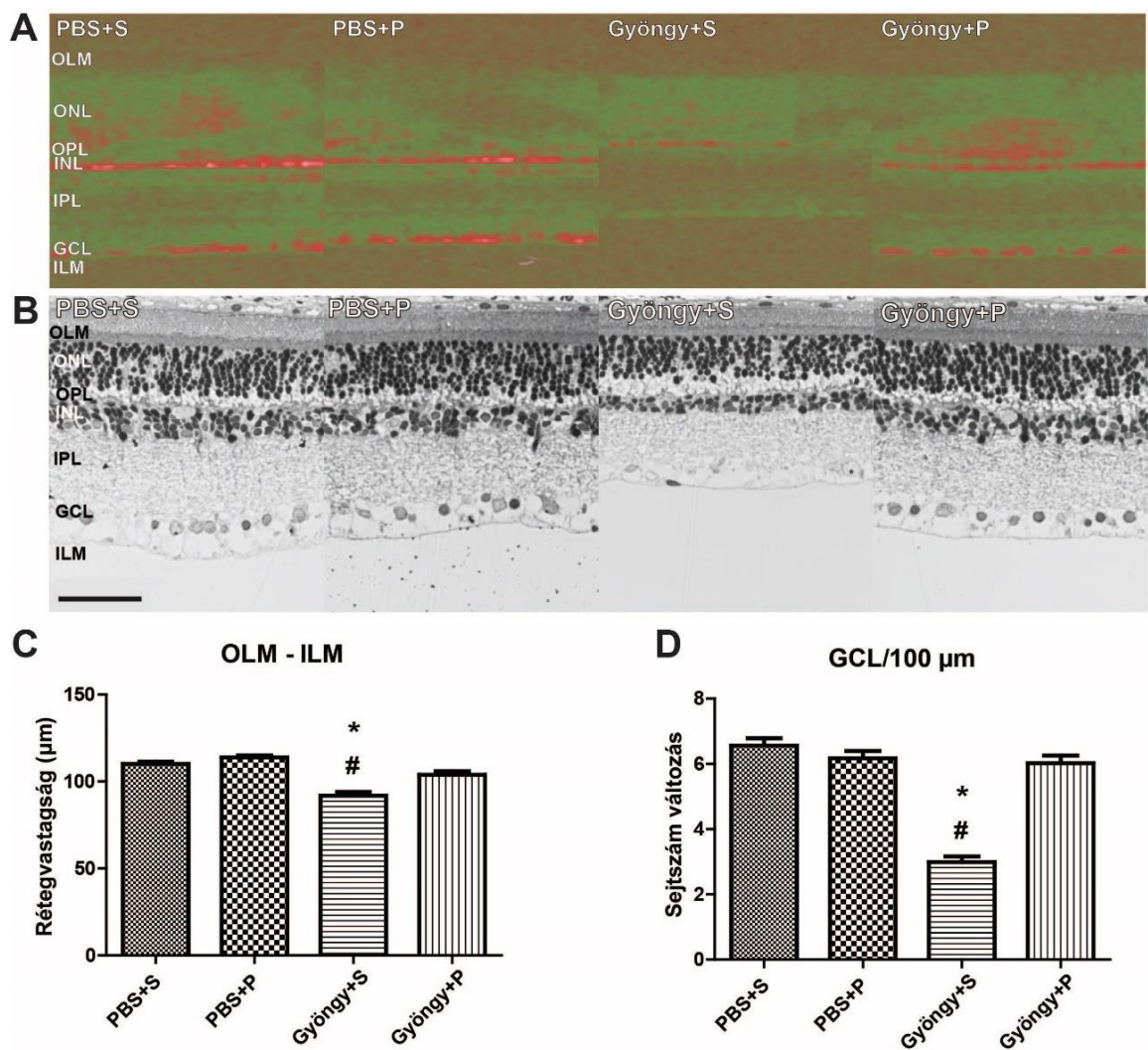


**18. ábra: A szemnyomás változás monitorozása mikrogyöngy beadást követő hetekben. A: Az IOP változása a négy vizsgálati csoportban a nyolc hetes vizsgálati periódus során (PBS+S, PBS+P, Gyöngy+S, Gyöngy+P). B: A belső szemnyomás értéke nyolc héttel a mikrogyöngyök elülső csarnokba történő injektálása után. Az adatok az átlag + SEM értéket ábrázolják. \* $p < 0,05$  vs. PBS+S; # $p < 0,05$  vs. Gyöngy+P (IOP: belső szemnyomás, PBS: foszfát pufferelt sóoldat, S: Systane, P: PACAP1-38)**

### 5.2.2 A PACAP szemcsepp hatása a retina szöveti szerkezetére

Szövettani eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a PACAP szemcseppes kezelés nem változtatott a retina szerkezetén a PBS injektált csoportban (PBS+P) (19. ábra B). In vivo OCT vizsgálatok eredményei egyaránt alátámasztották a szövettani vizsgálatok során tapasztaltakat (19. ábra A). A Gyöngy + S csoportban a retina rétegeinek vastagsága nagymértékben csökkent a PBS injektált csoportokhoz képest. Szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető az OLM-ILM távolságában ( $91,81 \pm 2,12 \mu\text{m}$ )

(19. ábra A-C). A ganglionáris sejtrétegben a 100  $\mu\text{m}$ -re eső sejtek száma is szignifikánsan csökkent ( $2,99 \pm 0,18$ ) (19. ábra D). A PACAP tartalmú szemcsepp alkalmazása protektív hatással rendelkezett a retinában (Gyöngy+P). A PACAP kezelt csoportban a retina morfológiája kevésbé változott, mint a vívíanyaggal kezelt mikrogyöngyös csoportban (19. ábra A, B). Az OLM-ILM távolság ( $103,84 \pm 2,02$ ) a PBS-t kapott csoportokétól nem különbözött szignifikánsan. A morfometriai paraméterek összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy a Gyöngy+P csoportban a ganglionsejtek száma/100  $\mu\text{m}$  ( $6,02 \pm 0,23$ ) a kontroll PBS injektált csoportokéhoz képest nem különbözött (20. ábra D).

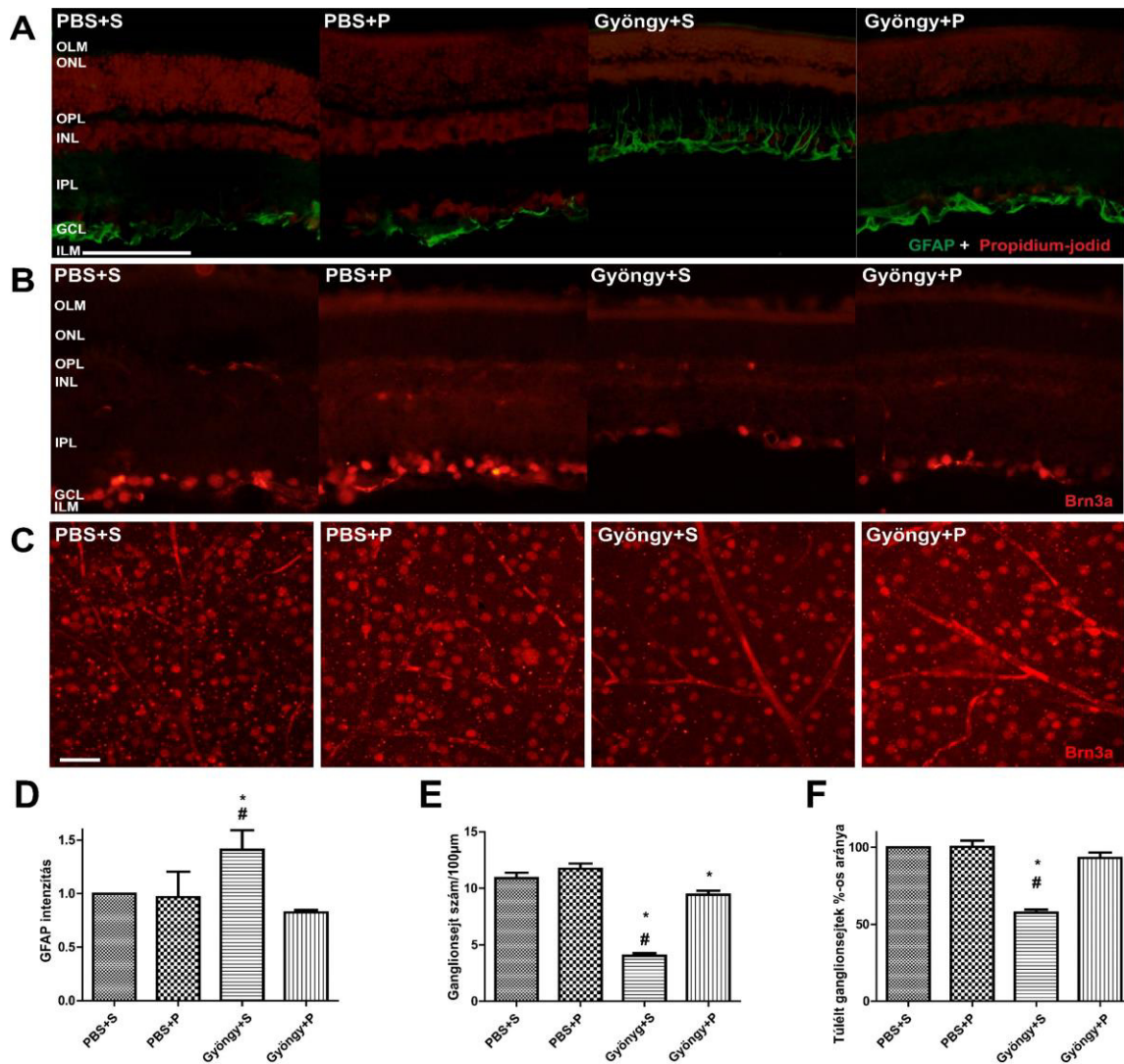


**19. ábra:** *Reprezentatív retina metszetek és felvételek, valamint morfometriai változások a különböző csoportokban. A: OCT készülékkel készített reprezentatív retina felvételek. B: Rutin szövettani eljárással készített metszetek. C: Az OLM-ILM réteg vastagsága. D: A ganglionsejt rétegben lévő sejtek*

*szám/100 µm. Az adatok az átlag + SEM értéket ábrázolják. \*p<0,05 vs. PBS+S, #p<0,05 vs. Gyöngy+P. Mérték: 50 µm. (PBS: foszfát pufferelt sóoldat, S: Systane, P: PACAP1-38)*

### 5.2.3 Az immunhisztokémiai jelölések eredményei

Immunhisztokémiai vizsgálataink során sem a PBS injektált csoportokban, sem a Gyöngy+P csoportban nem mutattunk ki elváltozást (20. ábra A-E). A glaukómás Gyöngy+S csoportban szignifikánsan erősebb GFAP jelölést tudtunk detektálni (20. ábra A, D). A retina belső rétegeiben a protein expressziója intenzívebb volt, mint a Gyöngy+PACAP kezelt csoportban (20. ábra A, D). A ganglionsejt specifikus (Brn3a) jelölés során igazolni tudtuk, hogy a megnövekedett belső szemnyomás szignifikánsan csökkenti a ganglionsejtek számát a PBS+S csoporthoz képest (20. ábra B, E). A glaukómás PACAP tartalmú szemcseppel kezelt retinák esetében szignifikánsan kisebb volt a ganglionsejtek számának csökkenése (20. ábra E). Ugyanezt az eredményt támasztotta alá a teljes retina preparátumokon (whole-mount) végrehajtott Brn3a ganglionsejt jelölés is (20. ábra C, F). A PBS+S és PBS+P csoportok teljes retina preparátumaiban nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. A glaukóma kórképet reprezentáló Gyöngy+S csoport teljes retina mintáiban is csökkent ganglionsejtszám volt megfigyelhető a Gyöngy+P csoporthoz képest. Brn3a jelölés után mind metszetben, mind a teljes retina készítmények esetén kontrollhoz hasonló immunpozitivitást tapasztaltunk a PACAP kezelés hatására (20. ábra B, C).

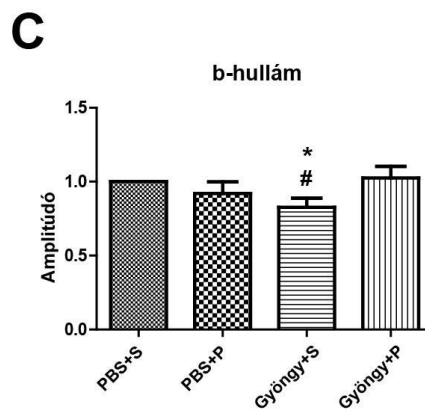
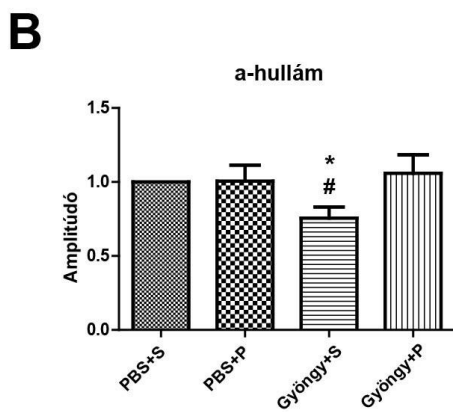
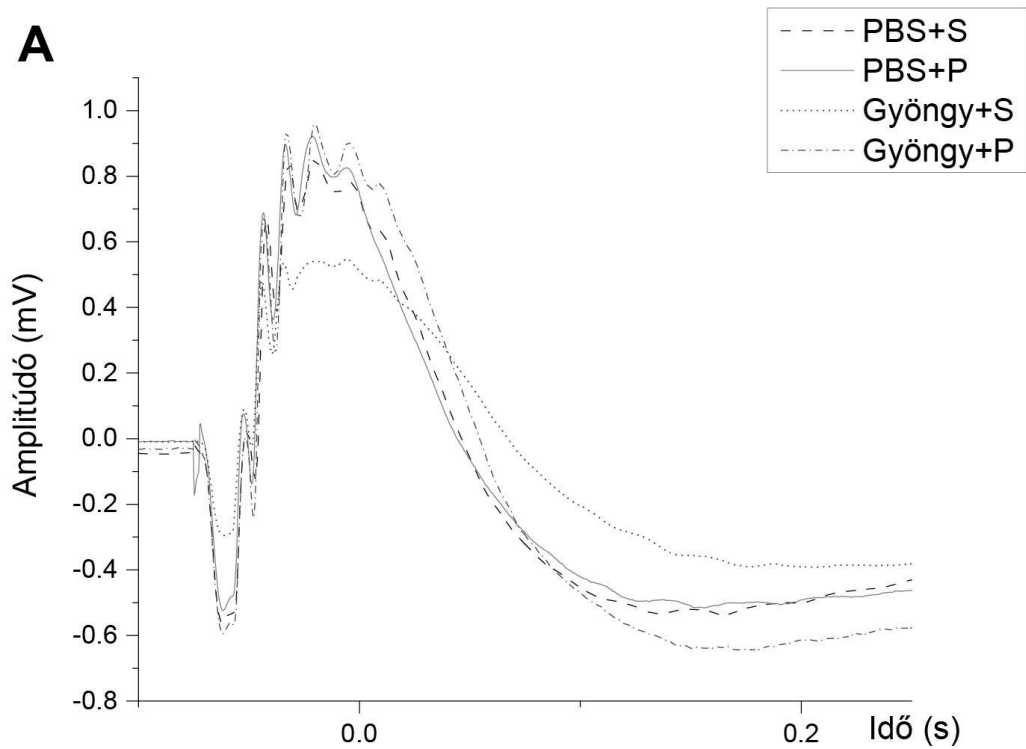


**20. ábra: Reprezentatív retina minták fluoreszcens jelöléssel a négy vizsgálati csoportban.** **A:** GFAP jelölt retina metszetek propidium-jodidos magfestéssel. **B:** Ganglionsejt specifikus Brn3a festés metszetben. **C:** Ganglionsejt specifikus Brn3a festés teljes retina preparátum esetén. **D:** A GFAP immunpozitivitásának változása. **E:** A ganglionsejtek számának egységnyi (100 µm) szakaszon **F:** A teljes retinapreparátumokban jelölt ganglionsejtek normalizált értéke. Az adatok az átlag + SEM értéket ábrázolják. \* $p < 0,05$  vs. PBS+S és vs. PBS+P, # $p < 0,05$  vs. Gyöngy+P. Mérték: A, B: 50 µm, C: 100 µm. (IOP: belső szemnyomás, PBS: foszfát pufferelt sóoldat, S: Systane, P: PACAP1-38, GFAP: gliális fibrilláris savas fehérje, Brn3a: brain-specific homeobox/POU domain protein 3A)



#### 5.2.4 Elektoretinográfia (ERG) eredményei

A reprezentatív ERG felvételeket 12 órás sötétbe való adaptálás után rögzítettük (21. ábra). Kontroll csoportokban (PBS+S és PBS+P) az ERG hullámok lefutása megegyezett. A kezelés nélküli glaukóma csoportban (Gyöngy+S) a fényfelvillanásra adott válaszok szignifikánsan csökkentek (21. ábra A). Ezzel ellentétben a Gyöngy+P csoportban a kezelés hatására az ERG hullámok a kontroll csoportoknál mértékhez hasonlítottak. A PBS+S csoportban (a-hullám:  $482,63 \pm 31,81 \mu\text{V}$ , b-hullám:  $1331,60 \pm 55,24 \mu\text{V}$ ) mért hullám amplitúdók hasonló mértékűek, mint a PBS+P csoportban (a-hullám:  $473,99 \pm 50,03 \mu\text{V}$ , b-hullám:  $1195,77 \pm 74,35 \mu\text{V}$ ). A PBS+S csoporthoz hasonlítva szignifikáns a- és b-hullám amplitúdó csökkenést figyeltünk meg a Gyöngy+S csoportban (a-hullám:  $347,89 \pm 32,76 \mu\text{V}$ , b-hullám:  $1065,91 \pm 67,6 \mu\text{V}$ ). A relatív amplitúdó változásokat ábrázoltuk az 21. ábra B és C részében. Az elektoretinogramok eredményei alapján megállapítható, hogy a látás funkciója szignifikánsan jobb volt abban a mikrogyöngy injektált csoportban, amely PACAP kezelésben részesült.



**21. ábra: A látás funkciójának vizsgálata nyolc hét után. A:** Reprezentatív ERG felvétel a vizsgálati csoportokban (PBS+S; PBS+P; Gyöngy+S; Gyöngy+P). **B-C:** normalizált a-hullám és b-hullám amplitúdó változások. Az adatok az átlag + SEM értéket ábrázolják. \* $p < 0,05$  vs. PBS+S  $p < 0,05$ , # $p < 0,05$  vs. Gyöngy+P. (ERG: elektroretinográfia, PBS: foszfát pufferelt sóoldat, S: Systane, P: PACAP1-38)

### 5.3 Diszkusszió

A glaukóma vagy zöldhályog egy komplex betegség, aminek pontos patomechanizmusát jelenleg sem ismerjük teljesen. Több mint húsz éve vizsgálják a betegséget különböző állatmodellek segítségével. Elsőként Urcola és munkatársai (2006) alkalmazták az elülső szemcsarnokba történő mikrogyöngy injekciót a glaukóma kialakítására (Urcola et al. 2006). A kísérleteink során alkalmazott patkány polisztirén mikrogyöngy-indukálta glaukóma modellt Sappington és munkatársai (2010) alapján hoztuk létre, mellyel a belső szemnyomás effektív módon emelhető (Sappington et al. 2010). Eredményeink szerint a PACAP kezelés hatására kevesebb ganglionsejt halt el a mikrogyöngy injektált csoportban, illetve a belső szemnyomás is mérsékeltebb emelkedést mutatott, így a modell segítségével képesek voltunk igazolni a PACAP 1-38 retinoprotektív szerepét.

A PACAP jól ismert neuroprotektív és általános citoprotektív hatásáról, beleértve a retinális károsodások esetén mutatott védő hatását. Többek között kimutatták, hogy az endogén PACAP, illetve az exogén PACAP védő hatással rendelkezik különböző retinadegenerációs modellekben. Kutatócsoportunk is leírta, hogy a PACAP csökkenti a károsodás mértékét a koraszülött- és diabéteszes retinopathiában valamint gyulladás-, iszkémia-, neurotoxikus ágensek- és UV fény által indukált retinopathiak esetében egyaránt (Atlasz et al. 2011, 2016; Szabadfi et al. 2012a; Vaczy et al. 2016, 2018; Kvarik et al. 2016, 2021; Werling et al. 2017; D'Amico et al. 2021). A retinopathiak szisztémás PACAP kezelése jelenleg nem megoldott, mivel a szérumban lévő peptidet a DPPIV enzim nagyon gyorsan bontja (felezési idő körülbelül 5 perc) és nem ismert, hogyan jut át a vér retina gáton. A legtöbb retinoprotektív hatást igazoló közleményben exogén módon, intravitrealis injekció formájában alkalmazták a PACAP-ot. Ennek az invazív kezelési formának a hátránya, hogy járulékos sérüléseket okoz, melyek negatív irányba módosíthatják a kísérletek kimenetelét. Kutatócsoportunk korábban bizonyította, hogy a PACAP szemcseppként alkalmazva megfelelő koncentrációban átjut az okuláris barriereken, így sikeresen fejti ki védőhatását iszkémiás retinopathiában (Werling et al. 2017). PhD munkám második felében végzett kutatásunk legfőbb megállapítása, hogy a szemcseppként alkalmazott PACAP1-38 védő hatással rendelkezik mikrogyöngy-indukálta glaukóma modellben.

A humán glaukómához hasonlóan a patkány modell esetén is a retinális ganglionsejtek számának csökkenése figyelhető meg. A szakirodalmi adatoknak

megfelelően kísérleteink során a SD patkány normál szemnyomás értékei 10-12 Hgmm közötti tartományba estek. Az általunk alkalmazott glaukóma modell esetében a 10 µm-es mikrogöngyök az elülső csarnokba történt injektálás után a csarnokvíz elfolyásának irányába kezdenek el áramlani. Ennek következményeként kezdetben a göngyök elakadnak a trabekuláris hálózatban, ezzel megakadályozzák a csarnokvíz további áramlását és végül az IOP emelkedését okozzák (Matsumoto et al. 2014). Kísérleteink során reprodukáltuk a glaukómára jellemző szemnyomásemelkedést, valamint váratlan pozitív eredményként azt is megfigyeltük, hogy a mikrogöngyök injektálása után a PACAP szemcseppek hatására a szemnyomás kisebb mértékben emelkedett. Ezen hatás molekuláris mechanizmusa jelenleg még nem ismert, de a PACAP szemnyomás csökkentő hatása további glaukóma kutatásokra ad okot. A csarnokvíz termelődése és elfolyása szigorúan szabályozott folyamat, amelyet számos tényező és struktúra befolyásol. Ebben a szabályozási mechanizmusban nem ismert a PACAP szerepe. Korábban már más PACAP-hoz hasonlóan cAMP szintet növelő anyagokról igazolták IOP csökkentő hatásukat. A szemnyomás csökkentő szerep egyik kulcsfontosságú mechanizmusa a cAMP szint változása lehet, mivel a cAMP fontos szerepet játszik a csarnokvíz termelésének és elfolyásának szabályozásában (Shim et al. 2017). A PACAP-ról pedig ismert, hogy cAMP emelő hatással rendelkezik (Miyata et al. 1989). Ezenkívül a PACAP csökkenti a RhoA GTPáz mennyiségét, ami pedig a csarnokvíz mennyiségének elfolyását határozza meg a trabekuláris hálózat szabályozásával (Meyer 2006; Rao et al. 2017).

