

A PACAP és specifikus receptorának előfordulása, valamint protektív hatásának igazolása

Doktori (Ph.D.) értekezés

Patkó Evelin Viktória



Témavezető: Dr. Atlasz Tamás, egyetemi docens

Doktori Iskola vezetője: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Programvezető: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet

Pécs, 2024

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	7
1.1	A látószerv	7
1.1.1	A látószerv fejlődése	7
1.1.2	A látószerv felépítése	9
1.1.3	A szemgolyó és retina vérellátása	14
1.1.4	A csarnokvíz termelődése, keringése	17
1.2	A szem non-invazív vizsgálati módszerei <i>in vivo</i>	19
1.2.1	Elektroretinográfia	19
1.2.2	Optikai koherencia tomográfia	20
1.3	Glaukóma.....	21
1.3.1	Glaukóma típusok	21
1.3.2	Glaukóma állatmodellek	23
1.4	A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)	26
1.4.1	A PACAP hatásai	27
1.4.2	A PACAP receptorai	28
1.4.3	A PACAP és receptorainak előfordulása	29
1.4.4	A PACAP alkalmazási módszerei	30
2	Problémafelvetés	31
3	Célkitűzés.....	32
4	Kísérlet I. PACAP és PAC1-R előfordulása humán szemben	33
4.1	Anyagok és módszerek	33
4.1.1	Kísérleti minták és előkészítésük	33
4.1.2	A retina minták szövettani analízise	33
4.2	Eredmények	34
4.3	Diszkusszió	39

5	Kísérlet II. PACAP1-38 szemcseppkezelés erekre és hypoxiás állapotra gyakorolt hatása glaukóma állatmodellben	44
5.1	Kísérleti állatok.....	44
5.1.1	Mikrogyöngy-indukálta glaukóma modell.....	44
5.1.2	Szemnyomás monitorozása és a szemcseppes kezelés	45
5.1.3	Optikai koherencia tomográfia vizsgálat.....	45
5.1.4	Immunhisztokémia	46
5.1.5	Teljes retina preparátum.....	47
5.1.6	Erezettség változásainak vizsgálata	47
5.1.7	Western blot analízis	48
5.1.8	Statisztikai analízis.....	48
5.2	Eredmények.....	48
5.2.1	A PACAP szemcsepp hatása a szemnyomás változására	48
5.2.2	A PACAP szemcsepp hatása a retina szerkezetére	49
5.2.3	Az immunhisztokémiai jelölések eredményei.....	51
5.2.4	Az érezettség vizsgálat eredményei	53
5.2.5	Western blot eredményei.....	56
5.3	Diszkusszió.....	58
6	Konklúzió.....	63
7	Új eredmények összefoglalása.....	65
8	Irodalomjegyzék	66
9	Publikációs lista	84
9.1	Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények	84
9.2	Egyéb tudományos közlemények	84
10	Köszönetnyilvánítás	85

Rövidítések jegyzéke

Akt: protein kinase B; protein kináz B

BSA: bovine serum albumin, szarvasmarha szérumalbumin

cAMP: cyclic adenosine monophosphate, ciklikus adenzin-monofoszfát

cAMP: cyclic adenosine monophosphate; ciklikus 3',5'-adenozin-monofoszfát

CREB: cAMP response element-binding protein; cAMP-reszponzív elem kötő fehérje

DPPIV: dipeptidyl peptidase 4, dipeptidil-peptidáz IV enzim

ERG: electroretinography, elektroretinográfia

ERK: extracellular signal-regulated kinases; extracelluláris szignál-regulált kináz

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz

GCL: ganglion cell layer, stratum ganglionare, ganglionsejt réteg

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

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

GLP: glucagon-like peptide, glukagonszerű peptid

HIF1 α : hypoxia-inducible factor 1-alpha, hypoxia-indukálta factor 1-alfa

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

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

iNOS: inducible nitric oxide synthases; indukálható NO szintáz

IOP: intraocular pressure, belső szemnyomás

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

ipRGC: intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, melanopszin tartalmú retinális ganglionsejtek

IS: photoreceptor inner segment, fotoreceptor belső szegmens

JNK: c-Jun N-terminal kinases; c-Jun N-terminális kináz

mTOR: mammalian target of rapamycin

MYOC: myocilin

NDS: normal donkey serum, normál szamárszérum

NFkB: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; nukleáris faktor-kappa B

NFL: nerve fiber layer, idegrostok rétege

NOX-2: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase type 2; nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát oxidáz 2

OCT: optical coherence tomography, optikai koherencia tomográfia

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

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

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

OS: photoreceptor outer segment, fotoreceptor külső szegmens

p38: mitogen-activated protein kinases; mitogén-aktivált protein kináz

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

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

PBS: phosphate buffered saline, foszfát pufferelt sóoldat

PFA: paraformaldehyde, paraformaldehid

PHM: peptide histidine methionine, hisztidin-metionin peptid

PI: propidium iodide, propídium-jodid

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinases; foszfatidilinozitol-3-kináz

PKA: protein kinase A; protein kináz A

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

POAG: primary open angle glaucoma, elsődleges nyitott zugú glaukóma

ROS: reactive oxygen species; reaktív oxigén származékok

RPE: pigment epithelium, stratum pigmenti retinae, pigmenthám

SD: Sprague Dawley rat strain, Sprague Dawley patkánytörzs

SEM: standard error of the mean, középérték közepes hibája

TBS: tris-buffered saline, tris-szel pufferolt sóoldat

TNF α : tumor necrosis factor α ; tumor nekrosis faktor α

VEGF-A: vascular endothelial growth factor A, vascularis endotheliális növekedési faktor A

VIP: active intestinal peptide, vazoaktív intesztinális peptid

VPAC1: vasoactive intestinal peptide receptor type 1, vazoaktív intesztinális peptid receptor 1

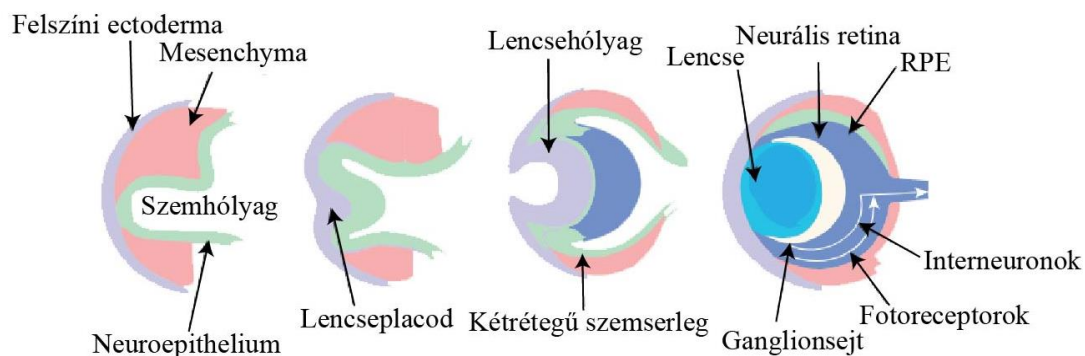
VPAC2: vasoactive intestinal peptide receptor type 2, vazoaktív intesztinális peptid receptor 2

1 Bevezetés

1.1 A látószerv

1.1.1 A látószerv fejlődése

A szemhólyag (*vesicula optica*) kialakulásának kezdete az embrionális fejlődés 22. napjára tehető. A folyamat a velőcső záródásával párhuzamosan, az előagy kitüremkedéseként indul (1. ábra). Az előrenyúló szemhólyag a felszíni ectodermával érintkezésbe kerülve a lencse fejlődését, a szemhólyag beöblösödése pedig a dupla falú szemserleg (*calix opticus*) kialakulását indítja el. A *fissura choroidea* széleinek egyesülése a leendő pupilla formálásában vesz részt. A felszíni ectoderma sejtjei a szemhólyaggal érintkezésbe kerülve alakítják a lencseplacodot, amely betűródve létrehozza a lencsehólyagot (1. ábra). Az embrionális fejlődés ötödik hetében a lencsehólyag az ektodermáról lefűződve a szemserleg szájadékába kerül (Sadler, 2000).



1. ábra: A szem fejlődése. Az előagy kitüremkedéseként előrenyúló szemhólyag a felszíni ectodermával érintkezve a lencseplacod, a szemhólyag beöblösödése pedig a duplafalú szemserleg fejlődését indítja el. A szemserleg külső egysége a retina pigmenthámját, a belső felszíne pedig a pars optica retinaet adja (RPE: pigmenthám). (Graw, 2010).

A szemserleg külső, pigment granulumokat tartalmazó rétege, a retina pigment epitheliumát hozza létre. A szemserleg belső rétegeinek fejlődése a pars optica retinaeből indul. Az intraretinális teret határoló sejtek fotoszenzitív pálcika- és csap fotoreceptorokká differenciálódnak. A további belső rétegekből a retina ideg és támasztósejtjei fejlődnek ki a külső magvas-, a belső magvas- és a ganglionsejt rétegben. A belső felszíni idegsejtek axonjainak kötege a mélyebb rétegeken áthatolva a látóideget hozzák létre. A retina anterior, belső rétege alakítja ki a pars caeca retinae-t, amely később szétválik pars iridica retinae-re és

pars ciliaris retinae-re, előbbi később az iris belső rétegévé, utóbbi pedig sugártestté fejlődik. Mindeközben a szemserleg és a külső epithelium réteg között található teret mesenchyma tölti ki. A szemserleg ektoderma rétegéből fejlődik ki a m. (musculus) sphincter- és m. dilatator pupillae. A pars ciliaris retinae-t kívülről a mesenchyma alkotta ciliáris izmok, belülről pedig elasztikus rostokat tartalmazó ligamentum suspensorium határolja. A ciliáris izmok megfeszülése a ligamentumok függesztésével később a lencse görbületét szabályozza. A lencsehólyag kialakulását követően, a hátulsó sejtek megnyúlva és hosszú rosthálózatot képezve kitöltik a teret. A hetedik hetet követően az elsődleges lencserostok elérik a lencsehólyag elülső falát. Az ötödik hét végén a szem primordiumot teljesen körülölelő laza mesenchyma egy belső és egy külső réteggé differenciálódik, amely analógiát mutat az agy pia- és dura mater rétegeivel. A belső rétegből az erősen erezett, pigmentált choroidea, a külső rétegből pedig a sclera jön létre. A mesenchyma vakuolizációjának és szétválásának eredményeként kialakul a szem elülső csarnoka, a belső réteg a lencse és az iris elülső szegmensét, a külső réteg pedig a cornea substantia propria rétegét alakítja ki, amely a scleraba kapcsolódik. A cornea felszíni ektodermából származó epithelium réteggel, a substantia propriat/stromat és az elülső csarnokot határoló epithelium réteggel rendelkezik. A lencse előtt található iridopupilláris membrán eltűnik. Az iris mögött található hátulsó csarnok a csarnokvízen keresztül kapcsolatban áll az elülső csarnokkal. Az áramló csarnokvíz látja el oxigénnel és tápanyagokkal az érmentes corneat és lencsét. A folyadék végül a Schlemm csatornán keresztül hagyja el a szemet. A mesenchyma a fissura choroidean keresztül a szemserlegbe lép és kialakítja hyaloid eret, amely a retina belső érhálózatát, köztük a centrális artériát hozza létre. A mesenchyma hálózatának intersticiális terében a zselatinszerű, áttetsző üvegtest jön létre. A hyaloid ér az embrionális fejlődés során felszívódva hyaloid csatornává alakul. A látóideg összekapcsolja a szemserleget az aggyal (szemserlegnyél), amely a fissura choroidean egy benyomatot képez. Ezen a benyomaton keresztül haladnak át a hyaloid erek. A hetedik hét folyamán a fissura choroidea bezáródik és egy szűk csatornát, a szemserlegnyelet hozza létre. Az idegrostok számának növekedése folyamán a szemserlegnyél belső és külső fala összeolvad. A szemserlegnyél végül látóideggé alakul, amely közepén a hyaloid artéria (későbbi az *arteria centralis retinae*) található. A látóideget kívülről a pia mater, az arachnoidea és a dura mater rétege határolja (Sadler, 2000; Graw, 2010).

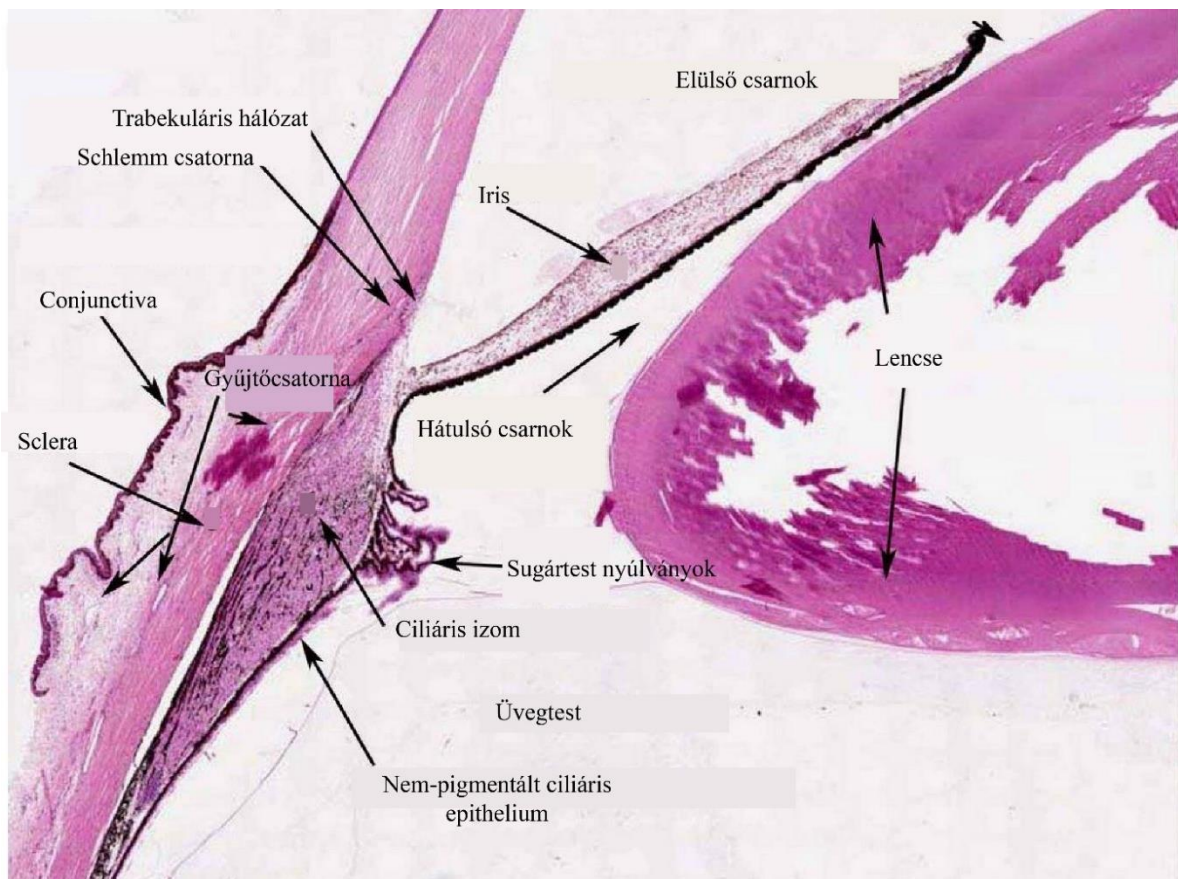
1.1.2 A látószerv felépítése

A látószerv egy összetett érzékszerv, amely emlősökben szemgolyóból (*bulbus oculi*), látóidegből (*nervus opticus*) és járulékos szervekből (szemmozgató-, védő- és könnykészülék) áll. A szemgolyó három rétegből épül fel: külső rostos réteg (*tunica fibrosa*), középső érhártya (*tunica vascularis*) és belső ideghártya (*tunica nervosa/retina*) (Szél, 2006).

A tunica fibrosa a központi idegrendszer dura materének folytatása, amelyet tömött rostos kötőszövet épít fel. A rostos burkot két részre oszthatjuk, átlátszatlan ínhártyára (*sclera*) és átlátszó szaruhártyára (*cornea*), amelyek fizikai tulajdonságát a bennük található rostok állása határozza meg. Az ínhártya, azaz a sclera a szemgolyó falának hátsó részét alkotó, kemény tömött réteg, amely a szemnyomásnak ellenállva tartja fenn a szem alakját. A sclera felépítésében résztvevő kollagén rostos kötőszövetben a rostok lapos kötegeket formálnak, melyek a felszínnel párhuzamosan, de szabálytalanul, különböző irányba rendeződnek. A kollagén lemezek között rugalmas rosthálózat található. A sclera fontos szerepet játszik a szemmozgató izmok inainak tapadásában. Az ínhártya belső felszínét egy pigmentált, laza kötőszövetes réteg, a *lamina fusca sclerae* béleli (amely része a choroidea és a sclera rétegének is). A cornea legkülső rétege a corneahám (*epithelium anterius corneae*) többretegű el nem szarusodó laphámból épül fel, amely igen érzékeny a nagyszámú szabad idegvégződés (*nervus ophthalmicus*) tartalma miatt. Nagyfokú regenerációs készségét a corneoscleralis határ környékén található osztódó hámsejteknek köszönheti. A könnyfilm fenntartásában a felszíni hámsejteken található mikrobolyhok vesznek részt. Ezt követő réteg a *membrana limitans anterior*, azaz a Bowman-hártya, amely egy vékony kötőszövetes lemez, fontos szerepet játszik a cornea mélyebb rétegeinek védelmében. Maga a Bowman-hártya nem rendelkezik regenerációs képességgel, sérülése esetén a cornea elveszíti átlátszóságát. A cornea vastagságának jelentős részét adó *substantia propria* lemezes kötőszövetből épül fel. Üvegszerű átlátszóságát a pontosan azonos átmérőjű V-ös típusú kollagénrostok párhuzamos rétege adja. Egy rétegen belül a rostok egymással és a cornea síkjával is párhuzamosak. A cornea és a sclera dehidratált struktúrák. A cornea dehidratált állapotát aktív ionpumpák tartják fenn, melynek gyulladás esetén víztartalma megnő, amely homályossá teszi. Ereket és pigmentsejteket a cornea nem tartalmaz, táplálása az elülső csarnok és az episcleralis erek felől történik. A cornea epithel sejtekben az oxigén-, a tápanyagellátás, illetve az anyagcsere-folyamatok egy része a könnyfilmen keresztül valósul meg. A stromát követő Descemet-membrán egy különleges lamina basalis, amelyet az endothelium termel. A cornea legbelső rétege az endothelium corneae (*endothelium camerae anterioris*). Az elülső csarnok

felé néző lapos sejtek ionokat és vizet juttatnak a cornea stromájába. A csarnokzuggal határos zónában alacsony differenciált őssejtek a cornea regenerációjáért felelősek (Szél, 2006).

A corneoscleralis határ fontos képletei a Schlemm csatorna, a csarnokzug és a *torus sclerae*, amelyek a csarnokvíz elvezetésében is szerepet játszanak. A csarnokvíz a Schlemm csatornából a *venae aquosae*-ba jut. A Schlemm csatornát a csarnokzuggal egy szivacsos szerkezetű endothellel borított hálózat (*spongiosa sclerae*) köti össze, így a csarnokvíz a benne található kötőszöveti trabekulákon (Fontana-féle ürök) keresztül szűrődik végül a Schlemm csatornába. A *torus sclerae* felszínén erednek a *m. ciliaris meridionalis* rostjai (2. ábra) (Szél, 2006).



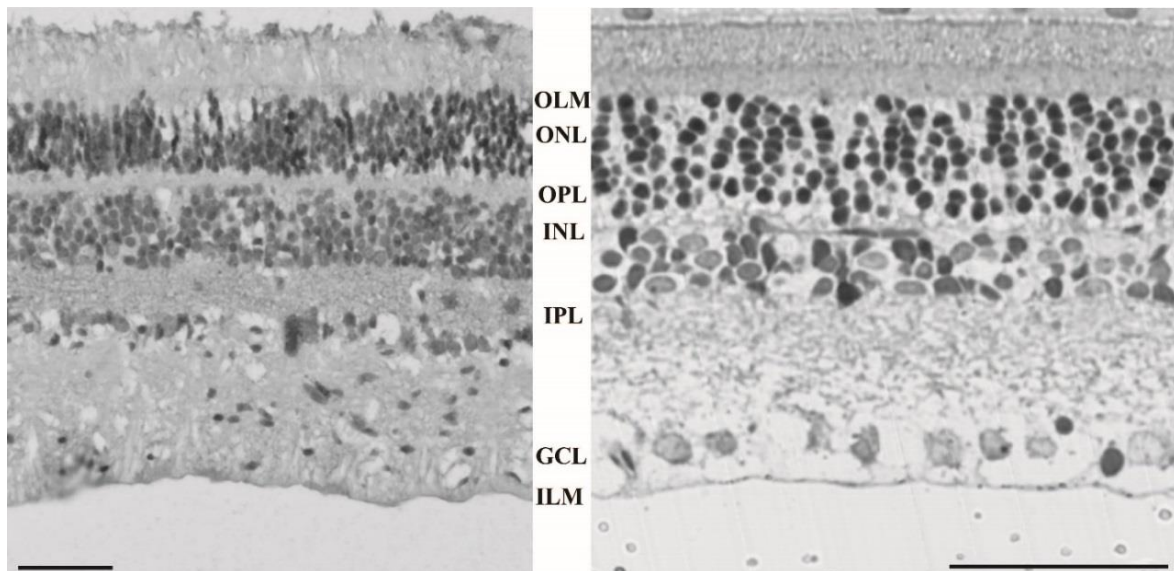
2. ábra: Rágcsáló szem elülső szegmens reprezentatív szövettani mikroszkópos képe (haematoxylin eosin). A szem elülső szegmensét, a sugártest nyúlványok által termelt csarnokvíz tölti ki. Az elülső szegmenst kívülről a cornea határolja, amely az irisszel való találkozási pontjánál a trabekuláris hálózat, majd az abba csatlakozó Schlemm csatorna helyét adja. Ez a csarnokvíz elvezetésében fontos szerepet játszó rendszer, a gyűjtőcsatornához csatlakozva a szem vénás elvezetéséhez kapcsolódik. Az cornea és iris közötti teret elülső csarnoknak, az iris és üvegtest között található területet hátsó csarnoknak nevezik, a csarnokok között középvonalban található a lencse. A szemet kívülről a cornea folytatásaként a sclera határolja, amelyhez a kötőszövetben és nyirokerekben gazdag conjunctiva csatlakozik.

<https://i.pinimg.com/originals/13/e9/1d/13e91d468279ac109e4e68b70c2a2e53.jpg>.

A bulbus középső burka, a tunica vascularis, a központi idegrendszert körülvevő lágyszövetes agyhártya folytatása. Ereket átszőtt kötőszövetes burok három részből áll: érhártya (*choroidea*), sugártest (*corpus ciliare*) és szivárványhártya (*iris*). Szövettani szempontból nagyjából azonos felépítésűek; eret, simaizmot tartalmazó stroma alkotja a három szövetet, melyhez hám csatlakozik. A choroidea az ínhártya és retina között található sötétbarna kötőszövetes réteg. A n. opticus átfúrva szerkezetét szilárdan rögzíti az ínhártyához. Fontos szerepet tölt be a retina vérellátásában, illetve a melanocyták pigment szemcséi a behatoló fénysugarak kiszűrésében is részt vesznek. A sugártest (*corpus ciliare*) fontos feladatot tölt be a lencse függesztésében, akkomodációban és a csarnokvíz termelésben. A sugárizom (*m. ciliaris*) a sugártest térfogatának legnagyobb részét teszi ki, amely közeli tárgyak fókuszálásában (akkomodáció) játszik szerepet, illetve befolyásolja a csarnokvíz elfolyását is. Az izomsejtek között elasztikus rostok és melanocyták találhatók. A sugártest vascularis rétege (*lamina vascularis*) a sugárizmot belülről borítja és beterjed a sugárnyúlványokba (*processus ciliares*) érfonatok formájában. A sugártest belső felszíne a pars ciliaris retinae (*epithelium ciliare*), kétrétegű hám, ahol a külső felszín a retina pigmenthámjának folytatása, amely pigment szemcséket tartalmaz. A sugárnyúlványok és a sugártest-hám (aktív ion- és víztranszport segítségével) a csarnokvíz termelésében vesz részt. A termelt csarnokvíz feladata a szemnyomás fenntartása, illetve a cornea, a lencse és a retina táplálása. A szivárványhártya (*iris*) egy gyűrűszerű lemez, ami a szemcsarnokot két részre osztja. Középen helyezkedik el a pupilla, ami a megvilágítás mértékétől függően átmérőjét változtatja. Az iris elülső felszínét *endothelium camerae anterioris* alkotja, amely egy szabálytalan endothel réteg. Alatta található *stroma iridis* egy hálózatos kollagénrost rendszer, amely átrendeződésével képes a pupilla átmérőjét változtatni. Az iris külső rétege a kétrétegű irishám (*stratum pigmenti iridis*), amely mindkét lemeze pigmentált. A kétrétegű pigmenthám sejtjei simaizomszerűen megnyúlva lapos, kontraktilis lemezt (myoepithel sejtek), a m. dilatator pupillae-t hozzák létre (2. ábra) (Szél, 2006).

A retina (recehártya) a gerincesek szemének legbelső, fényérzékeny rétege. A központi idegrendszer neuronhálózatához hasonlóan a retinában is két síkban történik az információ továbbítás. Vertikális irányban a fotoreceptorok, bipoláris sejtek és ganglionsejtek szinaptizálódnak. A horizontális neuronhálózat a retina síkjával párhuzamos, a résztvevő neuronok nyúlványai egy síkban maradnak, részei a horizontális- és amakrin sejtek. A retina szövettani felépítése 10 rétegből áll (3. ábra). A retinában belülről kifelé haladva a következő. Az üvegtesttel a Müller-sejtek végtalpai által létrehozott belső határmembrán (*membrana limitans interna*, ILM: inner limiting membrane) érintkezik. Ezt követi az optikus rostok rétege

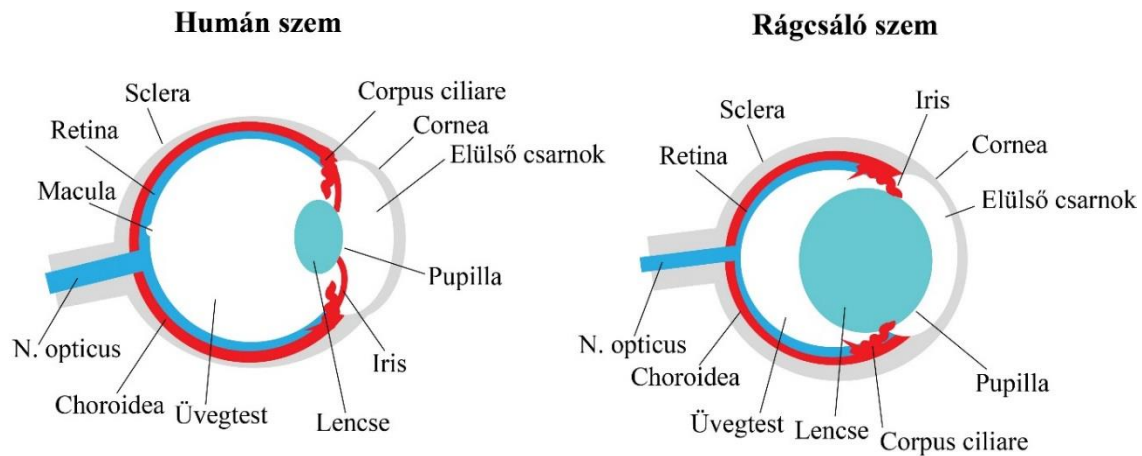
(*stratum neurofibrarum*, NFL: nerve fiber layer), a ganglionsejt réteg (*stratum ganglionare*, GCL: ganglion cell layer), a belső rostos- (*stratum plexiforme internum*, IPL: inner plexiform layer) és -magvas (*stratum granulosum internum*, INL: inner nuclear layer) rétegek, majd ezt követően a külső rostos- (*stratum plexiforme externum*, OPL: outer plexiform layer) és -magvas (*stratum granulosum externum*, ONL: outer nuclear layer) réteg. A Müller sejtek külső nyúlványai által kialakított határmembránt (*membrana limitans externa*, OLM: outer limiting membrane) a fotoreceptorok bel- és kültagjainak (*stratum bacilli et coni*, PL: photoreceptor layer) rétege követi, ahol a fényinformáció elektromos jellé való átalakítása történik. Ezt követő réteg a fény abszorpciójában is résztvevő a pigmenthám (*stratum pigmenti retinae*, PE: pigment epithelium) (Szél, 2006; Gregg et al., 2013). A dolgozatban a továbbiakban az angol nomenklatúrából származó rövidítéseket alkalmazzuk a szövettani rétegek említésekor.



3. ábra: Humán (bal) és rágcsáló (jobb) retina rétegei. (OLM: külső határmembrán, ONL: külső magvas réteg, OPL: külső rostos réteg, INL: belső magvas réteg, IPL: belső rostos réteg, GCL: ganglionsejt réteg, ILM: belső határmembrán). Mérték: 50 μ m. (Saját ábra).

A humán és rágcsáló szem felépítése közel megegyezik, így szemészeti kutatásokban kiválóan alkalmazható modellként szolgálnak (4. ábra) (Meister, 2009). A rágcsálók, éjszakai emlősök révén pálcika-domináns (a fotoreceptorok 97%-a pálcika) látással rendelkeznek. A rágcsáló szemszerkezet megegyező szövettani felépítésű, azonban viszonylagosan nagyobb corneával és lencsével rendelkezik. A cornea az emberekéhez hasonlóan a rágcsálókban is öt szövettani rétegből felépülő avascularis szövet. A cornea és a sclera határát, emberekhez hasonlóan a corneoscleralis junkció (*limbus*) képi, ahol a cornea regenerációban résztvevő össejtek

találhatóak. Az iris választja el a szem elülső és hátulsó csarnokát. Rágcsáló esetében az iris pupilla határa érintkezésben található a lencse anterior pólusával. Köztük a csarnokvízen keresztül van kapcsolat. Emberi szemben a sugártest közvetlenül a sclerahoz kapcsolódik, míg rágcsálók esetében eltérést lehet felfedezni. Az anterior irányban elhelyezkedő sugártest nyúlványok, így az iris posterior végéből erednek, míg csak a posterior szegmensük ered közvetlenül a scleráról. A strukturális eltérés következtében rágcsálók trabekuláris hálózata érintkezésben van a sugártest külső felszínével. A sugártestet, az emberi szemhez hasonlóan három szövettani réteg építi fel. Humán szem esetében a sugártest formája háromszög alakú, ezzel ellentétben rágcsálókban kicsi, hengeres formájú, alacsony izomtapadási felszínének köszönhetően az akkomodáció részleges. A trabekuláris hálózat a Descemet-membrántól posterior irányban jelenik meg és a sugártest középvonaláig van jelen. Az emberi és a rágcsáló trabekuláris hálózat számos hasonlósággal rendelkezik (4. ábra). Rágcsálókban a lencse mérete arányaiban lényegesen nagyobb az emberhez képest, formája kerek és az intraokuláris tér közel 75%-t tölti ki. A rágcsáló retina felépítésének vizsgálata jelentős múltra tekint vissza, alaposan tanulmányozták Golgi-festéssel, Nissl-festéssel és elektronmikroszkóppal. Egyik legjelentősebb különbség az emberi (és főemlős) és rágcsáló retinában a fovea hiánya. Emberi szemben a fovea az éleslátás helye, amely a szem optikai tengelyébe eső kb. 1,5 mm átmérőjű terület, ahol csak csapok találhatóak. Patkány retinában az éleslátás helye egy centrálisan elhelyezkedő sáv, az úgynevezett „visual streak”, ahol magas számban találhatóak a csapok. A periféria felé haladva a csapok mennyisége folyamatosan csökken. Emberi szemhez képest azonban rágcsálókban a csapok denzitása szignifikánsan alacsonyabb. Patkány és egér retinában jelentősen kevesebb ganglionsejt típus található az emberhez képest. Rágcsálókban, emberhez hasonlóan háromféle gliasejt található, astrociták, microgliák és Müller sejtek (Meister, 2009).



4. ábra: Humán és rágcsáló szem felépítése. Az emberi és rágcsáló szem felépítése közel azonosnak tekinthető, csupán néhány különbség van közöttük. A rágcsálók esetében a lencse méretének aránya, a trabekuláris hálózat elhelyezkedése különbözik, illetve pálcikadomináns retinájukban nem található macula (*Saját ábra*).

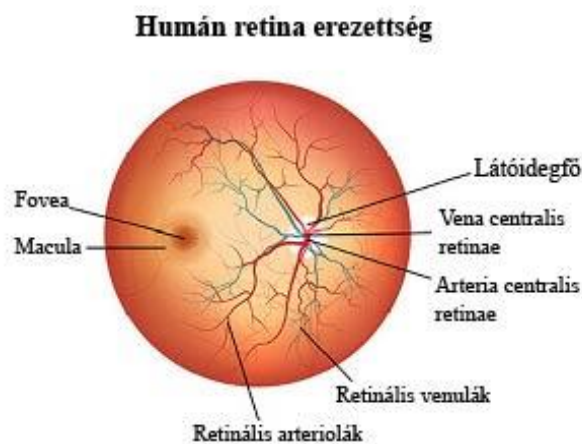
Az egerek és patkányok széleskörű felhasználásának fő oka, hogy genomjukat szekvenálták, és számos transzgenikus és génkiütött törzs áll rendelkezésre a különböző típusú kutatásokhoz. Az egér használatának további előnye, hogy könnyen tenyészthető, gyors szaporodással rendelkezik és költséghatékony (Meister, 2009).

1.1.3 A szemgolyó és retina vérellátása

A szemgolyó és az orbita vérellátását az *arteria (a.) carotis internából* eredő *a. ophthalmica* biztosítja, amely a *nervus opticussal* a *canalis opticuson* keresztül lép be az orbitába. A szemgolyó vérellátásáról az *a. ophthalmicából* két teljesen elkülönült rendszer gondoskodik, a ciliaris és a retinális rendszer. A ciliaris artériás rendszer két további részre osztható: a hátsó- és elülső ciliáris erek rendszerére. A két érrendszer elkülönül és eltérő módon alkalmazkodik élettani és kóros folyamatokban. A hátsó ciliáris érrendszer két alrendszerre osztható: a rövid- illetve hosszú hátsó ciliáris artériákra. A rövid a szem hátsó felszínének (látóidegburok, episclerális érplexus, *choriocapillaris*) vérellátásáért felel, míg a hosszú az elülső (suprachoroideális tér, sugártest, iris) struktúrák táplálását végzi. Az *a. ophthalmicából* eredő elülső ciliáris artériák a sclera felszínén oszlanak ágakra és a szem elülső szegmensét (*m. ciliaris, choroidea*) látják el. Az iris egy speciális, nem folytonos érgyűrűvel rendelkezik (*circulus arteriosus iridis major*), amely jelentős szerepet tölt be a sugártest vérellátásában,

ezáltal a csarnokvíz termelésében egyaránt. A szem vénás keringését az elülső- és hátsó ciliaris vénák rendszerből felépülő vortex-rendszer adja. A vortex-rendszer a choroidea, iris és sugártest véreinek nagy részét vezeti el. Az elülső ciliáris vénás rendszer a sugártest és részben a csarnokvíz elvezetésében, míg a hátsó ciliáris vénás rendszer a sclera hátsó szegmensének elvezetésében vesz részt (Süveges, 2010).

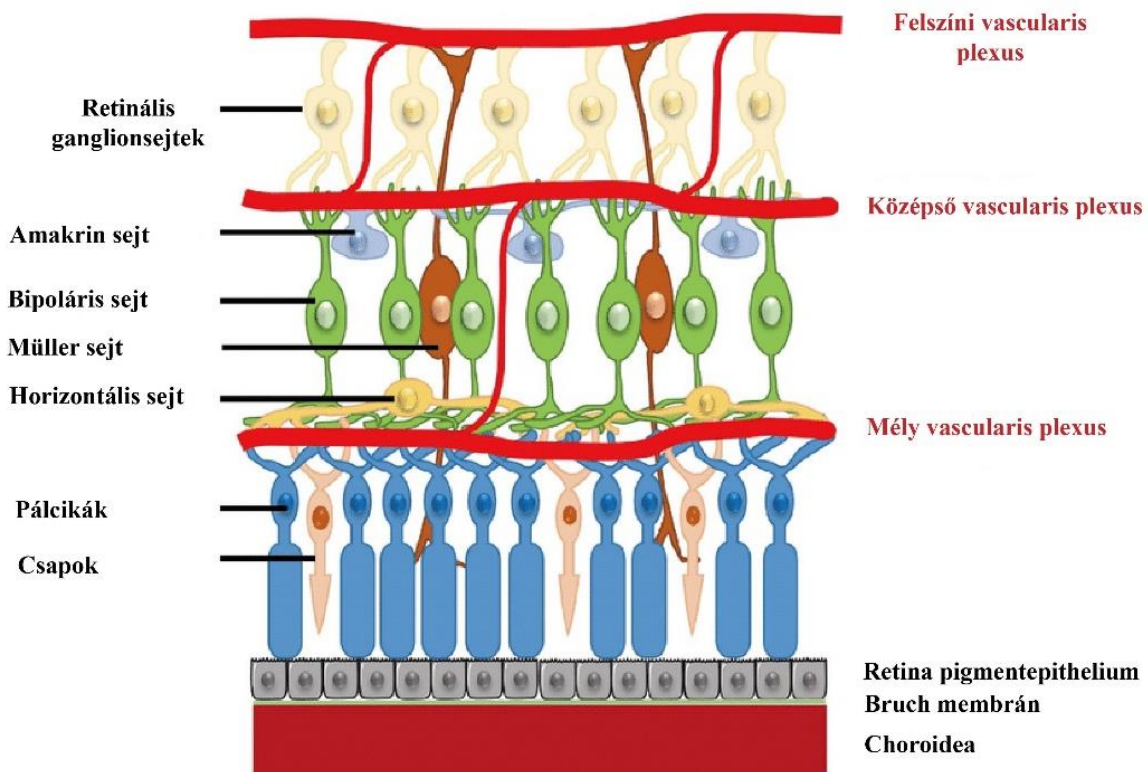
A retinális érrendszer (5. ábra) szintén az *a. ophthalmicából* ered, jelentősége a retina közvetlen vérellátásában van. Részei az intraorbitális (orbita ürege), intravaginális (látóideg burok), intraneurális (látóidegen belül halad) és retinalis (retinában fut) szakaszok. Az *a. centralis retinae* a látóidegfőnél négy nagy ágra (temporális felső, alsó; nasalis felső, alsó), valamint kis ágakra oszlik, amelyek a ciliaris artériákkal a látóideg burkának táplálásában vesznek részt. Minden kvadráns rendelkezik egy fő tápláló érrel, amely károsodása látótérkieséssel jár. A két érrendszer a látóidegfőnél, a Zinn-Haller gyűrűben találkozik egymással. A retina vénás elvezetése vénaágakban történik, az artériákhoz hasonlóan minden kvadránsnak van egy fő vénája. A fissura orbitalis superioron keresztül, végül a sinus cavernosusba vezet a retina vénás keringése (Süveges, 2010).



5. ábra: A humán retina vérellátásáért felelős artériás- és vénás rendszer. A látóidegfőnél belépő arteria centralis retinae négy ágra oszlik, temporális alsó, felső, illetve nasalis alsó és felső ágra, amelyek egy-egy további kisebb ágazatra bomlanak. A retina artériáival párhuzamosan futó vénaágak, az artériákhoz hasonlóan négy kvadránsban helyezkednek el. Végül a fissura orbitalison keresztül távozik a retina vénás vére ahonnan a sinus cavernosusba jut. <https://veniceretina.net/conditions/retinal-vein-occlusion/>.

A retina egy jelentős energiaigénnyel rendelkező szövet, megfelelő működéséhez folyamatos oxigén és tápanyagellátás szükséges. A retina anyagcsere szükséglete a kettős vérellátáson

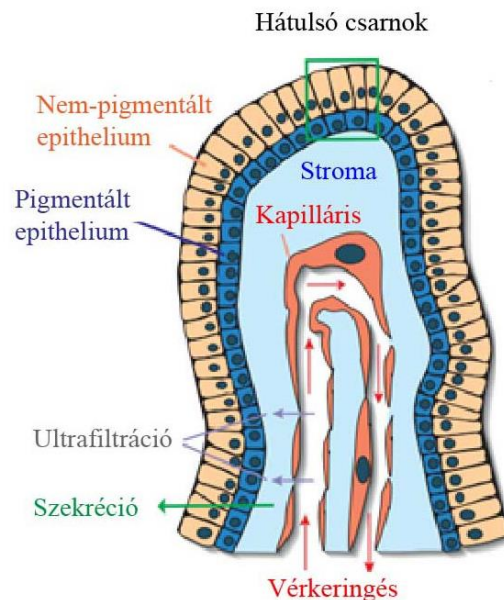
keresztül teljesül. Belső rétegeit a retina saját érhálózata, külső rétegeit pedig a pigment epithelium alatt található choroidea látja el oxigénnel és tápanyagokkal. A choroideában elhelyezkedő ciliaris artériás rendszerből a Bruch membránon keresztül diffúzióval történik az anyagcsere. Az itt található pigmenthámsejtek közti tight junction kapcsolatok hozzák létre a vér-retina gátat. A retinális érplexusokat elhelyezkedésük alapján csoportosíthatjuk felszíni- (GCL és NFL rétegekben), középső- (IPL, INL rétegben) és mély vascularis plexusra (INL és OPL rétegekben) (6. ábra). A felszíni vascularis plexust glia sejtek ölelik körül. A középső és mély vascularis plexusokat a Müller sejtek végtalpai veszik körül, leginkább kapilláris mérettel rendelkeznek. A retina legerezettebb területe a macula, ahol a legnagyobb denzitásban találhatóak a fotoreceptorok. A kapilláris hálózatokban történik meg az oxigén és tápanyagok leadása, valamint a széndioxid és a melléktermékek felvétele. A kapillárisok vénákba összekapcsolódva létrehozzák a vena centralis retinae-t, ami végül a látóidegen keresztül elhagyja a szemet (Das and Byrd, 2014; Barabas et al., 2020).



6. ábra: A retina vascularis plexusai. A retina külső rétegeinek táplálásában a choroidea tölt be jelentős szerepet, míg a retina belső rétegeinek vérrellátását a retina saját erei adják. A retinális érplexusokat elhelyezkedésük alapján felszíni, középső, illetve mély vascularis plexusra oszthatjuk (Fu et al., 2020).

1.1.4 A csarnokvíz termelődése, keringése

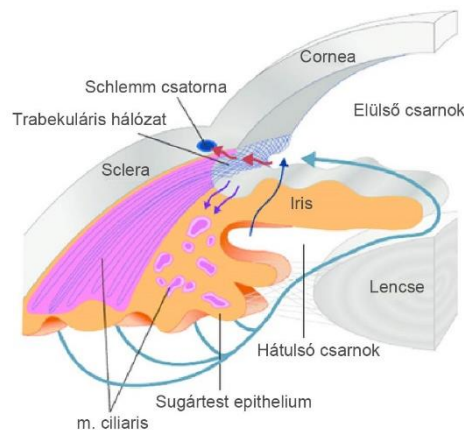
A csarnokvíz fontos szerepet tölt be a szem fiziológiájában. Tápanyagforrás az elülső csarnok érmentes területeinek, úgymint a cornea és a lencse, illetve anyagcsere melléktermékek eltávolításában is részt vesz. A csarnokvíz keringésének, termelődésének és elfolyásának egyensúlya fontos szerepet tölt be a belső szemnyomás (intraocular pressure: IOP) fenntartásában. A sugártestnyúlványokat és a sugártesthám stromáját kapilláris hálózat tölti ki, amelyet két epitheliummal borított réteg határol. A belső, nem pigmentált epithelium sejtjei zonula occludenssel, a külső pigmentált epithelium sejtjei pedig réskapcsolattal kötődnek egymáshoz. A fenestrált kapillárisokból a plazma ultrafiltráció segítségével a stroma intersticiumába jut (7. ábra). Az apikális felszínen található zonula occludens megakadályozza a plazmafehérjék hátsó csarnokba jutását, ezzel magas fehérje koncentrációt, a szövetben ozmotikus nyomást és csökkent transzkapilláris ozmotikus nyomást alakít ki. A hidrosztatikus és ozmotikus nyomás a hátsó csarnokba történő folyadékáramlás kialakításának kedvez. A folyadékáramlás ezt követően aktív szekréción keresztül folytatódik. A csarnokvíz kialakításában szerepet játszó legfontosabb ionok a Na^+ , HCO_3^- és Cl^- . Az ionok koncentrációjának emelkedésével az ozmotikus nyomás is emelkedik (Goel, 2010; Toris, 2010).



