

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

**A természetes öregedés vizsgálata patkány és PACAP kezelt
transzgenikus egér retinában**

PhD értekezés

Pöstyéni Etelka

PÉCS, 2022.

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A természetes öregedés vizsgálata patkány és PACAP kezelt transzgenikus egér retinában

PhD értekezés

Pöstyéni Etelka

Témavezető:
Prof. Dr. Gábrriel Róbert
egyetemi tanár

.....
Prof. Dr. Gábrriel Róbert
egyetemi tanár,
témavezető

.....
Prof. Dr. Gábrriel Róbert
egyetemi tanár
PTE-BDI iskolavezető

PÉCS, 2022.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	7
1.1. Az emlős retina szerkezete	7
1.2. Az öregedés	12
1.2.1. Az öregedés vizsgálata kísérletes állatmodellekben	15
1.2.2. A retina öregedése	17
1.3. A retina és a neuropeptidek	19
1.3.1. PACAP és a retina.....	20
1.3.2. Szomatosztatin és a retina	21
2. Célkitűzések	22
3. Anyag és módszer	23
3.1. Kísérleti állatok	23
3.2. A normál öregedés modellben biztosított körülmények.....	23
3.3. PACAP injektált öregedés modellben biztosított körülmények.....	23
3.3.1. PACAP kezelés	24
3.4. Szövetteni eljárások.....	24
3.4.1. Morfológiai és morfometriai vizsgálat.....	24
3.5. Immunhisztokémiai eljárások.....	25
3.5.1. Normál öregedés modellben	25
3.5.2. Transzgenikus egérmodellben.....	27
3.6. Western blot analízis	28
3.7. Statisztikai analízis	29
4. Eredmények	30
4.1. Normál öregedés modell	30
4.1.1. Morfológiai és morfometriai vizsgálatok.....	30
4.1.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok.....	33
4.1.2.1. Protein kináz C alfa.....	33
4.1.2.2. Calbindin	34
4.1.2.3. Calretinin.....	36
4.1.2.4. Parvalbumin	37

4.1.2.5. Tirozin-hidroxiláz	38
4.1.2.6. Vezikuláris glutamát transzporter-1	40
4.1.2.7. Gliális fibrilláris savas fehérje	41
4.2. A krónikus PACAP kezelés hatása transzgenikus egér retina öregedésére ..	43
4.2.1. A transzgenikus egér modell validálása	43
4.2.2. A PACAP kezelés hatására bekövetkező sejtdenzitás változások retinában	44
5. Eredmények megbeszélése	49
5.1. A retina szerkezeti változásai a normál öregedés során	49
5.2. A krónikus PACAP kezelés hatása az SST tartalmú illetve dopaminerg amakrin sejtek denzitására az öregedés során	51
5.3. Az öregedés lehetséges retinális mechanizmusai	54
5.4. A transzgenikus modellekben rejlő további lehetőségek	56
6. Összefoglaló	59
7. Summary	60
8. Irodalomjegyzék	61
9. Köszönetnyilvánítás	87
11. Saját publikációk listája	88

Rövidítések jegyzéke

AC	adenilát-cikláz
Akt	protein kináz B
ATP	adenozin-trifoszfát
BDNF	brain-derived neurotrophic factor/ agyi eredetű növekedési faktor
BRN3a	brain-specific homeobox/POU domain protein 3A
cAMP	3',5'-ciklikus-adenozin-monofoszfát
CREB	cAMP responsive element-binding protein/ cAMP-reszponzív elem kötő fehérje
DAG	diacilglicerol
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
ERK 1/2	- extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2
GABA	gamma-amino-vajsav
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
GCL	ganglion cell layer/ ganglion sejtek rétege
GFAP	gliális fibrilláris savas fehérje
Gα/β/γ	G fehérje alpha/beta/gamma alegység
HIF1α	hipoxia-indukálta faktor 1 α
HIF1β	hipoxia-indukálta factor 1 β
HRE	hipoxia-reszponzív elem
IL	interleukin
ILM	inner limiting membrane/ belső határoló membrán
INL	inner nuclear layer/ belső magvas réteg
IP3	inozitol-trifoszfát
IPL	inner plexiform layer/ belső rostos réteg

JNK	c-Jun N-terminális kináz
OLM	outer limiting membrane/ külső határoló hártya
OPL	outer plexiform layer/ külső rostos réteg
PAC1-R	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor/ PACAP receptor
PACAP	pituitary adenylate cyclase activating polypeptide/ hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
PB	phosphate buffer/ foszfát puffer
PBS	phosphate buffer saline/ foszfát puffer sója
PI3K	foszfatidilinozitol 3-kináz
PIP2	foszfatidilinozitol 4,5-bisfoszfát
PKA	protein kináz A
PKCα	protein kináz C alfa
PLC	foszfolipáz C
ROS	reactive oxygen species/ reaktív oxigén gyökök
RPE	retinális pigment epithelium
SIRT1	sirtuin 1
SIRT5	sirtuin 5
SST	szomatosztatin
TH	tirozin-hidroxiláz
TNFα	tumor nekrosis faktor alpha
VEGF	vascular endothelial growth factor/ vasculáris endoteliális növekedési faktor
vGLUT1	vezikuláris glutamát transzporter-1
VIP	vasoactive intestinal peptide/vazoaktív intesztinális peptid

VPAC1-R vasoactive intestinal polypeptide receptor 1/ vazoaktív intesztinális peptid receptor 1

VPAC2-R vasoactive intestinal polypeptide receptor 2/ vazoaktív intesztinális peptid receptor 2

1. Bevezetés

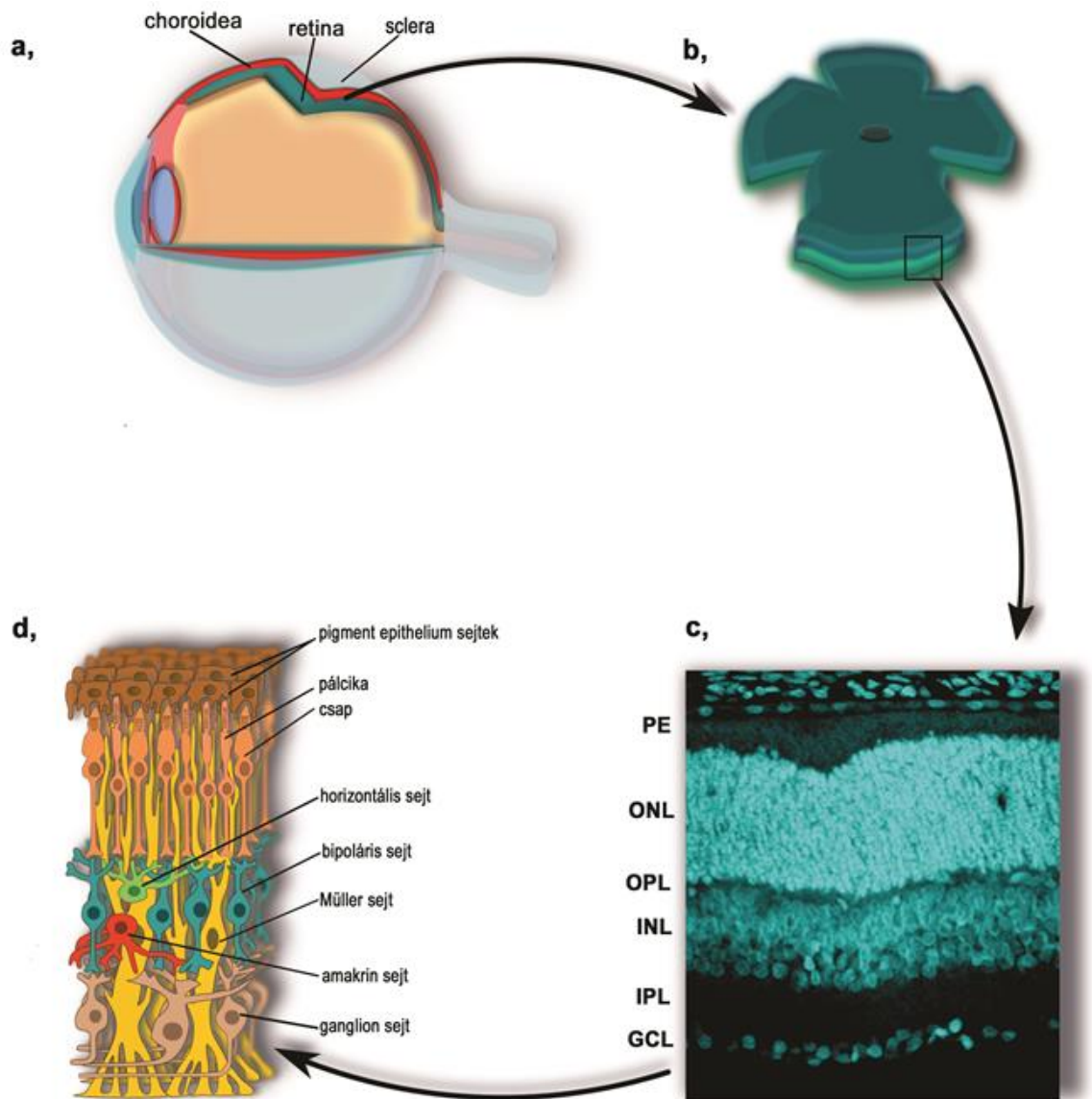
1.1. Az emlős retina szerkezete

A retina (recehártya, ideghártya) a szem legbelső rétegében elhelyezkedő lamináris szerveződésű fényérzékeny szövet, amely a központi idegrendszer részét képezi (1. Ábra a, b). A működése során fény hatására kialakuló ingerület vertikális és horizontális irányítása és feldolgozása is megvalósul.

A retinát alkotó főbb sejttípusok közül a vertikális információterjedésben vesznek részt a fotoreceptorok (pálcika, csap), a bipoláris sejtek és a ganglion sejtek, mely utóbbi sejttípus axon kötegei hozzák létre a vakfoltnál kilépő, a látóközpontok felé haladó látóideget (nervus opticus). A horizontális kapcsolatok kialakításában további interneuronok, név szerint az amakrin és a horizontális sejtek vesznek részt. (1. Ábra d; 2. Ábra) A vizuális információ továbbadása az axonok és a dendritek komplex hálózatának köszönhetően valósul meg, mely sejtek közötti kommunikációban, az elektromos és kémiai szinapszisok szerepe elengedhetetlen.

A felsorolt idegsejtek sejttestjei és az általuk kialakított szinapszisok, három magvas illetve kettő szinaptikus kapcsolatokat tartalmazó (plexiform) rétegbe szerveződnek a retinában. A rétegek kívülről befelé haladva a következőképpen helyezkednek el: PE - pigment epithelium, ONL (outer nuclear layer) - külső magvas réteg, OPL (outer plexiform layer) - külső plexiform réteg, INL (inner nuclear layer) – belső magvas réteg, IPL (inner plexiform layer) -belső plexiform réteg; GCL- ganglion sejtek rétege (1. Ábra c; 2. Ábra). Rövidítésük a nemzetközi irodalomban így használatos, ezért a dolgozatomban is ezt a nevezéktant fogom alkalmazni.

A PE réteg hámsejtjei a transzport funkcion túl a fotooxidációval szembeni védelemben, fényadaptációban, retinoid metabolizmusban és a fotoreceptorok külső szegmensének fagocitózisában is részt vesznek. Az ONL-ben a fotoreceptorok (csap, pálcika), az INL-ben a bipoláris sejtek, a horizontális sejtek, az amakrin sejtek és a Müller sejtek sejttestjeit, míg a GCL-ben a ganglion sejteket illetve az ún. „displaced” amakrin sejteket találjuk. Az OPL-ben valósul meg a fotoreceptorok és a bipoláris sejtek közötti információátadás, de a fotoreceptorok ingerületátadását a horizontális sejtek gátló neuronként képesek tovább modulálni. Az IPL - ben a bipoláris sejtek ganglion sejtekkel illetve amakrin sejtekkel szinaptizálhatnak (1. Ábra d; 2. Ábra).



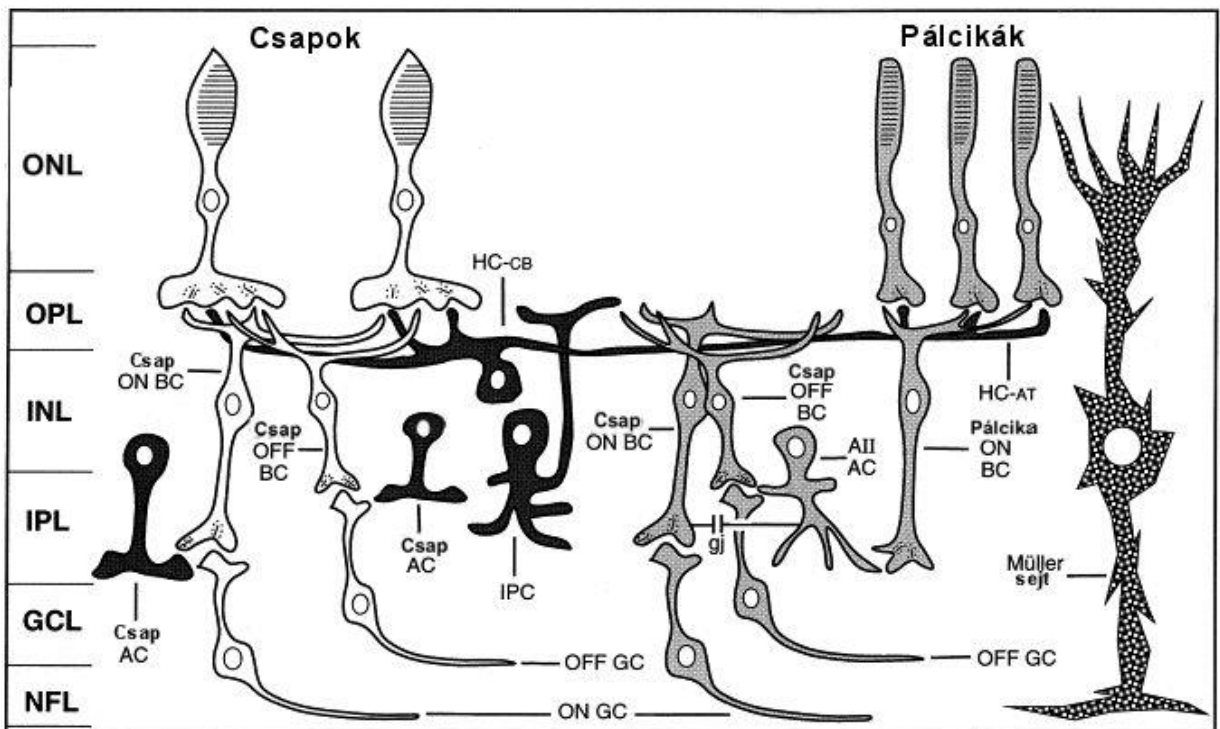
1 Ábra a., Sematikus ábra a retina elhelyezkedéséről; b., Retina whole-mount; c., A retina réteges szerkezete (4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI) magfestés patkány retina metszeten); d., A retina különböző rétegeit alkotó sejtípusok sematikus rajza. GCL - ganglion sejt réteg; IPL- belső rostos réteg; INL-belső magvas réteg; OPL-külső rostos réteg; ONL-külső magvas réteg; PE-pigment epithelium

Forrás: Saját szerkesztés

A fényinger hatására a retinában megindul egy fényreakcióhoz köthető kaszkád, kezdetben a fotoreceptorok membránja hiperpolarizálódik, ahonnan több irányba továbbítható a szignál. A csap fotoreceptorok ingerküszöbe magasabb, így magasabb fényintenzitás esetén aktiválódnak (fotopikus látás), míg a pálcikák fényrel szemben sokkal

érzékenyebbek (szkotopikus látás). Radiális irányban a bipoláris sejteken keresztül a ganglion sejtek felé továbbítható az információ glutamát szinapszisok révén.

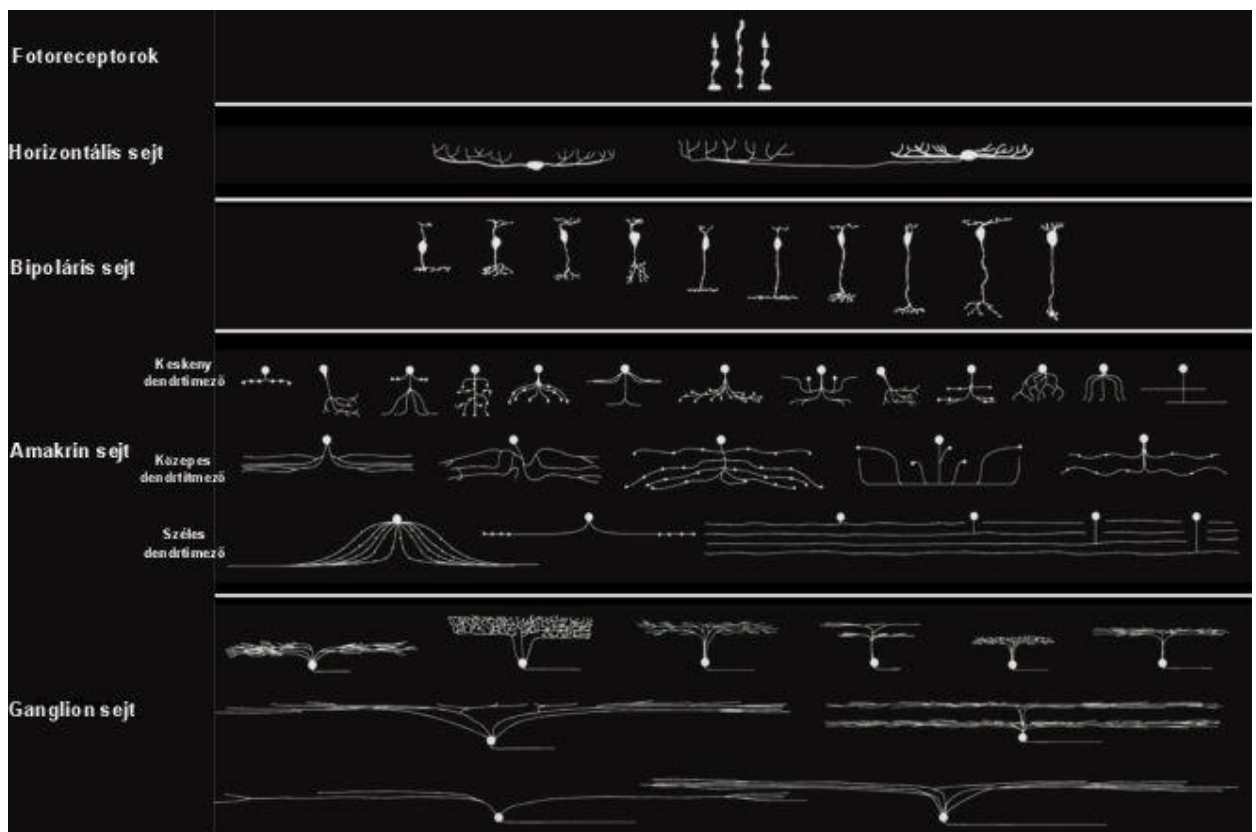
A bipoláris sejtek bementeiket a fotoreceptoroktól kapják, ennek megfelelően megkülönböztetünk csap bipoláris és pálcika bipoláris sejteket. Funkcionális szempontból ezek tovább osztályozhatóak, mint ON-típusúak amely csap és pálcika specifikus is lehet, illetve OFF-típusúak melyek csak csap fotoreceptor specifikusak lehetnek (2. Ábra). Az OFF-típusúak ionotróp glutamát receptorral rendelkeznek és sötétben aktívak, míg az ON-típusú bipoláris sejtek metabotróp glutamát receptorral rendelkeznek és fény hatására aktiválódnak. Az OFF terminálisok az IPL-ben az a szublaminában ágazódnak el ahol OFF típusú ganglion sejtekkel kapcsolódnak, amíg az ON típusúak a b szublaminában ON-típusú ganglion sejtekkel kapcsolódhatnak.



2. Ábra Az emlős retina sejt kapcsolatainak sematikus ábrázolása. HC CB - horizontális sejt sejttest; HC AT - horizontális sejt axonterminálisa; ON BC - ON bipoláris sejt; OFF BC- OFF bipoláris sejt; AC- amakrin sejt; OFF GC- OFF-típusú ganglion sejt; ON GC - ON-típusú ganglion sejt; NFL - optikus rostok rétege; GCL - ganglion sejtek rétege; INL- belső magvas réteg; IPL- belső rostos réteg; OPL-külső rostos réteg; ONL-külső magvas réteg. Forrás: Kalloniatis és mtsai., 1999 nyomán.

Laterális információterjedésben az interneuronok csoportjába tartozó horizontális és amakrin sejtek vesznek részt. A horizontális sejtek az OPL-ben γ -ammino-vajsavat (GABA) tartalmazó kémiai szinapszisok segítségével továbbítják az információt a bipoláris sejtek felé. Axonuk megléte alapján csoportosítják őket, mint axonnal rendelkező (B-típus) vagy axon nélküliek (A-típus).

A rendkívül változatos csoportot alkotó amakrin sejtek információt elsősorban a bipoláris sejtektől és más amakrin sejtektől kapnak, míg a kimenet az előbb említett sejteken kívül a ganglion sejtek felé is megvalósul. Ezen sejtek csoportja mind funkcionális, mind pedig morfológiai szempontból rendkívül heterogén, ennek köszönhetően több mint 25 típusát különítik el. A nyúlványaik arborizációja alapján keskeny (ún. narrow-field), közepes (ún. medium-field) és széles (ún. wide-field) dendritmezejű amakrin sejteket ismerünk. (3. Ábra). Többségében GABA illetve glicin gátló neurotranszmitter segítségével vesznek részt az információáramlás befolyásolásában, illetve GABAerg amakrin sejtek acetolkolint és dopamint is szintetizálhatnak.



3. Ábra Az emlős retina sejtípusainak morfológiai jellegzetességei. Forrás: Werblin és mtsai. 2011 és Masland és mtsai. 2011 nyomán.

Kiemelten fontos pl. az AII-es típusú amakrin sejt, amely glicerinergerg szinapszisokat hoz létre, transzmittere glicin és az emlős retina egyik leggyakoribb amakrin sejt típusa. Bemenetet a pálcika bipoláris sejtektől kap, ezáltal esszenciális szerepe van a két fotoreceptor útvonal elkülönülésében és a függőleges irányú pályák korai szétválasztásában. Kiterjedésüket tekintve, a keskeny dendritmezejű amakrinok közé tartoznak, dendritjeik kétfelé ágazódnak (bistratified) az IPL-ben. Az INL-ben elhelyezkedő sejttestjük kerek vagy ovális, kalciumkötő fehérjék elleni antitesttel jelölhetőek (pl. parvalbuminnal az AII-es amakrin sejt patkány retinában) (Kolb és mtsai., 1974; Famiglietti és mtsai., 1975; Wassle és mtsai., 1993).

A szintén jelentős élettani szereppel rendelkező dopaminerg amakrin sejtek a széles mezejű amakrin sejtek csoportjába sorolhatóak. A katekolaminok szintéziséhez elengedhetetlen enzim, a tirozin hidroxiláz (TH) ellen termeltetett antitesttel jelölhetőek. Az amakrin sejtek ezen csoportja alacsonyabb denzitással jelenik meg a retinában. Nagyméretű sejttestjük az INL-ben, denz hálózatot alkotó dendritjeik pedig az IPL-ben találhatóak (Voigt és mtsai., 1987). A kolinerg amakrin sejteknek acetilkolin a transzmittere, kolin-acetiltransferáz (ChAt) ellen termeltetett antitesttel jelölhetőek. Sejttestjeik megjelenését az INL-ben illetve a GCL-ben írták le, dendritjeik az előbbinek az IPL külső harmadában az utóbbinak az IPL közepén ágazódnak el (Voigt és mtsai., 1986).

A felsorolt sejtcsoportokon kívül, a gliasejtek struktúrális és metabolikus szempontból is jelentős szerepet játszanak a retina működésében és felépítésében. Három főbb gliasejt típus található meg a retinában, a makroglia csoportjához tartozó astrocita és Müller sejt, illetve a mikroglia. A neuronális folyamatokra jelentős befolyással bírnak, hisz funkciójukat tekintve a szerkezeti stabilizációban betöltött szerepük mellett, az ionikus és metabolikus homeosztázis fenntartásában is nélkülözhetetlenek. Legnagyobb mennyiségben előforduló gliasejt a retinában a Müller sejt, ami a metabolikus folyamatok támogatása mellett a retinát határoló membránok kialakításában is létfontosságú. Az astrocyták a vér-retina gát kialakításában vesznek részt, a mikroglia pedig makrofágként képesek bekebelezni az idegen anyagokat, elhalt idegsejteket.

A retinában a neurotranszmitterek közvetítésével megvalósuló kémiai szinapszisokon kívül, az csatornafehérjék révén, ionáramlás segítségével létrejövő réskapcsolatok, másnéven elektromos szinapszisok is fontos szerepet játszanak a jelátvitelben. Ezek lehetnek azonos sejt típusok közötti (homocelluláris) sejt kapcsolatok (pl. csap - csap, pálcika - pálcika, horizontális sejt - horizontális sejt) vagy eltérő sejt típusok közötti

(heterocelluláris) elektromos szinapszisok (pl. pácika- csap, horizontális sejt - bipoláris sejt).

A retina a központi idegrendszer részeként limitált sejtregenerálódási képességgel rendelkezik, amely az élet későbbi szakaszaiban tovább csökken. Ennek ismeretében, rendkívül fontos, hogy megvizsgáljuk melyek azok a sejtípusok, amelyeket az öregedés okozta változások súlyosabban érintenek. A retinát felépítő sejtek, sejtkapcsolatok részletes ismerete elengedhetetlen ahhoz, hogy az öregedését kísérő morfológiai és funkcionális változásokat egyaránt nyomon követhessük. Továbbá fontos, hogy az ezek között fellépő ok-okozati összefüggésüket is megértsük, hisz minden résztvevője a sejtek közötti kommunikációnak – ha eltérő mértékben is - ki van téve az idő múlásával jelentkező hatásoknak.

1.2. Az öregedés

A WHO adatai alapján 2019-ben 1 milliárdra volt tehető a 60. életévét már betöltött vagy annál idősebb személyek alkotta populáció nagysága, amely a növekvő tendencia eredményeként 2050-re akár megközelítheti majd a 2,1 milliárd főt is (World Health Organization, https://www.who.int/health-topics/ageing#tab=tab_1, 2020.07.08). A társadalom ilyen mértékű elöregedése nem csak szocioökonómiai problémákat rejt magában, hanem ezzel párhuzamosan az egészségügyi rendszer terhelését is növeli azáltal, hogy fokozatosan emelkedik az időskori betegségek prevalenciája.

Az öregedés egy komplex, irreverzibilis, multifaktoriális folyamat, amelynek számos tényezőjét és különböző színtereit különíthetjük el. Molekuláris szinten, sejtszinten és szövet szinten is megjelenhetnek az öregedéshez köthető biológiai és kémiai folyamatok, melyeket környezeti, genetikai és epigenetikai tényezők egyaránt befolyásolhatnak (Khan és mtsai., 2017).

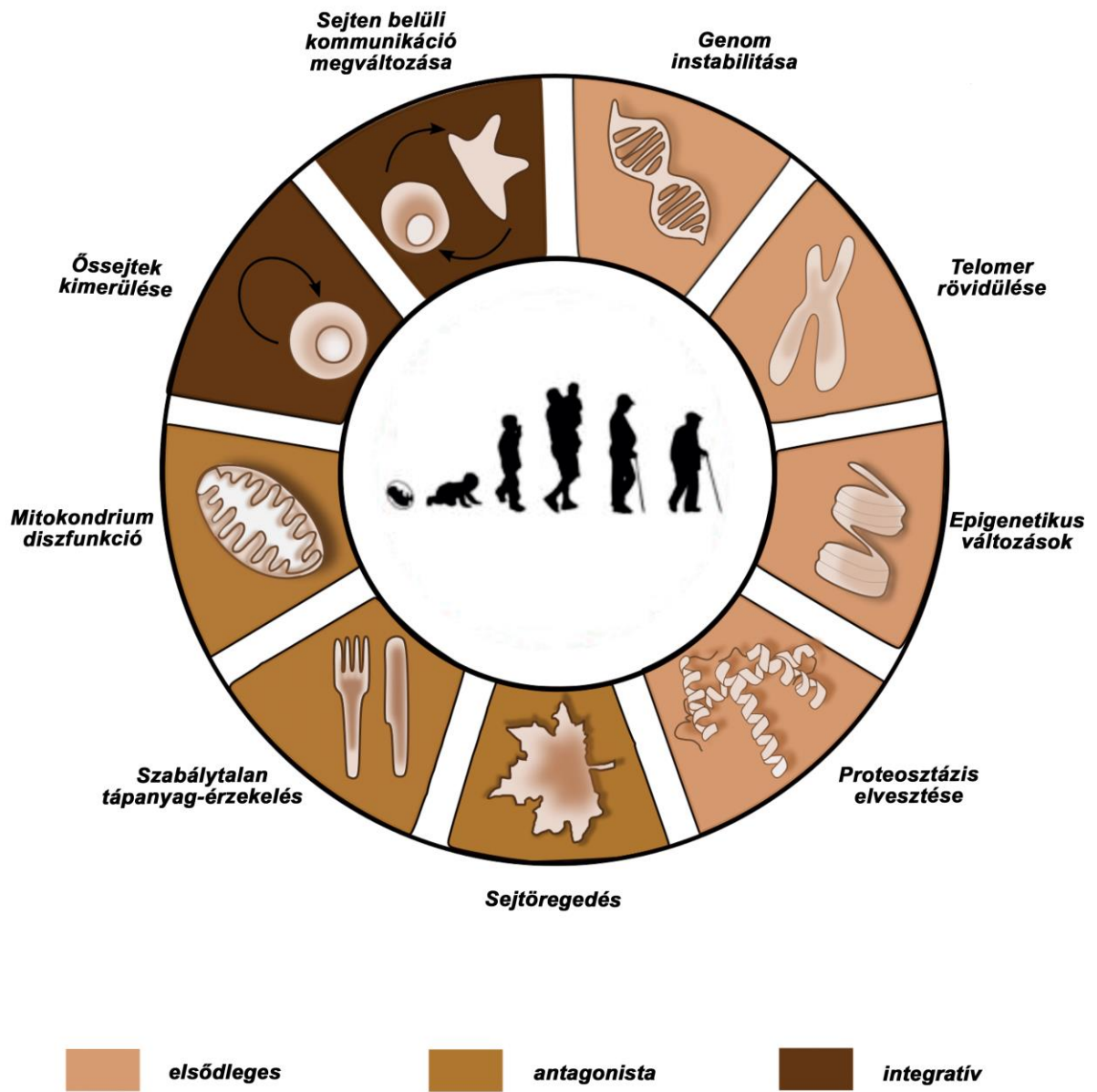
Az öregedésnek több főbb komponense van, melyek rendszerszinten képesek összefonódni és úgy fejtik ki hatásukat a szervezet egészére. Ezt a 7-10 egymással átfedő folyamatot, többféle modellel illetve stratégia szerint is igyekeznek csoportosítani. Ezen komponensek közé soroljuk a metabolikus diszfunkciót, a mitokondriális diszfunkciót, a sejten belüli kommunikáció megváltozását, a sejtek öregedését, a telomerek biológiáját, a genom instabilitást, a proteosztázis elvesztését, az őssejtek kimerülését, az epigenetikai hatásokat és a tápanyag érzékelés megváltozását is (4. Ábra).

