

Különböző neuropeptidek protektív szerepe retinális károsodások esetén

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

1 Bevezetés

1.1 A látószerv felépítése

A látószerv egy összetett érzékszerv, mely a szemgolyóból és járulékos struktúrákból áll. A szemgolyót három burok határolja. A külső vagy rostos réteg az ínhártyát és a szaruhártyát foglalja magában. A középső vagy vaszkuláris réteghez tartozik az érhártya, a sugártest és a szivárványhártya. A szem és a szemlencse rétegei a szem belüli három kamra határolására szolgálnak. A kamrák a következők: elülső-, hátsó csarnok és az üvegtest. Az elülső és a hátsó csarnokot egy áttetsző folyadék, a csarnokvíz tölti ki. Normál körülmények között a csarnokvíz a hátsó csarnokból az elülső kamrába áramlik. Ezt követően a trabekuláris hálózaton keresztül a Schlemm-csatorna irányába folyik el, majd a vénás rendszerbe kerül vissza. A szemgolyó legbelső rétege a retina, amely egy fényérzékeny réteg. A fényt a szem optikai rendszere fókuszálja a retinára, amely számos elektromos és kémiai reakciót vált ki. A gerincesek retináján belül tíz szövettani réteget különböztethetünk meg. A rétegek belülről kifelé haladva a következők:

Belső határmembrán (ILM) - a Müller sejtek belső végtalpai hozzák létre

Optikus rostok rétege (NFL) – a ganglionsejtek axonjaiból összeszedődő rostköteg, amely az ingerületet az agy felé továbbítja

Ganglionsejtek rétege (GCL) – a ganglionsejtek sejttestjeit tartalmazza

belső rostos réteg (IPL) – a bipoláris sejtek axonjai, az amakrin sejtek nyúlványai, valamint a ganglionsejtek dendritjei itt kapcsolódnak

Belső sejtes réteg (INL) – a horizontális-, a bipoláris-, az amakrin- és a Müller sejtek sejttestjeit tartalmazza

Külső rostos réteg (OPL) - a fotoreceptorok, bipoláris sejtek valamint a horizontális sejtek nyúlványai ebben a rétegben szinaptizálnak

Külső sejtes réteg (ONL) – a fotoreceptorok sejttestjeit tartalmazza

Külső határmembrán (OLM) - Müller sejtek külső nyúlványai által kialakított réteg

Fotoreceptorok rétege (PL) – a fotoreceptorok külső- és belső szegmensét tartalmazza

Pigmenthám (PE) – a retina legkülső rétege

1.2 Kétoldali arteria carotis communis okklúzió (BCCAO)

A retinában a kétoldali carotis communis permanens lekötésével (BCCAO) iszkémiás károsodás alakítható ki. Ez az egyik leggyakrabban alkalmazott hypoperfúziós modell, amely

morfológiai változásokat okoz a retinában. A retinális iszkémia a látáskárosodások egyik fő oka, valamint számos retinális rendellenességért is felelős.

1.3 Glaukóma

A glaukóma vagy zöldhályog egy heterogén betegségecsoport összefoglaló neve, egyike az opticus neuropathiáknak. Leggyakoribb formája a nyitott zugú glaukóma, amely egy progresszív állapot, mely a csarnokvíz elfolyásának zavarán keresztül megnövekedett belső szemnyomást eredményez. A megnövekedett szemnyomás a retina ganglionsejtjeinek és azok axonjainak elvesztését okozza. Jelenleg a kezelések a szemnyomás emelkedésének mérséklésére korlátozódnak, de a retina folyamatos degenerációját nem lehet megállítani. Ezek ismeretében felmerül az igény olyan terápiás szerek iránt, melyek képesek megakadályozni az apoptózist, valamint neuroprotektív hatást fejtenek ki.