7. ábra: A csarnokvíz termelése a sugártest nyúlványban. A sugártest nyúlvány stromában található fenestrált kapillárison keresztül ultrafiltrációval stroma intersticiumba, majd onnan a pigmentált, ezt követően nem-pigmentált epitheliumon keresztül végül a hátsó csarnokba szekretálódik a csarnokvíz (Toris, 2010).

Egészséges emberi szemben a csarnokvíz dinamikája a cirkadián ritmusnak megfelelően ingadozást mutat, amelyet az IOP mintázatának változásával lehet nyomon követni. Az ingadozás szabályozásában a vegetatív idegrendszer és a kortikoszteroidok vesznek részt. A ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) fontos szerepet tölt be a csarnokvíz dinamikájának szabályozásában. A cAMP agonisták, úgy mint a béta-2 adrenerg agonisták megemelik a csarnokvíz termelését, míg a cAMP csökkentő alpha-2 adrenerg agonisták csökkentik a csarnokvíz áramlását és annak termelődését (Shim et al., 2017).

A csarnokvíz a hátsó csarnokból az elülső csarnokba áramlik, ahonnan több útvonalon keresztül végül a szem vénás rendszerébe kerül (8. ábra). A hagyományos útvonal az elülső csarnok területén az iridocorneális szögben található trabekuláris hálózattal kezdődik, amely az uvealis-, a corneoscleralis és a juxtacanalicularis hálózatban folytatódva a Schlemm csatornában végződik. A rendszer a vv. aquosaeen keresztül az episcleralis vénás hálózatba vezet. Az uveoscleralis csarnokvízelvezetés a sugártest és iris tövének suprachoroidális területén történik meg. A csarnokvíz a suprachoroidális térből a sclerán keresztül a kötőhártya vénáival a vénás rendszerbe kerül. Az uveoscleralis rendszer hatékonysága nagyban függ a szem belnyomásának állapotától. A hagyományos útvonalon keresztül a csarnokvíz elvezetésének közel 60-80%-a, amíg az uveoscleralis útvonalon csupán 20-40%-a valósul meg (Yucel and Gupta, 2015; Carreon et al., 2017).



8. ábra: A csarnokvíz áramlásának útvonalai. Az ábrán a kék nyíl reprezentálja a csarnokvíz keringésének útvonalát a termelődésétől az elfolyásáig. A hátsó csarnokban a sugártest nyúlványok által termelt csarnokvíz az elülső csarnokba két útvonalon keresztül tud távozni. A hagyományos útvonalon (piros nyíl) keresztül a trabekuláris hálózaton, végül a Schlemm csatornán át jut a szem vénás elvezetésébe, míg a uveoscleralis útvonal (lila nyíl) a suprachoroidális területen át végződik később a vénás elvezetőrendszerbe (Crawley et al., 2012).

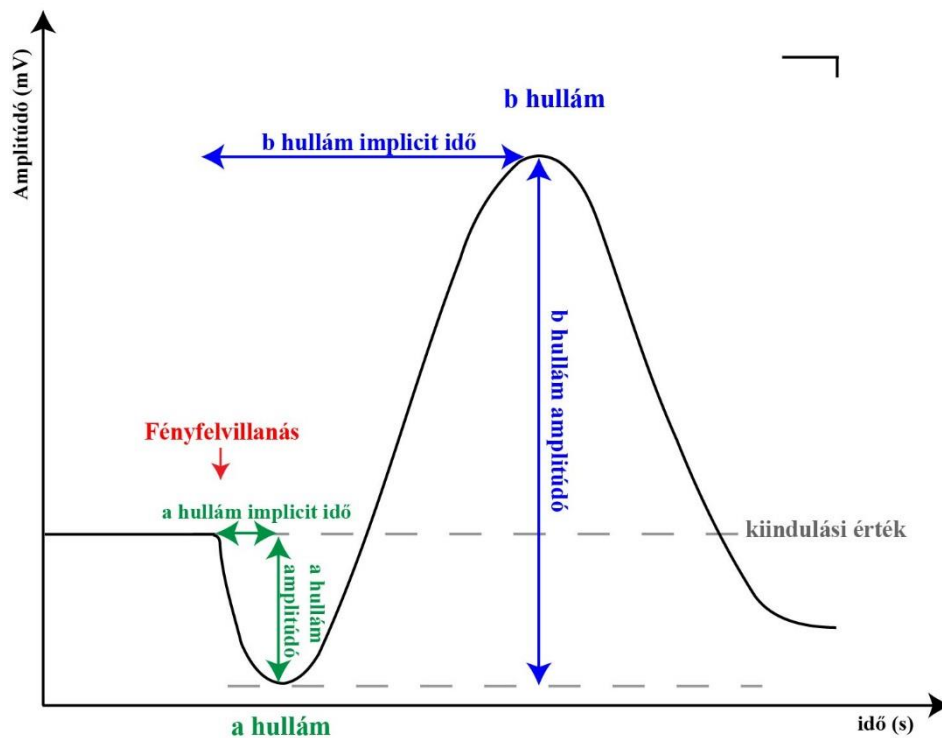
Rágcsálótörzsekben a csarnokvíz termelése nem tér el különösebben a humán szentől. Csupán néhány különbség mutatkozik meg a csarnokvíz elvezetőrendszer felépítésében. Az egyik legszembeütőbb eltérés a sugártest pozíciójában van. Humán szem esetében a sugártest a trabekuláris hálózathoz képest posterior irányban helyezkedik el, míg rágcsálók esetében a sugártest teljesen befedi a trabekuláris hálózatot. Azonban magának a trabekuláris hálózatnak a szerkezeti felépítése rágcsálókban és emberekben már közel azonos (Meister, 2009).

1.2 A szem non-invazív vizsgálati módszerei *in vivo*

Szemészeti- valamint egyéb szisztémás betegségek a retina szerkezetének részleges vagy teljes romlásával járhatnak. A humán klinikai vizsgálatok során alkalmazott *in vivo* módszerek ma már a szövettani vizsgálatoknak megfelelő precizitású információt nyújtanak. Az alábbi non-invazív szemészeti képalkotó és vizsgáló módszerek adhatnak információt a szem és a retina funkcionális és szövettani állapotáról, illetve lehetővé teszik a kórfolyamatok időbeni monitorozását.

1.2.1 Elektroretinográfia

Az elektroretinográfia (ERG) egy kitűnő non-invazív vizsgálati módszer a látás képességének felmérésére. A retina fotoreceptor sejtjei a fényingert elektromos válasszá alakítják, majd az ideghártya különböző sejtjei felé továbbítják. ERG vizsgálat során ezeket az elektromos válaszokat elektród segítségével a cornea felszínéről rögzítjük, elektroretinogram formájában. Az elektroretinogram képes információt nyújtani a retina fiziológiai állapotáról. A vizsgálat során egy fényingert követő potenciálváltozást vezetünk el. Először egy negatív irányú a-hullám detektálható, amely a fotoreceptorok (csapok, pálcikák) funkciójáról ad információt (9. ábra). Ezt követően egy nagyobb amplitúdójú, gyors, pozitív b-hullám vezethető el, amely a retina belsőbb rétegeiben megtalálható ON bipoláris és Müller sejtek állapotát reprezentálja. Továbbá elvezethető egy magas frekvenciájú oszcilláció, az oszcillátoros potenciál, amely a retina belső nukleáris és plexiform rétegeből ered. Az oszcillátoros potenciál az amakrin- és ganglion sejtekről nyújt információt (Perlman, 1995).

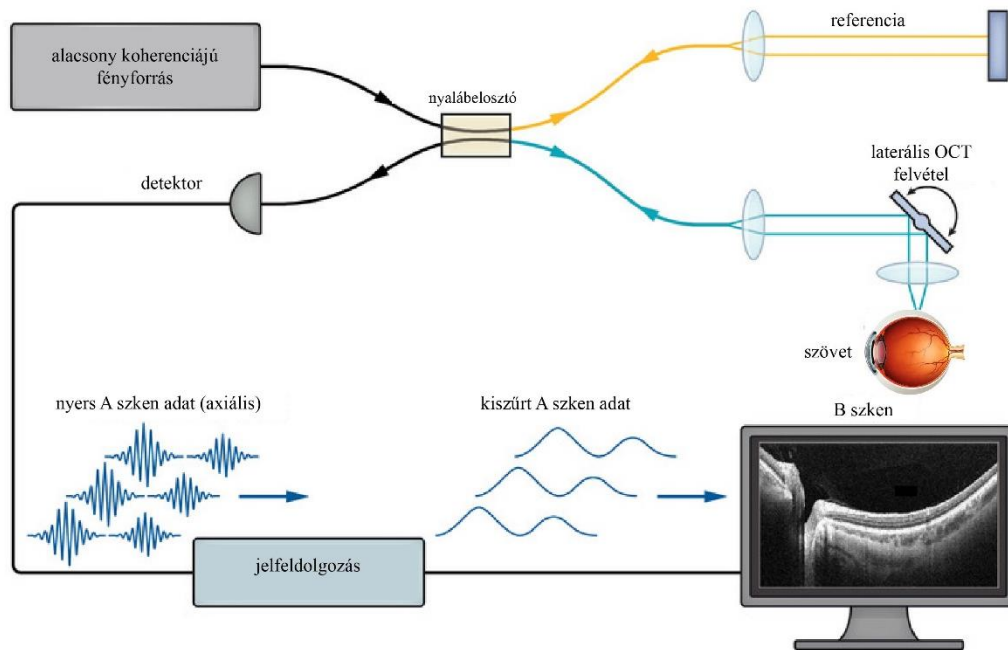


9. ábra: Reprezentatív elektroretinogram felvétel. A fényfelvillanást követően a fotoreceptorok aktivációja negatív irányú amplitúdóváltozást indukál, majd a bipoláris- és horizontális sejtek aktivációja pozitív amplitúdóváltozást indít (*Saját ábra*).

1.2.2 Optikai koherencia tomográfia

A szemészeti diagnosztikában elterjedt, non-invazív képalkotó módszer az optikai koherencia tomográfia (OCT), amely segítségével a szem teljes szerkezete vizsgálható. Olyan képalkotói eljárás, amely alkalmas alacsony fényszóródású közegek nagy mélységi felbontására, akár háromdimenziós szerkezeti vizsgálatára. OCT felvételek a reflexió/fényszóródási tulajdonságoknak térbeli eloszlását mutatják be. Az OCT működése a közeli infravörös fénysugár használatán, illetve a szövetek eltérő fényvisszatükröző tulajdonságán alapul, miközben képes az ideghártyáról készített nagy felbontású keresztmetszeti képek megjelenítésére. Az OCT technológia alacsony koherenciájú interferometria elvén alapul. Ennek során a szemből visszaverődő fény interferál a referencia fényel, amely által a megtett út hossza ismert. Az eljárás alapja a Michelson-interferométer, ahol a fény egy nyalábelosztón keresztül két útra, referencia útvonalra és a minta útvonalára oszlik (10. ábra). A visszaverődő fénysugarak újra egyesülve a detektorba jutnak. A jelből érkező érzékelt frekvencia megfelel a szövet mélységének, ezt nevezzük axiális profilnak (A-szken), illetve több A-szkenből létrehozott longitudinális felvétel 2D profilt, B-szket hoz létre. OCT esetében

interferometrikus módszert alkalmaznak. Ezáltal az A-szken segítségével a vizsgált szövet mélységét, a B-szken pedig az A-szken felvételek longitudinális sorozatát képezi le. A B-szken felvételek összeillesztéséből a rendszer egy térbeli modellt képes összeállítani. OCT segítségével a teljes szem szerkezete és akár annak érhálózata is vizsgálható. Az OCT jelentős szerepet tölt be különböző retinopathiák diagnosztikájában, kórfolyamatok monitorozásában (Shajari et al., 2019; Eladawi et al., 2020).



10. ábra: Optikai koherencia tomográfia működésének alapelve. Egy alacsony koherenciájú fényforrásból kiinduló nyaláb áthaladva egy nyalábelosztón kettéválí, majd egy-egy tükörről visszaverődve a nyalábelosztó újra egyesítve egy detektorra irányítja. Az X-Y koordinátán felvett mélységi (axiális) profilt A-szkennek, a több A-szkenből létrehozott 2D profilt B-szkennek nevezzük.

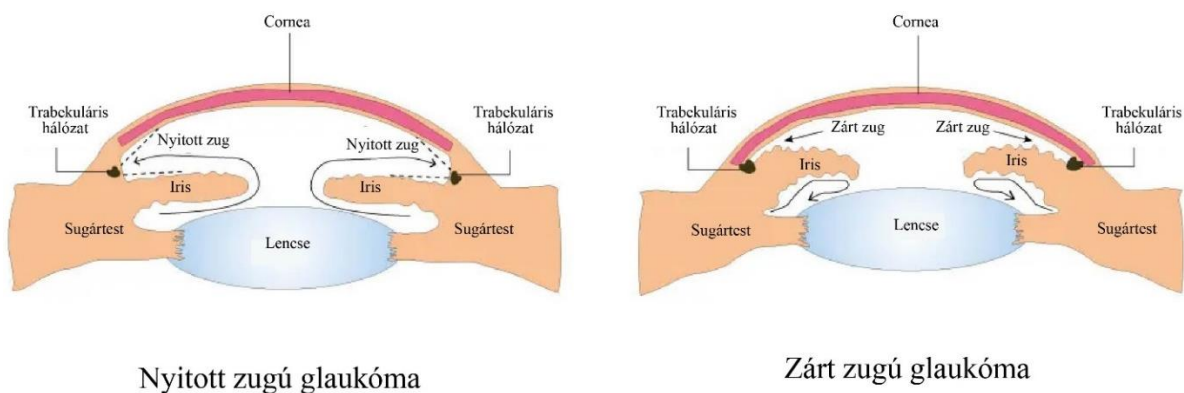
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMcibr2307733>.

1.3 Glaukóma

1.3.1 Glaukóma típusok

A vakságot okozó megbetegedések második leggyakoribb formája a glaukóma. A betegség komplex, progresszív kialakulásának háttere nem ismert. A zöldhályog egy heterogén betegségcsoport, melyben közös jellemző a látóidegfő károsodása és végül a látás elvesztése. Elkülöníthetünk elsődleges, illetve másodlagos típusú glaukómát, mely utóbbi esetében a betegség egy már meglévő szemészeti probléma okán alakul ki. Az elsődleges glaukóma több

altípusra osztható úgy, mint a nyitott zugú, zárt zugú, illetve normotenzív glaukóma (11. ábra). Ezen típusok közül az elsődleges, nyitott zugú glaukóma (primary open angle glaucoma: POAG) a leggyakoribb. A betegségnek számos rizikófaktora ismert, melyek közül a legjelentősebb a megnövekedett belső szemnyomás. Egészséges állapotban a sugártest által termelt csarnokvíz a hátulsó csarnokból az elülső csarnok felé áramlik, végül az elülső csarnok trabekuláris hálózatán keresztül elhagyja a szemet (McMonnies, 2017). Elsődleges nyitott zugú glaukóma esetében a csarnokvíz termelésének és elvezetésének egyensúlya megbomlik, így az elülső csarnokban a csarnokvíz felhalmozódik, amely a belső szemnyomás emelkedéséhez vezet (11. ábra).



11. ábra: Glaukóma típusok. Nyitott zugú glaukóma esetében a csarnokvíz az elülső csarnokból az elzáródott trabekuláris hálózat következményeként felhalmozódva okozza a szemnyomás emelkedését. Zárt zugú glaukóma meglétekor az iridocornealis szög szűkületét a lencse irisnek nyomódása hozza létre, ebben az esetben a trabekuláris hálózatot az iridocornealis szög szűkülete zárja el. <https://www.forneyeyeassociates.com/eye-disease-management/co-management-glaucoma/glaucoma-causes-and-risk-factors/>.

A megnövekedett szemnyomás aretinális ganglionsejtek pusztulásához, majd axonjaikon keresztül végül a látóideg elhalásához vezethet (Harris, 2008; Balasopoulou et al., 2017; Point, 2019). A nyitott zugú glaukóma rizikófaktora lehet a genetikai hajlam, a szaruhártya elvékonyodása, illetve a szteroid-gyógyszerek (glükokortikoidok) hosszútávú alkalmazása (Tripathi et al., 1999). Genetikai hajlam esetén a myocilin (MYOC) gén szerepét fedezték fel először (Tamm 2002).

Elsődleges, zárt zugú glaukóma esetében a csarnokvíz áramlásának akadályát az iridocornealis szög szűkülete okozza, amelyet az irisnek nyomódó lencse hoz létre (11. ábra). Ez az altípus

hirtelen megemelkedő szemnyomással, fájdalommal, a szem kipirosodásával és a centrális látótér kiesésével jár (Nongpiur et al., 2011).

A normotenzív glaukóma a zöldhályog egy speciális altípusa, melynek során a szemnyomás értékében nincsen emelkedés, normális tartományban marad, mégis a látóideg romlása, illetve a látásvesztés tapasztalható. A normotenzív glaukóma kialakulásának pontos oka jelenleg még nem ismert, feltételezhetően genetikai tényezők következtében hiperszenzitivitás alakul ki szem belsőnyomás változással szemben, így akár hipotenzió esetében is a látóideg elhalása tapasztalható (Trivli et al., 2018).

A betegségcsoport kialakulásának háttérmechanizmusáról számos elmélet született (Ichhpujani and Kumar 2019). Néhány tanulmány a mechanikai tényezők jelentőségét, máshol a neuroinflammatorikus vagy retina érzettségével összefüggő változásokat tartják jelentősnek (Morgan and Yu, 2019). A mechanikai elmélet kiváltó tényezőnek a megnövekedett szemnyomást tekinti, amely a ganglionsejtek károsodását és axonjaik elhalását indukálja. A kórkép kialakulásának másik fontos elméletében a molekuláris diszreguláció fontos szerepre helyeznek hangsúlyt, ahol a biokémiai egyensúly megbomlásának következtében az inflammatorikus citokinek felszabadulása neurodegenerációhoz vezet. A vascularis elmélet azonban úgy tartja, hogy a retina nem megfelelő vérellátásának következményeként alakul ki a kórkép (Harris, 2008; Chan et al., 2017). Számos kutatás rámutatott, hogy glaukómában a retina ganglionsejtek pusztulásához nagyban hozzájárul a véráramlás zavara és az emiatt bekövetkező hypoxia (Harris et al., 2008). Szövetekben hypoxiára és oxidatív stresszre adott egyik korai sejtszintű válasz a HIF1- α transzkripció faktor aktiválódása, amely angiogenikus-, növekedési- és proliferációs faktorok termelődését fokozza. Korábbi humán vizsgálatok rámutattak a glaukóma beteg retinájában megemelkedett HIF1- α szintjére (Tezel et al., 2006). A HIF1- α endogén hypoxiás állapot során szabályozó molekulaként képes különböző gének expresszióját modulálni, úgymint a vascularis endotheliális növekedési faktor A-t (VEGF-A). A VEGF-A a kóros morfológiájú, kis erek képződésére hatva, eltömődést és folyadékszivárgást indukál, a hypoxiás állapotot tovább erősítve, fokozva a VEGF-A termelődését (Aiello et al., 2000).

1.3.2 Glaukóma állatmodellek

A glaukóma multifaktoriális betegség hátterében számos kialakulási ok állhat. Több évtizedes kutatások ellenére a kórfolyamat pontos oka a mai napig nem ismert, ami szükségessé teszi az

állatmodellek alkalmazását a feltárás érdekében (Yukita et al., 2015). Az állatmodellek lehetőséget nyújtanak a betegség patomechanizmusának megértésére, feltárására, illetve a lehetséges neuroprotektív, tünetcsökkentő hatóanyagok tesztelésére. A rágcsáló modellek kiválóan képesek reprezentálni a humán szemben történő csarnokvízáramlást és a glaukóma során bekövetkező változásokat. Patkány és egér modellek alkalmazása számos pozitívummal jár, költséghatékonyak bizonyulnak, a rövid élettartam miatt gyors és etikai vonatkozásban is könnyen kezelhető állatok. Rágcsálókban, az emberekhez hasonlóan, a sugártest által termelődő csarnokvíz a trabekuláris hálózaton keresztül a Schlemm csatornába áramlik, majd csatlakozik a vénás keringéshez. Patkányokban a fiziológiás IOP nagyjából 10 Hgmm, amelyet a csarnokvíz termelődésének és elvezetésének egyensúlya tart fent. Humán szem esetében a normális IOP tartomány 11-21 Hgmm. Számos módszer áll rendelkezésre elsődleges nyitott zugú glaukóma kialakítására. A módszerek csoportosítását a csarnokvíz elfolyásának módosítása alapján kategorizáltuk (Vecino and C., 2011).

A post-trabekuláris hálózatot befolyásoló módszerek egyike az episcleralis véna elzárása. A legelső szemnyomásemelő glaukóma modellben az episcleralis véna kauterizációját alkalmazták (Urcole et al., 2006). Másik módszerként a fotokoaguláció következményeként záródik el az episcleralis véna, amely szintén megakadályozza a trabekuláris hálózat elvezetését, amely modell igen közel áll a humán glaukóma kialakulásának modellezéséhez (Levkovitch-Verbin et al., 2002). Ebbe a kategóriába tartozó módszerek közé sorolható még a 2M töménységű hipertóniás sóoldat kannulizálása az aqueous vénába, amely szintén szemnyomásemelkedést alakít ki. A post-trabekuláris hálózatot befolyásoló módszerek költséghatékonyak és egyszeri műtétet követően megfelelő hatékonysággal zárják el a csarnokvíz elvezetését (Biswas and Wan, 2019).

A trabekuláris hálózat közvetlen roncsolására alkalmazott módszerek egyike a lézerkoaguláció. Az eljárás során a szövetkárosítás során létrejött szöveti törmelék és a trabekuláris hálózat roncsolódása ideiglenesen megemelkedett szemnyomáshoz vezet. A lézer alkalmazását követően pár nap múlva a szemnyomás visszatér a normális tartományba. A lézer hatására a trabekuláris hálózat sejteinek osztódása is fokozódik, ami regenerációs folyamatok indukálásával végül a csarnokvíz elfolyását segíti. Összegezve a lézeres koaguláció számos hátránnyal jár. Többszöri alkalmazása növeli a szemszárazság, a cornea károsodás és a cataracta kialakulásának esélyét (Grozdanic et al., 2003). Manapság előtérbe kerültek a szemnyomásemelkedésre alkalmazott virális vektorok. A módszer hátránya azonban, hogy az alkalmazott állat törzse és kora nagymértékben befolyásolja a hatékonyságot. Mindemellert ez

a technika gyulladást okozhat a szemben, továbbá különleges eszközöket igényel, így igen költségesnek bizonyul (Pang et al., 2015).

Ismert, hogy hosszútávú kortikoszteroid kezelések a szemnyomás emelkedését okozzák (Overby et al., 2016). A szteroidok a hyaluronidáz enzim gátlásán keresztül a trabekuláris hálózatban mucopoliszaharid felhalmozódást indukálnak, amely a szemnyomás emelkedését okozza (Kersey and Broadway, 2006). Így egy igen költséghatékony módszerként szolgál a glaukóma modellezésében.

Glaukóma kutatásban, számos transzgenikus állatmodell áll rendelkezésre. Ilyen transzgenikus glaukóma modell a DBA/2J egér, Collal egér, Try 423 His myoc egér, és a Tg-MYCO egér (Zhou et al., 2008; Liu and Ding, 2017; Wang et al., 2017). Ezen modellek számos limitációval rendelkeznek és csupán enyhe szemnyomásemelkedéssel járnak, illetve a glaukóma tünetegyüttes kialakítása költséges és időigényes.

Pre-trabekuláris hálózatot befolyásoló módszerek a csarnokvíz keringésének ideiglenes elzárásán alapulnak. A szemnyomásemelkedést az elülső csarnokba injektált komponensek (hialuronsav, mikrogyöngy, paramágneses mikrogyöngy) indukálják. A módszer költséghatékony és viszonylag egyszerűen megvalósítható, kiválóan alkalmas különböző hatóanyagok efficencia vizsgálatára (Biswas and Wan, 2019). Az elülső csarnokba injektált mikrogyöngyök a trabekuláris hálózatba megakadva elzárják a csarnokvíz áramlását, ezzel szemnyomásemelkedést okozva. A módszer egyszerűségének ellenére a mikrogyöngy injektálást szükséges ismételn hosszán fenntartott emelkedett nyomás érdekében, ami időigényessé teszi a modellt. Mindemellet a mikrogyöngyök átmérőjének és mennyiségének változtatása nagyban befolyásolja a szemnyomásváltás mértékét (Samsel et al., 2011; Morgan and Tribble, 2015; Fu et al., 2018). Számos kutatásban viszkózus vivőanyag alkalmazásával próbálták javítani a modell hatékonyságát (Matsumoto et al., 2014). A módszer egyik hátránya, hogy a megemelkedett szemnyomás következtében a sejtek közti paracelluláris tér kitágul, amely később a mikrogyöngyök kiáramlását okozhatják.

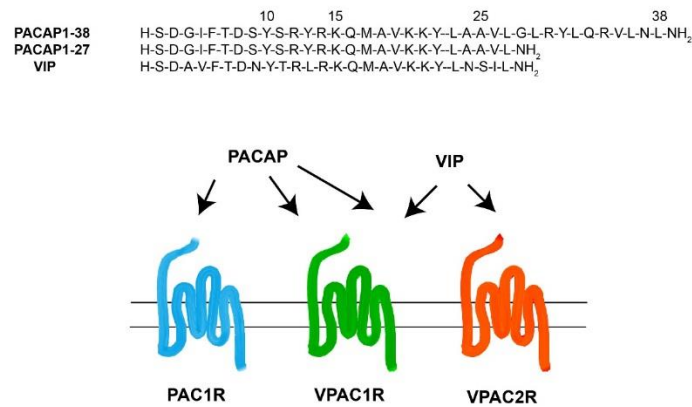
Összegezve az állatmodellek alkalmazása kulcsfontosságú szerepet tölt be olyan betegségek megértésében, melyek multifaktoriálisak és háttérükben álló patomechanizmus nem ismert. Fontos a modellt úgy megválasztani, hogy könnyen és megbízhatóan reprodukálható, illetve költséghatékony legyen. A mikrogyöngy injektálás elvén alapuló modellek bizonyulnak a legalkalmasabb rendszernek a betegség megértésére és az esetleges neuroprotektív hatóanyagok hatásának vizsgálatára.

1.4 A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A vazóaktív intesztinális peptid (VIP)/szekretin/glukagon peptidcsalád kilenc, sok szempontból analógiát mutató tagot foglal magába. A gerinctelenek megjelenésével egy időre tehető a szupercsalád felbukkanása, legkonzerváltabb és legősibb tagja a PACAP és a glukagon (Vaudry et al., 2009). A peptidcsalád tagjai a VIP, a szekretin, a glukagon, a glukagonhoz hasonló peptid (glucagon-like peptide, GLP) - 1 és 2, a növekedési hormont szabályozó hormon (growth-hormone releasing hormone, GHRH), a hisztidin-metionin peptid (peptide histidine methionine, PHM), a glükóz-függő inzulinotróp polipeptid (glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GIP) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PACAP) (Vaudry et al., 2000).

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid angol neve alapján, mozaikszóként PACAP, egy sokrétű biológiai funkciókkal bíró fehérje. Először 1989-ben izolálták birka hypothalamusból Miyata és munkatársai, azon tulajdonsága alapján, hogy a hipofízis mirigysejtjein adenilát-cikláz stimuláló hatással rendelkezett (Miyata et al., 1989). Ekkor a 38 aminosavból álló C-terminálison α -amilált típusát, a PACAP1-38-t izolálták. Később, a rövidebb 27 aminosavból felépülő PACAP1-27-t is leírták (Miyata et al., 1990). A PACAP biológiailag aktív struktúráját a PACAP1-27-en belül található szekvencia rész kódolja, mely az evolúció során gerincesekben szinte teljesen konzerválódott, ezzel is igazolva létfontosságú szerepét, mint neuropeptid. Az emberi szervezetben található PACAP1-27 szekvencia 68%-os homológiát mutat a VIP-pel (12. ábra) (Arimura and Shioda, 1995). Emlősökben túlnyomórészt a PACAP1-38 forma expresszálódik (Vaudry et al., 2009). A PACAP1-38 már előgerinchúros állatokban is előfordul, ahol szerkezete csupán 1-4 aminosavban tér el az emberi PACAP molekulától (Arimura, 1998). Ezek alapján filogenetikai fejlődés során valószínűsíthetőleg alapvető fiziológiai funkciókkal rendelkezik a konzerválódott peptid. A PACAP bontásáért a dipeptidil-peptidáz IV enzim felel, szisztémás keringésben a PACAP féléletideje csupán néhány perc (Zhu et al., 2003; Bourgault et al., 2008). A PACAP bomlása során, N-terminális részén rövidebb, biológiailag már nem aktív peptidek jönnek létre. A biológiai aktivitáshoz és receptorkötődésben kulcsfontosságúnak bizonyul az N-terminális vég. Korábbi tanulmányokban bizonyították az N terminális végén rövidebb fragmensek antagonistá hatását. Előfordulnak azonban sejt- és szövetfüggő agonista hatások is (Bourgault et al., 2008; Atlasz et al., 2009; Dejda et al., 2011; Werling et al., 2014). Kutatócsoportunk a PACAP 6-38 káros, antagonistá hatását bizonyította retina excitotoxikus lézióban (Atlasz et al., 2009). Ezzel

ellentétben a C-terminális végén rövidebb fragmensekre különböző erősségű receptorkötődés jellemző (Dejda et al., 2011).



12. ábra: A PACAP és VIP aminosavsorrendje és receptorai. A PACAP és a VIP csupán néhány aminosav eltéréssel rendelkeznek. Két közös receptora a VPAC1 és VPAC2 mindkét peptid kötésére képes, míg a PAC1 receptor csupán a PACAP esetében rendelkezik nagy affinitással (*Saját ábra*).

1.4.1 A PACAP hatásai

A szervezetben széleskörűen elterjedt, szerteágazó fiziológiai szerepet betöltő peptid akár hormonként, neurohormonként, transzmitterként és trófikus faktorként is funkcionálhat (Vaudry et al., 2009; Nakamachi et al., 2012). Igazoltan részt vesz a termoregulációban, a pajzsmirigy és szívműködés szabályozásában, porcképződésben és idegsejtek differenciálódásában. Számos funkciója közül kutatásaink középpontjában általános cito-, neuroprotektív és neurotrófikus hatása áll. A PACAP képes befolyásolni a sejten belüli pro- és anti-apoptotikus szignáltranszdukciós útvonalakat. *In vitro* és *in vivo* kísérletes betegségmodellek eredményei bizonyították a PACAP protektív hatását, köztük Parkinson-kórban, stroke modellben, gerincvelő sérülésben és diabéteszes neuropathiában (Reglodi et al., 2000; Wang et al., 2008; Atlasz et al., 2010; Szabadfi et al., 2012). *In vitro* és állatkísérletes vizsgálatokban megerősítették védőhatását oxidatív stressz-, gyulladásos folyamatok- és glutamát- okozta károsodással szemben is (Wang et al. 2021; Mester et al. 2011; Racz et al. 2006). Neurogenezist aktiváló hatása szintén bizonyított (Matsumoto et al., 2016). A PACAP előnyös és protektív hatásai a retinában is ismertek. *In vitro* retina szövettényezetben a PACAP számos sejtípus védelmét biztosította, úgymint a pigment epithelium és a ganglionsejtek. *In vivo* körülmények között excitotoxikus NMDA-, glutamát- és kainát-indukálta, retina és

látóidegsérülés vagy UV-indukálta károsodással szemben is protektív hatása mutatkozott meg (Seki et al., 2006; Rácz et al., 2006; Seki et al., 2008; Atlasz et al., 2011; Endo et al., 2011). Diabéteszes retinopathiában D'Amico és munkatársai (2023) egy friss tanulmányban igazolták, hogy az intravitreálisan alkalmazott PACAP csökkenti a hypoxia következményeit. A peptid védelmet nyújtott RPE sejtekben az oxigénhiány károsító hatásaival szemben, részben a vascularis endothelialis faktor (VEGF) expresszió csökkentésén keresztül (D'Amico et al., 2023). Továbbá diabéteszes keratinopathia patkány modellben igazolták a PACAP sejtmigrációt-, regenerációt fokozó és sebgyógyulást indukáló hatását (Maugeri et al., 2023). *In vitro* cornea endothel sejtenyészeten bizonyították, hogy a PACAP képes mérsékelni az UV-B sugárzás által indukált reaktív oxigén származékok (ROS) túltermelődést és anti-apoptikus hatását is igazolták (Maugeri et al., 2022). Streptozotocin-indukálta diabéteszes retinopathia patkány modellben PACAP és PAC1-R expresszió csökkenés mellett károsodást tapasztaltak az állatok retinájában, azonban PACAP kezelés esetében jelentős javulást találtak a fotoreceptor-, dopaminerg amakrin- és ganglion sejtek számában (Szabadfi et al., 2014). Összességében a PACAP egy esszenciális peptid, amely különböző sejtekben, illetve szöveti körülmények között, káros behatásokkal szemben általános sejtvédő hatással rendelkezik (Atlasz et al., 2016a).

1.4.2 A PACAP receptorai

A receptorokat a relatív PACAP és VIP kötésük alapján két nagyobb csoportba sorolhatjuk, a hipofízis adenilát-cikláz receptor 1 (PAC1), illetve a vazoaktív intesztinális peptid receptorok (VPAC1 és VPAC2) (Vaudry et al., 2009). Mindhárom receptor hét transzmembrán egységből és egy intracelluláris G-proteinkötő doménből épül fel (12. ábra). PAC1 receptor nagyjából kétféle nagyságrenddel erősebb kötődést mutat a PACAP felé, mint a VIP irányába. Szinte minden szervrendszerben kimutatható a PACAP receptorok jelenléte. Az idegrendszerben (agy, gerincvelő), az endokrin szervekben (hipofízis), a gonádokban, a vesében és a látószervben is bizonyították a peptid előfordulását (Vaudry et al., 2009; Shioda et al., 2016). A PACAP specifikus protektív hatásáért felelős PAC1 receptor a retina minden rétegében megtalálható. A specifikus PAC1 receptor adenilát cikláz, foszfolipáz C és a protein kináz C által közvetített jelátviteli útvonalakat aktivál. Különböző állatok retinájában magas expressziót figyeltek meg a GCL és az INL rétegekben, a Müller gliasejtekben és az amakrin sejtekben is (Seki et al., 1997; Nakamachi et al., 2012). Alacsonyabb mennyiségben az IPL, OPL, ONL rétegekben és

a fotoreceptor sejtek külső szegmensében is megtalálható volt (Seki et al., 1997). A VPAC1 és VPAC2 receptorok esetében a PACAP és VIP kötődése közel azonos erősségű. A receptorok megtalálhatók a központi idegrendszerben, a tüdőben, a gastrointestinalis traktusban, a májban, a lépben, az ovariumban és a placentában is (Hashimoto et al., 1996; Murthy et al., 1997; Joo et al., 2004). A VPAC1 és VPAC2 receptorok aktiválódása cAMP vagy ciklikus guanozin-monofoszfát szint emelkedéshez vezet, majd több, egymással összefüggő jelátviteli útvonal együttesen képes kialakítani a PACAP protektív hatását. Irodalmi adatok szerint a peptid mindezen felül koncentrációfüggést mutat a protektív hatás tekintetében. Tanulmányokban rávilágítottak továbbá a PAC1 receptor splice, sejtípus függő előfordulására is, amely szintén hozzájárul a protektív hatás különbözőségéhez (Vaudry et al., 2009).

1.4.3 A PACAP és receptorainak előfordulása

A peptid felfedezését követő korai vizsgálatokban, legnagyobb mennyiségben a hipotalamuszban volt kimutatható, azonban jelenlegi ismereteink rámutatnak a PACAP széleskörű eloszlására. Nagy mennyiségben fordul elő a központi- és környéki idegrendszerben, illetve perifériás szervekben egyaránt. A peptid jelen van a nyirokszervekben, az emlőben, a petefészekben, a méhben, a herében, a mellékvesében és a hasnyálmirigyben is (Vaudry et al., 2009). Mindemellett a szem számos szövetében is igazolták a peptid jelenlétét, így a PACAP megtalálható a szaruhártyában, az irisben és a sugártestben. PACAP-ot és receptorának jelenlétét kimutatták patkány, egér, nyúl és macska corneában, illetve nyúl és macska sclerában és irisben is. Sertés modellben PAC1-R pozitivitást találtak a sugártestben. PACAP és PAC1-R expressziót fedeztek fel macska, patkány és nyúl choroideában, illetve könnymirigyben és a conjunctivában is kimutatták a PACAP eloszlását (Nilsson et al. 1994; Wang et al. 1995; Elsås et al. 1996). PACAP immunpozitív sejtek találhatók a retina belső magvas rétegének amakrin és horizontális sejtjeiben, a ganglionsejt rétegben és Müller gliasejtjeiben, továbbá az optikus rostok rétegében, valamint a belső plexiform rétegben is találhatóak PACAP pozitív idegrostok. Azonban a külső magvas rétegben és a pigment epithelium rétegében nem mutattak ki PACAP pozitivitást. PACAP pozitív axon-terminálisok találhatóak a retinális ganglion-, bipoláris-, amakrin- és horizontális sejtek közötti szinapszisokban a GCL, NFL és IPL rétegekben egyaránt (Nakamachi et al., 2012; Shioda et al., 2016). Friss tanulmány egér retinában a PACAP és receptorának eloszlását, továbbá microglia aktivációban és idegi proliferációban betöltött szerepét vizsgálta. Erős immunpozitivitást mutattak ki dopaminerg amakrin sejtek és szomatosztatinerger sejtekben, amely valószínűsíti ezen sejtekre gyakorolt fontos fiziológiai hatását. Továbbá korábbi

patkányból származó eredmények hasonlóan erős jelölődést találtak PACAP és receptorainak esetében a GCL és INL rétegekben, ahol kifejezetten amakrin, horizontális és ganglion sejtek mutattak pozitívítást. A microglia és Müller gliasejtekben tapasztalt PACAP és receptorainak előfordulása a neuroinflammációban betöltött fontos szerepét valószínűsíti (Denes et al., 2023).

1.4.4 A PACAP alkalmazási módszerei

A PACAP széleskörű jótékony hatásainak köszönhetően nagy figyelmet kapott diagnosztikai (biomarker) és lehetséges terápiás értéke. Szemészeti kutatásokban is számos alkalmazási módszer lehetőségét igazolták (Werling et al. 2016; Nakamachi et al. 2016; Werling et al. 2017). Több szemészeti betegség kezelése során alkalmaznak intravitreális injekciót. Az eljárás során a hatóanyag az üvegtestbe juttatva éri el a retinát, és fejt ki hatását. A koraszülött retinopathiában, vagy az időskori maculadegenerációban alkalmazott anti-VEGF-intravitreális injekció gyakori kezelési forma, amely a kórosan burjánzó erek visszafejlődését elősegítve, képes az erek szivárgását csökkenteni. Számos korábbi kutatás igazolta az intravitrealisan beadott PACAP retinavédő hatását ischaemia-indukálta retinopathiában, koraszülött retinopathiában, diabéteses retinopathiában és gyulladásoz állatmodellben (Szabadfi et al. 2012; Danyadi et al. 2014; Kvarik et al. 2016). A retinoprotektív hatást akár PAC1-R agonista maxadilán alkalmazásával is elérhetjük. Kutatócsoportunk előzetes tanulmányai bizonyították, hogy a PACAP szemcsepp formájában képes átjutni az okularis barriereken és eléri a retinát (Werling et al., 2016; Werling et al., 2017). Továbbá azt is igazoltuk, hogy a PACAP stabil marad szemcsepp formájában (Kovacs et al., 2021). Szemcsepp formájában elsősorban a corneán igazolt jótékony hatásait érdemes megemlíteni (Nakamachi et al., 2016; Hirabayashi et al. 2022). Nyúl esetében száraz szem szindrómával szembeni pozitív hatásait szintén igazolták. Cornea keratinizációs modellben bizonyították a PACAP könnytermelés befolyásoló hatását, amely a cAMP és pPKA szint fokozásán keresztül valósul meg (Nakamachi et al., 2016). A PACAP szemcsepp nem csupán a cornea és könnymirigy működésére hat, hanem igazoltan védőhatása van a retina különböző károsodásaival szemben. A PACAP szemcsepp protektív hatását igazolták ischaemia-indukálta retinakárosodás, koraszülött retinopathia és glaukóma esetében is (Werling et al., 2017; Kvarik et al., 2021; Szabo et al., 2021). Ezen eredmények alapján a PACAP szemcsepp formájában ígéretes kiegészítő terápiás lehetőséget jelenthet különböző retinát érintő betegségekben.

2 Problémafelvetés

Különböző szervrendszerekben előforduló PACAP és PAC1-R eloszlása állatmodellek alapján gondosan dokumentált. Korábbi tanulmányok már igazolták a peptid pozitív hatásait különböző retinopathia modellekben. A PACAP neuroprotektív, anti-apoptotikus és anti-inflammatórikus tulajdonságai közismertek. Korábbi kutatások még nem vizsgálták a PACAP és specifikus receptorának jelenlétét emberi szemben, így fontosnak tartottuk a kérdés megválaszolását, ezzel felmérve az állatkísérletekből származó eredmények transzlációs lehetőségét. Kísérleteinkben humán, enukleált szemekben előforduló PACAP eloszlását vizsgáltuk, ezzel rámutatva a korábbi állatmodellekben leírt eredmények hasznosíthatóságára.

A vakság második leggyakoribb oka a glaukóma, amelyre hosszútávú, neuroprotektív gyógymód a mai napig nem ismert, csupán a tüneteket csökkentő terápiás lehetőségek állnak rendelkezésre. A betegség kialakulásának pontos oka sem ismert, azonban a pathomechanizmust illetően számos elmélet született. Kutatások fókuszában mechanikai faktorok, úgymint a megemelkedett szemnyomás, neuroinflammatórikus hatások, úgymint a gliózis, illetve a retina érzettségének vizsgálata áll. A „vascularis teória” szerint, a retina érzettségének változása és a nem megfelelő vérellátása vezet a kórkép kialakulásához. Korábbi kutatásunkban igazoltuk mikrogyöngy-indukálta elsődleges nyitott zugú glaukóma modellben a PACAP szemcseppkezelés szemnyomáscsökkentő és neuroprotektív hatását. Arra kerestük a választ, hogy a PACAP hogyan képes befolyásolja a többi betegség kialakításában kiemelkedő rizikófaktort.

3 Célkitűzés

Korábbi tanulmányok eredményei alapján ismert a PACAP és specifikus receptorának (PAC1-R) eloszlása különböző kísérleti állatfajok szemében.

- I. Első kísérletsorozatunkban célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk humán enukleált szemekben a PACAP és specifikus PAC1-R-nak eloszlását, mellyel a korábbi állatmodellekből származó eredmények transzlációs jelentőségét kívántuk igazolni és megerősíteni.

Kutatócsoportunk több szemészeti betegségben igazolta a PACAP retinoprotektív szerepét szemcseppes kezelés formájában. Korábbi kutatásinkban bizonyítottuk, hogy a PACAP szemcseppkezelés neuroprotektív hatása mellett IOP csökkentő hatással is rendelkezik glaukóma patkány modellben. Jelenleg a glaukóma az egyik legelterjedtebb szemészeti probléma, így kiemelt fontosságúnak tartottuk megvizsgálni a fájdalommentes, non-invazív szemcseppkezelés hatását a szemnyomás emelkedés mellett más, glaukóma hátterében álló faktorokra is.