Szövetteni eredményeink megegyeznek különböző glaukóma modell alkalmazásakor más kutatók által megfigyelt szövetteni változásokkal (Matsumoto et al. 2014; Huang et al. 2018; Zhao et al. 2020). A mikrogöngyök injektálása az OLM-ILM távolság csökkenését idézte elő, hasonlóan más retinális sérülésekhez, mint a lipopoliszacharid által kiváltott gyulladásos folyamat (Vaczy et al. 2018). A glaukómát reprezentáló Gyöngy+S csoportban a ganglionsejtek elvesztésének aránya hasonló volt, mint a fotokoagulációval előidézett glaukóma modell esetén (Seki et al. 2011; Soto et al. 2011). Szövetteni eredményeink segítségével bizonyítottuk, hogy a PACAP1-38 szemcseppek hatására a retina megőrizte normál struktúráját, míg a ganglionsejt specifikus Brn3a immunhisztokémiai jelölések igazolták, hogy a PACAP kezelt glaukómás csoportban kevesebb ganglionsejt halt el, mint a Gyöngy+S csoport esetében. A retina esetleges sérüléseinek egyik indikátora lehet a specifikus Müller gliasejtek aktiválódása. Ezen sejtek rendelkeznek PAC1 receptorral és a PACAP hatással lehet rájuk

(Nakamachi et al. 2012), többek között a PACAP befolyásolja az interleukin-6 gyulladáscsökkentő citokin expresszióját (Nakatani et al. 2006; Smedowski et al. 2014). Hipertóniás körülmények között a Müller sejtek fokozott aktivációját a GFAP jelölés segítségével jelen kísérletünk során is bizonyítani tudtuk. Korábbi tanulmányainkkal összhangban a PACAP kezelt csoportban a GFAP immunpozitivitás csak a gliasejtek végtalpaira korlátozódott (Werling et al. 2017; Vaczy et al. 2018). Seki és munkatársai (2011) eltérő metodika szerint, sóoldat befecskendezésével hoztak létre emelkedett szemnyomást, ahol szintén az intravitrealis PACAP kezelés ganglionsejt védő hatását bizonyították. Feltételezésük szerint a PACAP koncentrációtól függően különböző jelátviteli útvonalakat indukálhat. Kísérletünk adatai szintén egybevágóan a megállapítással, hogy a PACAP neuroprotektív hatást fejt ki hipertenziós glaukóma modellben. Az általunk alkalmazott modell jól reprezentálja a humán glaukóma patomechanizmusát. Vizsgálatunkban nemcsak a ganglionsejt rétegben, hanem más retinális rétegekben, illetve a Müller sejtekben is védő hatást tudtunk kimutatni. Kutatásunkban szövettani minták segítségével a PACAP védő hatását tudtuk igazolni a nem-invazív szemcseppes kezelés hatására (Seki et al. 2011), ezen eredményeinket funkcionális vizsgálatokkal is alá tudtuk támasztani.

ERG méréseket végeztünk annak vizsgálatára, hogy a PACAP kezelés általi morfológiai javulás funkcionálisan is kimutatható-e (Danyadi et al. 2014). A szkotopikus ERG hullámformák specifikus sejttípus aktivitásokat jelentenek. A fotoreceptorok, csapok és pálcikák aktiválódása adja az a-hullámot, míg az ON bipoláris sejtek, az amakrin sejtek és a Müller gliasejtek aktiválódása pedig a b-hullámot (Gurevich és Slaughter 1993). Alátámasztottuk, hogy a PACAP kezelés gátolja a Gyöngy+S csoportban észlelt látásromlást is, ami összhangban áll a korábbi iszkémiás retinopathiával kapcsolatos eredményeinkkel (Danyadi et al. 2014). Alapjában véve a két retinakárosodás patomechanizmusa különbözik, de van közös jellemzőjük is, mivel a glaukóma megjelenésének egyik oka lehet a vaszkuláris szabályozási zavar. Számos funkcionális változást figyeltünk meg a Gyöngy+S csoportban, ami azt bizonyítja, hogy patkányokban a mérsékelt IOP emelkedés elegendő a kísérleti glaukóma kiváltásához. Ezzel szemben a PACAP kezelt csoportban nem tapasztaltunk funkcionális változásokat.

Az irreverzibilis látásvesztés súlyos klinikai probléma, melynek egyik leggyakoribb kiváltó oka a zöldhályog. Jelenleg az orvostudomány nem ismer hatékony neuroprotektív terápiát. Kido és munkatársai (2000) szerint az üvegtestbe injektált agyi eredetű növekedési faktor (BDNF) fenntartja a ganglionsejtek számát NMDA-indukálta

károsodásban (Kido et al. 2000). A PACAP szemcsepp hasonló erősségű preventív hatást fejt ki a retinális ganglionsejtek csökkenésével szemben az általunk használt glaukóma modellben. A lehetséges kezelés esetében szükség van egy hatékony neuroprotektív módszer kidolgozására, ami hatással van a jelátviteli utakra és elősegíti a ganglionsejtek túlélését. A BDNF-nek a TrkB (tropomiozin receptor kináz B) receptoron keresztül fontos szerepe lehet a ganglionsejtek aktiválásában (Wójcik-Gryciuk et al. 2020). A két faktor összefügg egymással, mivel a PACAP a specifikus PAC1 receptorán keresztül indukálja a BDNF expresszióját valamint részben a BDNF közvetíti a PACAP védő hatását az idegsejtekben (Frechilla et al. 2001; Zink et al. 2004; Brown et al. 2013).

Megfigyeléseink alapján a mikrogyöngy-indukálta glaukóma modell megfelelőnek bizonyult, hogy a PACAP szemcseppes kezelés hatását vizsgáljuk. Jelenlegi eredményeink szerint a PACAP szemcsepp felhasználható a jövőbeni terápiás kezelések során. Összességében ez a kezelési módszer kiegészítő eleme lehet az eddig ismeretes glaukóma kezeléseknél.

Kutatásaink folytatásaként a PACAP citoprotektív hatását szelektíven, sejtspecifikusan is vizsgálni szeretnénk, valamint ezen protektív hatás útvonalának molekuláris biológiai módszerekkel való feltárását tervezzük.

## 6 Új eredmények összefoglalása

- I. A Ph.D. munkám első részében a PACAP-TAT és VIP-TAT retinoprotektív szerepét vizsgáltuk BCCAO okozta retinakárosodásban. Szövettani analízisünk során kimutattuk, hogy a szemcseppként alkalmazott PACAP-TAT és VIP-TAT csökkenti a hipoperfúzió-okozta retina degeneráció mértékét a BCCAO modellben. A TAT kapcsolt PACAP esetén nem tudtunk effektívebb protektív hatást kimutatni, mint önmagában a PACAP szemcsepp alkalmazásakor.
  
- II) A Ph.D. munkám második felében a szemcseppként alkalmazott PACAP védő szerepét igazoltuk mikrogyöngy-indukálta glaukóma modellben. A szövettani-, az immunhisztokémiai- valamint funkcionális analízisünk eredményei bebizonyították, hogy a lokálisan, szemcseppként alkalmazott PACAP protektívnek bizonyult az általunk használt modellben. Kísérletünk eredményei azt is igazolták, hogy a szemcseppes kezelés képes mérsékelni a szemnyomás emelkedést a glaukóma kialakulása során.

Eredményeinket összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a retinát érintő különböző károsodások hatásaival szemben a PACAP és a VIP non-invazív szemcseppes alkalmazása citoprotektívnek bizonyult. Valamint bizonyításra került, hogy a VIP esetben a TAT növelheti a kifejtett protektív hatást a különböző retinális károsodások esetén. Kutatócsoportunk korábbi és jelenlegi eredményeinek ismeretében mind a PACAP, mind a VIP potenciális terápiás lehetőségeket nyújthat különböző retinát érintő betegségek esetében.

## 7 Irodalomjegyzék

- Abad C, Tan YV (2018) Immunomodulatory roles of PACAP and VIP: Lessons from knockout mice. *J Mol Neurosci* 66:102–113. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1150-y>
- Acsády L, Arabadzisz D, Freund TF (1996) Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* 73:299–315. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00610-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00610-9)
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2003) Aqueous humor dynamics in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5168–5173. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0504>
- Akrouh A, Kerschensteiner D (2015) Morphology and function of three VIP-expressing amacrine cell types in the mouse retina. *J Neurophysiol* 114:2431–2438. <https://doi.org/10.1152/jn.00526.2015>
- Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, et al (2012) The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 31:152–181. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.11.002>
- Arimura A, Shioda S (1995) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front Neuroendocrinol* 16:53–88. <https://doi.org/10.1006/frne.1995.1003>
- Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, et al (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129:2787–2789. <https://doi.org/10.1210/endo-129-5-2787>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.12.022>
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF03033919>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.09.004>
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, et al (2008) PACAP-mediated neuroprotection of neurochemically identified cell types in MSG-induced retinal degeneration. *J Mol Neurosci* 36:97–104. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9059-5>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9392-3>
- Atlasz T, Szabadfi K, Reglodi D, et al (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. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03650.x>
- Atlasz T, Vaczy A, Werling D, et al (2016) Protective effects of PACAP in the retina. In: *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide - PACAP*. Eds.: Reglodi D, Tamas A. Springer, Switzerland, pp 501–527.
- Belokopytov M, Shulman S, Dubinsky G, et al (2011) Ameliorative effect of NAP on laser-induced retinal damage. *Acta Ophthalmol* 89:e126-31. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2010.02041.x>
- Berger EA, McClellan SA, Barrett RP, Hazlett LD (2010) VIP promotes resistance in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected cornea by modulating adhesion molecule expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5776–5782. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4917>
- Bill A, Sperber GO (1990) Control of retinal and choroidal blood flow. *Eye (Lond)* 4 ( Pt 2):319–325. <https://doi.org/10.1038/eye.1990.43>
- Block F, Schwarz M, Sontag K-H (1992) Retinal ischemia induced by occlusion of both common carotid arteries in rats as demonstrated by electroretinography. *Neurosci Lett* 144:124–126. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90731-L](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90731-L)
- Bonaventura G, Iemmolo R, D'Amico AG, et al (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. <https://doi.org/10.1002/jcp.26182>
- Botia B, Basille M, Allais A, et al (2007) Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* 28:1746–1752. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.04.013>
- Bouhenni RA, Dunmire J, Sewell A, Edward DP (2012) Animal models of glaucoma. *J Biomed Biotechnol* 2012:692609. <https://doi.org/10.1155/2012/692609>
- Bourgault S, Chatenet D, Wurtz O, et al (2011) Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Curr Pharm Des* 17:1002–1024. <https://doi.org/10.2174/138161211795589337>
- Bourgault S, Vaudry D, Botia B, et al (2008) Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 29:919–932. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.01.022>
- Brown D, Tamas A, Reglodi D, Tizabi Y (2013) PACAP protects against salsolinol-induced toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 50:600–607. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0015-7>
- Cakmak AI, Basmak H, Gursoy H, et al (2017) Vasoactive intestinal peptide, a promising agent for myopia? *Int J Ophthalmol* 10:211–216. <https://doi.org/10.18240/ijo.2017.02.05>
- Calkins DJ, Lambert WS, Formichella CR, et al (2018) The microbead occlusion model

- of ocular hypertension in mice. *Methods Mol Biol* 1695:23–39. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7407-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7407-8_3)
- Chen CS, Miller NR (2007) Ocular ischemic syndrome: review of clinical presentations, etiology, investigation, and management. *Compr Ophthalmol Update* 8:17–28.
- Chitranshi N, Dheer Y, Abbasi M, et al (2018) Glaucoma pathogenesis and neurotrophins: Focus on the molecular and genetic basis for therapeutic prospects. *Curr Neuropharmacol* 16:1018–1035. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180419121247>
- Choi WJ, Pepple KL, Zhi Z, Wang RK (2015) Optical coherence tomography based microangiography for quantitative monitoring of structural and vascular changes in a rat model of acute uveitis in vivo: a preliminary study. *J Biomed Opt* 20:16015. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.1.016015>
- Ciulla L, Moorthy M, Mathew S, et al (2020) Circadian rhythm and glaucoma: What do we know? *J Glaucoma* 29:127–132. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000001402>
- Crawley L, Zamir SM, Cordeiro MF, Guo L (2012) Clinical Options for the Reduction of Elevated Intraocular Pressure. *Ophthalmol Eye Dis* 4:OED.S4909. <https://doi.org/10.4137/OED.S4909>
- Czegledi L, Tamas A, Borzsei R, et al (2011) Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *Gen Comp Endocrinol* 172:115–119. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.12.012>
- D’Amico AG, Maugeri G, Bucolo C, et al (2017) Nap interferes with hypoxia-inducible factors and VEGF expression in retina of diabetic rats. *J Mol Neurosci* 61:256–266. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0869-6>
- D’Amico AG, Maugeri G, Musumeci G, et al (2021) PACAP and NAP: Effect of two functionally related peptides in diabetic retinopathy. *J Mol Neurosci* 71:1525–1535. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01769-4>
- D’Amico AG, Maugeri G, Rasà DM, et al (2018) NAP counteracts hyperglycemia/hypoxia induced retinal pigment epithelial barrier breakdown through modulation of HIFs and VEGF expression. *J Cell Physiol* 233:1120–1128. <https://doi.org/10.1002/jcp.25971>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0296-5>
- Dejda A, Bourgault S, Doan ND, et al (2011) Identification by photoaffinity labeling of the extracellular N-terminal domain of PAC1 receptor as the major binding site for PACAP. *Biochimie* 93:669–677. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.010>
- Denes V, Hideg O, Nyisztor Z, et al (2019) The neuroprotective peptide PACAP1-38

- contributes to horizontal cell development in postnatal rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 60:770–778. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-25719>
- Dey A, Manthey AL, Chiu K, Do C-W (2018) Methods to induce chronic ocular hypertension: reliable rodent models as a platform for cell transplantation and other therapies. *Cell Transplant* 27:213–229. <https://doi.org/10.1177/0963689717724793>
- Dietz GPH (2011) Protection by neuroglobin and cell-penetrating peptide-mediated delivery in vivo: a decade of research. Comment on Cai et al: TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol*. 2011; 227(1): 224–31. *Exp Neurol* 231:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.05.010>
- Dogrukol-Ak D, Tore F, Tuncel N (2004) Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood-brain barrier: therapeutic effects. *Curr Pharm Des* 10:1325–1340. <https://doi.org/10.2174/1381612043384934>
- Dragich JM, Loh DH, Wang LM, et al (2010) The role of the neuropeptides PACAP and VIP in the photic regulation of gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 31:864–875. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07119.x>
- El Zein N, Badran B, Sariban E (2008) The neuropeptide pituitary adenylate cyclase activating polypeptide modulates Ca<sup>2+</sup> and pro-inflammatory functions in human monocytes through the G protein-coupled receptors VPAC-1 and formyl peptide receptor-like 1. *Cell Calcium* 43:270–284. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.05.017>
- Fabian E, Reglodi D, Mester L, et al (2012) Effects of PACAP on intracellular signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *J Mol Neurosci* 48:493–500. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9812-7>
- Fahrenkrug J, Hannibal J (2004) Neurotransmitters co-existing with VIP or PACAP. *Peptides* 25:393–401. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.01.010>
- Fittipaldi A, Giacca M (2005) Transcellular protein transduction using the Tat protein of HIV-1. *Adv Drug Deliv Rev* 57:597–608. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.10.011>
- Flammer J, Mozaffarieh M (2007) What is the present pathogenetic concept of glaucomatous optic neuropathy? *Surv Ophthalmol* 52:S162–S173. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2007.08.012>
- Frechilla D, García-Osta A, Palacios S, et al (2001) BDNF mediates the neuroprotective effect of PACAP-38 on rat cortical neurons. *Neuroreport* 12:919–923. <https://doi.org/10.1097/00001756-200104170-00011>
- Gábel R, Pöstyéni E, Dénes V (2019) Neuroprotective Potential of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide in Retinal Degenerations of Metabolic Origin. *Front Neurosci* 13:1031. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01031>
- Galletti C, Fattori P (2018) The dorsal visual stream revisited: Stable circuits or dynamic

- pathways? *Cortex* 98:203–217. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.01.009>
- Gaytan F, Martinez-Fuentes AJ, Garcia-Navarro F, et al (1994) Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide (PACAP) immunolocalization in lymphoid tissues of the rat. *Cell Tissue Res* 276:223–227. <https://doi.org/10.1007/BF00306107>
- Girard BM, Campbell SE, Beca KI, et al (2021) Intrabladder PAC1 receptor antagonist, PACAP(6-38), reduces urinary bladder frequency and pelvic sensitivity in mice exposed to repeated variate stress (RVS). *J Mol Neurosci* 71:1575–1588. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01649-x>
- Gozes I (2008) VIP, from gene to behavior and back: summarizing my 25 years of research. *J Mol Neurosci* 36:115–124. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9105-3>
- Gurevich L, Slaughter MM (1993) Comparison of the waveforms of the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res* 33:2431–2435. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(93\)90122-d](https://doi.org/10.1016/0042-6989(93)90122-d)
- Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, et al (2012) Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. *Br J Pharmacol* 166:4–17. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01871.x>
- Hayreh SS (2001) Blood flow in the optic nerve head and factors that may influence it. *Prog Retin Eye Res* 20:595–624. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(01\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(01)00005-2)
- Hayreh SS, Zimmerman MB, Kimura A, Sanon A (2004) Central retinal artery occlusion. *Exp Eye Res* 78:723–736. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00214-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00214-8)
- Hosoya M, Kimura C, Ogi K, et al (1992) Structure of the human pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim Biophys Acta* 1129:199–206. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90488-1](https://doi.org/10.1016/0167-4781(92)90488-1)
- Huang W, Hu F, Wang M, et al (2018) Comparative analysis of retinal ganglion cell damage in three glaucomatous rat models. *Exp Eye Res* 172:112–122. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.03.019>
- Jacobs GH, Neitz J, Deegan JF (1991) Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature* 353:655–656. <https://doi.org/10.1038/353655A0>
- Jansen-Olesen I, Hougaard Pedersen S (2018) PACAP and its receptors in cranial arteries and mast cells. *J Headache Pain* 19:16. <https://doi.org/10.1186/s10194-017-0822-2>
- Jiang X, McClellan SA, Barrett RP, et al (2011) VIP and growth factors in the infected cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:6154–6161. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6943>
- Johnson T V., Tomarev SI (2010) Rodent models of glaucoma. *Brain Res Bull* 81:349–358. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.04.004>
- Joo KM, Chung YH, Kim MK, et al (2004) Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2,

- and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol* 476:388–413. <https://doi.org/10.1002/cne.20231>
- Joos KM, Li C, Sappington RM (2010) Morphometric changes in the rat optic nerve following short-term intermittent elevations in intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:6431–6440. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5212>
- Józsa G, Fülöp BD, Kovács L, et al (2021) Lack of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) disturbs callus formation. *J Mol Neurosci* 71:1543–1555. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01448-z>
- Karpiesiuk A, Palus K (2021) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) in Physiological and Pathological Processes within the Gastrointestinal Tract: A Review. *Int J Mol Sci* 22:8682. <https://doi.org/10.3390/ijms22168682>
- Keenan WT, Rupp AC, Ross RA, et al (2016) A visual circuit uses complementary mechanisms to support transient and sustained pupil constriction. *Elife* 5:15392. <https://doi.org/10.7554/eLife.15392>
- Kido N, Tanihara H, Honjo M, et al (2000) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in eyes with NMDA-induced neuronal death. *Brain Res* 884:59–67. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02887-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02887-0)
- Kiss P, Banki E, Gaszner B, et al (2021) Protective effects of PACAP in a rat model of diabetic neuropathy. *Int J Mol Sci* 22:10691. <https://doi.org/10.3390/ijms221910691>
- Kleemann E, Neu M, Jekel N, et al (2005) Nano-carriers for DNA delivery to the lung based upon a TAT-derived peptide covalently coupled to PEG-PEI. *J Control Release* 109:299–316. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.036>
- Köves K, Szabó E, Kántor O, et al (2020) Current state of understanding of the role of PACAP in the hypothalamo-hypophyseal gonadotropin functions of mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11:88. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00088>
- Kraus MF, Potsaid B, Mayer MA, et al (2012) Motion correction in optical coherence tomography volumes on a per A-scan basis using orthogonal scan patterns. *Biomed Opt Express* 3:1182–1199. <https://doi.org/10.1364/BOE.3.001182>
- Kuroiwa S, Katai N, Shibuki H, et al (1998) Expression of cell cycle-related genes in dying cells in retinal ischemic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:610–617.
- Kvarik T, Mammel B, Reglodi D, et al (2016) PACAP is protective in a rat model of retinopathy of prematurity. *J Mol Neurosci* 60:179–185. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0797-5>
- Kvarik T, Reglodi D, Werling D, et al (2021) The protective effects of endogenous PACAP in oxygen-induced retinopathy. *J Mol Neurosci* 71:2546–2557. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01846-2>
- Kwong JMK, Quan A, Kyung H, et al (2011) Quantitative analysis of retinal ganglion cell survival with Rbpm immunolabeling in animal models of optic neuropathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:9694–9702. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7869>

- Laburthe M, Couvineau A, Tan V (2007) Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 28:1631–1639. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.04.026>
- Langer I, Jeandriens J, Couvineau A, et al (2022) Signal transduction by VIP and PACAP receptors. *Biomedicines* 10(2):406. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020406>
- Lee LTO, Siu FKY, Tam JK V, et al (2007) Discovery of growth hormone-releasing hormones and receptors in nonmammalian vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2133–2138. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611008104>
- Leitão Guerra RL, Leitão Guerra CL, Bastos MG, et al (2019) Sick cell retinopathy: What we now understand using optical coherence tomography angiography. A systematic review. *Blood Rev* 35:32–42. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.03.001>
- León-Moreno LC, Castañeda-Arellano R, Rivas-Carrillo JD, Dueñas-Jiménez SH (2020) Challenges and improvements of developing an ischemia mouse model through bilateral common carotid artery occlusion. *J stroke Cerebrovasc Dis* 29:104773. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104773>
- Lerner LE, Polansky JR, Howes EL, Stern R (1997) Hyaluronan in the human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1222–1228.
- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KRG, et al (2002) Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:402–410.
- Lorén I, Emson PC, Fahrenkrug J, et al (1979) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience* 4:1953–1976. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(79\)90068-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(79)90068-x)
- Lugo JM, Tafalla C, Oliva A, et al (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. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.056>
- Maduna T, Lelievre V (2016) Neuropeptides shaping the central nervous system development: Spatiotemporal actions of VIP and PACAP through complementary signaling pathways. *J Neurosci Res* 94:1472–1487. <https://doi.org/10.1002/jnr.23915>
- Mantravadi A V., Vadhar N (2015) Glaucoma. *Prim Care Clin Off Pract* 42:437–449. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2015.05.008>
- Mathieu M, Giroso L, Vallarino M, Tagliafierro G (2005) PACAP in developing sensory and peripheral organs of the zebrafish, *Danio rerio*. *Eur J Histochem* 49:167–178.
- Matsumoto Y, Kanamori A, Nakamura M, Negi A (2014) Rat chronic glaucoma model induced by intracameral injection of microbeads suspended in sodium sulfate-sodium hyaluronate. *Jpn J Ophthalmol* 58:290–297. <https://doi.org/10.1007/s10384->

- Maugeri G, D'Amico AG, Bucolo C, D'Agata V (2019) Protective effect of PACAP-38 on retinal pigmented epithelium in an in vitro and in vivo model of diabetic retinopathy through EGFR-dependent mechanism. *Peptides* 119:170108. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170108>
- Maugeri G, D'Amico AG, Saccone S, et al (2017) PACAP and VIP inhibit HIF-1 $\alpha$ -mediated VEGF expression in a model of diabetic macular edema. *J Cell Physiol* 232:1209–1215. <https://doi.org/10.1002/jcp.25616>
- May V, Johnson GC, Hammack SE, et al (2021) PAC1 receptor internalization and endosomal MEK/ERK activation is essential for PACAP-mediated neuronal excitability. *J Mol Neurosci* 71:1536–1542. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01821-x>
- McMonnies CW (2017) Glaucoma history and risk factors. *J Optom* 10:71–78. <https://doi.org/10.1016/j.optom.2016.02.003>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9049-6>
- Meyer DK (2006) The effects of PACAP on neural cell proliferation. *Regul Pept* 137:50–57. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.03.009>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91757-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91757-9)
- Miyata A, Jiang L, Dahl RD, et al (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. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)92140-u](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)92140-u)
- Subhash HM, Wang RK (2013) Optical Coherence Tomography: Technical Aspects. In: *Biomedical Optical Imaging Technologies. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*. Eds.: Liang R. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 163-212. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-28391-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28391-8_5)
- Moody TW, Hill JM, Jensen RT (2003) VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. *Peptides* 24:163–177. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(02\)00290-5](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(02)00290-5)
- Moody TW, Jensen RT (2021) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal peptide (Part 2): biology and clinical importance in central nervous system and inflammatory disorders. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 28:206–213. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000621>
- Morgan JE, Tribble JR (2015) Microbead models in glaucoma. *Exp Eye Res* 141:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.06.020>

