

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

PÉCS, 2022.

1. Bevezetés

1.1. Az emlős retina szerkezete

A retina a szem legbelső rétegében elhelyezkedő, lamináris szerveződésű fényérzékeny szövet, amely a központi idegrendszer részét képezi. A retinát alkotó főbb sejtípusok közül a vertikális információtovábbításban vesznek részt a fotoreceptorok (pálcika, csap), a bipoláris sejtek és a ganglion sejtek, mely utóbbi sejtípus axon kötegei hozzák létre a vakfoltnál kilépő, a látóközpontok felé haladó látóideget. A horizontális kapcsolatok kialakításában további interneuronok, név szerint az amakrin és a horizontális sejtek vesznek részt. A felsorolt idegsejtek sejttestjei és az általuk kialakított szinapszisok három magvas, illetve kettő szinaptikus kapcsolatokat is tartalmazó (ún. plexiform) rétegbe szerveződnek a retinában. A rétegek kívülről befelé haladva a következőképpen helyezkednek el: PE - pigment epithelium, ONL - külső magvas réteg, OPL - külső plexiform réteg, INL - belső magvas réteg, IPL - belső plexiform réteg; GCL - ganglionsejtek rétege. 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. A horizontális sejtek az OPL-ben γ -amino-vajsavat (GABA) tartalmazó kémiai szinapszisok segítségével továbbítják az információt a bipoláris sejtek felé. 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. A nyúlványaik arborizációja alapján keskeny, közepes és széles dendritmezejű amakrin sejteket különböztetünk meg. Többségében GABA, illetve glicin gátló neurotranszmitterek segítségével vesznek részt az információáramlás befolyásolásában, illetve egyes GABAerg amakrin sejtek acetilkolin és dopamint is szintetizálhatnak. A felsorolt sejtcsoportokon kívül a gliasejtek struktúrális és metabolikus szempontból is jelentős szerepet töltenek be a retina működésében és

felépítésében. Három főbb gliasejt típus található meg az emlős retinában: a makrogliaák csoportjához tartozó asztrocita és Müller sejt, illetve a mikroglia.

1.2. Az öregedés és az öregedő retina

Az öregedés egy komplex, 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 együttesen fejtik ki hatásukat a szervezet egészére. Ezt a 7-10 egymással átfedő folyamatot többféle modellel illetve stratégia szerint is igyekeznek csoportosítani. Az öregedési folyamatok jellemző komponensei közé soroljuk a metabolikus diszfunkciót, a mitokondriális diszfunkciót, a sejten belüli kommunikáció megváltozását, a sejtek öregedését, a telomerek biológiáját, a genominstabilitást, a proteosztázis elvesztését, az őssejtek kimerülését, az epigenetikai hatásokat és a tápanyag érzékelés megváltozását is. Az öregedés folyamatának háttérében álló okokat eredetük szerint kategóriákba sorolják, mint: elsődleges (amelyek az öregedéshez köthető károsodások közvetlen kiváltó okai); antagonisták (a károsodásokra adott válaszokat foglalják magukba); integratív (amelyek a fent említett válaszok következményeit és az öregedés fenotípusának kialakításáért felelős tényezőket foglalják magukba) (López-Ótin és mtsai., 2013). A folyamat feltérképezésére rendkívül széles palettáját alkalmazzák az általánosabban használt kísérleti modelleknek. Az alkalmazott kísérleti állatok közül az egér és a patkány modellállatként való felhasználása a legelterjedtebb az öregedési vizsgálatokban. A transzgenikus állatmodellek alkalmazása pedig utat nyitott olyan további lehetőségeknek, melyek révén az öregedést kísérő biológiai mechanizmusok alapjául szolgáló különböző expressziós mintázatok befolyásolhatóak és alapvető szerepük a folyamatban így direkt, rendszerszinten vizsgálható.