- II. Kísérletsorozatunk második felében célunk volt vizsgálni a PACAP1-38 szemcseppkezelés hatását a retina érrendszerére és hypoxiás molekulák jelenlétére patkány glaukóma modellben.

4 Kísérlet I. PACAP és PAC1-R előfordulása humán szemben

4.1 Anyagok és módszerek

4.1.1 Kísérleti minták és előkészítésük

A kísérleteinkben használt humán szemek (n=7 beteg, 6 fiú, 1 lány) a PTE ÁOK/KK Pathológiai Intézet közreműködésével, retinoblasztóma miatt enukleált humán szemekből származtak (etikai engedély: No: 6383-PTE 2018). A betegek átlag életkora 16±10 hónap volt. A hisztológiai vizsgálatok során kizárólag a tumormentes, egészséges területeket használtuk fel. A teljes szemeket 10%-os formalinban fixáltuk, majd felszálló alkoholsorban dehidratáltuk. A teljes szemekből paraffinba ágyazást követően mikrotóm segítségével 3 µm vastagságú metszeteket készítettünk (Microm HM 325, Thermo Scientific, Lfd.). Ezután a metszeteket deparaffináltuk, majd leszálló alkoholsorban rehidratáltuk. Ezt követően a mintákon 15 percig hő-indukálta epitóp feltárást végeztünk, 1mM (pH=6.0) citrát-puffer segítségével mikrohullámú sütőben (750W). A metszetek ezt követően TBS-ben (pH=7.6) mostuk (5 x 5 percig).

4.1.2 A retina minták szövettani analízise

A metszetek immunhisztokémiai jelöléséhez nyúl anti-PAC1-R (katalógusszám: AVR-003, Alomone Labs, Ltd., 1:125, 1 óra, szobahőmérséklet) vagy nyúl anti-PACAP38 (katalógusszám: T-4473, BMA Biomedicals, Ltd., 1:500, 1 óra, szobahőmérséklet) antitestet alkalmaztunk. A mintákat ezt követően TBS-ben (5 x 5 percig) mostuk, majd HISTOLS-AP-R anti-nyúl alkalikus foszfatáz-jelölt detektálóban inkubáltuk (katalógusszám: 30,011.R500A, Histopathology, Ltd., 30 perc, szobahőmérséklet). Mosást (TBS) követően HISTOLS Resistant AP-Red Chromogen/substrate System (katalógusszám: 30,019, Histopathology, Ltd.) segítségével sötétben elvégeztük az előhívást, a kromogén/szubsztrát pufferben történő inkubálás nagyjából 10 percig tartott, a jelölés erősségének kontrollálása fénymikroszkóp alatt történt. Az általunk választott magenta színű kromogénnel próbáltuk a pigmentált sejtekre jellemző barna szín mellett is detektálhatóvá tenni a jelet. A metszeteket ezt követően hematoxylinnel kontrasztosítottuk, majd csapvízzel kékítettük. A mintákat felszálló alkoholsorban víztelenítettük, majd xilollal derítettük és fedőanyaggal fedtük. A negatív festési kontroll mintákon az elsődleges antitest nélkül, TBS-ben történt az inkubáció. A metszeteket

ezt követően Panoramic MIDI II automatikus metszet szkennert (3DHISTECH Ltd., Hungary) és CaseViewer 2.3 szoftvert (3DHISTECH Ltd., Hungary) segítségével fényképeztük, majd a mintákat szemikvantitatív módon elemeztük. Az immunreaktivitást leíró módon, három kutató egymástól függetlenül értékelte, 0-++-+++ jelzéssel a jelölés intenzitásától függően.

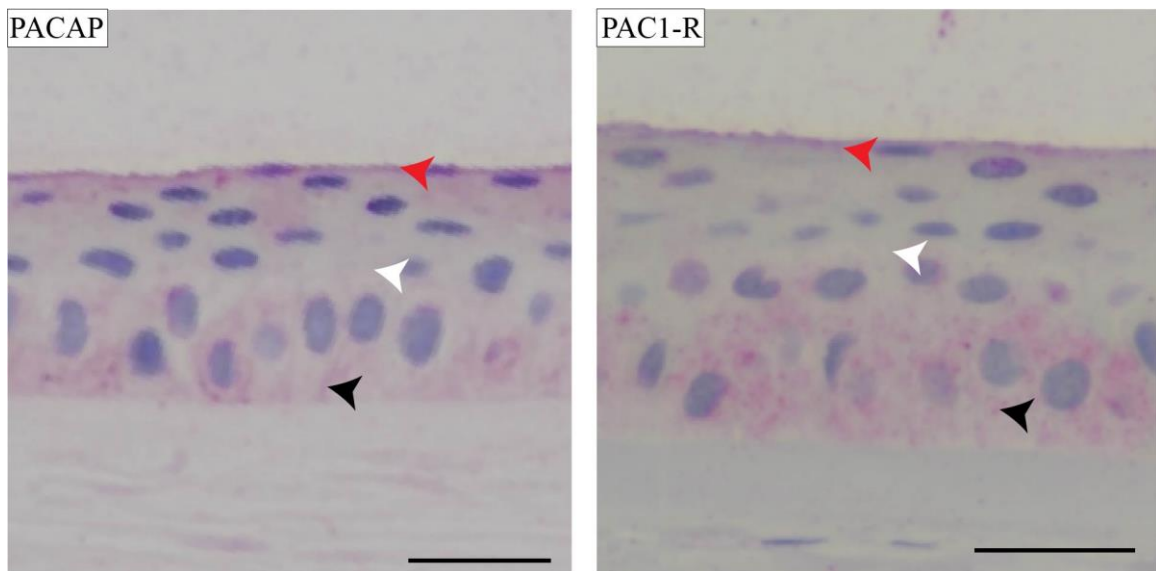
4.2 Eredmények

Eredményeinket a 1. táblázat foglalja össze. A szemgolyó három rétegnek megfelelő (*tunica fibrosa, tunica vasculosa, retina*) logikai sorrend mentén mutatjuk be megfigyeléseinket.

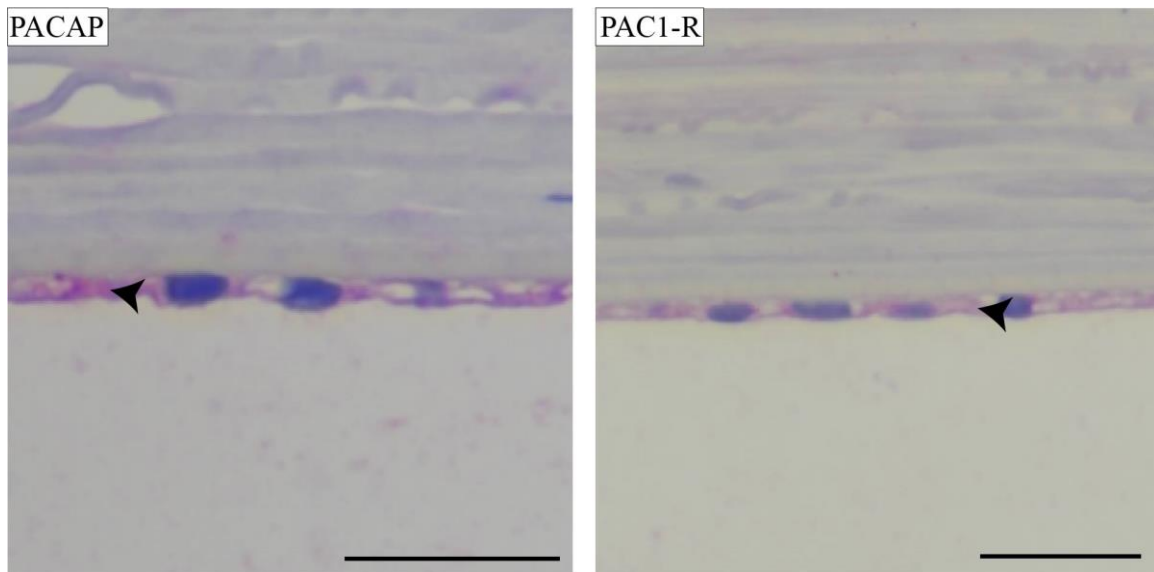
Stuktúrák		PACAP	PAC1-R	
Cornea	Epithelium	0 / ++	0 / ++	
	Stroma	0	0	
	Endothelium	++	++	
Sclera		0	0	
Tunica vasculosa	Iris	Pigment epithelium	+++	++/+++
		Stroma	++ / +++	++ / +++
		Musculus sphincter pupillae	+ / ++	0 - +
	Corpus ciliare	Musculus dilatator pupillae	+++	0 / ++
		Pigmentált hám	+++	+++
		Nem-pigmentált hám	+++	++
		Stroma	+	+ / +++
Choroidea		0	0	
Retina	Idegrostok rétege	+	+	
	Stratum ganglionare	0 / ++	0 / +++	
	Stratum plexiforme internum	++	+ / ++	
	Stratum granulosum internum	0 / +	+	
	Stratum plexiforme externum	0	0 - +	
	Stratum ganglionare externum	0	0 - +	
	Stratum bacillii et con	0 - +	0 - +	
	Stratum pigmenti retinae	++	+++	
Nervus opticus	Glia	0	++	
	Neuropil	++	++	

1. táblázat: A PACAP és PAC1-R immunreaktivitás disztribúciója és relatív mennyisége humán szemben. A szimbólumok szemikvantitatív értékelés alapján detektált PACAP és PAC1-R előfordulás erősségét reprezentálják: +++: erős; ++: mérsékelt; +: alacsony; 0: jel nem detektálható. A táblázatban egy metszeten belül felmerülő különbségeket „/” szimbólummal, eltérő mintákban detektált eltéréseket pedig „-” szimbólummal jelöltük.

A szemgolyó külső rétege, a tunica fibrosa két részre osztható, ínhártyára és szaruhártyára. A vastag, kollagénben gazdag, tömött rostos kötőszövetből felépülő ínhártya nem mutatott immunreaktivitást PACAP és PAC1-R esetében sem. A cornea külső, epithelium rétege többrétegű el nem szarusodó laphám, belső, endothelium rétege pedig egyrétegű laphám. A köztük található stroma kollagén rostos szerkezete sem mutatott immunreaktivitást. Azonban a külső hámrétegben találtunk immunpozitív sejteket mind a peptid, mind a receptora esetében. A basalis rétegben egységesen, illetve a felső, planocelluláris rétegben néhány metszet esetében találtunk jelölődést. A középső poligonális réteg esetén egy metszet sem mutatott immunpozitivitást (13. ábra). A belső endothelium rétegben egységesen erős PACAP és PAC1-R immunjelölést találtunk (14. ábra).

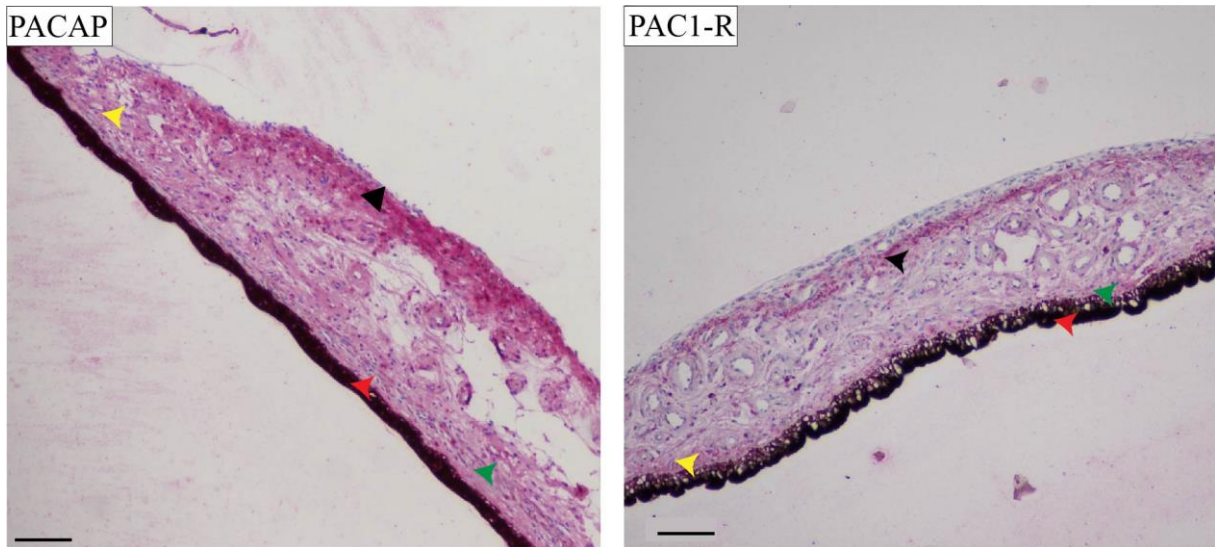


13. ábra: Reprezentatív fénymikroszkópos képek a PACAP és PAC1-R jelölt (magenta szín) humán szem szaruhártya epitheliumról. A cornea külső (piros nyílhegy) és belső (fekete nyílhegy) epithelium rétege mutatott PACAP és PAC1-R immunreaktivitást, míg a köztük található sejtrétegben (fehér nyílhegy) nem találtunk egyik antitest esetében sem immunreakciót. Mérték: 50 μ m

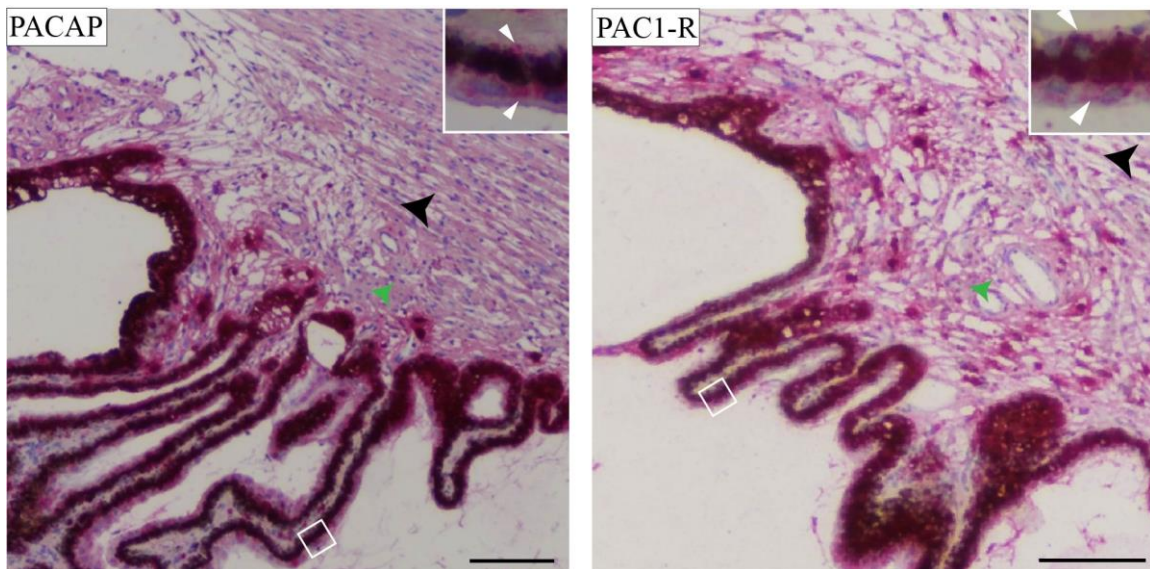


14. ábra: A szaruhártya belső endothelium rétegében, hasonlóan erős PACAP és PAC1-R (fekete nyílhegy) immunreakció volt detektálható (magenta szín), amely a reprezentatív ábrán is jól látható. Mérték: 50 μ m

A szem középső, tunica vasculosa rétege irisből, corpus ciliareből és choroideából áll. Az iris jelentős részét a m. sphincter és m. dilatator pupillae tapadását biztosító stroma tölti ki. A stromától posterior irányban található, kétrétegű pigmentált epithelium, mind a PACAP és PAC1-R esetében magentaszínű immunpozitivitást mutatott (15. ábra). A stroma egyenlőtlen eloszlású, anterior irányban erősebb jelölődést adott (++/+++ jelölés) (1. táblázat). A m. sphincter pupillae esetében a PACAP pozitívitas jelentősebb volt a receptorhoz képest, ahol csupán néhány metszetben találtunk immunjelet. A m. dilatator pupillae egységes erős PACAP jelölést adott, míg a receptor esetében csak a posterior szegmensben találtunk magenta színű kötődést. A sugártest stromájában a sugárizmok, az anterior szegmensében pedig a csarnokvíz termelésért felelős sugártestnyúlványok találhatóak. Felosztható továbbá egy külső, pigmentált és egy belső, nem pigmentált hámrétegre. A belső nem pigmentált rétegben erős PACAP és PAC1-R immunpozitivitas volt detektálható. A stroma esetében a PACAP gyenge, a receptor azonban erős magenta színű jelet adott. A sugártest nyúlványok bázisán erős, a ciliáris izmok esetében azonban nagyon gyenge immunpozitivitást találtunk (16. ábra). A choroidea esetében PACAP és PAC1-R jelölés nem volt detektálható.

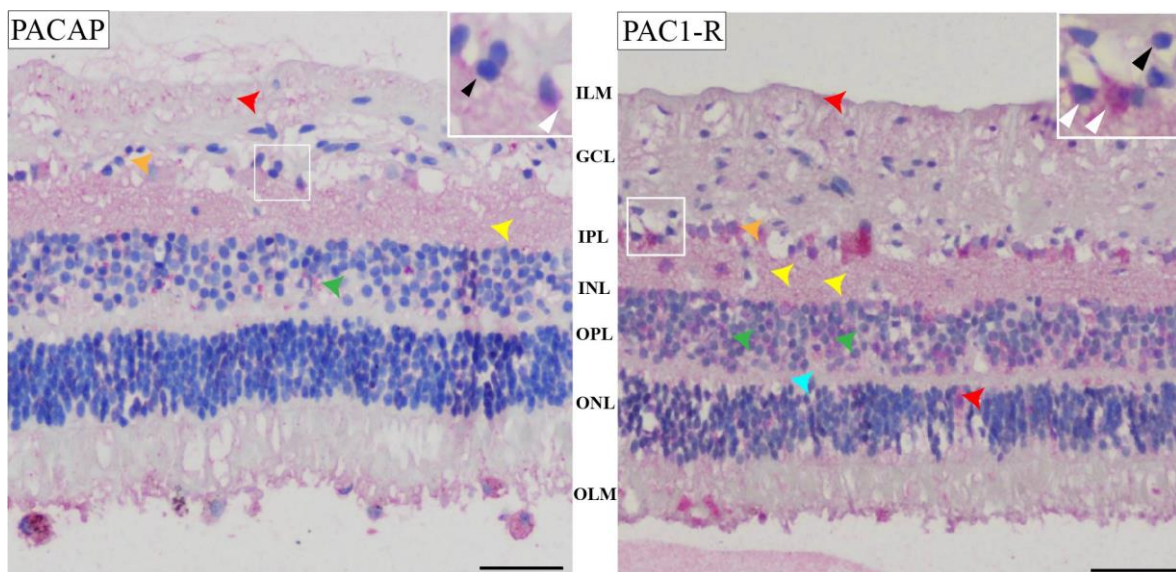


15. ábra: Az iris stromájában mindkét antitest esetében erős immunpozitivitást detektáltunk (fekete nyílhegy), azonban az eloszlása egyenlőtlennek bizonyult, anterior irányban intenzívebb jelet tapasztaltunk. Hasonlóan erős festődést találtunk a PACAP antitest esetében a m. sphincter pupillae (sárga nyílhegy) területén, azonban PAC1-R immunpozitivitás nagyon gyenge volt. A m. dilatator pupillae (zöld nyílhegy) PACAP jelölésre csupán a posterior területeken adott gyenge jelet, míg a receptor esetében posterior irányban tapasztaltunk jelet. A stroma mögött található kettős pigmentált epithelium rétegben (piros nyílhegy) intenzív magenta színű jelölést figyeltünk meg mindkét antitest esetében. Mérték: 100 µm



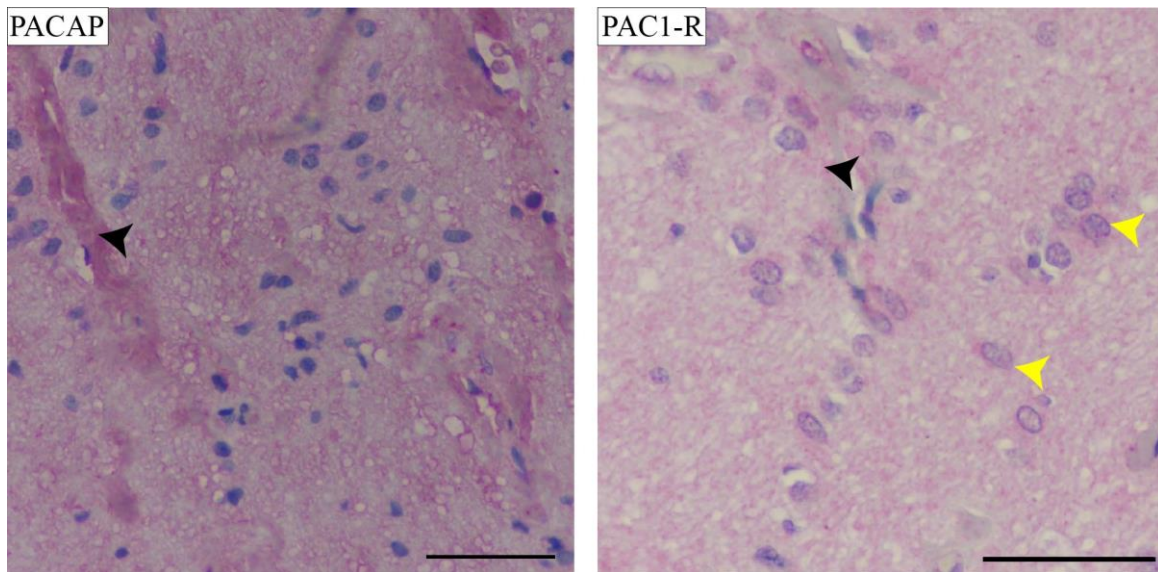
16. ábra: A corpus ciliare és processus ciliaris stromájában gyenge PACAP festődést találtunk (zöld nyílhegy). A PAC1-R jelölés erőteljesnek bizonyult a sugártest nyúlványok bázisán, azonban a ciliáris izmok (fekete nyílhegy) gyenge immunpozitivitást adtak. A kiemelt rész (fehér négyzet) a pigment epithelium réteget mutatja, amelyben magas immunpozitivitás mutatkozott (fehér nyilak) mindkét antitest esetében. Mérték: 100 µm

A retina tíz rétegből áll, amelyek közül a legkülső, pimentált réteg fejlődéstani szempontból eltér a többi kilenc rétegtől. A stratum pigmenti retinae esetében erős PACAP és PAC1-R immunpozitivitás volt kimutatható, és a magenta színű kromogénnek köszönhetően könnyen elkülöníthető volt a barna pigmenttől. A fotoreceptorok rétegében mintánként eltérő módon, helyenként gyenge immunjelölés mutatkozott (0-+ jelölés). A retina külső magvas- és plexiform rétegében hasonló immunpozitivitás mutatkozott, csupán néhány minta esetén találtunk PAC1-R pozitivitást. A bipoláris-, amakrin és Müller sejtek a retina belső magvasrétegben helyezkednek el. Immunjelölést követően ebben a rétegben szinte minden minta esetében tapasztaltunk PACAP és PAC1-R immunpozitivitást. A retina ganglionsejtes rétegében egy érdekes, ismétlődő jelölődési mintázatot fedeztünk fel, néhány ganglionsejt erős immunjelölődést mutatott, míg másokban nem volt detektálható sem PACAP, sem PAC1-R (0/+++ jelzés) reakció (17. ábra). A ganglionsejtek axonjai által alkotott látóideg, fejlődéstani eredete miatt a központi idegrendszer részének tekinthető. A látóideget az agyhártyával analóg rétegek burkolják, illetve gliasejteket tartalmaz. A látóideg neuropilben mérsékelt PACAP és PAC1-R pozitivitást detektáltunk, míg a gliasejtek csupán PAC1-R pozitivitással rendelkeztek (18. ábra).



17. ábra: A retina esetében magenta színű PACAP pozitívítás volt megfigyelhető az idegrostok rétegében (piros nyílhegy), ganglionsejt rétegben (narancssárga nyílhegy), a belső plexiform- (sárga nyílhegy) és magvas rétegben (zöld nyílhegy), illetve a pigment epithelium rétegben. A kiemelt részben a PACAP pozitív ganglionsejtek (fehér nyíl) és PACAP negatív ganglionsejtek (fekete nyíl) eloszlását kívántuk bemutatni a ganglionsejt rétegben. A retina számos rétegében erősebb PAC1-R pozitívítás volt megfigyelhető volt, az idegrostos rétegben (piros nyílhegy), a ganglionsejt rétegben (narancssárga nyíl), belső plexiform- (sárga nyílhegyek) és magvas rétegben (zöld nyílhegyek), külső magvas- (kék nyílhegy) és plexiform rétegben (piros nyílhegy), illetve a pigment epithelium rétegben is. A kiemelt részen a PAC1-R pozitív (fehér nyílak) és PAC1-

R negatív (fekete nyíl) ganglionsejtek eloszlását kívántuk bemutatni. Mérték: 50 μ m (A nyilak megléte/nem léte a jelölés előfordulását, száma pedig az immunpozitivitás intenzitásában jelentkező különbségeket reprezentálja).



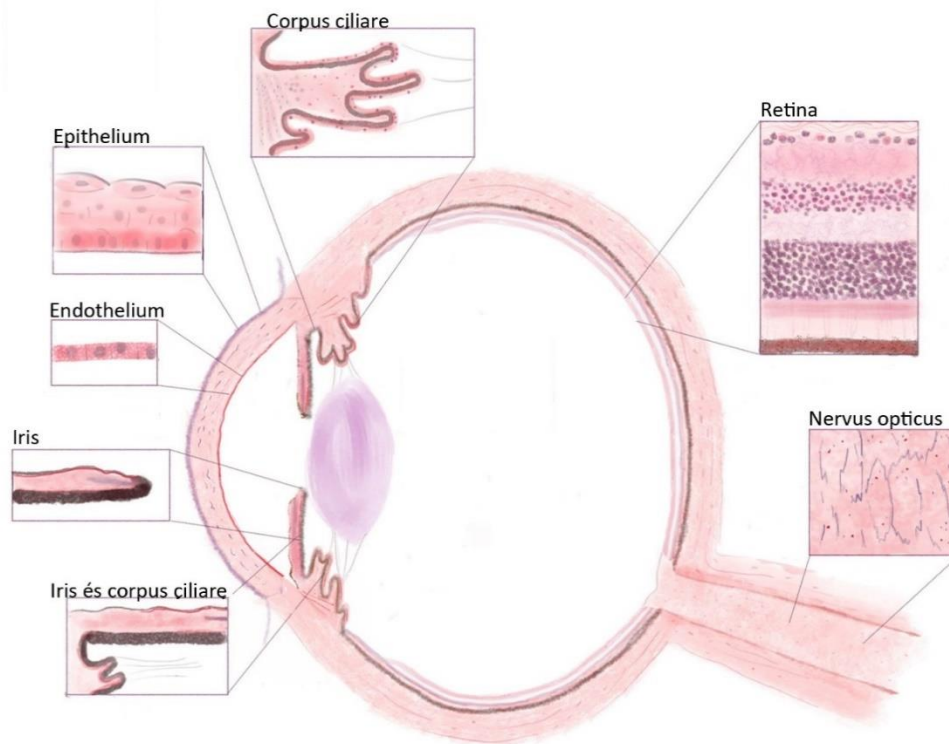
18. ábra: A látóideg neuropilben (fekete nyílhegy) mérsékelt PACAP immunreakció volt megfigyelhető, míg a gliasejtek nem mutattak jelölődést. A PAC1-R antitest esetében, a neuropilben mérsékelt immunreakció volt megfigyelhető, míg a gliasejtekben (sárga nyílhegyek) erős immunpozitivitás mutatkozott. Mérték: 50 μ m

4.3 Diszkusszió

Tanulmányunkban elsőként mutattuk be a PACAP és PAC1-R eloszlását teljes humán szemben immunhisztokémiai módszerrel (19. ábra). Immunpozitivitást detektáltunk a cornea epithelium és endothelium rétegében, illetve az iris és sugártest stromájában valamint az ott található izmokban. A retinában számos réteg mutatott immunreakciót, míg a látóideg esetében gyengébb festődést találtunk. A PACAP előfordulását a szemben és a retinában korábban számos fajban leírták. A legtöbb kutatásban patkány vagy egér retinát használtak, ahol PACAP és receptora erős immunreakciót mutatott (D'Agata and Cavallaro, 1998; Denes et al., 2019). Seki és munkatársai pontosan feltérképezték a fehérje és receptorának expresszióját egérben (Seki et al., 1997; Seki et al., 1998; Seki et al., 2000; Shioda et al., 2016). Hasonló expressziós mintázatot találtak csirke retinában is, ahol felfedezték a peptid cirkadián ritmussal való összefüggését (Józsa et al., 2001, Borba et al. 2005). Teknős és hal retinában is kimutatható a PACAP jelenléte (Reglodi et al., 2001; Grone et al., 2007), valamint majmokban és más fajban is megfigyelték, hogy a PACAP melanopszinnal együtt tárolva fordul elő a melanopszin tartalmú retinális ganglionsejtekben (ipRGC) (Hannibal et al., 2014). Korábbi tanulmányokban

PACAP immunreaktivitást találtak macska choroideában is (Elsås et al., 1996). Radioizotópos jelöléssel kimutatták a PACAP jelenlétét nyúl irisben, sugártestben, corneában, retinában és choroideában (Nilsson et al., 1994; Wang et al., 1995). Humán, magzati retinában Olianás (1996) és munkatársai kimutatták a PACAP cAMP serkentő hatását, illetve retina homogenizátumban a PACAP és PAC1-R mRNS előfordulását (Olianás et al., 1996). Tanulmányunkban elsőként írtuk le a PACAP és PAC1-R előfordulását és eloszlását humán szemben. A minták három év alatti, enukleáción átesett, retinablastomában szenvedő betegekből származtak. A betegség megléte, illetve a betegek kora befolyásoló tényezőként szolgálhat, így a peptid eloszlásában különbség feltételezhető a felnőtt szemhez képest. Azonban az általunk vizsgált szemgolyók teljesen kifejlett okuláris struktúrával rendelkeztek. Emlősökben a születést követően a szem különböző mikroszkópos és makroszkópos szintű növekedési, illetve érési folyamaton megy keresztül. A szemgolyó teljes érettségét nagyjából a serdülőkorra éri el. A születést követő érés során a retina kiterjedése aktív (sejt proliferáció, sejtosztódás, sejttest növekedés) és passzív (retina nyúlása a szemgolyó növekedése mentén) mechanizmusokon keresztül megnövekszik. Az életszakaszok során e folyamatok váltakozva járulnak hozzá a teljes érettség eléréséhez. Születés után a sejt proliferációs mechanizmusok fokozódása a szemgolyó növekedéséhez járulnak hozzá. Egy újszülött szeme közel 18 mm átmérőjű kissé lapított formájú, amely felnőtt korra érett állapotban akár 24 mm is lehet. Újszülöttek szemében a szemlencse rugalmasabb szerkezetű, amely látás során az akkomodációt befolyásolja. Miután az újszülött retinában minden sejt és idegi kapcsolat kialakul, további jelentős változásokon megy keresztül. A külső és belső magvas réteg az érési folyamatban vékonyodik, míg a belső plexiform réteg érett felnőtt retinában vastagodik. Egy másik a retina születést követő érésében fontos terület a fovea, amely akár több hónapon keresztül történik (Kuhrt et al. 2012). Összefoglalva, születést követően a szem és a retina további érési mechanizmusokon megy keresztül, azonban 16 hónapos gyermekek retinája már jelentősen fejlettnek tekinthető. Tanulmányok kimutatták, hogy embriók és koraszülöttek esetében a PACAP szint jelentősen magasabb a felnőttekben mérthez képest, amely feltételezhetően a retina fejlődését és differenciálódását segíti elő (Falluel-Morel et al. 2007). A születés utáni érési időszakban a PACAP kifejeződése is változhat a retina neurális és szinaptikus kapcsolatainak finomodásával (Shen et al. 2013). A korábbi postnatális agyban detektált eredmények alapján a PACAP feltételezhetően jelen van korai gyerekkorban a retina különböző rétegeiben, ahol a synaptogenesis és más fejlődési mechanizmusokban játszhat szerepet (Jaworski et al. 2000; Skoglösa et al. 1999). Bár ezen információk csupán egy főbb iránymutatást adnak a PACAP retina fejlődésében betöltött szerepére vonatkozóan, további

vizsgálatok szükségesek a neuropeptid fejlődésben és érésben betöltött pontos szerepének megértéséhez.



19. ábra: Humán szemben detektált PACAP és PAC1-R eloszlásának sematikus reprezentációja. A leírt eredményeink alapján a PACAP és receptorának előfordulását piros szín indikálja. A kiemelt hat stuktúra esetében detektáltunk immunpozitivitást, a cornea epithelium és endothelium rétegében, az irisben és corpus ciliareban, a retina számos rétegében, illetve a nervus opticusban. (*Saját ábra*).

Eredményeink rámutattak a peptid széleskörű eloszlására a humán retina számos rétegében. A ganglionsejt rétegben a korábbi állatkísérletekhez hasonló speciális mintázatot találtunk a PACAP és PAC1-R expresszió esetében. A melanopszin tartalmú retinális ganglionsejtekről igazolták egér, patkány és majom modellben, hogy PACAP expresszióval rendelkeznek (Hannibal et al., 2004). Ismert az ipRGC sejtek szerepe, miszerint fényinformációt továbbítanak a cirkadián ritmus szabályozásában jelentős központok felé (Hannibal and Fahrenkrug, 2004). Azonban további vizsgálatok szükségesek a pontos összefüggés mögötti mechanizmus feltárásához.

A PACAP retinoprotektív hatását már számos állatmodellben és *in vitro* tanulmányban igazolták (Atlasz et al., 2016b; Shioda et al., 2016). A retina öregedésének jeleit mutató, PACAP génkiütött állatok rávilágítottak a PACAP öregedésben betöltött fontos szerepre

(Kovács-Valasek et al., 2017). Korábbi tanulmányok bizonyították a PACAP expresszálo ipRGC sejtek fokozott ellenállását degeneratív folyamatokban, így feltehetően a PACAP fontos szerepet tölt be az sejtek endogén protektív rendszerében (La Morgia et al., 2011). Koraszülöttek ideghártya károsodása és ischaemia egér modellben kísérletek igazolták a PACAP-hiány súlyosbító következményeit (Szabadfi et al., 2012; Kvarik et al., 2021). A retina legkülső rétegét alkotó pigment epithelium sejtek részt vesznek a fotoprotekcióban, anyagcserében, membrán megújításban, A vitamin raktározásban és fontos növekedési faktorok raktározásában. A pigment epithelium sejtek PACAP tartalma bizonyítottan protektív hatással rendelkezik diabéteszes retinopathia és öregedéssel összefüggő degenerációban, illetve *in vitro* vizsgálatban (Maugeri et al., 2017; Maugeri et al., 2019; Fabian et al., 2019).

A retina nem fényérzékeny pigmentált szakasza az iris hátsó oldalán két réteggént folytatódik. A sugártest hátsó részének külső pigmentált rétegét a retina pigment epithelium sejtjeiből, míg a belső nem pigmentált réteg fejlődéstanilag a retina belső rétegeiből származik. Eredményeink alapján a retina nem fényérzékeny része erős PACAP és PAC1-R immunreakcióval rendelkezik. Humán és nyúl csarnokvíz mintákban korábban bizonyították a PACAP jelenlétét, azonban csak stimulációt követően találtak PACAP szint emelkedését a csarnokvíz mintákban (Wang et al., 1997; Brubel et al., 2011). A PACAP csarnokvíz termelésében betöltött szerepét számos kutatási eredmény alátámasztja. Emlősökben a cAMP-szint változás a sugártest hámsejtjeinek transepitheliális folyadéktranszportját befolyásolja (Kong et al., 2006; Cheng et al., 2016). Mivel a PACAP cAMP stimuláló hatással rendelkezik, valószínűleg endogén módon képes befolyásolni a csarnokvíz termelődést. Mindemellett, kutatások bizonyították a PACAP és receptorának klorid csatornákra gyakorolt hatását, amely a cAMP útvonaltól független módon tölt be szerepet a csarnokvíz termelésben (Leung et al., 2001; Dérand et al., 2004; Alshafie et al., 2014; Martínez-Rojas et al., 2021). Korábbi patkány glaukóma modellből származó eredményeink rávilágítottak arra, hogy a PACAP nem csupán a csarnokvíz termelődésében, hanem felszívódásában is szerepet játszhat, így szemnyomáscsökkentő hatással is rendelkezik (Szabo et al., 2021).

Az irisben és a sugártestben pigmentált epithelium sejtek mellett az izmok és a stroma is immunpozitivitást mutatott. Yamaji és munkatársai (2005) bemutatták a PACAP pupillareflex fokozó hatását, azonban a dilatator pupillae izom esetében nem találtak hatást (Yamaji et al., 2005). A peptid pupillareflexben betöltött szerepét PACAP és PAC1-R génhiányos egér modellben megerősítették, ahol csökkent fényválaszt tapasztaltak (Engelund et al., 2012; Keenan et al. 2016). A PACAP szivárványhártya izmaira gyakorolt hatásáról ellentmondásos

eredmények állnak rendelkezésre, azonban egy friss tanulmány rámutatott a sphincter reflex fényviszonyoktól való függésére, amely magyarázatként szolgálhat a tapasztalt eltérésekre (Keenan et al., 2016).

A szem tunica nervosa és tunica vasculosa rétegei mellett, erős PACAP és PAC1-R immunreaktivitást találtunk a cornea külső epithelium és belső endothelium rétegében. A szaruhártya PACAP kezelése bizonyítottan fokozza az hámsejtek és szenzoros beidegzés regenerációját (Fukiage et al., 2007; Ma et al., 2015; Wang et al., 2019). Száraz szem szindróma és cornea hiperkeratinizáció tapasztalható PACAP génkiütött egerekben, amely megerősíti a peptid fontos endogén szerepét (Nakamachi et al., 2016). A szaruhártya endothel sejtei erőteljes PACAP és PAC1-R immunpozitivitása hasonlóságot mutatott Maugeri és munkatársainak (2018) eredményeivel, ahol izolált emberi cornea endothelium sejtekben mutatták ki a PACAP és PAC1-R jelenlétét (Maugeri et al., 2018). Ezen eredmények összefoglalják a PACAP szaruhártya integritásának megtartásában betöltött fontos szerepét.

A PACAP és receptorának jelenléte már számos emberi szövetben jól bizonyított. Az emberi szem PACAP és PAC1-R eloszlásának vizsgálatáról korábban nem készült tanulmány, így elsőként bizonyítottuk a PACAP és PAC1-R széleskörű jelenlétét humán szemben. Emberi szövetekben a PACAP és receptorának eloszlásában eltérések mutatkozhatnak különböző betegségek esetében. Ez vetette fel a kérdést számunkra, hogy a PACAP biomarker szerepet tölthet be a betegségek diagnosztizálásában vagy a prognózis felállításában. Friss tanulmányok igazolták a PACAP diagnosztikai értékét mielóma multiplex (Toth et al., 2023), nem-traumatikus osteonecrosis (Zhu et al., 2021), migrén (Yan et al., 2021), szorongás (Ross et al., 2020), post-traumatikus stressz szindróma (Wang et al., 2021) és sclerosis multiplex esetén (Al-Keilani et al., 2022). Klinikai mintákban a szöveti PACAP-szint változása Parkinson-kór progresszió (Pham et al., 2022), szívroham stádium (Szabo et al., 2022), illetve tumorprogresszió értékelésére szolgálhat méhnyakrák (Jung et al., 2011), vese, here, prostata, pancreas, pajzsmirigy és vastagbél rák esetén (Godlewski and Łakomy, 2010; Szanto et al., 2012; Nakamura et al., 2014; Tamas et al., 2016; Bardosi et al., 2016; Ferencz et al., 2019; Lindner et al., 2021). Mindezen eredmények megerősítik a PACAP emberi szervezetben betöltött fontos szerepét. Korábban kevés irodalmi adat állt rendelkezésre a PACAP és receptorának humán szemben való előfordulásáról és eloszlásáról. Eredményeinkkel bemutattuk a PACAP és specifikus receptorának széleskörű előfordulását humán szemben, így eddigi *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokból származó állatkísérleti eredmények esetleges transzlációs lehetőséggel rendelkeznek.

5 Kísérlet II. PACAP1-38 szemcseppkezelés erekre és hypoxiás állapotra gyakorolt hatása glaukóma állatmodellben

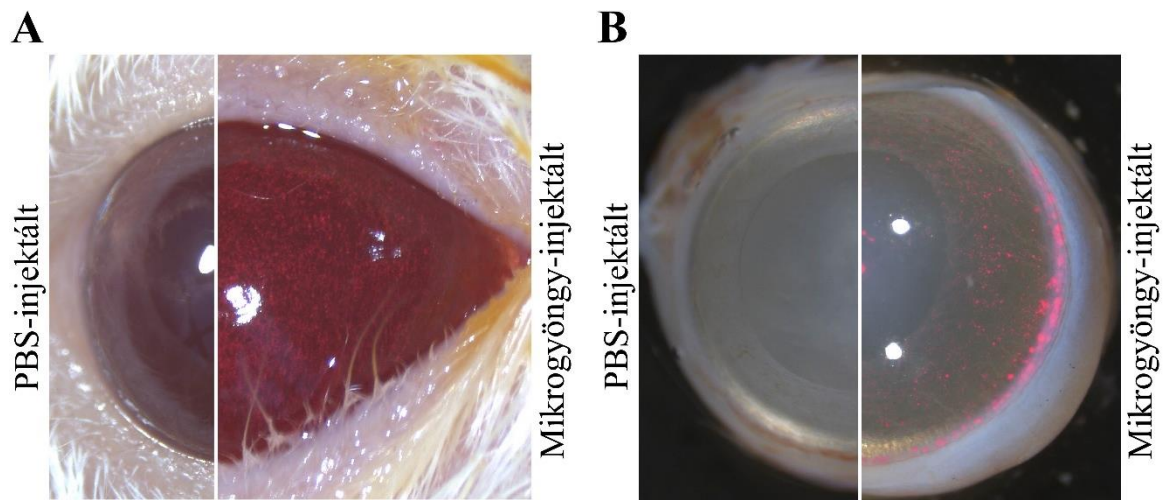
5.1 Kísérleti állatok

Kísérleteink során 3 hónapos hím Sprague-Dawley patkányokat alkalmaztunk, melyek súlya 300-450 g volt. A kísérleti patkányok az PTE ÁOK Anatómia Intézet állatházából származtak, ahol mesterséges (természetes fényhez közeli) megvilágítást alkalmaztunk, 12 órás sötét és 12 órás világos periódus váltotta egymást. Kísérleteinkbe bevont valamennyi állat laboratóriumi tartása megfelelő páratartalom, állandó 20-22°C-os hőmérséklet és napi almozás mellett történt. Kísérleteink megvalósításakor minden esetben betartottuk a PTE Munkahelyi Állatjóléti Bizottság által előírt etikai kódexben foglaltakat (a kísérleti projektek nyilvántartási száma: BA02/2000-16/2017). Ahhoz, hogy önállóan tudományos igényű, állatok felhasználására épülő kísérletes munkát végezhessek, a PTE MÁB által meghirdetett és az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács által jóváhagyott „Állatkísérletek elmélete és gyakorlata” című tanfolyamot (B szint, 80 óra) végeztem el. Az oklevél száma: PTE/33/B/2020.