Számos glaukómát reprezentáló állatmodellt ismerünk. Ezekben a modellekben a kutatóknak lehetőségük van a betegség patofiziológiájának vizsgálatára és az ígéretes kezelések hatékonyságának tesztelésére. Bár a rágcsálók szemének anatómiája és fiziológiája bizonyos szempontból különbözik a főemlősökétől, de jelenleg a legkönnyebben létrehozható glaukóma modellként szolgálnak. A patkányokban a sugártestben termelődő csarnokvíz az emberhez hasonlóan átáramlik a trabekuláris hálózaton és a Schlemm-csatorna irányába folyik el. Végül a folyadék az episzklerális vénákba kerül vissza. A fiziológiás szemnyomásszintet (körülbelül 10 Hgmm) a csarnokvíz be- és kiáramlásának dinamikus egyensúlya tartja fenn. Az általunk alkalmazott modell esetében a befecskendezett mikrogöngyök megrekednek a trabekuláris hálózat intracelluláris terében, ami a csarnokvíz elfolyásának zavarához, majd okuláris hipertóniához vezet.

1.4 A PACAP és a VIP

Az hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) egy endogén neuropeptid, amelyet először hipotalamikus peptidként izoláltak két biológiailag aktív formában (PACAP1-38 és PACAP1-27). A szekretin/glükagon/vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) család legkonzerváltabb tagja, melynek számos biológiai hatását ismerjük. A PACAP a G-fehérje kapcsolt receptorokon, nevezetesen a PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorokon hat. Felfedezése óta bizonyításra került, hogy a PACAP számos in vivo és in vitro modellben neuroprotektív hatással rendelkezik. A PACAP több szervrendszer esetében kimutatható és számos különböző funkciót lát el.

A VIP a szekretin/glükagon/VIP peptidcsalád másik tagja. Ez egy 28 aminosavból álló peptid, ami először 1970-ben írtak le. Ismert, hogy a VIP a perifériás és a központi idegrendszerben is széles körben elterjedt neurotranszmitter, neuromodulátor, neurotrofikus és neuroprotektív faktor. A VIP ugyanazon 3 receptoron keresztül hat, mint a PACAP. A VPAC1 és VPAC2 hasonló affinitással köti mind a VIP-et, mind a PACAP-ot, a PAC1 pedig nagyobb affinitással köti a PACAP-ot. A VIP szintén egy multifunkcionális peptid, amely különböző in vitro és in vivo degenerációs modellekben neuroprotektívnek hatású volt.

Mind a PACAP, mind a VIP számos szövet esetében védő hatásának bizonyult. A VIP erősebb gyulladáscsökkentő hatású, míg a PACAP inkább egy antiapoptotikus peptid. Mindkét peptid esetében kijelenthetjük, hogy a jövőbeli terápiás szerek egyik forrása lehet.

1.5 TAT

A transzkripció transzaktivátor (TAT) 11 aminosavból álló peptid, ami a humán immundeficiencia vírus 1 fehérjéből származik. A peptid ismert penetrációs képessége miatt került a kutatások központjába. A TAT egyfajta fehérjetranszdukciós domén, amely képes hatékonyan áthatolni a sejtmembránokon, akár önmagában, akár más molekulákkal összekapcsolva. A TAT nemcsak különböző típusú molekulákat (peptidek, nagy molekulájú fehérjék, DNS) tud átvinni különböző sejtekbe, hanem számos biológiai barrieren keresztül is képes átvinni a kapcsolódó molekulákat (pl. vér-agy gát, vér-levegő gát).

1.6 A retina vizsgáló módszerei: optikai koherencia tomográfia és elektroretinográfia

Az optikai koherencia tomográfia (OCT) az egyik leggyakrabban használt diagnosztikai technika a szemészetben, és gyorsan a retina diagnosztikájának standardjává vált. Ez egy nem-invazív, nagy felbontású optikai képalkotó technológia, amely a vizsgált tárgy jelének és egy helyi referencijelnek az interferenciáján alapul. Az OCT valós idejű, keresztmetszeti képet tud készíteni a vizsgált szövetről.

Az elektroretinográfia (ERG) olyan diagnosztikai vizsgálat, amely a retina fényingerre adott elektromos válaszát méri. Az ERG a fotoreceptorok, a horizontális sejtek, a bipoláris sejtek és a köztük lévő kapcsolatok vizsgálatára alkalmazható. Az a-hullám a fotoreceptorok válaszát jelenti; a b-hullámot a retina belső részén lévő sejtek, például az ON bipoláris és Müller-sejtek generálják. Az ERG klinikailag hasznos technika a retinabetegségek diagnózisának értelmezésében.