- Morrison JC, Johnson E, Cepurna WO (2008) Rat models for glaucoma research. *Prog Brain Res* 173:285–301. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)01121-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)01121-7)
- Murthy KS, Jin JG, Grider JR, Makhoulf GM (1997) Characterization of PACAP receptors and signaling pathways in rabbit gastric muscle cells. *Am J Physiol* 272:G1391-9. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.6.G1391>
- Nakamachi T, Matkovits A, Seki T, Shioda S (2012) Distribution and protective function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the retina. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:145. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00145>
- Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, et al (2016) PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat Commun* 7:12034. <https://doi.org/10.1038/ncomms12034>
- Nakatani M, Seki T, Shinohara Y, et al (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) stimulates production of interleukin-6 in rat Müller cells. *Peptides* 27:1871–1876. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.12.011>
- Noailles A, Kutsyr O, Maneu V, et al (2019) The absence of Toll-like receptor 4 mildly affects the structure and function in the adult mouse retina. *Front Cell Neurosci* 13:59. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00059>
- Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S (2008) Role of PACAP in ischemic neural death. *J. Mol. Neurosci* 36:16-25. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9077-3>
- Olianas MC, Ingianni A, Sogos V, Onali P (1997) Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors and PACAP in human fetal retina. *J Neurochem* 69:1213–1218. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69031213.x>
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP., et al (2004) Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 23:91–147. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2003.12.001>
- Osborne NN, Ugarte M, Chao M, et al (1999) Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* 43 Suppl 1:S102-28. [https://doi.org/10.1016/s0039-6257\(99\)00044-2](https://doi.org/10.1016/s0039-6257(99)00044-2)
- Overby DR, Clark AF (2015) Animal models of glucocorticoid-induced glaucoma. *Exp Eye Res* 141:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.06.002>
- Pang I-H, Clark AF (2020) Inducible rodent models of glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 75:100799. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100799>
- Pang I-H, Millar JC, Clark AF (2015) Elevation of intraocular pressure in rodents using viral vectors targeting the trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 141:33–41. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.04.003>
- Patko E, Szabo E, Toth D, et al (2022) Distribution of PACAP and PAC1 receptor in the human eye. *J Mol Neurosci*. <https://doi.org/10.1007/s12031-022-01985-0>



- Pérez de Sevilla Müller L, Solomon A, Sheets K, et al (2019) Multiple cell types form the VIP amacrine cell population. *J Comp Neurol* 527:133–158. <https://doi.org/10.1002/cne.24234>
- Pisegna JR, Wank SA (1993) Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6345–6349. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.6345>
- Pöstyéni E, Kovács-Valasek A, Dénes V, et al (2021) PACAP for retinal health: model for cellular aging and rescue. *Int J Mol Sci* 22:444. <https://doi.org/10.3390/ijms22010444>
- Quigley HA (2006) The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 90:262–267. <https://doi.org/10.1136/bjo.2005.081224>
- Rácz B, Gallyas FJ, Kiss P, et al (2006) The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involve inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul Pept* 137:20–26. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.02.009>
- Rao PV, Pattabiraman PP, Kopczynski C (2017) Role of the Rho GTPase/Rho kinase signaling pathway in pathogenesis and treatment of glaucoma: Bench to bedside research. *Exp Eye Res* 158:23–32. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.08.023>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9089-z>
- Reglodi D, Illes A, Opper B, et al (2018a) Presence and effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide under physiological and pathological conditions in the stomach. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:90. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00090>
- 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* 17:962–972. <https://doi.org/10.2174/138161211795589355>
- Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, et al (2012) PACAP is an endogenous protective factor—insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci* 48:482–492. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9762-0>
- Reglodi D, Renaud J, Tamas A, et al (2017) Novel tactics for neuroprotection in Parkinson’s disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Prog Neurobiol* 155:120–148. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.10.004>
- Reglodi D, Toth D, Vicena V, et al (2019) Therapeutic potential of PACAP in alcohol toxicity. *Neurochem Int* 124:238–244. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.01.017>
- Reglodi D, Vaczy A, Rubio-Beltran E, MaassenVanDenBrink A (2018b) Protective effects of PACAP in ischemia. *J Headache Pain* 19(1):19. <https://doi.org/10.1186/s10194-018-0845-3>

- Ross RA, Leon S, Madara JC, et al (2018) PACAP neurons in the ventral premammillary nucleus regulate reproductive function in the female mouse. *Elife* 7:e35960. <https://doi.org/10.7554/eLife.35960>
- Rytel L, Wojtkiewicz J, Snarska A, Mikołajczyk A (2020) Changes in the neurochemical characterization of enteric neurons in the porcine duodenum after administration of low-dose *Salmonella Enteritidis* Lipopolysaccharides. *J Mol Neurosci* 71:1556-1566. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01473-y>
- Said SI, Mutt V (1970) Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 169:1217–1218. <https://doi.org/10.1126/science.169.3951.1217>
- Samsel PA, Kisiswa L, Erichsen JT, et al (2011) A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:1671–1675. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3921>
- Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ (2010) The microbead occlusion model: A paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 51:207–216. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3947>
- Satitpitakul V, Sun Z, Suri K, et al (2018) Vasoactive intestinal peptide promotes corneal allograft survival. *Am J Pathol* 188:2016–2024. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.05.010>
- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF (1999) In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285:1569–1572. <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1569>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.11.015>
- Scuderi S, D’Amico AG, Castorina A, et al (2014) Davunetide (NAP) protects the retina against early diabetic injury by reducing apoptotic death. *J Mol Neurosci* 54:395–404. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0244-4>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9410-5>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9091-5>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00869-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00869-0)
- Senatorov V, Malyukova I, Fariss R, et al (2006) Expression of mutated mouse myocilin induces open-angle glaucoma in transgenic mice. *J Neurosci* 26:11903–11914.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3020-06.2006>

- Shan W, Lu S, Ou B, et al (2021) PACAP ameliorates the fertility of obese mice through PAC1/PKA/ERK/Nrf2 signal axis. *J Endocrinol* 248:337–354. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0316>
- Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE (2000) The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily\*. *Endocr Rev* 21:619–670. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0414>
- Shi G-X, Jin L, Andres DA (2010) Src-dependent TrkA transactivation is required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38-mediated Rit activation and neuronal differentiation. *Mol Biol Cell* 21:1597–1608. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-12-1033>
- Shili I, Hamdi Y, Marouani A, et al (2021) Long-term protective effect of PACAP in a fetal alcohol syndrome (FAS) model. *Peptides* 146:170630. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170630>
- Shim MS, Kim K-Y, Ju W-K (2017) Role of cyclic AMP in the eye with glaucoma. *BMB Rep* 50:60–70. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.2.200>
- Shioda S, Takenoya F, Wada N, et al (2016) Pleiotropic and retinoprotective functions of PACAP. *Anat Sci Int* 91:313–324. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0351-0>
- Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, et al (1999) Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res* 839:66–73. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01690-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01690-x)
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00789-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00789-6)
- Smedowski A, Pietrucha-Dutczak M, Kaarniranta K, Lewin-Kowalik J (2014) A rat experimental model of glaucoma incorporating rapid-onset elevation of intraocular pressure. *Sci Rep* 4:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep05910>
- Somogyvári-Vigh A, Reglodi D (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr Pharm Des* 10:2861–2889. <https://doi.org/10.2174/1381612043383548>
- Soto I, Pease ME, Son JL, et al (2011) Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:434–441. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5856>
- Spertus AD, Slakter JS, Weissman SS, Henkind P (1984) Experimental carotid occlusion: fundoscopic and fluorescein angiographic findings. *Br J Ophthalmol* 68:47–57. <https://doi.org/10.1136/bjo.68.1.47>
- Steele ECJ, Guo Q, Namura S (2008) Filamentous middle cerebral artery occlusion causes ischemic damage to the retina in mice. *Stroke* 39:2099–2104. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.504357>

- Steingart RA, Solomon B, Brenneman DE, et al (2000) VIP and peptides related to activity-dependent neurotrophic factor protect PC12 cells against oxidative stress. *J Mol Neurosci* 15:137–145. <https://doi.org/10.1385/JMN:15:3:137>
- Stetler RA, Gao Y, Zukin RS, et al (2010) Apurinic/aprimidinic endonuclease APE1 is required for PACAP-induced neuroprotection against global cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3204–3209. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000030107>
- Süveges I (2010) Szemészet, 1st edn. Medicina Könyvkiadó.
- Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, et al (2012a) Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell Tissue Res* 348:37–46. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1349-0>
- Szabadfi 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. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.013>
- Szabadfi K, Danyadi B, Kiss P, et al (2012b) Protective effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) in ischemic retinal degeneration. *J Mol Neurosci* 48:501–507. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9774-9>
- Szabadfi K, Mester L, Reglodi D, et al (2010) Novel neuroprotective strategies in ischemic retinal lesions. *Int J Mol Sci* 11:544–561. <https://doi.org/10.3390/ijms11020544>
- Szabadfi 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. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9593-1>
- Szabadfi K, Szabo A, Kiss P, et al (2014) PACAP promotes neuron survival in early experimental diabetic retinopathy. *Neurochem Int* 64:84–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.11.005>
- Szél Á (2006) Látószerv. In: Szövektan. Eds.: Röhlich P.Semmelweis Kiadó, Budapest, pp 465–488.
- Szentágothai J, Réthelyi M (2002) Funkcionális anatómia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, pp 1681–1730.
- Tamás A, Gábrriel R, Rácz B, et al (2004) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neurosci Lett* 372:110–113. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.09.021>
- Toth D, Szabo E, Tamas A, et al (2020) Protective effects of PACAP in peripheral organs. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11:377. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00377>
- Trick GL, Berkowitz BA (2005) Retinal oxygenation response and retinopathy. *Prog Retin Eye Res* 24:259–274. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.08.001>
- Trivli A, Koliarakis I, Terzidou C, et al (2018) Normal-tension glaucoma: Pathogenesis

- and genetics. *Exp Ther Med* 17:563-574. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.7011>
- Troger J, Kieselbach G, Teuchner B, et al (2007) Peptidergic nerves in the eye, their source and potential pathophysiological relevance. *Brain Res Rev* 53:39–62. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.06.002>
- Tsuchida M, Nakamachi T, Sugiyama K, et al (2014) PACAP stimulates functional recovery after spinal cord injury through axonal regeneration. *J Mol Neurosci* 54:380–387. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0338-z>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb17509.x>
- Uddman R, Luts A, Absood A, et al (1991a) PACAP, a VIP-like peptide, in neurons of the esophagus. *Regul Pept* 36:415–422. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(91\)90074-q](https://doi.org/10.1016/0167-0115(91)90074-q)
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF00318155>
- Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, et al (1998) Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn J Ophthalmol* 42:337–344. [https://doi.org/10.1016/s0021-5155\(98\)00026-4](https://doi.org/10.1016/s0021-5155(98)00026-4)
- Urcola JH, Hernández M, Vecino E (2006) Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res* 83:429–437. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.01.025>
- Vaczy A, Kovari P, Kovacs K, et al (2018) Protective role of endogenous PACAP in inflammation-induced retinal degeneration. *Curr Pharm Des* 24:3534–3542. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180924141407>
- Vaczy A, Reglodi D, Somoskeoy T, et al (2016) The protective role of PAC1-receptor agonist maxadilan in BCCAO-induced retinal degeneration. *J Mol Neurosci* 60:186–194. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0818-4>
- Varga B, Szabadfi K, Kiss P, et al (2011) PACAP improves functional outcome in excitotoxic retinal lesion: an electroretinographic study. *J Mol Neurosci* 43:44–50. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9406-1>
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, et al (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 Years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61:283-357. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, et al (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52:269–324.

- Vereczki V, Köves K, Csáki A, et al (2006) Distribution of hypothalamic, hippocampal and other limbic peptidergic neuronal cell bodies giving rise to retinopetal fibers: anterograde and retrograde tracing and neuropeptide immunohistochemical studies. *Neuroscience* 140:1089–1100. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.081>
- Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, et al (2012) Understanding glaucomatous damage: Anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res* 31:1–27. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.08.001>
- Vincze E, Köves K (2001) Structure, localization and physiologic role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Orv Hetil* 142:491–496.
- Wada Y, Nakamachi T, Endo K, et al (2013) PACAP attenuates NMDA-induced retinal damage in association with modulation of the microglia/macrophage status into an acquired deactivation subtype. *J Mol Neurosci* 51:493–502. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0017-5>
- Walker CS, Sundrum T, Hay DL (2014) PACAP receptor pharmacology and agonist bias: analysis in primary neurons and glia from the trigeminal ganglia and transfected cells. *Br J Pharmacol* 171:1521–1533. <https://doi.org/10.1111/bph.12541>
- Wang ZY, Alm P, Håkanson R (1995) Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rabbit eye. *Neuroscience* 69:297–308. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00258-k](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00258-k)
- Wang ZY, Waldeck K, Grundemar L, Håkanson R (1997) Ocular inflammation induced by electroconvulsive treatment: contribution of nitric oxide and neuropeptides mobilized from C-fibres. *Br J Pharmacol* 120:1491–1496. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701083>
- Webb IC, Coolen LM, Lehman MN (2013) NMDA and PACAP receptor signaling interact to mediate retinal-induced scn cellular rhythmicity in the absence of light. *PLoS One* 8:e76365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076365>
- Werling D, Banks W, Salameh T, et al (2017) Passage through the ocular barriers and beneficial effects in retinal ischemia of topical application of PACAP1-38 in rodents. *Int J Mol Sci* 18:675. <https://doi.org/10.3390/ijms18030675>
- Werling D, Reglodi D, Banks WA, et al (2016) Ocular delivery of PACAP1-27 protects the retina from ischemic damage in rodents. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 57:6683–6691. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20630>
- Werling D, Reglodi D, Kiss P, et al (2014) Investigation of PACAP fragments and related peptides in chronic retinal hypoperfusion. *J Ophthalmol* 2014:563812. <https://doi.org/10.1155/2014/563812>
- Wiggs JL, Pasquale LR (2017) Genetics of glaucoma. *Hum Mol Genet* 26:R21–R27. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx184>
- Wilson AM, Glickfeld LL (2014) Visual circuits get the VIP treatment. *Cell* 156:1123–

1124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.043>

- Wójcik-Gryciuk A, Gajewska-Woźniak O, Kordecka K, et al (2020) Neuroprotection of Retinal Ganglion Cells with AAV2-BDNF Pretreatment Restoring Normal TrkB Receptor Protein Levels in Glaucoma. *Int J Mol Sci* 21:6262. <https://doi.org/10.3390/ijms21176262>
- Yu R, Guo X, Huang L, et al (2012a) The novel peptide PACAP-TAT with enhanced traversing ability attenuates the severe lung injury induced by repeated smoke inhalation. *Peptides* 38:142–149. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.005>
- Yu R, Yang Y, Cui Z, et al (2014) Novel peptide VIP-TAT with higher affinity for PAC1 inhibited scopolamine induced amnesia. *Peptides* 60:41–50. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.07.018>
- Yu R, Zeng Z, Guo X, et al (2012b) The TAT peptide endows PACAP with an enhanced ability to traverse bio-barriers. *Neurosci Lett* 527:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.08.005>
- Zhao W, Dai L, Xi X-T, et al (2020) Sensitized heat shock protein 27 induces retinal ganglion cells apoptosis in rat glaucoma model. *Int J Ophthalmol* 13:525–534. <https://doi.org/10.18240/ijo.2020.04.01>
- Zheng Y, Zeng H, She H, et al (2010) Expression of peptide NAP in rat retinal Müller cells prevents hypoxia-induced retinal injuries and promotes retinal neurons growth. *Biomed Pharmacother* 64:417–423. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2010.01.016>
- Zheng Y, Zhang L, Xie J, Shi L (2021) The emerging role of neuropeptides in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 13:646726. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.646726>
- Zhou C-J, Shioda S, Yada T, et al (2002) PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways. *Curr Protein Pept Sci* 3:423–439. <https://doi.org/10.2174/1389203023380576>
- Zhou Y, Grinchuk O, Tomarev SI (2008) Transgenic mice expressing the Tyr437His mutant of human myocilin protein develop glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1932–1939. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1339>
- Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, et al (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* 278:22418–22423. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212355200>
- Zink M, Otto C, Zörner B, et al (2004) Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor in mice deficient for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type-I-receptor. *Neurosci Lett* 360:106–108. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.01.030>
- Zode GS, Kuehn MH, Nishimura DY, et al (2011) Reduction of ER stress via a chemical chaperone prevents disease phenotypes in a mouse model of primary open angle glaucoma. *J Clin Invest* 121:3542–3553. <https://doi.org/10.1172/JCI58183>

## 8 Publikációs lista

### 8.1 Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

**Szabó E.**, Patkó E., Váczy A., Molitor D., Csutak A., Tóth G., Reglődi D., Atlasz T. (2021). Retinoprotective Effects of PACAP Eye Drops in Microbead-Induced Glaucoma Model in Rats. *Int J Mol Sci* 22, 8825. <http://doi.org/10.3390/ijms22168825>  
(IF=5,923)

Atlasz T., Werling D., Song S., **Szabo E.**, Vaczy A., Kovari P., Tamas A., Reglodi D., Yu R. (2019). Retinoprotective Effects of TAT-Bound Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide. *J Mol Neurosci* 68(3), 397–407. <http://doi.org/10.1007/s12031-018-1229-5>  
(IF=2,678)

Reglodi D., Atlasz T., Jungling A., **Szabo E.**, Kovari P., Manavalan S., Tamas A. (2018). Alternative routes of administration of the neuroprotective pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Curr Pharm Des* 24(33): 3892–3904. <http://doi.org/10.2174/1381612824666181112110934>  
(Review; IF=2,412)

Témához kapcsolódó eredeti publikációk **összesített impakt faktora: 8,601**

### 8.2 Egyéb tudományos közlemények

Tekus E., Szenasi NL., **Szabo E.**, Heckel Z., Mintal T., Koszegi T., Atlasz T., Gazdag Z., Vaczi M., Wilhelm M. (2022). Well-trained elders have antioxidant responses and equal magnitude of EIMD as young adults. *Int J Environ Res Public Health* 19(15):8889. <https://doi.org/10.3390/ijerph19158889>  
(IF=4,614)

Patko E., **Szabo E.**, Toth D., Tornoczki T., Bosnyak I., Vaczy A., Atlasz T., Reglodi D. (2022). Distribution of PACAP and PAC1 receptor in the human eye. *J Mol Neurosci* <https://doi.org/10.1007/s12031-022-01985-0>  
(IF=3,444)



- Cselko A., **Szabo EI.**, Vaczi M., Koszegi T., Tekus E., Wilhelm M. (2021). Relationship between anthropometric, physical and hormonal parameters among pre-pubertal handball players *Int J Environ Res Public Health* 18(19): 9977. <https://doi.org/10.3390/ijerph18199977>  
(IF=3,390)
- Kovacs A. K., Atlasz T., Werling D., **Szabo E.**, Reglodi, D., Toth G. K. (2021). Stability Test of PACAP in Eye Drops. *J Mol Neurosci* 71(8):1567-1574. <http://doi.org/10.1007/s12031-020-01532-9>  
(IF=3,444)
- Kvarik T., Reglodi D., Werling D., Vaczy A., Kovari P., **Szabo E.**, Kovacs K., Hashimoto H., Ertl T., Gyarmati J., Atlasz, T. (2021). The Protective Effects of Endogenous PACAP in Oxygen-Induced Retinopathy. *J Mol Neurosci* <http://doi.org/10.1007/s12031-021-01846-2>  
(IF=3,444)
- Vácz M., Nagy S. A., Kószegi T., Misovics B., **Szabó E.**, Müller É., Perlaki G., Orsi G., Pál J., Bogner P., Illes Z. (2021). Muscle damage in response to a single bout of high intensity concentric exercise in patients with Pompe disease. *Ann Transl Med* 9(5): 389. <http://doi.org/10.21037/atm-20-3114>  
(IF=3,932)
- Toth D., **Szabo E.**, Tamas A., Juhasz T., Horvath G., Fabian E., Opper B., Szabo D., Maugeri G., D'Aamico A.G., D'Agata V., Vicena V., Reglodi D. (2020). Protective effects of PACAP in peripheral organs. *Front Endocrinol* 11:377. <http://doi.org/10.3389/fendo.2020.00377>  
(IF=5,555)
- Meszler B., Atlasz T., Misovics B., Botka B., **Szabó E.**, Vácz M. (2019). Combined strength and plyometric exercise training improves running economy and muscle elastic energy storage and re-use in young untrained women. *Eur J Intergr Med* 28: 86–91. <http://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.05.004>  
(IF=0,974)
- Reglodi D., Atlasz T., **Szabo E.**, Jungling A., Tamas A., Juhasz T., Fulop B.D. Bardosi A. (2018). PACAP deficiency as a model of aging. *GeroScience* 40(5–6): 437–452. <http://doi.org/10.1007/s11357-018-0045-8>  
(IF=6,444)

- Reglodi D., Tamas A., Jungling A., Vaczy A., Rivnyak A., Fulop B.D., **Szabo E.**, Lubics A., Atlasz T. (2018). Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide against neurotoxic agents. *Neurotoxicology* 66: 185–194. <http://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.03.010>  
(IF=3,263)
- Vaczy A., Kovari P., Kovacs K., Farkas K., **Szabo E.**, Kvarik T., Kocsis B., Fulop B., Atlasz T., Reglodi D. (2018). Protective role of endogenous PACAP in inflammation-induced retinal degeneration. *Curr Pharm Des* 24(30): 3534–3542. <http://doi.org/10.2174/1381612824666180924141407>  
(IF=2,412)
- Werling D., Banks W., Salameh T., Kvarik T., Kovacs L., Vaczy A., **Szabo E.**, Mayer F., Varga R., Tamas A, Toth G., Biro Zs., 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. <http://doi.org/10.3390/ijms18030675>  
(IF=3,687)
- Vaczy A., Reglodi D., Somoskeoy T., Kovacs K., Lokos E., **Szabo E.**, Tamas A., Atlasz T. (2016). The Protective Role of PAC1-Receptor Agonist Maxadilan in BCCAO-Induced Retinal Degeneration. *J Mol Neurosci* 60(2): 186–194. <http://doi.org/10.1007/s12031-016-0818-4>  
(IF=2,229)
- Tékus É., Kaj M., **Szabó E.**, Szénási N.L., Kerepesi I., Figler M., Gábrriel R., Wilhelm, M. (2012). Comparison of blood and saliva lactate level after maximum intensity exercise. *Acta Biol Hung* 63(Suppl 1.): 89–98. <http://doi.org/10.1556/ABiol.63.2012.Suppl.1.9>  
(IF=0,504)

Az eddig megjelent tudományos publikációk **összesített impakt faktora: 58,349.**

## 9 Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőimnek **Dr. Reglódi Dóra** egyetemi tanárnak és **Dr. Atlasz Tamás** egyetemi docensnek, akik lehetővé tették, hogy a Retina Kutatócsoport tagjává váljak és kezdetektől fogva támogatták és irányították munkásságom. Hálával tartozom nekik, értékes szakmai tanácsaikért, figyelmes és önzetlen segítségükért. Köszönöm, hogy megismertették velem a kutatói pálya szépségeit és lehetőségeit.

Köszönetet szeretnék mondani barátomnak, **Dr. Váczy Alexandra** egyetemi adjunktusnak, aki az első naptól kezdve teljes odaadással segítette és felügyelte tudományos munkám előrehaladását.

Hálásan köszönöm a rengeteg segítséget **Patkó Evelin**, **Molitor Dorottya** és **Kővári Petra** PhD hallgató- és kutatótársaimnak. Köszönöm az évek során együtt elvégzett kísérleteket, melyek segítettek szakmai fejlődésemet, valamint hálás vagyok, hogy baráti szeretettel bíztattak munkásságom során.