5.1.1 Mikrogyöngy-indukálta glaukóma modell

Kísérleteink során főként Sappington és munkatársai által korábban leközölt kísérleti modelljére hagyatkoztunk (Sappington et al., 2010). A mikrogyöngyök elülső csarnokba történő injektálása alatt a patkányokat intraperitoneálisan bejuttatott ketamin (90 mg/kg, Calypsol), xylazil (10 mg/kg, Sedaxylan) és fiziológiás sóoldat megfelelő arányú keverékével altattuk. Ezt követően az állatok szemét Braunol fertőtlenítővel megtisztítottuk. Kísérletünk során két csoportot alakítottunk ki. A kontroll csoport állatainak (n=10) szemén szemészeti lándzsa segítségével, centrálisan sebet ejtettünk majd Hamilton fecskendő (33G) segítségével, a centrálisan corneán ejtett apró lyukon keresztül 10 µl PBS-t juttattunk a szem elülső csarnokába. A beavatkozást követően az állatok szemét Tobrex antibiotikus szemcseppel kezeltük. Az állatok másik részén (n=20) hasonlóan jártunk el, viszont PBS helyett 10µl, 10µm átmérőjű poliszitirén mikrogyöngyöket (FluoSpheres™ Polystyrene Microspheres) juttattunk az elülső szemcsarnokba, a trabekuláris hálózat elzáródásának indukálásához (20. ábra). Két héttel a beavatkozást követően megismételtük az eljárást a tartós nyomásnövekedés érdekében. A gyöngybeadást követő nyolcadik héten irodalmi adatok és korábbi tapasztalatok alapján, úgy találtuk már olyan mértékű károsodás jelentkezik, ami megfelelőnek bizonyult (Sappington et

al., 2010; Szabó et al., 2020). Az állatokat a kísérleti időszak végén (8. hét) OCT segítségével vizsgáltuk majd termináltuk immunhisztokémiai és biokémiai analízisre.



20. ábra: Elülső csarnok mikroszkópos képe kontroll és mikrogyöngy injektált csoportban. **A.** Az injektálást követő reprezentatív fotón bal oldalon a PBS-injektált, jobb oldalon pedig a mikrogyöngy-injektált szem látható.

A mikrogyöngy injektálást követő pár órában látható a gyöngyök keringése az elülső csarnokon belül. **B.** Az injektálást követő 8 héttel készített fotón bal oldalon egy PBS-injektált, jobb oldalon pedig egy mikrogyöngy-injektált szem (Saját fotó).

5.1.2 Szemnyomás monitorozása és a szemcseppek kezelése

Az injektálást megelőzően a kontroll állapot felmérése érdekében kisállat tonométer (Tonolab, Icare) segítségével megmértük az állatok szemnyomását. Kutatások korábban leírták a belső szemnyomás fluktuációját befolyásoló tényezőket (cirkadián ritmus, fizikai aktivitás, megemelkedett vérnyomás, stressz), melyeket figyelembe véve vizsgáltuk az állatok szemnyomását minden második héten (Pease et al., 2011). Egy nappal az injektálást követően az állatok két csoportját (PBS+S: n=5; Gyöngy+S: n=10) éber állapotban vívőanyaggal (Systane) másik csoportját (PBS+P: n=5; Gyöngy+P: n=10) PACAP1-38 szemcseppekkel kezeltük (1 µg/csepp) négy héten keresztül, naponta háromszor.

5.1.3 Optikai koherencia tomográfia vizsgálat

Az OCT segítségével a retina leképezhető és elemezhető nem-invazív módon. A kísérleti állatok retináiról a mikrogyöngy injekció előtt, illetve az azt követő nyolcadik héten OCT (Leica-Envisu™ R-Series SDOIS, USA) felvételeket készítettünk. A mérésekhez az állatokat

ketamin (90 mg/kg, Calypsol), xylazil (10 mg/kg, Sedaxylan) és fiziológiás sóoldat megfelelő arányú keverékével altattuk (21. ábra). A mérések megkezdése előtt pupillatágító szemcseppet (0,01% atropin) alkalmaztunk. Az állatok szemének kiszáradását úgy kerültük el, hogy a mérések előtt és közben a szaruhártyájukat műkönnyel (Systane) nedvesen tartottuk.



21. ábra: A Leica-EnvisuTM R-Series SDOIS típusú OCT készülékkel végzett mérés során a patkány az állattartó padon (*Saját fotó*).

5.1.4 Immunhisztokémia

A gyöngybeadást követő nyolcadik héten preparáltuk az immunhisztokémiai vizsgálatokra szánt mintákat (n=20 szem). Az *ora serratan* ejtett bökést követően, az egész szemeket először fixáltuk (4% PFA, 2 óra, szobahőmérséklet), aztán mostuk (PBS, 6 x 10 perc), majd ezt követően felszálló koncentrációjú (10-20-30%) cukoroldatba helyeztük. A mintákat speciális beágyazó médiumba (Leica Tissue Freezing Medium, USA) helyeztük, majd kriosztáttal 15-17 μm -es vastagságú metszeteket készítettünk a retina centrális régiójából (látóidegtől 1 mm-re). Metszeteinket zselatinnal bevont tárgylemezre vettük fel. Az immunhisztokémiai jelölést PBS mosással kezdtük, majd a mintákat blokkoltuk (2 óra, szobahőmérséklet, 5% normál szamárszérum (NDS), 3% BSA és 0,3% Triton TM X-100 PBS-ben feloldva). A metszeteket ezt követően hűtőben (4°C) egy éjszaka elsődleges antitestben (nyúl anti-HIF1- α (katalógusszám: sab2702132, Sigma-Aldrich, 1200; egér anti-VEGF (katalógusszám: MA1-16629, Thermo Fisher Scientific, 1:200) inkubáltuk. Mosási lépést (6 x 10 perc PBS-ben) követően az immunreaktivitást másodlagos antitest alkalmazásával tettük láthatóvá (Alexa Fluor-488 számár anti-nyúl 1:800 (Jackson Immuno Research, Egyesült Királyság); Alexa Fluor-488 számár anti-egér 1:800, Jackson Immuno Research, Egyesült Királyság)) az

antitesteket blokkoló oldatban oldottuk (2 óra, szobahőmérséklet). Végül propídiium-jodid (PI) (Merck Life Science Kft., Magyarország, 1 perc, szobahőmérséklet) alkalmazásával magfestést végeztünk. A mintákat mostuk (5 x 5 perc PBS-ben), majd Fluoroshield (Merck Life Science Kft., Magyarország) fedőanyaggal metszeteinket lefedtük. A metszetekről Nikon Eclipse Ti2-E konfokális mikroszkóppal, Nikon C2 konfokális detektorral fotókat készítettünk. A reprezentatív ábrákat Photoshop CS6 programmal állítottuk össze.

5.1.5 Teljes retina preparátum

A teljes szemeket 8 héttel a gyöngybeadást követően preparáltuk (n=24 szem), majd az ora serratán ejtett bökést követően két órán keresztül 4% PFA oldatban fixáltuk. Fixálást után a retinát izoláltuk a szemserlegből, majd PBS-ben (6 x 10 perc) mostuk. A mintákat 24 lyukú well plate-be helyeztük, majd 500 µl fluorescensen jelölt isolectin oldatot (Isolectin GS-IB4, Grifonia simplifolia, Alexa598 konjugált, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Ma, USA) mértünk a lyukakban található mintákra. A retinákat szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk a lectin oldatban, majd ezt követően PBS-ben mostuk (6 x 10 perc). A teljes preparátumokat tárgylemezen kiterítettük, majd a retinaminták szélén négy kis bevágást ejtettünk. Fluoroshield médium (Merck Life Science Kft., Magyarország) segítségével a mintákat lefedtük, majd Nikon Eclipse 80i epifluorescens fénymikroszkóppal fotókat készítettünk. A reprezentatív ábrákat Photoshop CS6 programmal állítottuk össze.

5.1.6 Erezettség változásainak vizsgálata

A retina erezettségének vizsgálatához lectin jelöléssel festett mintákat (n=24 szem) használtunk (4x nagyítás, 2500 x 2500 pixel terület, 150 µm/pixel). A fotókon Photoshop (Adobe Photoshop CS6, Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA) segítségével küszöbérték meghatározást és korrigálást végeztünk. A teljes retina érhálózatának analíziséhez AngioTool programot használtunk. A következő érmorfológiai tulajdonságok mérését végeztük el: teljes érhosszúság, erek elágazási pontjainak száma, végpontok száma, lacunaritás (az eredményeket körülvevő üres területek eloszlását mutató érték). A programhoz a következő paramétereket adtuk meg: érátmérő (2-30 µm) és pixel intenzitás (0-255). A vascularis denzitás mérését ImageJ Vessel Analysis plugin segítségével végeztük el.

5.1.7 Western blot analízis

A szemeket (n=16 szem) nyolc héttel a gyöngybeadást követően a korábban leírt módon western blot analízishez preparáltuk (Vaczy et al., 2018). Bradford (BioRad, Hercules, Ca, USA) reagens használatával meghatároztuk a minták fehérjekoncentrációját. A membránokat EveryBlot Blocking Buffer (BioRad, Hercules, Ca, USA) segítségével 5 percig szobahőmérsékleten blokkoltuk, majd a következő antitesteket használtuk: nyúl anti-HIF1- α (1:2000; Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary), egér anti-VEGF (1:100; SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), amiben mintáinkat egy órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, belső kontrollként nem foszforilált anti-GAPDH-t (1:20000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) alkalmaztunk. A membránokat 0,2% Tween tartalmú TBS-ben (tris-szel pufferolt sóoldat; pH=7,5) mostuk, ezt követően 1 órát inkubáltuk anti-nyúl, anti-egér torna-peroxidáz konjugált másodlagos antitestben (1:3000; BioRad, Hercules, CA, USA). Az antitest-antigén komplexeket kemilumineszcens reakcióval tettük láthatóvá. A western blotból származó eredményeinket NIH ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) program segítségével elemeztük.

5.1.8 Statisztikai analízis

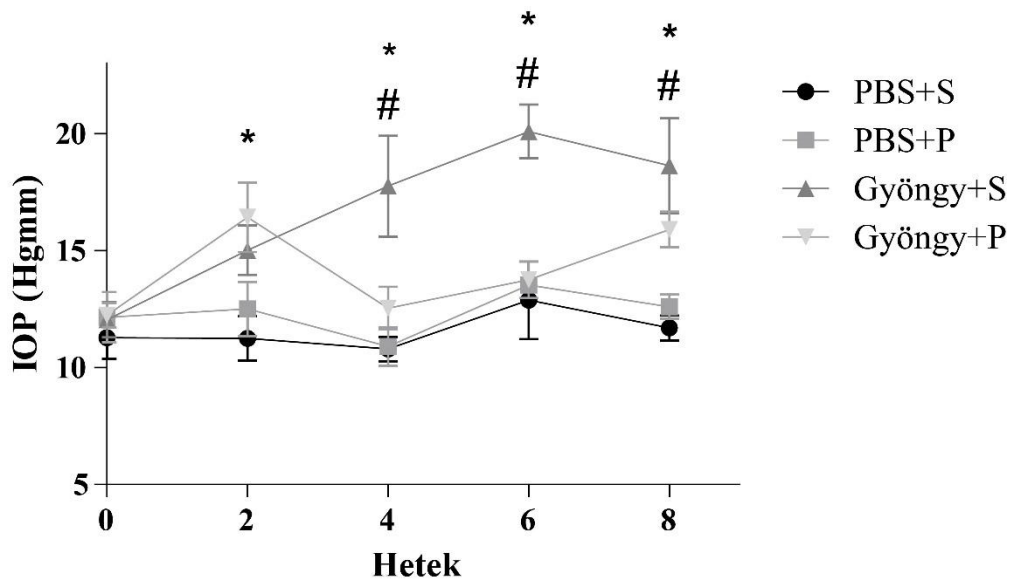
Az eredmények statisztikai kiértékeléséhez OriginPro 2018 programot használtunk, melyben kétutas ANOVA tesztet (IOP, OCT eredmények, AngioTool érvizsgálat, erek denzitása, Western blot), valamint Fisher-post hoc analízist használtunk. Szignifikancia szintként $p < 0,05$ értéket fogadtuk el. A diagrammokon és az ábrákon az átlag \pm középérték közepes hibája (SEM) került feltüntetésre.

5.2 Eredmények

5.2.1 A PACAP szemcsepp hatása a szemnyomás változására

Abszolút kontroll állapotban az átlagos szemnyomás értéke $11,93 \pm 0,22$ Hgmm-nek bizonyult. Az alábbi négy kísérleti csoport IOP értékeit vizsgáltuk a nyolc hetes vizsgálati időszakban: PBS+S; PBS+P; Gyöngy+S; Gyöngy+P (PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat; S: Systane; P: PACAP1-38). A kontroll csoportok szemnyomása a normális napi ritmusfüggő fluktuáción kívül nem mutatott jelentős változást. A glaukómás csoportok esetében a mikrogyöngy

injektálást követő 2. héten az IOP szignifikáns, 40%-os növekedése volt megfigyelhető (22. ábra). A 4. héttől kezdve a Gyöngy+P csoportban a korábbi eredményeinkhez hasonló IOP csökkenés volt megfigyelhető (Szabo et al., 2021). A 8. héten a Gyöngy+S csoportban szignifikánsan emelkedett szemnyomást mértünk a kontroll csoportokhoz képest, míg a PACAP kezelésben részesült, mikrogyöngy injektált csoport értékei nem mutattak szignifikáns eltérést a kontrollcsoportokhoz képest.

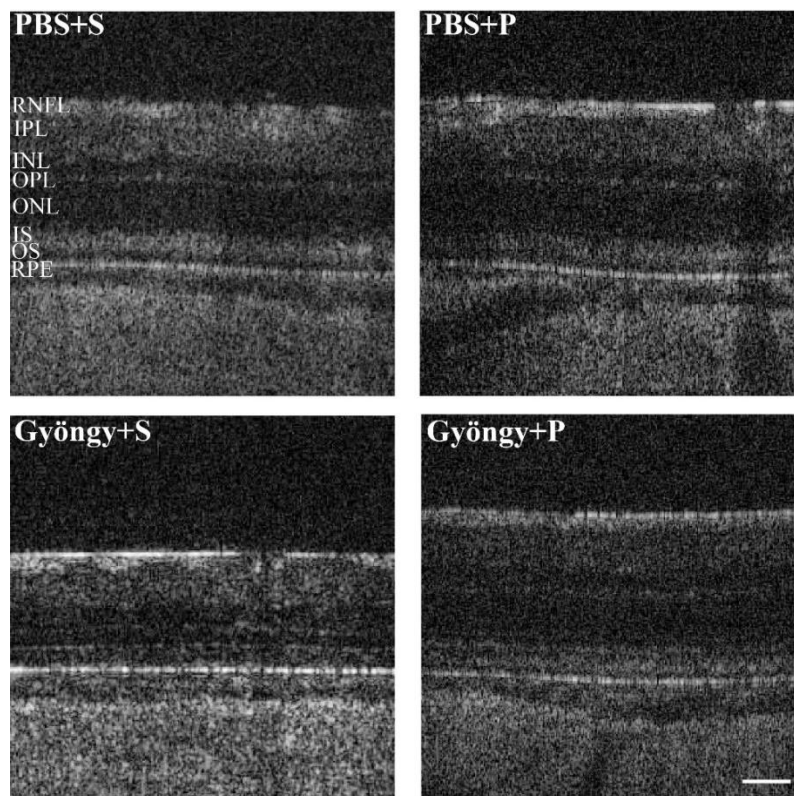


22. ábra: Szemnyomás változás nyomon követése a kísérleti periódus során. Az IOP változás a négy vizsgálati csoportban (PBS+S: n=5; PBS+P: n=5; Gyöngy+S: n=10; Gyöngy+P: n=10) a nyolchetes vizsgálati időszak alatt (IOP: belső szemnyomás, PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat; S: Systane; P: PACAP1-38). Az adatok az átlag ± SEM értéket ábrázolják ANOVA és Fisher-féle post hoc teszttel elemezve. * $p < 0,05$, Gyöngy+S vs. PBS+S; # $p < 0,05$, Gyöngy+S vs. Gyöngy+P.

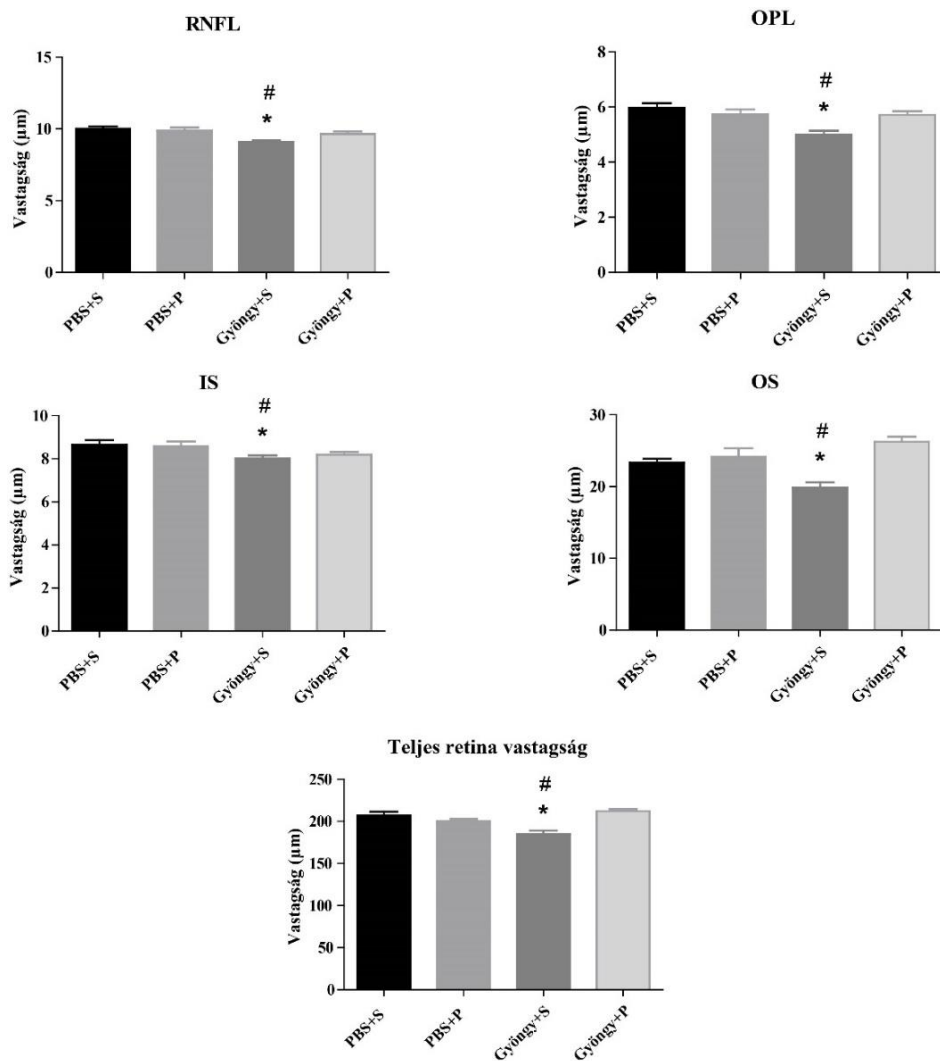
5.2.2 A PACAP szemcsepp hatása a retina szerkezetére

A retina változását *in vivo* OCT segítségével elemeztük, a vizsgálatot a mikrogyöngyök beadása előtt és a vizsgálati időszak végén (8. hét) végeztük el az alábbi négy kísérleti csoporton: PBS+S; PBS+P; Gyöngy+S; Gyöngy+P. A PACAP szemcseppkezelés PBS injektált állatokban (PBS+P) nem eredményezett változást a retina szerkezetében (23. ábra). A vizsgálati időszak végére a mikrogyöngy injektált vivőanyaggal kezelt állatokban (Gyöngy+S) súlyos retinadegeneráció jelei mutatkoztak a PBS-kontrollokhoz képest (23, 24. ábra). A Gyöngy+S csoportban szignifikáns változás volt kimutatható az RNFL vastagságában ($9,10 \pm 0,12 \mu\text{m}$) a PBS-sel injektált kontrollokhoz ($10,02 \pm 0,16 \mu\text{m}$) és a PACAP-kezelt mikrogyöngyökkel

injektált csoporthoz ($9,64 \pm 0,18 \mu\text{m}$) képest. A külső plexiform (OPL) rétegvastagság szintén csökkenést mutatott ($5,00 \pm 0,14 \mu\text{m}$), szemben a kontroll csoporttal ($5,97 \pm 0,16 \mu\text{m}$) és a PACAP kezelt csoporttal ($5,72 \pm 0,13 \mu\text{m}$). A kontroll csoportokhoz képest a fotoreceptorok belső szegmensében (IS) ($8,03 \pm 0,12 \mu\text{m}$), és a külső szegmensében (OS) ($19,82 \pm 0,76 \mu\text{m}$) is jelentős változás volt tapasztalható. A Gyöngy+S csoport teljes retina rétegvastagságában ($184,77 \pm 4,38 \mu\text{m}$) szignifikáns csökkenés mutatkozott a kontroll csoportokhoz képest ($203,44 \pm 2,51 \mu\text{m}$). A PACAP kezelés a teljes retina rétegvastagság védelmét eredményezte ($212,10 \pm 2,36 \mu\text{m}$) (23, 24. ábra). Összefoglalva, a mikrogyöngy injektált vivóanyaggal kezelt csoportban megjelentek a glaukóma diagnosztikában is jellegzetes indikátorok, úgymint az RNFL vastagság csökkenés, a teljes retina vastagság csökkenés, míg a PACAP kezelés ellensúlyozta a káros hatásokat, ezáltal megvédte a retinát a magas szemnyomás káros hatásaitól.



23. ábra: Reprezentatív optikai koherencia tomográfia (OCT) felvételek nyolc héttel a gyöngy beadást követően az alábbi négy vizsgálati csoportból (PBS+S: n=5; PBS+P: n=5; Gyöngy+S: n=10; Gyöngy+P: n=10). A kontroll csoportokban (PBS+S, PBS+P) jól látható az egészséges retina szerkezete. A Gyöngy+S csoportban azonban jelentős károsodás mutatkozott. A PACAP szemcseppkezelés hatására a gyöngy injektált csoportban (Gyöngy+P) jelentős javulás volt megfigyelhető. Mérték: $50 \mu\text{m}$. (Rövidítések: RNFL: retina idegrostréteg, OPL: külső plexiform réteg, IS: belső szegmens, OS: külső szegmens, PBS: foszfáttal puffertalt sóoldat; S: Systane; P: PACAP1-38).

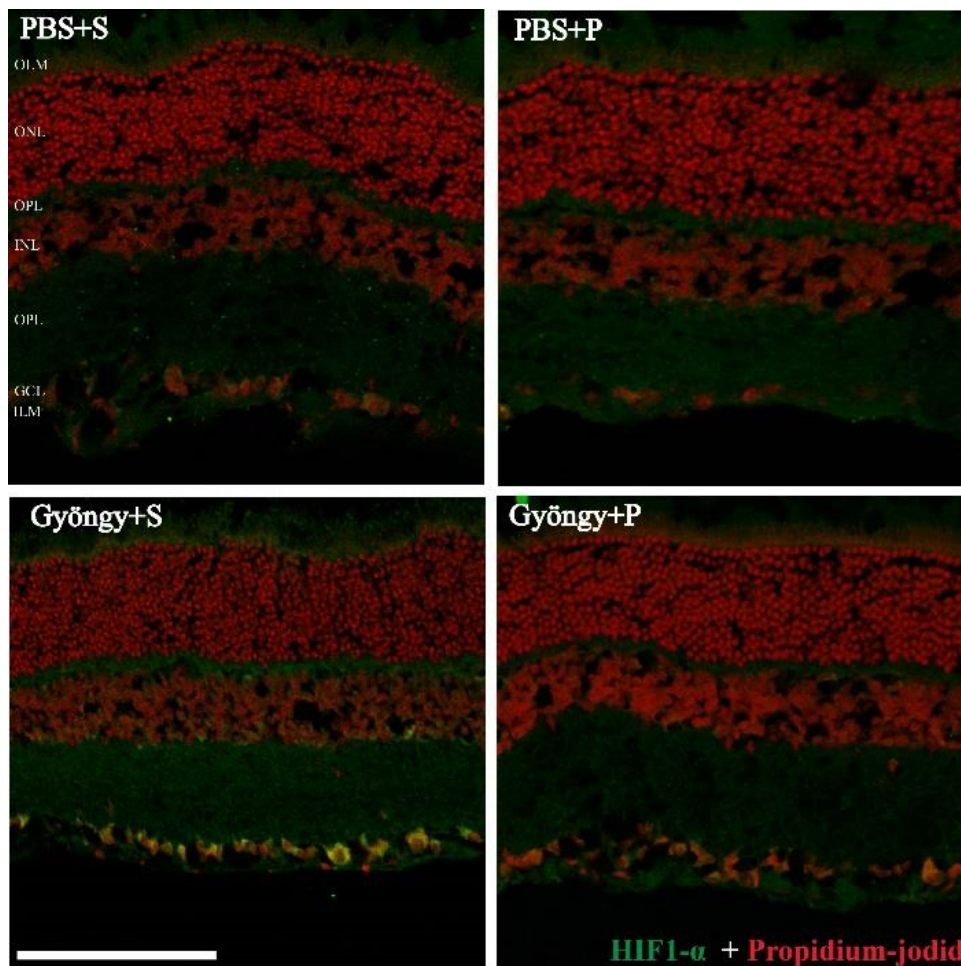


24. ábra: Optikai koherencia tomográfia (OCT) eredmények statisztikai elemzése (PBS+S: n=5; PBS+P: n=5; Gyöngy+S: n=10; Gyöngy+P: n=10). Szignifikáns különbség mutatkozott a Gyöngy+S csoportban a kontroll csoportokhoz viszonyítva az alábbi rétegekben: RNFL, OPL, IS, OS, teljes retina rétegvastagság. Az adatok átlag + SEM értéket ábrázolják ANOVA és Fisher-féle post hoc teszttel elemezve. * $p < 0,05$, Gyöngy+S vs. PBS+S; # $p < 0,05$, Gyöngy+S vs. Gyöngy+P. Mérték: 50 µm (Rövidítések: RNFL: retina idegrostréteg, OPL: külső plexiform réteg, IS: belső szegmens, OS: külső szegmens, PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat; S: Systane; P: PACAP1-38).

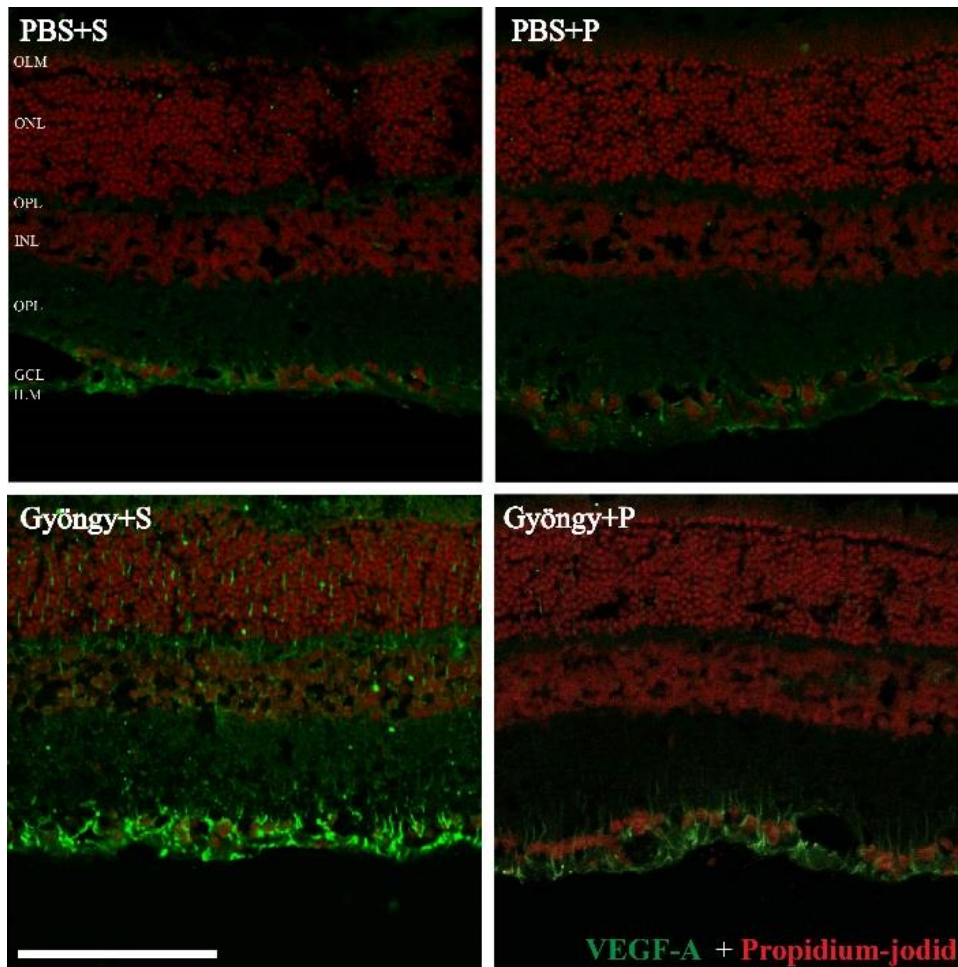
5.2.3 Az immunhisztokémiai jelölések eredményei

Kontroll csoportok (PBS+S; PBS+P) esetében nem tapasztaltunk jelentős immunreaktivitást sem HIF1- α (25. ábra), sem VEGF-A esetében (26. ábra). A Gyöngy+S csoportban lényegesen megemelkedett HIF1- α immunpozitivitás találtunk a kontroll (PBS+S; PBS+P) csoportokhoz képest (25. ábra). Jelentős immunpozitivitást detektáltunk a hypoxia következményeként a retina ganglionsejt rétegében és a belső plexiform rétegben. A kontroll csoportokhoz képest a

Gyöngy+P csoportban egy gyenge HIF1- α pozitívitas mutatkozott meg (25. ábra). VEGF-A esetében a vivőanyaggal kezelt glaukómás csoportban (Gyöngy+S) nagymértékű immunpozitivitas volt kimutatható a ganglionsejt rétegben és az idegrostos rétegben, a kontroll csoportokhoz képest. A PACAP-kezelt glaukómás csoportban alacsonyabb mértékű VEGF-A immunreakció volt kimutatható a Gyöngy+S csoporthoz viszonyítva (26. ábra).



25. ábra: HIF1- α antitest jelölést ábrázoló reprezentatív vertikális retinametszetek (a látóidegtől 1 mm-en belüli retina területek). Megemelkedett szemnyomás következtében történő immunpozitivitas változása a négy vizsgálati csoportban (PBS+ S, PBS+P, Gyöngy+S, Gyöngy+P). A megnövekedett szemnyomás HIF1- α (zöld) immunpozitivitas emelkedést okozott a Gyöngy+S csoportban a kontroll csoportokhoz (PBS+S, PBS+P) képest. A PACAP kezelt mikrogyöngy injektált csoportban mérsékelt immunpozitivitas volt detektálható. Mérték: 100 μ m. (Rövidítések: PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat; S: Systane; P: PACAP1-38; HIF1- α : hypoxia indukáló faktor 1 α ; VEGF-A: vascularis endotheliális növekedési faktor A).

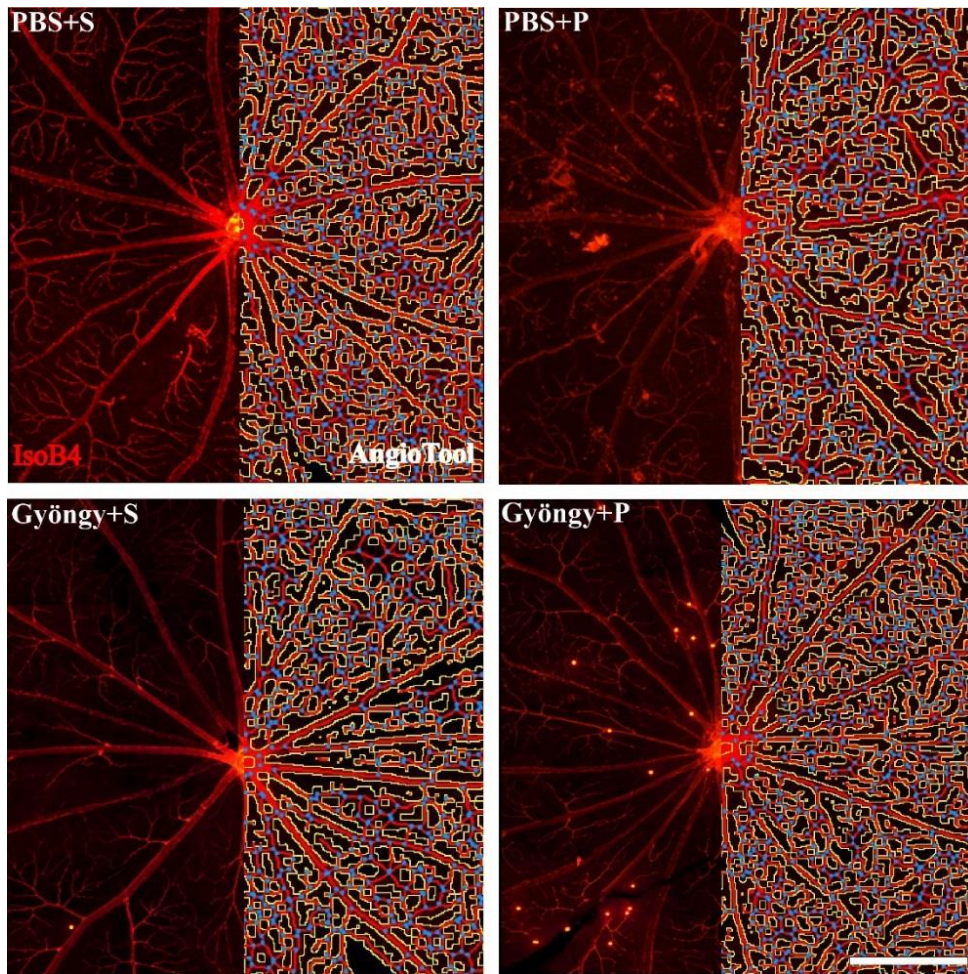


26. ábra: VEGF-A antitest jelölést ábrázoló reprezentatív vertikális retinametszetek (a látóidegtől 1 mm-en belüli retina területek). Megemelkedett szemnyomás következtében történő immunpozitivitás változása a négy vizsgálati csoportban (PBS+ S, PBS+P, Gyöngy+S, Gyöngy+P). A megnövekedett szemnyomás VEGF-A immunpozitivitás emelkedést okozott a Gyöngy+S csoportban a kontroll csoportokhoz (PBS+S, PBS+P) képest. A PACAP kezelt mikrogyöngy injektált csoportban mérsékelt immunpozitivitás volt detektálható. Mérték: 100 μ m. (Rövidítések: PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat; S: Systane; P: PACAP1-38; HIF1- α : hypoxia indukáló faktor 1 α ; VEGF-A: vascularis endotheliális növekedési faktor A).

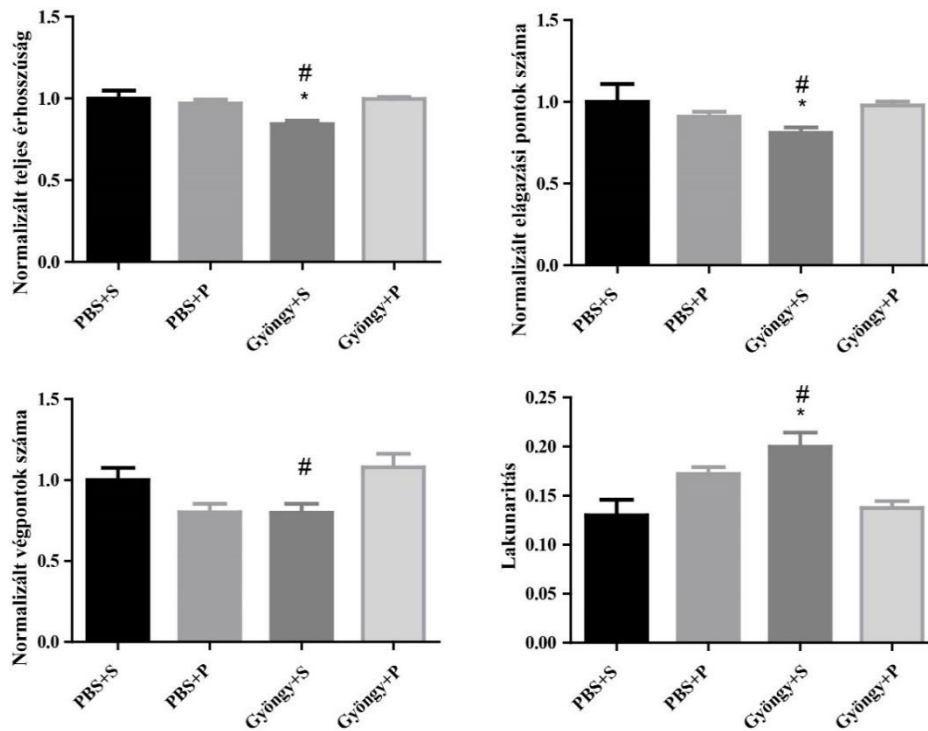
5.2.4 Az erezettség vizsgálat eredményei

A PBS injektált állatok érhalózata nem mutatott jelentős változást sem a vivőanyaggal kezelt (PBS+S), sem a PACAP-kezelt (PBS+P) csoportban (27, 28. ábra). A Gyöngy+S csoportban a teljes érhalózat hossza közel 20%-kal csökkent a kontroll csoportokhoz viszonyítva. Mindemellett jelentős (19%-os) csökkenés jelentkezett az elágazódási pontok és végpontok számában is. A vivőanyaggal kezelt glaukómás csoportban a lakunaritás mértéke megközelítette a 20%-ot, amely érték arra enged következtetni, hogy jelentősen csökkent az erekkel lefedett terület aránya (27, 28. ábra). A PACAP kezelésben részesült mikrogyöngy

injektált csoportban (Gyöngy+P) az érhálózat szerkezete a kontroll csoportokhoz hasonló értékeket mutatott (27, 28. ábra).

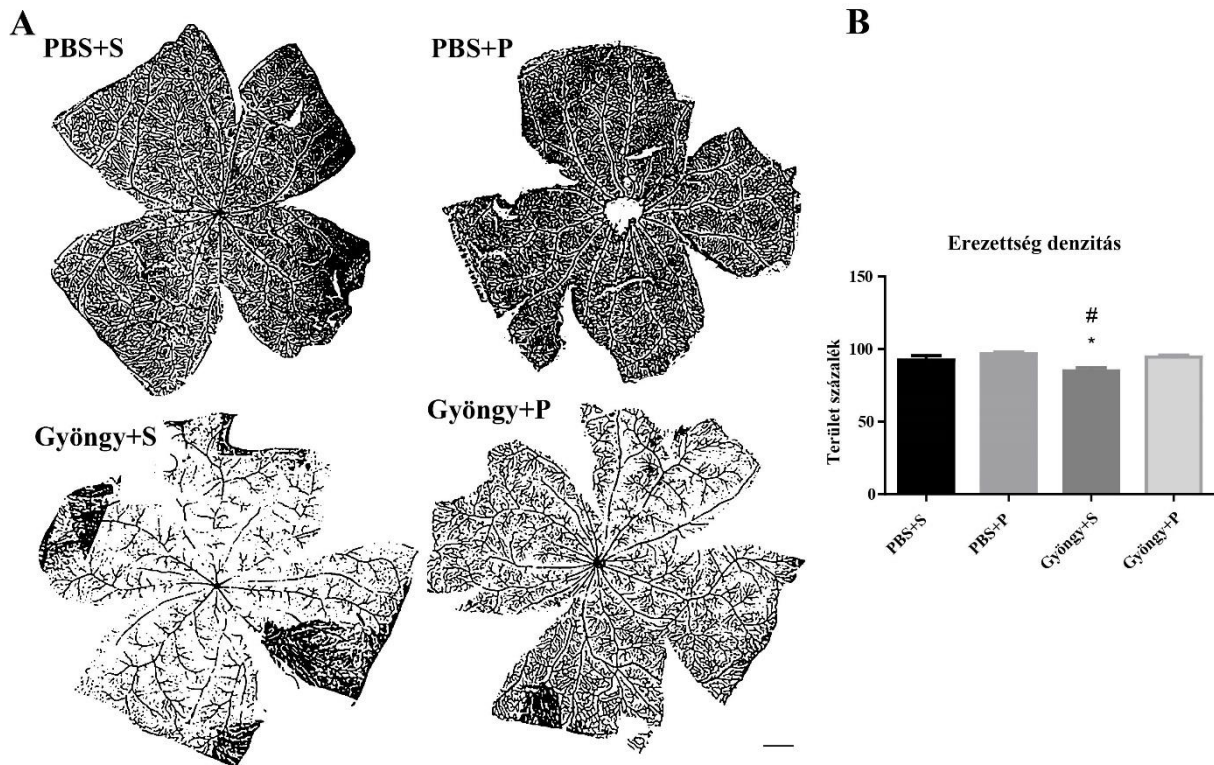


27. ábra: A retina érhálózatának vizsgálata a négy kísérleti csoportban (PBS+S; PBS+p; Gyöngy+S; Gyöngy+P). Az erek elemzéséhez Isolectin B4 jelölt (piros) whole mount retinamintákat alkalmaztunk (bal oldali panel). AngioTool program segítségével kirajzoltuk és elemeztük a teljes érhálózatot (jobb oldali panel). A piros szín az ereket, a kék az elágazódási pontokat, a sárga pedig a lakunaritást jelzi. Mérték: 500 μ m. (Rövidítések: PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat; S: Systane; P: PACAP1-38; IsoB4: isolektin B4-jelölés).



28. ábra: A retina érhálózatának vizsgálatának statisztikai eredményei a négy kísérleti csoportból (PBS+S: n=5; PBS+P: n=5; Gyöngy+S: n=7; Gyöngy+P: n=7 teljes retina preparátum). A mikrogyöngyökkel injektált vivőanyaggal kezelt csoportban (Göngy+S) jelentős változást figyeltünk meg, csökkenés jelentkezett a teljes érhálózat hosszában, az elágazódási pontok számában és végpontok számában. A lakunaritás mindemellett növekedést mutatott, ami az érrel fedett területek kiterjedésének csökkenését jelzi. A PACAP1-38 szemcsepp kezelésben részesült, mikrogyöngy injektált csoport (Gyöngy+P) esetében nem tapasztaltunk jelentős változást. Mérték: 500 μ m. Az adatok az átlag + SEM értéket ábrázolják ANOVA és Fisher-teszttel elemezve. * $p < 0,05$, Gyöngy+S vs. PBS+S; # $p < 0,05$, Gyöngy+S vs. Gyöngy+P; (Rövidítések: PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat; S: Systane; P: PACAP1-38).

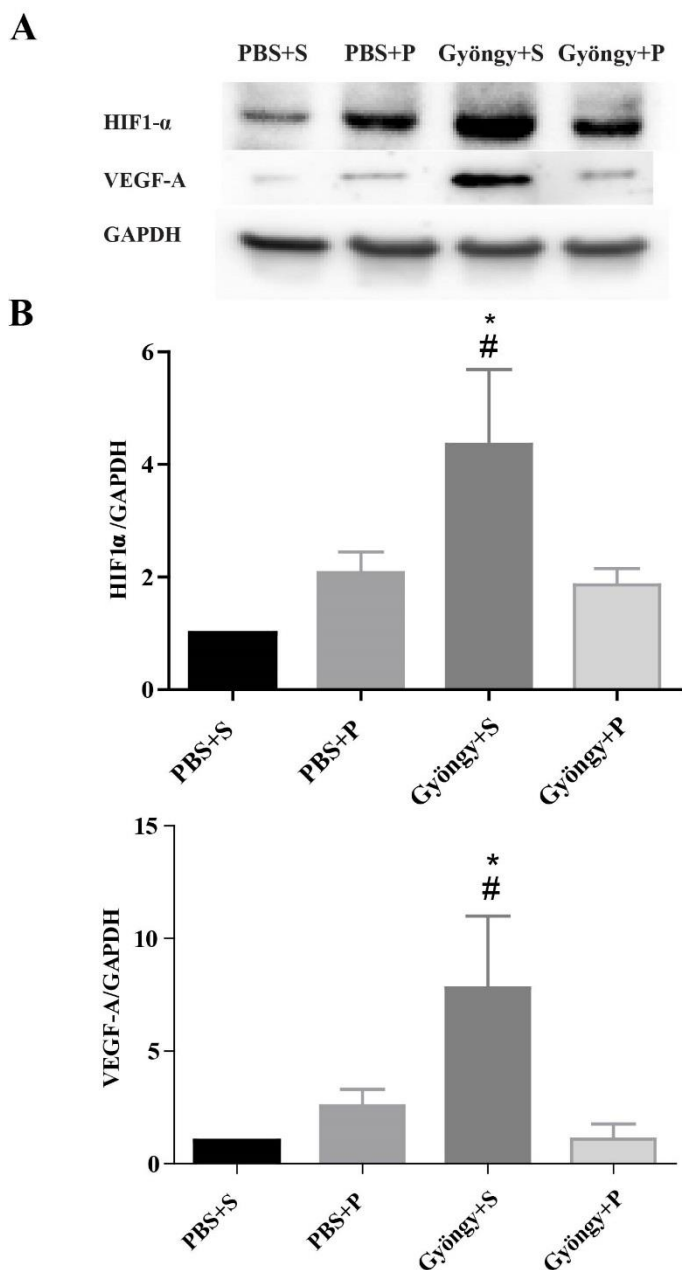
A kontrollcsoportok (PBS+S, PBS+P) mikrovascularis denzitása hasonló értékeket mutatott (29A, B ábra). A Gyöngy+S csoportban szignifikáns, közel 20% csökkenés jelentkezett az érhálózat sűrűségében (29A, B ábra). A Gyöngy+P csoportban a vascularis denzitás nem mutatott szignifikáns változást a kontroll csoportokhoz viszonyítva (29B ábra).