2 Célkitűzések

Korábbi tanulmányok igazolták, hogy intravitreálisan alkalmazott PACAP retinoprotektív hatással rendelkezik különböző retinális károsodások esetén. 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. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a TAT peptid, elősegíti a hozzá kötött molekulák biológiai barrieréken való átjutását, illetve a sejtmembránon való átlépést, így hatékonyabbá téve az esetleges neuroprotekción.

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

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

3.1 Anyagok és módszerek

BCCAO és szemcseppes kezelés

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 (nyilvántartási szám: BA02/2000-26/2017). Izofluránnal történő altatás során mindkét oldalon kipreparáltuk az arteria carotis communis-t egy középvonalbeli bemetszésen keresztül, majd 3-0-s fonállal lekötöttük. Az állatok egy csoportja (sham csoport) a műtéti eljárás minden lépésén átesett, kivéve az arteria carotis communis-ok lekötését (BCCAO). Közvetlenül a műtétet követően az állatok jobb szemét PACAP-TAT vagy VIP-TAT (1 µg/csepp) kezelésben részesítettük. Az állatokat öt napig, naponta kétszer kezeltük, izofluránnal történő bódítás során (max. 5 perc).

Szövetteni analízis

Tizennégy nappal a BCCAO-műtét után a patkányokat feldolgoztuk és a szemeket szövetteni vizsgálatra előkészítettük. Először 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, majd Durcupan ACM gyantába ágyasztuk. A retinából 2 μm vastagságú metszeteket készítettünk és toluidinkék festékoldattal megfestettük. A metszeteket DPX médium segítségével lefedtük. A következő paramétereket mértük: az OLM-ILM vastagsága, az egyes retinarétegek (ONL, OPL, INL, IPL) vastagsága, a ganglionsejtek száma/100 μm , valamint a sejtek száma/500 μm^2 az ONL-, INL rétegben.

Statisztika

Az eredményeinket az átlag \pm standard hiba (SEM) feltüntetésével adtuk meg. A statisztikai összehasonlításhoz kétutas-ANOVA tesztet, valamint Fisher- és Bonferroni post hoc analízist végeztük.

3.2 Eredmények

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. A PACAP-TAT és a VIP-TAT önmagában történő beadása az áloperált állatok esetében nem okozott semmilyen változást a retina rétegeinek vastagságában. A PACAP-TAT vagy a VIP-TAT szemcsepp a BCCAO műtött csoportban jelentősen csökkentette a károsodás mértékét az összes retina rétegben a sham csoporthoz képest. A rétegvastagságok szignifikánsan nagyobbak voltak, mint az iszkémiás csoportban. Ez különösen szembetűnő volt az OPL rétegben, amely több BCCAO műtött állat esetében eltűnt, ellenben mérhető maradt a PACAP-TAT vagy VIP-TAT kezelt állatokban. A BCCAO jelentős sejtvesztéshez vezetett az ONL-ben, az INL-ben és a GCL-ben egyaránt. A PACAP-TAT szemcseppek ellensúlyozták a BCCAO hatását minden sejtes rétegben. A sejtek száma a GLC/100 μm , az ONL/500 μm^2 és az INL/500 μm^2 -ben szignifikánsan magasabb volt a BCCAO műtött állatokhoz képest. A VIP-TAT kezelés szintén csökkent sejtvesztésget eredményezett szinte minden sejtes rétegben, kivéve az ONL/500 μm^2 egységben.