Az öregedés folyamatának háttérében álló okokat eredetük szerint kategóriákba sorolják, mint: elsődleges (amelyek az öregedéshez köthető károsodások kiváltói); antagonista (amelyek károsodásokra adott válaszokat foglalják magukba); integratív (amelyek a válaszok következményeit és az öregedés fenotípusának kialakításáért felelős tényezőket foglalják magukba) (López-Otín és mtsai., 2013) (4. Ábra). Kennedy és munkatársai ezzel szemben hét kulcstényezőt emelnek ki az öregedés folyamatában: a metabolizmus változását, a makromolekulák károsodását, az epigenetikai tényezőket, a gyulladással járó folyamatokat, a stresszre való adaptációképesség megváltozását, a stem sejtek és azok regenerációs képességének változását illetve a proteosztázis megváltozását (Kennedy és mtsai., 2016).

A biológiai öregedés magában rejti a javító mechanizmusok és a regeneratív potenciál hanyatlását, a stresszre adott megfelelő válaszreakciókhoz szükséges élettani tartalékok csökkenését. Homeoszténózisnak nevezzük a homeosztázis fenntartásához szükséges tartalékoknak az életkor előrehaladtával megjelenő csökkenését. Abban az esetben, ha a homeosztázis fenntartása tovább nem megvalósítható, a biológiai öregedés patológiás folyamatba léphet át (Khan és mtsai., 2017; Hodgson és mtsai., 2020).

Az öregedést kísérő morfológiai és funkcionális változások a szervrendszerekre jellemző szervspecifikus érzékenységből adódóan, eltérő mértékben és gyorsasággal, de minden szervrendszeren nyomot hagynak (pl. vázizomrendszerben – csonttrituráció (Demontiero és mtsai., 2012), szarkopénia (Melton és mtsai., 2000); keringérendszerben – érfalak elvékonyodása, endotél diszfunkció (Gkaliagkousi és mtsai., 2022) stb). Az idő előrehaladtával felhalmozódó molekuláris és sejtszintű károsodások akkumulációja hozzájárul a funkcionális és struktúrális rendellenességek megjelenéséhez, melyek szintúgy elősegítik különböző kórképek kialakulását. Néhány tanulmány ennek a fordítottját is alátámasztja, amikor egyes betegségek képesek felgyorsítani az öregedésre jellemző elváltozások megjelenését (Pathai és mtsai., 2014; Robinson és Hudson, 2014).

A magas életkor rizikó faktorként szerepel számos tömeget érintő krónikus betegségnél (Niccoli és Partridge, 2012; Dong és mtsai., 2016; Khan és mtsai., 2017), mind például a diabétesz (Gunasekaran és Gannon, 2011), a rák (de Magalhaes és mtsai., 2013) ,a glaukóma (Kwon és mtsai., 2009), a kardiovaszkuláris (North és Sinclair, 2012) vagy a különböző neurodegeneratív betegségek (Querfuth és LaFerla, 2010).



4. Ábra. Az öregedés folyamatának legfontosabb komponensei. Forrás: López- Otín és mtsai., 2013 nyomán.

1.2.1. Az öregedés vizsgálata kísérletes állatmodellekben

Az társadalom előregedésével nem csak az idősebb populáció nagysága, hanem ezzel párhuzamosan, a jellemzően magasabb életkorban jelentkező egészségügyi problémák prevalenciája is emelkedett a populációban. Az érintettek számának folyamatos növekedése hozzájárult, és elősegítette azon kutatások számának gyarapodását, amely a kórképek háttérében meghúzódó élettani folyamatok megválaszolását tűzték ki célul.

Az öregedés molekuláris és celluláris folyamatainak a pontos leírása rendkívüli kihívást jelent a komplexitását adó és befolyásoló extrinsic és intrinsic faktorok miatt. A rendszer szinten történő megértést tovább nehezíti, hogy jelentős heterogenitás jelentkezik egyes fajok, sőt akár azonos fajok egyedei között is az öregedés lefolyásában. Ennek köszönhetően a folyamat feltérképezésére rendkívül széles palettáját alkalmazzák az általánosabban használt kísérleti modelleknek (pl., *Caenorhabditis elegans* - Kremer és mtsai., 2020, *Drosophila melanogaster* – Piper és Partridge, 2018, *Saccharomyces cerevisiae* - Sun és mtsai., 2021, *Mus musculus*– Hakimizadeh és mtsai., 2021, *Rattus norvegicus* – El Far és mtsai., 2021), illetve alternatív öregedési modellek is szerepet kapnak (pl., *Nothobranchius furzeri* - Terzibasi és mtsai., 2007; *Canis lupus*- Borras és mtsai., 1999; *Felis catus*- Reynolds és mtsai., 2013; *Coturnix japonica*- Ottinger és mtsai., 1995 stb.).

Az alkalmazott kísérleti állatok közül az egér és a patkány modellállatként való alkalmazása a legelterjedtebb az öregedési vizsgálatokban is. Alkalmazásuk előnyei közé tartozik, a jelen disszertáció témájának szempontjából, hogy retinájuk a humán retinával szerkezeti, élettani és biokémiai hasonlóságokat mutat. Mindemellett a rövid életidő, a könnyen kontrolálható kísérletes környezet, illetve hogy a genetikai állományuk jól ismert és annak manipulációjára már sokféle megbízható genomeditálási technika is rendelkezésre áll (Richardson és mtsai., 1997; Carmona és mtsai., 2016, Holtze és mtsai., 2021). A beltenyésztett egyedek lehetőséget adnak arra, hogy genetikailag homogén állatokkal tudjunk dolgozni. Ezen kísérletek során az egyedek között jelentkező eltérések a környezeti tényezőknek vagy egy esetlegesen alkalmazott kezelésnek lesznek tulajdoníthatóak. A kültenyésztett egyedek ezzel szemben változatos genetikai állománnyal rendelkeznek, az egyedek így különböző érzékenységet vizsgáló, illetve fiziológiai paraméterek általános feltérképezésre vonatkozó kísérletekben nem a legalkalmasabbak (Chia és mtsai., 2015).

A normál öregedési folyamatokat kísérő élettani folyamatokat leíró öregedési modell mellett, vannak olyan öregedési modellek melyek az öregedés felgyorsítását vagy késleltetését tűzték ki célul. Az előbbi esetében elsődlegesen génmutációk segítségével alakítják ki a várt fenotípust, amelyeket szegmentális progériáknak neveznek (Andressoo és mtsai., 2006). A késleltetési modelleknél génmanupulációval, kalória vagy metionin megvonással, illetve különböző anyagok adásával (pl. rapamicin, metformin, sirtuin aktivátorok) igyekeznek növelni az élettartamot. Ilyen például az mTOR útvonal gátlására használt rapamicin vizsgálata, amely a *C. elegans* (Jia és mtsai., 2004), *Drosophila* (Kapahi és mtsai., 2004) és az élesztő (Kaeberlein és mtsai., 2005) esetében megnövelte az élettartamot, majd később ezt a hatást gerincesekben is igazolták (Harrison és mtsai., 2009; Neff és mtsai., 2013). Gerincesekben a SIRT1 aktiválása, resveratrol vagy más aktivátorok segítségével szintúgy hozzájárul az élettartam növeléséhez és az egészség fenntartásához, különböző diéták alkalmazása mellett (Baur és mtsai., 2006; Jimenez-Gomez és mtsai., 2013; Mitchell és mtsai., 2014; Mercken és mtsai., 2014). Mindemellett, patkányokban a kalória-megvonás eredményezte élettartamnövekedést is már korábban leírták (McCay és mtsai., 1975).

A másik érdekes megközelítése a heterokrónikus parabiosis kísérletek, amikor eltérő korú egyedek keringési rendszerét kötik össze és ezzel bizonyítják, azonosítják azokat a keringési faktorokat, amelyek az öregedési folyamatokban szerepet játszhatnak (Conboy és mtsai., 2013).

A transzgenikus állatmodellek alkalmazása utat nyitott olyan lehetőségeknek, melyek révén az öregedést kísérő biológiai mechanizmusok alapjául szolgáló különböző expressziós mintázatok befolyásolhatóak és alapvető szerepük a folyamatban így direkt, rendszerszinten vizsgálható. Ezek „gain of function” (funkciónyeréses) vagy „loss of function” (funkcióvesztéses) modellek lehetnek. Az előbbinél egy olyan gén terméket expreszálnak amelyet alapvetően nem vagy csak kisebb mértékben expresszálnak az érintett sejtek, utóbbinál pedig egy géntermék megjelenését szüntetik meg sejtekben. Ezek a modellek, mind a késleltetési, a gyorsított és a normál öregedési modellek esetében is felhasználásra kerülnek.

A leírt technika, olyan kísérletes állattörzsek megjelenését eredményezte, amelyek az öregedéssel kapcsolatos kutatásokban elérhetővé tették egyes gének, géntermékek szerepének vizsgálatát normál fiziológiás és patológiás folyamatokban egyaránt.

1.2.2. A retina öregedése

A központi idegrendszer esetében jelentkező neurodegeneratív betegségeknél kiemelt rizikó faktornak számít az emelkedett életkor, de ez nincs másképp a részét képező retina esetében sem. A látással kapcsolatban jelentkező diszfunkciónál, betegségeknél is kockázati tényezőnek számít a magasabb életkor. A leggyakoribbak közé tartozik a szemszárazság, a presbyopia, a katarakta, a diabéteszes retinopátia, a glaukóma és az időskori makuladegeneráció (Chader és Taylor, 2013).

Az öregedéssel kapcsolatos vizsgálatok során a folyamatok komplexitása mellett, további nehézségeket jelent, hogy az idő előrehaladtával lezajló struktúrális és funkcionális változások számos esetben hasonlóságokat mutatnak egyes patológiák kezdeti lépéseivel. Például a drusen jelenség illetve a choroid elvékonyodása az időskori makuladegeneráció esetében megfigyelhető (Ardeljan és mtsai., 2013), vagy a vitreus degenerációja idősebb korban (Sebag 1987), amely felerősödve miópiához vezethet. Ezek az elváltozások bizonyos mértékben már a normál öregedés során is jelentkezhetnek még a betegségek kialakulása nélkül. Az említett hasonlóságok eredményeként, jelentősen megnőtt azon vizsgálatok száma, amely a „normál öregedés” és a patológiás folyamatok közötti határvonalak felismerésére, az egészséges retina időskori jellemzőinek leírására irányulnak (Elliott és mtsai., 1990; Curcio és mtsai., 1993; Enoch és mtsai., 1999; Dimitrov és mtsai., 2008). Azon kutatások eredményeinek, amelyek a különböző biológiai tényezőket, az időskorban jelentkező látásromlás/látásvesztés kialakulásában szerepet játszó folyamatokat tárják fel, elsődleges szerepük van abban, hogy elősegítsék azok időbeni felismerését, esetleges megelőzését, vagy ha lehetséges azok lelassítására, akár kompenzációjára is módot adhatnak.

A retinát több tényező is együttesen kiszolgáltatottá teszi a különböző behatásokkal szemben, mint például, hogy a pontos működéséhez elengedhetetlen a szerkezeti integritásának és az összetett szinaptikus hálózatának fenntartása. Továbbá magas a metabolikus aktivitása, illetve a regeneratív kapacitása is korlátozott. Az öregedés során a retinára legjellemzőbb morfológiai módosulás a rétegek vastagságának a csökkenése, amelynek hátterében a sejtek denzitásában, a közöttük lévő szinaptikus kapcsolatok megoszlásában fellépő eltérés állhat (Weisse és mtsai., 1995; Samuel és mtsai., 2011; El-Sayyad és mtsai., 2014; Nadal-Nicolás és mtsai., 2018; Mohamed és mtsai., 2019). A különböző sejtípusokat érintő öregedéshez kapcsolódó változások, mint ahogy a különböző patológiák esetében is széleskörben tárgyaltak (Táblázat 1.).

Kapcsolódó irodalmak						
	normál öregedésben vizsgált			patológiákban vizsgált		
Érintett sejtípusok	<i>humán</i>	<i>patkány</i>	<i>egér</i>	<i>humán</i>	<i>patkány</i>	<i>egér</i>
ganglion sejt	Harman és mtsai., 2000; Cavallotti és mtsai., 2004 Gao és Hollyfield 1992	Katz és Robinson 1986; Weisse és mtsai., 1995 Cano és mtsai., 1986	Samuel és mtsai 2011 Danias és mtsai., 2003	Blanks és mtsai., 1996, Ramirez és mtsai., 2001	Hajna és mtsai., 2016, Szabadfi és mtsai., 2012 Reinher és mtsai., 2020	Buckingham és mtsai., 2008, Danias és mtsai., 2003
amakrin sejt	Roufai és Rees., 1997	Roufai és Rees., 1997 Ibrahim és mtsai. 2019	Samuel és mtsai 2011 May és mtsai., 2012	Fariss és mtsai., 2000; Ortuño-Lizarán és mtsai., 2020	Szabó és mtsai., 2017 Szabadfi és mtsai., 2012	Gastinger és mtsai., 2006 Gunn és mtsai., 2011,
bipoláris sejt	Aggarwall és Wadhwa 2007; Eliasieh és mtsai. 2007	Nadal-Nicolás és mtsai., 2018 Mohamed és mtsai., 2018	Liets és mtsai., 2006; Samuel és mtsai 2011 Kovács-Valasek és mtsai., 2017	Jones és mtsai., 2016,	Cuenca és mtsai., 2004; Szabadfi és mtsai., 2012 Szabadfi és mtsai., 2016	Strettoi és mtsai., 2000, Strettoi és mtsai 2002
horizontális sejt	Eliasieh és mtsai., 2007;	Ibrahim és mtsai. 2019	Samuel és mtsai 2011 Terzibasi és mtsai., 2009 Kovács-Valasek és mtsai., 2017	Fariss és mtsai., 2000; Janssen és mtsai., 1996	Chu és mtsai., 1993 Szabadfi és mtsai., 2014	Strettoi és mtsai 2002 Ajioka és mtsai., 2007
Müller sejt	Bringmann és mtsai., 2003 Ramirez és mtsai., 2001	DiLoreto és mtsai. 1995 Fan és mtsai., 1996	Kovács-Valasek és mtsai., 2017 Trotta és mtsai., 2021	Li és mtsai., 1995 Mizutani és mtsai., 1998	Rungger-Brandle és mtsai., 2000 Szabadfi és mtsai., 2012 Szabó és mtsai., 2017	Schuettauf és mtsai., 2004 Inman és mtsai., 2007 Goel és Dingra 2012
fotoreceptor sejtek						
pálcika	Gao és Hollyfield, 1992 Curcio és mtsai., 1993 Panda-Jonas és mtsai., 1995	Mohamed és mtsai., 2018 Ibrahim és mtsai. 2019	Liets és mtsai., 2006; Gresh és mtsai., 2003	Farris és mtsai., 2000; Li és mtsai., 1995	Cuenca és mtsai., 2004; Phipps és mtsai., 2004	Carter-Dawson és mtsai., 1978 Fuchs és mtsai., 2012
csap	Gao és Hollyfield, 1992 Panda-Jonas és mtsai., 1995	Nadal-Nicolás és mtsai., 2018 Mohamed és mtsai., 2018	Cunea és mtsai., 2014 Gresh és mtsai., 2003	Li és mtsai., 1995 Jones és mtsai., 2016	Cuenca és mtsai., 2004 Szabadfi és mtsai., 2012 Phipps és mtsai., 2004	Fei és mtsai., 2002 Lipinski és mtsai., 2011

1. Táblázat A retinális sejtípusok érintettségét leíró irodalmak normál öregedésben és patológiákban.

A morfológiai változások szoros kapcsolatban vannak a fellépő funkcionális eltérésekkel, és ez az elektoretinogramon megjelenő, életkorfüggő változásokon keresztül is nyomon követhető (Birch és mtsai., 1992; DiLoreto és mtsai., 1995; Freund és mtsai., 2011; Samuel és mtsai., 2011; Charng és mtsai., 2011; Chaychi és mtsai., 2018). Ezen eltérések háttérben meghúzódó, fentebbi ábrán (4. Ábra) szereplő öregedési komponensek a retinában, az RPE-ben és a retinát ellátó erekben is kimutatásra kerültek az öregedés során. A gyulladási folyamatok megjelenését (Steinle és mtsai., 2009; Xu és mtsai., 2009; Chen és mtsai., 2010), a mitokondriális diszfunkciót (Barreau és mtsai., 1996; Wang és mtsai., 2010; Eells 2019), a genomikus instabilitást (Wang és mtsai., 2010), sejtek öregedését (Catita és mtsai., 2015, López-Luppo és mtsai., 2017), a proteosztázis zavara miatt kialakuló fehérje aggregátumok megjelenését (Leger és mtsai., 2011), telomerrövidülést (Baek és mtsai., 2019), epigenetikai változások megjelenését (Pennington és mtsai., 2016) is leírták retinában.

Többféle terápiás lehetőséget is vizsgálnak, amelyekkel a különböző degenerációs folyamatok mérsékelhetőek (pl. őssejtterápia - Zhang és mtsai., 2020, Sharma és mtsai., 2021; kalóriamegvonásos kísérletek- Li és mtsai., 2003; fotodinámiás terápia - Muste és mtsai 2021; RNS-alapú terápia - Gemayel és mtsai., 2021; anti-VEGF terápia - Hussain és mtsai., 2021). Így került előtérbe azon neuropeptidok alkalmazása is, amelyek már számos patológia kezelésében ígéretes terápiás lehetőségnek bizonyultak.

1.3. A retina és a neuropeptidok

A neuropeptidok neurohormonként, neurotranszmitterként, immunmodulátorként rendkívül fontos szabályozó szerepet töltenek be a központi és a perifériás idegrendszer fiziológiai homeosztázisának szabályozásában, fejlődési és regenerációs folyamataiban, továbbá számos patológias folyamatban is bizonyították már protektív hatásukat (Strand és mtsai., 2003; Casini és mtsai., 2005; Cervia és Casini, 2013; Cervia és mtsai., 2019). Általában 3-100 aminosavból állnak, elsősorban neuronokban és gliasejtekben fordulnak elő nagy számban, de jelenlétük nem csak neuronális eredetű szövetekben bizonyított (Höckfelt és mtsai., 2003; Hoyer és mtsai., 2012; Pintér és mtsai., 2014). Receptoraik legnagyobb részét a heterotrimer G-fehérje receptor szupercsaládnak tartoznak, melyek közvetítésével számos szignáltranszdukciós útvonalat befolyásolnak (Hoyer és mtsai., 2012; Pintér és mtsai., 2014).

A retinában is nagy számban fejeződnek ki, illetve receptoraik jelenlétével annak élettani folyamatait is befolyásolják (Casini és mtsai., 2005; Cervia és Casini, 2013; Cervia és mtsai., 2019). Ide tartoznak például a P anyag (Kolb és mtsai., 1995), vazointesztinális polipeptid (VIP) (Casini és Brecha, 1992; Casini és mtsai., 1994), szomatosztatin (SST) (Brecha és mtsai., 1981; Johnson és mtsai., 2000; Cristiani és mtsai., 2002), hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) (Izumi és mtsai., 2000; Szabadfi és mtsai., 2016), agyi eredetű növekedési faktor (BDNF) (Bennett és mtsai., 1999; Telegina és mtsai., 2019) is.

1.3.1. PACAP és a retina

A PACAP a VIP/secretin/glukagon peptide szupercsaládkhoz tartozik, két természetes formája ismert, a PACAP-38 és a PACAP-27, melyek közül az előbbi előfordulása a gerincesekben jellemzőbb (Miyata és mtsai., 1989; Arimura és Shioda, 1995; Vaudry és mtsai., 2009). Hatását hét transzmembrándoménból álló G-protein kapcsolt VPAC1, VPAC2 és PAC1 receptorokon keresztül képes kifejteni, melyek nagy számban fordulnak elő az idegrendszer különböző területein. Ezek közül a VPAC receptorok VIP-et ugyanolyan affinitással kötnek, mint PACAP-ot, míg a PAC1 receptor PACAP-ot képes nagyobb affinitással megkötni (Vaudry és mtsai., 2000; Laburthe és mtsai., 2007). A kifejtt hatás függ a receptor típusától, a ligand természetétől, az adott szövetről és a fejlettségi állapottól (Filipsson és mtsai., 1998; Vaudry és mtsai., 2000; Basille és mtsai., 2000). Moduláló szerepe széles körben bizonyított mind fiziológiás, mind patológias körülmények között. Részt vesz a neuronok proliferációjában (Matsumoto és mtsai., 2016), differenciációjában és migrációjában (Rivnyak és mtsai., 2018). Ezek mellett összetett védő szereppel is bír, mind antioxidáns (Ohtaki és mtsai., 2010) mind antiapoptotikus (Gasz és mtsai., 2006) és gyulladáscsökkentő (Martinez és mtsai., 2002) hatása is már bizonyított. Számos neurodegeneratív betegség estében vizsgálták és sikeresen igazolták ezeket a védőfunkcióit (Wang és mtsai., 2008; Reglődi és mtsai., 2011; Han és mtsai., 2014a; Han és mtsai., 2014b; Lee és mtsai., 2014).

A retinában a PACAP a GCL egyes sejtestjeiben, illetve az amakrin és horizontális sejtekben fejeződik ki (Izumi és mtsai., 2000; Dénes és mtsai., 2014). A PAC1 receptora az INL-ben és a GCL-ben erősebben, mindamellett a plexiform rétegekben azonban kevésbé mutatkozik meg (Seki és mtsai., 1997). A retina fejlődése során alátámasztották, hogy a PACAP kezelés modulálja a sejthalálózási folyamatokat (Silveira és mtsai., 2002; Nyisztor

és mtsai., 2018), illetve a sejtek proliferációját (Njaine és mtsai., 2010). A retina patológiák esetében is bizonyította komplex védőhatását például diabeteszes retinopáthiában (Szabadfi és mtsai., 2012; Szabadfi és mtsai., 2016), ischemiában (Atlasz és mtsai., 2010; Szabó és mtsai., 2012; Dányádi és mtsai., 2014; Werling és mtsai., 2014), továbbá retina excitotoxicitás modellekben (Kiss és mtsai., 2011).

Az egyes betegség modellekben leírt összetett hatása mellett, igazolták a retina öregedését kísérő funkcionális és strukturális változásokra való befolyásoló hatását is. A PACAP KO egyedekben a korban megegyező kontrolokhoz képest felerősödnek az öregedés által kiváltott szerkezeti változások, mint a ganglion sejtek számának csökkenése, a gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) szintjének növekedése a gliasejtekben, illetve a bipoláris sejtek dentritjeinek ONL-felé való szabálytalan ágazódása (Kovács-Valasek és mtsai., 2017).

1.3.2. Szomatosztatin és a retina

A szomatosztatin (SST) peptidet először a hipotalamuszból izolálták, ezt követően pedig kifejeződését az idegrendszer számos központi, illetve perifériás részén széleskörűen leírták (Brazeau és mtsai., 1973; Delfs és mtsai., 1985).

Az SST esetében is két biológiailag aktív formát tudunk megkülönböztetni (SST-14, SST-28), illetve ez a peptid is több különböző (SST-1, SST-2, SST-3, SST-4, SST-5) hét transzmembrándoménból álló G-protein kapcsolt receptoron keresztül fejti ki pleiotropikus hatását (Günther és mtsai., 2018).

Számos analógja is ismert (pl. octreotide, lanreotide, pasireotide), melyeket humán gyógyászatban már sikeresen alkalmaznak (Gomes-Porras és mtsai., 2020). Jelenlétét a retinában az INL-ben lévő amakrin sejtek, illetve a GCL-ben elhelyezkedő displaced amakrin sejtek esetében írták le (Johnson és mtsai., 2000; Cristiani és mtsai., 2002).

Fontos szerepet játszik a retina homeosztázisának szabályozásában, különböző retinális betegségekben bizonyította már kiemelkedő antiangiogén (Grant és mtsai., 1993) és neuroprotektív hatását (Vasilaki és Thermos, 2003). Expressziójának csökkenése szerepet játszik pl. a diabeteszt kísérő neurodegeneratív folyamatokban a retinában (Carrasco és mtsai., 2007; Hernández és mtsai., 2014). Továbbá, analógjaival (pl. octreotide) együtt bizonyítottan védő hatásúak ischemiában (Cervia és mtsai., 2012; Wang és mtsai., 2015), makuláris ödémában (Kuijpers és mtsai., 1998) és diabeteszes retinopáthiában (Hernández és mtsai., 2013).

2. Célkitűzések

Az öregedés által befolyásolt számos fiziológias folyamat, illetve a retina különös kiszolgáltatottsága ezekkel szemben – pl. korlátozott regenerációs képességéből és magas metabolikus rátájából adódóan - számos fontos és megválaszolendő kérdést felvet a retina öregedésével kapcsolatban.

Publikált szakirodalmi adatok alapján tisztában vagyunk azzal is, hogy az idő múlásával a különböző neuropeptidok elérhető mennyisége a szervezetben csökken, amely fontos résztvevője a különböző szervezet szinten jelentkező károsodásoknak.

Az értekezés bevezetőjében leírtakra alapozva, a dolgozatom célkitűzése, hogy két állatmodell felhasználásával megvizsgálja a retinális öregedés komplex szerkezeti következményeit önmagában, illetve egyes neuropeptidok hosszú idejű hatásának összefüggésében is.

Ennek megfelelően:

1., Vizsgáltuk a retina szerkezeti változásait a normál öregedés során.

Morfometriai és morfológiai analízissel, továbbá immunhisztokémiai és western blot eljárások során alkalmazott különböző sejtspecifikus és szinaptikus protein markerek alkalmazásával azonosítottuk a sejtszinten megjelenő változásokat, melyek az idő múlásával a patkány retinában jelentkeztek.

2., Meg kívántuk ismerni a krónikus PACAP kezelés hatását az SST tartalmú illetve dopaminerg amakrin sejtek denzitására az öregedés során.

Immunhisztokémiai analízissel vizsgáltuk meg transzgenikus egérmodellben, a TH-pozitív és SST pozitív sejtek denzitásának változását krónikus PACAP kezelés hatására az öregedés során. Az öregedést kísérő sejtdenzitás változások befolyásolása mellett, a fellépő esetleges szinergikus kölcsönhatás felismerése is a céljaink közé tartozott.

3. Anyag és módszer

3.1. Kísérleti állatok

Kutatásaink során két öregedés modellt vizsgáltunk. Az egyik modellben Wistar albino patkányokat, míg másokban C57Bl/6JdTdTomato transzgenikus egereket használtunk fel. A transzgenikus egerek a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Orvosi Géntechnológiai Részlegén kerültek előállításra, az ott rendelkezésre álló sst/iresFlpo(Tm3) homozigóta hím X GT(ROSA)26Sor_CAG/FSF_TdTomato (Tm) homozigóta nőstények keresztezésével. Az utód egyedekben piros fluoreszcens jel jelenik meg a szomatosztatin (SST) termelő sejtekben. A kísérleteink kivitelezésében a PTE Munkahelyi Állatetikai Bizottság irányelveit figyelembe vettük (állatkísérletes engedély számok: BA02/2000-15024/2011, PE/EA/488-6/2021).

3.2. A normál öregedés modellben biztosított körülmények

Az azonos alomból származó Wistar albino nőstény patkányokat megegyező és folyamatosan ellenőrzött körülmények között tartottuk (23°C, 12h/12h sötét/világos ciklusok) az eltérő genetikai és környezeti behatások kizárása érdekében. A vizsgálatban megkülönböztettünk négy egymástól elkülönített korcsoportot (5 hónapos, 12 hónapos, 18 hónapos, 24 hónapos). Az adott életkort elérő állatoknál izoflurán bódítást követően, intraperitoneálisan tiopental injekciót alkalmaztunk a túlaltatáshoz, majd eltávolítottuk a szemet és ezt követően a szemszerlegből kipreparáltuk a retinát.

3.3. PACAP injektált öregedés modellben biztosított körülmények

A transzgenikus egerek az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetből származnak és az ottani állatházban kerültek tartásra. Az itt található európai színvonalú Orvosi Géntechnológiai Részleg által biztosított körülmények lehetővé teszik genetikailag módosított egerek tartását és a velük való kísérletek kivitelezését. Az állatok szemének PACAP-al történő intravitreális injektálása is ott valósult meg. Három korcsoportot különítettük el egymástól (6 hónapos, 12 hónapos, 18 hónapos). Az adott életkort elérő

állatoknál izoflurán altatást követően eltávolítottuk a szemet és ezt követően a szemszerlegből kipreparáltuk a retinát.

3.3.1. PACAP kezelés

Az adott korcsoportokon belül megkülönböztettünk kezelt és kontroll állatokat. A kontroll csoport egyedei nem kaptak kezelést a kísérletek során. A kezelt állatok szemét, izoflurán altatás alatt, háromhavonta intravitrealisan injektáltunk. Az első injekciót 3 hónapos korukban kapták így a 6 hónapos 1db, a 12 hónapos 3 db, a 18 hónapos 5 db injekciót kapott. A kezelés során 27G-s tű segítségével átszúrtuk a sclerát majd ezt követően 33G-s tűvel ellátott Hamilton fecskendő (10 μ l) segítségével injektáltunk az egyik szemükbe PACAP1-38-at (1.5 μ l 0,3 μ g/ μ l (100 pmol)) a másik szemükbe pedig ugyanakkora mennyiségben fiziológiás sóoldatot (0,9% NaCl). A fertőzés megelőzése céljából az injektálást követően utókezeltük a szemüket antibiotikus kenőccsel (Cavasan, Produlab Pharma B.V.) .