Továbbá köszönöm **Dr. Csutak Adrienne** egyetemi tanárnak, aki klinikai tapasztalatával segítette a kísérleteinket.

Köszönettel tartozom a **Retina Kutatócsoport** minden tagjának, valamint az **Anatómiai Intézet** összes munkatársának, akik kezdetektől fogva segítettek kutatásom előrehaladását.

Végül hálámat szeretném kifejezni **Családomnak** és **Barátaimnak**, akik mindig bíztattak és támogattak munkám során.

A disszertáció megvalósításához a következő támogatók 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, FIKPIL, .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, ÚNKP-19-3-I-PTE-137, TKP2020-IKA-08, TKP2021-EGA-16.



# Retinoprotective Effects of TAT-Bound Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide

Tamas Atlasz<sup>1,2,3</sup> · D. Werling<sup>1</sup> · S. Song<sup>4</sup> · E. Szabo<sup>1</sup> · A. Vaczy<sup>1</sup> · P. Kovari<sup>1</sup> · A. Tamas<sup>1</sup> · D. Reglodi<sup>1</sup> · Rongjie Yu<sup>4</sup>

Received: 20 September 2018 / Accepted: 21 November 2018 / Published online: 12 December 2018  
© The Author(s) 2018

## Abstract

Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) belong to the same peptide family and exert a variety of biological functions. Both PACAP and VIP have protective effects in several tissues. While PACAP is known to be a stronger retinoprotective peptide, VIP has very potent anti-inflammatory effects. The need for a non-invasive therapeutic approach has emerged and PACAP has been shown to be retinoprotective when administered in the form of eye drops as well. The cell penetrating peptide TAT is composed of 11 amino acids and tagging of TAT at the C-terminus of neuropeptides PACAP/VIP can enhance the traversing ability of the peptides through the biological barriers. We hypothesized that TAT-bound PACAP and VIP could be more effective in exerting retinoprotective effects when given in eye drops, by increasing the traversing efficacy and enhancing the activation of the PAC1 receptor. Rats were subjected to bilateral carotid artery occlusion (BCCAO), and retinas were processed for histological analysis 14 days later. The efficiency of the TAT-bound peptides to reach the retina was assessed as well as their cAMP increasing ability. Our present study provides evidence, for the first time, that topically administered PACAP and VIP derivatives (PACAP-TAT and VIP-TAT) attenuate ischemic retinal degeneration via the PAC1 receptor presumably due to a multifactorial protective mechanism.

**Keywords** Eye drops · TAT · Bio-barriers · Retinal protection

## Introduction

Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) belong to the same peptide family. PACAP exists in 27 and 38 amino acid forms, and the shorter peptide shows 67% homology with VIP. They also share their receptors: VPAC1 and VPAC2 receptors bind

both VIP and PACAP. However, PACAP also has a specific PAC1 receptor, which only binds PACAP. PACAP has a widespread occurrence in the body and a broad array of functions (Reglodi and Tamas 2016). Among others, PACAP influences gastrointestinal, urinary and cardiovascular functions (Heppner et al. 2018; Parsons and May 2018; Reglodi et al. 2018a), plays a role in reproduction and pregnancy (Lajko et al. 2018; Reglodi et al. 2012; Ross et al. 2018), has diverse behavioral and cognitive functions (Farkas et al. 2017; Gupta et al. 2018; Han et al. 2014; King et al. 2017), plays roles during both early development and aging (Fulop et al. 2018; Reglodi et al. 2018b; Watanabe et al. 2007), as well as influences the functions of both endocrine and exocrine glands (Bardosi et al. 2016; Egri et al. 2016; Prevost et al. 2013; Sasaki et al. 2017). VIP has also been shown to have diverse actions in addition to the originally described vasodilatory effects (Gozes 2008; Hill et al. 2007; Moody and Gozes 2007; Vu et al. 2015). VIP was originally isolated as a vasoactive peptide in the airways, later confirmed in the gastrointestinal tract (Vu et al. 2015). VIP is involved, among others, in immunomodulatory pathways (Abad and Tan 2018; Carrión et al. 2016; Jimeno et al. 2014), in nervous system

---

Tamas Atlasz, D. Werling, D. Reglodi and Rongjie Yu contributed equally to this work.

---

✉ Tamas Atlasz  
attam@gamma.ttk.pte.hu

✉ Rongjie Yu  
rongjie\_yu1123@163.com

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

<sup>2</sup> Department of Sportbiology, University of Pecs, Pecs, Hungary

<sup>3</sup> Janos Szentagothai Research Center, University of Pecs, Pecs, Hungary

<sup>4</sup> Institute of Biomedicine, Jinan University, Guangzhou, China

development and in the acquisition of certain neurological disorders (Maugeri et al. 2018a, b; Morell et al. 2012).

Both PACAP and VIP exert protective effects in several tissues (Brifault et al. 2016; Giladi et al. 2007; Reglodi et al. 2011; Shioda and Gozes 2011). VIP has stronger anti-inflammatory effects (Olson et al. 2015), while PACAP is a more potent antiapoptotic peptide (Reglodi et al. 2018c). In the eye, VIP and PACAP have various biological effects. Among others, PACAP has been described to participate in the iris sphincter functions (Yoshitomi et al. 2002), stimulates tear secretion (Nakamachi et al. 2016; Shioda et al. 2018) and modulates its composition (Gaal et al. 2008), influences corneal keratinization and wound repair (Ma et al. 2015; Nakamachi et al. 2016) and is involved in the sensory innervation of the ocular surface (Wang et al. 1996). PACAP and VIP also have protective effects on the corneal endothelium (Koh et al. 2017; Maugeri et al. 2018a, b). Both peptides and their receptors are distributed also in the retina, where they are involved in information processing of visual stimuli (Akrouh and Kerschensteiner 2015; Atlasz et al. 2016; Dragich et al. 2010; Pérez de Sevilla Müller et al. 2017; Webb et al. 2013) and have trophic functions (Endo et al. 2011; Fabian et al. 2012).

The retinoprotective effects of PACAP are well-documented and have been proven in different injury models, such as excitotoxic, ischemic, UV light-induced, traumatic, diabetic and oxygen-induced injuries (Atlasz et al. 2008, 2011, 2016; Kvarik et al. 2016; Shioda et al. 2016; Szabadfi et al. 2016; Vaczy et al. 2016). VIP, on the other hand, seems to be a less potent retinoprotective peptide. VIP has been shown to exert retinoprotective effects mainly in conditions involving inflammatory processes (Shi et al. 2016; Tunçel et al. 1996). However, in ischemic retinopathy, VIP was proven to be ten times less active than PACAP (Szabadfi et al. 2012). In most *in vivo* retinal disease models, PACAP and VIP have been administered as intravitreal injection in order to guarantee that the injected peptides reach the retina in high enough concentrations to exert protective effects. As PACAP exerts dramatic retinoprotective effects proven by dozens of studies, therapeutic use is implied and so the need for a non-invasive approach has emerged. One possible approach is to enhance cell penetration of these peptides. The cell penetrating peptide TAT (GRKKRRQRRRPQ) is derived from the HIV Tat protein (Schwarze et al. 1999). TAT has protein transduction domains (PTDs) with the ability to efficiently traverse cellular membranes. TAT can not only transfer different types of molecules (peptides, large molecular proteins, DNAs) into a variety of cell types, but can also bring the linked molecules across many biological barriers such as the blood-brain barrier (BBB), mucosal barrier and lung respiratory epithelium *in vivo* (Dietz and Bähr 2004). Our previous study reported that the tagging of TAT at the C-terminus of neuropeptides PACAP/VIP enhanced the traversing ability of the peptides through the biological barriers, such as BBB and blood–air barrier and blood–testis barrier (Yu et al. 2012a, b). Furthermore,

we found that VIP-TAT has higher activity on the activation of PACAP preferring PAC1 receptor than VIP (Yu et al. 2014). The structure analysis showed that TAT has a two-dimensional structure similar to that of PACAP(28–38), and PACAP(28–38) has been shown to facilitate the binding and the activation of PAC1-R (Vaudry et al. 2009).

PACAP in the form of eye drops has first been shown to exert local effects on the cornea. It has been shown to enhance corneal wound regeneration and nerve regrowth after injuries (Fukiage et al. 2007; Ma et al. 2015; Nakamachi et al. 2016; Shioda et al. 2018). Similarly, VIP has been shown to enhance corneal wound repair after alkali burn injury (Tuncel et al. 2016). Our recent studies have demonstrated that PACAP eye drops not only lead to topical effects, but PACAP is able to pass the ocular barriers and reach the retina, where it can exert retinoprotective effects (Werling et al. 2016, 2017). We hypothesize that the passage through ocular layers can be further enhanced by the binding of TAT peptide, which is known to increase passage of peptides through biological barriers. We have previously shown that intravitreally administered VIP is able to protect the retina against hypoperfusion-induced injury, but only in a dose ten times higher than that of PACAP (Szabadfi et al. 2012). We hypothesized that TAT-bound PACAP and VIP (PACAP-TAT, VIP-TAT) could be more effective in exerting retinoprotective effects when given in eye drops, by increasing the traversing efficacy and enhancing the activation of the PAC1 receptor. The aim of the present study, therefore, was to investigate the potential retinoprotective effects of PACAP-TAT and VIP-TAT administered in eye drops following bilateral carotid artery occlusion (BCCAO)-induced retinopathy in rats.

## Materials and Methods

### Materials

The peptides PACAP38, VIP, PACAP-TAT (tagging TAT at the C-terminus of PACAP38) and VIP-TAT (tagging TAT at the C-terminus of VIP) were chemically synthesized by GL Biochem Ltd. (Shanghai, China).

### Peptides Labeled with Fluorescein Isothiocyanate

In order to trace the drugs, peptides were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) using a FITC Protein Labeling Kit from ChangRu Biotech Ltd. (Guangzhou, China) according to the manufacturer's protocol. After the labeling reaction, gel filtration was used to remove the free FITC. In order to determine the amount of the residual free FITC, the peptides were submitted to ultrafiltration using Amicon Ultra – 0.5 mL (Millipore, USA) with a molecular sieve of 2000 Da. After centrifugation (1000×g, 10 min) the peptide was subjected to

fluorescence measurements performed with the multi-wavelength scanner Victor 3 (GE, USA) at the excitation of 495 nm and the emission of 520 nm. Protein concentrations were determined using the K4000 Bradford Protein Quantification Kit (Innovative, Guangzhou, China). The labeling efficiency was calculated using the following formula: label efficiency (LE) = fluorescence value (FV)/peptide mass (mol) (PM), representing the fluorescence intensity (AU) per mol of peptide (mol).

### The Efficiency of Reaching the Retina

Male rats with body weight from 160 to 180 g were purchased from the Medical and Experimental Animal Center (Guangdong, China). Rats were randomly assigned to one of the experimental groups (7 rats per group) and subjected to eye drops with FITC labeled peptides (100 nmol/kg) and PBS as control. Rats were sacrificed by anesthesia 2 h after the eye drop administration and the retina was separated, weighed, washed three times with PBS and divided into two parts. One part was prepared on the glass slide with glycerin and subjected to fluorescence microscopic observation of FITC with 495 nm excitation/520 nm emission. All images, focused on the left upper regions of the retina, were taken with 500 ms exposure time. The other part of the retina was subjected to grinding and ultrasonication in PBS at a concentration of 100 mg weight tissue per milliliter of PBS. The supernatant was collected by centrifugation and the fluorescence intensity in the supernatant (100  $\mu$ L) was determined. The valid fluorescence intensity (FI) for each sample treated with FITC labeled peptide was corrected by subtracting the fluorescence value of the sample treated with PBS, which was used as a blank background. The Efficiency of Traversing Eye to Retina (EtE) was expressed as the percentages of the FITC labeled peptide mass in the retina to the total FITC labeled peptide mass. The EtE was calculated using the following formula:  $\text{EtE} = \text{tFI}/\text{LE}/\text{PW} \times 100\%$  (tFI presents the fluorescence intensity of retina (arbitration unit, AU); LE presents the label efficiency of each peptide which has been determined above; PW presents the peptide mass (mole)).

### cAMP Accumulation Assay

PAC1-CHO cells cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) at 37 °C were scraped off the surface with rubber policeman, washed twice with PBS and the density of the cells was adjusted to  $2 \times 10^6$  /mL. Peptides were added to 500  $\mu$ L cells suspension with the corresponding varying working concentrations of the detected factor. After incubation at 37 °C for 5–10 min cells were harvested and the lysates were subjected to cAMP quantification using the enzyme immunoassay kit for cAMP (Biyuntian, Shanghai, China), following the manufacturer's instructions. Protein concentration of each

sample was determined using BCA assay, and the cAMP level of each sample was calculated following the formula:  $\text{cAMP level (pmol/mg protein)} = \text{cAMP concentration (pmol/mL)} / \text{protein concentration (mg/mL)}$ . The cAMP level in each sample was plotted as the percentage (%) of the maximal cAMP level in cells treated with PACAP27 versus the logarithmic value of the peptide concentrations. All experiments were run with at least four parallel samples and were repeated three times.

### Histological Procedure in the Retina

Adult male rat litters were housed in the animal facility in individual cages in a 12 h light-dark cycle with food and water ad libitum. Animal housing, care and application of experimental procedures were in accordance with institutional guidelines under approved protocols (No: BA02/2000–26/2017, University of Pecs). Under isoflurane anesthesia, common carotid arteries were exposed on both sides through a midline incision and then ligated with a 3–0 filament. A group of animals (sham group) underwent all steps of the operating procedure except ligation of the carotid arteries. Immediately following the operation, the right eye of the animals was treated with derivatives of PACAP (PACAP-TAT / $n = 17$ / or VIP-TAT / $n = 17$ /) eye drops (1  $\mu$ g/drop). Dose and schedule of the eye drop treatments were based on our previous experiments (Werling et al. 2016). In the experiment for histological analysis, the different derivatives were dissolved in benzalkonium solution for ophthalmic use (solutio ophthalmica cum benzalkonio (SOCB)). The left eye, serving as a control, was treated with vehicle containing neither PACAP-TAT nor VIP-TAT. Animals were treated for five consecutive days, twice a day with one drop of drug, under brief isoflurane anesthesia (max. 5 min).

Fourteen days after the operation, rats ( $n = 10$  SHAM and  $n = 24$  BCCAO) were killed with anesthetic and the eyes were processed for histology. The eyes were removed and the retinas were solved in phosphate buffered saline (PBS), fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1 M phosphate buffer (PB) (Sigma, Budapest, Hungary) and embedded in Durcupan ACM resin (Sigma, Budapest, Hungary). Retinas were cut at 2  $\mu$ m and stained with toluidine blue dye (Sigma, Hungary). Sections were mounted in DPX medium (Sigma, Hungary) and photographs were taken with a digital CCD camera using the Spot program. Central retinal areas within 1 mm from the optic nerve were used ( $n = 5$  measurements from one tissue block). The following parameters were measured: (i) cross-section of the retina from the outer limiting membrane (OLM) to the inner limiting membrane (ILM), (ii) the width of individual retinal layers (outer nuclear layer [ONL], outer plexiform layer [OPL], inner nuclear layer [INL], inner plexiform layer [IPL]), (iii) the number of cells/100  $\mu$ m section length in the GCL, and the (iv) number of cells/1  $\mu$ m<sup>2</sup> in the OPL and in the IPL. Results are

presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were made using the two-way ANOVA test followed by Tukey's post hoc analysis.

## Results

### TAT Tagging Enhances the Efficiency of Reaching Retina

The fluorescence imaging results of the retina after the treatment with eye drops of FITC labeled peptides (Fig. 1) showed that the FITC fluorescence density per area unit in the retina treated with eye drops of PACAP-TAT (Fig. 1a) and VIP-TAT (Fig. 1c) was much higher than in retinas treated with eye drops of PACAP/VIP, indicating that PACAP-TAT/VIP-TAT reached the retina more efficiently than PACAP/VIP. The calculation of the Efficiency for Traversing Eye to Retina (EtE) showed that the PACAP-TAT/VIP-TAT reached the retina with the efficiency ( $3.66 \pm 0.67\%$ ,  $3.05 \pm 0.58\%$ ) about three-fold that of PACAP/VIP ( $1.23 \pm 0.56\%$ ,  $0.97 \pm 0.47\%$ ), respectively.

### TAT-Tagging Enhanced the Activity of PACAP/VIP on the Activation of PAC1-R

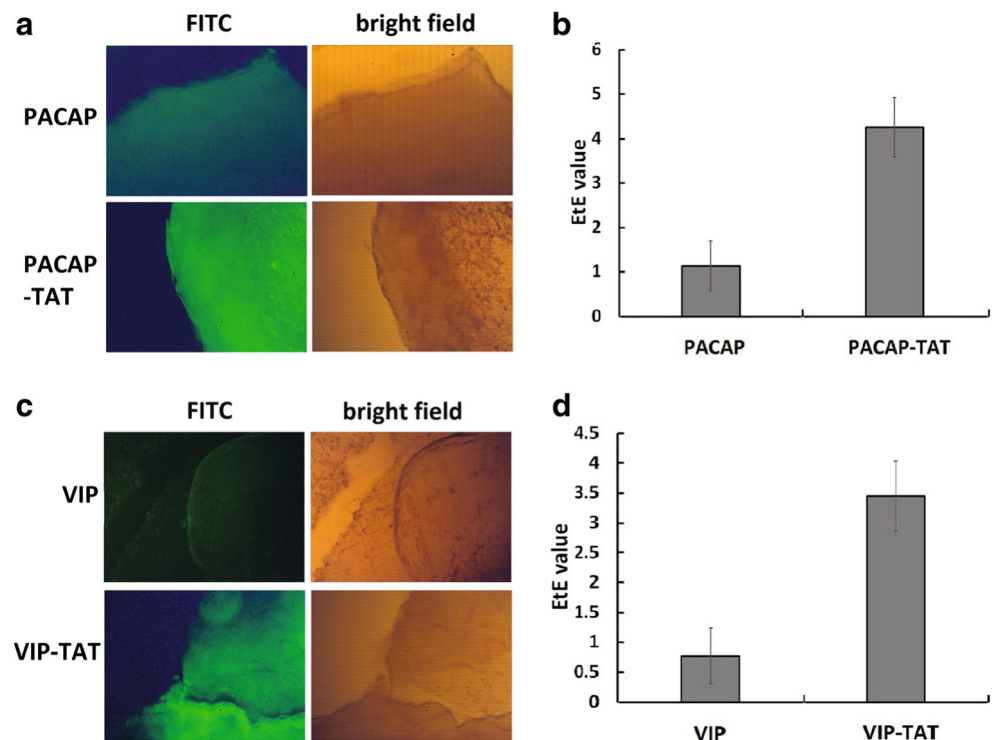
The results of cAMP assay (Fig. 2) showed that PACAP-TAT had EC<sub>50</sub> of  $23.6 \pm 4.4$  pM significantly higher than

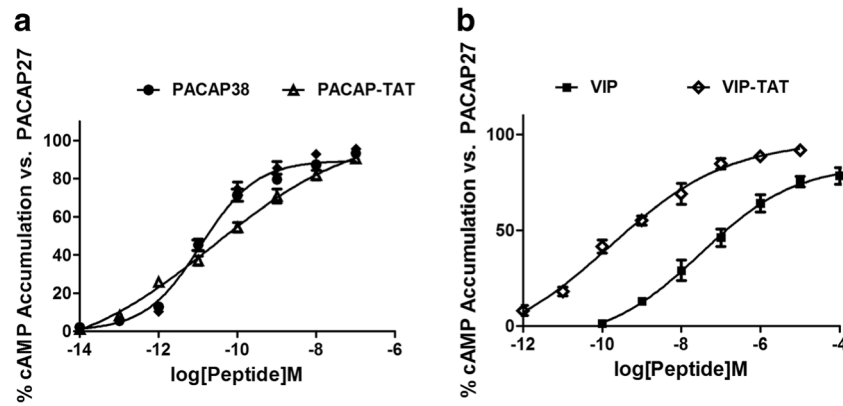
PACAP38 with  $11.7 \pm 3.1$  pM, whereas VIP-TAT had EC<sub>50</sub> of  $0.14 \pm 0.02$  nM about 1/200 of the EC<sub>50</sub> of VIP  $30.1 \pm 4.1$  nM. These results showed that TAT-tagging enhanced the activity of VIP on the activation of PAC1-R, but inhibited the activity of PACAP38.

### Morphological Analysis in the Retina after BCCAO

Carotid occlusion caused significant thickness reduction in all layers compared to sham animals. The most marked reduction in thickness was found in the outer and inner plexiform layers, and as a consequence, the total retinal thickness (OLM-ILM) was significantly less than in control retinas (Figs. 3 and 4). PACAP derivatives (PACAP-TAT, VIP-TAT) administration alone in sham animals did not cause any changes in the retinal thickness (Figs. 3 and 4). Eye drops containing PACAP-TAT or VIP-TAT caused significant amelioration in all retinal layers compared to the sham group. The thickness of the major retinal layers was significantly larger than that of the degenerated ones (Figs. 3 and 4). This was especially conspicuous in the OPL, which almost disappeared in several BCCAO-induced degenerated retinas and was preserved in PACAP-TAT or VIP-TAT-treated animals. The number of cells in different retinal layers also changed. BCCAO led to a significant cell loss in the ONL, INL and GCL. Eye drops with PACAP-TAT counteracted the effects of the BCCAO in all nuclear layers. The cell numbers in the GLC/100  $\mu\text{m}$ , in the ONL/500  $\mu\text{m}^2$  and in the INL/500  $\mu\text{m}^2$  were significantly higher compared to

**Fig. 1** The efficiency of FITC labeled PACAP/PACAP-TAT (a, b) and VIP/VIP-TAT (c, d) traversing to retina given in eye drops. The retina was separated 2 h after the eye drops and submitted to the fluorescence microscopic observation of FITC fluorescence signal (A, C) and the calculation of Efficiency of Traversing Eye to Retina (EtE) (b, d). The data are means  $\pm$  SEM of four experiments





**Fig. 2** cAMP assay results showing the effects of PACAP/PACAP-TAT (a) and VIP/VIP-TAT (b) on the activation of PAC1-R. The intracellular cAMP accumulation in PAC1-CHO cells induced by PACAP38(●), PACAP-TAT(▲), VIP(■) and VIP-TAT (◆) in their respective

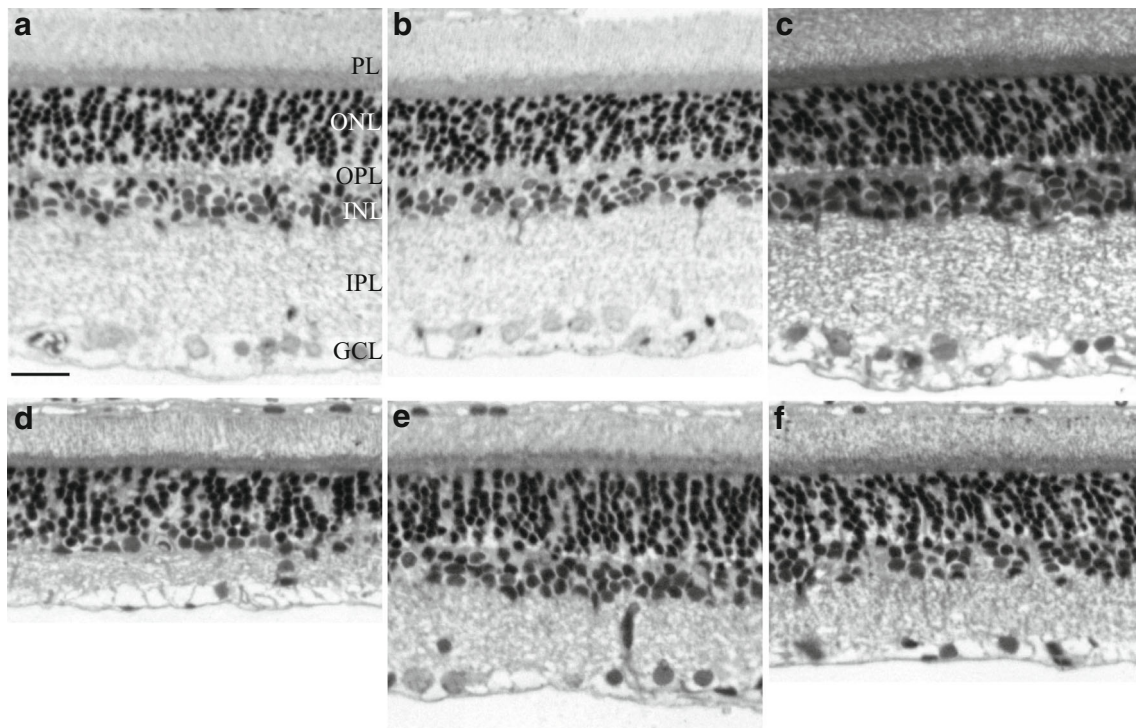
effective working concentration was plotted as the percentage (%) of the maximum cAMP level induced by PACAP27. The data are means ± SEM of four experiments

the BCCAO-induced degenerated retinas. VIP-TAT administration also led to reduced cell loss in almost all nuclear layers, except in the ONL/500 μm<sup>2</sup> (Figs. 5, 6 and 7).