3.3 Diszkusszió

Kutatásunk során igazoltuk a PACAP-TAT és VIP-TAT 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. A protektív hatások a retina minden idegsejt típusán érvényesülnek. A PACAP nemcsak a retina idegsejtjeire és gliasejtjeire van protektív hatással, hanem segít megőrizni a vér-retina gát integritását egyaránt. Oxidatív stressz okozta sérülések esetén védi a retina pigmenthámsejtjeit, aminek következtében megőrizhető az ideghártya külső határa. Tanulmányok szerint a VIP hatással van a látórendszerre, a legtöbb eredmény a fény által kiváltott neuronális transzmisszióban való részvételével foglalkozik. A VIP-ről ismert az is, hogy fontos neuromodulátor a vizuális jelátviteli utakban, nem csak a retinában, hanem az agykéregben is, ahol befolyásolja a vizuális információfeldolgozást. Emellett vannak olyan tanulmányok, melyek a VIP trófikus hatását igazolják más retinális elváltozásokban. Bizonyított, hogy a VIP in vitro körülmények között képes megvédeni a retina ganglionsejtjeit az excitotoxikus károsodásoktól. Iszkémiás reperfüziós modellben a VIP védő hatását igazolták, 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 hipoperfüziós 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. Jelenlegi tanulmányunkban hasonló fokú védelmet tapasztaltunk a VIP-TAT 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. A retinában a NAP védelmet nyújtott a lézer-indukálta károsodásban, csökkentette a hipoxia hatására megjelenő faktorokat diabéteszes retinopathia modellben, gátolta az apoptotikus sejthalált, valamint hipoxia-indukálta retinakárosodásban elősegítette a neuronális növekedést. A VIP a retina vérellátását is szabályozza, mivel hatással van az autonóm reflexekre és a choroidea véráramlására is. A VIP szemcsepp formájában történő alkalmazása hatással van a szaruhártyára.

A BCCAO okozta iszkémiás sérülésben a PACAP a legtöbb retinális rétegben sejtvédő hatásának bizonyult. Korábbi kutatási eredményeink szerint a VIP hatékonysága töredéke a PACAP védő hatásának. A 100 pmol-os (5 μ l) 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 (5 μ l) mellett volt mérhető. Sikerült bizonyítanunk, hogy a TAT peptidhez kötött VIP hatékonyan átjut az okuláris barriereken és neuroprotektív hatást fejt ki a retinában. A PACAP-TAT kezelés nem nyújtott erősebb védelmet a retina sejtjeinek, 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) aminosavja, nagyobb affinitást biztosított a VIP-nek a PAC1 receptorhoz való kötődéskor. A PACAP 38 aminosavas formája esetében a C terminálhoz 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.

Összefoglalva, jelen kutatásunk elsőként bizonyította, hogy a (Solutio ophthalmica cum benzalkonioban (SOCB) oldott TAT kapcsolt PACAP és VIP lokális alkalmazása csökkenti az iszkémiás retinadegeneráció mértékét, feltehetően ennek hátterében egy multifaktoriális védőmechanizmus áll.

4 Kísérlet II – PACAP szemcsepp protektív hatásának vizsgálata glaukóma modellben

4.1 Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok, mikrogyöngy injekció és a kezelés

Kísérleteink során felnőtt (300-500 g) hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk (n=50). Állatainkat 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 (BA02/2000-16/17). Kísérleti állatainkat véletlenszerűen négy vizsgálati csoportba osztottuk: PBS+vivőanyag (Systane (S)) n=8; PBS+PACAP1-38 (P) n=8; mikrogyöngy+vivőanyag (S) n=17 és mikrogyöngy+PACAP1-38 (P) n=17. Hamilton-fecskendővel a fluoreszcens mikrogyöngyöket mindkét szem elülső csarnokába fecskendeztük. A kontroll csoportokban a szemek megegyező mennyiségű PBS-t kaptak. Két héttel az első

injekció beadása után megismételtük az eljárást. A mikrogyöngyök beadása után a szemeket Systane oldattal vagy PACAP1-38 szemcseppel (1 µg/csepp) kezeltük. Az IOP-változást mindkét szemem tonométerrel monitoroztuk.

OCT és ERG mérés,

Az OCT mérés 1 nappal a mikrogyöngy beadása előtt történt. A mérés során a pupillatágításhoz 0,01% atropint tartalmazó pupillatágító szemcseppet, valamint a szaruhártya védelme érdekében műkönyvet alkalmaztunk. A retináról az injekciók előtt és 8 héttel az injekciók után készítettünk felvételeket.