3.4.Szövetteni eljárások

3.4.1. Morfológiai és morfometriai vizsgálat

A Wistar patkány modellben a szemek kipreparálását követően, sztereomikroszkóp (Nikon SMZ645, Németország) segítségével a szaruhártyát, a szemlencsét és az üvegtestet eltávolítottuk. A szemszerleg preparátumot másnapig 1%-os glutáraldehydes-PFA-ban (4%-os oldatot készítettünk foszfátpufferben (pH 7,4) oldott PFA-val, amelyhez 25%-os glutáraldehydet adtunk) fixáltuk. Ezt három napos rutin szövetteni protokolnak megfelelő eljárás követte. Első nap 6 x 10 percig mostuk 0,1 M-os foszfát-pufferben (PB), majd 1x10 percig felszálló alkoholsorozatban (30%, 50%) dehidráltuk, ezt követően 12 órán át 70%-os alkoholban tároltuk 4°C-on. A második napon folytattuk a víztelenítést, 1x10 percig 90%-os, majd 2x20 percig abszolút alkoholban (Sigma). Ezt követően 2x4 percig propilén-oxidban, majd 30 percig gyanta és propilén-oxid (Spektrum3D) 1:1 arányú keverékében inkubáltuk. Ezután négykomponensből álló Durcupan (Fluka) gyantában (komponensek: 'A' 12,2g; 'B' 10g; 'C' 0,3g; 'D' 0,5 g) hagytuk egy éjszakán át 4°C-on. A harmadik napon a preparátumokat Durcupan gyanta-blokkokba ágyasztuk, amiket minimum 36 órán át, 56°C-on hagytunk polimerizálódni. A kész blokkokból félvékony metszeteket (1-2 μ m)

készítettünk ultramikrotómmal (LEICA EM UC7), ezután tárgylemezre helyezve 1%-os toluidinkékkel (Sigma) festettük és DPX (Fluka) fedőanyaggal lefedtük. A retina metszeteiről fotókat készítettünk Nikon Eclipse 80i mikroszkóphoz kapcsolt CCD kamera segítségével a morfológiai illetve morfometriai analízist is végeztünk. A SPOT Basic program (Spot Basic 4.04) alkalmazásával több paramétert is vizsgáltunk: a külső és a belső határoló hártya (OLM-ILM) távolságát, az ONL, az OPL, az INL, az IPL vastagságát, valamint a csap terminálisok számát az OPL-ben és a GCL-ben meglévő ganglion sejtek számát 100 μm -ként. Az értékelés során minden korosztályból 4 állatot használtunk fel és 15 látóteret vizsgáltunk retinánként. A retina vizsgálatának alapkritériumai közé tartozott, hogy az INL négy sejt sorban a GCL pedig egy sejt sorban jelenjen meg a metszeten.

3.5. Immunhisztokémiai eljárások

3.5.1. Normál öregedés modellben

A metszetek elkészítése mindkét állatmodellben azonos módon történt. A kireparált retinát 2 órás 4%-os PFA-s fixálást követően 6x10 percig mostuk 0,2 M-os NaCl-os foszfát pufferben (PBS), majd süllyedésig inkubáltuk 15%-os szacharóz-oldatban (Sigma). Ezt követően 30%-os szacharóz-PBS-oldatban tároltuk 4°C-on a cryostáttal történő metszésig. A retina preparátumokat cryostat-médiumba (Shandon Cyromatrix, Thermo Scientific) ágyazva, fagyasztva (-20°C) metszettük le cryostat készülék segítségével (Leica, Németország). A 10-12 μm -es metszeteket SuperFrost Plus (VWR) tárgylemezre helyeztük. Az immunhisztokémiai eljárás megkezdésekor a metszeteket rehidráltuk TritonX-PBS pufferrel 6x5 percig, majd Normál Kecske Szérummal (Normal Goat Serum - NGS) blokkoltuk 1 órát. A patkány retinánál több eltérő primer antitestet is alkalmaztunk. A primer antitestekre specifikus szekunder antitestként Alexa Fluor „488” és „568” fluorescens markereket használtunk. Az alkalmazott primer, szekunder antitesteket és a próbát a 2. Táblázat tartalmazza. Az antitestekkel való munkavégzést megelőzően negatív kontrolokat készítettünk, amelyeknél vagy a primer vagy pedig a szekunder antitest kihagyásával ellenőriztük, hogy tapasztalunk-e specifikus kötődést.

Primer antitest neve	Gazdaszervezet	Hígítás IHK-ban	Hígítás WB-ban	Gyártó
anti-Brn3a (brain-specific homeobox/POU domain protein 3A)	egér	1:50	-	Santa-Cruz
anti-calbindin	egér	1:1000	1:1000	Sigma
anti-PKCα (protein kináz C alfa)	egér	1:200	1:200	Santa-Cruz
anti-TH (tirozin-hidroxiláz)	egér	1:1000	1:500	Milipore
anti-parvalbumin	egér	1:1000	1:200	Sigma
anti-calretinin	egér	1:1000	1:1000	Swant
anti-vGLUT1 (vezikuláris glutamát transzporter 1)	nyúl	1:500	1:1000	Abcam
anti-GFAP (gliafibrilláris savas fehérje)	nyúl	1:500	1:1000	Sigma
anti-GAPDH (gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz)	nyúl	-	1:10000	Sigma
PNA (peanut agglutinin)(FITC konjugált)*	-	1:1000	-	VectorLab
Szekunder antitest neve				
anti-egér AlexaFluor 488	kecske	1:1000	-	Life Technologies
anti-nyúl AlexaFluor 488	kecske	1:1000	-	Life Technologies
anti-nyúl AlexaFluor 568	kecske	1:1000	-	Life Technologies
anti-egér IgG HRP konjugált	kecske	-	1:10000	Sigma
anti-nyúl IgG HRP konjugált	kecske	-	1:10000	Life Technologies

*2. Táblázat A normál öregedés modell immunhisztokémiai (IHK) és western blot (WB) kísérletei során alkalmazott primer és szekunder antitestek, próbák. A *-al*

jelölt Anti-Peanut Agglutinin nem tartozik a primer antitestek közé, FITC-jelölt csap fotoreceptor specifikus próba.

3.5.2. Transzgenikus egérmodellben

A metszetek elkészítése itt is a fent leírt protokoll alapján történt. A transzgenikus egér modellünk validálása érdekében a retina metszeteken szomatosztatin illetve tirozin-hidroxiláz primer antitestet használtunk. A primer antitestre specifikus szekunder antitestként Alexa Fluor „488” fluorescens antitestet alkalmaztunk. A primer és szekunder antitesteket a 3. Táblázat tartalmazza.

Primer antitest neve	Gazdaszervezet	Hígítás	Gyártó
anti-SST	nyúl	1:1000	Biomedicals
anti-TH	nyúl	1:1000	Abcam
Szekunder antitest neve			
anti-nyúl AlexaFluor 488	kecske	1:1000	Life Technologies
anti-nyúl AlexaFluor 488	kecske	1:1000	Thermo Fischer

3. Táblázat A transzgenikus egér modellben alkalmazott primer és szekunder antitestek.

A transzgenikus egér retina teljes (wholemout) preparátumok esetében 2 órás 4%-os PFA fixálást követően sztereomikroszkóp alatt, PBS pufferes közegben az ínhártyát a retináról eltávolítottuk. Ezután 6 x 30 percig PBS pufferben mostuk majd 1%-os TritonX-ABS-ben blokkoltuk egy órán át. A wholemount preparátumokat 4°C-on anti-TH antitestel inkubáltuk 72 órán keresztül rázógépen. Utána a preparátumokat 6 x 5 percig mostuk 1%-os TritonX-PBS-ben. Ezután Alexa Fluor „488” szekunder antitesttel 24 órán keresztül 4°C-on inkubáltuk rázógépen. Az alkalmazott primer és szekunder antitesteket és a 3. táblázat tartalmazza.

A metszeteket és a wholemount preparátumokat a szekunder antitesttel való inkubálást követően 3x5 perces 0,2 M-os PBS-es mostuk, majd Fluoromount-G (Southern Biotech) fedőanyaggal fedtük le.

A fotókat Olympus IX81 invers platform (Olympus, Japán) típusú mikroszkóppal, Olympus Fluorview FV-1000 konfokális rendszer segítségével készítettük el a normál és a transzgenikus öregedés modellben is. A metszetek esetében 40-szeres, a wholemount esetében 20-szoros objektív nagyítással készültek a képek. Az AlexaFluor 488 esetében 520 nm emissziós hullámhosszon, a lézerintenzitás 5% -os, AlexaFluor 568 esetében pedig 543nm volt az emissziós hullámhossz és 22 % -os lézerintenzitást alkalmaztunk. Az alkalmazott rendszer lehetővé tette, hogy a szöveten belül többféle jelölést is képesek voltunk egyszerre megjeleníteni és esetlegesen előforduló együttes megjelenésüket azonosítani. A képeken utólagos módosításként csak a különböző feliratok, számozások és a sejteket jelölő nyilak/nyílhegyek kerültek feltüntetésre, illetve ezt követően a képeket táblázatba rendeztük. A sejtyszámolás wholemount preparátumokon Fiji is just ImageJ 1.52p program segítségével történt.

3.6. Western blot analízis

A patkány retinákat RIPA pufferben homogenizáltuk 3 percig majd 13 000 rpm-en centrifugáltuk 30 percig 4°C-on. Ezután a fehérje koncentrációt BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific) felhasználásával (B komponens:A komponens, 1:50) spektrofotométer segítségével meghatároztuk standardként BSA-t használva. A fehérje elektroforézis 4-12%- NuPage SDS poliakrilamid gélen történt és utána PVDF membránra (Bio-Rad) transzferáltuk a fehérjéket. A transzfer után szárítottuk a membránt szobahőmérsékleten és ezt követően a membránt blokkoló oldattal (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,1 Tween-20, 5% tejpor, 1%BSA) inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten rázógépen. A membránt ezután a blokkoló oldatban hígított primer antitesttel inkubáltuk (calbindin (1:1000, monoklonális anti-egér, Sigma); calretinin (1:1000, poliklonális, anti-nyúl, Swant); parvalbumin (1:1000, monoklonális anti-egér, Sigma); PKC α (1:200, monoklonális anti-egér, Santa Cruz); TH (1:1000, monoklonális anti-egér, Millipore); GFAP (1:500, monoklonális anti-nyúl, Sigma); VGLUT1 (1:500, poliklonális, anti-nyúl, Abcam); GAPDH; (1:10000; anti-nyúl, Sigma) másnapig 4°C-on rázógépen. A normalizációs kontrollként alkalmazott GAPDH-t a primer antitestek hígításához használt

blokkoló oldathoz adtuk. Másnap TBST pufferrel (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20) mostuk 3 x 10 percig. Ezt követte a tormaperoxidáz konjugált szekunder antitesttel (anti-egér,1:10000; anti-nyúl, 1:10000) való inkubálás 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten, rázógépen. A detektáláshoz WesternBright ECL HRP substrate kitet használtunk (Biomedica) és Chemi DOC System (Bio-Rad, Budapest) segítségével képfelvételeket készítettünk. A különböző fehérjék esetében megjelenő band-ek optikai denzitása a 12 hónapos korosztály értékeire normalizáltuk, a relatív fehérje expressziót belső kontrollként alkalmazott GAPDH segítségével határoztuk meg.

3.7. Statisztikai analízis

A morfolometriai vizsgálatok illetve a sejtdenzitás meghatározása során, a mért adatok között megjelenő különbségek szignifikanciájának meghatározásához statisztikai analízist végeztünk. Egy utas ANOVA tesztet alkalmaztunk, amit Tukey post-hoc teszt követett amelyet GraphPad Prism7 program segítségével végeztük el. Szignifikancia szintként $p < 0,05$ értéket határoztuk meg a különböző csoportok összehasonlítása során.

4. Eredmények

4.1. Normál öregedés modell

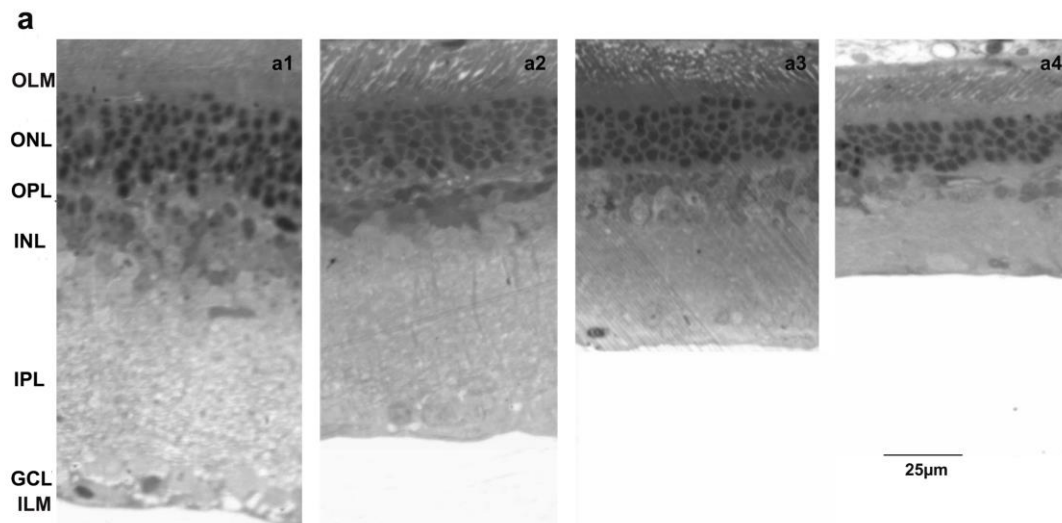
A normál öregedést bemutató állatmodellek lehetőséget teremtenek az idő múlásával jelentkező fiziológiás folyamatok megváltozásának, illetve az ezek háttérében álló/kísérő lehetséges struktúrális változásoknak a nyomonkövetésére. Alkalmazásukkal megismerhetjük a homeosztázis megváltozásával létrejött olyan normál öregedési folyamatokat, ahol még a különböző patológiás mechanizmusok nincsenek jelen.

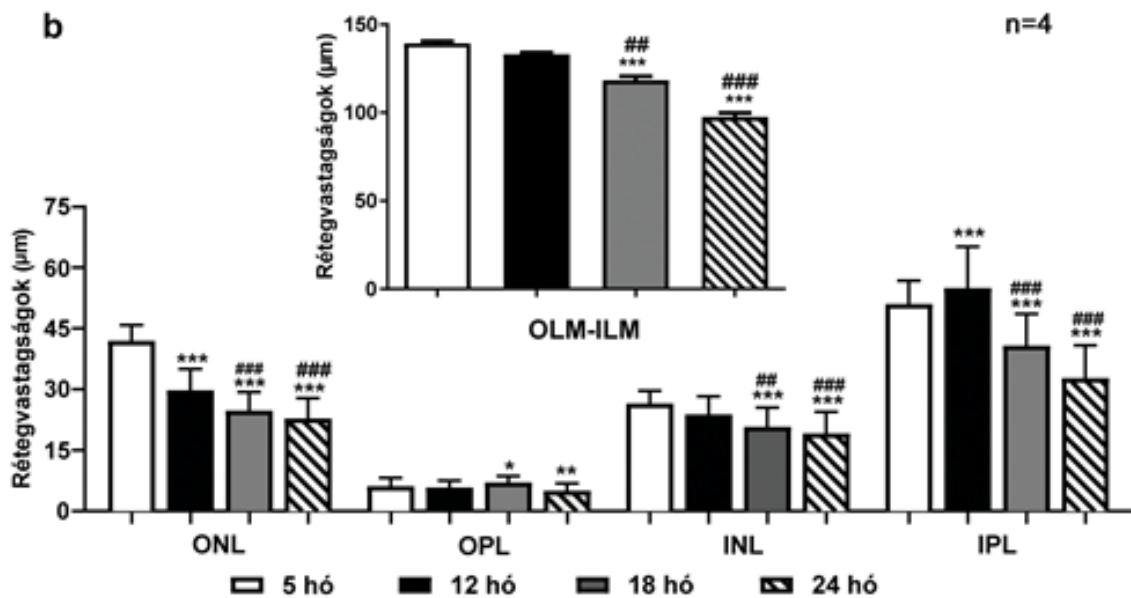
A retina réteges felépítésének köszönhetően, rendkívül jó modellként szolgált arra, hogy jobban megismerjük a központi idegrendszerben lejátszódó komplex folyamatokat.

4.1.1. Morfológiai és morfometriai vizsgálatok

Az öregedés folyamata, mind a retinális sejtrétegek vastagságában mind pedig az azokat alkotó sejtek denzitásában is változást eredményezett (5. Ábra).

Az idő múlásával a retina rétegeinek vékonyodása volt megfigyelhető, különös tekintettel az IPL-re. A magvas sejtrétegek közül az ONL-ben volt a legjelentősebb a vastagság csökkenése (5. Ábra a, b).

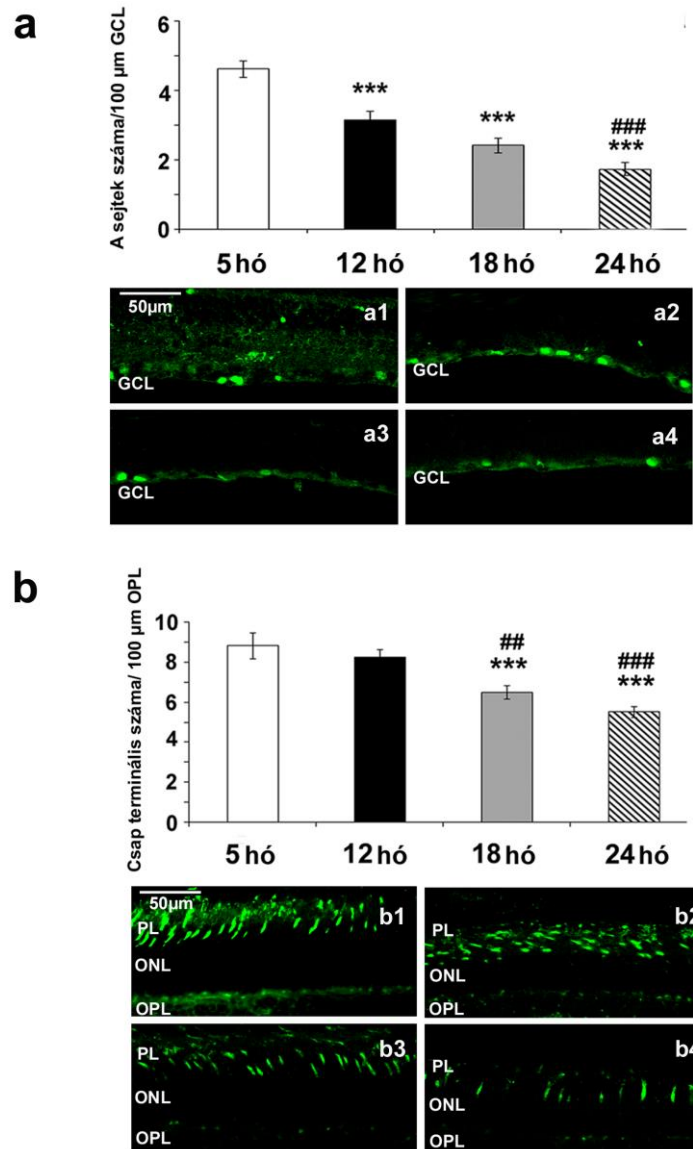




5. *Ábra* A retinális rétegek megjelenésének és sejtdenzitásának változása a különböző korcsoportokban. a, patkány retinából készült szövettani metszetek 5 hónapos (a1), 12 hónapos (a2), 18 hónapos (a3), 24 hónapos (a4) állatokból. b., rétegvastagságok alakulása 5-, 12-, 18- 24 hónapos állatokban. Rövidítések: OLM-külső határoló hártya, ONL-belső magvas réteg, OPL-külső rostos réteg, INL-belső nukleáris réteg, IPL-külső rostos réteg, GCL- ganglion sejtek rétege, ILM-belső határoló hártya. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; az 5 hónapos korcsoportozhoz hasonlítva. ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ a 12 hónapos korcsoportozhoz hasonlítva. A rövidítések a többi *Ábra* esetében is az itt megjelölt jelentéssel bírnak.

A **ganglion sejtek** számában fellépő változások nyomonkövetésére **anti-Brn3a** (brain-specific homeobox/POU domain protein 3A) antitestet használtunk. A Brn3a, mint transzkripciós faktor az idegrendszer különböző területein expresszálódik és kiemelkedő szerepet játszik a ganglion sejtek sejt-specifikus azonosításában és kvantifikálásában a retinában (Xiang és mtsai., 1995; Nadal-Nicolás és mtsai., 2009; Nadal-Nicolás és mtsai., 2012). A GCL-ben a ganglion sejtek fokozatos csökkenését tapasztaltuk az öregedés során (6. *Ábra* a).

A **csapok** számát **peanut agglutinin (PNA)** segítségével vizsgáltuk, mely lektin szelektíven kötődik a fotoreceptorok ezen szubpopulációjához (Blanks és mtsai., 1983; Blanks és mtsai., 1984). Az ONL-ben a csapok számának csökkenését észleltük az idő előrehaladtával (6. Ábra b).



6. Ábra A, *Brn3a* pozitív sejtek denzitása 5 hónapos (a1), 12 hónapos (a2), 18 hónapos (a3), 24 hónapos (a4) állatok retinájában. d., PNA pozitív csap terminálisok denzitása 5 hónapos (b1), 12 hónapos (b2), 18 hónapos (b3), 24 hónapos (b4) állatok retinájában.

Rövidítések: ONL - külső magvas réteg, OPL-külső rostos réteg, INL - belső magvas réteg, IPL - belső rostos réteg, GCL- ganglion sejtek rétege, ILM-belső határoló hártya.

** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; az 5 hónapos korcsoporthoz hasonlítva. ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ a 12 hónapos korcsoporthoz hasonlítva*

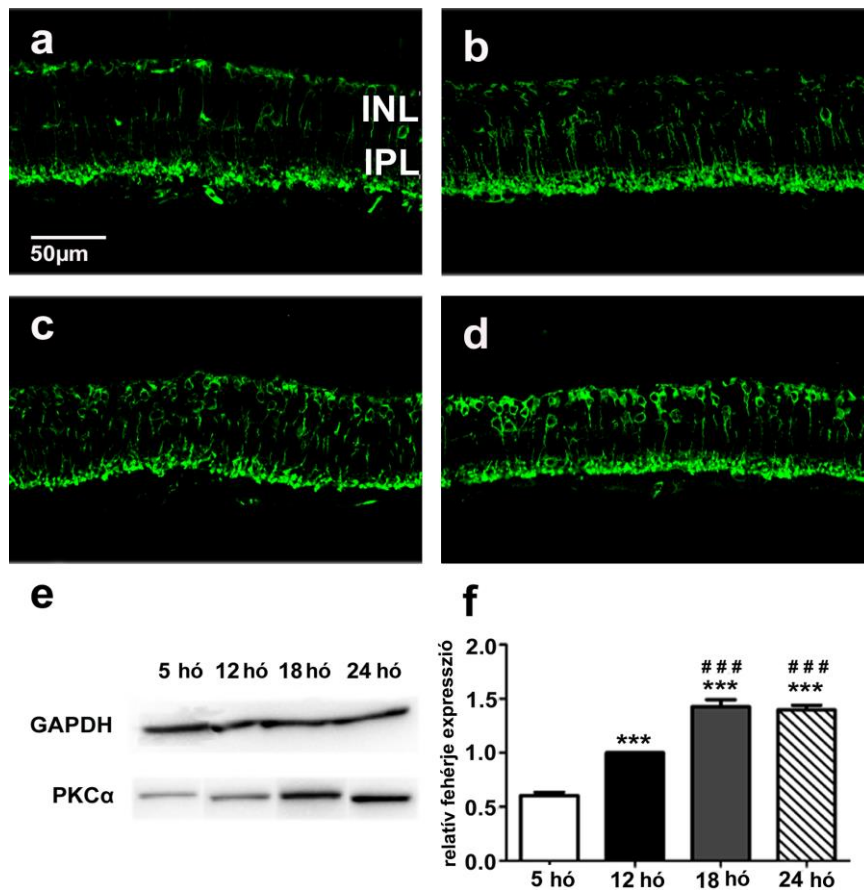
A réteges szerkezet megjelenésében bekövetkező módosulások háttérében álló sejtszintű eltérések feltárása érdekében, azonos sejt-specifikus markereket alkalmaztunk minden korosztálynál. A továbbiakban ezen markerek leírata a retinában való elhelyezkedésük sorrendjében, kívülről befelé haladva került rendszerezésre.

4.1.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok

4.1.2.1. Protein kináz C alfa

Az idő múlásával a **pálcika bipoláris sejtek** megjelenésében bekövetkező változások nyomonkövetésére **anti-protein kináz C alfa (PKC α)** antitestet alkalmaztunk. PKC α szelektíven jelöli a pálcika bipoláris sejteket, amelyet patkány és más rágcsálók retináiban is bizonyítottak (Osborne és mtsai., 1991; Euler és Wassle, 1995).

Az OPL-ben a dentritek, az INL-ben a sejttetek illetve az IPL-GCL határán lévő axon terminálisok mutattak immunpozitivitást (7. Ábra a-d). Kezdetben a fiatalabb korosztály retináiban a jelintenzitás gyengébb volt (7. Ábra a, b) majd szinte változatlan maradt az utolsó két korcsoportban (7. Ábra c, d). A Western blot analízis eredménye is megerősítette ezt a változást (7. Ábra e, f).



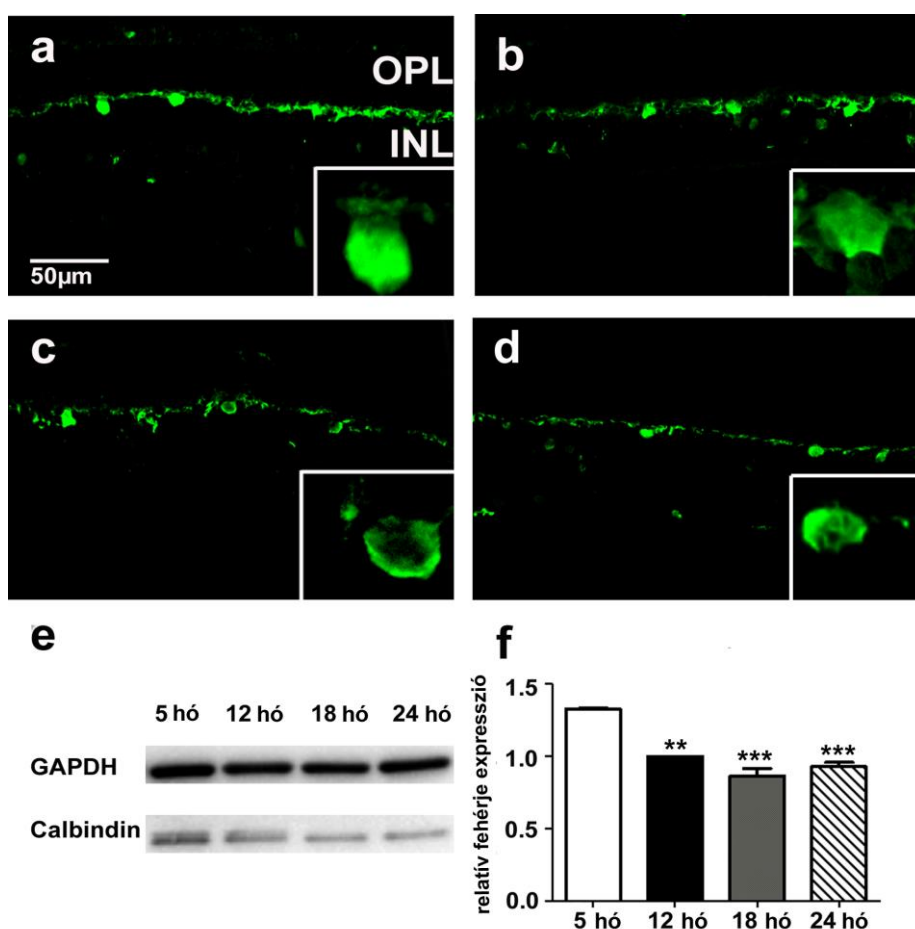
*7. Ábra PKCα immunreaktivitás és Western blot analízis a különböző korcsoportok retináiban. Anti-PKCα immunjelölés az 5 hónapos (a), 12 hónapos (b), 18 hónapos (c), 24 hónapos (d) retinákban. Western blot analízis eredménye (e-f). *** $p < 0,001$ az 5 hónapos korcsoporthoz hasonlítva. ### $p < 0,001$ a 12 hónapos korcsoporthoz hasonlítva.*

4.1.2.2. Calbindin

A korcsoportokban három különböző kalciumkötő fehérje (calbindin, parvalbumin, calretinin) megnyilvánulását is vizsgáltuk, melyek expressziójára az öregedés folyamata illetve különböző patológiás folyamatok is igazoltan befolyással lehetnek (Papazafiri és mtsai., 1995; Kwon és mtsai., 2005). A fent említett proteinek az EF-hand fehérjék családjába tartoznak, és elengedhetetlen szerepet játszanak a Ca-homeosztázis szabályozásában. A szabályozó szerepük központi idegrendszer számos területén érvényesül, és az emlős retina neuronjaiban is jelen vannak (Celio és mtsai., 1990;

Baimbridge és mtsai., 1992; Hamano és mtsai., 1990). Sejtspecifikus megjelenésüknek köszönhetően pedig kiváló markerként alkalmazhatóak a bekövetkező, sejtpopulációkat érintő változások morfológiai megfigyelésére (Wässle és mtsai., 1993; Wässle és mtsai., 1995; Völgyi és mtsai., 1997; Goebel és mtsai., 1997).