A retinát több tényező is együttesen kiszolgáltatottá teszi a különböző behatásokkal/változásokkal szemben, mint például, hogy pontos működéséhez elengedhetetlen a szerkezeti integritásának és az összetett szinaptikus hálózatának

fenntartása. Mindemellett magas a metabolikus aktivitása, illetve a regeneratív kapacitása is csak korlátozott. Az öregedés során a retinára legjellemzőbb morfológiai módosulás a rétegek vastagságának a csökkenése, amelynek háttérében a sejtek denzitásában, a közöttük lévő szinaptikus kapcsolatok megoszlásában fellépő eltérés állhat (Weisse és mtsai., 1995; Samuel és mtsai., 2011; Nadal-Nicholás és mtsai., 2018; Mohamed és mtsai., 2019). A morfológiai változások szoros kapcsolatban vannak a fellépő funkcionális eltérésekkel, és ez az elektroretinogramon megjelenő, életkorfüggő változásokon keresztül is nyomon követhető (Birch és mtsai., 1992; DiLoreto és mtsai., 1995; Freund és mtsai., 2011; Samuel és mtsai., 2011). Ezen eltérések háttérben meghúzódó öregedési komponensek a retinában, az RPE-ben és a retinát ellátó erekben is kimutatásra kerültek az öregedés során.

1.3. Neuropeptidok a retinában

A neuropeptidok nagy számban fejeződnek ki a retinában, illetve receptoraik jelenlétével annak élettani folyamatait is befolyásolják (Casini és mtsai., 2005; Cervia és Casini, 2013; Cervia és mtsai., 2019). A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, közismert nevén PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide), a VIP/szekretin/glükagon peptid szupercsaládnhoz tartozik és két természetes formája ismert, a PACAP-38 és a PACAP-27, melyek közül a 38 aminosav hosszú változat előfordulása a gerincesekben jellemzőbb (Miyata és mtsai., 1989; Arimura és Shioda, 1995; Vaudry és mtsai., 2009). A retinában a PACAP a GCL egyes sejttestjeiben, illetve az amakrin és horizontális sejtekben fejeződik ki (Izumi és mtsai., 2000; Dénes és mtsai., 2014). 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 (Kovács-Valasek és mtsai., 2017). A szomatosztatin (SST) esetében is két biológiailag aktív formát tudunk megkülönböztetni (SST-14, SST-28), illetve ez a peptid is több különböző, hét transzmembrándoménből álló G-protein kapcsolt receptoron (SST-1, SST-2, SST-3, SST-4, SST-5) keresztül fejt ki pleiotropikus hatását (Günther és mtsai., 2018).

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). Expressziójának csökkenése szerepet játszik pl. a diabéteszt kísérő retinális neurodegeneratív folyamatokban (Carrasco és mtsai., 2007; Hernández és mtsai., 2014).

2. Célkitűzés

Az öregedés által befolyásolt számos fiziológiás folyamat, illetve a retina különös kiszolgáltatottsága ezekkel szemben több fontos és megválaszolendő kérdést felvet a retina öregedésével kapcsolatban. Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy az öregedéssel egyes neuropeptidok elérhető mennyisége a szervezetben csökken, amely fontos résztvevője a különböző szervezet szinten jelentkező károsodásoknak.

Dolgozatom célkitűzése, hogy két különböző 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 kívántuk azonosítani 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 egermodellben a TH-pozitív és az SST pozitív sejtek denzitásának változását krónikus PACAP kezelés hatására az öregedés során. Az öregedést kísérő sejtdenzitás változások befolyásolása mellett az esetlegesen fellépő szinergikus kölcsönhatás felismerése is a céljaink közé tartozott.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok tartása és kezelése

Kutatásaink során két öregedés modellt vizsgáltunk. Az egyik modellben Wistar albino patkányokat, míg másikban C57Bl/6JdT_{Tomato} 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 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). A transzgenikus egerek az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetből származnak és az ottani állatházban kerültek tartásra, továbbá az állatok szemének PACAP-pal történő intravitrealis injekciója is ott valósult meg. Vizsgálataink során három korcsoportot különítettük el egymástól: 6 hónapos, 12 hónapos, 18 hónapos. 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. A kezelés során 33G-s tűvel ellátott Hamilton fecskendő (10µl) segítségével injektáltunk az egyik szemükbe PACAP1-38-at (100 pmol) a másik szemükbe pedig ugyanakkora mennyiségben fiziológiás sóoldatot (0,9% NaCl).