Szintén a mikrogyöngyök beadás előtt 1 nappal, illetve 8 héttel az mikrogyöngyök beadása után végeztünk ERG méréseket. A mérés előtt az állatokat egy éjszakán át (>12 óra) sötétbe adaptáltuk, és minden mérési előkészületet vörös fény mellett végeztünk el. A patkányokat a mérés során fűtőpadra tettük, majd elektródokat helyeztünk a szaruhártya felszínére. A referenciaelektródákat szubkután helyeztük el a fejükön. A következő paramétereket mértük: az a-hullám amplitúdója és a b-hullám amplitúdója.

Szövettan analízis

8 héttel az első mikrogyöngy beadás után a patkányokat feldolgoztuk és a szemeket (n=32) szövettani vizsgálatra előkészítettük. Először a szemeket 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, majd Durcupan ACM gyantába ágyasztuk. A retinákból 2 µm vastagságú metszeteket készítettünk és toluidinkék festékoldattal megfestettük. A metszeteket DPX médium segítségével lefedtük. A következő paramétereket mértük: az OLM-ILM vastagsága és a ganglionsejtek száma/100 µm.

Immunhisztokémia

Immunhisztokémiához a retinákat (n=32) 4%-os paraformaldehidben fixáltuk. Kriosztáttal 15-17 µm vékony metszeteket készítettünk, melyeket zselatinnal bevont tárgylemezre vettünk fel. A metszeteket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk primer poliklonális antitestben: egér anti-Brn3a és nyúl anti-GFAP (1:200). Az immunreaktivitást Alexa Fluor-594, számar anti-egér és Alexa Fluor-488, számar anti-nyúl (1:400) antitestekkel detektáltuk. Mosás után a sejtmagokat propidium-jodiddal kontrasztosítottuk. A mintákat Fluoroshield médiummal fedtük le, majd

Nikon Eclipse 80i fluoreszcens mikroszkóppal fotókat készítettünk. A GFAP-pozitivitás változásait ImageJ szoftverrel rögzítettük.

Whole mount retina minták

A szemeket (n=36) 4%-os paraformaldehydben fixáltuk. Mosás után kipreparáltuk a retinát és négy kis vágást ejtettünk a szélein. Az elsődleges egér anti-Brn3a-t PBST-ben hígítottuk és egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Az immunreaktivitást Alexa Fluor-594 számár anti-egérrel detektáltuk, amelyet 1:400 arányban hígítottunk PBST-ben. Mosás után a tárgylemezeket Fluoroshield médiummal fedtük le. A Brn3a-pozitív RGC-eket 4, egyenként 50 000 μm^2 területű régióban számoltuk meg. A számlálást az ImageJ programmal végeztük el. A képeket Nikon Eclipse 80i fluoreszcens mikroszkóppal elemeztük. A fényképeket Adobe Photoshop CS6 programmal szerkesztettük.

Statisztika

A statisztikai összehasonlításokat kétutas ANOVA teszttel végeztük, amelyet Fischer (szövettan; ERG; GFAP; Brn3a teljes montázs) és Bonferroni (IOP; Brn3a szelvény) post hoc analízis követett. Az eredményeink átlag \pm SEM értékben vannak feltüntetve. A $p < 0,05$ értékű különbségeket szignifikánsnak tekintettük.

4.2 Eredmények

A PACAP szemcsepp hatása a szemnyomás változására

A kontroll csoportokban nem tapasztaltunk szemnyomás változást. Ezzel ellentétben a glaukómás Gyöngy+S kezelt csoportban szignifikáns szemnyomásemelkedés volt megfigyelhető a vizsgálati periódus során, míg a Gyöngy+PACAP kezeltben mérséklődött a szemnyomás emelkedése. Egy héttel a mikrogyöngyök injektálása után több, mint 50%-os nyomásemelkedést 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 PBS injektált csoportokban a szemnyomásértékek a kiindulási érték (az összes kísérletbe bevont állat kontroll szemnyomásának átlaga) közelében maradtak a nyolcadik hét végén. A Gyöngy+S glaukómás csoportban szignifikánsan magasabb szemnyomás volt rögzíthető, mint a PACAP kezelt csoportban.