A **calbindin** fehérje egy **horizontális sejt** marker, amely a patkány retinában az amakrin és a ganglion sejtek szubpopulációiban is mutat expressziót (Rabié és mtsai., 1985; Pasteels és mtsai., 1990; Hamano és mtsai., 1990; Sanna és mtsai., 1990; Chun és mtsai., 1999; Mojumder és mtsai., 2008). A horizontális sejtek olyan GABAerg interneuronok, melyeknek nagyméretű sejttestjeik az INL-ben helyezkednek el és dendritjeikkel az OPL-felé nyúlnak. Ezen sejtek a leírtaknak megfelelő megjelenést mutattak a retina metszeteinken. A sejttestjeik és nyúlványaik az OPL-ben erős anti-calbindin jelölődést mutattak, amelynek intenzitása az idő előrehaladtával csökkent (8. Ábra a-d). A csökkenő expressziót a Western blot eredményeink is megerősítették (8. Ábra e, f).



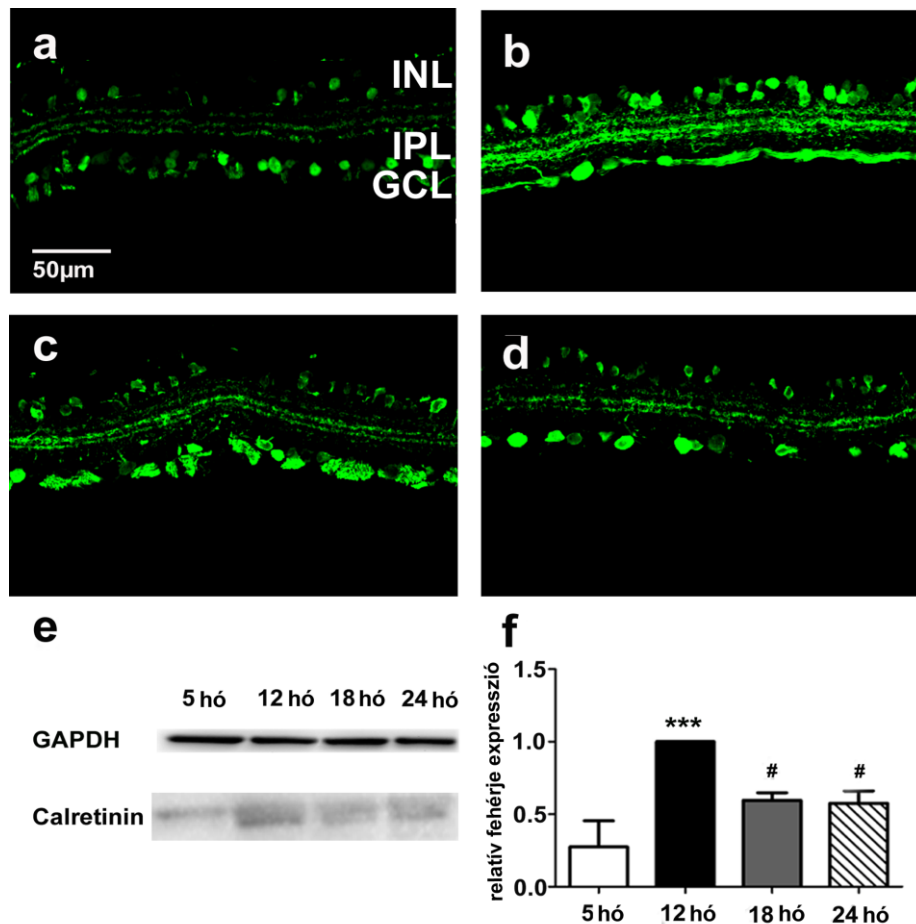
8. *Ábra* Calbindin immunreaktivitás a horizontális sejtekben és Western blot analízis eredménye a különböző korcsoportok retináiban. Anti-calbindin immunjelölés az 5

hónapos (a), 12 hónapos (b), 18 hónapos (c), 24 hónapos (d) retinákban, a nagyításokon a horizontális sejtek láthatóak. Western blot analízis eredménye (e-f).

*Rövidítések: GAPDH- gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ az 5 hónapos korcsoporthoz hasonlítva.*

4.1.2.3. Calretinin

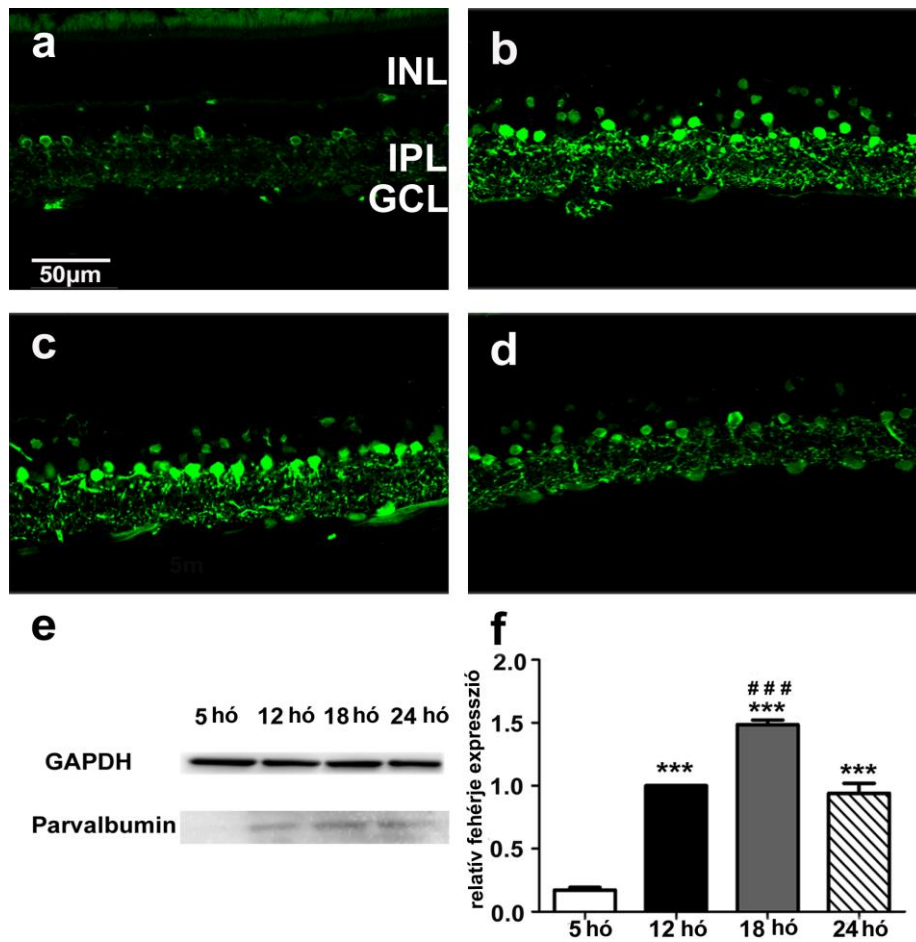
A patkány retinában a **calretinin** az eddigi szakirodalmi eredmények alapján, a **ganglion és az amakrin sejtek** esetében is megnyilvánul (Pasteels és mtsai., 1990; Mojumder és mtsai., 2008). Az anti-calretinin antitest az INL-ben néhány amakrin sejtben illetve a GCL sejtjeiben mutatott expressziót (9. Ábra a-d). Korábbi kutatások eredményei, mind a ganglion mind pedig a displaced amakrin sejtek esetében írtak le calretinin pozitivitást patkány retina GCL rétegében (Gabriel és Witkowsky, 1998). Az IPL-ben három egymástól elkülönülő sublaminában jelent meg a calretinin fehérje. Az expressziója gyengébben nyilvánult meg az 5 hónapos retinákban (9. Ábra a), mint a későbbi korosztályokban (9. Ábra b-d). A jelölés erőssége az egy éves korcsoportban volt a legmagasabb, mely tendencia a Western blot eredményein is nyomon követhető (9. Ábra e, f).



9. *Ábra* Calretinin immunreaktivitás és a Western blot analízis eredménye a különböző korcsoportok retináiban. Anti-calretinin immunjelölés az 5 hónapos (a), 12 hónapos (b), 18 hónapos (c), 24 hónapos (d) retinákban, . Western blot analízis eredménye (e-f). *** $p < 0,001$ az 5 hónapos korcsoporthoz hasonlítva. # $p < 0,05$ a 12 hónapos korcsoporthoz hasonlítva.

4.1.2.4. Parvalbumin

Parvalbumin immunreaktivitást az AII típusú **amakrin sejtek** esetében, illetve a GCL-ben a **ganglion setjek** és a displaced amakrin sejtekben írtak le eddig a patkány retinában (Hamano és mtsai., 1990; Sanna és mtsai., 1990; Chun és mtsai., 1993; Wassle és mtsai., 1993). Modellünkben parvalbumin pozitívnak bizonyultak az amakrin sejtek minden korcsoportban, illetve néhány ganglion sejt is jelölődést mutatott (10. *Ábra* a-d). A jelölés intenzitása kezdetben növekedett (10. *Ábra* a-c) majd pedig lecsökkent a legidősebb korcsoportban (10. *Ábra* d). A protein expresszió vizsgálatának eredménye is alátámasztotta ezt a jelenséget (10. *Ábra* e, f).

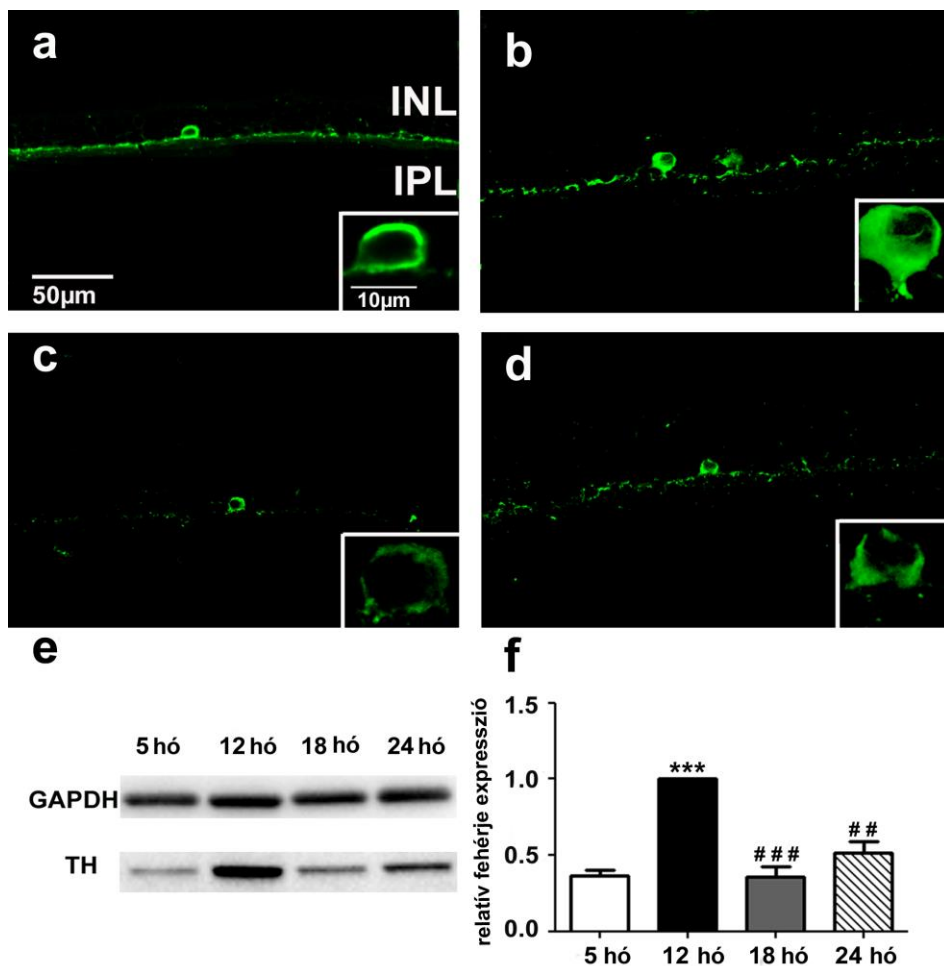


*10. Ábra Parvalbumin immunreaktivitás és Western blot analízis a különböző korcsoportok retináiban. Anti-parvalbumin immunjelölés az 5 hónapos (a), 12 hónapos (b), 18 hónapos (c), 24 hónapos (d) retinákban. Western blot analízis eredménye (e-f). *** $p < 0,001$ az 5 hónapos korcsoporthoz hasonlítva. ### $p < 0,001$ a 12 hónapos korcsoporthoz hasonlítva.*

4.1.2.5. Tirozin-hidroxiláz

A kalcium-kötő fehérjék mellett, a **dopaminerg amakrin sejtek** megjelenésében bekövetkező esetleges változások megnyilvánulására is kíváncsiak voltunk, melyet **anti-tirozin-hidroxiláz (TH)** antitest segítségével vizsgáltunk. A TH a patkány retinában először az amakrin sejtekben került leírásra, amely sejtekről később igazolódott, hogy dopaminerg (Nguyen-Legros és mtsai., 1983; Versaux-Botteri és mtsai., 1986). Ezek az amakrin sejtek kiterjedt, sűrű nyúlványrendszert hoznak létre, nagyméretű sejttestjeik az INL-ben, nyúlványaik az INL és IPL határán találhatók. A sejttestjeikben megtalálható a katekolamin transzmitterek közé tartozó dopamin, illetve annak szintéziséhez elengedhetetlen kulcsenzim a TH (Dacey és mtsai., 1990). Megjelenése az általunk vizsgált

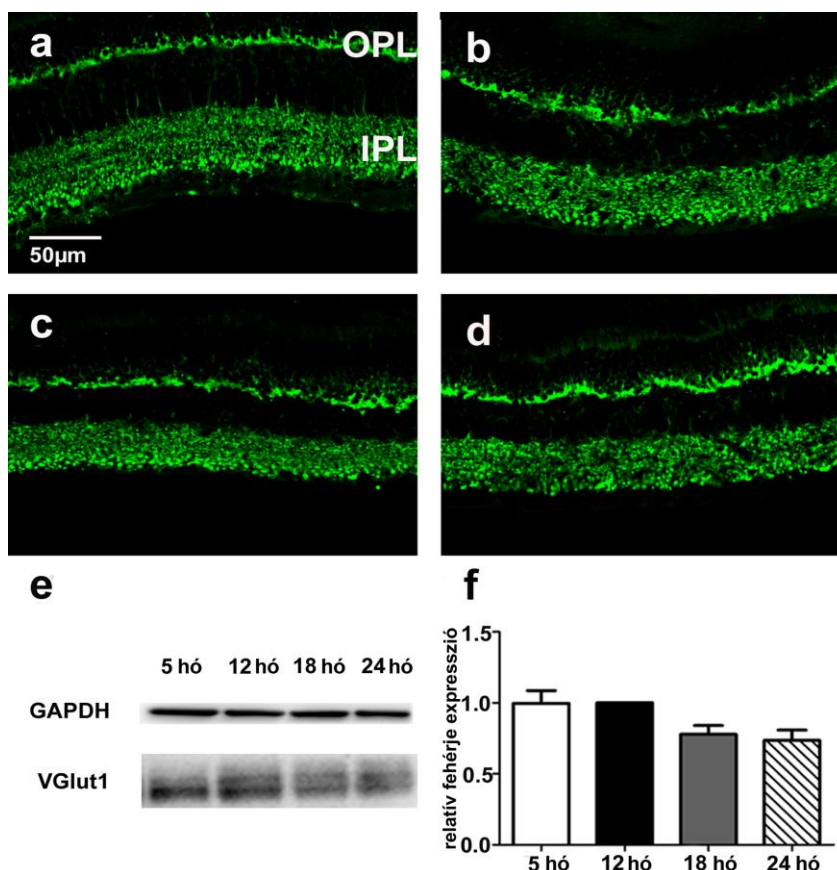
retina metszetek esetében is fentebb leírt jellegzetességeket mutatta. Az öregedéssel kísérletünkben a TH expressziója az egyéves korosztályban érte el a maximumát (11. Ábra b) majd ezt követően csökkent (11. Ábra c-d). A Western blot eredménye is megerősítette ezt a jelenséget (11. Ábra e, f).



*11. Ábra TH immunreaktivitás a dopaminerg amakrin sejtekben és a Western blot analízis eredménye a különböző korcsoportok retináiban. Anti-TH immunjelölés az 5 hónapos (a), 12 hónapos (b), 18 hónapos (c), 24 hónapos (d) retinákban. Western blot analízis eredménye (e-f). *** $p < 0,001$ az 5 hónapos korcsoportéhoz hasonlítva. ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ a 12 hónapos korcsoportéhoz hasonlítva.*

4.1.2.6. Vezikuláris glutamát transzporter-1

A glutamát az egyik legjelentősebb neurotranszmitter az idegrendszernek, amelynek a vezikulákba való csomagolásában a vezikuláris glutamát transzporterek (vGLUT) vesznek részt a szinaptikus végződésekben. A patkány retinában a **fotoceptor terminálisokban**, továbbá az IPL teljes területén jelenik meg (Johnson és mtsai., 2003; Horsburgh és Sefton, 1987). A **vGLUT1** az egyik legkiemelkedőbb résztvevője ennek a folyamatnak, melynek megnyilvánulására- előzetes irodalmi adatok alapján- az öregedés folyamata hatással lehet (Szabadfi és mtsai., 2015; Kovács-Valasek és mtsai., 2017). Vizsgálataink során az expressziója csökkenő tendenciát mutatott az öregedés során, amelyet mind immunhisztokémia mind pedig a Western blot analízis során kimutattunk (12. Ábra a-f).

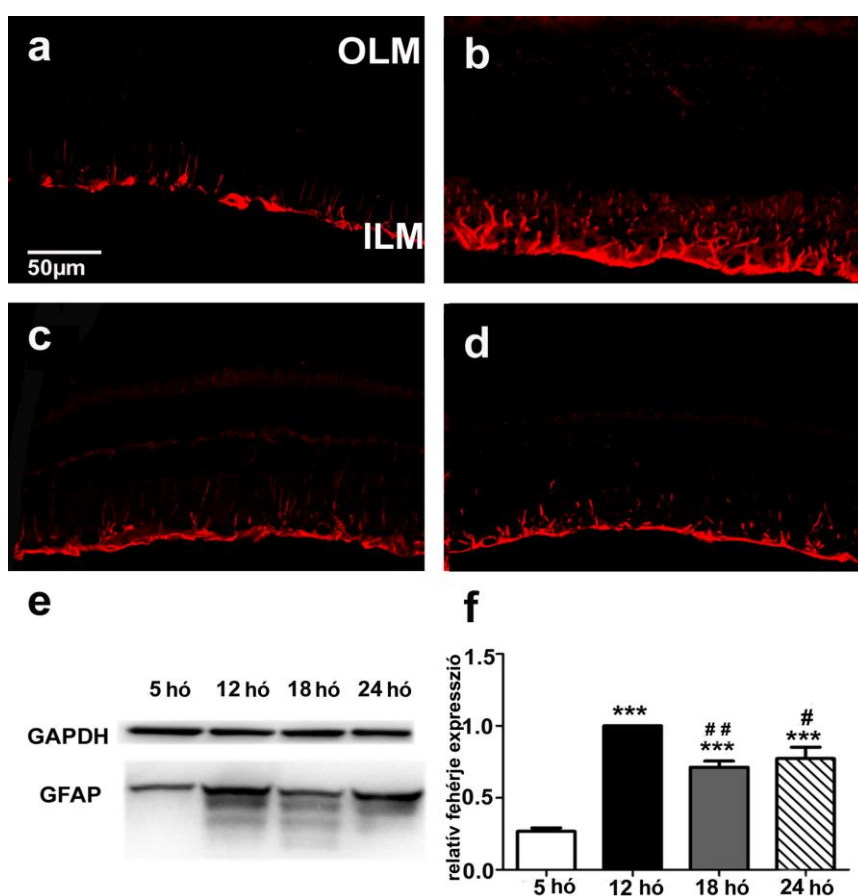


12. Ábra vGLUT1 immunreaktivitás és a Western blot analízis eredménye a különböző korcsoportok retináiban. Anti-vGLUT1 immunjelölés az 5 hónapos (a), 12 hónapos (b), 18 hónapos (c), 24 hónapos (d) retinákban. Western blot analízis eredménye (e-f).

4.1.2.7. Gliális fibrilláris savas fehérje

A gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) patkány retinában a Müller sejtek végtalpaiban került leírásra (Bignami és Dahl, 1979). A Müller sejteket érő stressz hatására a GFAP- mint aspecifikus metabolikus stresszszignál fehérje - expressziója megváltozik, melyet a retina öregedése, illetve különböző retinális kórképek (pl. diabeteszes retinopátia, ischemia), vizsgálata során is tapasztaltak (Mizutani és mtsai., 1998; Wu és mtsai., 2003; Lundkvist és mtsai., 2004; Atlasz és mtsai., 2010; Szabadfi és mtsai., 2015).

Kísérletünkben a GFAP is expresszióváltozást mutatott a retina öregedése során. Kezdetben alacsony (13. Ábra a), majd az egyéves korosztályban (13. Ábra b) már magasabb expresszióval jelentkezett, amely idősebb korcsoportokban ismét lecsökkent (13. Ábra c, d). A Western blot analízis eredménye is ezt a tendenciát mutatta, ahol a GFAP izoformák számában bekövetkező csökkenés is megfigyelhető volt az öregedéssel (13. Ábra e, f).



13. Ábra GFAP immunreaktivitás a glia sejtekben és a Western blot analízis eredménye a különböző korcsoportok retináiban. Anti-GFAP immunjelölés az 5 hónapos (a), 12

*hónapos (b), 18 hónapos (c), 24 hónapos (d) retinákban. Western blot analízis eredménye (e-f). *** $p < 0,001$ az 5 hónapos korcsoporthoz hasonlítva. # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ a 12 hónapos korcsoporthoz hasonlítva.*

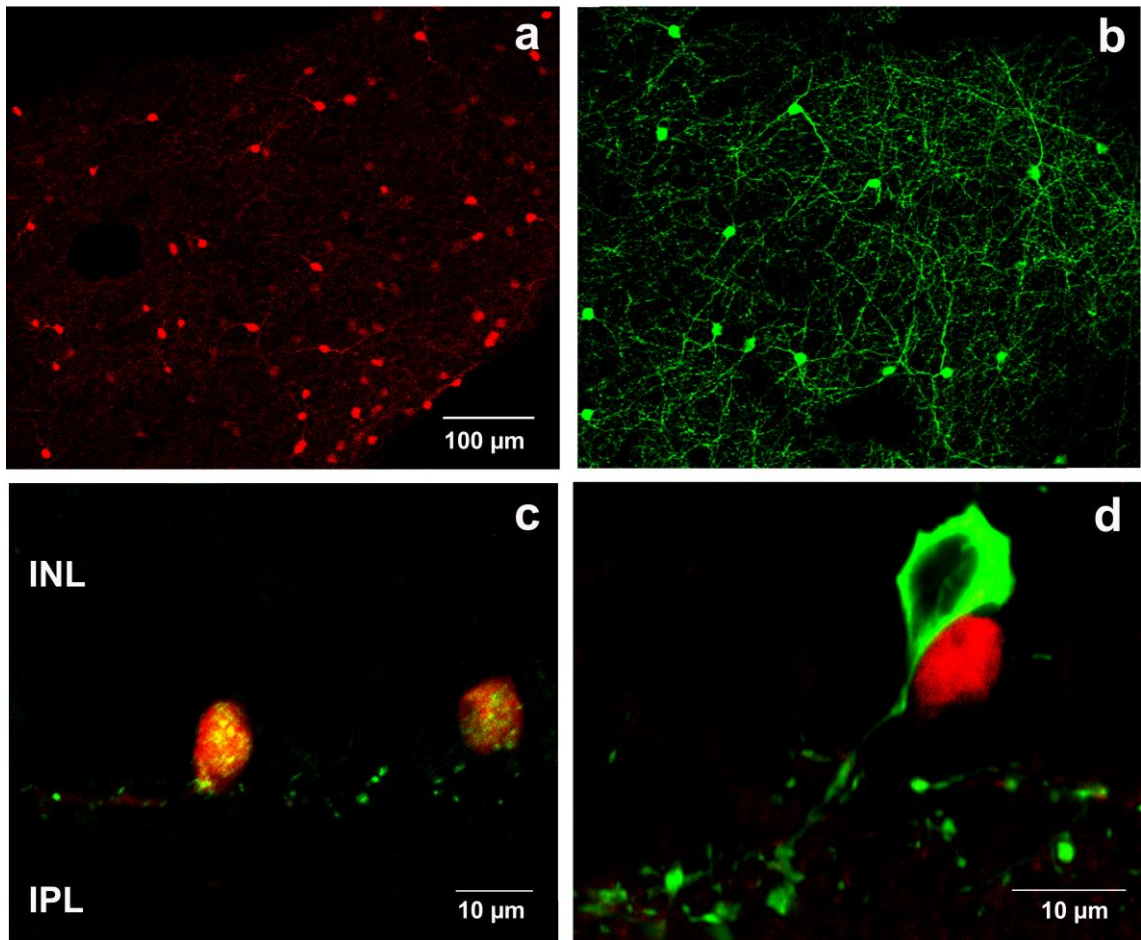
4.2 A krónikus PACAP kezelés hatása transzgenikus egér retina öregedésére

4.2.1 A transzgenikus egérmodell validálása

Az általunk alkalmazott transzgenikus kísérleti állatokat SST/iresFlpo (Tm3) és GT(ROSA)26Sor_CAG/FSF_TdTomato egértörzsek keresztezéséből hozták létre a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Orvosi Géntechnológiai (ORG) részlegében. Az így keletkezett utód egyedek szervezetében piros fluoreszcens jel jelentkezik a szomatosztatin (SST) termelő sejtekben, mely jelölőrendszer egy sejt- illetve szignálmolekula specifikus monitoringot tesz lehetővé egy olyan génkonstrukció felhasználásával, amelynek megbízhatóságát előzetes irodalmi adatok is megerősítik (Sylwestrak és Ghosh, 2012).

Kísérleteink során különös figyelemmel kellett lennünk a sterilitásra nem csupán az intravitreális kezelések kivitelezése során, hanem az állatházi előírások szigorú betartásakor is. Az általunk vásárolt transzgenikus egereket a KOKI ORG Transzgenikus Egységében állították elő, majd pedig az Állattechnológiai Egységben az előírásoknak megfelelő higiéniai körülmények között, SPF állatházban tartottuk őket folyamatos ellenőrzés és gondozás mellett.

Az egér retinában az amakrin sejtek az INL-ben, illetve a displaced amakrin sejtek a GCL-ben mutatnak SST pozitivitást (Cristiani és mtsai., 2002). Whole-mount kísérleteink során az autofluoreszcens sejtek eloszlása a 6 hónapos kontroll retinában (14. Ábra a) a TH expresszáló dopaminerg amakrin sejtekhez (14. Ábra b) hasonló mintázatot mutatott. A fluoreszkáló sejtek SST pozitívításának megerősítésére kettős jelölést végeztünk zöld fluoreszcenciával előhívott anti-SST antitest segítségével, melynek során az alkalmazott zöld jelölés azonos sejtekben jelent meg a piros autofluoreszcens jellel és sárga szín jelent meg a vizsgált sejtekben (14. Ábra c). Továbbiakban meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy elválaszthatóak-e egymástól egyértelműen a különböző amakrin sejt populációk és nem fed át az általunk alkalmazott anti-TH antitest és az SST sejtek jelölése. Az anti-TH antitesttel való inkubálás eredményeként igazolódott, hogy a TH-pozitív amakrin sejt populáció és az SST-pozitív sejtek egymástól elkülönülnek (14. Ábra d).