3.2. Morfológiai és morfometriai vizsgálatok

A Wistar patkány modell esetén a szemek kipreparálását követően szemserleg preparátumot készítettünk. A preparátumot másnapig 1%-os glutáraldehydes-PFA-ban fixáltuk. A fixálást követően a mintát foszfát-pufferben mostuk, majd felszálló alkoholsorozatban dehidráltuk. Ezt követően először propilén-oxidban, majd 30 percig gyanta és propilén-oxid 1:1 arányú keverékében inkubáltuk. Ezután négy komponensből álló Durcupan gyantában hagytuk egy éjszakán át 4°C-on. A harmadik napon a preparátumokat gyanta-blokkokba ágyasztuk, amiket minimum 36 órán át 56°C-on hagytunk polimerizálódni. A kész blokkokból félvékony metszeteket készítettünk ultramikrotómmal, ezután tárgylemezre helyezve 1%-os toluidinkékkel festettük és DPX fedőanyaggal lefedtük. A retina metszetekről

fotókat készítettünk Nikon Eclipse 80i mikroszkóphoz kapcsolt CCD kamera segítségével és morfológiai illetve morfometriai analízist végeztünk. A SPOT Basic program (Spot Basic 4.04) alkalmazásával több paramétert is vizsgáltunk.

3.3. Immunhisztokémiai eljárások

3.3.1. Normál öregedési modell

A metszetek elkészítése mindkét állatmodellben azonos módon történt. A kipreparált retinát 4%-os PFA-s fixálást követően mostuk NaCl-os foszfát pufferben, majd süllyedésig inkubáltuk 15%-os majd 30%-os szaharóz oldatban. A retina preparátumokat fagyasztva metszettük le kriosztát készülék segítségével, majd a 10-12 µm-es metszeteket tárgylemezre helyeztük. Az immunhisztokémiai eljárás megkezdésekor a metszeteket rehidráltuk, majd normál kecske szérummal blokkoltuk 1 órát. Ebben a kísérletsorozatban több eltérő primer antitestet (anti-Brn3a, anti-PNA, anti-PKC α , anti-calbinid, anti-calretinin, anti-parvalbumin, anti-GFAP, anti-vGlut1, anti-TH) is alkalmaztunk a patkány retinán. A normál öregedés modellünkben primer antitestekre specifikus szekunder antitestként Alexa Fluor „488” és „568” fluorescens markereket használtunk. A fotókat Olympus IX81 invers platform típusú mikroszkóppal, Olympus Fluorview FV-1000 konfokális rendszer segítségével készítettük el a normál és a transzgenikus öregedés modellben is.

3.3.2. Transzgenikus egérmodellben

A transzgenikus egér modellünk validálása érdekében a retina metszeteken SST illetve TH primer antitestet használtunk. A primer antitestre specifikus szekunder antitestként Alexa Fluor „488” fluoreszcens antitestet alkalmaztunk.

A transzgenikus egér retina teljes (wholemout) preparátumok esetében 4%-os PFA fixálást követően sztereomikroszkóp alatt, PBS pufferes közegben az ínhártyát a retináról eltávolítottuk. Ezután a retinát PBS pufferben mostuk majd TritonX-ABS-ben blokkoltuk. A preparátumokat 4°C-on anti-TH antitestel inkubáltuk 72 órán keresztül rázógépből, majd az inkubálási idő leteltével TritonX-PBS-ben

mostuk. Alexa Fluor „488” szekunder antitesttel 24 órán keresztül 4°C-on inkubáltuk rázógépen.