**Discussion**

In the present study we demonstrated the efficacy of TAT-bound PACAP and VIP peptides to reach the retina and exert

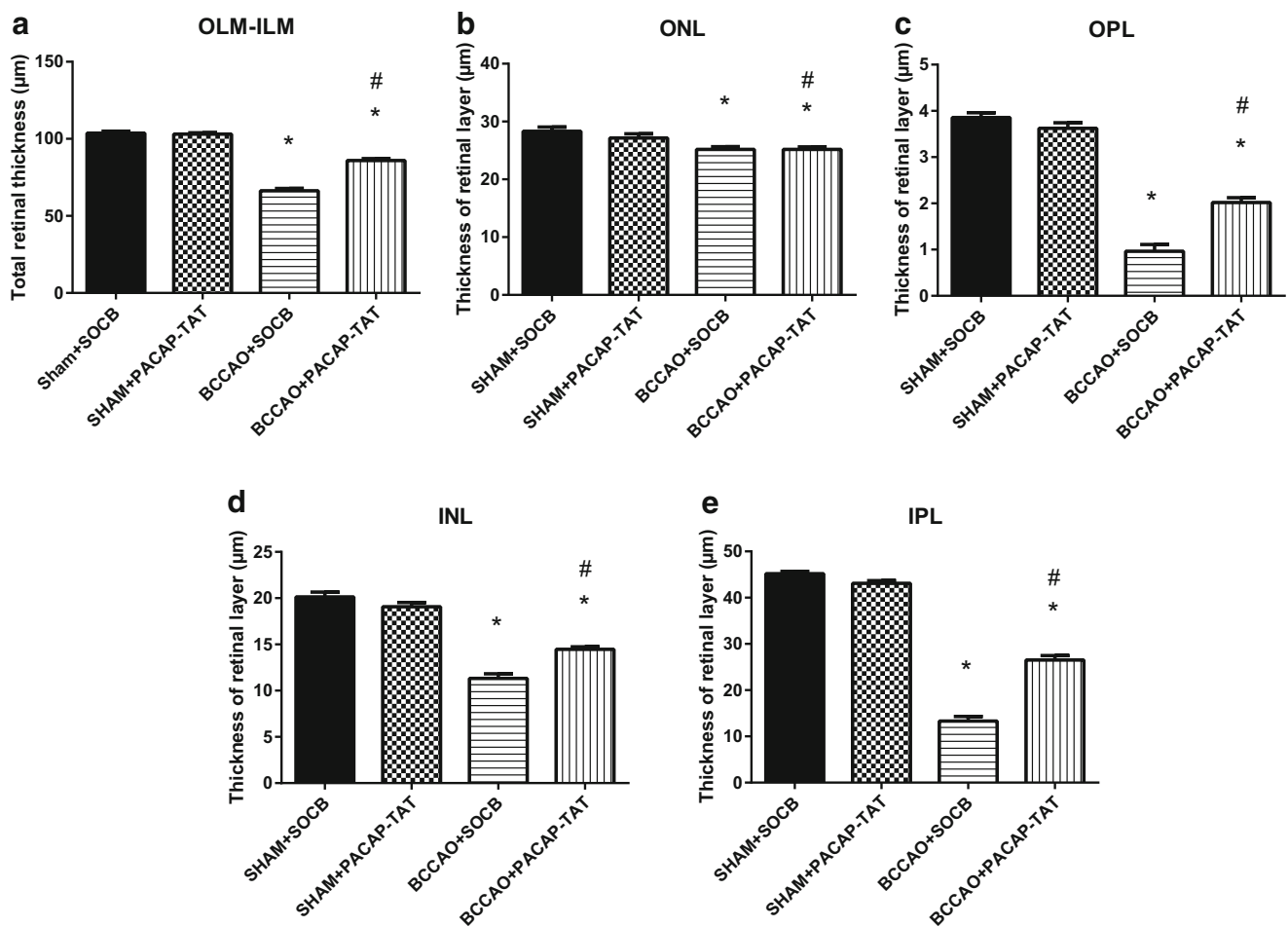
a retinoprotective effect in a model of ischemic retinopathy in rats. The retinoprotective effects of PACAP are well-documented in models of many different retinopathies (Atlasz et al. 2011, 2016; Shioda et al. 2016). Intravitreal injections of PACAP have been shown to lead to robust retinoprotective effects in various models of retinal injuries (Atlasz et al. 2016). The protective effects have been demonstrated to affect all neuronal cell types, from ganglion cells (Atlasz et al. 2010; Shoge et al. 1999) to photoreceptors and



**Fig. 3** Light microphotographs of retinal sections. Retinal tissue from BCCAO+SOCB (d) showed severe degeneration compared to SHAM+SOCB (a), SHAM + PACAP-TAT (b) or SHAM + VIP-TAT (c). The retinal layers of BCCAO+SOCB rats following treatment with eye drops

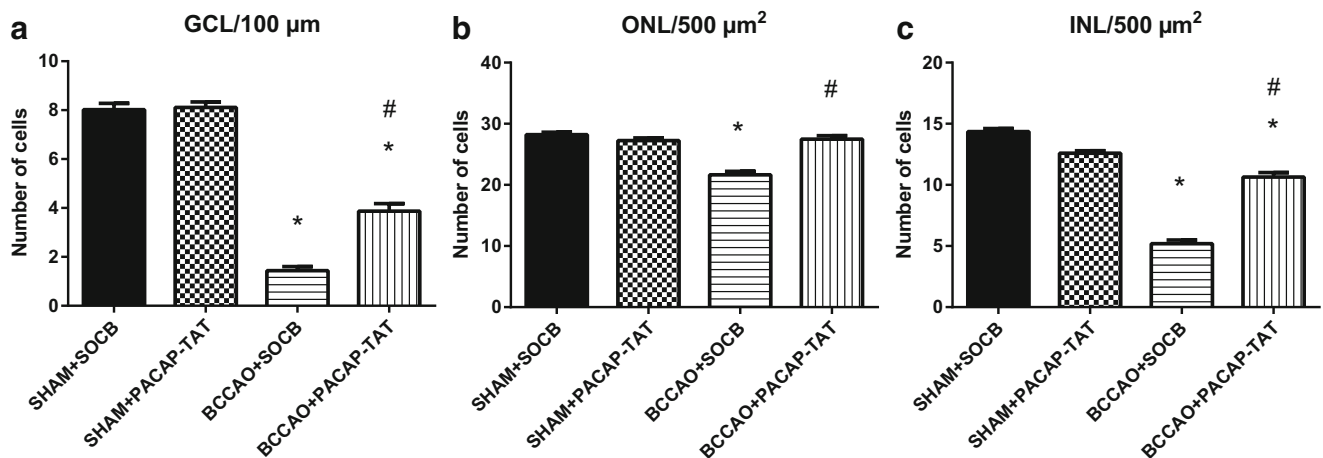
containing PACAP-TAT (e) or VIP-TAT (f) showed only mild degeneration. Abbreviations: PL, photoreceptor layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar: 20 μm





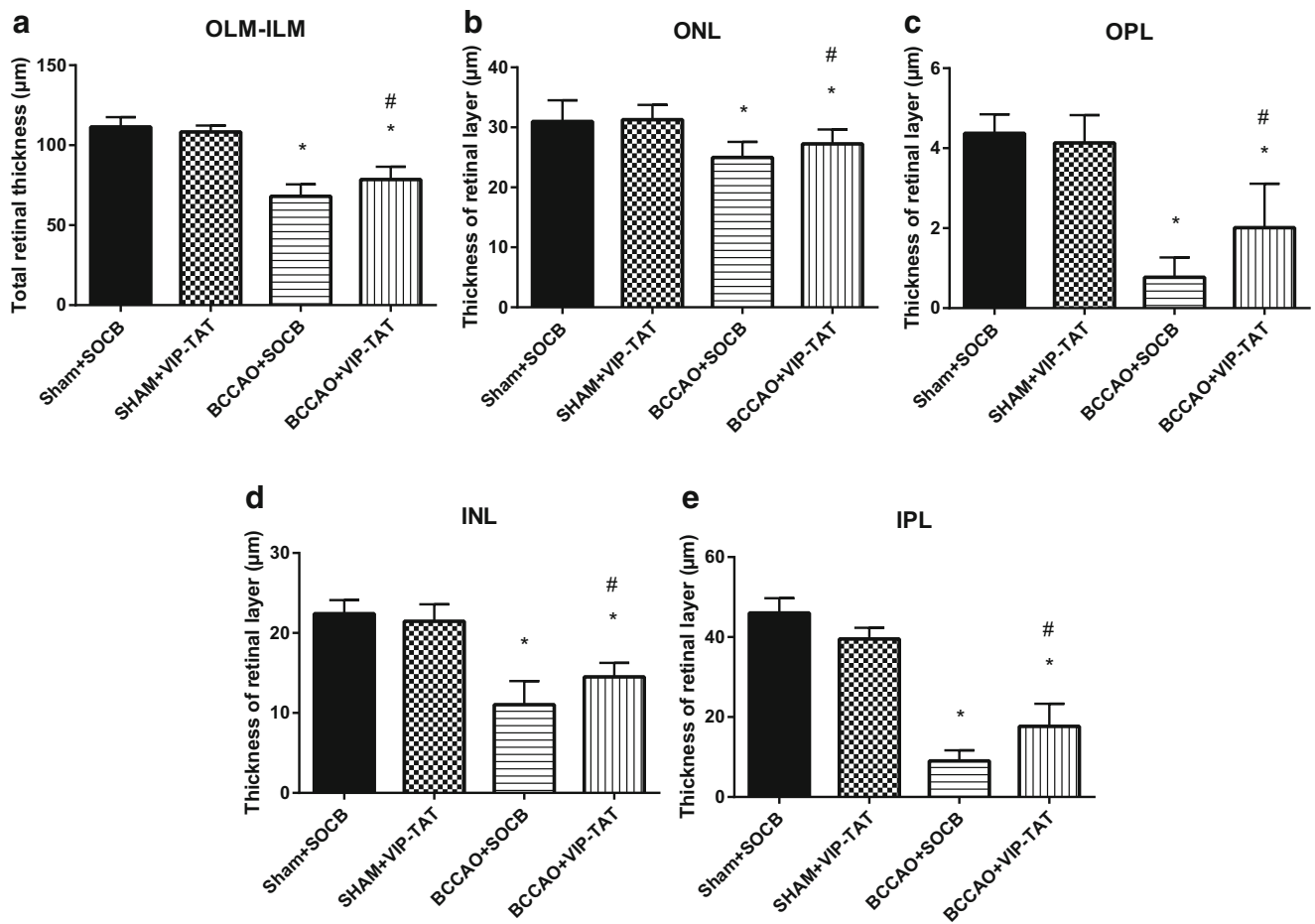
**Fig. 4** Quantification of retinal layers in SHAM+SOCB, in SHAM+PACAP-TAT, in BCCAO+SOCB, and in BCCAO+PACAP-TAT animals; the right eye was treated with PACAP-TAT eye drops, the left eye served as controls receiving only SOCB. Comparison of all retinal layers (a–e). Morphometric analysis showed that treatment with PACAP-

TAT eye drops improved the structure of all the retinal layers. Statistical significance ( $*p < 0.05$  vs. SHAM+SOCB retinas,  $\#p < 0.05$  vs. BCCAO+SOCB retinas) was calculated by two-way ANOVA followed by Fischer's post hoc test



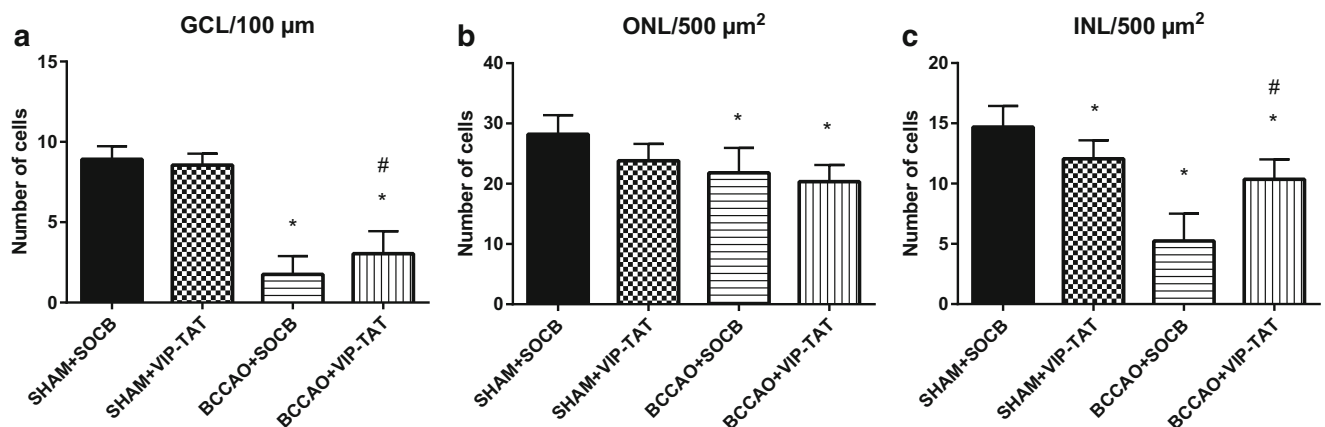
**Fig. 5** Quantification of the number of cells/100 µm GCL length (a), the number of cells/500 µm<sup>2</sup> ONL (b) and INL (c) areas in SHAM+SOCB, in SHAM+PACAP-TAT, in BCCAO+SOCB, and in BCCAO+PACAP-

TAT animals. Statistical significance ( $*p < 0.05$  vs. SHAM+SOCB retinas,  $\#p < 0.05$  vs. BCCAO+SOCB retinas) was calculated by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test



**Fig. 6** Quantification of retinal layers in SHAM+SOCB, in SHAM+VIP-TAT, in BCCAO+SOCB, and in BCCAO+VIP-TAT animals; the right eye was treated with VIP-TAT eye drops, the left eye served as control receiving only SOCB. Comparison of all retinal layers (a–e). Morphometric analysis showed that treatment with VIP-TAT eye drops

improved the structure of all the retinal layers. Statistical significance ( $*p < 0.05$  vs. SHAM+SOCB retinas,  $#p < 0.05$  vs. BCCAO+SOCB retinas) was calculated by two-way ANOVA followed by Fischer’s post hoc test



**Fig. 7** Quantification of the number of cells/100 μm GCL length (a), the number of cells/500 μm<sup>2</sup> ONL (b) and INL (c) areas in SHAM+SOCB, in SHAM+VIP-TAT, in BCCAO+SOCB, and in BCCAO+VIP-TAT

animals. Statistical significance ( $*p < 0.05$  vs. SHAM+SOCB retinas,  $#p < 0.05$  vs. BCCAO+SOCB retinas) was calculated by two-way ANOVA followed by Bonferroni’s post hoc test

bipolar neurons (Szabadfi et al. 2016), the two main interneuronal types, amacrine and horizontal cells (Szabadfi et al. 2012) and the main glial cells, Muller glial cells (Nakatani et al. 2006; Werling et al. 2016). Furthermore, PACAP is an endogenous regulator of retinal microglial cells/macrophages, important in certain pathological conditions (Wada et al. 2013). PACAP not only affects the neurons and glial cells of the retina leading to retinoprotection, but also helps to preserve the integrity of the blood-retinal barrier (Scuderi et al. 2013) and protects the retinal pigment epithelial cells against oxidative stress injury, a process important in preservation of the outer barrier of the retina (Fabian et al. 2012). Furthermore, PACAP influences retinal vasculogenesis, especially under pathological conditions (Kvarik et al. 2016).

VIP has also been shown to have effects in the visual system according to some studies, although most results point to its involvement in photic neuronal transmission rather than its trophic effects (Akrouh and Kerschensteiner 2015; Dragich et al. 2010; Pérez de Sevilla Müller et al. 2017; Webb et al. 2013). VIP is an important neuromodulator along the visual transmission pathways, not only in the retina, but all the way to the cortex where it influences visual information processing (Galletti and Fattori 2018; Wilson and Glickfeld 2014). Regarding retinoprotection, a few studies indicate that VIP may also exert trophic effects in certain retinal injuries. Among others, VIP has been shown to protect retinal ganglion cells against excitotoxic injury *in vitro* (Shoge et al. 1998). VIP also protected against ischemia-reperfusion injury induced by ophthalmic vessel ligation (Tunçel et al. 1996), where both systemic and intravitreal VIP decreased oxidative stress as shown by reduced malondialdehyde levels. This led to a more preserved histological structure, which is in accordance with our present findings. Our earlier study, using the same hypoperfusion model used in the present study, showed that intravitreal VIP administration led to retinal morphological amelioration, but only at doses ten times higher than PACAP (Szabadfi et al. 2012). In the present study, we show a similar degree of protection, using TAT-bound VIP. VIP's actions include not only direct effects, but also indirect effects, through stimulation of activity-dependent neurotrophic protein (ADNP) and its short fragment NAP, with highly potent neuroprotective effects. Both ADNP and NAP exerted strong protection against a variety of stress factors (Steingart et al. 2000). In the retina, NAP protected against laser-induced retinal damage (Belokopytov et al. 2011), to decrease hypoxia-inducible factor levels in a model of diabetic retinopathy (D'Amico et al. 2017, 2018; Maugeri et al. 2017), to prevent apoptotic cell death (Scuderi et al. 2014) and to promote neuronal growth after hypoxia-induced injury (Zheng et al. 2010). VIP also affects autonomic reflexes and choroidal blood flow, which eventually affects retinal blood supply (Bill and Sperber 1990). Applying VIP on the ocular surface in the form of eye drops has so far been shown to exert local effects on the cornea.

Regarding ischemic injury, PACAP has been shown to be protective in most cell layers affected in BCCAO-induced retinal ischemia. VIP was previously proven to be ten times less effective: intravitreal 100 pmol VIP, in contrast to the same dose of PACAP, led to no ameliorating effect on the retinal structure. However, 1000 pmol intravitreal VIP produced a protective effect. As eye drops, VIP was not effective alone (not shown). However, in our present study, we confirm that VIP bound to TAT peptide could effectively traverse the ocular barriers and exert a neuroprotective effect in the retina. PACAP-TAT did not prove to have significantly higher retinoprotective efficacy than untagged PACAP, but VIP exerted much stronger retinoprotective effects when bound to TAT. These results were consistent with our previous report that TAT with similar structure with PACAP(28–38) endowed VIP with higher affinity for PAC1-R (Yu et al. 2014). As for PACAP38, the tagging with TAT at the C-terminus of PACAP38 would be redundant and interfere with the receptor binding. This may be the reason why TAT tagging had some negative effect on PACAP38's activity on the activation of PAC1-R. Also, as VIP has been implicated in a variety of other ocular diseases as a possible therapeutic approach (Berger et al. 2010; Cakmak et al. 2017; Satitpitakul et al. 2018), our results with topical applications leading to retinoprotection may open new therapeutic approaches.

In summary, our present study provides evidence, for the first time, that topical administration of PACAP and VIP derivatives (PACAP-TAT and VIP-TAT) dissolved in SOCB attenuate ischemic retinal degeneration via the PAC1 receptor presumably due to a multifactorial protective mechanism.

**Acknowledgements** This work was supported by NKFIH FK129190, K119759, NAP 2017-1.2.1-NKP-2017-00002, National Natural Science Foundation of China (31670848), National Science Foundation of Guangdong Province (2016A030313087), Bolyai Scholarship, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS”, MTA-TKI 14016, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-15 2017-00008 “The role of neuro-inflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics”, EFOP 3.6.3-VEKOP-2017-00009, EFOP-3.6.1.-16-2016-00004 “Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs”, ÚNKP-18-4-PTE-364, ÚNKP-18-2-I-PTE-199, ÚNKP-16-4, ÚNKP-17-2-II New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities, Centre for Neuroscience, PTE AOK Research Grant KA-2017-15, Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities in Hungary, within the framework of the 20765-3/2018/FEKUTSTRAT.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## References

- Abad C, Tan YV (2018) Immunomodulatory roles of PACAP and VIP: lessons from knockout mice. *J Mol Neurosci* 66:102–113. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1150-y>
- Akrouh A, Kerscheneiner D (2015) Morphology and function of three VIP-expressing amacrine cell types in the mouse retina. *J Neurophysiol* 114:2431–2438. <https://doi.org/10.1152/jn.00526.2015>
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Babai N, Koszegi Z, Tamas A, Reglodi D, Gabriel R (2008) PACAP-mediated neuroprotection of neurochemically identified cell types in MSG-induced retinal degeneration. *J Mol Neurosci* 36:97–104. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9059-5>
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Tamas A, Toth G, Reglodi D, Gabriel R (2010) Evaluation of the protective effects of PACAP with cell-specific markers in ischemia-induced retinal degeneration. *Brain Res Bull* 81:497–504. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.09.004>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9392-3>
- 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) Neuroprotective effects of PACAP in the retina. In: Reglodi, Tamas (eds) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-PACAP, current topics in neurotoxicity 11*. Springer Nature, New York, pp 501–527
- Bardosi S, Bardosi A, Nagy Z, Reglodi D (2016) Expression of PACAP and PAC1 receptor in normal human thyroid gland and in thyroid papillary carcinoma. *J Mol Neurosci* 60:171–178. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0823-7>
- Belokopytov M, Shulman S, Dubinsky G, Gozes I, Belkin M, Rosner M (2011) Ameliorative effect of NAP on laser-induced retinal damage. *Acta Ophthalmol* 89:e126–e131. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2010.02041.x>
- Berger EA, McClellan SA, Barrett RP, Hazlett LD (2010) VIP promotes resistance in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected cornea by modulating adhesion molecule expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5776–5782. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4917>
- Bill A, Sperber GO (1990) Control of retinal and choroidal blood flow. *Eye (Lond)* 4:319–325. <https://doi.org/10.1038/eye.1990.43>
- Brifault C, Vaudry D, Wurtz O (2016) The neuropeptide PACAP, a potent disease modifier candidate for brain stroke treatment. In: Reglodi, Tamas (eds) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-PACAP, current topics in neurotoxicity 11*. Springer Nature, New York, pp 583–606
- Cakmak AI, Basmak H, Gursoy H, Ozkurt M, Yildirim N, Erkasap N, Bilgec MD, Tuncel N, Colak E (2017) Vasoactive intestinal peptide, a promising agent for myopia? *Int J Ophthalmol* 10:211–216. <https://doi.org/10.18240/ijo.2017.02.05>
- Carrión M, Pérez-García S, Martínez C, Juarranz Y, Estrada-Capetillo L, Puig-Kröger A, Gomariz RP, Gutiérrez-Cañás I (2016) VIP impairs acquisition of the macrophage proinflammatory polarization profile. *J Leukoc Biol* 100:1385–1393. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A0116-032RR>
- D'Amico AG, Maugeri G, Bucolo C, Saccone S, Federico C, Cavallaro S, D'Agata V (2017) Nap interferes with hypoxia-inducible factors and VEGF expression in retina of diabetic rats. *J Mol Neurosci* 61:256–266. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0869-6>
- D'Amico AG, Maugeri G, Rasà DM, La Cognata V, Saccone S, Federico C, Cavallaro S, D'Agata V (2018) NAP counteracts hyperglycemia/hypoxia induced retinal pigment epithelial barrier breakdown through modulation of HIFs and VEGF expression. *J Cell Physiol* 233:1120–1128. <https://doi.org/10.1002/jcp.25971>
- Dietz GP, Bähr M (2004) Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci* 27:85–131. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.03.005>
- Dragich JM, Loh DH, Wang LM, Vosko AM, Kudo T, Nakamura TJ, Odom IH, Tateyama S, Hagopian A, Waschek JA, Colwell CS (2010) The role of the neuropeptides PACAP and VIP in the photic regulation of gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 31:864–875. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07119.x>
- Egri P, Fekete C, Dénes Á, Reglodi D, Hashimoto H, Fülöp BD, Gereben B (2016) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) regulates the hypothalamo-pituitary-thyroid (HPT) axis via type 2 deiodinase in male mice. *Endocrinology* 157:2356–2366. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1043>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9434-x>
- Fabian E, Reglodi D, Mester L, Szabo A, Szabadfi K, Tamas A, Toth G, Kovacs K (2012) Effects of PACAP on intracellular signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *J Mol Neurosci* 48:493–500. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9812-7>
- Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Ujvári B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglodi D, Gaszner B (2017) Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience* 354:11–29. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.019>
- Fukiage C, Nakajima T, Takayama Y, Minagawa Y, Shearer TR, Azuma M (2007) PACAP induces neurite outgrowth in cultured trigeminal ganglion cells and recovery of corneal sensitivity after flap surgery in rabbits. *Am J Ophthalmol* 143:255–262. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2006.10.034>
- Fulop BD, Sandor B, Szentleleky E, Karanyicz E, Reglodi D, Gaszner B, Zakany R, Hashimoto H, Juhasz T, Tamas A (2018) Altered notch signalling in developing molar teeth of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *J Mol Neurosci*. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1146-7>
- Gaal V, Mark L, Kiss P, Kustos I, Tamas A, Kocsis B, Lubics A, Nemeth V, Nemeth A, Lujber L, Pytel J, Toth G, Reglodi D (2008) Investigation of the effects of PACAP on the composition of tear and endolymph proteins. *J Mol Neurosci* 36:321–329. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9067-5>
- Galletti C, Fattori P (2018) The dorsal visual stream revisited: stable circuits or dynamic pathways? *Cortex* 98:203–217. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.01.009>
- Giladi E, Hill JM, Dresner E, Stack CM, Gozes I (2007) Vasoactive intestinal peptide (VIP) regulates activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) expression in vivo. *J Mol Neurosci* 33:278–283. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-9003-0>
- Gozes I (2008) VIP, from gene to behavior and back: summarizing my 25 years of research. *J Mol Neurosci* 36:115–124. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9105-3>
- Gupta A, Gargiulo AT, Curtis GR, Badve PS, Pandey S, Barson JR (2018) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-27 (PACAP-27) in the thalamic paraventricular nucleus is stimulated by ethanol drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 42:1650–1660. <https://doi.org/10.1111/acer.13826>
- Han P, Tang Z, Yin J, Maalouf M, Beach TG, Reiman EM, Shi J (2014) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects against  $\beta$ -amyloid toxicity. *Neurobiol Aging* 35:2064–2071. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.022>