A PACAP szemcsepp hatása a retina szöveti szerkezetére

Szövettani eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a PACAP szemcseppes kezelés nem változtatott a retina szerkezetén a PBS injektált csoportban. In vivo OCT vizsgálatok eredményei egyaránt alátámasztották a szövettani vizsgálatok során tapasztaltakat. A Gyöngy+S csoportban a retina rétegeinek vastagsága nagymértékben csökkent a PBS injektált csoportokhoz képest. Szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető az OLM-ILM távolságában. A ganglionáris sejtrétegben a 100 µm-re eső sejtek száma is szignifikáns csökkenést mutatott. A PACAP tartalmú szemcsepp alkalmazása protektív hatással rendelkezett a retinában. A PACAP kezelt csoportban a retina morfológiája kevésbé változott, mint a vivőanyaggal kezelt mikrogyöngyös csoportban. Az OLM-ILM távolság a PBS-t kapott csoportokétól nem különbözött szignifikánsan. A morfometriai paraméterek összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy a Gyöngy+P csoportban a ganglionsejtek száma/100 µm a kontroll PBS injektált csoportokéhoz képest nem különbözött.

Az immunhisztokémiai jelölések eredményei

Immunhisztokémiai vizsgálataink során sem a PBS injektált csoportokban, sem a Gyöngy+P csoportban nem mutattunk ki elváltozást. A glaukómás Gyöngy+S csoportban szignifikánsan erősebb GFAP jelölést tudtunk detektálni. A retina belső rétegeiben a protein expressziója intenzívebb volt, mint a Gyöngy+PACAP kezelt csoportban. A ganglionsejt specifikus (Brn3a) jelölés során igazolni tudtuk, hogy a megnövekedett belső szemnyomás szignifikánsan csökkenti a ganglionsejtek számát a PBS+S csoporthoz képest. A glaukómás PACAP szemcseppel kezelt retinák esetében szignifikánsan kisebb volt a ganglionsejtek számának csökkenése. Ugyanezt az eredményt támasztotta alá a whole-mount retina preparátumokon végrehajtott Brn3a ganglionsejt jelölés is. 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.

Elektroretinográfia (ERG) eredményei

A reprezentatív ERG felvételeket 12 órás sötéthez való adaptálás után rögzítettük. Kontroll csoportokban az ERG hullámok lefutása megegyezett. A kezelés nélküli glaukóma csoportban a fényfelvillanásra adott válaszok szignifikánsan csökkentek. Ezzel ellentétben a Gyöngy+P csoportban a kezelés hatására az ERG hullámok a kontroll csoportoknál mértékhez

hasonlítottak. A PBS+S csoportban mért hullám amplitúdók hasonló mértékűek voltak, mint a PBS+P csoportban. A PBS+S csoporthoz hasonlóan szignifikáns a- és b-hullám amplitúdó csökkenést figyeltünk meg a Gyöngy+S csoportban. Az elektroretinogramok eredményei alapján azt mondhatjuk, hogy a látás funkciója szignifikánsan jobb volt abban a mikrogyöngy injektált csoportban, amely PACAP kezelésben részesült.

4.3 Diszkusszió

A glaukóma vagy zöldhályog egy komplex betegség, aminek pontos patomechanizmusát jelenleg sem ismerjük teljesen. Kísérleteink során reprodukálni tudtuk a retinális ganglionsejtek magas IOP által kiváltott pusztulását. A mikrogyöngyökkel indukált modell segítségével bebizonyítottuk, hogy a PACAP képes volt megakadályozni a szemnyomás emelkedését és a ganglionsejtek pusztulását.