29. ábra: (A) A négy vizsgálati csoport érhalózatának reprezentatív ábrája. (B) Kontroll csoportokhoz képest szignifikáns csökkenés jelentkezett a Gyöngy+S csoport erezettségének denzitásában. A Gyöngy+P csoportban a vascularis denzitás a kontroll csoportokéhoz hasonló maradt (PBS+S; PBS+P). A négy kísérleti csoport elemszáma a következő: PBS+S: n=5; PBS+P: n=5; Gyöngy+S: n=7; Gyöngy+P: n=7 teljes retina preparátum. Mérték: 1000 μ m. Az adatok az átlag + SEM értéket ábrázolják ANOVA és Fisher-teszttel elemezve. * $p < 0,05$, Gyöngy+S vs. PBS+S; # $p < 0,05$, Gyöngy+S vs. Gyöngy+P; (Rövidítések: PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat; S: Systane; P: PACAP1-38).

5.2.5 Western blot eredményei

Immunhisztokémiai eredményeink megerősítéseként szeretnénk volna megvizsgálni western blot analízissel a HIF1- α és a VEGF-A fehérjék mennyiségét (30A, B ábra). A két kontroll csoportban (PBS+S; PBS+P) alacsony HIF1- α szintet mértünk. A Gyöngy+S csoport HIF1- α fehérjeszint szignifikánsan megemelkedett a kontroll és a Gyöngy+P csoporthoz képest. A PACAP kezelt glaukómás csoportban az immunfluoreszcencia eredményekhez hasonlóan alacsonyabb HIF1- α fehérjeexpressziót mutattunk ki. Jelentős emelkedést tapasztaltunk a Gyöngy+S csoport VEGF-A fehérjeszint mérésének eredményében is, míg a PACAP kezelés hatására a kontrollhoz hasonló eredményt kaptunk.



30. ábra: (A) Reprezentatív western blot panel felvételek a HIF1- α és a VEGF-A eredményeit mutatják.

Gyöngy+S csoportban, a kontrollhoz képest jelentős emelkedést tapasztaltunk a HIF1- α és VEGF-A fehérjeszintjében. (B) Négy vizsgálati csoportból származó HIF1- α és a VEGF-A relatív változását bemutató oszlopdiagram, belső kontrollra (GAPDH) normalizálva. A négy kísérleti csoport elemszáma a következő: PBS+S: n=2; PBS+P: n=2; Gyöngy+S: n=5; Gyöngy+P: n=5 teljes retina preparátum. A diagramok az átlag + SEM értéket ábrázolják ANOVA és Fisher-tesztel elemelve. * $p < 0,05$, Gyöngy+S vs. PBS+S; # $p < 0,05$, Gyöngy+S vs. Gyöngy+P; (Rövidítések: PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat; S: Systane; P: PACAP1-38, HIF1- α : hypoxia indukálható faktor 1 α , VEGF-A: vascularis endothelialis növekedési faktor-A).

5.3 Diszkusszió

A glaukóma patomechanizmusának hátterére többféle teória létezik, úgymint a mechanikai, biokémiai, genetikai vagy glimfatikus elmélet. Elsődleges nyitott zugú glaukóma kialakítására megbízhatóan reprodukálható módszer az elülső csarnokba injektált mikrogyöngyök használata (Sappington et al., 2010; Morgan and Tribble, 2015; Mukai et al., 2019). A mikrogyöngyök a csarnokvíz természetes keringésének elzárásával szemnyomásemelkedést okoznak. Korábbi kutatásunkban feltártuk a PACAP szemcseppkezelés neuroprotektív és szemnyomás csökkentő hatását (Szabo et al., 2021). Jelen tanulmányunkban igazoltuk a PACAP védőhatását vascularis és hypoxiás faktorok változásával szemben patkány glaukóma modellben.

Számos kutatás bemutatta már a PACAP és specifikus receptorának (PAC1-R) jelenlétét a szemben. A peptid expresszálódik a szem számos szövetében, úgy mint a cornea epithelium és endothelium rétegében, a sugártestben valamint a retina szinte minden sejtjében (Nakamachi et al., 2012; Shioda et al., 2016). Korábbi tanulmányunkban bemutattuk a PACAP és PAC1-R eloszlásának humán szemben (Patko et al., 2022). Eredményeink felvetik az eddigi állatkísérletekből származó adatok transzlációs lehetőségét. Immunpozitivitást találtunk a szaruhártya endothelium és epitheliumban, a tunica vasculosán belül a sugártestben, irisben és choroideaban, a retina minden rétegében, valamint a látóidegben is (Patko et al., 2022). Kutatócsoportunk továbbá azt is sikeresen bizonyította, hogy a PACAP szemcsepp formájában képes átjutni az okuláris barrieréken, elérve a retinát protektív hatást képes kiváltani (Werling et al., 2017). Továbbá szintén ismert, hogy szemcsepp formájában a peptid stabilitása nem változik (Kovacs et al., 2021), így esetleges non-invazív terápiás potenciállal rendelkezik.

A retina és a teljes szem fájdalommentes, *in vivo* vizsgálati lehetőségei fontos szerepet töltenek be a retinadegenerációs kórképek diagnózisában és nyomon követésében (Ruggeri et al., 2007; Kim et al., 2008; Guo et al., 2010). Glaukómás betegek OCT vizsgálata során az RNFL réteg változásának detektálása fontos a károsodás mértékének felmérésében. Humán és főemlős glaukóma esetén szövettani károsodást írtak le a fotoreceptorok rétegében is (Nork et al., 2000; Fan et al., 2011; Matsuura et al., 2018). Korábbi kutatásokban összefüggést találtak a retina pigment epithelium és a fotoreceptorok külső szegmens vastagságának változásában (Lakshmanan et al., 2020). Kísérletünkben a mikrogyöngy-indukálta hipertenzió a retina több rétegében (teljes retina rétegvastagság, RNFL, OPL, IS, OS) morfológiai változást indukált. Ezek a változások korábban már leközölt tanulmányokhoz hasonlónak bizonyultak egy SD patkány törzsben kialakított glaukóma modellben tapasztalathoz (Lakshmanan et al., 2020). A

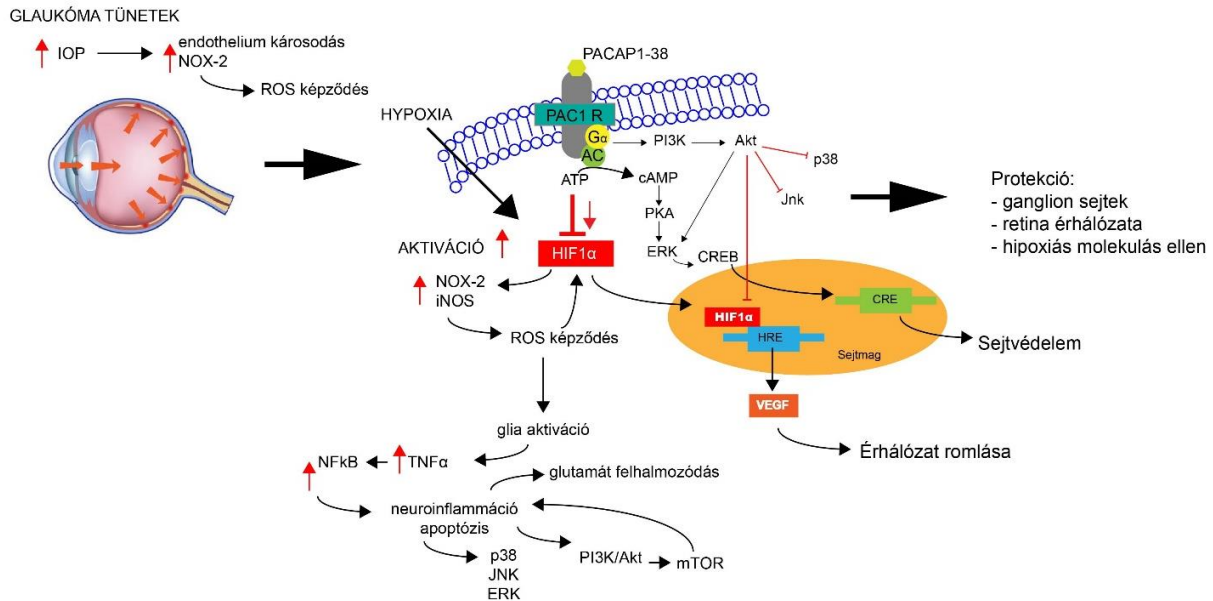
fotoreceptorok rétegének külső- és belső szegmenseinek rétegvastagság csökkenése összefüggésben áll a korábban általunk ERG vizsgálat alapján tapasztalt szignifikáns funkciócsökkenéssel (Szabo et al., 2021). Egy korábbi tanulmány glaukómában a retina fotoreceptor réteg külső és belső szegmensek érzékenységének változását, továbbá hasonlóan csökkent a- és b-hullám amplitúdót tapasztaltak ERG mérés során (Velten, 2001). Továbbá, más kutatócsoportokhoz (Velten, 2001) hasonlóan mi is szignifikáns RNFL rétegvastagság csökkenést tapasztaltunk. A retina teljes rétegvastagsága szignifikánsan csökkent előző kísérletünkben tapasztaltakhoz hasonlóan (Szabo et al., 2021). A Gyöngy+S csoportban az RNFL réteg közel 10%-os rétegvastagság csökkenést mutatott a kontroll csoportokhoz képest. Lakshmanan és munkatársai (2020) ebben a rétegben nagyjából 17%-os csökkenést figyeltek meg 8 héttel az episclerális véna elzárását követően (Lakshmanan et al., 2020). Az állatmodellből származó eredményeink továbbá hasonlóságot mutatnak a humán betegekben tapasztaltakkal, ahol korai stádiumban már változás lép fel a teljes retina rétegvastagságban (Asrani et al., 2003; Sathyan et al., 2014). A szemcseppeként alkalmazott PACAP protektív hatással rendelkezett a retina külső és belső rétegeiben.

A glaukóma kialakulásának „vascularis elmélete” azt feltételezi, hogy a retina és a látóideg károsodása összefüggésben áll az érrendszenek változásával. Mikrocirkulációs változásokat tapasztaltak glaukómás betegeknél, mely szerint a szem véráramlásának zavara feltételezhetően retinakárosodáshoz vezet (Flammer et al., 2002). A látóidegfő perfúziójának fenntartása három tényezőtől függ: a szisztémás vérnyomástól, a belső szemnyomástól és az autoregulációtól. A magas metabolikus igényvel rendelkező retina ganglionsejtjeit szintén ez a három faktor befolyásolja. A szemnyomás nagymértékű fluktuációja érrendszeri diszregulációt okozva károsabb hatással rendelkezik, mint a fenntartottan magas IOP. A vivőanyaggal kezelt glaukómás csoportban jelentős károsodást figyeltünk meg a retina érezettségében, azonban a PACAP kezelés képes volt megvédeni az erek állapotát. Mágneses mikrogyöngyökkel indukált patkány glaukóma modellben közel megegyező eredményeket tapasztaltak a retina érezettségében (Tribble et al., 2021). Glaukómás betegekben hasonló változást írtak le a véráramlás csökkenésében (Harris 2008). Jelen eredményeink megerősítik a glaukóma retinális érrendszerre gyakorolt hatását, mivel a PACAP szemcseppek kezelésben részesült mikrogyöngy injektált csoportban a vascularis hálózat több paramétere is a kontroll csoportokéhoz hasonló maradt.

A glaukómában fellépő véráramlás szabályozásának zavara és az azt követő hypoxia összefüggést mutat a retina ganglionsejtek számának csökkenésével (Harris, 2008). Post-

mortem humán glaukómás retina mintákban hypoxiás állapotra utaló megemelkedett HIF1- α szintet közöltek le immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével (Tezel, 2004). Az általunk vizsgált glaukómás csoportban hasonló mértékben megemelkedett HIF1- α immunpozitivitást találtunk, amelyet western blot analízissel is megerősítettünk. Zhou és munkatársai glaukóma modellben a szemnyomásemelkedés következtében szintén fokozott HIF1- α expressziót találtak (Ergorul et al., 2010; Zhou et al., 2021). A glaukóma számos rizikófaktora közül a megemelkedett szemnyomás a retina ischaemiás állapotát eredményezi (Mathew et al., 2019). A hypoxiás állapot endogén jelátviteli molekulája a HIF1- α , hozzájárul a szöveti homeosztázis fenntartásához (Liang et al., 2018).. A HIF1- α egy oxigén által szabályozott transzkripciós faktor, amely az oxigén homeosztázist szabályozza. Hypoxiás körülmények között a HIF1- α különböző gének aktiválódását indukálja, úgymint a glükóz transzporterek és a VEGF-A, amivel igyekszik kompenzálni a csökkent oxigénmennyiséget. A VEGF-A a szemben megtalálható a RPE rétegben, a ganglionsejtekben, a pericitákban, a Müller-sejtekben valamint az endothelium, és a simaizom sejtekben is (Saint-Geniez et al. 2008). A VEGF-A a kóros morfológiájú, kis erek képződésére hatva, eltömődést és folyadékshivárgást indukál, hypoxiás állapotot tovább erősítve, fokozva a VEGF-A termelődését (Aiello and Wong, 2000; Wang et al., 2010).

A glaukóma és VEGF-A közötti összefüggést csupán néhány kutatásban vizsgálták. Korábbi vizsgálatokban kimutatták a VEGF-A mennyiségének emelkedését glaukómás betegek vérplazmájában és csarnokvizében (Lip et al., 2002; Huang et al., 2016). Eddigi eredmények (Ergorul et al. 2008) mellett azonban a VEGF-A neovascularizációban betöltött szerepét glaukómában még nem vizsgálták. Kísérletünk során bemutattuk a VEGF-A retinán belüli lokalizációját, amely hasonlóságot mutatott korábbi tudományos közleményekben leírtakkal (Ozaki et al., 1999; Ergorul et al., 2008). Maugeri és munkatársai (2017) igazolták, hogy a PACAP képes csökkenteni és gátolni a HIF1- α és VEGF-A expresszióját diabeteses macula ödéma modellben (Maugeri et al., 2017). Jelen eredményeink megerősítették a glaukóma során fellépő hypoxiás állapotot, ezáltal a fokozott HIF1- α , valamint VEGF-A expressziót. Továbbá a hypoxia okozta érhalózat károsodás mértékét is csökkenteni tudta a PACAP szemcseppekezelés. A VEGF-A neovascularizációban betöltött szerepe már számos tanulmányban igazolt, azonban vizsgálataink során glaukóma esetében ezt nem tapasztaltuk. Jelenleg ez a paradox kérdés még megválaszolásra vár.



31. ábra: A glaukóma és PACAP szemcseppkezelés feltételezhető molekuláris összefüggése. A trabekuláris hálózat elzáródásának következményeként kialakult megemelkedő szemnyomás (IOP) endothel károsodáshoz és NOX-2 molekula indukálásán keresztül reaktív oxigénszarmazékok (ROS) képződéséhez vezet. Az erek károsodása és a ROS felszabadulás HIF1- α expresszióhoz vezetve hypoxiás állapotot okoz. A HIF1- α megemelkedett szintje NOX-2 és iNOS indukálásán keresztül további ROS felszabadulásához vezet. A HIF1- α mindemellett a sejtmagon belül transzkripciós faktorként VEGF-A expresszióon keresztül az érhálózat romlásához vezet. A folyamat eredményeként a retinában fokozott inflammáció és apoptózis indul meg, amely a glia sejtek aktiválódását okozza. Az aktivált glia sejtek TNF α molekulán keresztül NF κ B expresszióját fokozva, tovább erősítik a glia sejtek aktiválódását ezzel neuroinflammációhoz vezetve. Továbbá a p38/JNK/ERK tengelyen és mTOR-on keresztül további károsodás keletkezik. A PACAP specifikus receptora a PI3K-n keresztül Akt fokozásával feltételezhetően legátolja a p38, JNK és HIF1- α aktiválódását, mindemellett a cAMP/PKA/ERK tengelyen keresztül emelkedik a CREB szintje, amely a sejtvédelemben játszik szerepet.

<https://www.ranelle.com/adult-ophthalmology/glaucoma/>.

A zöldhályog pathomechanizmusát vizsgáló kutatások, kiemelt jelentőséget adnak a megnövekedett IOP okozta retinális érhálózat károsodásnak és a NOX-2 felülszabályozásából adódó reaktív oxigén származékok (ROS) képződésnek (Gericke et al., 2019; Wang et al., 2022). Krónikusan emelkedett IOP patkány glaukóma modellben a látóidegfő hypoperfúziójához, és fokozott ROS képződéséhez vezetett (Chidlow et al., 2017). Az érhálózat romlásából következő alacsony oxigén koncentráció hozzájárulhat a ROS-ok és a HIF1- α termeléséhez. Humán glaukóma betegek esetében hasonló expresszió emelkedést tapasztaltak HIF1- α , NOX-2 és iNOS molekulák esetében (Guillemin et al., 1997; Rupin et al., 2004; Mittal et al., 2007; Yokota et al., 2011). Mindemellett a ROS visszacsatolva HIF1- α

szintjét fokozva hozzájárul az inflammáció és apoptózis indukálásához. A glia sejtek TNF α felszabadulásán keresztül, gyulladásos folyamatokban kulcsszerepet játszó NF κ B transzkripciós faktor aktiválásához vezetnek (Tezel et al., 2000; Tezel et al., 2004). A folyamat inflammáció és apoptózis indukálásához, a sejthalál útvonalában fontos ASK-1/p38/JNK/ERK tengely fokozásához vezet (Di Marzo et al., 2018; Kitsati et al., 2016). A ROS-ok mindemellett a glutamát metabolizmus felborulását okozva az extracelluláris glutamát felhalmozódást, ezzel neurotoxicitást okoznak (Tezel et al., 2009; Martin et al., 2002). Maugeri és munkatársai (2018) kimutatták, hogy a PACAP a PI3K/Akt és MAPK/ERK útvonalon keresztül képes ellensúlyozni a HIF1- α expresszióját, mindemellett a peptid képes volt befolyásolni a VEGF-A és receptorának expressziós szintjét is (Maugeri et al., 2018). Feltételezhetően ezen útvonalak járulhatnak hozzá a PACAP érhálózatvédő, hypoxiás állapot javító hatásához (31. ábra).

Köztudott, hogy a PACAP anti-apoptotikus, gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatással rendelkezik, ami neuroprotektív hatás háttérében áll (Vaudry et al., 2009). Száraz szem szindróma tüneteinek kezelésére a PACAP szemcsepp igazoltan jótékony hatású. Képes fokozni a könnytermelődést a cAMP felszabadító és aquaporin expresszió indukáló hatásával (Nakamachi et al., 2016). A PACAP továbbá protektív hatással rendelkezik számos hipoxiás állatmodellben, úgy mint BCCAO-indukált retinopathiában, diabeteses macula ödémában és koraszülöttek retinopathiájában (Werling et al., 2017; Maugeri et al., 2017; Kvarik et al., 2021). A lista most már tovább bővíthet a glaukómával is. Összefoglalva, kutatásunk során kimutattuk a PACAP protektív hatását a retina szerkezetére és érhálózatára, illetve eredményeink szerint képes volt csökkenteni a hypoxiás markerek megjelenését glaukóma modellben. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a PACAP szemcsepp formájában alkalmazva esetleges potenciális jövőbeli terápiás lehetőség alapjait képezheti glaukóma kezelésében. Azonban további vizsgálatokra van szükség a védőhatás mögött meghúzódó pontos mechanizmus megértéséhez.

6 Konklúzió

A PACAP egy széles hatásspektrummal rendelkező neuropeptid, amely bizonyítottan fontos szerepet játszik a fejlődésben, az immunmodulációban és az idegrendszeri szabályozásban egyaránt. Számos kutatás bemutatta már különböző állatokban található PACAP és PAC1-R szemben előforduló jelenlétét. A peptid a látószerv több szövetében expresszálódik úgy, mint a cornea epithelium és endothelium rétegében, a sugártestben valamint a retina szinte minden sejtjében (Nakamachi et al., 2012; Shioda et al., 2016). Első kísérletsorozatunkban elsőként mutattuk be a PACAP és PAC1-R eloszlását humán szemben. Eredményeink felvetik az eddigi állatkísérletekből származó adatok esetleges translációs lehetőségét. Korábbi kísérletekben kutatócsoportunk azt is sikeresen bizonyította, hogy a PACAP szemcsepp formájában képes átjutni az okuláris barrieren, elérve a retinát protektív hatást képes kiváltani (Werling et al., 2017). Továbbá szintén ismert, hogy szemcsepp formájában a peptid stabilitása nem változik (Kovacs et al., 2021), így esetleges non-invazív terápiás potenciállal rendelkeznek. Korábbi kutatások igazolták a PACAP cAMP fokozó hatását, amely fontos kiválasztási és hormontermelési folyamatok szabályozásában vesz részt. A csarnokvíz termelés szabályozásában korábbi vizsgálatok igazolták a PACAP hatását. Emlősökben a cAMP-szint változás befolyásolja a sugártest epithelium sejtjeinek folyadéktranszportját, képes emelni a folyadék termelését, illetve fokozni a csarnokvíz elvezetésének hatékonyságát. Mindemellett, kutatások bizonyították a PACAP és receptorának klorid csatornákra gyakorolt hatását, amely a cAMP útvonaltól független módon tölt be szerepet a csarnokvíz termelésben. Első kísérletsorozatunkban bemutattuk a PACAP és receptorának expresszióját a ciliáris testben, az irisben és a corneában. Feltételezhetően a PACAP disztribúció részben magyarázatot adhat a korábbi kísérletünkben tapasztalt szemcseppkezelés szemnyomáscsökkentő hatására. A pontos hatásmechanizmust természetesen szükséges feltárni, jövőbeli terveink egyik fő célpontja. Mayer és munkatársai által (2006) leírt RhoA redukáló hatás is hozzájárulhat a PACAP IOP csökkentő hatásához (Mayer et al. 2006). Jelentős PACAP és PAC1-R jelenlétet figyeltünk meg továbbá a retina számos rétegében, többek között a ganglionsejt rétegben is. Az elsődleges nyitott zugú glaukóma során a megemelkedett IOP jelentősen károsító hatással rendelkezik a ganglionsejtekre. Mivel e sejtípus bizonyul a legérzékenyebbnek az IOP változásra és egyik legjelentősebb résztvevője a látás mechanizmusának, így fontosnak találtuk a PACAP és receptorának magasfokú expresszióját mind a ganglionsejt rétegben, mind az idegrostok rétegében. Korábbi patkány glaukóma modellből származó eredményeink igazolták a PACAP szemcseppkezelés ganglionsejt védő hatását. A pontos hatásmechanizmus feltárása még

terveink között szerepel, azonban azzal, hogy igazoltuk a PACAP jelenlétét e sejttípusban egy lépéssel közelebb kerültünk a folyamat megértéséhez. Kísérletsorozatunk második felében egy korábban alkalmazott patkány glaukóma modellben vizsgáltuk a PACAP szemcseppkezelés hatását további, a betegség háttérmechanizmusában álló tényezőkre. Kutatásunkban a „vascularis elmélet” mentén közelítettük meg a betegséget, amely feltételezi, hogy a retina érhálózatának fokozott romlása és a vele járó hypoxia fontos, a betegség kialakításában résztvevő fontos faktorok. Glaukómás állapotban az érhálózat jelentős hanyatlását és hypoxiás molekulák felhalmozódását tapasztaltuk, amely a PACAP kezelés hatására mérséklődött. Jövőbeli vizsgálatainkban szeretnénk pontosan feltárni, a PACAP hypoxia csökkentő és érvédő tulajdonságát. A megemelkedő IOP endothelium károsodást és NOX-2 molekula expressziót indukálva ROS képződéshez vezet, amely együttesen ischemiát majd hypoxiát okoz. Hypoxiás állapotban indukált sejtválasz jelentős VEGF-A expresszióhoz és így később az érhálózat romlásához, illetve további ROS képződésen keresztül glia aktivációhoz, neuroinflammációhoz és apoptózishoz vezet. A PACAP a PAC1-R-on keresztül képes fokozni a cAMP termelést, amely az ERK, CREB útvonalon át sejtvédelemhez, illetve PI3K, Akt útvonalon keresztül apoptotikus és inflammatórikus fehérjék gátlását indukálja. Maugeri és munkatársai (2017) macula ödéma modellben alkalmazott PACAP kezelés hatására csökkent HIF1- α és VEGF expressziót írtak le (Maugeri et al. 2017). Ezen eredmények összefüggnek az általunk glaukóma modellben tapasztaltakkal, feltételezhetően a neuropeptid hatása az Akt aktiváción keresztül érvényesül, azonban a pontos válasz érdekében további vizsgálatok szükségesek.

7 Új eredmények összefoglalása

I) A Ph.D. munkám első részében humán szemben vizsgáltuk a PACAP és specifikus receptorának (PAC1-R) eloszlását. Tanulmányunkban elsőként írtuk le a PACAP és specifikus receptorának előfordulását humán szemben. Immunhisztokémiai jelölést követő szemikvantitatív analízisből származó eredményeink arra engedtek következtetni, hogy humán szemben a korábban emlős modellekben leírtakhoz hasonló a PACAP és PAC1-R eloszlás található. Korábbi *in vitro* és *in vivo* kutatásokból származó állatkísérleti eredmények esetleges transzlációs értékkel rendelkeznek.

II) A Ph.D. munkám második felében a lokálisan, szemcseppként alkalmazott PACAP hypoxiában és a retina érhálózatának védelmében betöltött szerepét kívántuk vizsgálni mikrogyöngy-indukálta glaukóma modellben. Az OCT-, immunhisztokémiai-, érhálózat- valamint western blot analízisünk eredményei alátámasztották, hogy a PACAP szemcseppkezelés védő hatással rendelkezett az általunk alkalmazott állatmodellben. Eredményeink egy esetleges jövőbeli terápiás lehetőség alapjait képezhetik, amely egy szemcseppes terápia kidolgozásával könnyen alkalmazható, nem-invazív módon szerepelhetne a glaukóma kiegészítő kezelésében.

Összefoglalva, a korábbi *in vitro* és *in vivo* kísérletekből származó eredmények transzlációs értékét megerősítettük a PACAP és specifikus receptorának humán szemben való vizsgálatával. Mindemellett kutatócsoportunk korábbi és jelenlegi eredményeinek ismeretében a PACAP kutatásból származó eredmények esetleges transzlációs potenciállal bír és lehetséges terápiás lehetőségeket nyújthatnak akár glaukóma esetében is.

8 Irodalomjegyzék

- Aiello LP, Wong JS (2000) Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl* 58:113–119. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.07718.x.
- Al-Keilani MS, Almomani BA, Al-Sawalha NA, et al (2022) Significance of serum VIP and PACAP in multiple sclerosis: an exploratory case–control study. *Neurol Sci* 43:2621–2630. doi: 10.1007/s10072-021-05682-5.
- Alshafie W, Chappe FG, Li M, et al (2014) VIP regulates CFTR membrane expression and function in Calu-3 cells by increasing its interaction with NHERF1 and P-ERM in a VPAC1- and PKC ϵ -dependent manner. *Am J Physiol Physiol* 307:C107–C119. doi: 10.1152/ajpcell.00296.2013.
- Arimura A (1998) Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn. J. Physiol.* 48:301–331.
- Arimura A, Shioda S (1995) Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) and Its Receptors: Neuroendocrine and Endocrine Interaction. *Front Neuroendocrinol* 16:53–88. doi: 10.1006/frne.1995.1003.
- Asrani S, Challa P, Herndon L, et al (2003) Correlation among Retinal Thickness, Optic Disc, and Visual Field in Glaucoma Patients and Suspects: A Pilot Study. *J Glaucoma* 12:119–128. doi: 10.1097/00061198-200304000-00006.
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, et al (2010) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the retina: focus on the retinoprotective effects. *Ann N Y Acad Sci* 1200:128–139. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05512.x.
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, et al (2011) Effects of PACAP in UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats. *J Mol Neurosci* 43:51–57. doi: 10.1007/s12031-010-9392-3.
- Atlasz T, Szabadfi K, Reglodi D, et al (2009) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its fragments on retinal degeneration induced by neonatal monosodium glutamate treatment. *Ann N Y Acad Sci* 1163:348–352. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03650.x.
- Atlasz T, Vaczy A, Werling D, et al (2016a) Protective Effects of PACAP in the Retina. pp

501–527.

- Atlasz T, Vaczy A, Werling D, et al (2016b) Protective Effects of PACAP in the Retina. In: Reglodi D, Andrea Tamas (eds). pp 501–527.
- Balasoopoulou A, Kokkinos P, Pagoulatos D, et al (2017) Symposium Recent advances and challenges in the management of retinoblastoma Globe - saving Treatments. *BMC Ophthalmol* 17:1. doi: 10.4103/ijo.IJO.
- Barabas P, Augustine J, Fernández JA, et al (2020) Ion channels and myogenic activity in retinal arterioles. In: *Current Topics in Membranes*. pp 187–226.
- Bardosi S, Bardosi A, Nagy Z, Reglodi D (2016) Expression of PACAP and PAC1 Receptor in Normal Human Thyroid Gland and in Thyroid Papillary Carcinoma. *J Mol Neurosci* 60:171–178. doi: 10.1007/s12031-016-0823-7.
- Biswas S, Wan KH (2019) Review of rodent hypertensive glaucoma models. *Acta Ophthalmol* 97:e331–e340. doi: 10.1111/aos.13983.
- Bourgault S, Vaudry D, Botia B, et al (2008) Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 29:919–932. doi: 10.1016/j.peptides.2008.01.022.
- Brubel R, Reglodi D, Jambor E, et al (2011) Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 46:189–194. doi: 10.1002/jms.1884.
- Carrazzoni Borba J, Pereira Henze I, Souza Silveira M, et al (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) can act as determinant of the tyrosine hydroxylase phenotype of dopaminergic cells during retina development. *Dev Brain Res* 156:193–201. doi: 10.1016/j.devbrainres.2005.02.016.
- Carreon T, van der Merwe E, Fellman RL, et al (2017) Aqueous outflow - A continuum from trabecular meshwork to episcleral veins. *Prog Retin Eye Res* 57:108–133. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.12.004.
- Chan KKW, Tang F, Tham CCY, et al (2017) Retinal vasculature in glaucoma: a review. *BMJ Open Ophthalmol* 1:e000032. doi: 10.1136/bmjophth-2016-000032.
- Cheng AK-W, Civan MM, To C-H, Do C-W (2016) cAMP Stimulates Transepithelial Short-Circuit Current and Fluid Transport Across Porcine Ciliary Epithelium. *Investig*

- Ophthalmology Vis Sci 57:6784. doi: 10.1167/iovs.16-20127 Chidlow G, Wood JPM, Casson RJ (2017) Investigations into hypoxia and oxidative stress at the optic nerve head in a rat model of glaucoma. *Front Neurosci* 11, 478.
- Crawley L, Zamir SM, Cordeiro MF, Guo L (2012) Clinical Options for the Reduction of Elevated Intraocular Pressure. *Ophthalmol Eye Dis* 4:OED.S4909. doi: 10.4137/oed.s4909.
- D'Agata V, Cavallaro S (1998) Functional and molecular expression of PACAP/VIP receptors in the rat retina. *Mol Brain Res* 54:161–164. doi: 10.1016/S0169-328X(97)00335-5.
- D'Amico AG, Maugeri G, Magri B, et al (2023) PACAP-ADNP axis prevents outer retinal barrier breakdown and choroidal neovascularization by interfering with VEGF secreted from retinal pigmented epithelium cells. *Peptides* 168:171065. doi: 10.1016/j.peptides.2023.171065.
- Danyadi B, Szabadfi K, Reglodi D, et al (2014) PACAP Application Improves Functional Outcome of Chronic Retinal Ischemic Injury in Rats-Evidence From Electroretinographic Measurements. *J Mol Neurosci* 54:293–299. doi: 10.1007/s12031-014-0296-5.
- Das A, Byrd J (2014) Retinal Vasculature: Structure and Pathologies. In: *Pathobiology of Human Disease*. Elsevier, pp 2137–2161.
- Dejda A, Bourgault S, Doan ND, et al (2011) Identification by photoaffinity labeling of the extracellular N-terminal domain of PAC1 receptor as the major binding site for PACAP. *Biochimie* 93:669–677. doi: 10.1016/j.biochi.2010.12.010.
- Denes V, Lukats A, Szarka G, et al (2023) Long-term Effects of the pituitary-adenylate cyclase-activating Polypeptide (PACAP38) in the Adult Mouse Retina: Microglial Activation and Induction of Neural Proliferation. *Neurochem Res* 48(11):3430-3446. doi: 10.1007/s11064-023-03989-7.
- Denes V, Hideg O, Nyisztor Z, et al (2019) The neuroprotective peptide PACAP1-38 contributes to horizontal cell development in postnatal rat retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 60:770–778. doi: 10.1167/iovs.18-25719.
- Dérand R, Montoni A, Bulteau- Pignoux L, et al (2004) Activation of VPAC 1 receptors by VIP and PACAP- 27 in human bronchial epithelial cells induces CFTR- dependent chloride secretion. *Br J Pharmacol* 141:698–708. doi: 10.1038/sj.bjp.0705597.

- Di Marzo N, Chisci E, Giovannoni R (2018) The role of hydrogen peroxide in redox-dependent signaling: homeostatic and pathological responses in mammalian cells. *Cells* 7, 156.
- Eladawi N, Elmogy M, Ghazal M, et al (2020) Optical coherence tomography: A review. In: *Diabetes and Fundus OCT*. Elsevier, pp 191–221
- Elsås T, Uddman R, Sundler F (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-immunoreactive nerve fibers in the cat eye. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 234:573–580. doi: 10.1007/BF00448802.
- Endo K, Nakamachi T, Seki T, et al (2011) Neuroprotective Effect of PACAP Against NMDA-Induced Retinal Damage in the Mouse. *J Mol Neurosci* 43:22–29. doi: 10.1007/s12031-010-9434-x.
- Engelund A, Fahrenkrug J, Harrison A, et al (2012) Altered pupillary light reflex in PACAP receptor 1-deficient mice. *Brain Res* 1453:17–25. doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.005.
- Ergorul C, Ray A, Huang W, et al (2010) Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and some HIF-1 target genes are elevated in experimental glaucoma. *J Mol Neurosci* 42:183–191. doi: 10.1007/s12031-010-9343-z.
- Ergorul C, Ray A, Huang W, et al (2008) Levels of vascular endothelial growth factor-A165b (VEGF-A165b) are elevated in experimental glaucoma. *Mol Vis* 14:1517–1524.
- Fabian E, Reglodi D, Horvath G, et al (2019) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide acts against neovascularization in retinal pigment epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1455:160–172. doi: 10.1111/nyas.14189.
- Falluel-Morel A, Chafai A, Vaudry D, et al. (2007) The neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide exerts anti-apoptotic and differentiating effects during neurogenesis: focus on cerebellar granule neurones and embryonic stem cells. *J Neuroendocrinol* 19(5):321-7 doi: 10.1111/j.1365-2826.2007.01537.x.
- Fan N, Huang N, Lam DSC, Leung CK (2011) Measurement of Photoreceptor Layer in Glaucoma: A Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Study. *J Ophthalmol* 2011:1–5. doi: 10.1155/2011/264803.
- Ferencz S, Reglodi D, Kaszas B, et al (2019) PACAP and PAC1 receptor expression in pancreatic ductal carcinoma. *Oncol Lett*. doi: 10.3892/ol.2019.10971.

- Flammer J, Costa VP, Orzalesi N, et al (2002) The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 21:359–393
- Fu L, Shiu J, Lai M, et al (2018) Induction of significant intraocular pressure diurnal fluctuation in rats using a modified technique of microbead occlusion. *Int J Ophthalmol* 11:1351. doi: 10.18240/ijo.2018.07.07.
- Fu Z, Sun Y, Cakir B, et al (2020) Targeting Neurovascular Interaction in Retinal Disorders. *Int J Mol Sci* 21:1503. doi: 10.3390/ijms21041503.
- Fukiage C, Nakajima T, Takayama Y, et al (2007) PACAP Induces Neurite Outgrowth in Cultured Trigeminal Ganglion Cells and Recovery of Corneal Sensitivity After Flap Surgery in Rabbits. *Am J Ophthalmol* 143:255-262.e1. doi: 10.1016/j.ajo.2006.10.034.
- Gericke A, Mann C, Zadeh J.K, et al (2019) Elevated intraocular pressure causes abnormal reactivity of mouse retinal arterioles. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 9736047.
- Godlewski J, Łakomy IM (2010) Changes in vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and neuropeptide Y-ergic structures of the enteric nervous system in the carcinoma of the human large intestine. *Folia Histochem Cytobiol*. doi: 10.2478/v10042-010-0052-9.
- Goel M (2010) Aqueous Humor Dynamics: A Review. *Open Ophthalmol J* 4:52–59. doi: 10.2174/1874364101004010052.
- Graw J (2010) *Eye Development*. pp 343–386.
- Gregg RG, McCall MA, Massey SC (2013) Function and Anatomy of the Mammalian Retina. In: *Retina, Fifth Edit*. Elsevier, pp 360–400.
- Grone BP, Sheng Zhao, Chen C-C, Fernald RD (2007) Localization and Diurnal Expression of Melanopsin, Vertebrate Ancient Opsin, and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide mRNA in a Teleost Retina. *J Biol Rhythms* 22:558–561. doi: 10.1177/0748730407308285.
- Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, et al (2003) Laser-Induced Mouse Model of Chronic Ocular Hypertension. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 44:4337. doi: 10.1167/iops.03-0015.
- Guillemin K, Krasnow MA (1997) The hypoxic response: Huffing and HIFing. *Cell* 89, 9-12.
- Guo L, Normando EM, Nizari S, et al (2010) Tracking Longitudinal Retinal Changes in

- Experimental Ocular Hypertension Using the cSLO and Spectral Domain-OCT. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 51:6504. doi: 10.1167/iovs.10-5551.
- Hannibal J, Fahrenkrug J (2004) Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res* 316:99–113. doi: 10.1007/s00441-004-0858-x.
- Hannibal J, Hindersson P, Østergaard J, et al (2004) Melanopsin is expressed in PACAP-containing retinal ganglion cells of the human retinohypothalamic tract. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 45:4202–4209. doi: 10.1167/iovs.04-0313.
- Hannibal J, Kankipati L, Strang CE, et al (2014) Central projections of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the macaque monkey. *J Comp Neurol*. doi: 10.1002/cne.23588.
- Harris A (2008) Dysfunctional regulation of ocular blood flow: A risk factor for glaucoma? *Clin Ophthalmol* 2:849. doi: 10.2147/OPHTH.S2774.
- Hashimoto H, Nogi H, Mori K, et al (1996) Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase- activating polypeptide receptor in the rat brain: An in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 371:567–577. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960805)371:4<567::AID-CNE6>3.3.CO;2-M.
- Hirabayashi T, Shibato J, Kimura A, et al (2022) Potential Therapeutic Role of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide for Dry Eye Disease. *Int J Mol Sci* 23:664. doi: 10.3390/ijms23020664.
- Huang W, Gao X, Chen S, et al (2016) Vascular Endothelial Growth Factor is Increased in Aqueous Humor of Acute Primary Angle-Closure Eyes. *J Glaucoma* 25:e647–e651. doi: 10.1097/IJG.0000000000000242.
- Ichhpujani P, Kumar S (2019) What's New in Pathogenesis of Glaucoma. pp 1–6
- Jaworski DM, Proctor MD (2000) Developmental regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and PAC(1) receptor mRNA expression in the rat central nervous system *Brain Res Dev Brain Res* 15;120(1):27-39 doi: 10.1016/s0165-3806(99)00192-3.
- Joo KM, Chung YH, Kim MK, et al (2004) Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol* 476:388–413. doi: 10.1002/cne.20231.

- Józsa R, Somogyvári-Vigh A, Reglödi D, et al (2001) Distribution and daily variations of PACAP in the chicken brain. *Peptides* 22:1371–1377. doi: 10.1016/S0196-9781(01)00477-6.
- Jung S, Yi L, Jeong D, et al (2011) The role of ADCYAP1, adenylate cyclase activating polypeptide 1, as a methylation biomarker for the early detection of cervical cancer. *Oncol Rep* 25:245–52.
- Keenan WT, Rupp AC, Ross RA, et al (2016) A visual circuit uses complementary mechanisms to support transient and sustained pupil constriction. *Elife* 5:1–23. doi: 10.7554/eLife.15392.
- Kersey JP, Broadway DC (2006) Corticosteroid-induced glaucoma: a review of the literature. *Eye* 20:407–416. doi: 10.1038/sj.eye.6701895.
- Kim KH, Puoris'haag M, Maguluri GN, et al (2008) Monitoring mouse retinal degeneration with high-resolution spectral-domain optical coherence tomography. *J Vis* 8:17. doi: 10.1167/8.1.17.
- Kitsati N, Mantzaris MD, Galaris D (2016) Hydroxytyrosol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic signaling via labile iron chelation. *Redox Biol* 10, 233–242.
- Kong C-W, Li K-K, To C-H (2006) Chloride Secretion by Porcine Ciliary Epithelium: New Insight into Species Similarities and Differences in Aqueous Humor Formation. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 47:5428. doi: 10.1167/iovs.06-0180.
- Kovács-Valasek A, Szabadfi K, Dénes V, et al (2017) Accelerated retinal aging in PACAP knock-out mice. *Neuroscience* 348:1–10. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.02.003.
- Kovacs AK, Atlasz T, Werling D, et al (2021) Stability Test of PACAP in Eye Drops. *J Mol Neurosci* 71:1567–1574. doi: 10.1007/s12031-020-01532-9.
- Kuhrta H, Grygaa M, Wolburg H, et al (2012) Postnatal mammalian retinal development: Quantitative data and general rules. *Prog retin eye res* 31:605-621. <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.08.001>.
- Kvarik T, Mammel B, Reglodi D, et al (2016) PACAP Is Protective in a Rat Model of Retinopathy of Prematurity. *J Mol Neurosci* 60:179–85. doi: 10.1007/s12031-016-0797-5.