- Heppner TJ, Hennig GW, Nelson MT, May V, Vizzard MA (2018) PACAP38-mediated bladder afferent nerve activity hyperexcitability and Ca<sup>2+</sup> activity in urothelial cells from mice. *J Mol Neurosci*. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1119-x>
- Hill JM, Hauser JM, Sheppard LM, Abebe D, Spivak-Pohis I, Kushnir M, Deitch I, Gozes I (2007) Blockage of VIP during mouse embryogenesis modifies adult behavior and results in permanent changes in brain chemistry. *J Mol Neurosci* 31:183–200
- Jimeno R, Leceta J, Martínez C, Gutiérrez-Cañas I, Carrión M, Pérez-García S, Garín M, Mellado M, Gomariz RP, Juarranz Y (2014) Vasoactive intestinal peptide maintains the nonpathogenic profile of human th17-polarized cells. *J Mol Neurosci* 54:512–525. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0318-3>
- King SB, Lezak KR, O'Reilly M, Toufexis DJ, Falls WA, Braas K, May V, Hammack SE (2017) The effects of prior stress on anxiety-like responding to intra-BNST pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in male and female rats. *Neuropsychopharmacology* 42:1679–1687. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.16>
- Koh SM, Coll T, Gloria D, Sprehe N (2017) Corneal endothelial cell integrity in pre-cut human donor corneas enhanced by autocrine vasoactive intestinal peptide. *Cornea* 36:476–483. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001136>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0797-5>
- Lajko A, Meggyes M, Fulop BD, Gede N, Reglodi D, Szereday L (2018) Comparative analysis of decidual and peripheral immune cells and immune-checkpoint molecules during pregnancy in wild-type and PACAP-deficient mice. *Am J Reprod Immunol* 9:e13035. <https://doi.org/10.1111/aji.13035>
- Ma Y, Zhao S, Wang X, Shen S, Ma M, Xu W, Hong A (2015) A new recombinant PACAP-derived peptide efficiently promotes corneal wound repairing and lacrimal secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56:4336–4349. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17088>
- Maugeri G, D'Amico AG, Saccone S, Federico C, Cavallaro S, D'Agata V (2017) PACAP and VIP inhibit HIF-1 $\alpha$ -mediated VEGF expression in a model of diabetic macular edema. *J Cell Physiol* 232:1209–1215. <https://doi.org/10.1002/jcp.25616>
- Maugeri G, D'Amico AG, Rasa DM, Saccone S, Federico C, Cavallaro S, D'Agata V (2018a) PACAP and VIP regulate hypoxia-inducible factors in neuroblastoma cells exposed to hypoxia. *Neuropeptides* 69:84–91. <https://doi.org/10.1016/j.nepe.2018.04.009>
- Maugeri G, Longo A, D'Amico AG, Rasa DM, Reibaldi M, Russo A, Bonfiglio V, Avitabile T, D'Agata V (2018b) Trophic effect of PACAP on human corneal endothelium. *Peptides* 99:20–26. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.11.003>
- Moody TW, Gozes I (2007) Vasoactive intestinal peptide receptors: a molecular target in breast and lung cancer. *Curr Pharm Des* 13:1099–1104. <https://doi.org/10.2174/138161207780619000>
- Morell M, Souza-Moreira L, González-Rey E (2012) VIP in neurological diseases: more than a neuropeptide. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 12:323–332
- 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. <https://doi.org/10.1038/ncomms12034>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.12.011>
- Olson KE, Kosloski-Bilek LM, Anderson KM, Diggs BJ, Clark BE, Gledhill JM Jr, Shandler SJ, Mosley RL, Gendelman HE (2015) Selective VIP receptor agonists facilitate immune transformation for dopaminergic neuroprotection in MPTP-intoxicated mice. *J Neurosci* 35:16463–16478. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2131-15.2015>
- Parsons RL, May V (2018) PACAP-induced PAC1 receptor internalization and recruitment of endosomal signaling regulate cardiac neuron excitability. *J Mol Neurosci*. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1127-x>
- Pérez de Sevilla Müller L, Solomon A, Sheets K, Hapukino H, Rodriguez AR, Brecha NC (2017) Multiple cell types form the VIP amacrine cell population. *J Comp Neurol*. <https://doi.org/10.1002/cne.24234>
- Prevost G, Arabo A, Jian L, Quehenec E, Cartier D, Hassan S, Falluel-Morel A, Tanguy Y, Gargani S, Lihmann I, Kerr-Conte J, Lefebvre H, Pattou F, Anouar Y (2013) The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human  $\beta$ -cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance. *Endocrinology* 154:3796–3806. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1167>
- Reglodi D, Tamas A (2016) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide – PACAP. Springer Nature, New York
- Reglodi D, Kiss P, Lubics A, Tamas A (2011) Review of the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des* 17:962–972. <https://doi.org/10.2174/138161211795589355>
- Reglodi D, Tamas A, Koppan M, Szogyi D, Welke L (2012) Role of PACAP in female fertility and reproduction at gonadal level – recent advances. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:155. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00155>
- Reglodi D, Illes A, Opper B, Schafer E, Tamas A, Nemeth J, Horvath G (2018a) Presence and effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide under physiological and pathological conditions in the stomach. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:90. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00090>
- Reglodi D, Jungling A, Longuespée R, Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann M, Juhasz T, Bardosi A, Tamas A, Fulop BD, Kovacs K, Nagy Z, Sparks J, Miseta A, Mazzucchelli G, Hashimoto H, Bardosi A (2018b) Accelerated pre-senile systemic amyloidosis in PACAP knockout mice – a protective role of PACAP in age-related degenerative processes. *J Pathol* 245:478–490. <https://doi.org/10.1002/path.5100>
- Reglodi D, Tamas A, Jungling A, Vaczy A, Rivnyak A, Fulop BD, Szabo E, Lubics A, Atlasz T (2018c) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide against neurotoxic agents. *Neurotoxicology* 66:185–194. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.03.010>
- Ross RA, Leon S, Madara JC, Schafer D, Fergani C, Maguire CA, Versteegen AM, Brengle E, Kong D, Herbison AE, Kaiser UB, Lowell BB, Navarro VM (2018) PACAP neurons in the ventral premammillary nucleus regulate reproductive function in the female mouse. *Elife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.35960.001>
- Sasaki S, Watanabe J, Ohtaki H, Matsumoto M, Murai N, Nakamachi T, Hannibal J, Fahrenkrug J, Hashimoto H, Watanabe H, Sueki H, Honda K, Miyazaki A, Shioda S (2017) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion. *Br J Dermatol* 176:413–422. <https://doi.org/10.1111/bjd.14885>
- Satitpitakul V, Sun Z, Suri K, Amouzegar A, Katikireddy KR, Jurkunus UV, Kheirkhah A, Dana R (2018) Vasoactive intestinal peptide promotes corneal allograft survival. *Am J Pathol* 188:2016–2024. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.05.010>
- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF (1999) In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285:1569–1572. <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1569>
- Scuderi S, D'Amico AG, Castorina A, Imbesi R, Carnazza ML, D'Agata V (2013) Ameliorative effect of PACAP and VIP against increased permeability in a model of outer blood retinal barrier dysfunction.

- Peptides 39:119–124. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.11.015>
- Scuderi S, D'Amico AG, Castorina A, Federico C, Marrazzo G, Drago F, Bucolo C, D'Agata V (2014) Davunetide (NAP) protects the retina against early diabetic injury by reducing apoptotic death. *J Mol Neurosci* 54:395–404. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0244-4>
- Shi H, Carion TW, Jiang Y, Steinle JJ, Berger EA (2016) VIP protects human retinal microvascular endothelial cells against high glucose-induced increases in TNF- $\alpha$  and enhances RvD1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 123:28–32. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2016.03.001>
- Shioda S, Gozes I (2011) VIP and PACAP: novel approaches to brain functions and neuroprotection. *Curr Pharm Des* 17:961. <https://doi.org/10.2174/138161211795589391>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0351-0>
- Shioda S, Takenoya F, Hirabayashi T, Wada N, Seki T, Nonaka N, Nakamachi T (2018) Effects of PACAP on dry eye symptoms, and possible use for therapeutic application. *J Mol Neurosci*. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1087-1>
- Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, Ishihara K, Tamura Y, Shiomi H et al (1998) Protective effects of vasoactive intestinal peptide against delayed glutamate neurotoxicity in cultured retina. *Brain Res* 809:127–136
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01690-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01690-X)
- Steingart RA, Solomon B, Brennehan DE, Fridkin M, Gozes I (2000) VIP and peptides related to activity-dependent neurotrophic factor protect PC12 cells against oxidative stress. *J Mol Neurosci* 15:137–145. <https://doi.org/10.1385/JMN:15:3:137>
- Szabadfi K, Danyadi B, Kiss P, Tamas A, Fabian E, Gabriel R, Reglodi D (2012) Protective effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) in ischemic retinal degeneration. *J Mol Neurosci* 48:501–507. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9774-9>
- Szabadfi K, Reglodi D, Szabo A, Szalontai B, Valasek A, Setalo G Jr, 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. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9593-1>
- Tunçel N, Başmak H, Uzuner K, Tunçel M, Altıokka G, Zaimoğlu V, Ozer A, Gürer F (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 NY Acad Sci* 805:489–498. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb17509.x>
- Tuncel N, Yildirim N, Gurer F, Basmak H, Uzuner K, Sahinturk V, Gursoy H (2016) Effect of vasoactive intestinal peptide on the wound healing of alkali-burned corneas. *Int J Ophthalmol* 9:204–210. <https://doi.org/10.18240/ijo.2016.02.04>
- Vaczy A, Reglodi D, Somoskeoy T, Kovacs K, Lokos E, Szabo E, Tamas A, Atlasz T (2016) The protective role of PAC1-receptor agonist maxadilan in BCCAO-induced retinal degeneration. *J Mol Neurosci* 60:186–194. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0818-4>
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, 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. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>
- Vu JP, Larauche M, Flores M, Luong L, Norris J, Oh S, Liang LJ, Waschek J, Pisegna JR, Germano PM (2015) Regulation of appetite, body composition, and metabolic hormones by vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *J Mol Neurosci* 56:377–387. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0556-z>
- Wada Y, Nakamachi T, Endo K, Seki T, Ohtaki H, Tsuchikawa D, Hori M, Tsuchida M, Yoshikawa A, Matkovits A, Kagami N, Imai N, Fujisaka S, Usui I, Tobe K, Koide R, Takahashi H, Shioda S (2013) PACAP attenuates NMDA-induced retinal damage in association with modulation of the microglia/macrophage status into an acquired deactivation subtype. *J Mol Neurosci* 51:493–502. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0017-5>
- Wang ZY, Alm P, Håkanson R (1996) PACAP occurs in sensory nerve fibers and participates in ocular inflammation in the rabbit. *Ann NY Acad Sci* 805:779–783. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb17556.x>
- Watanabe J, Nakamachi T, Matsuno R, Hayashi D, Nakamura M, Kikuyama S, Nakajo S, Shioda S (2007) Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. *Peptides* 28:1713–1719. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.06.029>
- Webb IC, Coolen LM, Lehman MN (2013) NMDA and PACAP receptor signaling interact to mediate retinal-induced scn cellular rhythmicity in the absence of light. *PLoS One* 8:e76365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076365>
- 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, Zs B, Tamas A, Atlasz T (2016) Ocular delivery of PACAP1-27 protects the retina from ischemic damage in rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:6683–6691. <https://doi.org/10.1167/iov.16-20630>
- Werling D, Banks WA, Salameh TS, Kvarik T, Kovacs LA, Vaczy A, Szabo E, Mayer F, Varga R, Tamas A, Toth G, Zs B, 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. <https://doi.org/10.3390/ijms18030675>
- Wilson AM, Glickfeld LL (2014) Visual circuits get the VIP treatment. *Cell* 156:1123–1124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.043>
- Yoshitomi T, Yamaji K, Ishikawa H, Ohnishi Y (2002) Effect of pituitary adenylate cyclase-activating peptide on isolated rabbit iris sphincter and dilator muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:780–783
- Yu R, Guo X, Huang L, Zeng Z, Zhang H (2012a) The novel peptide PACAP-TAT with enhanced traversing ability attenuates the severe lung injury induced by repeated smoke inhalation. *Peptides* 38:142–149. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.005>
- Yu R, Zeng Z, Guo X, Zhang H, Liu X, Ding Y, Chen J (2012b) The TAT peptide endows PACAP with an enhanced ability to traverse bio-barriers. *Neurosci Lett* 527:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.08.005>
- Yu R, Yang Y, Cui Z, Zheng L, Zeng Z, Zhang H (2014) Novel peptide VIP-TAT with higher affinity for PAC1 inhibited scopolamine induced amnesia. *Peptides* 60:41–50. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.07.018>
- Zheng Y, Zeng H, She H, Liu H, Sun N (2010) Expression of peptide NAP in rat retinal Müller cells prevents hypoxia-induced retinal injuries and promotes retinal neurons growth. *Biomed Pharmacother* 64:417–423. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2010.01.016>



Article

# Retinoprotective Effects of PACAP Eye Drops in Microbead-Induced Glaucoma Model in Rats

Edina Szabo <sup>1</sup>, Evelin Patko <sup>1</sup>, Alexandra Vaczy <sup>1</sup>, Dorottya Molitor <sup>1</sup>, Adrienne Csutak <sup>2</sup> , Gabor Toth <sup>3</sup>, Dora Reglodi <sup>1,4</sup> and Tamas Atlasz <sup>1,4,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, MTA-PTE PACAP Research Team, University of Pecs Medical School, 7624 Pecs, Hungary; szaboedina90@gmail.com (E.S.); evelin.patko@gmail.com (E.P.); vaczyalexandra@gmail.com (A.V.); molitty@gmail.com (D.M.); dora.reglodi@aok.pte.hu (D.R.)

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology, Clinical Centre, University of Pecs Medical School, 7632 Pecs, Hungary; csutak.adrienne@pte.hu

<sup>3</sup> Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Szeged, 6720 Szeged, Hungary; toth.gabor@med.u-szeged.hu

<sup>4</sup> Szentagothai Research Center, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary

<sup>5</sup> Department of Sportbiology, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary

\* Correspondence: attam@gamma.ttk.pte.hu; Tel.: +36-72-536-600 (ext. 24361)

**Abstract:** Glaucoma is associated with increased intraocular pressure (IOP), causing the apoptosis of retinal ganglion cells (RGCs) and the loss of their axons leading to blindness. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is neuroprotective in several neural injuries, including retinopathies. The aim of this study was to investigate the effects of PACAP1-38 eye drops in a model of glaucoma. IOP was elevated bilaterally by injections of microbeads to block the aqueous humor outflow. The control groups received the same volume of saline. Animals were treated with PACAP1-38 (1 µg/drop, 3 × 1 drop/day) or vehicle for 4 weeks starting one day after the injections. Retinal morphology by histology and optical coherence tomography, function by electroretinography, and IOP changes were analyzed. Animals were sacrificed 8 weeks after the injections. Microbeads injections induced a significant increase in the IOP, while PACAP1-38 treatment lowered it to normal levels (~10 mmHg). Significant retinal degeneration and functional impairment were observed in the microbead-injected group without PACAP1-38 treatment. In the microbeads + PACAP1-38 group, the retinal morphology and functionality were close to the normal values. In summary, our results show that PACAP1-38, given in form of eye drops, is neuroprotective in glaucoma, providing the basis for potential future therapeutic administration.

**Keywords:** glaucoma; PACAP; eye drops; protection; intraocular pressure



**Citation:** Szabo, E.; Patko, E.; Vaczy, A.; Molitor, D.; Csutak, A.; Toth, G.; Reglodi, D.; Atlasz, T. Retinoprotective Effects of PACAP Eye Drops in Microbead-Induced Glaucoma Model in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8825. <https://doi.org/10.3390/ijms22168825>

Academic Editor: Stephanie C. Joachim

Received: 15 July 2021

Accepted: 13 August 2021

Published: 17 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Glaucoma refers to a group of optic neuropathies. The most common form of it is open-angle glaucoma, which is a progressive condition that develops by the blockage of the aqueous humor (AH) drainage system leading to intraocular hypertension. The increased intraocular pressure will cause the loss of the RGCs and their axons [1]. Today, treatments are limited to moderate the intraocular pressure (IOP) elevation; however, retinal degeneration continues to progress at a slower rate. There is an emerging need for therapeutic agents that can prevent apoptosis and exert a neuroprotective effect [2]. Although the exact underlying mechanism of RGC apoptosis in glaucoma has not been fully clarified [3], evidence shows that oxidative stress, glial activation, and inflammatory reactions play a role in the pathomechanism [4–7].

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is an endogenous neuropeptide first isolated as a hypothalamic peptide in two biologically active forms (PACAP1-27 and PACAP1-38). It is the most conserved member of the secretin/glucagon/VIP family and it exerts diverse biological actions [8–10]. PACAP acts on G-protein coupled receptors,

namely PAC1, VPAC1, and VPAC2 receptors [10,11]. Since its discovery, it has become evident that PACAP has strong neuroprotective effects in several *in vivo* and *in vitro* models such as Parkinson's disease, cerebral ischemia, traumatic brain injury, and Huntington's disease [12–15]. PACAP1-38 is now considered an effective neuroprotective and cytoprotective peptide with potential therapeutic effects. In the retina, PACAP has been shown to ameliorate lesions in several models of retinopathy. Our research team found that PACAP protects the ischemia-induced changes and promotes anti-apoptotic pathways [16,17]. Among others, PACAP has been shown to counteract the damaging effects of the excitotoxins glutamate and kainate, hyperoxia/hypoxia, oxidative stress, UV-light, hyperglycemia, optic nerve transection, and endotoxins [8,18–20].

Altogether, these findings give strong evidence that PACAP has potential therapeutic importance in severe retinopathy [21,22]. Previously, we have proven that PACAP, given in form of eye drops on the surface of the cornea, is able to pass through the ocular barriers to reach the retina with an appropriate vehicle and exert retinoprotective effects [23]. The topical administration would provide a non-invasive method for the treatment of ophthalmological diseases [24].

Therefore, the main purpose of the present study was to investigate the effects of PACAP1-38 eye drops in a rat model of hypertensive, primary open-angle glaucoma, using morphological, immunological, and functional techniques.

## 2. Results

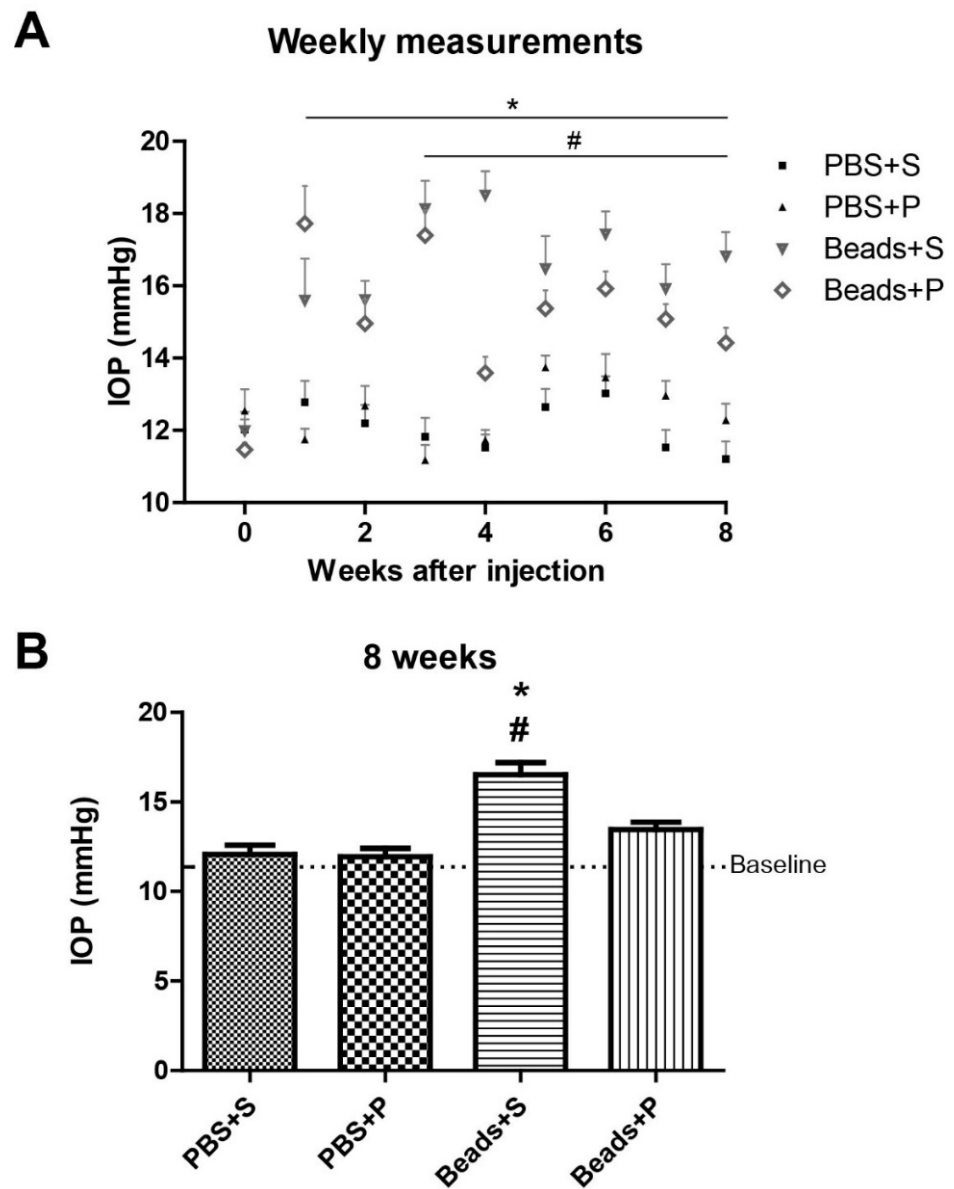
### 2.1. Effect of PACAP Eye Drops on IOP

In control situations (phosphate-buffered saline (PBS) + Systane (S) and PBS + PACAP1-38 (P)), we did not detect any changes in the IOP (Figure 1A). In the Beads + S group, IOP increase developed during the observation period (Figure 1A), while topical PACAP1-38 administration attenuated the elevation of the IOP in the microbead-injected retinas. We already found more than 50% elevation of IOP in both groups receiving beads one week after the microbeads injection. On week 3, a significant difference ( $p < 0.05$ ) started to develop between the two microbead-injected groups (Beads + S 55% IOP elevation; Beads + P 35% compared to PBS + S group). This tendency was observed during the 8 weeks, the percentages are the following: on week 4 Beads + S 53%, Beads + P 20%; on week 5 Beads + S 45%, Beads + P 19%; on week 6 Beads + S 33%, Beads + P 19%; on week 7 Beads + S 56%, Beads + P 36%; and on week 8 Beads + S 38%, Beads + P 12%. The differences were statistically significant starting from week 3, throughout the observation period. Detailed values of this statistically significant difference on week 8 is shown in Figure 1B. In the PBS-injected control groups (PBS + S and PBS + P), IOP levels remained close to the baseline on week 8 (PBS + S =  $12.08 \pm 0.5$  mmHg; PBS + P =  $11.95 \pm 0.45$  mmHg). In the microbead-injected vehicle-treated eyes (Beads + S), IOP showed a significant elevation ( $16.52 \pm 0.68$  mmHg) in contrast to the PACAP1-38-treated eyes ( $13.46 \pm 0.42$  mmHg; Beads + P).