3.4. Western blot analízis

A patkány retinákat RIPA pufferben homogenizáltuk. Ezután a fehérje koncentrációt BCA Protein Assay Kit felhasználásával spektrofotométer segítségével meghatároztuk, standardként BSA-t használva. A fehérje elektroforézis NuPage SDS poliakrilamid gélen történt, majd PVDF membránra transzferáltuk a fehérjéket. A transzfer után szárítottuk a membránt szobahőmérsékleten és ezt követően blokkoló oldattal inkubáltuk szobahőmérsékleten rázógépen. A membránt ezután primer antitesttel inkubáltuk (anti-calbindin; anti-calretinin; anti-parvalbumin; anti-PKC α , anti-TH, anti-GFAP, anti-VGLUT1). A normalizációs kontrollként GAPDH-t alkalmaztunk. Egy éjszakás inkubációt követően a membránokat TBST pufferrel mostuk, ezt követte a tormaperoxidáz-konjugált szekunder antitesttel való inkubálás. A különböző fehérjék esetében megjelenő sávok (band) optikai denzitása a 12 hónapos korosztály értékeire normalizáltuk, a relatív fehérje expressziót belső kontrollként alkalmazott GAPDH segítségével határoztuk meg. A detektáláshoz WesternBright ECL HRP substrate kitet használtunk és Chemi DOC System segítségével képfelvételeket készítettünk.

4. Eredmények

4.1. Normál öregedés modell

4.1.1 Morfológiai és morfometriai vizsgálatok

Az idő múlásával a retina rétegeinek szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető, különös tekintettel az IPL-re. A magvas sejtrétegek közül az ONL-ben volt a legjelentősebb a vastagság csökkenése. A GCL-ben a ganglion sejtek számának fokozatos csökkenését tapasztaltuk az öregedés során, az ONL-ben pedig a csapok számának csökkenését észleltük az idő előrehaladtával.

4.1.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok

A bipoláris sejteket jelölő PKC α intenzitása kezdetben a fiatalabb korosztály retináiban gyengébb volt, majd szinte változatlan maradt az utolsó két korcsoportban. A horizontális sejteket jelölő calbindin jelölődés intenzitása az idő előrehaladtával csökkent. A calretinin expressziója az IPL-ben gyengébben nyilvánult meg az 5 hónapos retináknban, mint a későbbi korosztályokban. A parvalbumin jelölés intenzitása kezdetben növekedett, majd végül csökkenést mutatott a legidősebb korcsoportban. Az öregedéssel kísérletünkben a dopaminerg sejtek TH expressziója az egyéves korosztályban érte el a maximumát, majd ezt követően csökkent. Vizsgálataink során az általunk vizsgált glutamát transzporter, a vGlut1 expressziója kismértékű csökkenő tendenciát mutatott az öregedés során. Kezdetben a Müller gliákban jelölődő GFAP alacsony expressziót mutatott, majd az egyéves korosztályban már magasabb expresszióval jelentkezett, amely idősebb korcsoportokban ismét lecsökkent.

4.2. A krónikus PACAP kezelés hatása transzgenikus egér retina öregedésére

4.2.1. A transzgenikus egér modell validálása

A fluoreszkáló sejtek SST pozitivitásának megerősítésére kettős jelölést végeztünk zöld fluoreszcenciával előhívott anti-SST antitest segítségével. Továbbiakban meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy elválaszthatóak-e egymástól egyértelműen a különböző amakrin sejt populációk és nem fed-e 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.