- Kvarik T, Reglodi D, Werling D, et al (2021) The Protective Effects of Endogenous PACAP in Oxygen-Induced Retinopathy. *J Mol Neurosci*. doi: 10.1007/s12031-021-01846-2.
- La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Hannibal J, et al (2011) Melanopsin-expressing retinal ganglion cells: implications for human diseases. *Vision Res* 51:296–302. doi: 10.1016/j.visres.2010.07.023.
- Lakshmanan Y, Wong FSY, Zuo B, et al (2020) Longitudinal outcomes of circumlimbal suture model-induced chronic ocular hypertension in Sprague-Dawley albino rats. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 258:2715–2728. doi: 10.1007/s00417-020-04820-7.
- Leung PS, So SC, Lam SY, et al (2001) Local regulation of anion secretion by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in human colonic T84 cells. *Cell Biol Int* 25:123–129. doi: 10.1006/cbir.2000.0584.
- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KRG, et al (2002) Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 43:402–410.
- Liang X, Liu X, Lu F, et al (2018) HIF1 α Signaling in the Endogenous Protective Responses after Neonatal Brain Hypoxia-Ischemia. *Dev Neurosci* 40:617–626. doi: 10.1159/000495879.
- Lindner S, Rudolf H, Palumbo G, et al (2021) Are heterobivalent GRPR- and VPAC1R-bispecific radiopeptides suitable for efficient in vivo tumor imaging of prostate carcinomas? *Bioorg Med Chem Lett* 48:128241. doi: 10.1016/j.bmcl.2021.128241.
- Lip PL, Felmeden DC, Blann AD, et al (2002) Plasma vascular endothelial growth factor, soluble VEGF receptor FLT-1, and von Willebrand factor in glaucoma. *Br J Ophthalmol* 86:1299–1302. doi: 10.1136/bjo.86.11.1299.
- Liu H, Ding C (2017) Establishment of an experimental glaucoma animal model: A comparison of microbead injection with or without hydroxypropyl methylcellulose. *Exp Ther Med* 14:1953–1960. doi: 10.3892/etm.2017.4728.
- Ma Y, Zhao S, Wang X, et al (2015) A New Recombinant PACAP-Derived Peptide Efficiently Promotes Corneal Wound Repairing and Lacrimal Secretion. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 56:4336. doi: 10.1167/iovs.15-17088.
- Martin KR, Levkovitch-Verbin H, Valenta D, et al (2002) Retinal glutamate transporter

- changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in the rat. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 43, 2236–2243. 104.
- Martínez-Rojas VA, Jiménez-Garduño AM, Michelatti D, et al (2021) CIC-2-like Chloride Current Alterations in a Cell Model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy, a Polyglutamine Disease. *J Mol Neurosci* 71:662–674. doi: 10.1007/s12031-020-01687-5.
- Mathew B, Ravindran S, Liu X, et al (2019) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles and retinal ischemia-reperfusion. *Biomaterials* 197:146–160. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.01.016.
- Matsumoto M, Nakamachi T, Watanabe J, et al (2016) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Is Involved in Adult Mouse Hippocampal Neurogenesis After Stroke. *J Mol Neurosci* 59:270–279. doi: 10.1007/s12031-016-0731-x.
- Matsumoto Y, Kanamori A, Nakamura M, Negi A (2014) Rat chronic glaucoma model induced by intracameral injection of microbeads suspended in sodium sulfate-sodium hyaluronate. *Jpn J Ophthalmol* 58:290–7. doi: 10.1007/s10384-014-0311-y.
- Matsuura M, Fujino Y, Kanamoto T, et al (2018) Improving the structure-function relationship in glaucomatous and normative eyes by incorporating photoreceptor layer thickness. *Sci Rep* 8:10450. doi: 10.1038/s41598-018-28821-z.
- Maugeri G, D'Amico AG, Amenta A, et al (2022) Protective effect of PACAP against ultraviolet B radiation-induced human corneal endothelial cell injury. *Neuropeptides* Feb;79:101978 doi: 10.1016/j.npep.2019.101978.
- Maugeri G, D'Amico AG, Bucolo C, D'Agata V (2019) Protective effect of PACAP-38 on retinal pigmented epithelium in an in vitro and in vivo model of diabetic retinopathy through EGFR-dependent mechanism. *Peptides* 119:170108. doi: 10.1016/j.peptides.2019.170108.
- Maugeri G, D'Amico AG, Magri B, et al (2023) Protective effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in diabetic keratopathy. *Peptides*. 170:171107. doi: 10.1016/j.peptides.2023.171107.
- Maugeri G, D'Amico AG, Saccone S, et al (2017) PACAP and VIP Inhibit HIF-1 α -Mediated VEGF Expression in a Model of Diabetic Macular Edema. *J Cell Physiol* 232:1209–1215. doi: 10.1002/jcp.25616.

- Maugeri G, Longo A, D'Amico AG, et al (2018) Trophic effect of PACAP on human corneal endothelium. *Peptides* 99:20–26. doi: 10.1016/j.peptides.2017.11.003.
- McMonnies CW (2017) Glaucoma history and risk factors. *J Optom* 10:71–78. doi: 10.1016/j.optom.2016.02.003.
- Meister M (2009) Eye, Retina, and Visual System of the Mouse. *Q Rev Biol* 84:302–302. doi: 10.1086/644693.
- Mester L, Kovacs K, Racz B, et al (2011) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is protective against oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells. *J Mol Neurosci* 43(1):35-43. doi: 10.1007/s12031-010-9427-9.
- Meyer DK (2006) The effects of PACAP on neural cell proliferation. *Regul Pept* 137, 50–57.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, et al (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567–574. doi: 10.1016/0006-291X(89)91757-9.
- Miyata A, Jiang L, Dahl RD, et al (1990) Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 170:643–648. doi: 10.1016/0006-291X(90)92140-U.
- Mittal M, Roth M, König P, et al (2007) Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circ Res* 101, 258–267.
- Morgan JE, Tribble JR (2015) Microbead models in glaucoma. *Exp Eye Res* 141:9–14. doi: 10.1016/j.exer.2015.06.020.
- Morgan WH, Yu D-Y (2019) Mechanism Theories of Glaucoma. In: Sun X, Dai Y (eds) *Medical Treatment of Glaucoma*. Springer Singapore, Singapore, pp 33–66.
- Mukai R, Park DH, Okunuki Y, et al (2019) Mouse model of ocular hypertension with retinal ganglion cell degeneration. *PLoS One* 14:1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0208713.
- Murthy KS, Jin JG, Grider JR, Makhlof GM (1997) Characterization of PACAP receptors and signaling pathways in rabbit gastric muscle cells. *Am J Physiol* 272:G1391-9. doi: 10.1152/ajpgi.1997.272.6.G1391.
- Nakamachi T, Matkovits A, Seki T, Shioda S (2012) Distribution and protective function of

- pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the retina. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:1–10. doi: 10.3389/fendo.2012.00145.
- Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, et al (2016) PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat Commun* 7:12034. doi: 10.1038/ncomms12034.
- Nakamura K, Nakamachi T, Endo K, et al (2014) Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the human testis and in testicular germ cell tumors. *Andrologia* 46:465–471. doi: 10.1111/and.12102.
- Nilsson SFE, De Neef P, Robberecht P, Christophe J (1994) Characterization of Ocular Receptors for Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) and their Coupling to Adenylate Cyclase. *Exp Eye Res* 58:459–467. doi: 10.1006/exer.1994.1039.
- Nongpiur ME, Ku JYF, Aung T (2011) Angle closure glaucoma: a mechanistic review. *Curr Opin Ophthalmol* 22:96–101. doi: 10.1097/ICU.0b013e32834372b9.
- Nork TM, Ver Hoeve JN, Poulsen GL, et al (2000) Swelling and loss of photoreceptors in chronic human and experimental glaucomas. *Arch Ophthalmol* 118:235–245. doi: 10.1001/archophth.118.2.235.
- Olianas MC, Ennas MG, Lampis G, Onali P (1996) Presence of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptors in Y-79 Human Retinoblastoma Cells. *J Neurochem* 67:1293–1300. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67031293.x.
- Overby DR, Clark AF, Texas UN, Science H (2016) Animal Models of Glucocorticoid-Induced Glaucoma. 15–22. doi: 10.1016/j.exer.2015.06.002.
- Ozaki H, Yu AY, Della N, et al (1999) Hypoxia inducible factor-1 α is increased in ischemic retina: Temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 40:182–189.
- Pang IH, Millar JC, Clark AF (2015) Elevation of intraocular pressure in rodents using viral vectors targeting the trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 141:33–41. doi: 10.1016/j.exer.2015.04.003.
- Patko E, Szabo E, Toth D, et al (2022) Distribution of PACAP and PAC1 Receptor in the Human Eye. *J Mol Neurosci* 72:2176–2187. doi: 10.1007/s12031-022-01985-0.
- Pease ME, Cone FE, Gelman S, et al (2011) Calibration of the TonoLab tonometer in mice with

- spontaneous or experimental glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 52:858–864. doi: 10.1167/iovs.10-5556.
- Pham D, Polgar B, Toth T, et al (2022) Examination of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in Parkinson's disease focusing on correlations with motor symptoms. *Geroscience* 44(2):785-803 doi: 10.1007/s11357-022-00530-6.
- Perlman I (1995) *The Electroretinogram: ERG*.
- Point E (2019) Open-angle glaucoma. 1–27.
- Racz B, Gallyas F, Kiss P, et al (2006) The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involve inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul Pept* 137:20–26. doi: 10.1016/j.regpep.2006.02.009.
- Reglodi D, Somogyvari-Vigh A, Vigh S, et al (2000) Neuroprotective Effects of PACAP38 in a Rat Model of Transient Focal Ischemia under Various Experimental Conditions. *Ann N Y Acad Sci* 921:119–128. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06958.x.
- Reglodi D, Somogyvari-Vigh A, Vigh J, et al (2001) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is highly abundant in the nervous system of anoxia-tolerant turtle, *Pseudemys scripta elegans*. *Peptides* 22:873–878. doi: 10.1016/S0196-9781(01)00412-0.
- Ross RA, Hoepfner SS, Hellberg SN, et al (2020) Circulating PACAP peptide and PAC1R genotype as possible transdiagnostic biomarkers for anxiety disorders in women: a preliminary study. *Neuropsychopharmacology* 45:1125–1133. doi: 10.1038/s41386-020-0604-4.
- Ruggeri M, Wehbe H, Jiao S, et al (2007) In vivo three-dimensional high-resolution imaging of rodent retina with spectral-domain optical coherence tomography. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 48:1808–1814. doi: 10.1167/iovs.06-0815.
- Rupin A, Paysant J, Sansilvestri-Morel P, et al (2004) Role of NADPH oxidase-mediated superoxide production in the regulation of E-selectin expression by endothelial cells subjected to anoxia/reoxygenation. *Cardiovasc Res* 63, 323–330.
- Sadler TW (2000) *Langman's Medical Embryology*. *Eur Radiol*. doi: 10.1007/s003300050004.
- Saint-Geniez M, Maharaj ASR, Walshe TE, et al (2008) Endogenous VEGF Is Required for Visual Function: Evidence for a Survival Role on Müller Cells and Photoreceptors. *PLoS*

- One 3:e3554. doi: 10.1371/journal.pone.0003554.
- Samsel PA, Kisiswa L, Erichsen JT, et al (2011) A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 52:1671–1675. doi: 10.1167/iovs.09-3921.
- Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ (2010) The microbead occlusion model: A paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 51:207–216. doi: 10.1167/iovs.09-3947.
- Sathyan P, Agarwal P, Sharma A, Saini V (2014) Macular Thickness Variability in Primary Open Angle Glaucoma Patients using Optical Coherence Tomography. *J Curr Glaucoma Pract* 8:10–14. doi: 10.5005/jp-journals-10008-1154.
- Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Shioda S (2008) Suppression of Ganglion Cell Death by PACAP Following Optic Nerve Transection in the Rat. *J Mol Neurosci* 36:57–60. doi: 10.1007/s12031-008-9091-5.
- Seki T, Nakatani M, Taki C, et al (2006) Neuroprotective Effect of PACAP against Kainic Acid-Induced Neurotoxicity in Rat Retina. *Ann N Y Acad Sci* 1070:531–534. doi: 10.1196/annals.1317.074.
- Seki T, Shioda S, Izumi S, et al (2000) Electron microscopic observation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-containing neurons in the rat retina☆. *Peptides* 21:109–113. doi: 10.1016/S0196-9781(99)00180-1.
- Seki T, Shioda S, Ogino D, et al (1997) Distribution and ultrastructural localization of a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett* 238:127–130. doi: 10.1016/S0304-3940(97)00869-0.
- Shajari M, Herrmann K, Bühren J, et al (2019) Anterior segment optical coherence tomography. *Clin Exp Optom* 15:132–156. doi: 10.1002/cne.
- Shen S, Gehlert DR, Collier DA (2013) PACAP and PAC1 receptor in brain development and behavior. *Neuropeptides* 47(6):421-30 doi: 10.1016/j.npep.2013.10.005.
- Shim MS, Kim K-Y, Ju W-K (2017) Role of cyclic AMP in the eye with glaucoma. *BMB Rep* 50:60–70. doi: 10.5483/BMBRep.2017.50.2.200.
- Shioda S, Takenoya F, Wada N, et al (2016) Pleiotropic and retinoprotective functions of

- PACAP. *Anat Sci Int* 91:313–324. doi: 10.1007/s12565-016-0351-0.
- Süveges I (2010) *Szemészet*, 1st editio.
- Skoglösa Y, Takei N, Lindholm D (1999) Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain *Brain Res Mol Brain Res* 19;65(1):1-13 doi: 10.1016/s0169-328x(98)00294-0.
- Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, et al (2012) Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell Tissue Res* 348:37–46. doi: 10.1007/s00441-012-1349-0.
- Szabadfi K, Szabo A, Kiss P, et al (2014) PACAP promotes neuron survival in early experimental diabetic retinopathy. *Neurochem Int* 64:84-91 doi: 10.1016/j.neuint.2013.11.005.
- Szabo D, Sarszegi Z, Polgar B, et al (2022) PACAP-38 and PAC1 Receptor Alterations in Plasma and Cardiac Tissue Samples of Heart Failure Patients *Int J Mol Sci* 28;23(7):3715 doi: 10.3390/ijms23073715.
- Szabo E, Patko E, Vaczy A, et al (2021) Retinoprotective Effects of PACAP Eye Drops in Microbead-Induced Glaucoma Model in Rats. *Int J Mol Sci* 22:8825. doi: 10.3390/ijms22168825.
- Szanto Z, Sarszegi Z, Reglodi D, et al (2012) PACAP Immunoreactivity in Human Malignant Tumor Samples and Cardiac Diseases. *J Mol Neurosci* 48:667–673. doi: 10.1007/s12031-012-9815-4.
- Szél Á (2006) *Látószerv*. In: *Szövettan*. pp 465–488.
- T Seki, S Shioda, Y Nakai, A Arimura RK (1998) Distribution and Ultrastructural Localization of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) and Its Receptor in the Rat Retina. *Ann N Y Acad Sci* 865:408–411. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb11205.x.
- Tamas A, Javorhazy A, Reglodi D, et al (2016) Examination of PACAP-Like Immunoreactivity in Urogenital Tumor Samples. *J Mol Neurosci* 59:177–183. doi: 10.1007/s12031-015-0652-0.
- Tamm ER (2002) Myocilin and glaucoma: Facts and ideas. *Prog Retin Eye Res* 21:395–428. doi: 10.1016/S1350-9462(02)00010-1.
- Tezel G, Wax MB (2000) Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells

- exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci* 20, 8693–8700.
- Tezel G, Yang X (2004) Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 45, 4049–4059.
- Tezel G (2004) Hypoxia-Inducible Factor 1 α in the Glaucomatous Retina and Optic Nerve Head. *Arch Ophthalmol* 122:1348. doi: 10.1001/archophth.122.9.1348.
- Tezel G, Fourth AP (2009) The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis Sci* 50, 1001–1012.
- Toris CB (2010) Pharmacology of Aqueous Humor Formation. In: *Encyclopedia of the Eye*. Elsevier, pp 312–315.
- Toth T, Alizadeh H, Polgar B, et al (2023) Diagnostic and Prognostic Value of PACAP in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci* 28;24(13):10801 doi: 10.3390/ijms241310801.
- Tribble JR, Otmani A, Kokkali E, et al (2021) Retinal Ganglion Cell Degeneration in a Rat Magnetic Bead Model of Ocular Hypertensive Glaucoma. *Transl Vis Sci Technol* 10:21. doi: 10.1167/tvst.10.1.21.
- Tripathi RC, Parapuram SK, Tripathi BJ, et al (1999) Corticosteroids and glaucoma risk. *Drugs and Aging* 15:439–450. doi: 10.2165/00002512-199915060-00004.
- Trivli A, Koliarakis I, Terzidou C, et al (2018) Normal-tension glaucoma: Pathogenesis and genetics (Review). *Exp Ther Med* 563–574. doi: 10.3892/etm.2018.7011.
- Urcola JH, Hernández M, Vecino E (2006) Three experimental glaucoma models in rats: Comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res* 83:429–437. doi: 10.1016/j.exer.2006.01.025.
- Vaczy A, Kovari P, Kovacs K, et al (2018) Protective Role of Endogenous PACAP in Inflammation-induced Retinal Degeneration. *Curr Pharm Des* 24:3534–3542. doi: 10.2174/1381612824666180924141407.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, et al (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 Years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61:283–357. doi: 10.1124/pr.109.001370.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, et al (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating

- polypeptide and its receptors: From structure to functions. *Pharmacol Rev* 52:269–324.
- Vecino E, C. S (2011) Glaucoma Animal Models. *Glaucoma - Basic Clin Concepts*. doi: 10.5772/18498.
- Velten IM (2001) The a-wave of the dark adapted electroretinogram in glaucomas: are photoreceptors affected? *Br J Ophthalmol* 85:397–402. doi: 10.1136/bjo.85.4.397.
- Wang G, Pan J, Tan YY, et al (2008) Neuroprotective effects of PACAP27 in mice model of Parkinson's disease involved in the modulation of KATP subunits and D2 receptors in the striatum. *Neuropeptides* 42:267–276. doi: 10.1016/j.npep.2008.03.002.
- Wang L, Zhang J, Li G, et al (2021) The ADCYAP1R1 Gene Is Correlated With Posttraumatic Stress Disorder Symptoms Through Diverse Epistases in a Traumatized Chinese Population. *Front Psychiatry*. doi: 10.3389/fpsy.2021.665599.
- Wang M, Liu H, Xia N, Li H, et al (2022) Intraocular pressure-induced endothelial dysfunction of retinal blood vessels is persistent, but does not trigger retinal ganglion cell loss. *Antioxidants* 11, 1864.
- Wang R, Seifert P, Jakobs TC (2017) Astrocytes in the optic nerve head of glaucomatous mice display a characteristic reactive phenotype. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 58:924–932. doi: 10.1167/iovs.16-20571.
- Wang T, Li Y, Guo M, et al (2021) Exosome-Mediated Delivery of the Neuroprotective Peptide PACAP38 Promotes Retinal Ganglion Cell Survival and Axon Regeneration in Rats With Traumatic Optic Neuropathy. *Front Cell Dev Biol* 6:9:659783. doi: 10.3389/fcell.2021.659783.
- Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, et al (2010) Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 465:483–486. doi: 10.1038/nature09002.
- Wang Z-Y, Alm P, Håkanson R (1995) Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rabbit eye. *Neuroscience* 69:297–308. doi: 10.1016/0306-4522(95)00258-K.
- Wang Z, Shan W, Li H, et al (2019) The PACAP-derived peptide MPAP0 facilitates corneal wound healing by promoting corneal epithelial cell proliferation and trigeminal ganglion cell axon regeneration. *Int J Biol Sci* 15:2676–2691. doi: 10.7150/ijbs.35630.

- Wang Z, Waldeck K, Grundemar L, Håkanson R (1997) Ocular inflammation induced by electroconvulsive treatment: contribution of nitric oxide and neuropeptides mobilized from C-fibres. *Br J Pharmacol* 120:1491–1496. doi: 10.1038/sj.bjp.0701083.
- Werling D, Banks W, Salameh T, et al (2017) Passage through the Ocular Barriers and Beneficial Effects in Retinal Ischemia of Topical Application of PACAP1-38 in Rodents. *Int J Mol Sci* 18:675. doi: 10.3390/ijms18030675.
- Werling D, Reglodi D, Banks WA, et al (2016) Ocular Delivery of PACAP1-27 Protects the Retina From Ischemic Damage in Rodents. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 57:6683. doi: 10.1167/iovs.16-20630.
- Werling D, Reglodi D, Kiss P, et al (2014) Investigation of PACAP Fragments and Related Peptides in Chronic Retinal Hypoperfusion. *J Ophthalmol* 2014:1–7. doi: 10.1155/2014/563812.
- Yamaji K, Yoshitomi T, Usui S (2005) Action of biologically active peptides on monkey iris sphincter and dilator muscles. *Exp Eye Res* 80:815–820. doi: 10.1016/j.exer.2004.12.020.
- Yan B, Depoy EG, Ahmad A, Nahas S (2021) Biomarkers in Migraine. *Neurol India* 69:17. doi: 10.4103/0028-3886.315988.
- Yokota H, Narayanan SP, Zhang W, et al (2011) Neuroprotection from retinal ischemia/reperfusion injury by NOX2 NADPH oxidase deletion. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 52, 8123–8131.
- Yucel Y, Gupta N (2015) Lymphatic drainage from the eye. In: *Progress in Brain Research*, 1st edn. Elsevier B.V., pp 185–198.
- Yukita M, Machida S, Nishiguchi KM, et al (2015) Molecular, anatomical and functional changes in the retinal ganglion cells after optic nerve crush in mice. *Doc Ophthalmol* 130:149–156. doi: 10.1007/s10633-014-9478-2.
- Zhou J, Chen F, Yan A, Xia X (2021) Role of mammalian target of rapamycin in regulating HIF-1 α and vascular endothelial growth factor signals in glaucoma. *Arch Physiol Biochem* 127:44–50. doi: 10.1080/13813455.2019.1609996.
- Zhou Y, Grinchuk O, Tomarev SI (2008) Transgenic Mice Expressing the Tyr437His Mutant of Human Myocilin Protein Develop Glaucoma. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 49:1932. doi: 10.1167/iovs.07-1339.

Zhu H-X, Jin Y, Wei B-F (2021) Decreased Serum Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Levels May Reflect Disease Severity in Patients with Non-traumatic Osteonecrosis of Femoral Head. *Int J Pept Res Ther* 27:397–404. doi: 10.1007/s10989-020-10098-4.

Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, et al (2003) The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: In vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-(1-38). *J Biol Chem* 278:22418–22423. doi: 10.1074/jbc.M212355200.

Felhasznált ábrák internetes forrása

2. ábra: <https://i.pinimg.com/originals/13/e9/1d/13e91d468279ac109e4e68b70c2a2e53.jpg>
letöltés dátuma: 2023.03.24.

5. ábra: <https://veniceretina.net/conditions/retinal-vein-occlusion/>. letöltés dátuma: 2023.10.20.

10. ábra: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMcibr2307733> letöltés dátuma: 2024.02.10.

11. ábra: <https://www.forneyeyeassociates.com/eye-disease-management/co-management-glaucoma/glaucoma-causes-and-risk-factors/> letöltés dátuma: 2023.09.15.

31. ábra: <https://www.ranelle.com/adult-ophthalmology/glaucoma/> letöltés dátuma: 2022.10.21.

9 Publikációs lista

9.1 Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

Patko E, Szabo E, Toth D, Tornoczki T, Bosnyak I, Vaczy A, Atlasz T, Reglodi D (2022) Distribution of PACAP and PAC1 receptor in the human eye. *J Mol Neurosci* 72(11):2176-2187, <https://doi.org/10.1007/s12031-022-01985-0>

(IF=3,444; Q2 Medicine)

Patko E, Szabo E, Vaczy A, Molitor D, Tari E, Li L, Csutak A, Toth G, Reglodi D, Atlasz T (2023) Protective effects of pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide on retinal vasculature and molecular responses in a rat model of moderate glaucoma. *Int J Mol Sci* 24(17):13256, <https://doi.org/10.3390/ijms241713256>

(IF= 6,208; Q1 Medicine)

Témához kapcsolódó eredeti publikációk összesített impakt faktora: **9,652**

9.2 Egyéb tudományos közlemények

Szabo E, **Patko E**, Vaczy A, Molitor D, Csutak A, Toth G, Reglodi D, Atlasz T (2021) Retinoprotective effects of PACAP eye drops in microbead-induced glaucoma model in rats. *Int J Mol Sci* 22, 8825. <http://doi.org/10.3390/ijms22168825>

(IF=5,923; Q1 Medicine)

Tóth D, Fabian E, Szabo E, **Patko E**, Vicena V, Vaczy V, Atlasz T, Tornoczky T, Reglodi D (2024) Investigation of PACAP38 and PAC1 receptor expression in human retinoblastoma and the effect of PACAP38 administration on human Y-79 retinoblastoma cells. *Life* 14(2), 185; <https://doi.org/10.3390/life14020185>

(IF=3,2; Q2 Biochemistry, Genetics and Molecular Biology)

Az eddig megjelent tudományos publikációk **összesített impakt** faktora: **18,775**.

10 Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Atlasz Tamás** egyetemi docensnek, aki lehetővé tette, hogy a Retina Kutatócsoport tagjává váljak és kezdetektől fogva támogatta és irányította munkámat. Hálával tartozom neki, értékes szakmai tanácsaikért, figyelmes és az önzetlen segítségért. Köszönöm, hogy megismertette velem a kutatói pálya szépségeit és lehetőségeit.

Őszinte hálával tartozom **Dr. Reglődi Dóra** egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette számomra, hogy az Anatómiai Intézet szerves részévé válhassak. Hálával tartozom neki, értékes szakmai tanácsaikért, figyelmes és az önzetlen segítségért. Az itt eltöltött évek során olyan értékes szakmai tapasztalatra tettem szert, amit soha nem fogok elfelejteni.

Köszönetet szeretnék mondani barátomnak, **Dr. Szabó Edina** adjunktusnak, aki az első naptól kezdve teljes odaadással segítette és felügyelte tudományos munkám előrehaladását. Nélküle nem jutottam volna el idáig. A mi összetartó csapatunk volt a motiváló erőm az úton.

Köszönettel tartozom **Dr. Váczy Alexandra** adjunktus számára, a sok jótanácsért, segítségért és hogy mindig józan iránymutatást adott.

Hálásan köszönöm a rengeteg segítséget **Molitor Dorottya** Ph.D. hallgató- és kutatótársamnak. Köszönöm az évek során együtt elvégzett kísérleteket, melyek segítettek szakmai fejlődésemet, valamint hálás vagyok, hogy baráti szeretettel biztattott munkásságom során.

Szeretném megköszönni **Dr. Tóth Dénes** egyetemi tanársegédnek és **Bosnyák Inez** Ph.D. hallgatónak a kísérletekben nyújtott segítségükért.

Továbbá köszönöm **Dr. Csutak Adrienne** egyetemi tanárnak, aki klinikai meglátásaival és tapasztalataival segítette kísérleteinket.

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

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

A disszertáció megvalósításához a következő támogatók járultak hozzá: NKFIH FK129190, K135457, ÚNKP-21-3-I-PTE-1299, ÚNKP-22-3-II-PTE-1402, ÚNKP-23-3-II-PTE-2034.



Distribution of PACAP and PAC1 Receptor in the Human Eye

Evelin Patko¹ · Edina Szabo¹ · Denes Toth² · Tamas Tornoczky³ · Inez Bosnyak¹ · Alexandra Vaczy¹ · Tamas Atlasz^{1,4,5}  · Dora Reglodi^{1,4}

Received: 15 January 2022 / Accepted: 8 February 2022 / Published online: 7 March 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Pituitary adenylate cyclase–activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide with widespread distribution and diverse biological functions. Several studies show that PACAP has strong cytoprotective effects mediated mostly through its specific PAC1 receptor (PAC1-R) and it plays important roles in several pathological conditions. Its distribution and altered expression are known in various human tissues, but there is no descriptive data about PACAP and its receptors in the human eyeball. Since PACAP38 is the dominant form of the naturally occurring PACAP, our aim was to investigate the distribution of PACAP38-like immunoreactivity in the human eye and to describe the presence of PAC1-R. Semiquantitative evaluation was performed after routine histology and immunohistochemical labeling on human eye sections. Our results showed high level of immunopositivity in the corneal epithelium and endothelium. Within the vascular layer, the iris and the ciliary body had strong immunopositivity for both PACAP and PAC1-R. Several layers of the retina showed immunoreactivity for PACAP and PAC1-R, but the ganglion cell layer had a special pattern in the immunolabeling. Labeling was observed in the neuropil within the optic nerve in both cases and glial cells displayed immunoreactivity for PAC1-R. In summary, our study indicates the widespread occurrence of PACAP and its specific receptor in the human eye, implying that the results from in vitro and animal studies have translational value and most probably are also present in the human eye.

Keywords Human eye · PACAP · PAC1 receptor · Immunohistochemistry

Introduction

Pituitary adenylate cyclase–activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide with widespread occurrence in the body. It has two forms, PACAP27 and PACAP38, consisting of 27 and 38 amino acids, respectively. In mammalian tissues, PACAP38 is the dominant form. PACAP binds to its specific

PAC1 receptor (PAC1-R), and to VPAC1 and VPAC2 receptors, which also bind the closest homolog peptide, vasoactive intestinal peptide (VIP) with equal affinity (Moody et al. 2021; Vaudry et al. 2009). PACAP has very diverse actions depending, among others, on the receptor expression pattern of the different tissues. PACAP plays a role in neuronal excitability (May et al. 2021), urinary bladder activity (Girard et al. 2021), gastrointestinal motility and secretion (Karpiesiuk and Palus 2021; Reglodi et al. 2018; Rytel et al. 2021), cartilage and bone formation (Jozsa et al. 2021), and reproduction and embryonal growth (Koves et al. 2020; Ross et al. 2018; Shan et al. 2021) and it also has immunomodulatory functions (Abad and Tan 2018). Several studies show that PACAP plays important roles in numerous pathological conditions such as tumor growth and proliferation (D’Amico et al. 2021b, c; Maugeri et al. 2018a, 2021; Moody et al. 2016) and nervous system disorders (Moody and Jensen 2021) like migraine, schizophrenia, anxiety, and depression (Eslami et al. 2021; Kormos et al. 2016; Martelle et al. 2021; Ross et al. 2020; Tiihonen et al. 2021) as well as inflammatory conditions (Moody and Jensen 2021; Tamas

✉ Tamas Atlasz
attam@gamma.ttk.pte.hu

¹ Department of Anatomy, Medical School, MTA-PTE PACAP Research Team, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary
² Department of Forensic Medicine, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary
³ Department of Pathology, Medical School and Clinical Center, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary
⁴ Szentagothai Research Center, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary
⁵ Department of Sportbiology, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary

et al. 2021), sudden infant death syndrome (Shi et al. 2021), and hearing loss (Fulop et al. 2019; Ruel et al. 2021).

One of the most intensively studied actions of PACAP is its neuroprotective and general cytoprotective effect. This has been demonstrated in numerous in vitro and in vivo studies (Reglodi et al. 2011, 2017). Recently, it has been shown that in addition to the long-known protective effects in models of stroke and Parkinson's disease (Ohtaki et al. 2008; Zheng et al. 2021), PACAP is protective in models of spinal and bulbar muscular atrophy (Martinez-Rojas et al. 2021), fetal alcohol syndrome (Shili et al. 2021), diabetic neuropathy (Kiss et al. 2021), optic neuritis in multiple sclerosis (Van et al. 2021), and noise-induced hearing loss (Ruel et al. 2021). The large body of evidence, showing that PACAP is protective in animal models of several diseases, places PACAP on the list of emerging protective therapeutic agents in neurodegenerative disorders (Cheng et al. 2020; Soles-Tarres et al. 2020) and stroke (Cherail et al. 2021; Fang et al. 2020; Sadanandan et al. 2021; Zheng et al. 2021).

PACAP is also present in the eye, in several retinal layers as well as iris, cornea, and ciliary body displaying immunoreactivity for both the peptide and its receptors (Wang et al. 1995). Numerous actions have been described in ocular tissues (D'Amico et al. 2021a; Postyeni et al. 2021). Among others, PACAP stimulates tear production and prevents corneal hyperkeratinization (Nakamachi et al. 2016); it is necessary for stable pupil maintenance (Keenan et al. 2016) and it plays an important role in the regulation of circadian rhythm via the retinohypothalamic pathway (Vereczki et al. 2006). The general protective effects of PACAP can also be observed in the eye. Although some data indicate that PACAP may provoke inflammatory reactions in the rabbit eye (Wang et al. 1997), most available data indicate that PACAP has very potent protective effects in the retina and cornea. For example, PACAP is protective in diabetic, ischemic, inflammatory retinopathies, in retinopathy of prematurity, in glaucoma (Atlasz et al. 2010; Kvarik et al. 2021; Maugeri et al. 2019a; Szabo et al. 2021; Vaczy et al. 2018), as well as traumatic and excitotoxic retinal injuries (Atlasz et al. 2009; Seki et al. 2008).

PACAP and its receptors occur in ocular tissues in different species, such as rabbit, rat, and mouse (Troger et al. 2007; Wang et al. 1995). As the role of PACAP is emerging also in human diseases as a biomarker and an increasing number of data support the functions of PACAP in human tissues, it is essential to investigate the distribution of PACAP and its receptors in the human eye. However, there are very few data regarding the occurrence and actions of PACAP in the human eye. Olianas and coworkers (2002) have reported that PACAP increases cAMP levels in fetal retinas and could demonstrate the presence of the mRNA of PACAP and of its receptors in retinal homogenates. Pigment epithelial and corneal endothelial cells derived from human

eyes have been subject of a series of in vitro investigations that show that PACAP stimulates adenylate cyclase, protects the cells against growth factor deprivation, oxidative stress, or hyperglycaemia, and stimulates various intracellular signaling pathways (Fabian et al. 2012, 2019; Maugeri et al. 2017, 2018b, 2019a, b). Retinoblastomas have also been shown to express PACAP receptors (Olianas et al. 1996), where, interestingly, PACAP acts as a cytotoxic agent in high concentrations (Wojcieszak and Zawilska 2014). However, there are no further data available in the normal human eye. Therefore, the aim of the present study was to describe the distribution of PACAP-like immunoreactivity in the human eye. As the protective effects of PACAP are predominantly mediated by its specific PAC1-R, we also studied the presence of PAC1 receptor in different parts of the human eye.

Materials and Methods

Human Samples

Human eyes ($N=7$ patients; 6 boys, 1 girl) were used in this experiment (ethical permission No: 6383-PTE 2018). The age of patients, undergoing enucleation surgery because of retinoblastoma, was 16 ± 10 months. Only the tumor-free, normal parts were used for histological analysis. Tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated in graded alcohol series, embedded in paraffin, cut in 3- μ m-thick sections with a rotational microtome (Microm HM 325, Thermo Scientific, Ltd.), and mounted on coated glass microscope slides. After deparaffinization and rehydration, samples were pretreated with heat-induced epitope retrieval method in 1 mM (pH=6.0) citrate buffer in a microwave oven for 15 min at 750 W. After cooling on room temperature, tissues were washed in TRIS buffered saline solution (TBS) (pH=7.6).

Immunohistochemistry Analysis

For immunohistochemistry, samples were incubated in anti-PAC1-R antibody (Cat. Nr. AVR-003, Alomone Labs, Ltd., 1:125, 1 h at room temperature), and anti-PACAP38 (Cat. Nr. T-4473, BMA Biomedicals, Ltd., 1:500, 1 h at room temperature). Sections were washed in TBS and incubated with HISTOLS-AP-R anti-rabbit alkaline phosphatase labelled detection system (Cat. Nr. 30,011.R500A, Histopathology, Ltd., 30 min at room temperature). After washing in TBS, the reaction was developed with HISTOLS Resistant AP-Red Chromogen/substrate System (Cat. Nr. 30,019, Histopathology, Ltd.) in a dark environment. Staining intensity was controlled under light microscope after 10 min of incubation with the chromogen/substrate working solution. Our choice was this chromogen substance for its magenta staining, so

positive immunoreaction would also be visible in the pigmented cells. Sections were counterstained with hematoxylin solution, and bluing was performed with tap water. Samples were dehydrated in alcohol, cleared in xylene, and mounted with permanent mounting medium. Negative control was obtained when the primary antibody was replaced with TBS. The slides were digitalized using a Panoramic MIDI II automatic digital slide scanner (3DHISTECH Ltd., Hungary) and images were taken with CaseViewer 2.3 software (3DHISTECH Ltd., Hungary). Sections were analyzed using a semiquantitative approach. Immunoreactivity was scored by 3 researchers, between 0- ++++ depending on the staining intensity.

Results

Results are summarized in Table 1. The outer layer of the eyeball, the tunica fibrosa or fibrous layer, consists of the sclera and cornea. The sclera is a dense connective tissue layer, which was negative for both PACAP and its PAC1-R. The cornea, on the other hand, displayed positive areas. The cornea has an outer epithelial layer made up of stratified squamous non-keratinized epithelium and an inner endothelial layer, made up of a single layer of simple squamous cells, the endothelial cells, facing the anterior chamber. Between the epithelial layers, the corneal stroma is found,

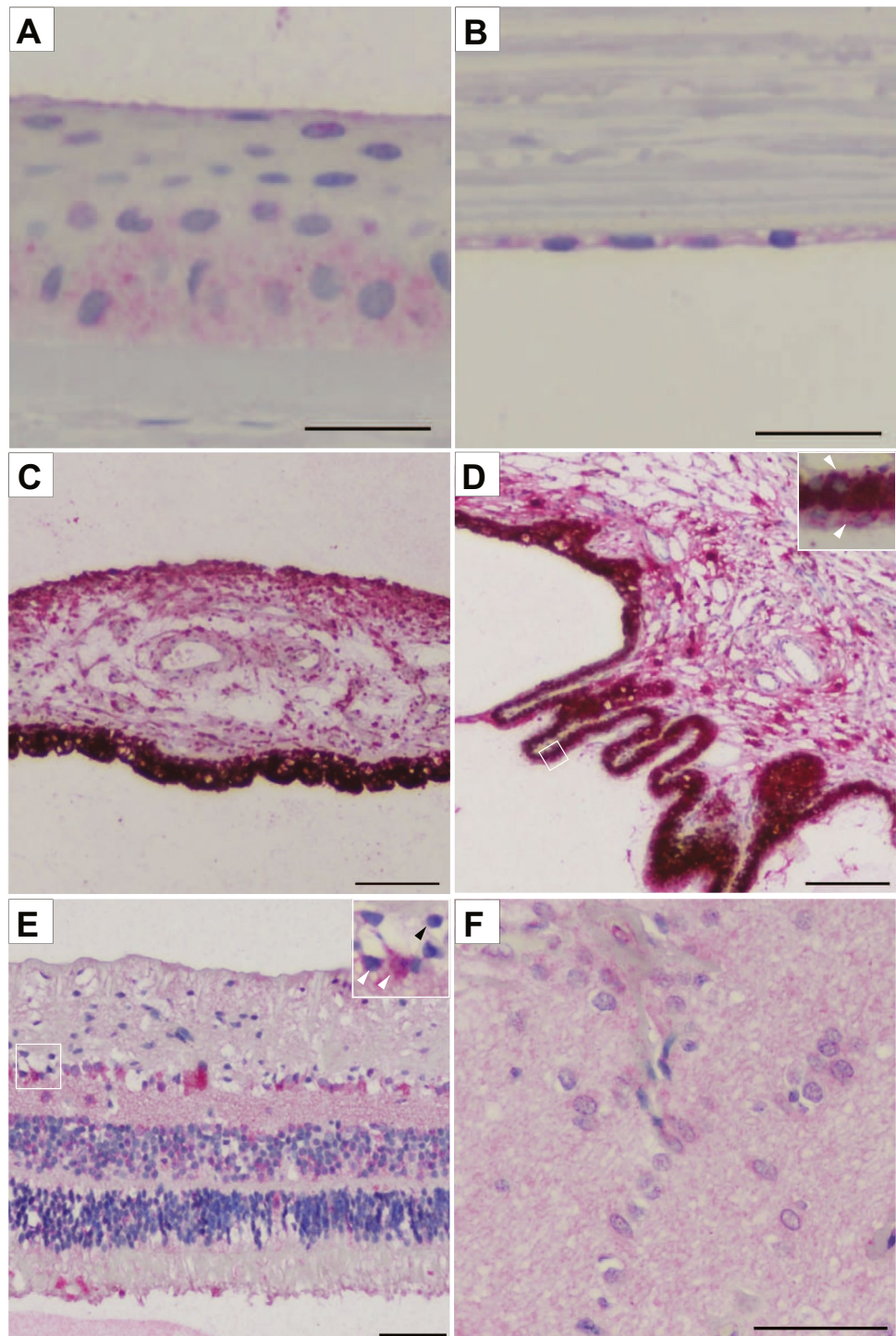
separated by the limiting membranes from the outer and inner epithelium. While the stroma, which is similar in its main histological characteristics to those of the sclera, remained negative, the epithelial cells showed immunopositivity for both PACAP and PAC1-R. The outer epithelium showed strong immunopositivity in the basal layers in all sections and in the upper, planocellular layer in some sections. The middle polygonal layer did not show positivity in any of the sections. These findings are indicated as 0/++ in Table 1. The inner endothelial layer was strongly positive in all cases (Figs. 1A, B; 2A, B).