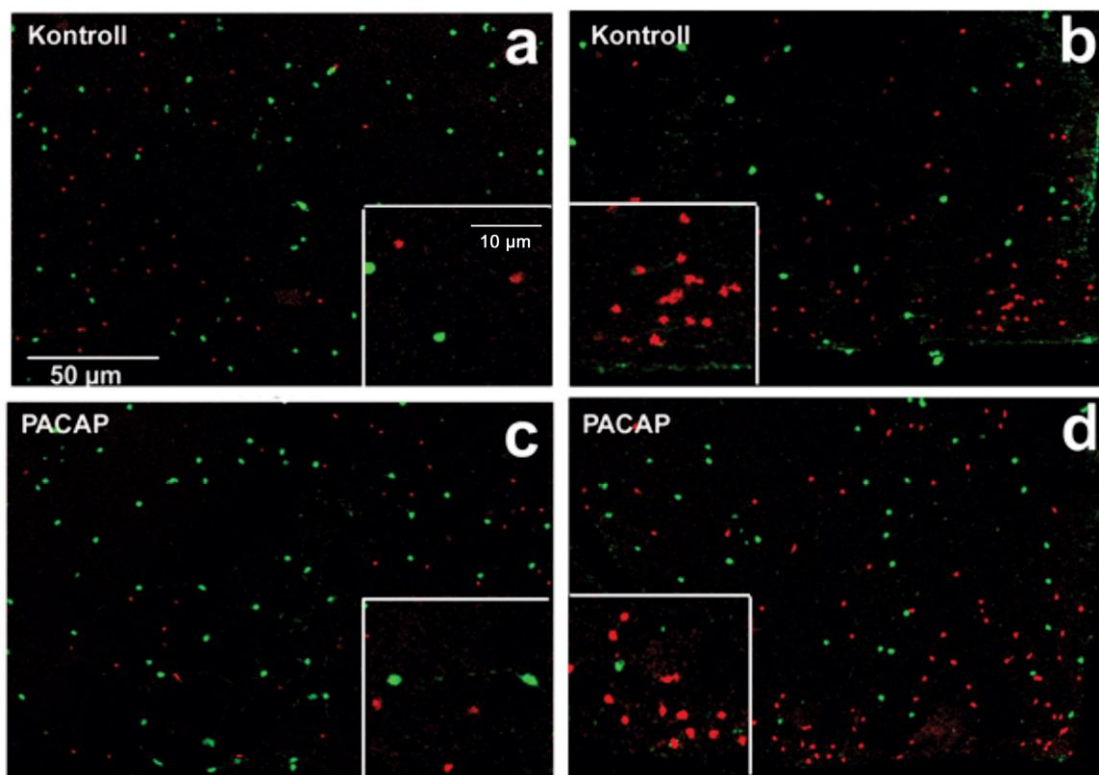
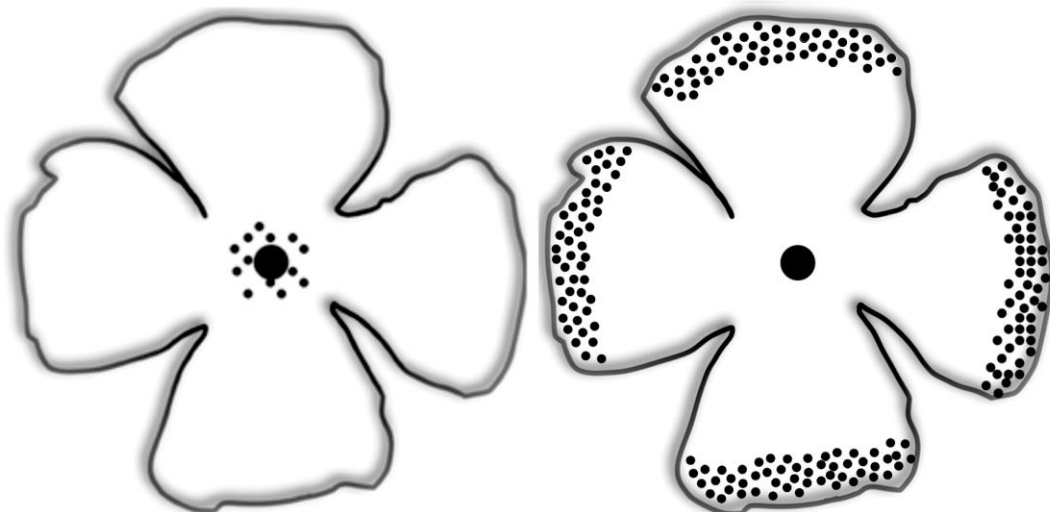


14. *Ábra TH és SST jelölés retina whole-mount-ban (a, b) és retinametszetekben (c, d). A tdTomato expresszáló sejtek (a) és TH-pozitív neuronok (b) whole-mount-ban. az AF488-al előhívott anti-SST antitest és piros autofluoreszcens jel kolokalizációja (c). Kolokalizáció az AF488-al jelölt TH-pozitív sejtek és a piros autofluoreszcens SST sejtek között nem volt megfigyelhető (d).*

4.2.2 A PACAP kezelés hatására bekövetkező sejtdenzitás változások retinában

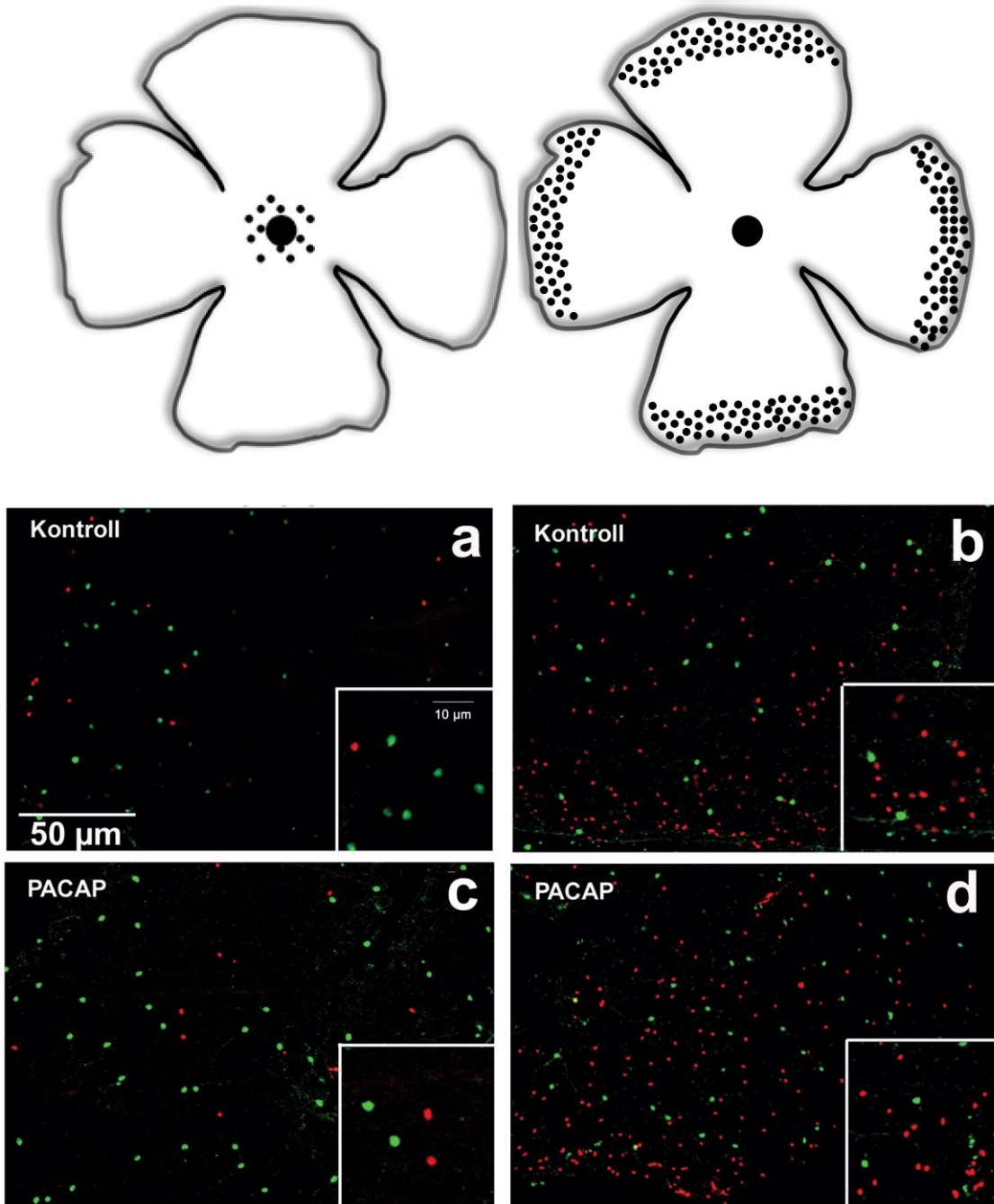
A perifériás retina területeken magasabb SST-pozitív sejtdenzitást tapasztaltunk a centrális területekhez képest, minden csoportban (15-17. *Ábra*). A fiziológiás sóoldatot kapott illetve az abszolút kontroll retinák esetében nem találtunk jelentős különbséget, így az előbbi csoportot alkalmaztunk az összehasonlítások során kontrollként.

A fiziológiás sóoldattal kezelt retinák esetében enyhe csökkenés volt megfigyelhető a centrális és a perifériás retina területeken az öregedéssel az SST-pozitív sejtek és a TH-pozitív sejtek denzitásában is (15. *Ábra*, 18. *Ábra*).



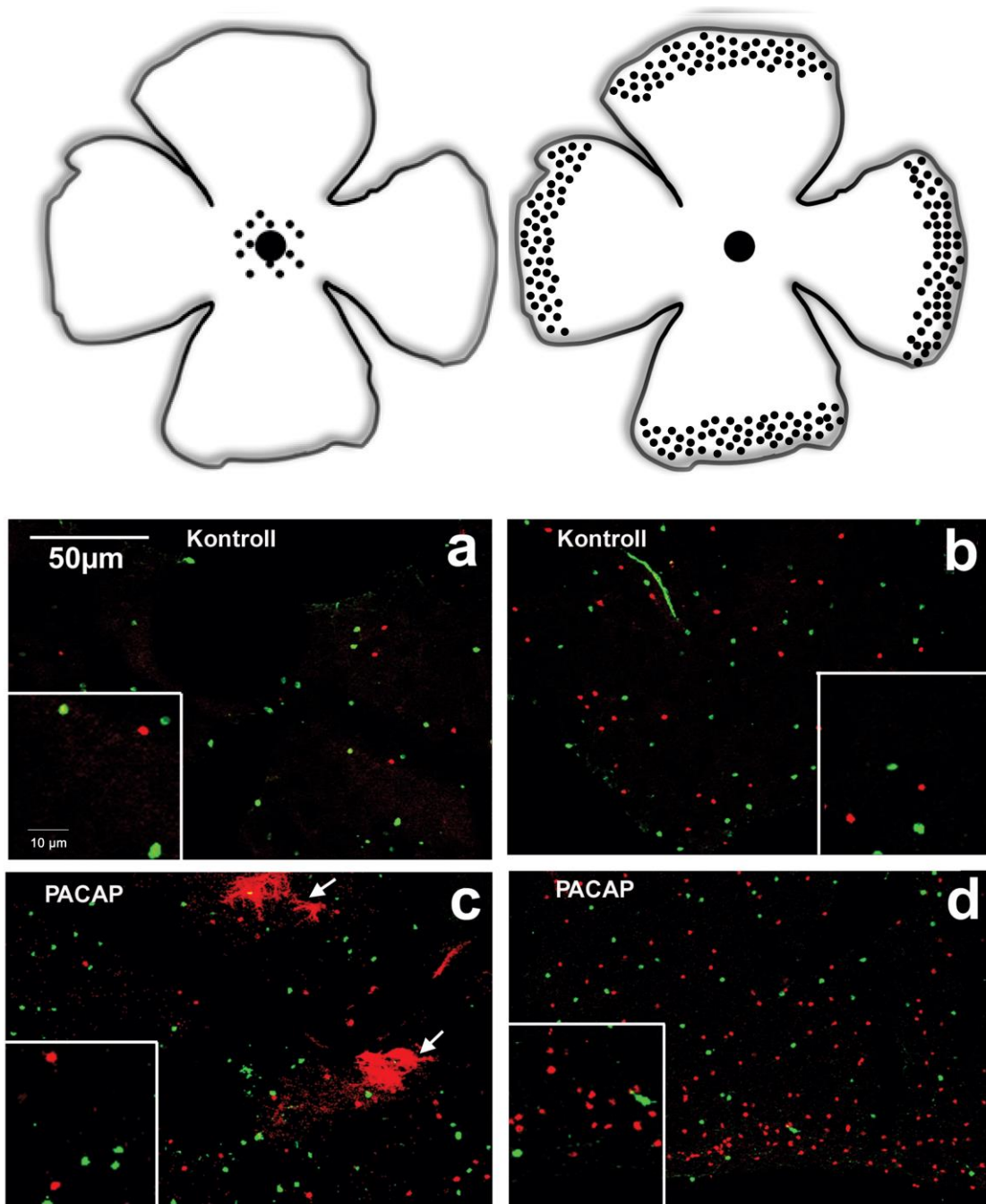
15. Ábra TH és SST pozitív sejtek eloszlása a centrális (a, c) és a perifériás (b, d) területeken 6 hónapos egér retina whole-mountban , fziológias só oldat (a, b) és PACAP kezelés (c, d) hatására. A rajzok a retinális wholemountot ábrázolják, a sejtek centrális (bal oldali rajz) és perifériás elhelyezkedésével (jobb oldali rajz).

A PACAP kezelés hatása először a 12 hónapos korosztálynál nyilvánult meg, ahol mind a TH- mind pedig az SST-pozitív sejtek számában növekedés volt tapasztalható (16. Ábra, 18. Ábra).



16. Ábra TH és SST pozitív sejtek eloszlása a centrális (a, c) és a perifériás (b, d) területeken 12 hónapos egér retina whole-mountban , fiziológiás só oldat (a, b) és PACAP kezelés (c, d) hatására. A rajzok a retinális wholemountot ábrázolják, a sejtek centrális (bal oldali rajz) és perifériás elhelyezkedésével (jobb oldali rajz).

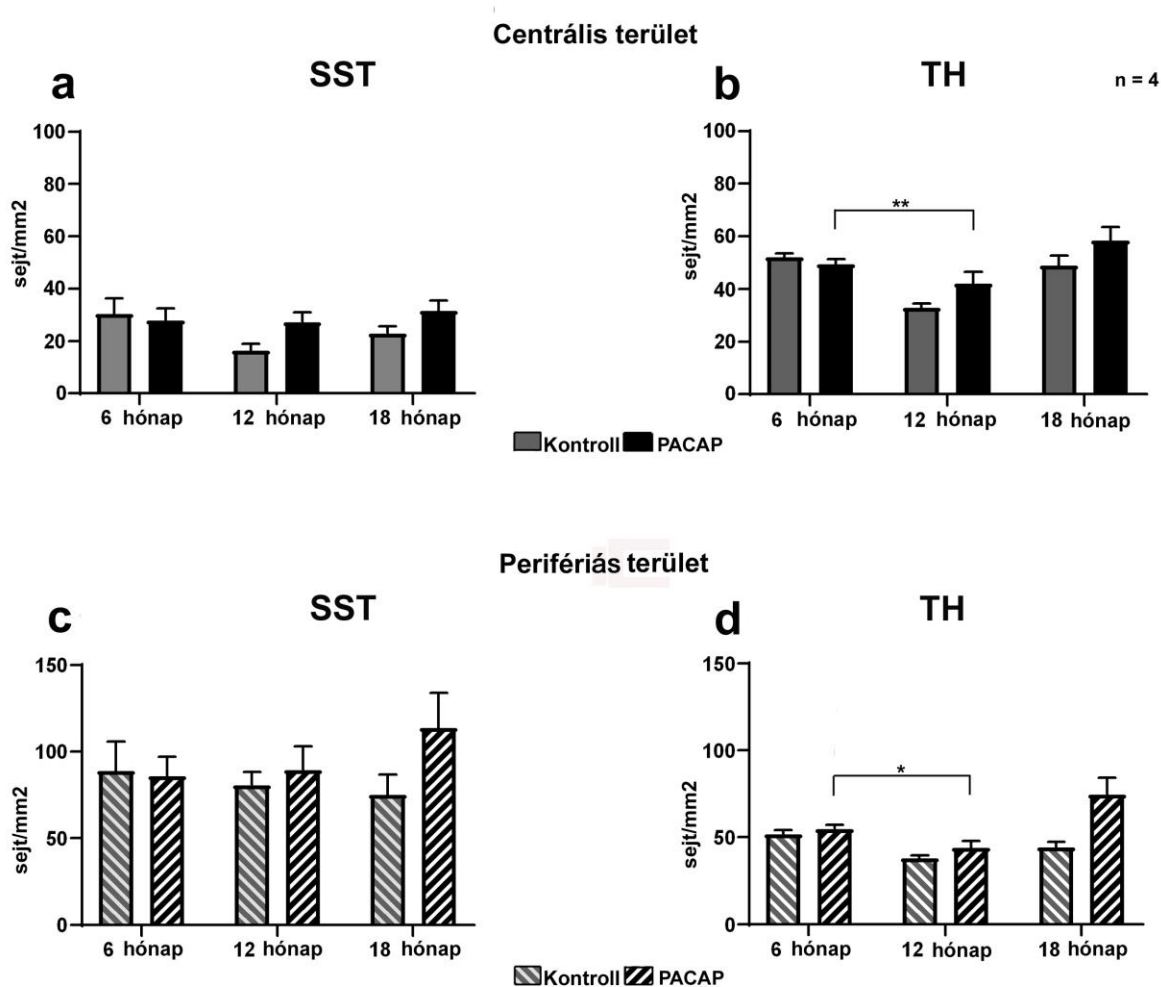
A növekedés ezt követően a legidősebb korcsoport retináiban is folytatódott, illetve gliaszerű sejtek megjelenése volt jellemző a legidősebb korcsoportban (17. Ábra).



17. Ábra TH és SST pozitív sejtek eloszlása a centrális (a, c) és a perifériás (b, d) területeken 18 hónapos egér retina whole-mountban, fiziológias só oldat (a, b) és PACAP kezelés (c, d) hatására. A rajzok a retinális wholemountot ábrázolják, a sejtek centrális (bal oldali rajz) és perifériás elhelyezkedésével (jobb oldali rajz). Nyilakkal jelöltük a gliasejtekre emlékeztető sejtek megjelenését.

A PACAP kezelés hatásának területi összehasonlítása során észrevettük, hogy a perifériás területek jobban érintettek mind a TH-pozitív és mind az SST-pozitív sejtszám növekedésben, mint a centrális retina területek. Szignifikáns eltérést a TH-pozitív sejtek számában találtunk a centrális és a perifériás területek esetében a 6 és a 12 hónapos kezelt csoportok retinái között (18. Ábra).

A sejtszámváltozás hátterében álló okok egyike lehet a megnövekedett ütemű sejtsztódás vagy egyes már meglévő sejtek transzdifferentiációja, de a kérdés megválaszolásával kapcsolatos molekuláris biológiai kísérletek még folyamatban vannak.



18. Ábra Az SST és TH pozitív sejtek denzitása a centrális (a, b) és a perifériás retina területeken (c, d) a különböző korcsoportokban. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a 6 hónapos korcsoporthoz hasonlítva.

5. Az eredmények megbeszélése

Az öregedést kísérő biológiai változások, ha nem is egyforma mértékben, de minden szervrendszerünket érintik. Az emelkedett életkor kiemelt rizikó faktornak számít neurodegeneratív kórképek esetében is, hisz az öregedés során bekövetkező mikroenvironmentváltozások hozzájárulnak az idegrendszer homeosztatiszikus folyamatainak megzavarásához.

A retina öregedése esetében szerkezeti illetve sejtdenzitásbeli változásokat tapasztaltunk a vizsgálataink során. A sejtdenzitás változások vizsgálatára egy transzgenikus modellt választottunk, melyben az SST tartalmú sejtek autofluoreszcensek voltak. A modell kiválasztásának fontos szempontja volt az, hogy egy olyan neuropeptidet jelöljünk autofluoreszcensen melyről a PACAP-hoz hasonlóan már ismert összetett, protektív hatása a retinában. A PACAP kezelés és egy másik neuropeptid együttes vizsgálatát ilyen formában, mint ahogy mi kiviteleztük még nem írták le a szakirodalomban. Az intravitreális PACAP kezelés mérsékelni tudta mind az SST, mind pedig a TH-pozitív sejtek számának változását az idő múlásával.

5.1. A retina szerkezeti változásai a normál öregedés során

A retina öregedésével kapcsolatos kutatások nagy része az egymással szorosan összekapcsolódó szerkezeti és funkcionális változások megismerését tűzte ki célul. A vizsgálataink során 5, 12, 18, és 24 hónapos Wistar albino patkányokat használtunk, melyeknek retináit morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatoknak is egyaránt alávetettük. Az idő múlása, mind a retina rétegeinek vastagságában, mind pedig az azokat alkotó sejtek denzitásában, megjelenésében változást eredményezett. A rétegek változása és a sejtdenzitásukban fellépő csökkenés már korábbi öregedéssel kapcsolatos kutatások során is leírásra került különböző állatfajokban (rézuszamajom - Lin és mtsai., 2021 ; egér – Hermenean és mtsai., 2021; Ferdous és mtsai., 2021; degu - Szabadfi és mtsai., 2015), köztük albino patkányok retináiban is (Nadal-Nicolás és mtsai., 2018; Mohamed és mtsai., 2019). A mi eredményeinkkel összeecsengően, egyes retinális rétegek vastagságának fokozatos csökkenését tapasztalták az idősödő patkányokban legkésőbb egy éves kor után. Nadal-Nicolás és munkatárai 21 napos csoporttal kiegészítve vizsgálták az öregedésnek a

rétegek vastagságában megnyilvánuló következményeit, melynek során hasonló csökkenő tendenciát tapasztaltak (Nadal-Nicolás és mtsai., 2018). A retinális rétegek közül az IPL és az ONL vastagságának a csökkenése volt méréseink szerint a legjelentősebb. A patkány retina ilyen jellegű szerkezeti változását az öregedés során, már korábbi kutatások során is tapasztalták (Weisse és mtsai., 1995; Nadal-Nicolás és mtsai., 2012; Nadal-Nicolás és mtsai., 2018). Az ONL a vastagságának csökkenését, illetve a csapok számának szignifikáns csökkenését is észleltük vizsgálatainkban. Megelőző kutatásaink során is tapasztaltunk ennek a fotoreceptor típusnak a csökkenését az idő múlásával egér retinában (Kovács-Valasek és mtsai., 2017), illetve mások által szintúgy ismertetésre került egér (Cunea és mtsai., 2014) és patkány retinában is (Cano és mtsai., 1986; Nadal-Nicolás és mtsai., 2018).

A ganglion sejtek száma is szignifikáns csökkenést mutatott az öregedés során, amelyet korábbi kutatásaink során is leírtunk egér retinában (Kovács-Valasek és mtsai., 2017). A ganglion sejtek illetve a dendrit mezőjük csökkenése is ismert az idő múlásával patkány retinában (Samuel és mtsai., 2011; Nadal-Nicolás és mtsai., 2018).

A kapott eredményeinkből kiindulva, az alkalmazott markereket expressziójuk alapján patkányban három csoportba tudjuk sorolni a következők szerint: csökkenő expressziót mutatók (PNA jelölt csapok, Brn3a pozitív ganglion sejtek), időközi kiugrást (midlife peak) mutatók (TH, parvalbumin, calretinin, GFAP) és változást csak kismértékben mutatók (calbindin, PKC α , vGLUT1).

Az öregedés során a kalcium homeosztázisban is zavar léphet fel a retinában. A kalcium-kötő fehérjék közül a parvalbumin és a calretinin voltak azok, amelyek 18 hónapot követően csökkentek, míg eközben a calbindin kismértékben fokozatos csökkenést mutatott. Korábbi kutatások is alátámasztják az idő előrehaladtával fellépő csökkent expressziójukat a központi idegrendszer egyes területein, köztük a retinában (Papazifir és mtsai., 1995; Kishimoto és mtsai., 1998).

A TH pozitív dopaminerg sejtek esetében a 12 hónapos korban szintén magas expressziót figyelhettünk meg, mely ezt követően csökkenésnek indult. A TH expresszió változását humán kutatásokban (Roufail és Rees, 1997) is leírták, illetve öregedő PACAP KO egerek retinájában korábban már mi is megfigyeltük (Kovács-Valasek és mtsai., 2017). A pálcika bipoláris sejtek denzitásában csak kismértékű változást láttunk, az öregedés során rájuk jellemző fokozott dendrit arborizáció viszont már degu retinában is leírásra került (Szabadfi és mtsai., 2015), illetve a dendritjeik elrendeződésében bekövetkező változást már egér

(Terzibasi és mtsai., 2009; Samuel és mtsai., 2011) és humán retinában (Liets és mtsai., 2006; Eliasieh és mtsai., 2007) is nyomon követték. A vGLUT1 expresszió is csökkenő tendenciát mutatott az öregedés során, ezt a változást degu retinában is felismerték korábban (Szabadfi és mtsai., 2015). Elérhetőségének csökkenése a glutamát neuronok működésének zavarához vezethet, a fotoreceptorok és a bipoláris sejtek közötti kommunikáció elégtelenségét vetítheti elő.

A GFAP expresszió 12 hónapos retinákban kiugró értéket mutatott és ezt követően emelkedett volt az 5 hónapos korcsoport expressziós értékéhez képest. A GFAP stressz indikátorként működik a retinában, metabolikus stressz illetve különböző degeneratív hatások következtében is jelentkezhethet emelkedett expresszióval. Fokozott kifejeződése, a glia sejtek fokozott megjelenését is jelzi, amely jelenséget gliózisnak nevezik (Nork és mtsai., 1986; Mizutani és mtsai., 1998). Expressziójának emelkedését különböző patológiában (Szabadfi és mtsai., 2012) továbbá, a normál öregedés során humán retinában is leírták (Wu és mtsai., 2003).

Az általunk leírt eredmények összetettebb képet adnak a retinális sejtek megjelenésében, lehetséges szinaptikus kapcsolataiban bekövetkező változásokról. Az eddig leírt szakirodalmi adatokhoz képest, rávilágítottunk arra, hogy nem minden egyszerűen egy csökkenő vagy növekvő tendencia mentén változik, hanem megjelenhetnek időközi kiugrást mutatóak is (pl. GFAP, calretinin, TH), amelyek tovább árnyalják az öregedés által okozott változásokról alkotott képünket.

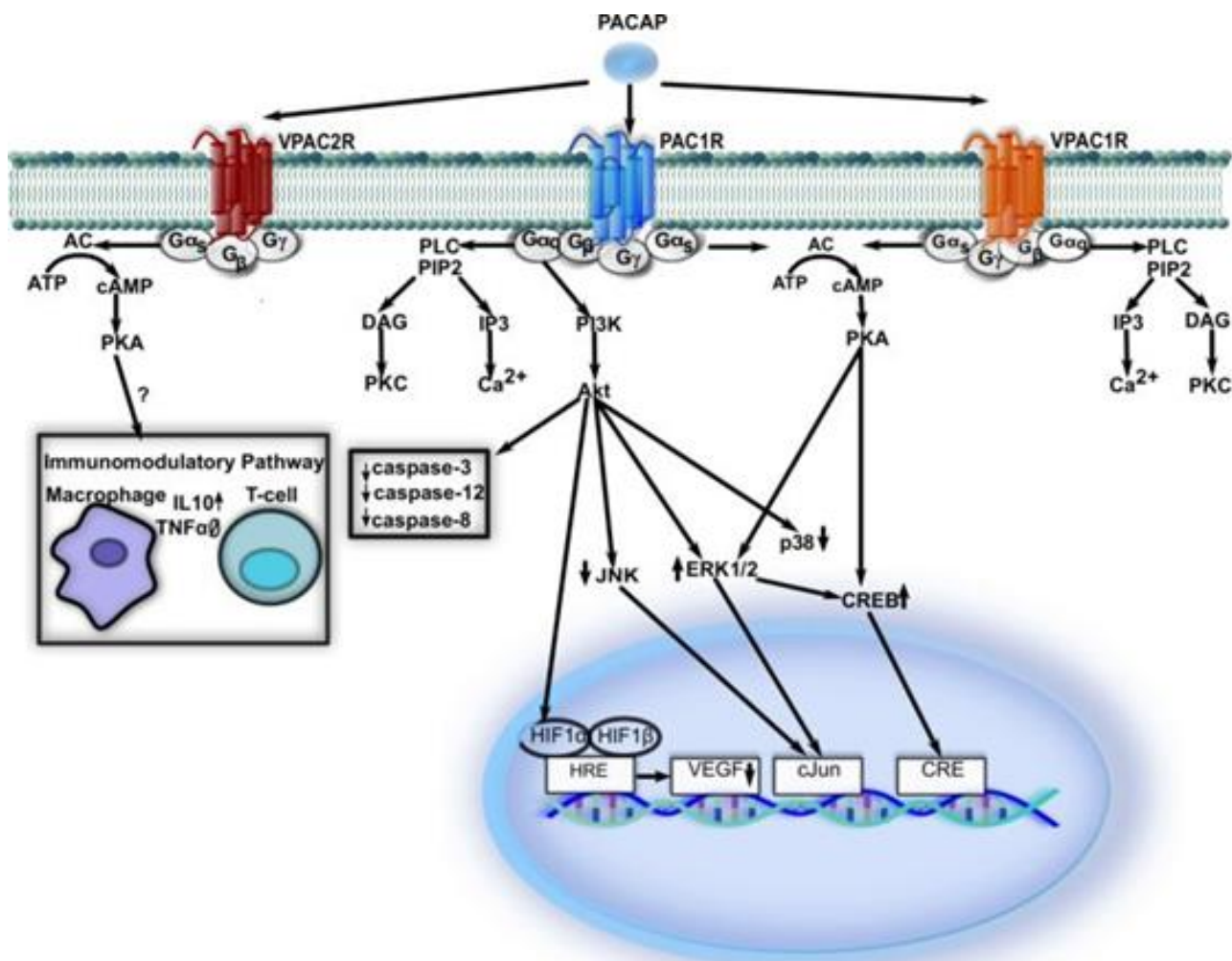
5.2. A krónikus PACAP kezelés hatása az SST tartalmú illetve dopaminerg amakrin sejtek denzitására az öregedés során

A PACAP retinoprotektív hatása illetve pleiotróp szerepe már széleskörben bizonyított. Expressziója az életkor előrehaladtával fokozatos csökkenést mutat az idegrendszerben (Han és mtsai., 2017), illetve a megjelenése egyes öregedést kísérő neurodegeneratív kórképek esetében (pl. Alzheimer kór) is hanyatlásnak indul az idegszövetben (Han és mtsai., 2014; Han és mtsai., 2015).

Korábbi eredményeink PACAP-KO egerek esetében azt mutatták, hogy egyes öregedést kísérő retinaváltozások (pl. retinális ganglion sejtek számának csökkenése) fokozottabban jelentek meg PACAP termelés hiányában (Kovács-Valasek és mtsai., 2017). Vizsgálataink

során az idő múlásával az SST pozitív amakrin és a TH pozitív dopaminerg sejtek denzitása csökkent a transzgenikus egerek retináiban, melyet PACAP intravitreális injekciója mérsékelni tudott. Esetünkben a sejtdenzitás csökkenésének hátterében az apoptotikus útvonalak felélékülése, esetleg az anti-apoptotikus ágensek csökkent megjelenése állhat. Az SST-pozitív interneuronok számának csökkenését az öregedéssel párhuzamosan már korábban is leírták a központi idegrendszerben (Ouellet és mtsai., 2014; Mohan és mtsai., 2018), illetve a dopaminerg amakrin sejtek számának csökkenése is ismert jelenség az öregedés során (Roufail és Rees, 1997). Az SST neurodegenerációval szemben kifejtett protektív szerepe diabeteszes retinopáthiában is igazolódott, ahol csökkentette az apoptózis és a gliális aktiváció mértékét, illetve a glutamát akkumulációt (Hernandez és mtsai., 2013). Az SST szignálútjainak ismert résztvevői az például adenilát-cikláz (AC), a foszfolipáz-C (PLC), MAP-kinázok, foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3-kináz), Janus-kinázok (Cervia és mtsai., 2005). A PACAP részvétele ezen intracelluláris útvonalak befolyásolásában már számos esetben szintén bizonyítást nyert (Szabadfi és mtsai., 2014; D'Amico és mtsai., 2015). Anti-apoptotikus hatása a MAP-kináz útvonalon keresztül, kaspázok (pl. kaspáz-3) illetve a ROS-indukálta mitokondriális diszfunkció gátlásán keresztül is megvalósul (Masmoudi-Kouki és mtsai., 2011). A 19. ábrán irodalmi adatok alapján ábrázoltuk lehetséges kifejeződési mechanizmusát. A cAMP-produkció és a PLC-útvonalon keresztül is elősegíti a CREB transzkripció faktor foszforilációt, gátolja az apoptotikus útvonalat, így segítve a neuronok túlélését (Silveira és mtsai., 2002; Lakk és mtsai., 2015).