A PACAP jól ismert neuroprotektív és általános citoprotektív hatásáról, beleértve a retinális károsodások esetén mutatott védő hatását. Kutatócsoportunk is leírta, hogy a PACAP csökkenti a károsodás mértékét különböző eredetű retinopathiákban. A retinopathiák szisztémás PACAP kezelése jelenleg nem megoldott, mivel a szérumban lévő peptidet a DPPIV enzim nagyon gyorsan bontja. A legtöbb retinoprotektív hatást igazoló közleményben exogén módon, intravitreális injekció formájában alkalmazták a PACAP-ot. Kutatócsoportunk korábban bizonyította, hogy a PACAP szemcseppként alkalmazva megfelelő koncentrációban átjut az okuláris barrieren, így sikeresen fejti ki védőhatását iszkémiás retinopathiában. 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. Kontroll körülmények között az SD patkányok szemnyomás értéke 10-12 Hgmm közötti tartományba esett. Ebben a glaukóma modellben a mikrogyöngyök a csarnokvíz elfolyásának zavarát, ezáltal IOP emelkedést idézik elő. Kísérleteink során reprodukáltuk a glaukómára jellemző szemnyomásemelkedést, valamint váratlan pozitív eredményként azt is megfigyeltük, hogy a mikrogyöngyök injektálása után a PACAP szemcseppes kezelés 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. Ezenkívül a PACAP csökkenti a RhoA GTPáz mennyiségét, ami pedig a csarnokvíz mennyiségének elfolyását határozza meg a trabekuláris hálózat szabályozásával.

Szövetteni eredményeink megegyeznek különböző glaukóma modell alkalmazásakor más kutatók által megfigyelt szövetteni változásokkal. A mikrogyöngyök injektálása az OLM-ILM távolság csökkenését idézte elő, hasonlóan más retinális sérülésekhez, mint például a lipopoliszacharid által kiváltott retina gyulladás. A PACAP1-38 szemcseppek kezelés hatására a retina megőrizte normál struktúráját, míg a ganglionsejt specifikus Brn3a immunhisztokémiai jelölések igazolták, hogy a PACAP kezelt glaukómás csoportban kevesebb ganglionsejt halt el. A retina esetleges sérüléseinek egyik indikátora lehet a specifikus Müller gliasejtjek aktiválódása. Ezen sejtek rendelkeznek PAC1 receptorral és a PACAP hatással lehet rájuk, többek között a PACAP befolyásolja az interleukin-6 gyulladáscitokin expresszióját. 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 gliasejt végtalpaira korlátozódott. 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 egybevágóak azzal 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 tudunk kimutatni. Kutatásunkban szövetteni minták segítségével a PACAP védő hatását tudtuk igazolni a nem-invazív szemcseppek kezelés hatására, ezen eredményeinket funkcionális vizsgálatokkal is alá tudtuk támasztani.

ERG méréseket végeztünk annak vizsgálatára, hogy a PACAP kezelés általi morfológiai javulás funkcionálisan is kimutatható-e. Alátámasztottuk, hogy a PACAP kezelés gátolhatja a Gyöngy+S csoportban észlelt látásromlást is, ami összhangban áll a korábbi iszkémiás retinopathiával kapcsolatos eredményeinkkel. 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 nem ismerünk hatékony neuroprotektív terápiát. Kutatások szerint az üvegtestbe injektált agyi eredetű növekedési faktor (BDNF) fenntartja a ganglionsejtek számát. 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. 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.

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 módszer kiegészítő eleme lehet az eddig ismeretes glaukóma kezeléseknél.

5 Új eredmények összefoglalása

- I. A Ph.D. munkám első részében a PACAP-TAT és VIP-TAT retinoprotektív szerepét vizsgáltuk BCCAO okozta retinakárosodásban. Szövetteni 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. 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 esetében 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.

6 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, FIKPII, .FIKP III, PTE-ÁOK KA 2017, NAP2017- 1.2.1-NKP-2017-00002; MTA-TKI14016; EFOP-3.6.1-16-2016-00004, EFOP-362-00008, TAMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012- 0001, 20765-3/2018/FEKUTSTRAT, ÚNKP-19-3-I-PTE-137, TKP2020-IKA-08, TKP2021-EGA-16.

7 Publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények (össz. impakt faktor (IF): 8,601)

- 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.**, Vaczzy 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)

Egyéb tudományos közlemények (össz. IF: 49,748)

- 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., Vaczzy 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., Vaczzy 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)
- Váczai M., Nagy S. A., Kőszegi 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.**, Váczai 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.**