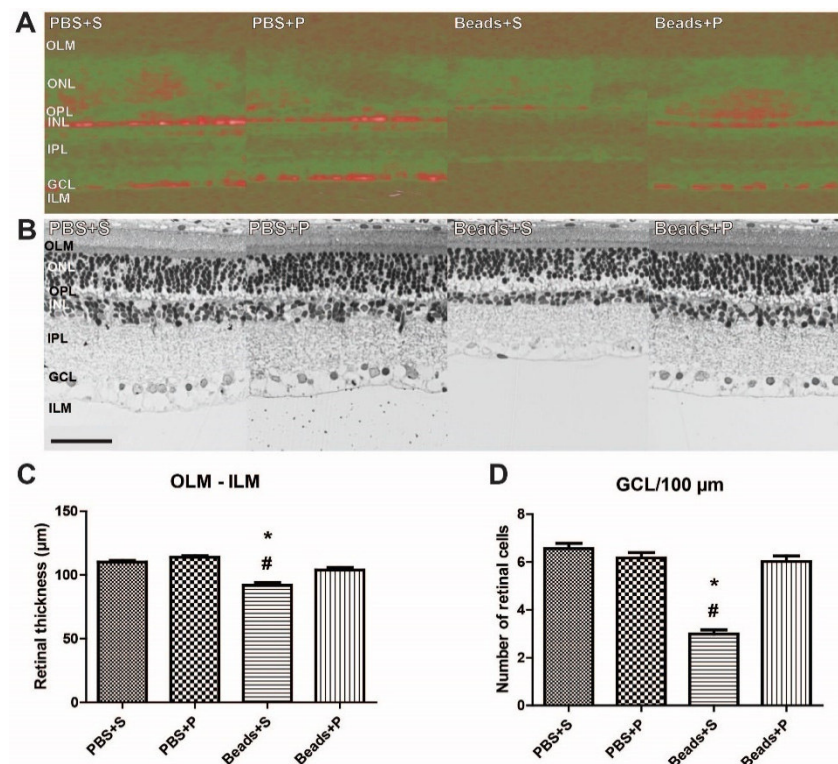
### 2.2. Effects of PACAP1-38 Eye Drops Treatment on Histological Changes of the Retina

PACAP1-38 administration in PBS-injected animals did not result in any alterations in the retinal layers (Figure 2A–C). *In vivo* 3D OCT retinal images supported our histological findings (Figure 2A). Retinal layers in microbead-injected animals (Beads + S) showed signs of severe degeneration compared to the PBS controls (Figure 2A–D). A significant reduction was detected in the OLM–ILM thickness ( $91.81 \pm 2.12$   $\mu$ m) in this group (Figure 2A–C). The number of cells in the GCL/100  $\mu$ m was also significantly decreased ( $2.99 \pm 0.18$ ; Figure 2D). Topical administration of PACAP1-38 (Beads + P) led to significant protection in the retina. The microbead-injected PACAP1-38-treated retinas had a more preserved structure compared to the vehicle-treated retinas (Figure 2A,B) and resulted in a significantly better preserved whole retinal distance between the OLM–ILM ( $103.84 \pm 2.02$   $\mu$ m). Quantitative morphometric analysis demonstrated that the loss in the number of cells in the GCL was also preserved ( $6.02 \pm 0.23$ ) in the PACAP1-38-treated groups (Figure 2D).





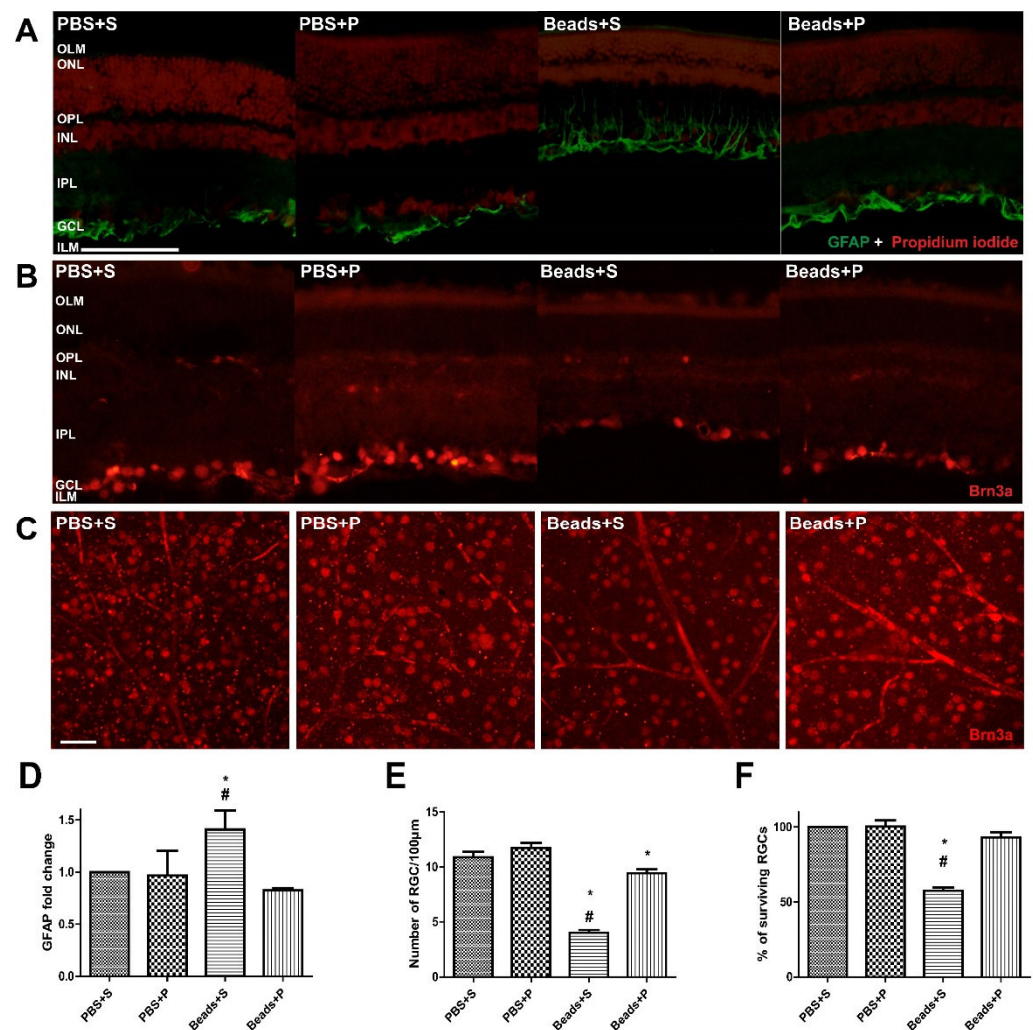
**Figure 1.** (A). IOP dynamics in the four examined groups (PBS + S, PBS + P, Beads + S, Beads + P) during the 8-week period. Intraocularly injected microbeads caused significant elevation of the IOP. (B). Bar chart shows the IOP in mmHg 8 weeks after the injection. Significant elevation of IOP was found in the Beads + S group compared to the control ones. PACAP1-38 eye drops resulted in the reduction of the IOP in the Beads + P group compared to the vehicle-injected group (Beads + S). Values are expressed in mean + SEM, analyzed by ANOVA and Bonferroni’s post hoc test. \* Beads + S vs. PBS + S  $p < 0.05$ ; # Beads + S vs. Beads + P  $p < 0.05$ . (Abbreviations: IOP: intraocular pressure; PBS: phosphate-buffered saline; S: Systane; P: PACAP1-38).



**Figure 2.** (A) Optical coherence tomography (OCT) shows the retinal layers in the four examined groups (PBS + S, PBS + P, Beads + S, Beads + P). In the OCT, retinal structure showed severe degeneration in the Beads + S group compared to the controls. A significant amelioration of the retinal structure was found after PACAP1-38 administration (Beads + P). (B) Representative light microphotographs of retinal sections in all groups. Retinal tissue from Beads + S group showed severe degeneration compared to PBS-injected retinas. The retained retinal structure following PACAP1-38 treatment (Beads + P) was similar to the control (PBS + P) retina. (C,D) Morphometric analysis of microbead-induced retinal damage. The degree of microbead-induced retinal neuronal degeneration and the neuroprotective effects of PACAP1-38 eye drops treatment were quantified by the cross-section of the retina from the outer limiting membrane to the inner limiting membrane (OLM–ILM), and the number of cells/100 μm ganglion cell layer (GCL) length. Values are expressed in mean ± SEM, analyzed by ANOVA and Fisher’s post hoc test. \* Beads + S vs. PBS + S  $p < 0.05$ ; # Beads + S vs. Beads + P  $p < 0.05$ . Bar: 50 μm. (Abbreviations: PBS: phosphate-buffered saline; S: Systane; P: PACAP1-38).

### 2.3. Effects of PACAP1-38 Treatment on Immunohistochemical Changes

PBS-treated retinas did not show any remarkable immunofluorescent changes in either the vehicle-treated (PBS + S) or the PACAP1-38 eye drops (PBS + P) groups (Figure 3A–E). Significant glial fibrillary acidic protein (GFAP) upregulation was detected following microbeads injection in the retinas in the Beads + S group (Figure 3A,D). Expression was more intense in the inner retinal layers compared to the PACAP1-38-treated (Beads + P) retinas (Figure 3A,D). IOP resulted in massive loss of the Brn3a immunopositivity in RGCs (Beads + S) compared to the control eyes (PBS + S; Figure 3B,E). Glaucomatous retinas receiving PACAP1-38 eye drops (Beads + P) showed significantly smaller reduction in RGC cells (Figure 3A,D). To further confirm this quantitative observation, surviving RGCs were also counted in whole-mount retinas (Figure 3C,F). No significant differences were detected in PBS-injected groups (PBS + S and PBS + P). A reduced number of RGCs were observed in glaucomatous eyes (Beads + S) compared to the retinas in the PACAP1-38-treated group (Beads + P). We found that the decrease in Brn3a expression was counteracted by topical PACAP1-38 treatment.

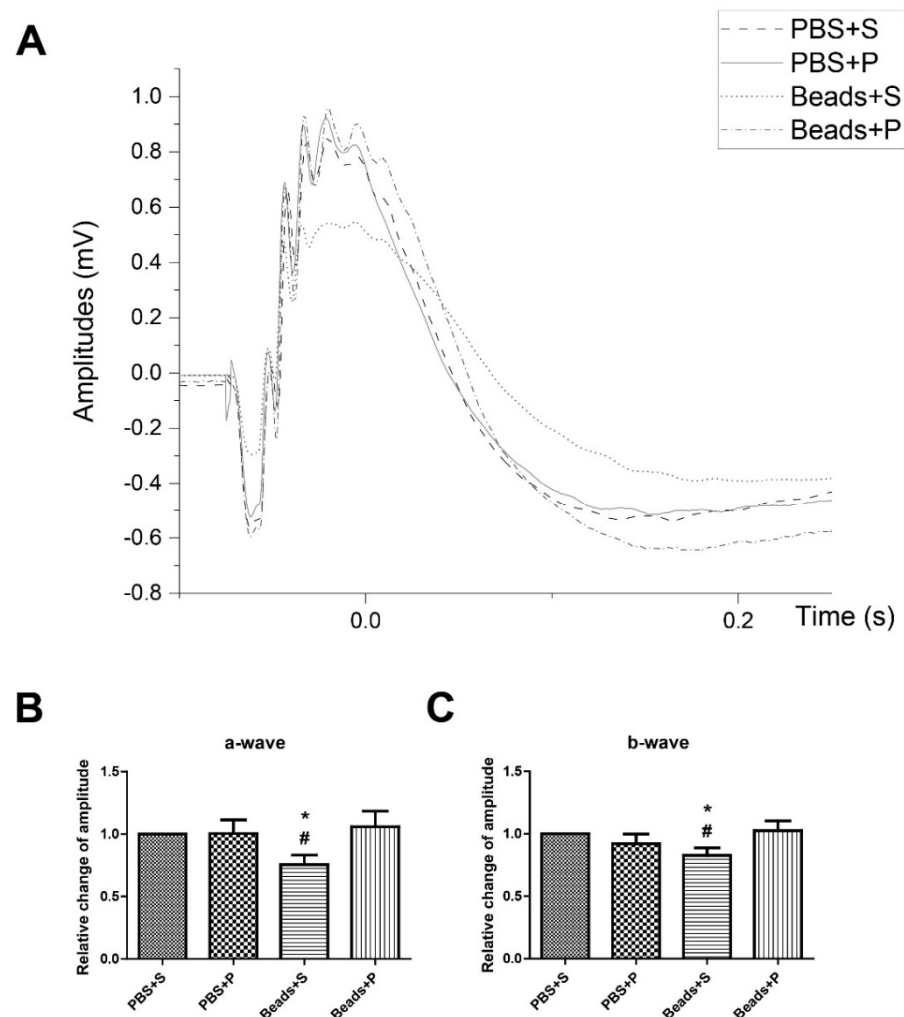


**Figure 3.** Representative vertical retinal sections (A,B) and whole-mount (retinal areas within 2 mm from the optic nerve) (C) stained by GFAP (A) and Brn3a (B,C) antibodies showing the effects of elevated IOP in the four examined groups (PBS + S, PBS + P, Beads + S, Beads + P). IOP resulted in massive elevation of GFAP immunopositivity (D), and reduction of Brn3a expression (E,F) in Beads + S group compared to the controls (PBS + S, PBS + P) and the PACAP1-38-treated (Beads + P) retinas. Statistical comparisons were made using ANOVA followed by Fischer's (GFAP, Brn3a whole-mount) and Bonferroni's (Brn3a section) post hoc analysis. Data are presented as means  $\pm$  SEM. \* Beads + S vs. PBS + S and Beads + P vs. PBS + P  $p < 0.05$ ; # Beads + S vs. Beads + P  $p < 0.05$ . Bar: A, B: 50  $\mu$ m; C: 100  $\mu$ m. (Abbreviations: IOP: intraocular pressure; PBS: phosphate-buffered saline; S: Systane; P: PACAP1-38; GFAP: glial fibrillary acidic protein; Brn3a: brain-specific homeobox/POU domain protein 3A).

#### 2.4. Protective Effect of PACAP1-38 Eye Drops on Visual Responses after Ocular Hypertension

Representative ERG was recorded after 12 h dark adaptation (Figure 4). In control situations ERG waves were similar in the PBS + S and PBS + P retinas. In the glaucomatous vehicle-treated group (Beads + S), the light responses significantly decreased (Figure 4A). However, in the glaucomatous PACAP1-38-treated eyes (Beads + P), the waveforms were almost the same as in the PBS-injected groups. The scotopic a- and b-waves in the PBS-injected eyes were similar in the PBS + S (a-wave =  $482.63 \pm 31.81 \mu$ V; b-wave =  $1331.60 \pm 55.24 \mu$ V) and in the PBS + P (a-wave =  $473.99 \pm 50.03 \mu$ V; b-wave =  $1195.77 \pm 74.35 \mu$ V) ones (Figure 4B,C). We observed significant reduction of the a- and b-wave amplitudes in the Beads + S (a-wave =  $347.89 \pm 32.76 \mu$ V; b-wave =  $1065.91 \pm 67.6 \mu$ V) group compared to the PBS + S-treated animals. ERGs showed significant functional

protection after PACAP1-38 administration (Beads + P) in the microbead-injected eye (Figure 4B,C).



**Figure 4.** (A) Representative average ERG recordings of PBS + S, PBS + P, Beads + S, Beads + P groups. (B,C). Comparative analysis of the amplitude ratio of a-wave (B) and b-wave (C). ERG responses were similar in PBS + S and PBS + P rats under healthy conditions. Microbead-induced alterations (Beads + S) in the amplitudes of a- and b-waves compared to the control animals (PBS + S). ERG showed significant functional protection after PACAP1-38 eye drops treatment (Beads + P) in the microbead-injected eye compared to the Beads + S group. Data are given as mean  $\pm$  SEM, analyzed by ANOVA and Fisher's post hoc test. \* Beads + S vs. PBS + S  $p < 0.05$ ; # Beads + S vs. Beads + P  $p < 0.05$ . (Abbreviations: ERG: electroretinography; PBS: phosphate-buffered saline; S: Systane; P: PACAP1-38).

### 3. Discussion

Glaucoma is a complex disease that is far from being completely understood. Animal models of glaucoma were developed more than twenty years ago, however, Urcola et al. was the first to apply injection of microbeads into the anterior chamber of rodent eyes to increase IOP [25]. Our model is based on Sappington's earlier study using polystyrene microbeads to elevate the pressure [26]. In our present study, we could stably reproduce the retinal ganglion cell death induced by high IOP. Using this model, we proved that the neuropeptide PACAP was able to prevent the marked increase in the intraocular pressure and the significant ganglion cell loss.

PACAP has well-documented neuro- and general cytoprotective effects, including protective actions in several retinopathies. Among others, PACAP has been shown to reduce injuries in models of retinopathy of prematurity, diabetic retinopathy, and retinopathies induced by inflammation, ischemia, neurotoxicity, and UV light [8,17,19,21–23,27–29]. A difficulty of systemic treatment of retinopathies with PACAP is that the peptide has a short half-life in the serum due to the rapid degradation by the dipeptidyl-peptidase IV enzyme and that it is not known how it passes the blood–retina barrier. Most studies demonstrating the retinoprotective effects of PACAP, therefore, applied intravitreal treatment. However, intravitreal treatments have the disadvantage of being invasive, leading to secondary injuries. We have previously shown that PACAP, given in form of eye drops, is able to pass the ocular barriers and reaches the retina in sufficient concentration to induce protective effects in a model of ischemic retinopathy [23]. The principal finding of our present study is that PACAP1-38, delivered as eye drops, has a protective role in microbead-induced glaucoma.

Similar to human glaucoma, the elevation of IOP in this rat model can lead to the loss of retinal ganglion cells. Normal IOP values were recorded around 10–12 mmHg, similar to those described by studies using Sprague–Dawley rats. In the glaucomatous eyes, beads with a diameter of 10  $\mu\text{m}$  induced the blockage of the trabecular meshwork leading to IOP elevation. In our present study, we were able to reproduce this elevation in IOP after the injections and showed that treatment with PACAP1-38 eye drops could prevent this increase [30]. This was an unexpected positive finding of the present study. Although the exact mechanism is not known yet, the IOP-lowering effect of PACAP can be an additional protective factor in glaucoma. AH production and flow is a very tightly regulated process influenced by numerous factors and structures. It is not known yet how PACAP affects AH production and/or flow, but other cAMP-inducing substances have been described to have IOP-lowering effects. One of the possible mechanisms can occur through the cAMP level, as cAMP plays a critical role in the regulation of the AH production and outflow [31]. Moreover, PACAP can reduce the small GTPase RhoA which has a role in the regulation of trabecular meshwork [32,33].

Our histological findings are also in accordance with those of others [30,34,35]. Microbeads injections induced histological changes between the two limiting layers (OLM–ILM), similar to other retinal injuries, such as LPS-induced retinal inflammation [19]. The degree of cell loss in our Beads + S group was similar to that reported in other studies using photocoagulation-induced glaucoma [36,37]. PACAP1-38 eye drops preserved the normal retinal structure and prevented the ganglion cell loss investigated by routine histology and the specific Brn3a immunohistochemical labeling. Müller glial cells are known to be over-activated in various injuries. Müller cells are known to have PAC1 receptor and PACAP can exert several effects on them [14]. Among others, PACAP has been shown to influence inflammatory cytokine (IL-6) expression in Müller cells [38–40]. The activation of Müller cells could be confirmed in our present study, demonstrating more intense GFAP labeling in hypertensive conditions, while in the PACAP-treated group, GFAP positivity was limited only to the end feet of the glial cells, in concordance with previous findings [19,23]. Seki et al., using another model for increased IOP with saline injection, have already demonstrated the protective effects of intravitreal injections of PACAP in the retina, focusing on the ganglion cell death. They suggested that PACAP1-38 can induce different signaling pathways depending on the concentration. Our findings support their results that PACAP1-38 has neuroprotective effects in hypertension-induced glaucoma. Our present results further confirm these earlier findings in a model more closely resembling the pathophysiological mechanisms of human glaucoma. In addition, we could show protective effects not only in the ganglion cell layer but also in other layers and in Müller cells, and could also confirm that the morphological improvement is associated with functional amelioration. Above all, we could provide evidence for the protective effects of PACAP in this model using a non-invasive eye drops application of PACAP1-38 [36].

To investigate whether the morphological amelioration by PACAP treatment is also reflected in functional improvement, we performed ERG measurements [41]. Scotopic ERG

waveforms represent specific cell type activities. The activation of rods and cones results in the a-wave, while the activation of ON bipolar neurons, amacrine, and Müller glial cells forms the b-wave [42]. Here, we confirmed that PACAP treatment could also prevent the deterioration in visual function detected in the Beads + S group. This observation is in accordance with previous findings in ischemic retinopathy [41]. Although the two pathomechanisms differ, they also share some common features, as vascular dysregulation has also been described in glaucoma. We observed several functional alterations in the Beads + S group proving that low-to-moderate elevation of IOP is necessary to induce experimental glaucoma in rodents. In contrast, no such changes were observed in the PACAP-treated group.

Irreversible visual loss is a severe clinical issue commonly caused by glaucoma. Currently, there is no known effective neuroprotective therapy. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) injection into the vitreous body has proven to maintain the number of ganglion cells [43]. PACAP1-38 eye drops therapy has a similar potent preventive effect against retinal ganglion cell death in our glaucoma model. There is a need to develop an effective neuroprotection method which is able to interact with cellular signaling and promotes RGCs survival. The locally produced BDNF might be important in the RGC activation through the TrkB receptor [44]. The two factors are also linked to each other, as PACAP1-38 can induce the expression of BDNF via its specific PAC1 receptor and PACAP's protective effects are partially mediated by BDNF in neuronal cells [45–47].