The middle layer of the eyeball is the vascular layer, or uvea, which is composed of the iris, ciliary body, and choroid parts. The main tissue of the iris is the stroma, where the sphincter and dilator pupillary muscles are embedded. Behind the stroma, the blind part of the retina is located as a double layer of pigmented epithelial cells. The magenta-stained positive immunoreaction was visible for both PACAP and its receptor (Figs. 1C, 2C). The stroma showed strong immunoreactivity with both antibodies, but the distribution of the immunoreactivity was uneven: the anterior part of the stroma displayed stronger immunopositivity (indicated as ++/+++ in Table 1). Interestingly, the sphincter pupillary muscle was more positive for PACAP than for PAC1-R, which showed very weak positivity only in some sections (PAC1-R indicated as 0-+ in Table 1). The dilator pupillary muscle was positive for PACAP in its entire length, while

Table 1 Localization and relative abundance of PACAP and PAC1-R immunoreactivity in the human eye. The symbols provide a semiquantitative evaluation of the density of PACAP and PAC1-R; +++: high density; ++: moderate density; +: low density; 0: no signal. In the table “/” indicates the difference within one section in different parts of one layer, “-” indicates the different distribution of the immunopositivity between different sections

Structures			PACAP	PAC1-R
Fibrous layer	Cornea	Epithelium	0/++	0/++
		Stroma	0	0
		Endothelium	++	++
Vascular layer	Sclera		0	0
		Iris	Pigment epithelium	+++
	Stroma		++/+++	++/+++
	Sphincter pupillary muscle		+ / ++	0-+
	Ciliary body	Dilator pupillary muscle	+++	0/++
		Pigmented epithelium	+++	+++
		Non-pigmented epithelium	+++	++
		Stroma	+	+ / +++
		Choroid	0	0
	Nervous layer		Nerve fiber layer	+
Ganglion cell layer			0/++	0/+++
Inner plexiform layer			++	+ / +++
Inner nuclear layer			0/+	+
Outer plexiform layer			0	0-+
Outer nuclear layer			0	0-+
Layer of rods and cones			0-+	0-+
Retinal pigmented epithelium			++	+++
Optic nerve	Glia		0	++
		Neuropil	++	++

Fig. 1 Representative light microscopic pictures of the magenta-stained PAC1-R positive areas in the human eyes. **A** Corneal epithelial cells showed PAC1-R immunopositivity. **B** Corneal endothelial cells were strongly PAC1-R positive. **C** In the iris, the pigmented epithelial cells and stroma showed strong immunopositivity. **D** The ciliary body displayed strong positivity at the bases of the ciliary processes and weak immunosignal was found in the ciliary muscle. Pigmented epithelial cells showed strong PAC1-R positivity with high magnification (white arrowheads in inset) **E** Several retinal layers displayed high PAC1-R immunosignal. In high magnification, PAC1-R positive (white arrowheads) and PAC1-R negative (black arrowhead) cells are shown in the ganglion cell layer. **F** The optic nerve showed moderate immunoreactivity for PAC1-R in the neuropil, while glial cells had strong immunopositivity. Scale bar: 50 μ m (A, B, E, F); 100 μ m (C, D)

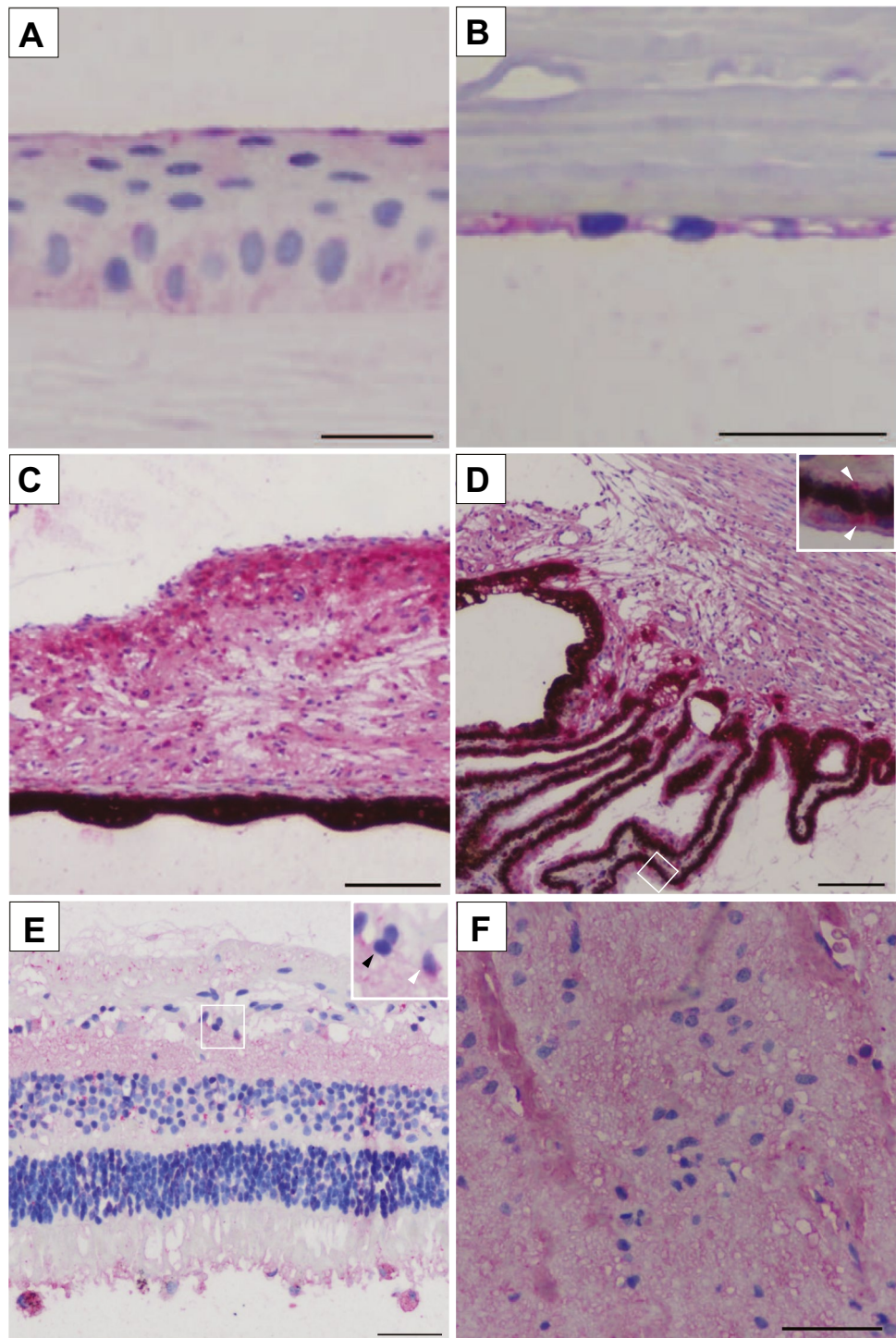


positive for PAC1-R only in the posterior part (indicated as 0/+ + in Table 1). The ciliary body stroma has the ciliary muscle embedded, and the anterior part of the ciliary shows projections called ciliary processes, which produce the aqueous humor. The posterior part of the ciliary is also covered by the continuation of the non-visual part of the retina as an outer pigmented and an inner non-pigmented layer (ciliary part of the retina). The non-pigmented retinal layer showed

strong positivity for both PACAP and PAC1-R. The stroma was weakly stained for PACAP, while PAC1-R immunosignal was very strong at the bases of the ciliary processes and very weak in the ciliary muscle (Figs. 1D, 2D). The choroid was negative for the antibodies.

The retina has 10 layers, the first (pigmented) layer developing from the original outer layer of the eyecup, while the other 9 layers derive from the original inner retinoblasts.

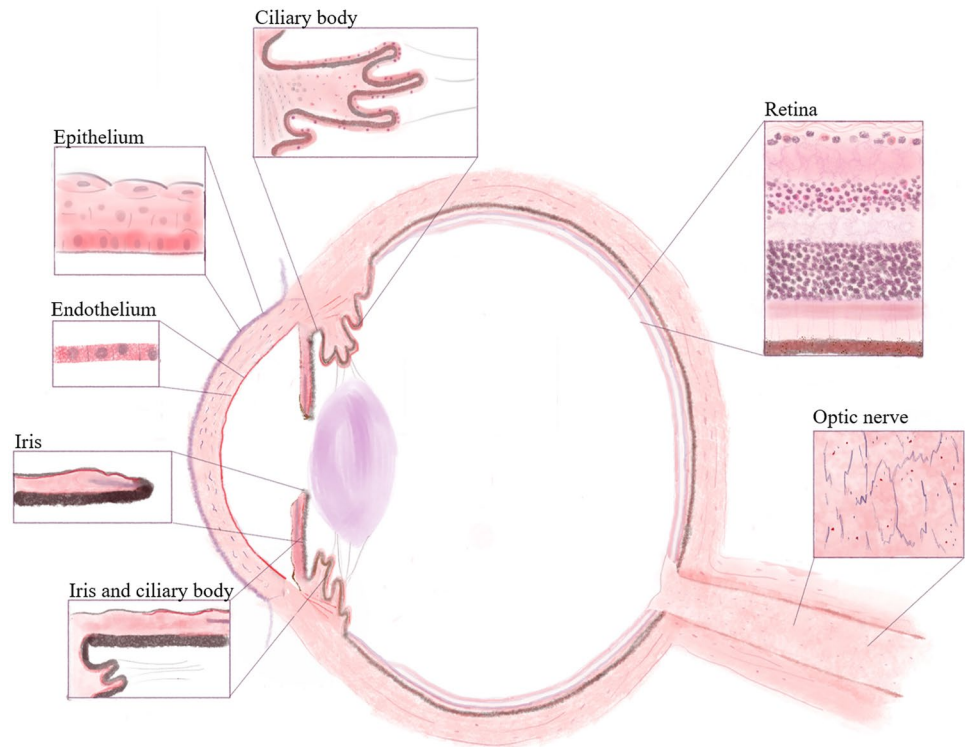
Fig. 2 Representative light microscopic pictures of the magenta-stained PACAP positive areas in the human eyes. **A** Epithelial basal layers of the cornea showed strong immunosignal. **B** Endothelial layer of the cornea was strongly positive for PACAP. **C** In the iris, the stroma, sphincter pupillary muscle showed strong immunoreaction; the dilator pupillary muscle had positivity only in the posterior part. **D** The ciliary stroma showed weaker staining. Inset highlights the pigmented epithelium where high immunosignal was shown (white arrowheads in inset). **E** PACAP positivity was observed in the retinal nerve fiber layer, ganglion cell layer, inner plexiform, and nuclear layers and also in the pigmented epithelium. Inset highlights the PACAP positive ganglion cells (white arrowhead) and PACAP negative ganglion cells (black arrowhead) distribution within the ganglion cell layer. **F** Optic nerve showed moderate immunoreactivity in the neuropil but glial cells did not show PACAP immunosignal. Scale bar: 50 μm (A, B, E, F); 100 μm (C, D)



Positivity for PACAP and very strong expression for PAC1-R were detected in the pigmented epithelial layer, where the magenta color was easily distinguishable from the brown pigmentation of the epithelial cells. The layer of the photoreceptors (rods and cones) showed weak or no immunostaining in an individually variable pattern (indicated as 0- + in Table 1), similarly to the outer nuclear and plexiform layers, which displayed a weak signal for PAC1-R only in some samples.

The inner nuclear layer contains the cell bodies of the bipolar neurons, those of the retinal interneurons (amacrine and horizontal cells) and those of the retinal Müller glial cells. This layer was positive in most cases for both the peptide and the receptor. An interesting staining pattern was observed in the ganglion cell layer, where very strong immunosignal could be seen in some of the ganglion cells, while others were negative (indicated as 0/ + + + in Table 1, Figs. 1E, 2E). The optic

Fig. 3 Schematic drawing of PACAP and PAC1-R distribution in the human eye. Red color indicates PACAP and PAC1-R-expressing cells according to our results. The highlighted areas represent the most relevant parts



nerve is formed from the axons of the retinal ganglion cells. As a projection of the diencephalon during development, it is not a peripheral nerve, but part of the central nervous system. Therefore, the optic nerve is covered by the meninges and contains glial cells of the central nervous system. In the optic nerve, we found moderate immunoreactivity for PACAP and PAC1-R in the neuropil, while the glial cells only displayed immunoreactivity for the receptor (Figs. 1F, 2F). Schematic representations of our findings are shown in Fig. 3.

Discussion

In the present study, we described the distribution of PACAP and PAC1-R-like immunoreactivity in the human eye. We found immunopositivity in the corneal epithelium and endothelium, in the stroma and muscles of the iris and ciliary body. The retina displayed strong immunoreactivity in several layers, including the pigment epithelial cells, while the optic nerve had weaker immunoreactivity.

PACAP has been shown to occur in retinas and other ocular tissues of various species. Most studies have used rat and mouse retinas, where strong PACAP and receptor expression has been described (D'Agata and Cavallaro 1998; Denes et al. 2019). In mice, detailed mapping of PACAP and PACAP receptors is available by Seki and coworkers (Seki et al. 1997, 1998, 2000; Shioda et al. 2016). Similarly, PACAP and PAC1-R expression has been found in

the chick retina, where PACAP expression shows circadian rhythm (Borba et al. 2005; Jozsa et al. 2001). PACAP has also been described in the turtle and fish retina (Grone et al. 2007; Reglodi et al. 2001). In several species, including monkeys, PACAP and melanopsin have been found to be co-stored in the melanopsin-containing retinal ganglion cells (Hannibal et al. 2014). Other parts of the eye have been less investigated. PACAP immunoreactivity has been described in the cat choroid (Elsås et al. 1996), while radioimmunoassay studies have revealed PACAP immunoreactivity in homogenates of the iris, ciliary body, cornea, retina, and choroid of the rabbit eye (Nilsson et al. 1994; Wang et al. 1995). Our study described, for the first time, the detailed distribution of PACAP and PAC1-R-like immunoreactivity in the human eye. The samples were from children under 3 undergoing enucleation surgery because of retinoblastoma. Therefore, the distribution could be different in adult eyes, but the eyeballs used in our study showed fully developed ocular structures.

In the human retina, only Olianias and coworkers (2002) have reported that PACAP increases cAMP levels in fetal retinas and could demonstrate the presence of mRNA of PACAP and its receptors in retinal homogenates. We found that several layers, including the ganglion cell layer, express PACAP and its PAC1-R with a distribution pattern described in other mammalian species. Previously, it has been found that almost all intrinsically photosensitive melanopsin-containing ganglion cells express PACAP in mice, rats, and even in monkeys

(Hannibal et al. 2014). These cells are thought to play a role in the transmission of light information for the centers responsible for generating circadian rhythm (Hannibal and Fahrenkrug 2004).

The retinoprotective effects of PACAP are widely known and have been proven by dozens of animal models and in vitro studies (Atlasz et al. 2016; Shioda et al. 2016). PACAP has also been shown to have a role against retinal aging, as early aging signs have been demonstrated in PACAP knockout animals (Kovacs-Valasek et al. 2017). Earlier it has been demonstrated that the melanopsin-containing retinal ganglion cells (which also express PACAP) are more resistant to degenerative processes, and this has raised the possibility of PACAP being involved in the endogenous protective machinery (La Morgia et al. 2011). Indeed, we have shown that mice lacking PACAP have increased vulnerability in models of retinal ischemia and retinopathy of prematurity (Kvarik et al. 2021; Szabadfi et al. 2012). The retinal pigment epithelial cells, as the first layer of the neural retina, play an important role in the photoprotection, metabolism, membrane renewal, vitamin A storage, and growth factor supply of the photoreceptors. Their involvement in several retinal diseases has been implied, such as diabetic retinopathy and age-related degeneration, and in vitro studies from human retinal pigment epithelial cells have described protection by PACAP against several harmful effects (Fabian et al. 2019; Maugeri et al. 2017, 2019a).

The pigment layer continues also in the blind part of the retina, where it is reflected in the iris to form two pigmented layers in the posterior border of the iris. In the posterior part of the ciliary body, the continuation of the retinal pigment epithelial cells forms the outer pigmented layer of the ciliary part of the retina, while a non-pigmented inner layer is derived from the embryonic inner layer of the retina. This latter structure builds the barrier between capillaries and the aqueous humor, thus playing an important role in the production of the aqueous humor. We found that both layers of the blind part of the retina express strong immunoreactivity for PACAP and its receptor. The presence of PACAP in the aqueous humor has been investigated in rabbit and human fluid samples, which showed that PACAP could not be detected under normal conditions, only after stimulation, when PACAP levels increased in the aqueous humor (Brubel et al. 2011; Wang et al. 1997). Although the direct involvement of PACAP in the aqueous humor production is not yet established, several lines of evidence support this hypothesis. cAMP is known to trigger transepithelial fluid transport across the ciliary epithelium in mammals (Cheng et al. 2016; Kong et al. 2006). As PACAP is a cAMP stimulating peptide, it can be assumed that the neuropeptide plays a role endogenously in the aqueous humor production. Furthermore, PACAP and its receptors have also been shown to act on chloride channels, which are essential in the production

of aqueous humor, independently from the cAMP pathway (Alshafie et al. 2014; Derand et al. 2004; Leung et al. 2001; Martinez-Rojas et al. 2021). The role of PACAP has been implied not only in the production, but also in the absorption of the aqueous humor, as our most recent data have provided evidence that PACAP treatment leads to reduced intraocular pressure in a rat model of glaucoma (Szabo et al. 2021).

In addition to the pigmented epithelial cells of the iris and ciliary body, the stroma and the muscles also showed immunopositivity. Earlier studies have reported on the effects of PACAP on the intraocular smooth muscles. Yamaji et al. (2005) showed that PACAP enhanced sphincter response, but had no effect on the dilator pupillary muscle. The involvement of PACAP in the pupillary light reflex is also strengthened by the observation that both PACAP and PAC1 deficient mice have attenuated reflex (Engelund et al. 2012; Keenan et al. 2016). Although different, even contradictory data are available on the effect of PACAP on the iris muscles, a recent study has reported that the effect on the sphincter reflex depends on the light conditions, which might explain the reported differences (Keenan et al. 2016).

In addition to the inner and middle layers of the eye, we found strong immunoreactivity in the cornea part of the outermost, fibrous layer of the eye, where the outer epithelial and inner endothelial layers were positive for both the peptide and its receptor. PACAP treatment on the corneal surface has been shown to induce recovery of the epithelial cells and also of the sensory innervation (Fukiage et al. 2007; Ma et al. 2015; Wang et al. 2019). PACAP KO mice present dry eye symptoms with corneal hyperkeratinization, also pointing at the importance of endogenous PACAP (Nakamachi et al. 2016). Our finding that the endothelial cells display strong immunoreactivity for both PACAP and PAC1 receptors is in agreement with findings of Maugeri and coworkers (2019b), who showed the presence of PACAP and PAC1-R in corneal endothelial cells isolated from human corneal cells. PACAP's protective effects have been confirmed in these cells (Maugeri et al. 2019b). Among others, PACAP showed protective effects against growth factor deprivation and induced epidermal growth factor receptor phosphorylation. These results show that PACAP may be an important factor in corneal integrity (Maugeri et al. 2018b, 2019b).

PACAP and/or its receptors have been shown in most human tissues, with the eye being an exception. In the present study, we provided evidence for the widespread occurrence of PACAP and its PAC1-R in the human eye. In human tissues, expression levels of PACAP and/or its receptors show alterations in various diseases. This has raised the question whether PACAP could be used as a biomarker for disease diagnosis and/or prognosis. Recent studies show diagnostic value of serum PACAP in non-traumatic osteonecrosis (Zhu et al. 2021), migraine (Yan et al. 2021), anxiety disorder (Ross et al. 2020), post-traumatic stress disorder (Wang et al. 2021), and multiple sclerosis (Al-Keilani

et al. 2021). Tissue PACAP has also been suggested as a marker for tumor progression, like cervical cancer (Jung et al. 2011), tumors of kidney, testis, prostate and thyroid gland, pancreas, and large intestine (Bardosi et al. 2016; Ferencz et al. 2019; Godlewski and Łakomy 2010; Lindner et al. 2021; Nakamura et al. 2014; Szanto et al. 2012; Tamas et al. 2016). A recent human study investigating the transcriptomic profile of skin samples from patients undergoing carpal tunnel decompression surgery indicated that PACAP gene was the most strongly upregulated gene and its expression correlated with nerve fiber regeneration further suggesting a therapeutic potential in using PACAP for nerve regeneration (Baskozos et al. 2020; Maugeri et al. 2020a, b). All these studies draw attention to the importance of PACAP in human tissues. Very limited data had been available on the occurrence and almost no data on the distribution of PACAP and its receptors in the human eye. As dozens of studies have described different effects of PACAP in the eye, our study indicating the widespread occurrence of PACAP and its specific receptor in the human eye implies that the in vitro cellular effects and in vivo results from animal studies have translational value and most probably are also present in the human eye.

Author Contribution Evelin Patko, Edina Szabo, Denes Toth, Tamas Atlasz, Dora Reglodi conceived and designed the experiments; Evelin Patko, Edina Szabo, Denes Toth, Inez Bosnyak, Alexandra Vaczy, performed the experiments; Evelin Patko, Edina Szabo, Inez Bosnyak, Dora Reglodi analyzed the data; Dora Reglodi, Tamas Tornoczky, Tamas Atlasz contributed reagents/materials/analysis tools; Evelin Patko, Edina Szabo, Dora Reglodi, Tamas Atlasz wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Open access funding provided by University of Pecs. The research was financed by the Thematic Excellence Program 2021 Health Sub-programme of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the EGA-16 project of the University of Pecs. This study was supported by the National Research, Development and Innovation Fund FK129190, K119759, K135457 and ÚNKP-21-3-I-PTE-1299; National Brain Research Program NAP2017-1.2.1-NKP-2017-00002; MTA-TKI-14016; PTE AOK-TANDEM; GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS”; “The role of neuroinflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics”; and Higher Education Institutional Excellence Program of the Ministry of Human Capacities in Hungary: 20765/3/2018/FEKUTSTRAT, 2020-4.1.1-TKP2020—FIKP III. Project No. TKP2020-IKA-08 has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme.

Availability of Data and Material The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Code Availability Not applicable.

Declarations

Ethics Approval This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. All human sample collections were carried out according to a protocol approved by the Institutional Ethic Committee, University of Pecs (6383-PTE 2018).

Consent to Participate Not applicable.

Consent for Publication Not applicable.

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Abad C, Tan Y-V (2018) Immunomodulatory roles of PACAP and VIP: lessons from knockout mice. *J Mol Neurosci* 66(1):102–113. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1150-y>
- Al-Keilani MS, Almomani BA, Al-Sawalha NA et al (2021) Significance of serum VIP and PACAP in multiple sclerosis: an exploratory case–control study. *Neurol Sci*. <https://doi.org/10.1007/s10072-021-05682-5>
- Alshafie W, Chappe FG, Li M et al (2014) VIP regulates CFTR membrane expression and function in Calu-3 cells by increasing its interaction with NHERF1 and P-ERM in a VPAC1- and PKCε-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol* 307(1):C107–C119. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00296.2013>
- Atlasz T, Szabadfi K, Reglodi D et al (2009) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its fragments on retinal degeneration induced by neonatal monosodium glutamate treatment. *Ann N Y Acad Sci* 1163:348–352. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03650.x>
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P et al (2010) Evaluation of the protective effects of PACAP with cell-specific markers in ischemia-induced retinal degeneration. *Brain Res Bull* 81(4–5):497–504. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.09.004>
- Atlasz T, Vaczy A, Werling D, Kiss P, Tamas A, Kovacs K, Fabian E, Kvarik T, Mammel B, Danyadi B, Lokos E, Reglodi D (2016) Neuroprotective effects of PACAP in the retina. In: Reglodi D, Tamas A (eds) *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide PACAP, current topics in neurotoxicity 11*. Springer Nature, Switzerland AG, pp 501–527
- Bardosi S, Bardosi A, Nagy Z, Reglodi D (2016) Expression of PACAP and PAC1 receptor in normal human thyroid gland and in thyroid papillary carcinoma. *J Mol Neurosci* 60(2):171–178. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0823-7>
- Baskozos G, Sandy-Hindmarch O, Clark AJ et al (2020) Molecular and cellular correlates of human nerve regeneration: ADCYAP1/

- PACAP enhance nerve outgrowth. *Brain* 143(7):2009–2026. <https://doi.org/10.1093/Brain/awaa163>
- Brubel R, Reglodi D, Jambor E et al (2011) Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 46(2):189–194. <https://doi.org/10.1002/jms.1884>
- Carrazzoni Borba J, Pereira Henze I, Souza Silveira M et al (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) can act as determinant of the tyrosine hydroxylase phenotype of dopaminergic cells during retina development. *Brain Res Dev Brain Res* 156(2):193–201. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.02.016>
- Cheng AK-W, Civan MM, To C-H, Do C-W (2016) cAMP stimulates transepithelial short-circuit current and fluid transport across porcine ciliary epithelium. *Invest Ophthalmol vis Sci* 57(15):6784–6794. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20127>
- Cheng Q, Cheng J, Cordato D, Gao J (2020) Can dipeptidyl peptidase-4 inhibitors treat cognitive disorders? *Pharmacol Ther* 212:107559. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107559>
- Cherait A, Maucotel J, Lefranc B et al (2021) Intranasal administration of PACAP is an efficient delivery route to reduce infarct volume and promote functional recovery after transient and permanent middle cerebral artery occlusion. *Front Endocrinol (lausanne)* 11:585082. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.585082>
- D'Agata V, Cavallaro S (1998) Functional and molecular expression of PACAP/VIP receptors in the rat retina. *Brain Res Mol* 54(1):161–164. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00335-5](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00335-5)
- D'Amico AG, Maugeri G, Musumeci G et al (2021a) PACAP and NAP: effect of two functionally related peptides in diabetic retinopathy. *J Mol Neurosci* 71(8):1525–1535. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01769-4>
- D'Amico AG, Maugeri G, Rasà DM et al (2021b) Modulatory role of PACAP and VIP on HIFs expression in lung adenocarcinoma. *Peptides* 146:170672. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170672>
- D'Amico AG, Maugeri G, Vanella L et al (2021c) Multimodal role of PACAP in glioblastoma. *Brain Sci* 11(8):994. <https://doi.org/10.3390/brainsci11080994>
- Denes V, Hideg O, Nyisztor Z et al (2019) The neuroprotective peptide PACAP1–38 contributes to horizontal cell development in postnatal rat retina. *Invest Ophthalmol vis Sci* 60(2):770–778. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-25719>
- Derand R, Montoni A, Bulteau-Pignoux L et al (2004) Activation of VPAC 1 receptors by VIP and PACAP-27 in human bronchial epithelial cells induces CFTR-dependent chloride secretion. *Br J Pharmacol* 141(4):698–708. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705597>
- Elsås T, Uddman R, Sundler F (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-immunoreactive nerve fibers in the cat eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234(9):573–580. <https://doi.org/10.1007/BF00448802>
- Engelund A, Fahrenkrug J, Harrison A et al (2012) Altered pupillary light reflex in PACAP receptor 1-deficient mice. *Brain Res* 1453:17–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.005>
- Eslami R, Parnow A, Pairo Z et al (2021) The effects of two different intensities of aerobic training protocols on pain and serum neurobiomarkers in women migraineurs: a randomized controlled trial. *Eur J Appl Physiol* 121(2):609–620. <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04551-x>
- Fabian E, Reglodi D, Mester L et al (2012) Effects of PACAP on intracellular signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *J Mol Neurosci* 48(3):493–500. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9812-7>
- Fabian E, Reglodi D, Horvath G et al (2019) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide acts against neovascularization in retinal pigment epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1455(1):160–172. <https://doi.org/10.1111/nyas.14189>
- Fang Y, Shi H, Ren R et al (2020) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide attenuates brain edema by protecting blood–brain barrier and glymphatic system after subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurotherapeutics* 17(4):1954–1972. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00925-3>
- Ferencz S, Reglodi D, Kaszas B et al (2019) PACAP and PAC1 receptor expression in pancreatic ductal carcinoma. *Oncol Lett* 18(6):5725–5730. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10971>
- Fukiage C, Nakajima T, Takayama Y et al (2007) PACAP induces neurite outgrowth in cultured trigeminal ganglion cells and recovery of corneal sensitivity after flap surgery in rabbits. *Am J Ophthalmol* 143(2):255–262. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2006.10.034>
- Fulop DB, Humli V, Szepesy J et al (2019) Hearing impairment and associated morphological changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *Sci Rep* 9(1):14598. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50775-z>
- Girard BM, Campbell SE, Beca KI et al (2021) Intrabladder PAC1 receptor antagonist, PACAP(6–38), reduces urinary bladder frequency and pelvic sensitivity in mice exposed to repeated variate stress (RVS). *J Mol Neurosci* 7(8):1575–1588. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01649-x>
- Godlewski J, Łakomy IM (2010) Changes in vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and neuropeptide Y-ergic structures of the enteric nervous system in the carcinoma of the human large intestine. *Folia Histochem Cytobiol* 48(2):208–216. <https://doi.org/10.2478/v10042-010-0052-9>
- Grone BP, Zhao S, Chen C-C, Fernald RD (2007) Localization and diurnal expression of melanopsin, vertebrate ancient opsin, and pituitary adenylate cyclase-activating peptide mRNA in a teleost retina. *J Biol Rhythms* 22(6):558–561. <https://doi.org/10.1177/0748730407308285>
- Hannibal J, Fahrenkrug J (2004) Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res* 316(1):99–113. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0858-x>
- Hannibal J, Kankipati L, Strang CE et al (2014) Central projections of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 522(10):2231–2248. <https://doi.org/10.1002/cne.23588>
- Jozsa R, Somogyvari-Vigh A, Reglodi D et al (2001) Distribution and daily variations of PACAP in the chicken brain. *Peptides* 22(9):1371–1377. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)004776](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)004776)
- Jozsa G, Fulop BD, Kovacs L et al (2021) Lack of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) disturbs callus formation. *J Mol Neurosci* 71(8):1543–1555. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01448-z>
- Jung S, Yi L, Jeong D et al (2011) The role of ADCYAP1, adenylate cyclase activating polypeptide 1, as a methylation biomarker for the early detection of cervical cancer. *Oncol Rep* 25(1):245–252. https://doi.org/10.3892/or_00001067
- Karpiesiuk A, Palus K (2021) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in physiological and pathological processes within the gastrointestinal tract: a review. *Int J Mol Sci* 22(16):8682. <https://doi.org/10.3390/ijms22168682>
- Keenan WT, Rupp AC, Ross RA et al (2016) A visual circuit uses complementary mechanisms to support transient and sustained pupil constriction. *Elife* 5:e15392. <https://doi.org/10.7554/Elife.15392>
- Kiss P, Banki E, Gaszner B et al (2021) Protective effects of PACAP in a rat model of diabetic neuropathy. *Int J Mol Sci* 22(19):10691. <https://doi.org/10.3390/ijms221910691>
- Kong C-W, Li K-K, To C-H (2006) Chloride secretion by porcine ciliary epithelium: new insight into species similarities and differences in aqueous humor formation. *Invest Ophthalmol vis Sci* 47(12):5428–5436. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0180>

- Kormos V, Gaspar L, Kovacs LA et al (2016) Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and Brainstem centers. *Neuroscience* 330:335–358. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.004>
- Kovacs-Valasek A, Szabadfi K, Denes V 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>
- Koves K, Szabo E, Kantor O et al (2020) Current state of understanding of the role of PACAP in the hypothalamo-hypophyseal gonadotropin functions of mammals. *Front Endocrinol (lausanne)* 11:88. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00088>
- Kvarik T, Reglodi D, Werling D et al (2021) The protective effects of endogenous PACAP in oxygen-induced retinopathy. *J Mol Neurosci* 71(12):2546–2557. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01846-2>
- La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Hannibal J et al (2011) Melanopsin-expressing retinal ganglion cells: implications for human diseases. *Vision Res* 51(2):296–302. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2010.07.023>
- Leung P, So S, Lam S et al (2001) Local regulation of anion secretion by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in human colonic T84 cells. *Cell Biol Int* 25(2):123–129. <https://doi.org/10.1006/cbir.2000.0584>
- Lindner S, Rudolf H, Palumbo G et al (2021) Are heterobivalent GRPR-and VPAC1R-bispecific radiopeptides suitable for efficient in vivo tumor imaging of prostate carcinomas? *Bioorg Med Chem Lett* 48:128241. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128241>
- Ma Y, Zhao S, Wang X et al (2015) A new recombinant PACAP-derived peptide efficiently promotes corneal wound repairing and lacrimal secretion. *Invest Ophthalmol vis Sci* 56(8):4336–4349. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17088>
- Martelle SE, Cotella EM, Nawreen N et al (2021) Prefrontal cortex PACAP signaling: organization and role in stress regulation. *Stress* 24(2):196–205. <https://doi.org/10.1080/10253890.2021.1887849>
- Martinez-Rojas VA, Jimenez-Garduño AM, Michelatti D et al (2021) CIC-2-like chloride current alterations in a cell model of spinal and bulbar muscular atrophy, a polyglutamine disease. *J Mol Neurosci* 71(3):662–674. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01687-5>
- Maugeri G, D'Amico AG, Saccone S et al (2017) PACAP and VIP inhibit HIF-1 α -mediated VEGF expression in a model of diabetic macular edema. *J Cell Physiol* 232(5):1209–1215. <https://doi.org/10.1002/jcp.25616>
- Maugeri G, D'Amico AG, Rasà DM et al (2018a) PACAP and VIP regulate hypoxia-inducible factors in neuroblastoma cells exposed to hypoxia. *Neuropeptides* 69:84–91. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.04.009>
- Maugeri G, Longo A, D'Amico AG et al (2018b) Trophic effect of PACAP on human corneal endothelium. *Peptides* 99:20–26. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.11.003>
- Maugeri G, D'Amico AG, Bucolo C, D'Agata V (2019a) Protective effect of PACAP-38 on retinal pigmented epithelium in an in vitro and in vivo model of diabetic retinopathy through EGFR-dependent mechanism. *Peptides* 119:170108. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170108>
- Maugeri G, D'Amico AG, Castrogiovanni P et al (2019b) PACAP through EGFR transactivation preserves human corneal endothelial integrity. *J Cell Biochem* 120(6):10097–10105. <https://doi.org/10.1002/jcb.28293>
- Maugeri G, D'Amico AG, Morello G et al (2020a) Differential vulnerability of oculomotor versus hypoglossal nucleus during ALS: involvement of PACAP. *Front Neurosci* 14:805. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00805>
- Maugeri G, D'Amico AG, Musumeci G et al (2020b) Effects of PACAP on Schwann cells: focus on nerve injury. *Int J Mol Sci* 21(21):8233. <https://doi.org/10.3390/ijms21218233>
- Maugeri G, D'Amico AG, Saccone S et al (2021) Effect of PACAP on hypoxia-induced angiogenesis and epithelial–mesenchymal transition in glioblastoma. *Biomedicines* 9(8):965. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080965>
- May V, Johnson GC, Hammack SE et al (2021) PAC1 receptor internalization and endosomal MEK/ERK activation is essential for PACAP-mediated neuronal excitability. *J Mol Neurosci* 71(8):1536–1542. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01821-x>
- Moody TW, Nuche-Berenguer B, Jensen RT (2016) Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 23(1):38–47. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000218>
- Moody TW, Jensen RT (2021) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal peptide (Part 2): biology and clinical importance in central nervous system and inflammatory disorders. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 28(2):206–213. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000621>
- Moody TW, Lee L, Jensen RT (2021) The G protein–coupled receptor PAC1 regulates transactivation of the receptor tyrosine kinase HER3. *J Mol Neurosci* 71(8):1589–1597. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01711-8>
- Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T et al (2016) PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat Commun* 7:12034. <https://doi.org/10.1038/ncomms12034>
- Nakamura K, Nakamachi T, Endo K et al (2014) Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the human testis and in testicular germ cell tumors. *Andrologia* 46(5):465–471. <https://doi.org/10.1111/and.12102>
- Nilsson SFE, de Neef P, Robberecht P, Christophe J (1994) Characterization of ocular receptors for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and their coupling to adenylate cyclase. *Exp Eye Res* 58(4):459–467. <https://doi.org/10.1006/exer.1994.1039>
- Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S (2008) Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci* 36(1–3):16–25. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9077-3>
- Olianas MC, Ennas MG, Lampis G, Onali P (1996) Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in Y-79 human retinoblastoma cells. *J Neurochem* 67(3):1293–1300. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67031293.x>
- Olianas MC, Ingianni A, Sogos V, Onali P (2002) Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors and PACAP in human fetal retina. *J Neurochem* 69(3):1213–1218. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69031213.x>
- Postyeni E, Kovacs-Valasek A, Denes V et al (2021) PACAP for retinal health: model for cellular aging and rescue. *Int J Mol Sci* 22(1):444. <https://doi.org/10.3390/ijms22010444>
- Reglodi D, Somogyvari-Vigh A, Vigh J et al (2001) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is highly abundant in the nervous system of anoxia-tolerant turtle. *Pseudemys Scripta Elegans Peptides* 22(6):873–878. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00412-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00412-0)
- Reglodi D, Kiss P, Lubics A, Tamas A (2011) Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des* 17(10):962–972. <https://doi.org/10.2174/138161211795589355>
- Reglodi D, Renaud J, Tamas A et al (2017) Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Prog Neurobiol* 155:120–148. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.10.004>
- Reglodi D, Illes A, Opper B et al (2018) Presence and effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide under physiological

- and pathological conditions in the stomach. *Front Endocrinol (lausanne)* 9:90. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00090>
- Ross RA, Leon S, Madara JC et al (2018) PACAP neurons in the ventral premammillary nucleus regulate reproductive function in the female mouse. *Elife* 7:e35960. <https://doi.org/10.7554/Elife.35960>
- Ross RA, Hoepfner SS, Hellberg SN et al (2020) Circulating PACAP peptide and PAC1R genotype as possible transdiagnostic biomarkers for anxiety disorders in women: a preliminary study. *Neuropsychopharmacology* 45(7):1125–1133. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0604-4>
- Ruel J, Guitton MJ, Gratiot P et al (2021) Endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) plays a protective effect against noise-induced hearing loss. *Front Cell Neurosci* 15:658990. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.658990>
- Rytel L, Wojtkiewicz J, Snarska A, Mikołajczyk A (2021) Changes in the neurochemical characterization of enteric neurons in the porcine duodenum after administration of low-dose salmonella enteritidis lipopolysaccharides. *J Mol Neurosci* 71(8):1556–1566. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01473-y>
- Sadanandan N, Cozenc B, Park YJ et al (2021) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a potent therapeutic agent in oxidative stress. *Antioxidants (basel)* 10(3):354. <https://doi.org/10.3390/antiox10030354>
- Seki T, Shioda S, Ogino D et al (1997) Distribution and ultrastructural localization of a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett* 238(3):127–130. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00869-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00869-0)
- Seki T, Shioda S, Nakai Y et al (1998) Distribution and ultrastructural localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor in the rat retina. *Ann N Y Acad Sci* 865:408–411. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb11205.x>
- Seki T, Shioda S, Izumi S et al (2000) Electron microscopic observation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-containing neurons in the rat retina. *Peptides* 21(1):109–113. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(99\)00180-1](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(99)00180-1)
- Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Shioda S (2008) Suppression of ganglion cell death by PACAP following optic nerve transection in the rat. *J Mol Neurosci* 36(1–3):57–60. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9091-5>
- Shan W, Lu S, Ou B et al (2021) PACAP ameliorates the fertility of obese mice through PAC1/PKA/ERK/Nrf2 signal axis. *J Endocrinol* 248(3):337–354. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0316>
- Shi Y, Stornetta DS, Reklow RJ et al (2021) A brainstem peptide system activated at birth protects postnatal breathing. *Nature* 589(7842):426–430. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2991-4>
- Shili I, Hamdi Y, Marouani A et al (2021) Long-term protective effect of PACAP in a fetal alcohol syndrome (FAS) model. *Peptides* 146:170630. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170630>
- Shioda S, Takenoya F, Wada N et al (2016) Pleiotropic and retinoprotective functions of PACAP. *Anat Sci Int* 91(4):313–324. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0351-0>
- Soles-Tarres I, Cabezas-Llobet N, Vaudry D, Xifro X (2020) Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide against cognitive decline in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 14:221. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00221>
- Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P et al (2012) Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotox Res* 21(1):41–48. <https://doi.org/10.1007/s12640-011-9254-y>
- Szabo E, Patko E, Vaczy A et al (2021) Retinoprotective effects of PACAP eye drops in microbead-induced glaucoma model in rats. *Int J Mol Sci* 22(16):8825. <https://doi.org/10.3390/ijms22168825>
- Szanto Z, Sarszegi Z, Reglodi D et al (2012) PACAP immunoreactivity in human malignant tumor samples and cardiac diseases. *J Mol Neurosci* 48(3):667–673. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9815-4>
- Tamas A, Javorhazy A, Reglodi D et al (2016) Examination of PACAP-like immunoreactivity in urogenital tumor samples. *J Mol Neurosci* 59(2):177–183. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0652-0>
- Tamas A, Toth D, Pham D et al (2021) Changes of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) level in polytrauma patients in the early post-traumatic period. *Peptides* 146:170645. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170645>
- Tiihonen J, Koskivi M, Lähteenvuo M et al (2021) Molecular signaling pathways underlying schizophrenia. *Schizophr Res* 232:33–41. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2021.05.011>
- Troger J, Kieselbach G, Teuchner B et al (2007) Peptidergic nerves in the eye, their source and potential pathophysiological relevance. *Brain Res Rev* 53(1):39–62. <https://doi.org/10.1016/j.Brainres-rev.2006.06.002>
- Vaczy A, Kovari P, Kovacs K et al (2018) Protective role of endogenous PACAP in inflammation-induced retinal degeneration. *Curr Pharm Des* 24(30):3534–3542. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180924141407>
- Van C, Condro MC, Ko HH 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. *Neurobiol Dis* 160:105524. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105524>
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S et al (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61(3):283–357. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>
- Vereczki V, Koves K, Csaki A et al (2006) Distribution of hypothalamic, hippocampal and other limbic peptidergic neuronal cell bodies giving rise to retinopetal fibers: anterograde and retrograde tracing and neuropeptide immunohistochemical studies. *Neuroscience* 140(3):1089–1100. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.081>
- Wang Z, Shan W, Li H et al (2019) The PACAP-derived peptide MPAP0 facilitates corneal wound healing by promoting corneal epithelial cell proliferation and trigeminal ganglion cell axon regeneration. *Int J Biol Sci* 15(12):2676–2691. <https://doi.org/10.7150/ijbs.35630>
- Wang L, Zhang J, Li G et al (2021) The ADCYAP1R1 gene is correlated with posttraumatic stress disorder symptoms through diverse epistases in a traumatized Chinese population. *Front Psychiatry* 12:665599. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.665599>
- Wang ZY, Alm P, Håkanson R (1995) Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rabbit eye. *Neuroscience* 69(1):297–308. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00258-K](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00258-K)
- Wang ZY, Waldeck K, Grundemar L, Håkanson R (1997) Ocular inflammation induced by electroconvulsive treatment: contribution of nitric oxide and neuropeptides mobilized from C-fibres. *Br J Pharmacol* 120(8):1491–1496. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701083>
- Wojcieszak J, Zawilska JB (2014) PACAP38 and PACAP6-38 exert cytotoxic activity against human retinoblastoma Y79 cells. *J Mol Neurosci* 54(3):463–468. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0248-0>
- Yamaji K, Yoshitomi T, Usui S (2005) Action of biologically active peptides on monkey iris sphincter and dilator muscles. *Exp Eye Res* 80(6):815–820. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.12.020>
- Yan BM, Depoy EMG, Ahmad A, Nahas SJ (2021) Biomarkers in migraine. *Neurol India* 69(Supplement):S17–S24. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.315988>
- Zheng Y, Zhang L, Xie J, Shi L (2021) The emerging role of neuropeptides in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 13:646726. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.646726>
- Zhu H-X, Jin Y, Wei B-F (2021) Decreased serum pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) levels may reflect

disease severity in patients with non-traumatic osteonecrosis of femoral head. *Int J Pept Res Ther* 27(2):397–404. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10098-4>

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



Article

Protective Effects of Pituitary Adenylate-Cyclase-Activating Polypeptide on Retinal Vasculature and Molecular Responses in a Rat Model of Moderate Glaucoma

Evelin Patko¹, Edina Szabo¹, Alexandra Vaczy¹, Dorottya Molitor¹, Eniko Tari¹, Lina Li¹, Adrienne Csutak² , Gabor Toth^{3,4}, Dora Reglodi¹ and Tamas Atlasz^{1,5,*} 

¹ Department of Anatomy, ELKH-PTE PACAP Research Team, Medical School, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary

² Department of Ophthalmology, Clinical Centre, Medical School, University of Pecs, 7632 Pecs, Hungary

³ Department of Medical Chemistry, Albert Szent-Györgyi Medical School, University of Szeged, 6720 Szeged, Hungary

⁴ MTA-SZTE Biomimetic Systems Research Group, Albert Szent-Györgyi Medical School, University of Szeged, 6720 Szeged, Hungary

⁵ Department of Sportbiology, Faculty of Sciences, University of Pecs, 7624 Pecs, Hungary

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

Abstract: Despite the high probability of glaucoma-related blindness, its cause is not fully understood and there is no efficient therapeutic strategy for neuroprotection. Vascular factors have been suggested to play an important role in glaucoma development and progression. Previously, we have proven the neuroprotective effects of pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide (PACAP) eye drops in an inducible, microbeads model in rats that is able to reproduce many clinically relevant features of human glaucoma. In the present study, we examined the potential protective effects of PACAP1-38 on the retinal vasculature and the molecular changes in hypoxia. Ocular hypertension was induced by injection of microbeads into the anterior chamber, while control rats received PBS. PACAP dissolved in vehicle (1 µg/drop) or vehicle treatment was started one day after the injections for four weeks three times a day. Retinal degeneration was assessed with optical coherence tomography (OCT), and vascular and molecular changes were assessed by immunofluorescence labeling. HIF1-α and VEGF-A protein levels were measured by Western blot. OCT images proved severe retinal degeneration in the glaucomatous group, while PACAP1-38 eye drops had a retinoprotective effect. Vascular parameters were deteriorated and molecular analysis suggested hypoxic conditions in glaucoma. PACAP treatment exerted a positive effect against these alterations. In summary, PACAP could prevent the severe damage to the retina and its vasculature induced by ocular hypertension in a microbeads model.

Keywords: retina; glaucoma; PACAP; neuroprotection; vasculature



Citation: Patko, E.; Szabo, E.; Vaczy, A.; Molitor, D.; Tari, E.; Li, L.; Csutak, A.; Toth, G.; Reglodi, D.; Atlasz, T. Protective Effects of Pituitary Adenylate-Cyclase-Activating Polypeptide on Retinal Vasculature and Molecular Responses in a Rat Model of Moderate Glaucoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13256. <https://doi.org/10.3390/ijms241713256>

Academic Editor: Young-Hee Kang

Received: 30 July 2023

Revised: 14 August 2023

Accepted: 21 August 2023

Published: 26 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Glaucoma is a common optic neuropathy characterized by the progressive loss of retinal ganglion cells (RGCs) and the degeneration of their axons that build the optic nerve. Although genetic predisposition and age are significant risk factors for the disease, increased intraocular pressure (IOP) remains the only modifiable risk factor [1,2]. Current therapies are only able to delay RGC apoptosis by lowering IOP [3]. Agents, such as alpha adrenergic receptor blockers, beta-blockers, or prostaglandins, can only facilitate the outflow of the aqueous humor (AH) or decrease fluid production [3,4]. There is a strong need for accessory therapeutic treatments that can prevent neuronal apoptosis [5,6]. Although the exact underlying pathogenesis of neuronal apoptosis in glaucoma has not been fully clarified, evidence shows that oxidative stress, glial activation, and inflammatory reactions play a role in the pathomechanism [7–9]. Typical hallmarks of glaucomatous

retinopathy include the reduced thickness of the retinal nerve fiber layer (RNFL), greater cup to disk ratio, and characteristic visual field defects [1,10,11]. Considerable evidence shows a correlation between retinal vessel changes and reduced retinal thickness [12].