4.2.2. A PACAP kezelés hatására bekövetkező sejtdenzitás változások retináiban

A fiziológias sóoldattal kezelt transzgenikus egér 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. A területi összehasonlítás során azt tapasztaltuk, hogy a perifériás területeken magasabb

számban jelennek meg az SST tartalmú sejtek a centrális területekhez képest. A PACAP kezelés hatása először a 12 hónapos korosztálynál nyilvánult meg, ahol mind a TH- mind pedig az SST-pozitív sejtek csökkenése mérséklődött.

5. Összefoglalás

Az idő múlása mind a retina rétegeinek vastagságában, mind pedig az azokat alkotó sejtek denzitásában, megjelenésében változást eredményezett.

1. Morfológiai és morfometriai eredményeinkkel bizonyítottuk a retinális rétegek vastagságának természetes öregedés során fellépő csökkenését, melyek közül az IPL és az ONL rétegvastagságának csökkenése volt a legjelentősebb. Emellett sikerült rávilágítanunk a ganglion sejtek és a csapok számának szignifikáns csökkenésére az öregedés során.

2. Immunhisztokémiai vizsgálatainkban megmutattuk, hogy az általunk alkalmazott retinális markereket expressziójuk alapján három csoportba tudjuk sorolni a következők szerint: csökkenő expressziót mutatók (PNA, Brn3a), időközi kiugrást mutatók (TH, parvalbumin, calretinin, GFAP) és változást csak kismértékben mutatók (calbindin, PKC α , vGlut1).

3. Vizsgálataink során az idő múlásával az SST pozitív amakrin és a TH pozitív dopaminerg sejtek denzitása csökkent a transzgenikus egerek retinaiban, amelyet PACAP intravitrealis injekálásával mérsékelni tudtunk. Az SST és a PACAP is a neuropeptidok széles családjához tartoznak és G-proteinhez kapcsolt receptoron keresztül fejtik ki hatásukat, melynek köszönhetően intracelluláris jelátviteli útvonaluk számos ponton átfed, így nem kizárt, hogy egymás hatását erősíteni képesek.

4. A szakirodalomból ismert tényezők és kísérleti eredményeink alapján felvázoltuk az öregedés lehetséges retinális mechanizmusait.

5. 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.

6. Felhasznált irodalom

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.

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.

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.

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.

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.

Cervia D., Catalani E., & Casini G. (2019). Neuroprotective Peptides in Retinal Disease. *Journal of clinical medicine*, 8(8), 1146.

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.

Dénes V., Czotter N., Lakk M., Berta G., & Gábor R. (2014). PAC1-expressing structures of neural retina alter their PAC1 isoform splicing during postnatal development. *Cell and tissue research*, 355(2), 279–288.

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.

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.

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.

- Hernández C., Simó-Servat O., & Simó R. (2014). Somatostatin and diabetic retinopathy: current concepts and new therapeutic perspectives. *Endocrine*, 46(2), 209–214.
- 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.
- 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.
- 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.
- López-Otín C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., & Kroemer G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Weisse I. (1995). Changes in the aging rat retina. *Ophthalmic research*, 27 Suppl 1, 154–163.

7. Publikációk jegyzéke

7.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

Pöstyéni E., Kovács-Valasek A., Dénes V., Mester A., Sétáló G., Jr, & Gábiel 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, & Gábiel 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>.

Gábiel 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>.

7.2. A disszertációhoz kapcsolódó konferenciaközlemények

Pöstyéni E., Mester A, Stefanov A, Dénes V& Gábiel 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.

7.3. 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., Magyar 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., Magyar 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 Petra; Pöstyéni Etelka; Komlósi Katalin; Szalai Renáta; Bene Judit; Magyar Lili; Melegh Béla; Hadzsiev Kinga. Halláskárosodásban részt vevő NAT2, GRM7, GRHL2 hajlamosító polimorfizmusok és haplotípusok roma és magyar populációban. *NÉPEGÉSZSÉGÜGY* 96 : 1 pp. 51-58. , 8 p. (2018)

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>.

7.4. 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.

Összesített impakt faktor: **48,22**

Független idézetek száma: **22**