Az általunk tapasztalt változások is ezen eredményeket erősítik, hisz a PACAP intravitreális injekciója követően a 18 hónapos korosztály retináiban a perifériás és centrális retina területeken is egyaránt pozitív irányú volt az SST és a TH pozitív sejtek denzitásának változása a fiatalabb csoportokhoz képest. Az SST és a PACAP is a neuropeptidek széles családjához tartoznak és G-proteinhez kapcsolt receptoron keresztül fejtik ki hatásukat, melynek köszönhetően intracelluláris útvonaluk számos ponton átfednek így nem kizárt, hogy egymás hatását erősíteni képesek. Sőt mi több, esetleges kombinált alkalmazásuk terápiás lehetőségként is felmerülhet, különböző ismert retinális kórképek esetében (Gábrriel és mtsai., 2019)



19. Ábra A PACAP jelátviteli útvonalai. VPAC1-R, vazoaktív intesztinális peptid receptor 1; VPAC2-R, vazoaktív intesztinális peptid receptor 2; PAC1-R, hipofízis adenilát-cikláz receptor; cAMP- ciklikus adenzin 3',5'-adenozin-monofoszfát; AC, adenilát-cikláz; PKA, protein kináz A; ATP, adenzin trifoszfát; Gα/β/γ, G protein alpha/beta/gamma alegység; IL, interleukin; TNFα, tumor nekrozis faktor alpha; PLC, foszfolipáz C; PIP2, foszfatidilinozitol 4,5-bisfoszfát; DAG, diacylglycerol; IP3, inozitol trifoszfát; PI3K, foszfatidilinozitol 3-kináz; JNK, jun N-terminális kináz; ERK 1/2, extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2; Akt, protein kináz; CREB, cAMP reszponzív elem kötő protein; VEGF, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor; HRE, hipoxia-reszponzív elem; HIF1α, hipoxia-indukálta faktor 1 α; HIF1β, hipoxia-indukálta factor 1 β. Forrás: Gábriel és mtsai. 2019.

5.3. Az öregedés lehetséges retinális mechanizmusai

Az öregedés komplex, multifaktoriális folyamat, mely szöveti, celluláris és molekuláris szinten több különböző szignálútvonalon keresztül fejt ki hatását a központi idegrendszer egészére, ezáltal befolyásolva annak működését. Kiemelt kockázati tényezőnek számít a neurodegeneratív folyamatokban, mivel a neuronok szerkezeti és funkcionális változásait vonja maga után.

Az agy öregedése során számos jellegzetes eltérést írtak le, mint pl. a pigment akkumulációt, szinaptikus atrofiát, reaktív mikroglia jelenlétét, dendritikus regressziót vagy a citoskeletális abnormalitást. A szervezet különböző kompenzáló mechanizmusokkal igyekszik a neuronok elvesztését pótolni, ilyen védekezési folyamat lehet pl. a dendritikus arborizáció növekedése vagy a szinaptikus folyamatok átszervezése. A felsorolt degeneratív folyamatok háttérében több, egymással kaszkádszerűen összekapcsolódó folyamatot sikerült azonosítani, mint például az oxidatív stresszt, a telomer rövidülést, gyulladási folyamatokat illetve az autofágiát (Zia és mtsai., 2021).

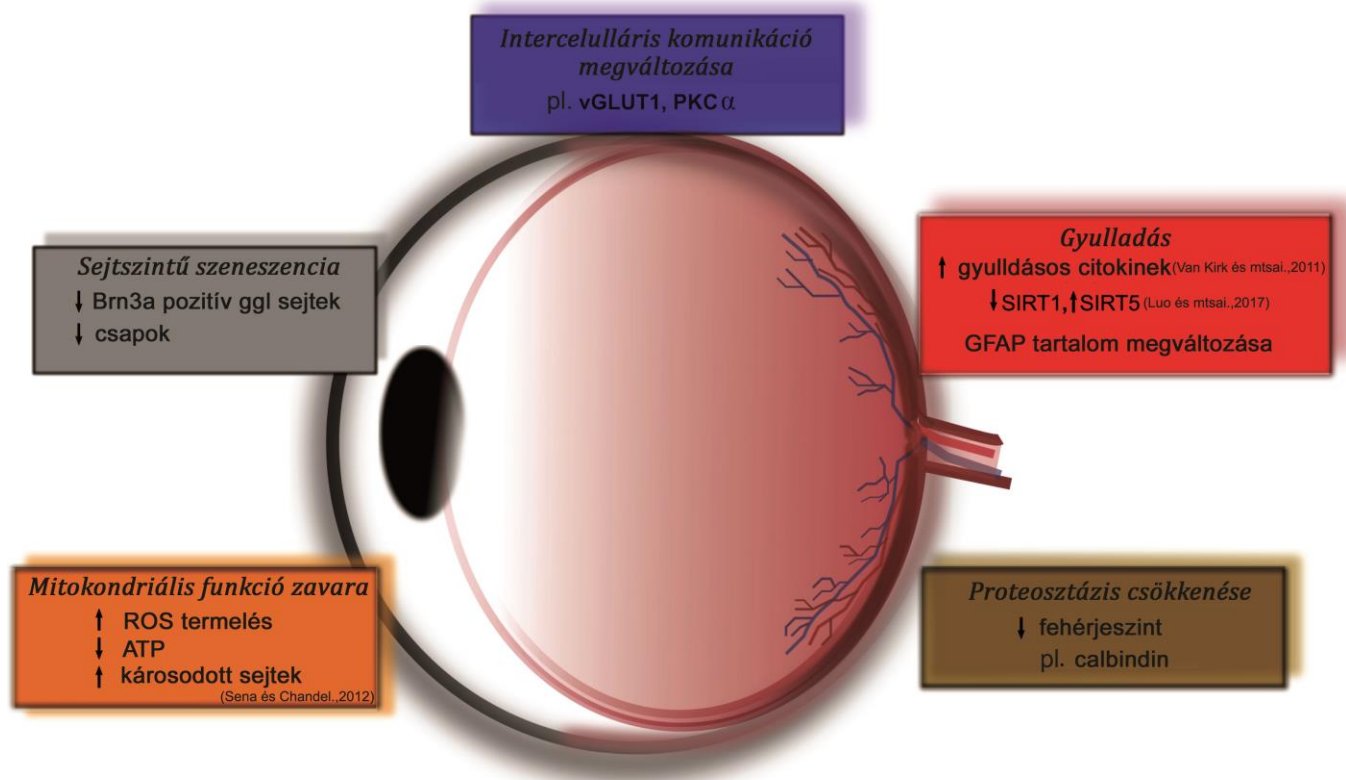
A retina öregedése során fellépő, már mások által is ismertett struktúrális/funkcionális eltérések háttérében is sikerült számos marker expressziójában eltérést leírni a normál öregedés modellünkben. Ezenkívül a dolgozatban bemutatott transzgenikus egérmodellünkben alátámasztottuk azt is, hogy egy jól megválasztott neuroprotektív ágens alkalmazása segíthet a sejtszám megőrzésében az öregedő retinában. Eredményeink között számos olyan eltérést tapasztaltunk, melyek a dolgozat bevezető részében leírt öregedés modellek egyes celluláris szinten lejátszódó lépcsőfokainak szintúgy megfeleltethetőek.

A szakirodalomból ismert tényezők és kísérleti eredményeink alapján felvázoltuk az öregedés lehetséges retinális mechanizmusait (20. Ábra). Retinában az intercelluláris kommunikáció (20. Ábra, lila négyzet) elengedhetetlen a sejtek közötti információátadáshoz, annak megfelelő feldolgozásához. A vGLUT1 illetve a PKC alfa expressziójának változása jelzi, hogy a retinában az öregedés az elsődleges pálcika útvonal résztvevőinek szinaptikus kapcsolataira is hatással van. A szinaptikus kapcsolatok különböző résztvevőinek változása rányomja a bélyegét az információáramlásban szerepet játszó más sejtek működésére is.

A ganglion sejtek és a csapok számának csökkenése, az információ központi idegrendszer felé való továbbításának, illetve a csapok közvetítette szignál útvonalak által való információ átadásának nehézségeit is előre jelzik. A transzgenikus egértörzs retináiban is sejtszám csökkenést tapasztaltunk az idősebb egyedek esetén a fiatalabb állatokhoz képest.

A megjelenő celluláris szenescencia a különböző stresszhatásokra adott válasznak tekinthető (20. Ábra, szürke négyzet), jelenléte hozzájárul a gyulladós folyamatok felélénküléséhez az általuk kibocsátott proinflammatorikus mediátorok révén (Herranz és mtsai., 2015; Davalos és mtsai., 2010). A Müller sejtek jelölésére alkalmazott GFAP, mint metabolikus stressz indikátor, egyértelműen a negatív irányú elváltozások jelenlétét mutatja. A gliasejtek által expresszált számos angiogenikus, neurogenikus és stresszhez kapcsolódó faktor fokozott jelenléte jellemző az öregedő retinára. A megnövekedett glia aktivációt és a gyulladós faktorok emelkedett jelenlétét is leírták a retinában, mely folyamatok hátterében az oxidatív stressz, az immunsejtek infiltrációja, továbbá fotoreaktív pigmentek akkumulációja is állhat. A sirtuinok a DNS stabilizálásában szerepet játszó NAD⁺-függő enzimek, melyeknek expresszió változása is hozzájárul a sejtek gyulladós folyamataihoz és degenerációjához az öregedés során. A sirtuin-1 pozitív hatását más öregedéshez kapcsolódó betegség esetében is vizsgálták, illetve fokozatos csökkenését írták le az öregedő retinában, mely bizonyítottan hozzájárul a funkció hanyatlásához is (Zeng és mtsai., 2015). A sirtuin-5 ezzel szemben növekedést mutatott az idősebb korosztály retináiban a fiatalabbakéhoz képest (Luo és mtsai., 2017) (20. Ábra, narancssárga és piros négyzet). A fehérjék mennyiségének változása a proteosztázis megváltozását jelzi, mely a kalciumkötő fehérjék mennyiségének megváltozására is magyarázatul szolgálhat (20. Ábra, barna négyzet).

A sejtek denzitásában és eloszlásában fellépő eltérés tovább mélyítette ismereteinket az öregedés által hozott változásokról a retinában. A jövőbeli terveink közé tartozik ezen változások hátterében fennálló molekuláris okok feltérképezése és esetleges további vizsgálatok elvégzése, melyek az öregedés okozta elváltozások vagy akár más degenerációs folyamatok eredményeként fellépő károsodások elleni kezelés kifejlesztését segíthetik.



20. Ábra A retinális öregedés lehetséges sémája. vGLUT1, vezikuláris glutamát transzporter 1; PKC α , protein kináz C alfa; ; SIRT1, sirtuin 1; SIRT5- sirtuin 5; GFAP, gliális fibrilláris savas fehérje; ROS, reaktív oxigén gyök; ATP, adenozin trifoszfát. Forrás: Kovács-Valasek és mtsai., 2021

5.4. A transzgenikus modellekben rejlő további lehetőségek

A genetikailag módosított egérmodellek felhasználása a retinális kutatásokban is új távlatokat nyitott a genotípus-fenotípus kapcsolatok megismerésére. A módosított genetikai állománnyal rendelkező genetikai modellek lehetnek funkcionyeréses vagy funkcióvesztéses mutánsok. Az elvégzett kutatások során, a fizioiógias folyamatok részletes leírása mellett (pl. sejtfunckió, fejlődés vizsgálatok) a különböző humán betegségek mimikjeiként való alkalmazásuk is kiemelkedő, ahol a pathológiás elváltozások akár lépésről-lépésre, és sejtípus szinten történő követésére is lehetőséget teremtenek. Mindemellett ezen ismeretek akár új, eddig nem ismert terápiás lehetőségek, gyógyszerceiálpontok felismerésében is segítséget nyújthatnak.

A retina vizsgálata során széleskörben alkalmazzák a transzgenikus technikát például a fotoreceptorok fejlődésének (Fong és mtsai., 2005) és degenerációjának (Geiger és mtsai.,

1994; Joseph és Li, 1996; Kanan és mtsai., 2010; Lipinski és mtsai., 2011), a bipoláris sejt (He és mtsai., 2019; Yang és mtsai., 2019), a Müller sejt (Peant és mtsai., 2007) és a ganglion sejt (Husain és mtsai., 2014; Wang és mtsai., 2020) degenerációjának vizsgálatára.

Ezek mellett a különböző megőrzési/védelmi mechanizmusok megismerése is előtérbe kerül a modern transzgenikus technikák alkalmazása során (McNally és mtsai., 1999; Dong és mtsai., 2007; Liu és mtsai., 2012; Garcia-Caballero és mtsai., 2018; Wang és mtsai., 2019). A jelenleg elérhető adatbázisok (pl. Mouse Genome Database (MGD), Human - Mouse: Disease Connection (HMDC)) már több mint 230 olyan genetikailag módosított egértörzset számlálnak, amelyek valamely retina betegséghez köthetőek. Az említett betegségek túlnyomó többsége természetesen az örökletes retina betegségek közé sorolható, hisz itt ismert mutáció/mutációk állnak a betegségek hátterében (pl. retinitis pigmentosa, Stargardt betegség).

A metabolikus eredetű retina betegségek komplexitása, a számos befolyásoló környezeti faktor, illetve ezen rendelleneségek genetikailag heterogén háttere jelentősen korlátozza a genetikailag módosított modellek alkalmazását. A transzgenikus technikák felhasználásával azonban ilyen esetekben is lehetőség nyílik különböző metabolikus útvonalak megfigyelésére vagy akár a résztvevő folyamatok, mediátorok célzott módosítására. Segítségével különböző retinális sejttípusok megváltozott viselkedésére, a szignálmolekulák módosult expressziójára így szolgáltathatnak választ a betegségprogresszió során.

Az utóbbi években a retina öregedéssel foglalkozó kutatások esetében is emelkedett azon vizsgálatok száma, melyek ezt a technikát alkalmazzák. A retina öregedés esetén például különböző riportergének jelenlétében tudják nyomon követni az egyes sejtcsoportok változását (Samuel és mtsai., 2011) vagy módosíthatjuk akár az öregedés hátterében lejátszódó molekuláris útvonalak ismert résztvevőit (Marrero és mtsai., 2019).

Kiemelt figyelmet kaptak a neuropeptidek pl. a retinális homeosztázis szabályozásában szerepet játszó neuropeptidek, mint az általunk is vizsgált PACAP és SST. A neuropeptidekkel foglalkozó kutatások vizsgálata során is találkozhatunk ezekkel a technikákkal, ahol vagy a fiziológiás szerepüket írják le vagy a neuropeptid homeosztázisban okozott változás eredményeként fellépő retinális változásokat követik nyomon. Például a PAC1R emelkedett expressziója csökkenést eredményez a GABAerg amakrin sejtek mennyiségében (Lang és mtsai., 2010), miközben ugyanennek a receptornak a kiütése csökkent ganglion sejt számot eredményez (Van és mtsai., 2021). Az sst1 gén kiütését követően, bizonyosságot nyert az SST kiemelkedő protektív szerepe hipoxia indukált

retinopáthiában (Cervia és mtsai., 2012), illetve octreotide SST analóggal való kezelést követően csökkentek a hipoxia okozta EEG jelváltozások és az apoptotikus folyamatok (Dal Monte és mtsai., 2012).

Habár a neuropeptidekkel foglalkozó kutatások száma rendkívül magas, ezeknek a kombinált vizsgálata, amikor akár egyszerre több peptidet vizsgálnak ilyen technikával elenyésző. Számos esetben találkozhatunk, olyan megközelítéssel ahol neuroprotektív faktorokat kombinálnak egymással vagy más vegyületekkel (Koeberle és mtsai., 2002; Parrilla-Reverter és mtsai., 2009; Pöstyéni és mtsai., 2021) vagy egy peptidet kombinálnak más környezeti behatással (Kiss és mtsai., 2011), de együttes párhuzamos vizsgálatuk jelen pillanatban még hiányos.

A dolgozatban bemutatott kísérleteinkben sikerült két neuropeptid közötti kapcsolatot vizsgálnunk transzgenikus modell segítségével. Eredményeink alapján állíthatjuk, hogy ez a megközelítés kiemelkedő jelentőséggel bír abban, hogy megértsük és a jövőben akár felhasználjuk a neuropeptidok együttes alkalmazásában rejlő további lehetőségeket. A neuropeptid szintézishez kapcsolódó génbeillesztés (knock in) modellek tervezése egy ígéretes opció lehet olyan patológiák esetében, amelyeknél ezen faktorok csökkent expressziója kiemelten hozzájárul a betegség okozta károsodásokhoz. Ennek a megközelítésnek a hatékonyságát azzal is tovább fokozhatjuk, hogy képesek vagyunk ezt szövetspecifikusan, vagy sejtspecifikus módon megtervezni, így a kiváltott hatás még célirányosabb. Ha részletes ismereteink vannak a patológia esetében emelkedett expressziót mutató káros hatású mediátorok (pl. VEGF, endothelin-1) jelenlétéről - amelyekkel szemben a neuropeptidok már bizonyítottan hatásosnak bizonyultak - erősítő regulátor elemek (enhancer) segítségével elérhetjük, hogy ezek emelkedett jelenlétében történjen meg a konstruktról a peptid fokozott átírása. Ezen a vizsgálatok hozzájárulhatnak ahhoz, hogy megelőzzük, illetve mérsékeljük annak a lehetőségét, hogy az öregedés során tapasztalt megváltozott expressziós mintázatok a látórendszer egészségének romlásához vezethessenek. Az öregedés természetes folyamata és a patológiás elváltozások kialakulása között megjelenő határvonal megismerése, élessé alakítása segíthet abban, hogy csökkentsük a retinát érintő betegségekben szenvedő populáció növekedését a társadalom hasznára.

6. Összefoglalás

Az öregedés során bekövetkező összetett homeosztatiszikus változások a retina szerkezetén és működésén is nyomot hagynak. Az elváltozások pontos feltérképezése és megértése elengedhetetlen ahhoz, hogy tudjuk milyen terápiás lehetőségeink vannak azok mérséklésére, esetleges késleltetésére.

Munkánk során rávilágítottunk, melyek azok a retinális sejtípusok és sejt-kommunikációban résztvevő markerek, amelyek a legsúlyosabban érintettek az öregedés során. A fototranszdukció folyamatában elengedhetetlen sejtípusok (pl. a ganglion sejtek, a fotoreceptorsejtek illetve amakrin sejtek) csökkent megjelenése, a homeosztázis fenntartásában szerepet játszó és kezdetben protektív majd gliózisba átcsappó glia sejtek fokozott megjelenése egyértelműen megmutatkozott természetes retinaöregedés modellünkben.

A modell ismeretében megvizsgáltuk, kompenzálhatóak-e a szomatosztatin pozitív sejteket érintő sejtszám-változások hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid adásával. Az általunk felhasznált tdTomato transzgenikus egerek alkalmasak arra, hogy sejt-specifikusan nyomon kövessük szomatosztatin expresszióját a retinában, míg a hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptidet pedig intravitreális injekciók sorozatával juttattuk be a szembe. A hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptiddel injektált szemek retinájában a sejtszámcsökkenés kompenzálható volt mind a szomatosztatint expresszáló amakrin, mind pedig a dopaminerg amakrin sejtek esetében.

Munkánk rávilágít, melyek azok a sejtcsoportok, amelyek leginkább ki vannak téve az öregedést kísérő elváltozásoknak a retinában, illetve emellett bizonyítja, hogy a neuropeptidok ígéretes terápiás lehetőségként szolgálhatnak ezen elváltozások kezelésében.

7. Summary

The complex homeostatic changes that occur during the process of aging exert irreversible effect on the function and the structure of the retina. The precise description of these changes is essential for creating strategies to delay and temper these harmful modifications effectively.

In the current work, we highlight those cell types and communication markers which are most affected in the aforementioned processes. In our aging models, we demonstrated the diminishing number of cell types crucial for signal transduction (ganglion cells, photoreceptor cells, amacrine cells). At the same time, glial cell types which have an essential role in retinal homeostasis showed increased stress-related marker expression, which could initially convey protective effects but later may lead to gliosis. After familiarizing ourselves with the main characteristic of the model in question, we checked how the change of the number of somatostatin positive cell could be attenuated with the help of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. We followed the expression changes of somatostatin through a TdTomato transgenic mouse model and injected pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide intravitreally multiple times into the eyes. More precisely, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide treatments could attenuate the decrease of cell numbers for both the dopaminerg amacrine and somatostatin positive cells.

Our work identified the cell types most affected by the aging process and offered evidence for the therapeutic potential of neuropeptides in the amelioration of these changes.

8. Irodalomjegyzék

Aggarwal, P., Nag, T. C., & Wadhwa, S. (2007). Age-related decrease in rod bipolar cell density of the human retina: an immunohistochemical study. *Journal of biosciences*, 32(2), 293–298. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0029-9>.

Ajioka, I., Martins, R. A., Bayazitov, I. T., Donovan, S., Johnson, D. A., Frase, S., et al. (2007). Differentiated horizontal interneurons clonally expand to form metastatic retinoblastoma in mice. *Cell*, 131(2), 378–390. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.036>.

Andressoo, J. O., Hoeijmakers, J. H., & Mitchell, J. R. (2006). Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging. *Cell cycle* (Georgetown, Tex.), 5(24), 2886–2888. <https://doi.org/10.4161/cc.5.24.3565>.

Ardeljan, D., & Chan, C. C. (2013). Aging is not a disease: distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Progress in retinal and eye research*, 37, 68–89. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.07.003>.

Arimura, A., & Shioda, S. (1995). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Frontiers in neuroendocrinology*, 16(1), 53–88. <https://doi.org/10.1006/frne.1995.1003>.

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 research bulletin*, 81(4-5), 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.09.004>.

Baek, J. H., Son, H., Jeong, Y. H., Park, S. W., & Kim, H. J. (2019). Chronological Aging Standard Curves of Telomere Length and Mitochondrial DNA Copy Number in Twelve Tissues of C57BL/6 Male Mouse. *Cells*, 8(3), 247. <https://doi.org/10.3390/cells8030247>.

Baimbridge, K. G., Celio, M. R., & Rogers, J. H. (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends in neurosciences*, 15(8), 303–308. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90081-i](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90081-i).

Barreau, E., Brossas, J. Y., Courtois, Y., & Tréton, J. A. (1996). Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human retina during aging. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(2), 384–391.

Basille, M., Vaudry, D., Coulouarn, Y., Jegou, S., Lihrmann, I., Fournier, A., Vaudry, H., & Gonzalez, B. (2000). Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

(PACAP) binding sites and PACAP receptor mRNAs in the rat brain during development. *The Journal of comparative neurology*, 425(4), 495–509.

Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., et al. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature05354>.

Bennett, J. L., Zeiler, S. R., & Jones, K. R. (1999). Patterned expression of BDNF and NT-3 in the retina and anterior segment of the developing mammalian eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(12), 2996–3005.

Bignami, A., & Dahl, D. (1979). The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Experimental eye research*, 28(1), 63–69. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(79\)90106-4](https://doi.org/10.1016/0014-4835(79)90106-4).

Birch, D. G., Anderson, J. L., & Fish, G. E. (1999). Yearly rates of rod and cone functional loss in retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy. *Ophthalmology*, 106(2), 258–268. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(99\)90064-7](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(99)90064-7).

Blanks, J. C., & Johnson, L. V. (1983). Selective lectin binding of the developing mouse retina. *The Journal of comparative neurology*, 221(1), 31–41. <https://doi.org/10.1002/cne.902210103>.

Blanks, J. C., & Johnson, L. V. (1984). Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Investigative ophthalmology & visual science*, 25(5), 546–557.

Blanks, J. C., Torigoe, Y., Hinton, D. R., & Blanks, R. H. (1996). Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. Ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina. *Neurobiology of aging*, 17(3), 377–384. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(96\)00010-3](https://doi.org/10.1016/0197-4580(96)00010-3).

Borràs, D., Ferrer, I., & Pumarola, M. (1999). Age-related changes in the brain of the dog. *Veterinary pathology*, 36(3), 202–211. <https://doi.org/10.1354/vp.36-3-202>.

Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., & Guillemin, R. (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science (New York, N.Y.)*, 179(4068), 77–79. <https://doi.org/10.1126/science.179.4068.77>.

Brecha, N., Karten, H. J., & Schenker, C. (1981). Neurotensin-like and somatostatin-like immunoreactivity within amacrine cells of the retina. *Neuroscience*, 6(7), 1329–1340. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90191-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90191-3).

Bringmann, A., Kohen, L., Wolf, S., Wiedemann, P., & Reichenbach, A. (2003). Age-related decrease of potassium currents in glial (Müller) cells of the human retina. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 38(6), 464–468. <https://doi.org/10.1016>.

- Buckingham, B. P., Inman, D. M., Lambert, W., Oglesby, E., Calkins, D. J., Steele, M. R., et al. (2008). Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(11), 2735–2744. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4443-07.2008>.
- Cano, J., Machado, A., & Reinoso-Suárez, F. (1986). Morphological changes in the retina of ageing rats. *Archives of gerontology and geriatrics*, 5(1), 41–50. [https://doi.org/10.1016/0167-4943\(86\)90006-3](https://doi.org/10.1016/0167-4943(86)90006-3).
- Carmona, J. J., & Michan, S. (2016). Biology of Healthy Aging and Longevity. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 68(1), 7–16.
- Carrasco, E., Hernández, C., Miralles, A., Huguet, P., Farrés, J., & Simó, R. (2007). Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration. *Diabetes care*, 30(11), 2902–2908. <https://doi.org/10.2337/dc07-0332>.
- Carter-Dawson, L. D., LaVail, M. M., & Sidman, R. L. (1978). Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, 17(6), 489–498.
- Casini, G., & Brecha, N. C. (1992). Colocalization of vasoactive intestinal polypeptide and GABA immunoreactivities in a population of wide-field amacrine cells in the rabbit retina. *Visual neuroscience*, 8(4), 373–378. <https://doi.org/10.1017/s0952523800005113>.
- Casini, G., Catalani, E., Dal Monte, M., & Bagnoli, P. (2005). Functional aspects of the somatostatinergic system in the retina and the potential therapeutic role of somatostatin in retinal disease. *Histology and histopathology*, 20(2), 615–632. <https://doi.org/10.14670/HH-20.615>.
- Casini, G., Molnar, M., & Brecha, N. C. (1994). Vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine messenger RNA in the rat retina: adult distribution and developmental expression. *Neuroscience*, 58(3), 657–667. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90089-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90089-2).
- Catita, J., López-Luppo, M., Ramos, D., Nacher, V., Navarro, M., Carretero, A., et al (2015). Imaging of cellular aging in human retinal blood vessels. *Experimental eye research*, 135, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.03.019>.
- Cavallotti, C., Artico, M., Pescosolido, N., Leali, F. M., & Feher, J. (2004). Age-related changes in the human retina. Canadian journal of ophthalmology. *Journal canadien d'ophtalmologie*, 39(1), 61–68. [https://doi.org/10.1016/s0008-4182\(04\)80054-1](https://doi.org/10.1016/s0008-4182(04)80054-1).
- Celio M. R. (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, 35(2), 375–475. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90091-h](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90091-h).

- Cervia, D., & Casini, G. (2013). The Neuropeptide Systems and their Potential Role in the Treatment of Mammalian Retinal Ischemia: A Developing Story. *Current neuropharmacology*, 11(1), 95–101. <https://doi.org/10.2174/157015913804999423>.
- Cervia, D., Catalani, E., & Casini, G. (2019). Neuroprotective Peptides in Retinal Disease. *Journal of clinical medicine*, 8(8), 1146. <https://doi.org/10.3390/jcm8081146>.
- Cervia, D., Catalani, E., Dal Monte, M., & Casini, G. (2012). Vascular endothelial growth factor in the ischemic retina and its regulation by somatostatin. *Journal of neurochemistry*, 120(5), 818–829. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07622.x>.
- Cervia D., Nunn C., Bagnoli P. (2005). Multiple Signalling Transduction Mechanisms Differentially Coupled to Somatostatin Receptor Subtypes: A Current View, *Current Enzyme Inhibition*; 1(3) . <https://dx.doi.org/10.2174/157340805774580529>.
- Chader, G. J., & Taylor, A. (2013). Preface: The aging eye: normal changes, age-related diseases, and sight-saving approaches. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(14), ORSF1–ORSF4. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12993>.
- Charng, J., Nguyen, C. T., Bui, B. V., & Vingrys, A. J. (2011). Age-related retinal function changes in albino and pigmented rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(12), 8891–8899. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7602>.
- Chaychi, S., Polosa, A., Chemtob, S., & Lachapelle, P. (2018). Evaluating the neuroprotective effect of 17 β -estradiol in rodent models of oxidative retinopathies. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 137(3), 151–168. <https://doi.org/10.1007/s10633-018-9658-6>.
- Chen, M., Muckersie, E., Forrester, J. V., & Xu, H. (2010). Immune activation in retinal aging: a gene expression study. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(11), 5888–5896. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-5103>.
- Chia, R., Achilli, F., Festing, M. F., & Fisher, E. M. (2005). The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature genetics*, 37(11), 1181–1186. <https://doi.org/10.1038/ng1665>.
- Chu, Y., Humphrey, M. F., & Constable, I. J. (1993). Horizontal cells of the normal and dystrophic rat retina: a wholemount study using immunolabelling for the 28-kDa calcium-binding protein. *Experimental eye research*, 57(2), 141–148. <https://doi.org/10.1006/exer.1993.1109>.
- Chun, M. H., Han, S. H., Chung, J. W., & Wässle, H. (1993). Electron microscopic analysis of the rod pathway of the rat retina. *The Journal of comparative neurology*, 332(4), 421–432. <https://doi.org/10.1002/cne.903320404>.