The microbead occlusion model of glaucoma represents an attractive model for determining the impact of PACAP on glaucoma. Our present findings further suggest that PACAP1-38 eye drops could be used in future therapeutic approaches. Taken together, PACAP1-38 eye drops treatment can provide a future accessory strategy designed parallel to the regular glaucoma treatments.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Animals

Adult male Sprague–Dawley (SD) rats (n = 50) weighing 300–500 g were used in this experiment. Animals were maintained under a 12 h light/dark cycle and fed and watered ad libitum. All the procedures were approved by the Animal Welfare Committee of the University of Pecs, and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation (ÁTET) at the Ministry of Agriculture, fully complied with the Decree No. 40/2013. (II. 14.) of the Hungarian Government and the EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes (ethical permission numbers: BA02/2000-16/2017, and ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Rats were divided randomly into four experimental groups: (i) PBS + vehicle (Systane (S)) n = 8; (ii) PBS + PACAP1-38 (P) n = 8; (iii) microbeads + vehicle (S) n = 17; and (iv) microbeads + PACAP1-38 n = 17, referred to as PBS + S; PBS + P; Beads + S; and Beads + P, respectively.

### 4.2. Administration of Microbeads

The injection of microbeads was performed as previously described by Sappington et al. [26] to induce high IOP in rats. Animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine (90 mg/kg; Calypsol, Richter Gedeon, Hungary) and xylazine (10 mg/kg; Sedaxylan, Dechra, Netherlands) injection. Before the microbeads injection, we applied the disinfectant Braunol solution (B. Braun Medical AG, Switzerland) to prevent infections. Fluorescent (580/603 nm) polystyrene microbeads (FluoSpheres™ Polystyrene Microspheres; 10 µm Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) ( $3.6 \times 10^6$  beads/mL; 10 µL/injection) were injected into the anterior chamber (AC) of both eyes by Hamilton syringe (33G needle). After administration of microbeads, anti-inflammatory eye drops (Tobrex, 3 mg/mL; Alcon, Budapest, Hungary) were used to prevent inflammation and promote corneal healing. In the control groups, eyes received an injection with the same volume (10 µL) of PBS. Two weeks after the injection, we repeated the same procedure.

#### 4.3. IOP Measurement

One day before the intervention, IOP was measured in both eyes with a rebound tonometer (Tonolab, Icare; Vantaa, Finland). To avoid IOP fluctuation [48,49] due to the circadian cycle, we measured IOP at the same time of the day throughout the 8 weeks (10–11 a.m., once a week). For each eye, the mean value of three consecutive measurements was used. After IOP measurement, lubricant ointment was also applied to the ocular surface.

#### 4.4. Eye Drops Treatment

After the microbeads injection, the eyes were treated with Systane solution (S) (Alcon, Budapest, Hungary) or PACAP1-38 (P) eye drops (1 µg/drop) (PACAP1-38 was synthesized at the Department of Medical Chemistry, University of Szeged, Szeged, Hungary), according to previous descriptions [50]. Systane solution was used as a vehicle. Rats were treated 3 times a day with 1 drop PACAP1-38 solution, for 4 consecutive weeks.

#### 4.5. Optical Coherence Tomography Examination

Noninvasive, *in vivo* imaging was performed with Optical Coherence Tomography (OCT) (Bioptigen, Morrisville, NC, USA). This technique gives the chance to obtain high-resolution images of the anterior chamber or the retina in real-time. OCT imaging was performed 1 day before the microbeads injections. Anesthesia was carried out by intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Animals with ocular inflammation were excluded from further experiments and were not included in the final number of the animals. The pupils were dilated using eye drops that contained 0.01% atropine. During the procedure, we applied artificial tear to protect the corneal surface (Systane solution (Alcon, Budapest, Hungary)). Images of the retina were collected before and 8 weeks after the injections.

#### 4.6. Morphological and Morphometric Analysis

Rats (n = 16) were killed 8 weeks after the microbeads injections. The eyes were removed and dissected in 0.1 M PBS and fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1 M phosphate buffer (PB). After fixation, eyecups were washed in 0.1 M PBS for one hour, then our samples were dehydrated in ascending row of alcohol. These samples were embedded in Durcupan ACM resin (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) and placed into thermostat at 56 °C for 72 h. From our histological blocks, semi-thin sections (2 µm) were made by microtome (Reichert Ultracut E, Wien, Austria) and were stained with routine histological staining (1% toluidine blue solution, Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary). Microphotographs were made from our sections and were analyzed with light microscopy (Nikon Eclipse 80i). Measurements were taken from the digital photographs with the Nikon Nis-Elements program. Four tissue blocks from animals were made and central retinal areas within 2 mm from the optic nerve were used for the measurements. The following parameters were analyzed: (i) retinal cross-section between the outer and inner limiting membranes (OLM–ILM), as well as the (ii) number of cells/100 µm section length in the ganglion cell layer (GCL).

#### 4.7. Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, retinas (n = 32) were dissected in 0.1 M PBS and fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 2 h at room temperature followed by washing 0.1 M PBS for one hour. Then, eyecups were immersed into a 10–20–30% sucrose solution and embedded in optimal cutting temperature compound mounting media (Tissue Freezing Medium, Mount Waverley, Australia). Next, 15–17 µm thin sections were cut (central retinal areas within 2 mm from the optic nerve) on gelatin-coated slides with cryostat (Leica CM1950, BioMarker, Budapest, Hungary) and they were processed for further immunohistochemical analysis.

After rehydration with 0.1 M PBS, sections were blocked in 5% normal donkey serum, 3% bovine serum in PBS, and 0.3% Triton™ X-100 (PBST) at room temperature for 2 h to minimize nonspecific labeling. Sections were incubated overnight at 4 °C with primary polyclonal antibodies: (i) mouse anti-Brn3a (brain-specific homeobox/POU domain protein 3A) (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary), and (ii) rabbit anti-GFAP (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) diluted in 1:200 in antibody diluting buffer. Immunoreactivity was detected with Alexa Fluor-594, donkey anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK) and Alexa Fluor-488, donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK) diluted 1:400 in PBST.

After the secondary antibody, sections were washed in 0.1 M PBS for one hour. Cell nuclei were stained with propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary). For control experiments, primary antibodies were omitted, resulting in no specific staining. After washes, slides were coverslipped with Fluoroshield (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary). Microphotographs were made by Nikon Eclipse 80i fluorescence microscope. Photographs were further processed with the Adobe Photoshop CS6 program (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA). Images were adjusted for contrast only; they were aligned, arranged, and labeled using the functions of the Photoshop CS6 program. Fold change of GFAP-positive area was measured by ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). We quantified the RGC number with the previously described method (morphometric analysis).

#### 4.8. Retinal Whole Mounts

Eyes (n = 36) were dissected in 0.1 M PBS and fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1 M PB for 2 h at room temperature followed by washing 0.1 M PBS for one hour. After washing, retinas were removed and four small cuts were made. Retinas were placed in a 24 well-plate and were blocked in 5% normal donkey serum, 3% bovine serum in 0.3% PBST for 1 h. Primary mouse anti-Brn3a (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) was diluted in PBST and incubated overnight at 4 °C. Immunoreactivity was visualized with Alexa Fluor-594 donkey anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK) diluted 1:400 in PBST. After, the secondary antibody samples were washed in 0.1 M PBS for one hour. Slides were mounted with Fluoroshield (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) mounting medium. Brn3a-positive RGCs were counted in 4 regions (one region per retinal quadrant from the same area as previously described) each of area 50,000  $\mu\text{m}^2$ . Counting was managed by ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Images were analyzed with Nikon Eclipse 80i epifluorescence microscope. Photographs were also further processed with the Adobe Photoshop CS6 program (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA). Images were adjusted for contrast only; they were aligned, arranged, and labeled using the functions of the Photoshop CS6 program.

#### 4.9. Electroretinography

Scotopic electroretinography (ERG) responses were recorded from both eyes 1 day before and 8 weeks after microbeads injection. Before the measurement, animals were dark-adapted overnight (>12 h) and all set-up preparations were performed under dim red light (632 nm). For the examination, animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg and xylazine (10 mg/kg) [51]. Pupils were dilated with one drop of 0.01% atropine before the ERG recording. Rats were placed on a heating pad and ERGs were recorded by active electrodes from the corneal surface and the reference electrodes were placed subcutaneously on the head. Ground electrode was also 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 pre-amplified, amplified (2.000 $\times$ , Bioamp SbA4-V6, Supertech, Hungary), and recorded with an A/D converter (Ratsoft-Solar Electronic). Responses (n = 50/eye) were averaged with Ratsoft software [41]. The following parameters were measured: amplitude of the a-wave (from baseline to the trough of the a-wave) and the amplitude of the b-wave (from the trough of the a-wave to the peak of the b-wave). The recording dataset was



averaged and then further processed to examine the waveform of the electroretinograms with Origin Pro 2018 (Macasoft, Hungary).

#### 4.10. Statistical Analysis

Statistical comparisons were made using the two-way ANOVA followed by Fischer's (histology; ERG; GFAP; Brn3a whole-mount) and Bonferroni's (IOP; Brn3a section) post hoc analysis. Data are presented as means  $\pm$  SEM. Differences with  $p < 0.05$  were considered significant.

### 5. Limitations

The limitation of this model in rats is that there is no clear relationship between the volume/size of injected microbead and the IOP elevation [52]. Shappington et al. (2010) evaluated the effect of different volumes on the IOP elevation. According to their results, after single injection of microbeads (5  $\mu$ L or above) IOP increased for 2 weeks. It extended until 8 weeks with repeated injections in rats [26]. Urcola et al. (2006) used the microbead injection with hydromethylcellulose to achieve a higher IOP level [25]. One of the inconveniences is to keep the microbeads in the anterior chamber. Compared to human eyes, in rodents, it is more difficult to reach a self-sealing corneal wound after bead injection due to the thin cornea.

**Author Contributions:** E.S., E.P., T.A. and D.R. conceived and designed the experiments; E.S., E.P., A.V., D.M., A.C., D.R. and T.A. performed the experiments; E.S., E.P. and T.A. analyzed the data; G.T. contributed reagents/materials/analysis tools; E.S., E.P., D.R. and T.A. wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Research, Development and Innovation Fund FK129190, K135457; National Brain Research Program NAP2017-1.2.1-NKP-2017-00002; MTA-TKI-14016; PTE AOK-TANDEM; GINOP-2.3.2-15-2016-00050 "PEPSYS"; EFOP-3.6.2-16-2017-00008; "The role of neuroinflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics"; and Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities in Hungary: 20765/3/2018/FEKUTSTRAT, 2020-4.1.1-TKP2020—FIKP III. Project No. TKP2020-IKA-08 has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the Animal Welfare Committee of the University of Pecs, and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation (ÁTET) at the Ministry of Agriculture, fully complied with the Decree No. 40/2013. (II. 14.) of the Hungarian Government and the EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes (ethical permission numbers: BA02/2000-16/2017, and ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

**Data Availability Statement:** The dataset generated during this study is available from the corresponding author upon reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Mantravadi, A.V.; Vadhar, N. Glaucoma. *Prim. Care Clin. Off. Pract.* **2015**, *42*, 437–449. [[CrossRef](#)]
2. Kaufman, P.L.; Rasmussen, C.A. Advances in glaucoma treatment and management: Outflow drugs. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2012**, *53*, 2495–2500. [[CrossRef](#)]
3. Huang, S.; Huang, P.; Yu, H.; Lin, Z.; Liu, X.; Shen, X.; Guo, L.; Zhong, Y. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is insufficiently involved in the neuroprotective effect by hydrogen sulfide supplement in experimental glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2019**, *60*, 4346–4359. [[CrossRef](#)]
4. Wei, X.; Cho, K.S.; Thee, E.F.; Jager, M.J.; Chen, D.F. Neuroinflammation and microglia in glaucoma—Time for a paradigm shift. *J. Neurosci. Res.* **2019**, *176*, 100–106.
5. Wang, M.; Zheng, Y. Oxidative stress and antioxidants in the trabecular meshwork. *PeerJ* **2019**, *7*, e8121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Steele, M.R.; Inman, D.M.; Calkins, D.J.; Horner, P.J.; Vetter, M.L. Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, *47*, 977–985. [[CrossRef](#)]

7. Rieck, J. The pathogenesis of glaucoma in the interplay with the immune system. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 2393–2409. [[CrossRef](#)]
8. Atlasz, T.; Vaczy, A.; Werling, D.; Kiss, P.; Tamas, A.; Kovacs, K.; Fabian, E.; Kvarik, T.; Mammel, B.; Danyadi, B.; et al. Protective effects of PACAP in the retina. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP*; Reglodi, D., Tamas, A., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; pp. 501–527.
9. Miyata, A.; Arimura, A.; Dahl, R.R.; Minamino, N.; Uehara, A.; Jiang, L.; Culler, M.D.; Coy, D.H. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *164*, 567–574. [[CrossRef](#)]
10. Vaudry, D.; Falluel-Morel, A.; Bourgault, S.; Basille, M.; Burel, D.; Wurtz, O.; Fournier, A.; Chow, B.K.C.; Hashimoto, H.; Galas, L.; et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 Years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* **2009**, *61*, 283–357. [[CrossRef](#)]
11. Amin, F.M.; Schytz, H.W. Transport of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide across the blood-brain barrier: Implications for migraine. *J. Headache Pain* **2018**, *19*, 4–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Reglodi, D.; Kiss, P.; Lubics, A.; Tamas, A. Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 962–972. [[CrossRef](#)]
13. Toth, D.; Tamas, A.; Reglodi, D. The neuroprotective and biomarker potential of PACAP in human traumatic brain injury. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nakamachi, T.; Matkovits, A.; Seki, T.; Shioda, S. Distribution and protective function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the retina. *Front. Endocrinol.* **2012**, *3*, 1–10. [[CrossRef](#)]
15. Shioda, S.; Takenoya, F.; Wada, N.; Hirabayashi, T.; Seki, T.; Nakamachi, T. Pleiotropic and retinoprotective functions of PACAP. *Anat. Sci. Int.* **2016**, *91*, 313–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Werling, D.; Reglodi, D.; Banks, W.A.; Salameh, T.S.; Kovacs, K.; Kvarik, T.; Vaczy, A.; Kovacs, L.; Mayer, F.; Danyadi, B.; et al. Ocular delivery of PACAP1-27 protects the retina from ischemic damage in rodents. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2016**, *57*, 6683–6691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Vaczy, A.; Reglodi, D.; Somoskeoy, T.; Kovacs, K.; Lokos, E.; Szabo, E.; Tamas, A.; Atlasz, T. The protective role of PAC1-receptor agonist maxadilan in BCCAO-induced retinal degeneration. *J. Mol. Neurosci.* **2016**, *60*, 186–194. [[CrossRef](#)]
18. Maugeri, G.; D’Amico, A.G.; Bucolo, C.; D’Agata, V. Protective effect of PACAP-38 on retinal pigmented epithelium in an in vitro and in vivo model of diabetic retinopathy through EGFR-dependent mechanism. *Peptides* **2019**, *119*, 170108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Vaczy, A.; Kovari, P.; Kovacs, K.; Farkas, K.; Szabo, E.; Kvarik, T.; Kocsis, B.; Fulop, B.; Atlasz, T.; Reglodi, D. Protective role of endogenous PACAP in inflammation-induced retinal degeneration. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *24*, 3534–3542. [[CrossRef](#)]
20. Maugeri, G.; D’Amico, A.G.; Amenta, A.; Saccone, S.; Federico, C.; Reibaldi, M.; Russo, A.; Bonfiglio, V.; Avitabile, T.; Longo, A.; et al. Protective effect of PACAP against ultraviolet B radiation-induced human corneal endothelial cell injury. *Neuropeptides* **2020**, *79*, 101978. [[CrossRef](#)]
21. Kvarik, T.; Mammel, B.; Reglodi, D.; Kovacs, K.; Werling, D.; Bede, B.; Vaczy, A.; Fabian, E.; Toth, G.; Kiss, P.; et al. PACAP is protective in a rat model of retinopathy of prematurity. *J. Mol. Neurosci.* **2016**, *60*, 179–185. [[CrossRef](#)]
22. Szabadfi, K.; Atlasz, T.; Kiss, P.; Reglodi, D.; Szabo, A.; Kovacs, K.; Szalontai, B.; Setalo, G.; Banki, E.; Csanaky, K.; et al. Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell Tissue Res.* **2012**, *348*, 37–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Werling, D.; Banks, W.; Salameh, T.; Kvarik, T.; Kovacs, L.; Vaczy, A.; Szabo, E.; Mayer, F.; Varga, R.; Tamas, A.; et al. Passage through the ocular barriers and beneficial effects in retinal ischemia of topical application of PACAP1-38 in rodents. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 675. [[CrossRef](#)]
24. Reglodi, D.; Atlasz, T.; Jungling, A.; Szabo, E.; Kovari, P.; Manavalan, S.; Tamas, A. Alternative routes of administration of the neuroprotective Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *24*, 3892–3904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Urcola, J.H.; Hernández, M.; Vecino, E. Three experimental glaucoma models in rats: Comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp. Eye Res.* **2006**, *83*, 429–437. [[CrossRef](#)]
26. Sappington, R.M.; Carlson, B.J.; Crish, S.D.; Calkins, D.J. The microbead occlusion model: A paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51*, 207–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Atlasz, T.; Szabadfi, K.; Kiss, P.; Marton, Z.; Griecs, M.; Hamza, L.; Gaal, V.; Biro, Z.; Tamas, A.; Hild, G.; et al. Effects of PACAP in UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats. *J. Mol. Neurosci.* **2011**, *43*, 51–57. [[CrossRef](#)]
28. Kvarik, T.; Reglodi, D.; Werling, D.; Vaczy, A.; Kovari, P.; Szabo, E.; Kovacs, K.; Hashimoto, H.; Ertl, T.; Gyarmati, J.; et al. The protective effects of endogenous PACAP in oxygen-induced retinopathy. *J. Mol. Neurosci.* **2021**. [[CrossRef](#)]
29. D’Amico, A.G.; Maugeri, G.; Musumeci, G.; Reglodi, D.; D’Agata, V. PACAP and NAP: Effect of two functionally related peptides in diabetic retinopathy. *J. Mol. Neurosci.* **2021**, *71*, 1525–1535. [[CrossRef](#)]
30. Matsumoto, Y.; Kanamori, A.; Nakamura, M.; Negi, A. Rat chronic glaucoma model induced by intracameral injection of microbeads suspended in sodium sulfate-sodium hyaluronate. *Jpn. J. Ophthalmol.* **2014**, *58*, 290–297. [[CrossRef](#)]
31. Shim, M.S.; Kim, K.Y.; Ju, W.K. Role of cyclic AMP in the eye with glaucoma. *BMB Rep.* **2017**, *50*, 60–70. [[CrossRef](#)]
32. Meyer, D.K. The effects of PACAP on neural cell proliferation. *Regul. Pept.* **2006**, *137*, 50–57. [[CrossRef](#)]
33. Rao, P.V.; Pattabiraman, P.P.; Kopczynski, C. Role of the Rho GTPase/Rho kinase signaling pathway in pathogenesis and treatment of glaucoma: Bench to bedside research. *Exp. Eye Res.* **2017**, *158*, 23–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Huang, W.; Hu, F.; Wang, M.; Gao, F.; Xu, P.; Xing, C.; Sun, X.; Zhang, S.; Wu, J. Comparative analysis of retinal ganglion cell damage in three glaucomatous rat models. *Exp. Eye Res.* **2018**, *172*, 112–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhao, W.; Dai, L.; Xi, X.T.; Chen, Q.B.; An, M.X.; Li, Y. Sensitized heat shock protein 27 induces retinal ganglion cells apoptosis in rat glaucoma model. *Int. J. Ophthalmol.* **2020**, *13*, 525–534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Seki, T.; Itoh, H.; Nakamachi, T.; Endo, K.; Wada, Y.; Nakamura, K.; Shioda, S. Suppression of rat retinal ganglion cell death by PACAP following transient ischemia induced by high intraocular pressure. *J. Mol. Neurosci.* **2011**, *43*, 30–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Soto, I.; Pease, M.E.; Son, J.L.; Shi, X.; Quigley, H.A.; Marsh-Armstrong, N. Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Nakatani, M.; Seki, T.; Shinohara, Y.; Taki, C.; Nishimura, S.; Takaki, A.; Shioda, S. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) stimulates production of interleukin-6 in rat Müller cells. *Peptides* **2006**, *27*, 1871–1876. [[CrossRef](#)]
39. Smedowski, A.; Pietrucha-Dutczak, M.; Kaarniranta, K.; Lewin-Kowalik, J. A rat experimental model of glaucoma incorporating rapid-onset elevation of intraocular pressure. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–11. [[CrossRef](#)]
40. Akopian, A.; Kumar, S.; Ramakrishnan, H.; Viswanathan, S.; Bloomfield, S.A. Amacrine cells coupled to ganglion cells via gap junctions are highly vulnerable in glaucomatous mouse retinas. *J. Comp. Neurol.* **2019**, *527*, 159–173. [[CrossRef](#)]
41. Danyadi, B.; Szabadfi, K.; Reglodi, D.; Mihalik, A.; Danyadi, T.; Kovacs, Z.; Batai, I.; Tamas, A.; Kiss, P.; Toth, G.; et al. PACAP application improves functional outcome of chronic retinal ischemic injury in rats-evidence from electroretinographic measurements. *J. Mol. Neurosci.* **2014**, *54*, 293–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Gurevich, L.; Slaughter, M.M. Comparison of the waveforms of the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res.* **1993**, *33*, 2431–2435. [[CrossRef](#)]
43. Kido, N.; Tanihara, H.; Honjo, M.; Inatani, M.; Tatsuno, T.; Nakayama, C.; Honda, Y. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in eyes with NMDA-induced neuronal death. *Brain Res.* **2000**, *884*, 59–67. [[CrossRef](#)]
44. Wójcik-Gryciuk, A.; Gajewska-Woźniak, O.; Kordecka, K.; Boguszewski, P.M.; Waleszczyk, W.; Skup, M. Neuroprotection of retinal ganglion cells with AAV2-BDNF pretreatment restoring normal TrkB receptor protein levels in glaucoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zink, M.; Otto, C.; Zörner, B.; Zacher, C.; Schütz, G.; Henn, F.A.; Gass, P. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor in mice deficient for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type-I-receptor. *Neurosci. Lett.* **2004**, *360*, 106–108. [[CrossRef](#)]
46. Brown, D.; Tamas, A.; Reglodi, D.; Tizabi, Y. PACAP protects against salsolinol-induced toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: Implication for Parkinson's Disease. *J. Mol. Neurosci.* **2013**, *50*, 600–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Frechilla, D.; García-Osta, A.; Palacios, S.; Cenarruzabeitia, E.; Del Río, J. BDNF mediates the neuroprotective effect of PACAP-38 on rat cortical neurons. *NeuroReport* **2001**, *12*, 919–923. [[CrossRef](#)]
48. Liu, L.-F.; Huang, C.-K.; Zhang, M.-Z. Reliability of Tonolab measurements in rats. *Int. J. Ophthalmol.* **2014**, *7*, 930–934. [[PubMed](#)]
49. Pease, M.E.; Cone, F.E.; Gelman, S.; Son, J.L.; Quigley, H.A. Calibration of the TonoLab tonometer in mice with spontaneous or experimental glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 858–864. [[CrossRef](#)]
50. Jozsa, R.; Hollosy, T.; Tamas, A.; Toth, G.; Lengvari, I.; Reglodi, D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide plays a role in olfactory memory formation in chicken. *Peptides* **2005**, *26*, 2344–2350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Nair, G.; Kim, M.; Nagaoka, T.; Olson, D.E.; Thulé, P.M.; Pardue, M.T.; Duong, T.Q. Effects of common anesthetics on eye movement and electroretinogram. *Doc. Ophthalmol.* **2011**, *122*, 163–176. [[CrossRef](#)]
52. Morgan, J.E.; Tribble, J.R. Microbead models in glaucoma. *Exp. Eye Res.* **2015**, *141*, 9–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]