- Chun, M. H., Kim, I. B., Ju, W. K., Kim, K. Y., Lee, M. Y., Joo, C. K., & Chung, J. W. (1999). Horizontal cells of the rat retina are resistant to degenerative processes induced by ischemia-reperfusion. *Neuroscience letters*, 260(2), 125–128.
- Conboy, M. J., Conboy, I. M., & Rando, T. A. (2013). Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Aging cell*, 12(3), 525–530. <https://doi.org/10.1111/accel.12065>.
- Cristiani, R., Petrucci, C., Dal Monte, M., & Bagnoli, P. (2002). Somatostatin (SRIF) and SRIF receptors in the mouse retina. *Brain research*, 936(1-2), 1–14. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02450-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02450-2).
- Cuenca, N., Pinilla, I., Sauvé, Y., Lu, B., Wang, S., & Lund, R. D. (2004). Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cone pathways of P23H transgenic rat retina. *Neuroscience*, 127(2), 301–317. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.04.042>.
- Cunea, A., Powner, M. B., & Jeffery, G. (2014). Death by color: differential cone loss in the aging mouse retina. *Neurobiology of aging*, 35(11), 2584–2591. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.012>.
- Curcio, C. A., & Drucker, D. N. (1993). Retinal ganglion cells in Alzheimer's disease and aging. *Annals of neurology*, 33(3), 248–257. <https://doi.org/10.1002/ana.410330305>.
- Dacey D. M. (1990). The dopaminergic amacrine cell. *The Journal of comparative neurology*, 301(3), 461–489. <https://doi.org/10.1002/cne.903010310>.
- Dal Monte, M., Latina, V., Cupisti, E., & Bagnoli, P. (2012). Protective role of somatostatin receptor 2 against retinal degeneration in response to hypoxia. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 385(5), 481–494. <https://doi.org/10.1007/s00210-012-0735-1>.
- D'Amico, A. G., Maugeri, G., Reitano, R., Bucolo, C., Saccone, S., Drago, F. et al. (2015). PACAP Modulates Expression of Hypoxia-Inducible Factors in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Retina. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 57(4), 501–509. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0621-7>.
- Danias, J., Lee, K. C., Zamora, M. F., Chen, B., Shen, F., Filippopoulos et al. (2003). Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2NNia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(12), 5151–5162. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-1101>.
- Danyadi, B., Szabadfi, K., Reglodi, D., Mihalik, A., Danyadi, T., Kovacs, Z., et al. (2014). PACAP application improves functional outcome of chronic retinal ischemic injury in rats-evidence from

- electroretinographic measurements. *Journal of molecular neuroscience*: MN, 54(3), 293–299. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0296-5>.
- Davalos, A. R., Coppe, J. P., Campisi, J., & Desprez, P. Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer metastasis reviews*, 29(2), 273–283. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9220-9>.
- de Magalhães J. P. (2013). How ageing processes influence cancer. *Nature reviews. Cancer*, 13(5), 357–365. <https://doi.org/10.1038/nrc3497>.
- Delfs JR, Dichter MA. Somatostatin. In: Rogawski MA, Barker JL, editors. Neurotransmitter actions in the vertebrate nervous system. *Plenum*; New York: 1985. pp. 411–437.
- Demontiero, O., Vidal, C., & Duque, G. (2012). Aging and bone loss: new insights for the clinician. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 4(2), 61–76. <https://doi.org/10.1177/1759720X11430858>.
- Dénes, V., Czotter, N., Lakk, M., Berta, G., & Gábel, R. (2014). PAC1-expressing structures of neural retina alter their PAC1 isoform splicing during postnatal development. *Cell and tissue research*, 355(2), 279–288. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1761-0>.
- DiLoreto, D., Jr, Ison, J. R., Bowen, G. P., Cox, C., & del Cerro, M. (1995). A functional analysis of the age-related degeneration in the Fischer 344 rat. *Current eye research*, 14(4), 303–310. <https://doi.org/10.3109/02713689509033530>.
- Dimitrov, P. N., Guymer, R. H., Zele, A. J., Anderson, A. J., & Vingrys, A. J. (2008). Measuring rod and cone dynamics in age-related maculopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(1), 55–65. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1048>.
- Dong, A., Shen, J., Krause, M., Hackett, S. F., & Campochiaro, P. A. (2007). Increased expression of glial cell line-derived neurotrophic factor protects against oxidative damage-induced retinal degeneration. *Journal of neurochemistry*, 103(3), 1041–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04839.x>.
- Dong, X., Milholland, B., & Vijg, J. (2016). Evidence for a limit to human lifespan. *Nature*, 538(7624), 257–259. <https://doi.org/10.1038/nature19793>.
- Eells J. T. (2019). Mitochondrial Dysfunction in the Aging Retina. *Biology*, 8(2), 31. <https://doi.org/10.3390/biology8020031>.
- Ehinger, B., & Falck, B. (1969). Morphological and pharmacohistochemical characteristics of adrenergic retinal neurons of some mammals. *Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie. Albrecht von Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 178(4), 295–305. <https://doi.org/10.1007/BF00410475>.

- El-Far, A. H., Elewa, Y., Abdelfattah, E. A., Alsenosy, A. A., Atta, M. S., Abou-Zeid, K. M. et al. (2021). Thymoquinone and Curcumin Defeat Aging-Associated Oxidative Alterations Induced by D-Galactose in Rats' Brain and Heart. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6839. <https://doi.org/10.3390/ijms22136839>.
- Eliasieh, K., Liets, L. C., & Chalupa, L. M. (2007). Cellular reorganization in the human retina during normal aging. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(6), 2824–2830. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1228>.
- Elliott, D., Whitaker, D., & MacVeigh, D. (1990). Neural contribution to spatiotemporal contrast sensitivity decline in healthy ageing eyes. *Vision research*, 30(4), 541–547. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(90\)90066-t](https://doi.org/10.1016/0042-6989(90)90066-t).
- El-Sayyad, H. I., Khalifa, S. A., El-Sayyad, F. I., Mousa, S. A., & Mohammed, E. A. (2014). Analysis of fine structure and biochemical changes of retina during aging of Wistar albino rats. *Clinical & experimental ophthalmology*, 42(2), 169–181. <https://doi.org/10.1111/ceo.12123>.
- Enoch, J. M., Werner, J. S., Haegerstrom-Portnoy, G., Lakshminarayanan, V., & Rynders, M. (1999). Forever young: visual functions not affected or minimally affected by aging: a review. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 54(8), B336–B351. <https://doi.org/10.1093/gerona/54.8.b336>.
- Euler, T., & Wässle, H. (1995). Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *The Journal of comparative neurology*, 361(3), 461–478. <https://doi.org/10.1002/cne.903610310>.
- Famiglietti, E. V., Jr, & Kolb, H. (1975). A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain research*, 84(2), 293–300. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90983-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90983-x).
- Fan, W., Lin, N., Sheedlo, H. J., & Turner, J. E. (1996). Müller and RPE cell response to photoreceptor cell degeneration in aging Fischer rats. *Experimental eye research*, 63(1), 9–18. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0086>.
- Fariss, R. N., Li, Z. Y., & Milam, A. H. (2000). Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. *American journal of ophthalmology*, 129(2), 215–223. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(99\)00401-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(99)00401-8).
- Fei Y. (2002). Cone neurite sprouting: an early onset abnormality of the cone photoreceptors in the retinal degeneration mouse. *Molecular vision*, 8, 306–314.

- Ferdous, S., Liao, K. L., Gefke, I. D., Summers, V. R., Wu, W., Donaldson, K. J. et al (2021). Age-Related Retinal Changes in Wild-Type C57BL/6J Mice Between 2 and 32 Months. *Investigative ophthalmology & visual science*, 62(7), 9. <https://doi.org/10.1167/iovs.62.7.9>.
- Filipsson, K., Sundler, F., Hannibal, J., & Ahrén, B. (1998). PACAP and PACAP receptors in insulin producing tissues: localization and effects. *Regulatory peptides*, 74(2-3), 167–175. [https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(98\)00037-8](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(98)00037-8).
- Fong, S. L., Criswell, M. H., Belecky-Adams, T., Fong, W. B., McClintick, J. N., Kao, W. W. et al (2005). Characterization of a transgenic mouse line lacking photoreceptor development within the ventral retina. *Experimental eye research*, 81(4), 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.06.007>.
- Freund, P. R., Watson, J., Gilmour, G. S., Gaillard, F., & Sauvé, Y. (2011). Differential changes in retina function with normal aging in humans. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 122(3), 177–190. <https://doi.org/10.1007/s10633-011-9273-2>.
- Fuchs, M., Scholz, M., Sendelbeck, A., Atorf, J., Schlegel, C., Enz, R., et al (2012). Rod photoreceptor ribbon synapses in DBA/2J mice show progressive age-related structural changes. *PloS one*, 7(9), e44645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044645>.
- Gábel, R., & Witkovsky, P. (1998). Cholinergic, but not the rod pathway-related glycinergic (All), amacrine cells contain calretinin in the rat retina. *Neuroscience letters*, 247(2-3), 179–182. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(98\)00323-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(98)00323-1).
- Gábel, R., Pöstyéni, E., & Dénes, V. (2019). Neuroprotective Potential of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide in Retinal Degenerations of Metabolic Origin. *Frontiers in neuroscience*, 13, 1031. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01031>.
- Gao, H., & Hollyfield, J. G. (1992). Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 33(1), 1–17.
- García-Caballero, C., Lieppman, B., Arranz-Romera, A., Molina-Martínez, I. T., Bravo-Osuna, I., Young, M., Baranov, P. et al (2018). Photoreceptor preservation induced by intravitreal controlled delivery of GDNF and GDNF/melatonin in rhodopsin knockout mice. *Molecular vision*, 24, 733–745.
- Gastinger, M. J., Singh, R. S., & Barber, A. J. (2006). Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(7), 3143–3150. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1376>.

- Gasz, B., Rácz, B., Roth, E., Borsiczky, B., Ferencz, A., Tamás, A. et al. (2006). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides*, 27(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.06.022>.
- Geiger, K., Howes, E., Gallina, M., Huang, X. J., Travis, G. H., & Sarvetnick, N. (1994). Transgenic mice expressing IFN-gamma in the retina develop inflammation of the eye and photoreceptor loss. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(6), 2667–2681.
- Gemayel, M. C., Bhatwadekar, A. D., & Ciulla, T. (2021). RNA therapeutics for retinal diseases. *Expert opinion on biological therapy*, 21(5), 603–613. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1856365>.
- Gkaliagkousi, E., Lazaridis, A., Dogan, S., Fraenkel, E., Tuna, B. G., Mozos, I., et al. (2022). Theories and Molecular Basis of Vascular Aging: A Review of the Literature from VascAgeNet Group on Pathophysiological Mechanisms of Vascular Aging. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8672. <https://doi.org/10.3390/ijms23158672>
- Goebel, D. J., & Pourcho, R. G. (1997). Calretinin in the cat retina: colocalizations with other calcium-binding proteins, GABA and glycine. *Visual neuroscience*, 14(2), 311–322. <https://doi.org/10.1017/s0952523800011445>.
- Goel, M., & Dhingra, N. K. (2012). Müller glia express rhodopsin in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Neuroscience*, 225, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.066>.
- Gomes-Porras, M., Cárdenas-Salas, J., & Álvarez-Escolá, C. (2020). Somatostatin Analogs in Clinical Practice: a Review. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1682. <https://doi.org/10.3390/ijms21051682>.
- Grant, M. B., Caballero, S., & Millard, W. J. (1993). Inhibition of IGF-I and b-FGF stimulated growth of human retinal endothelial cells by the somatostatin analogue, octreotide: a potential treatment for ocular neovascularization. *Regulatory peptides*, 48(1-2), 267–278. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(93\)90356-d](https://doi.org/10.1016/0167-0115(93)90356-d).
- Gresh, J., Goletz, P. W., Crouch, R. K., & Rohrer, B. (2003). Structure-function analysis of rods and cones in juvenile, adult, and aged C57bl/6 and Balb/c mice. *Visual neuroscience*, 20(2), 211–220. <https://doi.org/10.1017/s0952523803202108>.
- Gunasekaran, U., & Gannon, M. (2011). Type 2 diabetes and the aging pancreatic beta cell. *Aging*, 3(6), 565–575. <https://doi.org/10.18632/aging.100350>.

- Gunn, D. J., Gole, G. A., & Barnett, N. L. (2011). Specific amacrine cell changes in an induced mouse model of glaucoma. *Clinical & experimental ophthalmology*, 39(6), 555–563. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2010.02488.x>.
- Günther, T., Tulipano, G., Dournaud, P., Bousquet, C., Csaba, Z., Kreienkamp, H. J et al. (2018). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature. *Pharmacological reviews*, 70(4), 763–835. <https://doi.org/10.1124/pr.117.015388>.
- Hajna, Z., Szabadfi, K., Balla, Z., Biró, Z., Degrell, P., Molnár, G. A. et al. (2016). Modeling long-term diabetes and related complications in rats. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 78, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.003>.
- Hakimizadeh, E., Zamanian, M., Giménez-Llort, L., Sciorati, C., Nikbakhtzadeh, M., Kujawska, M. et al. (2021). Calcium Dobesilate Reverses Cognitive Deficits and Anxiety-Like Behaviors in the D-Galactose-Induced Aging Mouse Model through Modulation of Oxidative Stress. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 10(5), 649. <https://doi.org/10.3390/antiox10050649>.
- Hamano, K., Kiyama, H., Emson, P. C., Manabe, R., Nakauchi, M., & Tohyama, M. (1990). Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD), in the vertebrate retina. *The Journal of comparative neurology*, 302(2), 417–424. <https://doi.org/10.1002/cne.903020217>.
- Han, P., Caselli, R. J., Baxter, L., Serrano, G., Yin, J., Beach, T. G., et al. (2015). Association of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with cognitive decline in mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. *JAMA neurology*, 72(3), 333–339. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.3625>.
- Han, P., Liang, W., Baxter, L. C., Yin, J., Tang, Z., Beach, T. G. et al. (2014a). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is reduced in Alzheimer disease. *Neurology*, 82(19), 1724–1728. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000417>.
- Han, P., Nielsen, M., Song, M., Yin, J., Permenter, M. R., Vogt, J. A. et al. (2017). The Impact of Aging on Brain Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, Pathology and Cognition in Mice and Rhesus Macaques. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 180. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00180>.
- Han, P., Tang, Z., Yin, J., Maalouf, M., Beach, T. G., Reiman, E. M. et al. (2014b). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects against β -amyloid toxicity. *Neurobiology of aging*, 35(9), 2064–2071. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.022>.

- Harman, A., Abrahams, B., Moore, S., & Hoskins, R. (2000). Neuronal density in the human retinal ganglion cell layer from 16-77 years. *The Anatomical record*, 260(2), 124–131. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20001001\)260:2<124::AID-AR20>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20001001)260:2<124::AID-AR20>3.0.CO;2-D).
- Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K. et al. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460(7253), 392–395. <https://doi.org/10.1038/nature08221>.
- He, F., Nichols, R. M., Kailasam, L., Wensel, T. G., & Agosto, M. A. (2019). Critical Role for Phosphatidylinositol-3 Kinase Vps34/PIK3C3 in ON-Bipolar Cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 60(8), 2861–2874. <https://doi.org/10.1167/iovs.19-26586>.
- Hermenean, A., Trotta, M. C., Gharbia, S., Hermenean, A. G., Peteu, V. E., Balta, C. et al. (2021). Changes in Retinal Structure and Ultrastructure in the Aged Mice Correlate With Differences in the Expression of Selected Retinal miRNAs. *Frontiers in pharmacology*, 11, 593514. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.593514>.
- Hernández, C., García-Ramírez, M., Corraliza, L., Fernández-Carneado, J., Farrera-Sinfreu, J., Ponsati, B., et al. (2013). Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes. *Diabetes*, 62(7), 2569–2578. <https://doi.org/10.2337/db12-0926>.
- Hernández, C., Simó-Servat, O., & Simó, R. (2014). Somatostatin and diabetic retinopathy: current concepts and new therapeutic perspectives. *Endocrine*, 46(2), 209–214. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0232-z>.
- Herranz, N., Gallage, S., Mellone, M., Wuestefeld, T., Klotz, S., Hanley, C. J. et al. (2015). mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nature cell biology*, 17(9), 1205–1217. <https://doi.org/10.1038/ncb3225>.
- Hodgson, R., Kennedy, B. K., Masliah, E., Scearce-Levie, K., Tate, B., Venkateswaran, A., & Braithwaite, S. P. (2020). Aging: therapeutics for a healthy future. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 108, 453–458. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.021>.
- Hökfelt, T., Bartfai, T., & Bloom, F. (2003). Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *The Lancet. Neurology*, 2(8), 463–472. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(03\)00482-4](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(03)00482-4).
- Holmes, D. J., Thomson, S. L., Wu, J., & Ottinger, M. A. (2003). Reproductive aging in female birds. *Experimental gerontology*, 38(7), 751–756. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(03\)00103-7](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(03)00103-7).
- Holtze, S., Gorshkova, E., Braude, S., Cellerino, A., Dammann, P., Hildebrandt, T. B. et al (2021). Alternative Animal Models of Aging Research. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 660959. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.660959>.

- Horsburgh, G. M., & Sefton, A. J. (1987). Cellular degeneration and synaptogenesis in the developing retina of the rat. *The Journal of comparative neurology*, 263(4), 553–566. <https://doi.org/10.1002/cne.902630407>.
- Hoyer, D., & Bartfai, T. (2012). Neuropeptides and neuropeptide receptors: drug targets, and peptide and non-peptide ligands: a tribute to Prof. Dieter Seebach. *Chemistry & biodiversity*, 9(11), 2367–2387. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200288>.
- Husain, S., Abdul, Y., Webster, C., Chatterjee, S., Kesarwani, P., & Mehrotra, S. (2014). Interferon-gamma (IFN- γ)-mediated retinal ganglion cell death in human tyrosinase T cell receptor transgenic mouse. *PLoS one*, 9(2), e89392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089392>.
- Hussain, R. M., Shaukat, B. A., Ciulla, L. M., Berrocal, A. M., & Sridhar, J. (2021). Vascular Endothelial Growth Factor Antagonists: Promising Players in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Drug design, development and therapy*, 15, 2653–2665. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S295223>.
- Ibrahim, N. N. E. H., Radwan, D. A., Zoair, M. M., & El-Kattan, A. K. (2019). Postnatal and aging-related changes of the retina in albino rats: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Tanta Medical Journal*, 47(3), 107.
- Inman, D. M., & Horner, P. J. (2007). Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia*, 55(9), 942–953. <https://doi.org/10.1002/glia.20516>.
- Izumi, S., Seki, T., Shioda, S., Zhou, C. J., Arimura, A., & Koide, R. (2000). Ultrastructural localization of PACAP immunoreactivity in the rat retina. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 921, 317–320. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06985.x>.
- Janssen, P., Naskar, R., Moore, S., Thanos, S., & Thiel, H. J. (1996). Evidence for glaucoma-induced horizontal cell alterations in the human retina. *German journal of ophthalmology*, 5(6), 378–385.
- Jia, K., Chen, D., & Riddle, D. L. (2004). The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* (Cambridge, England), 131(16), 3897–3906. <https://doi.org/10.1242/dev.01255>.
- Jimenez-Gomez, Y., Mattison, J. A., Pearson, K. J., Martin-Montalvo, A., Palacios, H. H., Sossong, A. M., et al (2013). Resveratrol improves adipose insulin signaling and reduces the inflammatory response in adipose tissue of rhesus monkeys on high-fat, high-sugar diet. *Cell metabolism*, 18(4), 533–545. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.004>.

- Johnson, J., Rickman, D. W., & Brecha, N. C. (2000). Somatostatin and somatostatin subtype 2A expression in the mammalian retina. *Microscopy research and technique*, 50(2), 103–111. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000715\)50:2<103::AID-JEMT2>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000715)50:2<103::AID-JEMT2>3.0.CO;2-X).
- Johnson, J., Tian, N., Caywood, M. S., Reimer, R. J., Edwards, R. H., & Copenhagen, D. R. (2003). Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(2), 518–529. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-02-00518.2003>.
- Jones, B. W., Pfeiffer, R. L., Ferrell, W. D., Watt, C. B., Marmor, M., & Marc, R. E. (2016). Retinal remodeling in human retinitis pigmentosa. *Experimental eye research*, 150, 149–165. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.03.018>
- Joseph, R. M., & Li, T. (1996). Overexpression of Bcl-2 or Bcl-XL transgenes and photoreceptor degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(12), 2434–2446..
- Kaeberlein, M., Powers, R. W., 3rd, Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang et al. (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5751), 1193–1196. <https://doi.org/10.1126/science.1115535>.
- Kanan, Y., Centola, M., Bart, F., & Al-Ubaidi, M. R. (2010). Analysis of genes differentially expressed during retinal degeneration in three mouse models. *Advances in experimental medicine and biology*, 664, 3–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1399-9_1.
- Kapahi, P., Zid, B. M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., & Benzer, S. (2004). Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current biology: CB*, 14(10), 885–890. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.059>.
- Katz, M. L., & Robison, W. G., Jr (1986). Evidence of cell loss from the rat retina during senescence. *Experimental eye research*, 42(4), 293–304. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(86\)90022-9](https://doi.org/10.1016/0014-4835(86)90022-9).
- Kennedy, B. K., Berger, S. L., Brunet, A., Campisi, J., Cuervo, A. M., Epel, E. S. et al. (2014). Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*, 159(4), 709–713. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.039>.
- Khan, S. S., Singer, B. D., & Vaughan, D. E. (2017). Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging cell*, 16(4), 624–633. <https://doi.org/10.1111/acer.12601>.
- Kishimoto, J., Tsuchiya, T., Cox, H., Emson, P. C., & Nakayama, Y. (1998). Age-related changes of calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin mRNAs in the hamster brain. *Neurobiology of aging*, 19(1), 77–82. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(97\)00166-8](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(97)00166-8).

- Kiss, P., Atlasz, T., Szabadfi, K., Horvath, G., Griecs, M., Farkas, J. et al. (2011). Comparison between PACAP- and enriched environment-induced retinal protection in MSG-treated newborn rats. *Neuroscience letters*, 487(3), 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.10.065>.
- Koeberle, P. D., & Ball, A. K. (2002). Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*, 110(3), 555–567. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00557-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00557-7).
- Kolb, H., & Famiglietti, E. V. (1974). Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science (New York, N.Y.)*, 186(4158), 47–49. <https://doi.org/10.1126/science.186.4158.47>.
- Kolb, H., Fernández, E., Ammermüller, J., & Cuenca, N. (1995). Substance P: a neurotransmitter of amacrine and ganglion cells in the vertebrate retina. *Histology and histopathology*, 10(4), 947–968.
- Kovács-Valasek, A., Szabadfi, K., Dénes, V., Szalontai, B., Tamás, A., Kiss, P. et al (2017). Accelerated retinal aging in PACAP knock-out mice. *Neuroscience*, 348, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.02.003>.
- Kremer, J., Brendel, C., Mack, E., & Mack, H. (2020). Expression of β -1,4-galactosyltransferases during Aging in *Caenorhabditis elegans*. *Gerontology*, 66(6), 571–581. <https://doi.org/10.1159/000510722>.
- Kuijpers, R. W., Baarsma, S., & van Hagen, P. M. (1998). Treatment of cystoid macular edema with octreotide. *The New England journal of medicine*, 338(9), 624–626. <https://doi.org/10.1056/NEJM199802263380917>.
- Kwon, O. J., Kim, J. Y., Kim, S. Y., & Jeon, C. J. (2005). Alterations in the localization of calbindin D28K-, calretinin-, and parvalbumin-immunoreactive neurons of rabbit retinal ganglion cell layer from ischemia and reperfusion. *Molecules and cells*, 19(3), 382–390.
- Kwon, Y. H., Fingert, J. H., Kuehn, M. H., & Alward, W. L. (2009). Primary open-angle glaucoma. *The New England journal of medicine*, 360(11), 1113–1124. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804630>.
- 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(9), 1631–1639. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.04.026>.
- Lakk, M., Denes, V., & Gabriel, R. (2015). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptors Signal via Phospholipase C Pathway to Block Apoptosis in Newborn Rat Retina. *Neurochemical research*, 40(7), 1402–1409. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1607-0>.

- Lang, B., Zhao, L., Cai, L., McKie, L., Forrester, J. V., McCaig, C. D. et al. (2010). GABAergic amacrine cells and visual function are reduced in PAC1 transgenic mice. *Neuropharmacology*, 58(1), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.07.003>.
- Lee, E. H., & Seo, S. R. (2014). Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. *BMB reports*, 47(7), 369–375. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2014.47.7.086>.
- Leger, F., Fernagut, P. O., Canron, M. H., Léoni, S., Vital, C., Tison, F et al. (2011). Protein aggregation in the aging retina. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 70(1), 63–68. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31820376cc>.
- Li, D., Sun, F., & Wang, K. (2003). Caloric restriction retards age-related changes in rat retina. *Biochemical and biophysical research communications*, 309(2), 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.020>.
- Li, Z. Y., Kljavin, I. J., & Milam, A. H. (1995). Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(8), 5429–5438. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-08-05429.1995>.
- Liets, L. C., Eliasieh, K., van der List, D. A., & Chalupa, L. M. (2006). Dendrites of rod bipolar cells sprout in normal aging retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), 12156–12160. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605211103>.
- Lin, K. H., Tran, T., Kim, S., Park, S., Chen, J., Stout, J. et al (2021). Age-related changes in the rhesus macaque eye. *Experimental eye research*, 212, 108754. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108754>.
- Lipinski, D. M., Yusuf, M., Barnard, A. R., Damant, C., Charbel Issa, P., Singh, M. S., et al. (2011). Characterization of a dominant cone degeneration in a green fluorescent protein-reporter mouse with disruption of Loci associated with human dominant retinal dystrophy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(9), 6617–6623. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7932>.
- Lipinski, D. M., Yusuf, M., Barnard, A. R., Damant, C., Charbel Issa, P., Singh, M. S. et al . (2011). Characterization of a dominant cone degeneration in a green fluorescent protein-reporter mouse with disruption of Loci associated with human dominant retinal dystrophy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(9), 6617–6623. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7932>.
- Liu, Q., Collin, R. W., Cremers, F. P., den Hollander, A. I., van den Born, L. I., & Pierce, E. A. (2012). Expression of wild-type Rp1 protein in Rp1 knock-in mice rescues the retinal degeneration phenotype. *PloS one*, 7(8), e43251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043251>.

- López-Luppo, M., Catita, J., Ramos, D., Navarro, M., Carretero, A., Mendes-Jorge, L. et al (2017). Cellular Senescence Is Associated With Human Retinal Microaneurysm Formation During Aging. *Investigative ophthalmology & visual science*, 58(7), 2832–2842. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20312>.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- Lundkvist, A., Reichenbach, A., Betsholtz, C., Carmeliet, P., Wolburg, H., & Pekny, M. (2004). Under stress, the absence of intermediate filaments from Müller cells in the retina has structural and functional consequences. *Journal of cell science*, 117(Pt 16), 3481–3488. <https://doi.org/10.1242/jcs.01221>.
- Luo, H., Zhou, M., Ji, K., Zhuang, J., Dang, W., Fu, S. et al. (2017). Expression of Sirtuins in the Retinal Neurons of Mice, Rats, and Humans. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 366. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00366>.
- Marrero, B., He, C., Oh, H. M., Ukwu, U. T., Yu, C. R., Dambuza, I. M. et al. (2019). Persistent Activation of STAT3 Pathway in the Retina Induced Vision Impairment and Retinal Degenerative Changes in Ageing Mice. *Advances in experimental medicine and biology*, 1185, 353–358. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27378-1_58.
- Martinez, C., Abad, C., Delgado, M., Arranz, A., Juarranz, M. G., Rodriguez-Henche, N. et al (2002). Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 1053–1058. <https://doi.org/10.1073/pnas.012367999>.
- Masmoudi-Kouki, O., Douiri, S., Hamdi, Y., Kaddour, H., Bahdoudi, S., Vaudry, D. et al. (2011). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects astroglial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of neurochemistry*, 117(3), 403–411. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07185.x>.
- Matsumoto, M., Nakamachi, T., Watanabe, J., Sugiyama, K., Ohtaki, H., Murai, N. et al. (2016). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Is Involved in Adult Mouse Hippocampal Neurogenesis After Stroke. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 59(2), 270–279. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0731-x>.
- May C. A. (2012). Age-dependent morphology of NADPH diaphorase-positive amacrine cells in the mouse retina. *Anatomia, histologia, embryologia*, 41(6), 476–478. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2012.01152.x>

- McCay, C. M., Maynard, L. A., Sperling, G., & Barnes, L. L. (1975). The Journal of Nutrition. Volume 18 July--December, 1939. Pages 1--13. Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories. *Nutrition reviews*, 33(8), 241–243. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1975.tb05227.x>.
- McNally, N., Kenna, P., Humphries, M. M., Hobson, A. H., Khan, N. W., Bush, R. A. et al. (1999). Structural and functional rescue of murine rod photoreceptors by human rhodopsin transgene. *Human molecular genetics*, 8(7), 1309–1312. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.7.1309>.
- Melton, L. J., 3rd, Khosla, S., Crowson, C. S., O'Connor, M. K., O'Fallon, W. M., & Riggs, B. L. (2000). Epidemiology of sarcopenia. *Journal of the American Geriatrics Society*, 48(6), 625–630.
- Mercken, E. M., Mitchell, S. J., Martin-Montalvo, A., Minor, R. K., Almeida, M., Gomes, et al (2014). SIRT2104 extends survival of male mice on a standard diet and preserves bone and muscle mass. *Aging cell*, 13(5), 787–796. <https://doi.org/10.1111/accel.12220>
- Mitchell, S. J., Martin-Montalvo, A., Mercken, E. M., Palacios, H. H., Ward, T. M., Abulwerdi, G., et al (2014). The SIRT1 activator SIRT1720 extends lifespan and improves health of mice fed a standard diet. *Cell reports*, 6(5), 836–843. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.031>.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R. R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler et al. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 164(1), 567–574. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)91757-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)91757-9).
- Mizutani, M., Gerhardinger, C., & Lorenzi, M. (1998). Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes*, 47(3), 445–449. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.3.445>.
- Mohamed, M., El-Shaarawy, E., Youakim, M. F., Shuaib, D., & Ahmed, M. M. (2019). Aging changes in the retina of male albino rat: a histological, ultrastructural and immunohistochemical study. *Folia morphologica*, 78(2), 237–258. <https://doi.org/10.5603/FM.a2018.0075>.
- Mohan, A., Thalamuthu, A., Mather, K. A., Zhang, Y., Catts, V. S., Weickert, C. S. et al. (2018). Differential expression of synaptic and interneuron genes in the aging human prefrontal cortex. *Neurobiology of aging*, 70, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.011>.
- Mojumder, D. K., Wensel, T. G., & Frishman, L. J. (2008). Subcellular compartmentalization of two calcium binding proteins, calretinin and calbindin-28 kDa, in ganglion and amacrine cells of the rat retina. *Molecular vision*, 14, 1600–1613.
- Muste, J. C., Kalur, A., Iyer, A., Valentim, C., & Singh, R. P. (2021). Photobiomodulation therapy in age-related macular degeneration. *Current opinion in ophthalmology*, 32(3), 225–232. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000742>.

- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Albuquerque-Béjar, J. J., Vidal-Sanz, M. et al (2012). Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS one*, 7(11), e49830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049830>.
- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Cánovas-Martínez, I., Salinas-Navarro, M. et al. (2009). Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(8), 3860–3868. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3267>.
- Nadal-Nicolás, F. M., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2018). The aging rat retina: from function to anatomy. *Neurobiology of aging*, 61, 146–168. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.021>
- Neff, F., Flores-Dominguez, D., Ryan, D. P., Horsch, M., Schröder, S., Adler, T., Afonso, L. C. et al. (2013). Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging. *The Journal of clinical investigation*, 123(8), 3272–3291. <https://doi.org/10.1172/JCI67674>.
- Nguyen-Legros, J., Vigny, A., & Gay, M. (1983). Post-natal development of TH-like immunoreactivity in the rat retina. *Experimental eye research*, 37(1), 23–32. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(83\)90146-x](https://doi.org/10.1016/0014-4835(83)90146-x).
- Niccoli, T., & Partridge, L. (2012). Ageing as a risk factor for disease. *Current biology : CB*, 22(17), R741–R752. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.024>.
- Njaine, B., Martins, R. A., Santiago, M. F., Linden, R., & Silveira, M. S. (2010). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide controls the proliferation of retinal progenitor cells through downregulation of cyclin D1. *The European journal of neuroscience*, 32(3), 311–321. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07286.x>.
- Nork, T. M., Ghobrial, M. W., Peyman, G. A., & Tso, M. O. (1986). Massive retinal gliosis. A reactive proliferation of Müller cells. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 104(9), 1383–1389. <https://doi.org/10.1001/archophth.1986.01050210137041>.
- North, B. J., & Sinclair, D. A. (2012). The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circulation research*, 110(8), 1097–1108. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246876>.
- Nyisztor, Z., Denes, V., Kovacs-Valasek, A., Hideg, O., Berta, G., & Gabriel, R. (2018). Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP1-38) Exerts Both Pro and Anti-Apoptotic Effects on Postnatal Retinal Development in Rat. *Neuroscience*, 385, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.008>.

- Ohtaki, H., Satoh, A., Nakamachi, T., Yofu, S., Dohi, K., Mori, H. et al. (2010). Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. *Journal of molecular neuroscience* : MN, 42(3), 397–403. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9350-0>.
- Ortuño-Lizarán, I., Sánchez-Sáez, X., Lax, P., Serrano, G. E., Beach, T. G., Adler, C. H. et al (2020). Dopaminergic Retinal Cell Loss and Visual Dysfunction in Parkinson Disease. *Annals of neurology*, 88(5), 893–906. <https://doi.org/10.1002/ana.25897>
- Osborne, N. N., Broyden, N. J., Barnett, N. L., & Morris, N. J. (1991). Protein kinase C (alpha and beta) immunoreactivity in rabbit and rat retina: effect of phorbol esters and transmitter agonists on immunoreactivity and the translocation of the enzyme from cytosolic to membrane compartments. *Journal of neurochemistry*, 57(2), 594–604. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb03790.x>.
- Ottinger, M. A., Nisbet, I. C. T., Finch, C. E. (1995) Aging and Reproduction: Comparative Endocrinology of the Common Tern and Japanese Quail. *American Zoologist*, 35: 299–306. <https://doi.org/10.1093/icb/35.4.299>.
- Ouellet, L., & de Villers-Sidani, E. (2014). Trajectory of the main GABAergic interneuron populations from early development to old age in the rat primary auditory cortex. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 40. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00040>.
- Panda-Jonas, S., Jonas, J. B., & Jakobczyk-Zmija, M. (1995). Retinal photoreceptor density decreases with age. *Ophthalmology*, 102(12), 1853–1859. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(95\)30784-1](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(95)30784-1).
- Papazafiri, P., Podini, P., Meldolesi, J., & Yamaguchi, T. (1995). Ageing affects cytosolic Ca²⁺ binding proteins and synaptic markers in the retina but not in cerebral cortex neurons of the rat. *Neuroscience letters*, 186(1), 65–68.
- Parrilla-Reverter, G., Agudo, M., Sobrado-Calvo, P., Salinas-Navarro, M., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2009). Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study. *Experimental eye research*, 89(1), 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.02.015>.
- Pasteels, B., Rogers, J., Blachier, F., & Pochet, R. (1990). Calbindin and calretinin localization in retina from different species. *Visual neuroscience*, 5(1), 1–16. <https://doi.org/10.1017/s0952523800000031>
- Pathai, S., Bajillan, H., Landay, A. L., & High, K. P. (2014). Is HIV a model of accelerated or accentuated aging?. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 69(7), 833–842. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt168>.

- Péant, C., Dosso, A., Eder-Colli, L., & Chiodini, F. (2007). Functional study in NSE-Hu-Bcl-2 transgenic mice: a model for retinal diseases starting in Müller cells. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 115(3), 203–209. <https://doi.org/10.1007/s10633-007-9077-6>.
- Pennington, K. L., & DeAngelis, M. M. (2016). Epigenetic Mechanisms of the Aging Human Retina. *Journal of experimental neuroscience*, 9(Suppl 2), 51–79. <https://doi.org/10.4137/JEN.S25513>.
- Phipps, J. A., Fletcher, E. L., & Vingrys, A. J. (2004). Paired-flash identification of rod and cone dysfunction in the diabetic rat. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(12), 4592–4600. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0842>.
- Pintér, E., Pozsgai, G., Hajna, Z., Helyes, Z., & Szolcsányi, J. (2014). Neuropeptide receptors as potential drug targets in the treatment of inflammatory conditions. *British journal of clinical pharmacology*, 77(1), 5–20. <https://doi.org/10.1111/bcp.12097>.
- Piper, M., & Partridge, L. (2018). Drosophila as a model for ageing. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(9 Pt A), 2707–2717. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.016>.
- Pochet, R., Pasteels, B., Seto-Ohshima, A., Bastianelli, E., Kitajima, S., & Van Eldik, L. J. (1991). Calmodulin and calbindin localization in retina from six vertebrate species. *The Journal of comparative neurology*, 314(4), 750–762. <https://doi.org/10.1002/cne.903140408>.
- Pöstyéni, E., Szabadfi, K., Sétáló, G., Jr, & Gabriel, R. (2021). A Promising Combination: PACAP and PARP Inhibitor Have Therapeutic Potential in Models of Diabetic and Hypertensive Retinopathies. *Cells*, 10(12), 3470. <https://doi.org/10.3390/cells10123470>.
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, 362(4), 329–344. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>.
- Rabié, A., Thomasset, M., Parkes, C. O., & Clavel, M. C. (1985). Immunocytochemical detection of 28 000-MW calcium-binding protein in horizontal cells of the rat retina. *Cell and tissue research*, 240(2), 493–496. <https://doi.org/10.1007/BF00222366>.
- Ramírez, J. M., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., & Triviño, A. (2001). Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Experimental eye research*, 73(5), 601–615. <https://doi.org/10.1006/exer.2001.1061>.
- 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. *Current pharmaceutical design*, 17(10), 962–972. <https://doi.org/10.2174/138161211795589355>.

- Reinehr, S., Buschhorn, V., Mueller-Buehl, A. M., Goldmann, T., Grus, F. H., Wolfrum, U., et al (2020). Occurrence of Retinal Ganglion Cell Loss via Autophagy and Apoptotic Pathways in an Autoimmune Glaucoma Model. *Current eye research*, 45(9), 1124–1135. <https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1716987>.
- Reynolds, B. S., Chetboul, V., Nguyen, P., Testault, I., Concordet, D. V., Carlos Sampedrano, C. et al. (2013). Effects of dietary salt intake on renal function: a 2-year study in healthy aged cats. *Journal of veterinary internal medicine*, 27(3), 507–515. <https://doi.org/10.1111/jvim.12074>.
- Richardson, A., Heydari, A. R., Morgan, W. W., Nelson, J. F., Sharp, Z. D., & Walter, C. A. (1997). Use of Transgenic Mice in Aging Research. *ILAR journal*, 38(3), 125–136.
- Rivnyak, A., Kiss, P., Tamas, A., Balogh, D., & Reglodi, D. (2018). Review on PACAP-Induced Transcriptomic and Proteomic Changes in Neuronal Development and Repair. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1020. <https://doi.org/10.3390/ijms19041020>.
- Robison, L. L., & Hudson, M. M. (2014). Survivors of childhood and adolescent cancer: life-long risks and responsibilities. *Nature reviews. Cancer*, 14(1), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nrc3634>.
- Roufail, E., & Rees, S. (1997). Ageing has a differential effect on nitric oxide synthase-containing and catecholaminergic amacrine cells in the human and rat retina. *The Journal of comparative neurology*, 389(2), 329–347.
- Rungger-Brändle, E., Dosso, A. A., & Leuenberger, P. M. (2000). Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(7), 1971–1980.
- Samuel, M. A., Zhang, Y., Meister, M., & Sanes, J. R. (2011). Age-related alterations in neurons of the mouse retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(44), 16033–16044. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3580-11.2011>.
- Sanna, P. P., Keyser, K. T., Battenberg, E., & Bloom, F. E. (1990). Parvalbumin immunoreactivity in the rat retina. *Neuroscience letters*, 118(1), 136–139. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90267-d](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90267-d).
- Schuettauf, F., Rejdak, R., Walski, M., Frontczak-Baniewicz, M., Voelker, M., Blatsios, G., Shinoda, K., Zagorski, Z., Zrenner, E., & Grieb, P. (2004). Retinal neurodegeneration in the DBA/2J mouse—a model for ocular hypertension. *Acta neuropathologica*, 107(4), 352–358. <https://doi.org/10.1007>.
- Sebag J. (1987). Age-related changes in human vitreous structure. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 225(2), 89–93. <https://doi.org/10.1007/BF02160337>.

- Seki, T., Shioda, S., Ogino, D., Nakai, Y., Arimura, A., & Koide, R. (1997). Distribution and ultrastructural localization of a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its mRNA in the rat retina. *Neuroscience letters*, 238(3), 127–130. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00869-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00869-0).
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48(2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>.
- Sharma, A., & Jaganathan, B. G. (2021). Stem Cell Therapy for Retinal Degeneration: The Evidence to Date. *Biologics: targets & therapy*, 15, 299–306. <https://doi.org/10.2147/BTT.S290331>.
- Silveira, M. S., Costa, M. R., Bozza, M., & Linden, R. (2002). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 277(18), 16075–16080. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110106200>.
- Steinle, J. J., Sharma, S., Smith, C. P., & McFayden-Ketchum, L. S. (2009). Normal aging involves modulation of specific inflammatory markers in the rat retina and choroid. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 64(3), 325–331. <https://doi.org/10.1093/gerona/gln052>.
- Strand F. L. (2003). Neuropeptides: general characteristics and neuropharmaceutical potential in treating CNS disorders. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*, 61, 1–37. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8049-7_1.
- Strettoi, E., & Pignatelli, V. (2000). Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), 11020–11025. <https://doi.org/10.1073/pnas.190291097>.
- Strettoi, E., Porciatti, V., Falsini, B., Pignatelli, V., & Rossi, C. (2002). Morphological and functional abnormalities in the inner retina of the rd/rd mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(13), 5492–5504. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-13-05492.2002>.
- Sun, Y., Yu, R., Guo, H. B., Qin, H., & Dang, W. (2021). A quantitative yeast aging proteomics analysis reveals novel aging regulators. *GeroScience*, 43(5), 2573–2593. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00412-3>.
- Sylwestrak, E. L., & Ghosh, A. (2012). Eln1 regulates target-specific release probability at CA1-interneuron synapses. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6106), 536–540. <https://doi.org/10.1126/science.1222482>.

- Szabadfi, K., Atlasz, T., Kiss, P., Reglodi, D., Szabo, A., Kovacs, K., et al (2012). Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell and tissue research*, 348(1), 37–46. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1349-0>.
- Szabadfi, K., Estrada, C., Fernandez-Villalba, E., Tarragon, E., Setalo, G., Jr, Izura, V., et al (2015). Retinal aging in the diurnal Chilean rodent (Octodon degus): histological, ultrastructural and neurochemical alterations of the vertical information processing pathway. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 126. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00126>.
- Szabadfi, K., Kiss, P., Reglodi, D., Fekete, E. M., Tamas, A., Danyadi, B. et al. (2014). Urocortin 2 treatment is protective in excitotoxic retinal degeneration. *Acta physiologica Hungarica*, 101(1), 67–76. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.100.2013.020>.
- Szabadfi, K., Reglodi, D., Szabo, A., Szalontai, B., Valasek, A., Setalo, G., Jr et al (2016). Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, A Potential Therapeutic Agent for Diabetic Retinopathy in Rats: Focus on the Vertical Information Processing Pathway. *Neurotoxicity research*, 29(3), 432–446. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9593-1>.
- Szabó, A., Danyadi, B., Bogнар, E., Szabadfi, K., Fabian, E., Kiss, P. et al (2012). Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neuroscience letters*, 523(2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.06.044>.
- Szabó, K., Énzsöly, A., Dékány, B., Szabó, A., Hajdú, R. I., Radovits, T et al. (2017). Histological Evaluation of Diabetic Neurodegeneration in the Retina of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rats. *Scientific reports*, 7(1), 8891.
- Telegina, D. V., Kolosova, N. G., & Kozhevnikova, O. S. (2019). Immunohistochemical localization of NGF, BDNF, and their receptors in a normal and AMD-like rat retina. *BMC medical genomics*, 12(Suppl 2), 48. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0493-8>.
- Terzibasi, E., Calamusa, M., Novelli, E., Domenici, L., Strettoi, E., & Cellerino, A. (2009). Age-dependent remodelling of retinal circuitry. *Neurobiology of aging*, 30(5), 819–828. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.017>.
- Terzibasi, E., Valenzano, D. R., & Cellerino, A. (2007). The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. *Experimental gerontology*, 42(1-2), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.06.039>.
- Trotta, M. C., Gharbia, S., Herman, H., Mladin, B., Hermenean, A., Balta, C. et al (2021). Sex and Age-Related Differences in Neuroinflammation and Apoptosis in Balb/c Mice Retina Involve Resolvin D1. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6280. <https://doi.org/10.3390/ijms22126280>.

- Van, C., Condro, M. C., Ko, H. H., Hoang, A. Q., Zhu, R., Lov, K. et al (2021). Targeted deletion of PAC1 receptors in retinal neurons enhances neuron loss and axonopathy in a model of multiple sclerosis and optic neuritis. *Neurobiology of disease*, 160, 105524. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105524>.
- Van Kirk, C. A., VanGuilder, H. D., Young, M., Farley, J. A., Sonntag, W. E., & Freeman, W. M. (2011). Age-related alterations in retinal neurovascular and inflammatory transcripts. *Molecular vision*, 17, 1261–1274.
- Vasilaki, A., & Thermos, K. (2009). Somatostatin analogues as therapeutics in retinal disease. *Pharmacology & therapeutics*, 122(3), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.03.010>.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O. et al (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological reviews*, 61(3), 283–357. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>.
- Vaudry, D., Gonzalez, B. J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., & Vaudry, H. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacological reviews*, 52(2), 269–324.
- Versaux-Botteri, C., Martin-Martinelli, E., Nguyen-Legros, J., Geffard, M., Vigny, A., & Denoroy, L. (1986). Regional specialization of the rat retina: catecholamine-containing amacrine cell characterization and distribution. *The Journal of comparative neurology*, 243(3), 422–433. <https://doi.org/10.1002/cne.902430311>.
- Voigt T. (1986). Cholinergic amacrine cells in the rat retina. *The Journal of comparative neurology*, 248(1), 19–35. <https://doi.org/10.1002/cne.902480103>.
- Voigt, T., & Wässle, H. (1987). Dopaminergic innervation of A II amacrine cells in mammalian retina. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 7(12), 4115–4128. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-12-04115.1987>.
- Völgyi, B., Pollak, E., Buzás, P., & Gábel, R. (1997). Calretinin in neurochemically well-defined cell populations of rabbit retina. *Brain research*, 763(1), 79–86. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00405-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00405-8).
- Wang, A. L., Lukas, T. J., Yuan, M., & Neufeld, A. H. (2010). Age-related increase in mitochondrial DNA damage and loss of DNA repair capacity in the neural retina. *Neurobiology of aging*, 31(11), 2002–2010. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.10.019>.
- Wang, G., Pan, J., Tan, Y. Y., Sun, X. K., Zhang, Y. F., Zhou, H. Y. et al (2008). Neuroprotective effects of PACAP27 in mice model of Parkinson's disease involved in the modulation of K(ATP)

- subunits and D2 receptors in the striatum. *Neuropeptides*, 42(3), 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2008.03.002>.
- Wang, J., Sun, Z., Shen, J., Wu, D., Liu, F., Yang, R. et al (2015). Octreotide Protects the Mouse Retina against Ischemic Reperfusion Injury through Regulation of Antioxidation and Activation of NF- κ B. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, 970156. <https://doi.org/10.1155/2015/970156>.
- Wang, J., Zhao, J., Cui, X., Mysona, B. A., Navneet, S., Saul, A. et al (2019). The molecular chaperone sigma 1 receptor mediates rescue of retinal cone photoreceptor cells via modulation of NRF2. *Free radical biology & medicine*, 134, 604–616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.001>.
- Wang, L., Klingeborn, M., Travis, A. M., Hao, Y., Arshavsky, V. Y., & Gospe, S. M., 3rd (2020). Progressive optic atrophy in a retinal ganglion cell-specific mouse model of complex I deficiency. *Scientific reports*, 10(1), 16326. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73353-0>.
- Wässle, H., Grünert, U., & Röhrenbeck, J. (1993). Immunocytochemical staining of AII-amacrine cells in the rat retina with antibodies against parvalbumin. *The Journal of comparative neurology*, 332(4), 407–420. <https://doi.org/10.1002/cne.903320403>.
- Wässle, H., Grünert, U., Chun, M. H., & Boycott, B. B. (1995). The rod pathway of the macaque monkey retina: identification of AII-amacrine cells with antibodies against calretinin. *The Journal of comparative neurology*, 361(3), 537–551. <https://doi.org/10.1002/cne.903610315>.
- Weisse I. (1995). Changes in the aging rat retina. *Ophthalmic research*, 27 Suppl 1, 154–163. <https://doi.org/10.1159/000267862>.
- Werling, D., Reglodi, D., Kiss, P., Toth, G., Szabadfi, K., Tamas, A. et al. (2014). Investigation of PACAP Fragments and Related Peptides in Chronic Retinal Hypoperfusion. *Journal of ophthalmology*, 2014, 563812. <https://doi.org/10.1155/2014/563812>.
- Wu, K. H., Madigan, M. C., Billson, F. A., & Penfold, P. L. (2003). Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis. *The British journal of ophthalmology*, 87(9), 1159–1166. <https://doi.org/10.1136/bjo.87.9.1159>.
- Xiang, M., Zhou, L., Macke, J. P., Yoshioka, T., Hendry, S. H., Eddy, R. L. et al. (1995). The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(7 Pt 1), 4762–4785. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-07-04762.1995>.

- Xu, H., Chen, M., & Forrester, J. V. (2009). Para-inflammation in the aging retina. *Progress in retinal and eye research*, 28(5), 348–368. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.06.001>.
- Yang, Y., Liu, W., Sun, K., Jiang, L., & Zhu, X. (2019). Tmem30a deficiency leads to retinal rod bipolar cell degeneration. *Journal of neurochemistry*, 148(3), 400–412. <https://doi.org/10.1111/jnc.14643>.
- Zeng, Y., & Yang, K. (2015). Sirtuin 1 participates in the process of age-related retinal degeneration. *Biochemical and biophysical research communications*, 468(1-2), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.139>.
- Zhang, X., Tenerelli, K., Wu, S., Xia, X., Yokota, S., Sun, C. et al (2020). Cell transplantation of retinal ganglion cells derived from hESCs. *Restorative neurology and neuroscience*, 38(2), 131–140. <https://doi.org/10.3233/RNN-190941>.
- Zia, A., Pourbagher-Shahri, A. M., Farkhondeh, T., & Samarghandian, S. (2021). Molecular and cellular pathways contributing to brain aging. *Behavioral and brain functions: BBF*, 17(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12993-021-00179-9>.

9. Köszönetnyilvánítás

Jelen disszertáció elkészülése nem valósulhatott volna meg számos munkatárs, barát, családtag támogatása és feltétel nélküli segítsége nélkül, melyet ezúton szeretnék külön megköszönni.

Kiemelt hálával tartozom **Prof. Dr. Gábrriel Róbert** egyetemi tanárnak, témavezetőmnek és egyben a PTE TTK Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola vezetőjének. Páratlan szakmai ismerete és belém vetett végtelen bizalma által ismerkedhettem meg a retina kutatással, melyet neki köszönhetően szerettem meg és amit a továbbiakban is szeretnék folytatni.

Köszönettel tartozom **Dr. Kovács-Valasek Andrea** egyetemi adjunktusnak aki szakmai tudásával és biztató, baráti támogatásával végig segítette munkámat.

Köszönet illeti **Dr. Dénes Viktória** egyetemi docenst, aki szakmai tanácsai és útmutatásai hozzájárultak a munkámhoz.

Köszönettel tartozom továbbá, **Ifj. Dr. Sétáló György** egyetemi docensnek a konfokális mikroszkóppal való munkában biztosított segítségéért.

Szeretném megköszönni **Dr. Völgyi Béla** egyetemi tanárnak, aki lehetőséget teremtett arra, hogy végig vihessem doktori munkámat.

Külön köszönettel tartozom munkatársaimnak **Bolboaca Alinának, Dr. Ganczer Almának, Antalné Hegyi Marikának** akik a szakmai segítségen túl, mint barát is mellettem álltak végig a dolgozat elkészülése során.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak és a páromnak, akik a PhD éveim alatt minden nehézségek ellenére is végig hittek bennem és mindvégig támogattak.

A dolgozatom elkészülése minden megemlítésre került személy érdeme is.

Disszertációmat **Dr. Szabadfi Krisztina** és szeretett édesapám, **Pöstyéni Sándor** emlékére ajánlom.

10. Saját publikációk

10.1. MTMT közlemény és idéző összefoglaló táblázat

MTMT közlemény és idéző összefoglaló táblázat				
Pöstyéni Etelka adatai (2022.04.20)				
Közlemény típusok	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összes	Részletezve	Független	Összes
Tudományos közlemények				
I. Tudományos folyóiratcikk	12	---	---	---
külföldi kiadású szakfolyóiratban idegen nyelven	---	11	17	21
külföldi kiadású szakfolyóiratban magyar nyelven	---	0	0	0
hazai kiadású szakfolyóiratban idegen nyelven	---	0	0	0
hazai kiadású szakfolyóiratban magyar nyelven	---	1	0	0
II. Könyvek	0	---	---	---
a) Könyv, szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
b) Könyv, szerkesztőként²	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény folyóiratban vagy konferenciakötetben	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Közlemények összesen (I.-IV.)	12	---	17	21
Absztrakt³	0	---	0	0
Kutatási adat	0	---	0	0
További tudományos művek⁴	0	---	0	0
Összes tudományos közlemény	12	---	17	21
Hirsch index⁵	3	---	---	---
Oktatási művek	0	---	---	---
Felsőoktatási művek	0	---	---	---
Felsőoktatási tankönyv idegen nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része idegen nyelven	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része magyar nyelven	---	0	0	0
Oktatási anyag	0	---	0	0
Oltalmi formák	0	---	0	0

Alkotás	0	---	0	0
Ismeretterjesztő művek	0	---	---	---
Folyóiratcikk		0	0	0
Könyvek	---	0	0	0
További ismeretterjesztő művek	---	0	0	0
Közérdekű vagy nem besorolt művek⁶	0	---	0	0
További közlemények⁷	0		0	0
Egyéb szerzőség⁸	0	---	0	0
Idézők szerkesztett művekre	---	---	0	0
Idézők disszertációban, egyéb típusban	---	---	0	0
Összes közlemény és összes idézőik	12	---	17	21

Összesített impakt faktor: 48,22

Megjegyzések
A táblázat számai hivatkozások is. A számra kattintva a program listázza azokat a műveket, amelyeket a cellában összeszámlált.
--- : Nem kitölthető cella
¹ A hivatkozások a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül számolva. A disszertáció és egyéb típusú idézők összesítve a táblázat végén található.
² Szerkesztőként nem részesedik a könyv idézéséből
³ Csak a tudományos jellegű absztraktok.
⁴ Minden további még el nem számolt tudományos mű (kivéve alkotás vagy oltalmi forma), ahol a szerző: szerző, szerkesztő, kritikai vagy forráskiadás készítője szerzőségű.
⁵ A disszertációk és egyéb típusú idézők nélkül számolva. A sor értéke az "Összes tudományos közlemény" sor idézettségi adatait veszi alapul.
⁶ Minden Közérdekű, Nem besorolt jellegű közlemény, ahol a szerző nem egyéb szerzőségű szerző.
⁷ Ide értve minden olyan művet, mely a táblázat más, nevesített soraiban nem került összeszámlálásra.
⁸ Minden olyan egyéb szerzőségű mű, ahol a szerző nem: szerző, szerkesztő, kritikai vagy forráskiadás készítője szerzőségű.

10.2. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

Pöstyéni E., Kovács-Valasek A., Dénes V., Mester A., Sétáló G. Jr, & Gábrriel R. (2021). PACAP for Retinal Health: Model for Cellular Aging and Rescue. *International journal of molecular sciences*,22(1), 444. <https://doi.org/10.3390/ijms22010444>.

Kovács-Valasek A., **Pöstyéni E.**, Dénes V., Mester A., Sétáló G. Jr, & Gábrriel R. (2021). Age-Related Alterations of Proteins in Albino Wistar Rat Retina. *Cells, tissues, organs*, 210(2), 135–150. <https://doi.org/10.1159/000515447>.

Gábrriel R., **Pöstyéni E.**, & Dénes V. (2019). Neuroprotective Potential of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide in Retinal Degenerations of Metabolic Origin. *Frontiers in neuroscience*, 13, 1031. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01031>.

10.3. A disszertációhoz kapcsolódó konferenciaközlemények

Pöstyéni E., Mester A, Stefanov A, Dénes V& Gábrriel R (2019). Correlation of PAC1 receptor isoforms (HIP, HOP1) and mir137, mir147 expression during postnatal development in rat retina. Fens Regional meeting 2019, Belgrád, Szerbia.

10.4. Egyéb tudományos közlemények

Pöstyéni E., Ganczer A., Kovács-Valasek A., & Gabriel R. (2022). Relevance of Peptide Homeostasis in Metabolic Retinal Degenerative Disorders: Curative Potential in Genetically Modified Mice. *Frontiers in pharmacology*, 12, 808315. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.808315>.

Pöstyéni E., Szabadfi K., Sétáló G. Jr, & Gabriel R. (2021). A Promising Combination: PACAP and PARP Inhibitor Have Therapeutic Potential in Models of Diabetic and Hypertensive Retinopathies. *Cells*, 10(12), 3470. <https://doi.org/10.3390/cells10123470>.

Kovesdi E., Ripszam R., **Postyeni E.**, Horvath E. B., Kelemen A., Fabos B., Farkas V., Hadzsiev K., Sumegi K., Magyari L., Moreno P. G., Bauer P., & Melegh B. (2021). Whole Exome Sequencing in a Series of Patients with a Clinical Diagnosis of Tuberous Sclerosis Not Confirmed by Targeted TSC1/TSC2 Sequencing. *Genes*, 12(9), 1401. <https://doi.org/10.3390/genes1209140>.

Pöstyéni E., Kovács-Valasek A., Urbán P., Czuni L., Sétáló G. Jr, Fekete C., & Gabriel R. (2021). Profile of miR-23 Expression and Possible Role in Regulation of Glutamic Acid Decarboxylase during Postnatal Retinal Development. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 7078. <https://doi.org/10.3390/ijms22137078>.

Pöstyéni E., Kovács-Valasek A., Urbán P., Czuni L., Sétáló G. Jr, Fekete C., & Gabriel R. (2021). Analysis of mir-9 Expression Pattern in Rat Retina during Postnatal Development. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2577. <https://doi.org/10.3390/ijms22052577>.

Bánfai Z., Ádám V., **Pöstyéni E.**, Büki G., Czakó M., Miseta A., & Melegh B. (2018). Revealing the impact of the Caucasus region on the genetic legacy of Romani people from genome-wide data. *PloS one*, 13(9), e0202890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202890>.

Matyas P., **Postyeni E.**, Komlosi K., Szalai R., Bene J., Magyari L., Melegh B., & Hadzsiev K. (2019). Age-Related Hearing Impairment Associated NAT2, GRM7, GRHL2 Susceptibility Gene Polymorphisms and Haplotypes in Roma and Hungarian Populations. *Pathology oncology research : POR*, 25(4), 1349–1355. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0388-6>.

Mátyás P.; **Pöstyéni E.**; Komlósi K.; Szalai R.; Bene J.; Magyar L.; Melegh B.; Hadzsiev K. (2018). Halláskárosodásban részt vevő NAT2, GRM7, GRHL2 hajlamosító polimorfizmusok és haplotípusok roma és magyar populációban. *NÉPEGÉSZSÉGÜGY* 96 : 1 pp. 51-58. , 8 p.

Hadzsiev K., Komlosi K., Czako M., Duga B., Szalai R., Szabo A., **Postyeni E.**, Szabo T., Kosztolanyi G., & Melegh B. (2016). Kleefstra syndrome in Hungarian patients: additional symptoms besides the classic phenotype. *Molecular cytogenetics*, 9, 22. <https://doi.org/10.1186/s13039-016-0231-2>.

10.5. Egyéb konferencia közlemények

Pöstyéni E, Kovács-Valasek A, Urban P, Bolboaca A, Fekete Cs& Gábrriel R (2019). Analysis of mir-9 and mir-23a expression pattern in postnatal rat retina. ERM 2019, Helsinki, Finnország.

Mester A, **Pöstyéni E**, Gábrriel R (2019). Retinal glutamate transporters (vGlut1, EAAT5) in rod bipolar cells of four mammalian species. FENS 2019, Belgrád, Szerbia.

Komlósi K, Hadzsiev K, Haack T, **Pöstyéni E**, Bene J, Szabó A, Czakó M, Fónai F, Meitinger T, Melegh B (2015). Exome sequencing identifies TMEM70 deficiency in Hungarian Roma family with severe congenital lactic acidosis. Meeting of the European Society of Human Genetics, Glasgow, June 2015.