Dysregulation of blood flow with subsequent hypoxia has been suggested to have a connection to RGC death in glaucoma [13]. The “vascular theory” of glaucoma pathogenesis hypothesizes an association between optic nerve damage and retinal vasculature changes [12,14]. The retinal and optic nerve blood flow is a tightly autoregulated system, the disruption of which will lead to retinal injury [1,15,16].

Pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide with several biological functions. It has two biologically active forms: the 27 amino acid long PACAP1-27 and the longer PACAP1-38. As PACAP1-38 is the dominant form of the peptide, we applied the longer form in our experiments and refer to it simply as PACAP in the manuscript. It is the most conserved member of the secretin/glucagon/vasoactive intestinal peptide (VIP) superfamily [17–19]. PACAP elicits its actions through G-protein-coupled receptors, PAC1 and VPAC1/2, which can also bind VIP [19–21]. Soon after its discovery, it had become evident that PACAP has strong neuroprotective effects in various *in vivo* and *in vitro* models such as cerebral ischemia, Huntington’s disease, and Parkinson’s disease [22–25]. PACAP is now considered as a potent neuroprotective and cytoprotective peptide with potential therapeutic effects. In the retina, PACAP has been shown to be protective in several models of retinopathy. Our research team found that PACAP could protect against ischemia-induced changes and promote the anti-apoptotic pathways [26–28]. Furthermore, PACAP counteracts the damaging effects of UV light, oxidative stress, optic nerve transection, excitotoxins, hyperoxia/hypoxia, hyperglycemia, and endotoxins [17,27–31]. We have previously proved that PACAP is able to pass through the ocular barriers with an appropriate vehicle [32], and that PACAP, in the form of eye drops, is protective in a hypertensive glaucoma model [33]. Given the importance of vascular changes and hypoxia in glaucoma, the purpose of the present study was to further investigate the potential protective effect of PACAP eye drops on glaucomatous vasculature and on the subsequent hypoxia markers.

2. Results

2.1. Morphological Changes of the Retina

Retinal morphology was analyzed *in vivo* during the examination period. OCT retinal scan images were made one day before the microbead injection and at the end of the examination period. PACAP administration in PBS-injected animals did not result in any alterations in the retinal layers (Figure 1A). Retinal layers in the microbeads-injected vehicle-treated animals (Beads+S) showed signs of severe retinal degeneration compared to the PBS controls (Figure 1A,B). In the Beads+S group, a significant difference was detected in the RNFL thickness ($9.10 \pm 0.12 \mu\text{m}$) compared to the PBS-injected controls ($10.02 \pm 0.16 \mu\text{m}$) and to the PACAP-treated microbeads-injected group ($9.64 \pm 0.18 \mu\text{m}$). Also, the outer plexiform layer (OPL) thickness decreased ($5.00 \pm 0.14 \mu\text{m}$) in contrast to the control groups ($5.97 \pm 0.16 \mu\text{m}$) and the PACAP-treated group ($5.72 \pm 0.13 \mu\text{m}$). The photoreceptors showed a notable reduction compared to the control groups both in the inner segment (IS) ($8.03 \pm 0.12 \mu\text{m}$) and the outer segment (OS) ($19.82 \pm 0.76 \mu\text{m}$). A remarkable decrease was observed in the total thickness of the Beads+S group ($184.77 \pm 4.38 \mu\text{m}$) compared to the control groups ($203.44 \pm 2.51 \mu\text{m}$). PACAP treatment led to a significant amelioration in the total retinal thickness ($212.10 \pm 2.36 \mu\text{m}$) (Figure 1A,B). In summary, the microbeads-injected vehicle-treated group showed the typical signs of glaucoma with structural degeneration, while PACAP treatment could counteract the deteriorating effects of high IOP.

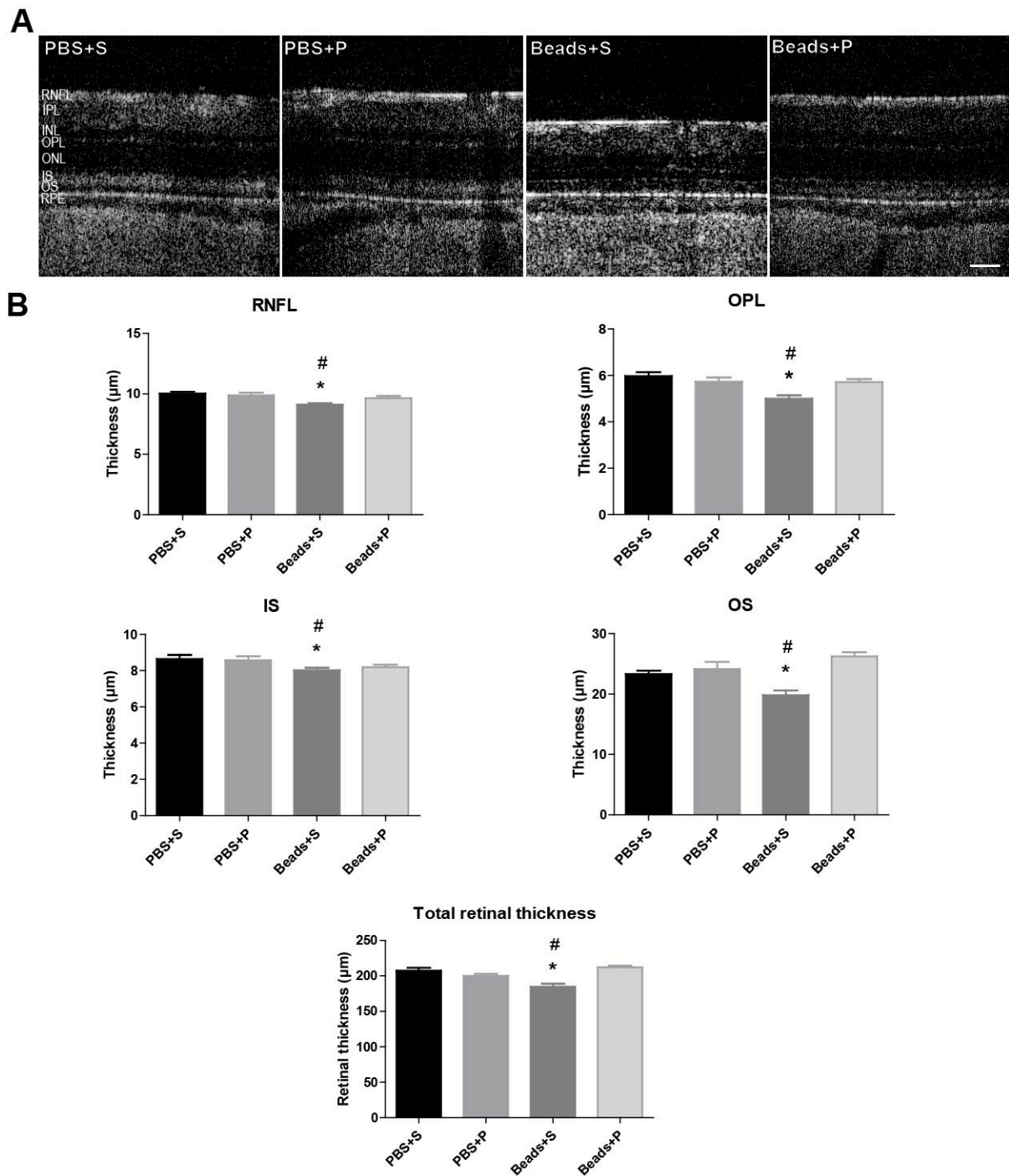


Figure 1. Optical coherence tomography (OCT) results. (A) Retinal OCT images demonstrating the normal retinal architecture in the control groups (PBS+S; PBS+P). In the glaucomatous vehicle-treated group (Beads+S), remarkable retinal changes can be observed. A significant amelioration of the retina was detected after PACAP1-38 topical administration (Beads+P). Scale bar: 50 μ m. (B) Significant differences could be seen in the Beads+S group compared to the control groups in the following layers: RNFL, OPL, IS, OS, total retinal thickness. Values are expressed as mean \pm SEM, analyzed by ANOVA and Fisher's post hoc test. * $p < 0.05$, Beads+S vs. PBS+S; # $p < 0.05$, Beads+S vs. Beads+P; (Abbreviations: RNFL: retinal nerve fiber layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer, IS: inner segment, OS: outer segment, RPE: retinal pigment epithelium; PBS: phosphate-buffered saline; S: Systane; P: PACAP1-38).

2.2. Vessel Analysis

The PBS-treated control groups did not show any remarkable vascular differences in either the vehicle-treated (PBS+S) or the PACAP-treated (PBS+P) groups (Figure 2A). Analysis of isolectin-B4-labeled retina vessels indicated a significant 20% reduction in the total vessel length in the Beads+S group compared to the control groups (Figure 2B). A major difference (19% decrease) was found in the total number of junctions in the Beads+S group compared to the PBS+S group (Figure 2B). The number of endpoints was reduced by 20% in the Beads+S group compared to the controls (Figure 2B). The lacunarity in the vehicle-treated glaucomatous group increased by approximately 20%, indicating a severely reduced vessel coverage of the inner retina (Figure 2B). In the case of the PACAP-treated (Beads+P) group, the vessel morphology was similar to that of the control groups (Figure 2A,B).

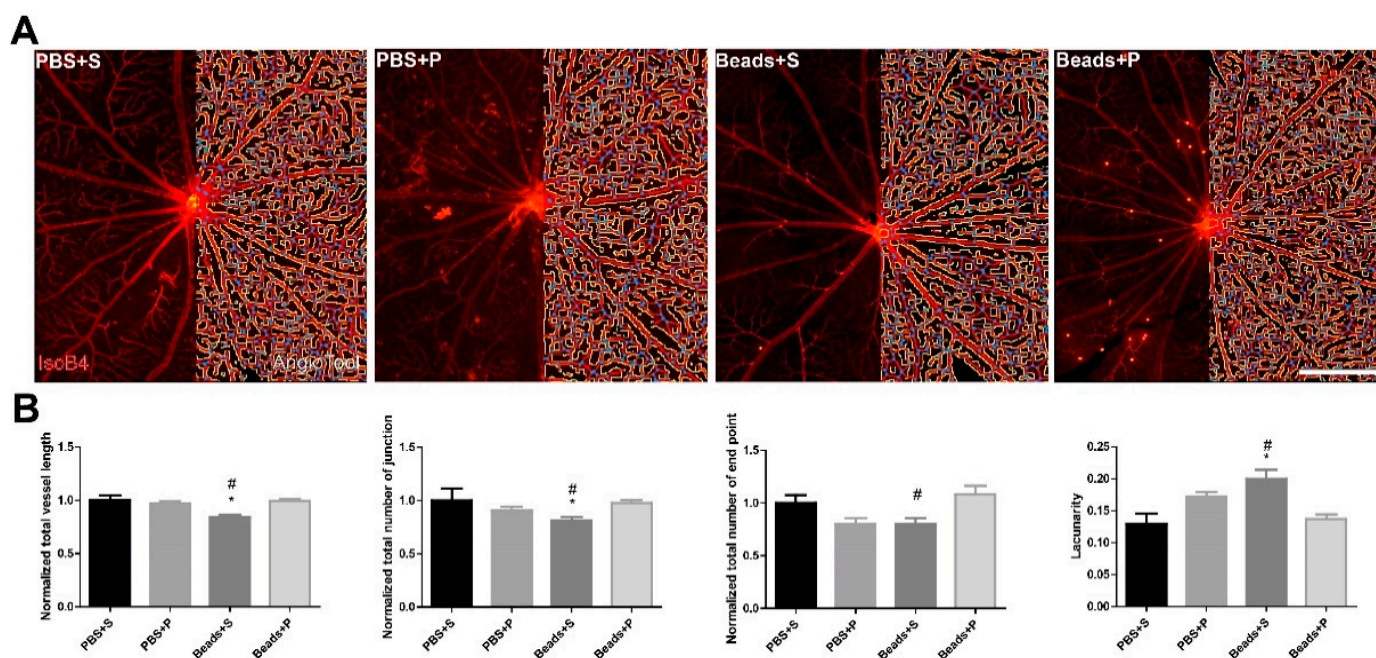


Figure 2. Assessment of retinal capillary network. (A) Whole-mount retinas were labelled with isolectin B4 and visualized to examine blood vessel morphology (left panel). Blood vessels were reconstructed and analyzed with AngioTool (right panel). Red color indicates the vessels, blue color the junction points, and yellow color the lacunarity. (B) Following the hypertensive conditions in the microbeads-injected vehicle-treated group (Beads+S), significant remodeling occurred, indicated by the decrease in the total vessel length, number of junctions, and end points and an increase in lacunarity, which indicates reduced vessel coverage of the retina. In the case of the PACAP1-38-treated glaucomatous group (Beads+P), these parameters remained similar to the control groups (PBS+S; PBS+P). Scale bar: 500 μ m. Values are expressed as mean \pm SEM, analyzed by ANOVA and Fisher's test. * $p < 0.05$, Beads+S vs. PBS+S; # $p < 0.05$, Beads+S vs. Beads+P; (Abbreviations: PBS: phosphate-buffered saline; S: Systane; P: PACAP1-38; IsoB4: isolectin B4 label).

2.3. Vascular Density Changes

Microvascular densities of PBS-injected control groups (PBS+S, PBS+P) were similar (Figure 3A). However, quantitative analysis of the vascular density showed a significant reduction (20%) in the Beads+S group compared to the controls (Figure 3B). In the Beads+P group, vascular density remained similar to the controls (Figure 3A,B).

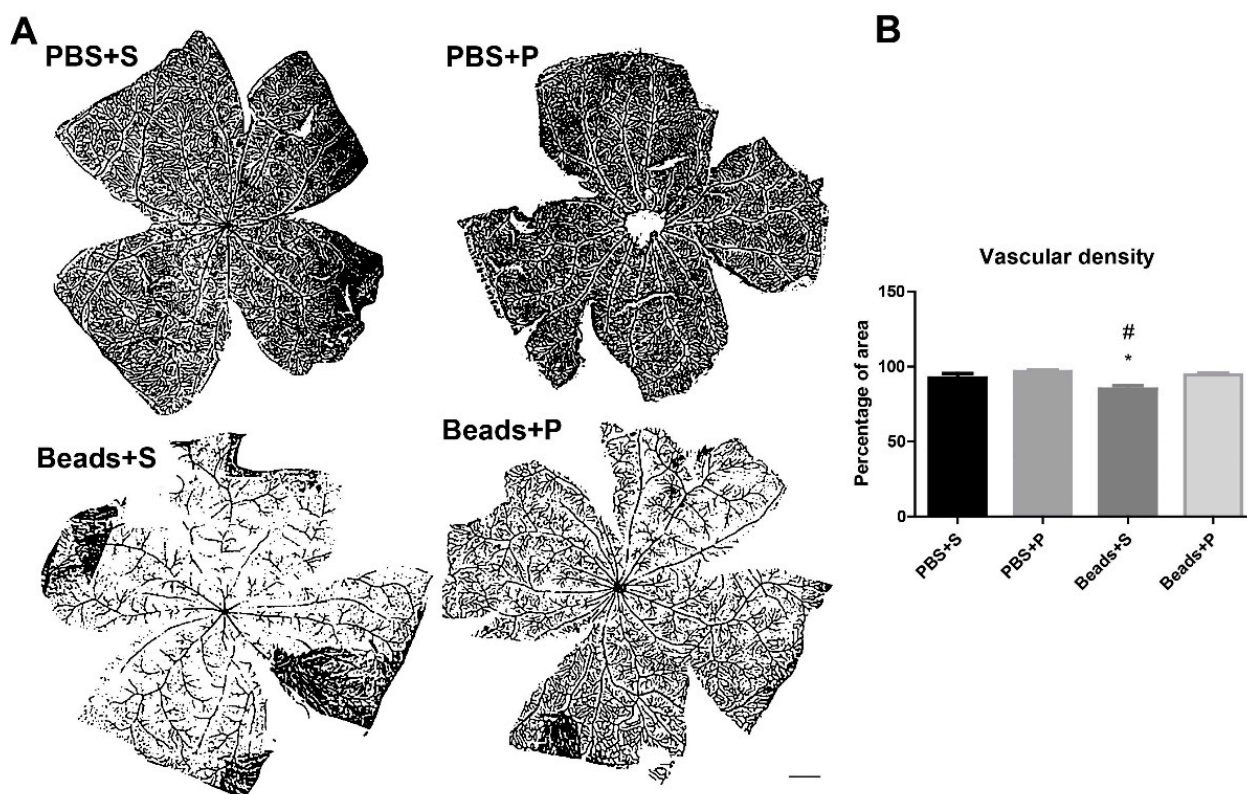


Figure 3. (A) Representative vascular images of the four groups. (B) Vascular density analysis suggested a significant decrease in the vessel distribution of the Beads+S group. In the PACAP1-38-treated glaucomatous group, the vascular density was similar to the control groups (PBS+S; PBS+P). Scale bar: 1000 μ m. Values are expressed as mean \pm SEM, analyzed by ANOVA and Fisher's test. * $p < 0.05$, Beads+S vs. PBS+S; # $p < 0.05$, Beads+S vs. Beads+P; (Abbreviations: PBS: phosphate-buffered saline; S: Systane; P: PACAP1-38).

2.4. Immunohistochemical Changes

The PBS-injected groups (PBS+S; PBS+P) did not show any notable immunofluorescent changes either in retinal HIF1- α or VEGF-A expressions (Figure 4A,B). In the case of the Beads+S group, an intense level of HIF1- α immunopositivity was observed compared to the control (PBS+S; PBS+P) groups (Figure 4A,B). A higher level of immunopositivity was detected in hypoxic conditions in the GCL and in the IPL. The Beads+P group had a slightly higher HIF1- α positivity within the GCL than the controls. The VEGF-A expression was also more intense in the vehicle-treated glaucomatous group, particularly within the GCL and RNFL. The PACAP-treated glaucomatous group had a lower level of VEGF-A signal compared to the Beads+S group.

2.5. Protein Level Changes

We aimed to further investigate and quantitatively evaluate the protein levels of HIF1- α , and VEGF-A by immunoblotting (Figure 5A,B). In the two control groups (PBS+S; PBS+P), the HIF1- α level was low. Eight weeks after the microbead injections, the Beads+S group showed a significant elevation in the HIF1- α level compared to the control and to the Beads+P group. In the PACAP-treated glaucomatous group, similarly to the immunofluorescence results, a lower level of HIF1- α expression was detected, which was not significantly different from the control groups. For the VEGF-A protein levels, a significant increase was found in the Beads+S group compared to the control groups. After PACAP administration, we did not observe an increase in the expression of VEGF-A protein.

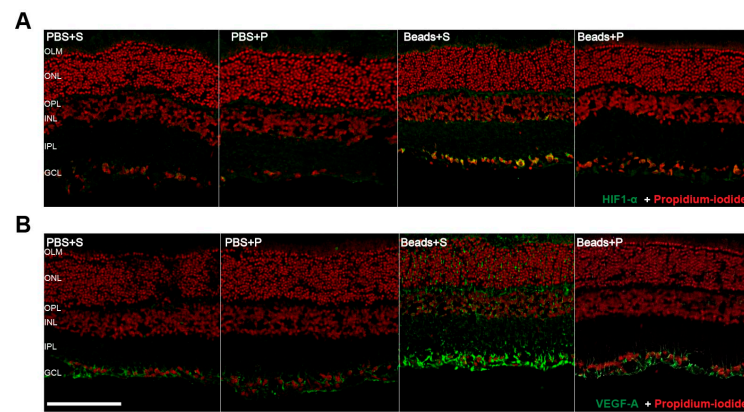


Figure 4. Representative vertical retinal sections (**A,B**) (retinal areas within 1 mm of the optic nerve) stained by HIF1- α (**A**) and VEGF-A (**B**) antibodies showing the effects of elevated IOP in the four examined groups (PBS+S, PBS+P, Beads+S, Beads+P). Increased IOP resulted in an elevation of HIF1- α (green) (**A**) and VEGF-A (green) (**B**) immunopositivity in the Beads+S group compared to the controls (PBS+S, PBS+P). We found that the increase in HIF1- α and VEGF-A expressions were counteracted by topical PACAP1-38 treatment (Beads+P). Scale bar: A, B: 100 μ m. (Abbreviations: PBS: phosphate-buffered saline; S: Systane; P: PACAP1-38; HIF1- α : hypoxia-inducing factor 1 α ; VEGF-A: vascular endothelial growth factor A, OLM: outer limiting membrane, ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GCL: ganglion cell layer).

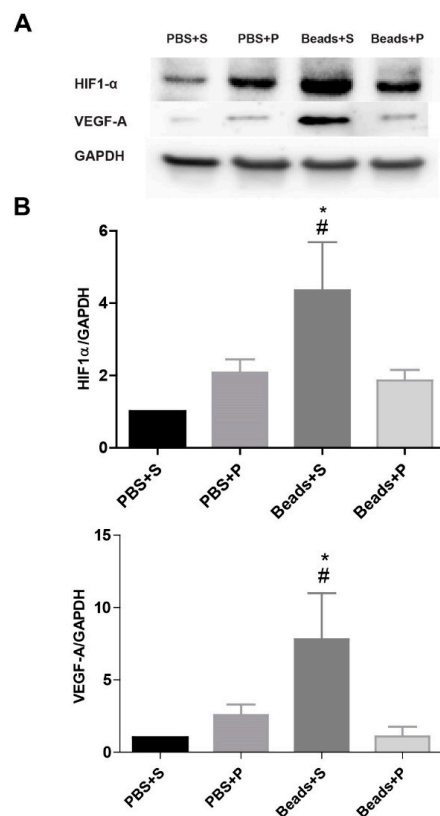


Figure 5. (A) Representative panels show the results of Western blot analysis of HIF1- α and VEGF-A from protein lysates of the four examination groups. The HIF1- α levels increased in the glaucomatous vehicle-treated (Beads+S) retina compared to controls. (B) Bar chart shows the relative changes of HIF1- α and VEGF-A in the four examination groups normalized to the internal control (GAPDH). Values are expressed as mean \pm SEM, analyzed by ANOVA and Fisher's test. * $p < 0.05$, Beads+S vs. PBS+S; # $p < 0.05$, Beads+S vs. Beads+P; (Abbreviations: PBS: phosphate-buffered saline; S: Systane; P: PACAP1-38, HIF1- α : hypoxia-inducible factor 1 α , VEGF-A: vascular endothelial factor-A).

3. Discussion

In this study, we investigated the protective effects of PACAP in a rat model of glaucoma from the perspective of vascular theory. Numerous studies have previously achieved the induction of ocular hypertension (OHT) by blocking AH outflow with microbeads [34–36]. In our previous study, we proved that PACAP eye drops had a neuroprotective and IOP-lowering effect in the hypertensive glaucoma model [33]. Recent studies have started to focus on different aspects of the pathomechanism of glaucoma, such as vascular disruption [37]. Here, we demonstrated that PACAP is able to decrease the hypoxic conditions and preserve the retinal vasculature in the hypertensive glaucoma model.

In numerous animal studies, it has been described that PACAP and its specific receptor PAC1 are expressed in several parts of the eye, especially in the corneal endothelium and epithelium, in the ciliary body, and in the retinal ganglion and Müller cells [25]. In our previous study, we investigated the distribution of PACAP and PAC1 receptors in human eyes. We found a distribution similar to animal studies; PACAP and its receptor were present in the corneal endothelium and epithelium, in parts of the vascular layer, especially in the ciliary body, in the retinal layers, and also in the optic nerve [38]. The ability of PACAP to pass through the ocular barriers in form of eye drops and the presence of the specific receptor in the ciliary body and iris provide the background for the receptor-binding of PACAP provided in form of eye drops [32].

In vivo imaging of retinal structures has been increasingly recognized as a valuable tool in the investigation of retinal degeneration in animal models [39–41]. Also, recent studies on glaucoma patients have confirmed that OCT enables the detection of structural damage in the RNFL. Histologically, the loss of photoreceptors has been observed in human and primate glaucoma [42–44]. A previous study has suggested that the thickness between the retinal pigment epithelium (RPE) and OS is associated with visual sensitivity in glaucoma [45]. In our microbeads model, the moderate hypertension induced morphological changes in several retinal layers (total retinal thickness, RNFL, OPL, IS, OS). These changes were similar to another SD glaucoma model induced by episcleral vein occlusion [45]. The segments of the photoreceptor layer showed a significant decrease, which is in accordance with our previous study where we suggested there to be functional damage of the photoreceptors [33]. In addition, electroretinography (ERG) studies have reported the involvement of both the outer and inner retina in glaucoma, with reduced and delayed a- and b-wave amplitudes [46]. These results are in accordance with our previous functional assessment data where we found significantly decreased a- and b-waves in glaucoma [33]. As was also described earlier, we could demonstrate that the outer retina is affected along with the expected thinning of the RNFL [46]. Glaucoma also affected the whole retinal thickness [33]. A decrease of 10% was observed in the RNFL layer of the Beads+S group compared to the PBS-treated groups. In another animal model of glaucoma, Lakshmanan and co-workers (2020) found an approximately 17% decrease in this layer 8 weeks after the occlusion of the episcleral vein [45]. Our present OCT results are also in accordance with our previous study. In the present study, we could also show the thinning between the OLM-ILM and the total retinal thickness. [33]. These findings in the rat model are comparable to those in human glaucoma in terms of reduced total retinal thickness in the early stage of the disease [47,48]. The application of PACAP eye drops could protect the whole retinal morphology in glaucoma and could also preserve the inner and outer layers of the retina.

The “vascular theory” of glaucoma pathogenesis hypothesizes the association of optic nerve damage and glaucoma with the changes in retinal vasculature. Microcirculatory changes have also been observed in glaucoma patients, and disrupted ocular blood flow leads to retinal injury [14]. The perfusion of the ONH depends on three key contributors: systemic blood pressure, IOP, and autoregulatory mechanisms. The retinal ganglion cells are supported metabolically and functionally by these three factors. Fluctuation of the IOP results in vascular dysregulation, which is worse than stably reduced circulation due to increased IOP. We observed compromised vascularization in the glaucomatous group, but

PACAP could prevent these changes [37,49]. Animal studies found similar changes in the retinal microvasculature in a rat magnetic bead model of ocular hypertensive glaucoma [37]. In a previous study, it was described that the retinal structure changes appeared after the decrease in the retinal blood flow in glaucoma patients. Our present results suggested the disruption of the retinal vasculature in the glaucomatous group. In the case of the PACAP eye drops, the vasculature was similar to the control groups.

The dysregulation of blood flow with subsequent hypoxia in glaucoma has been suggested to have a connection to retinal ganglion cell death [16]. Immunohistochemical studies described that HIF1- α levels were elevated in human post-mortem glaucomatous retinal tissue, which indicates hypoxic conditions [50]. Accordingly, our results demonstrated a similar change in the HIF1- α levels in retinal section. Also, this difference was supported by Western blot analysis. In the present study, we obtained results similar to Zhou and co-workers [51,52] that indicate HIF1- α was increased in the retinal tissues after IOP elevation. Elevated IOP is one of the most critical risk factors of glaucoma which can result in retinal ischemia [53]. In hypoxic conditions, HIF1- α is an important endogenous signaling molecule, contributing to physiologic changes in homeostasis [54]. A hypoxic microenvironment induces the activation of HIFs. Hypoxia-inducible factor-1 is an oxygen regulated transcription factor that controls oxygen homeostasis. In hypoxic conditions, HIF1- α regulates the activation of various genes, including glucose transporters, vascular endothelial growth factor, and other genes, which increases oxygen supply or increases metabolic adaptation to the hypoxic conditions. In the affected tissues, HIFs upregulate the production of some growth factors, mainly VEGF-A, which is produced in the eye, not only by RPE but also by ganglion cells, Müller glia, pericytes, and endothelial, glial, neural, and smooth muscle cells. VEGF-A acts on small blood vessels, inducing leakage of fluid in the retina and obliteration of capillaries, causing extra hypoxia and a further increase in VEGF-A production [55,56].

There are only few studies that have examined VEGF-A in glaucoma. VEGF-A levels were shown to be increased in the plasma of glaucoma patients when compared to healthy controls and in the aqueous humor of glaucoma patients compared to their plasma VEGF-A levels [57,58]. Despite these findings, neovascularization is not impacted in glaucoma and the exact role of VEGF-A has not been examined in the glaucomatous retina [59]. We showed the localization of VEGF-A within the retina, which was similar to that previously found, primarily localized to the RGC layer and the inner nuclear layer [59,60]. Previously, Maugeri and co-workers provided evidence that PACAP is able to decrease and inhibit HIF1- α and VEGF-A expression in a diabetic macular edema model [61]. Our present results confirmed elevated expression of HIF1- α and VEGF-A in glaucoma, and our findings suggest that PACAP is able to reduce the hypoxia-induced retinal and microvascular damage by decreasing HIF1- α and VEGF-A expression in glaucoma. Although VEGF-A is responsible for neovascularization, several studies found a lack of neovascularization in glaucoma, with an increased level of VEGF-A. This paradox question still needs to be answered.

It is well known that PACAP has anti-apoptotic, anti-inflammatory, and anti-oxidant effects, leading to neuroprotection [19]. It has been stated that PACAP eye drops can suppress the symptoms of dry eye syndrome. PACAP eye drops increase tear secretion, cAMP release, and aquaporin expression in the infraorbital lacrimal gland [62]. It has also been described that PACAP has a protective effect in hypoxic conditions in BCCAO-induced retinopathy, in diabetic macular edema, and in retinopathy of prematurity [32,61,63]. This list of retinopathies is now extended to glaucoma. Studies on animals and humans suggest the presence of dopamine receptors in the anterior segment of the eye, such as the ciliary body, as well as in the retina, and DA₃ receptors play a crucial role in the AH outflow. It is well known that PACAP has a neuroprotective effect on dopaminergic cells and PACAP is able to enhance the production and exocytosis of dopamine. Thus, the protective effect of PACAP might be related to the dopaminergic system [64,65]. In summary, our study provided evidence that PACAP, in a model of glaucoma, can preserve retinal structure,

decrease vascular damage, and decrease hypoxia markers. These results suggest that PACAP eye drops could be a potential future therapeutic agent in glaucoma treatment. However, further study is needed to understand the exact underlying mechanism behind the protective effect.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

This study was performed on adult male Sprague–Dawley (SD) rats ($n = 30$) weighing 300–500 g. Animals were maintained under a 12 h light/dark cycle and fed and watered ad libitum. All procedures were undertaken in accordance with the Animal Research Review Committee of the University of Pecs, Hungary (No. BA02/2000-50/2022) and directives of the National Ethical Council for Animal Research, the European Communities Council (86/609/EEC), and ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Rats were divided randomly into four experimental groups: (i) PBS + vehicle (Systane (S)) $n = 5$; (ii) PBS + PACAP1-38 (P) $n = 5$; (iii) microbeads + vehicle (S) $n = 10$; and (iv) microbeads + PACAP1-38 $n = 10$, referred to as PBS + S; PBS + P; Beads + S; and Beads + P, respectively.

4.2. Induction of IOP Elevation

Intraocular pressure elevation was induced using a microbeads model, detailed previously [33]. Animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine (90 mg/kg; Calypsol, Richter Gedeon, Budapest, Hungary) and xylazine (10 mg/kg; Sedaxylan, Dechra, Amsterdam, The Netherlands) injection. Before the microbeads injection, we applied Braurol solution (B. Braun Medical AG, Sempach, Switzerland) to prevent infections. The fluorescent (580/603 nm) polystyrene microbeads (FluoSpheres™ Polystyrene Microspheres; 10 μm Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) (3.6×10^6 beads/mL; 10 μL /injection) were introduced into the anterior chamber of the eyes by Hamilton syringe (33 G needle). After the injections, anti-inflammatory eye drops (Tobrex, 3 mg/mL; Alcon, Budapest, Hungary) were used to prevent inflammation and support corneal healing. The same volumes of PBS were injected into the control (normotensive) groups (Figure 6). The procedure was repeated two weeks after the first injection. During the examination period, IOP changes were recorded with a rebound tonometer (Tonolab, Icare, Vantaa, Finland).

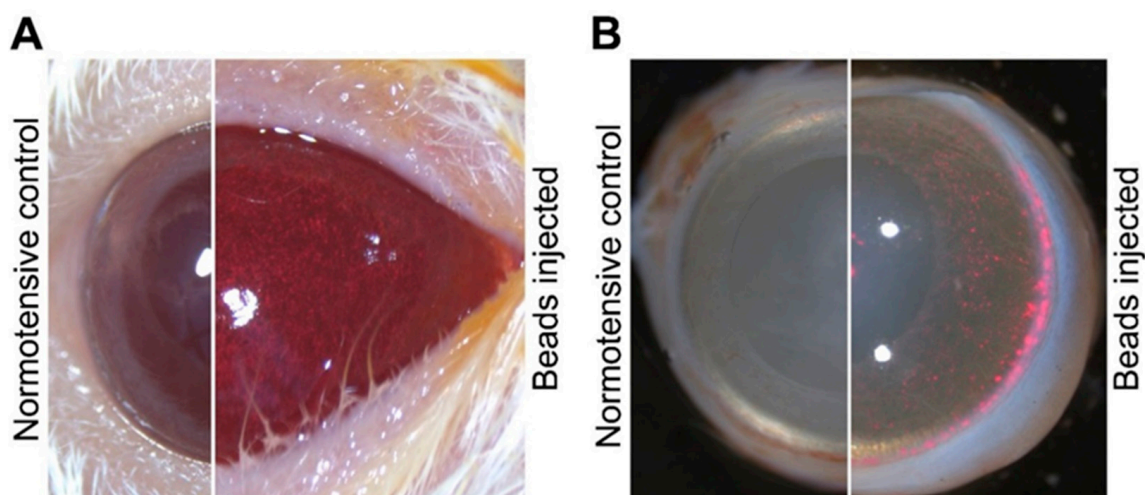


Figure 6. Distribution of microbeads in the anterior chamber. (A) Representative photograph immediately after the PBS (normotensive group) or microbeads injection. After the injection, the red microbeads start to float towards the iridocorneal angle. (B) Representative photograph 8 weeks after the microbeads or PBS (normotensive group) injection. Microbeads are driven into the drainage structures of the eye via the natural flow of the aqueous humor.

4.3. Eye Drops Treatment

One day after the first injections, the eyes were treated with Systane (vehicle) solution (S) (Alcon, Budapest, Hungary) or PACAP (P) eye drops (1 µg/drop) (PACAP1-38 was synthesized at the Department of Medical Chemistry, University of Szeged, Szeged, Hungary). Rats were treated three times a day with one drop for 4 consecutive weeks.

4.4. Optical Coherence Tomography Examination and Morphological Analysis

Non-invasive, in vivo imaging was implemented with Optical Coherence Tomography (OCT). This technique was designed to acquire high-resolution images of the anterior chamber or the retina in real-time. Rats were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg; Calypsol, Richter Gedeon, Budapest, Hungary) and xylazine (10 mg/kg; Sedaxylan, Dechra, The Netherlands). Pupils were dilated with topically administered eye drops of 0.01% atropine. During the procedure, we applied artificial tear (Systane solution, Alcon, Budapest, Hungary) to protect the corneal surface. OCT imaging was performed 8 weeks after the first microbeads injections. Radial volumetric images, centered on the optic nerve, were acquired from both eyes with SD-OCT, and were analyzed and evaluated by the Bioptigen Diver program (Spectral Domain Optical Coherence Tomography (Bioptigen, Durham, NC, USA)).

4.5. Immunohistochemistry

Rats were sacrificed 8 weeks after the microbeads injections. Eyes ($n = 20$) were dissected in 0.1 M PBS and fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 2 h at room temperature followed by washing in 0.1 M PBS for one hour. Then, eyecups were immersed into a 10–20–30% sucrose solution and embedded in O.C.T. compound-mounting media (Tissue-Tek Cryo, Leica, Deer Park, IL, USA). Thin sections were made (15–17 µm) on gelatin-coated slides with cryostat (LeicaCM1950, BioMarker, Budapest, Hungary) and processed further for immunohistochemistry.

After rehydration with 0.1 M PBS, sections were blocked for 2 h in 5% normal donkey serum, 3% bovine serum in PBS 0.3% Triton™ X-100 (PBST) at room temperature and then incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-HIF1-α (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) diluted in 1:200 in antibody-diluting buffer or mouse anti-VEGF-A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluted in 1:200 in antibody-diluting buffer. Immunoreactivity was detected with Alexa Fluor-488, donkey anti-mouse (Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, UK) and Alexa Fluor-488, donkey anti-rabbit (Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, UK) diluted 1:800 in PBST.

After, the secondary antibody sections were washed in 0.1 M PBS for one hour. Cell nuclei were stained with propidium iodine (PI). Glass slides were mounted with Fluoroshield (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary). Microphotographs were made with a Nikon Eclipse Ti2-E microscope with Nikon C2 confocal detector.

4.6. Retinal Whole-Mounts

Animals were sacrificed 8 weeks after the microbeads injections. Eyes ($n = 24$) were dissected in 0.1 M PBS and fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1 M PB for 2 h at room temperature followed by washing 0.1 M PBS for one hour. After the washing steps, we removed the retina from the eyecup and made four small cuts. To stain the retinal vasculature, we placed the retinas in a well plate and added 500 µL of fluoresceinated isolectin solution (Isolectin GS-IB4 from *Grifonia simplicifolia*, Alexa Fluor568 conjugate; Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). After an overnight rocking incubation in lectin solution at room temperature, retinas were rinsed 6 times in PBS. The labeled, isolated retinas were placed and unfolded on a glass slide. To avoid later bleaching of the fluorophores, we mounted the slides with Fluoroshield (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) mounting medium. Images were made of the retinal whole-mounts with a Nikon Eclipse 80i epifluorescence microscope.

4.7. Vascular Analysis

For retinal blood vessel analysis, lectin-stained retina images were captured with a Nikon Eclipse 80i epifluorescence microscope (4× magnification, approximately 2500 × 2500 area, 150 μm/pixel). Images were thresholded and corrected with Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA). Whole retinas were analyzed with the use of AngioTool. The following vessel morphological parameters were measured: total blood vessel length, total number of junctions, total number of end points, and lacunarity (the distribution of gap area surrounding the vessels). The following parameters were used in the program: blood vessel diameter (2–30 μm) and pixel intensity (0–255). Vascular density was measured using the ImageJ Vessel Analysis plugin.

4.8. Western Blot Analysis

For Western blot analysis, retinas were removed 8 weeks after the first injections from each separate group. Samples ($n = 16$) were processed for Western blot analysis as described earlier [31]. Protein concentrations were determined using Bradford reagents. Membranes were blocked in EveryBlot Blocking Buffer (BioRad; Hercules, CA, USA) for 5 min at room temperature and were probed at room temperature with anti-HIF1- α (1:2000; Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) and anti-VEGF-A (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) for 1 h. Non-phosphorylated anti-GAPDH (1:20000; Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA) was used as internal control. Membranes were washed in Tris-buffered saline (TBS; pH = 7.5) containing 0.2% Tween. Anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000; BioRad; Hercules; CA, USA) was diluted in EveryBlot Blocking Buffer (BioRad; Hercules; CA, USA) and the membranes were incubated for 1 h at room temperature. The antibody–antigen complexes were visualized by means of enhanced chemiluminescence. For quantification of blots, band intensities were quantified by the NIH ImageJ program (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

4.9. Statistical Analysis

Data are expressed as average \pm standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons were made using two-way ANOVA followed by Fischer's post hoc analysis (OCT results; AngioTool vessel analysis; vessel density; Western blot). Differences $p < 0.05$ were considered significant.

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

Funding: This research was funded by the National Research, Development and Innovation Fund FK129190, K135457; PTE AOK-TANDEM, ÚNKP-22-4-I-PTE-1401; ÚNKP-22-3-I-PTE-1660; ÚNKP-22-3-II-PTE-1402, National Brain Research Program NAP3.0; ELKH-TKI14016; GINOP-2.3.2-15-2016-00050 "PEPSYS"; and Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities in Hungary: 20765/3/2018/FEKUTSTRAT, 2020-4.1.1-TKP2020—FIKP III. Project No. TKP2020-IKA-08 has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme, TKP2021-EGA-32.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Animal Research Review Committee of the University of Pecs, Hungary (Protocol code: No. BA02/2000-50/2022, approval date: 09.08.2022) and directives of the National Ethical Council for Animal Research, the European Communities Council (86/609/EEC).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The research was performed in collaboration with the Nano-Bio-Imaging core facility at the Szentagothai Research Centre of the University of Pecs.

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

References

1. Wareham, L.K.; Calkins, D.J. The Neurovascular Unit in Glaucomatous Neurodegeneration. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 452. [[CrossRef](#)]
2. Mantravadi, A.V.; Vadhar, N. Glaucoma. *Prim. Care Clin. Off. Pract.* **2015**, *42*, 437–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Schmidl, D.; Schmetterer, L.; Garhöfer, G.; Popa-Cherecheanu, A. Pharmacotherapy of Glaucoma. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2015**, *31*, 63–77. [[CrossRef](#)]
4. Casson, R.J. Medical therapy for glaucoma: A review. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **2022**, *50*, 198–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kaufman, P.L.; Rasmussen, C.A. Advances in glaucoma treatment and management: Outflow drugs. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2012**, *53*, 2495–2500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Surgucheva, I.; Shestopalov, V.I.; Surguchov, A. Effect of gamma-synuclein silencing on apoptotic pathways in retinal ganglion cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 36377–36385. [[CrossRef](#)]
7. Chong, R.S.; Martin, K.R. Glial cell interactions and glaucoma. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2015**, *26*, 73–77. [[CrossRef](#)]
8. Kaur, C.; Rathnasamy, G.; Foulds, W.S.; Ling, E.-A. Cellular and Molecular Mechanisms of Retinal Ganglion Cell Death in Hypoxic-Ischemic Injuries. *J. Neurol. Exp. Neurosci.* **2015**, 10–19. [[CrossRef](#)]
9. Yukita, M.; Machida, S.; Nishiguchi, K.M.; Tsuda, S.; Yokoyama, Y.; Yasuda, M.; Maruyama, K.; Nakazawa, T. Molecular, anatomical and functional changes in the retinal ganglion cells after optic nerve crush in mice. *Doc. Ophthalmol.* **2015**, *130*, 149–156. [[CrossRef](#)]
10. Pagliara, M.M.; Lepore, D.; Balestrazzi, E. The role of OCT in glaucoma management. *Prog. Brain Res.* **2008**, *173*, 139–148.
11. He, S.; Stankowska, D.L.; Ellis, D.Z.; Krishnamoorthy, R.R.; Yorio, T. Targets of neuroprotection in glaucoma. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2018**, *34*, 85–106. [[CrossRef](#)]
12. Chan, K.K.W.; Tang, F.; Tham, C.C.Y.; Young, A.L.; Cheung, C.Y. Retinal vasculature in glaucoma: A review. *BMJ Open Ophthalmol.* **2017**, *1*, e000032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ichhpujani, P. (Ed.) *Glaucoma; Current Practices in Ophthalmology*; Springer: Singapore, 2019.
14. Flammer, J.; Costa, V.P.; Orzalesi, N.; Krieglstein, K.; Serra, L.M.; Renard, J. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* **2002**, *21*, 359–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Cherecheanu, A.P.; Garhofer, G.; Schmidl, D.; Werkmeister, R.; Schmetterer, L. Ocular perfusion pressure and ocular blood flow in glaucoma. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13*, 36–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Harris, A. Dysfunctional regulation of ocular blood flow: A risk factor for glaucoma? *Clin. Ophthalmol.* **2008**, *2*, 849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Atlasz, T.; Vaczy, A.; Werling, D.; Kiss, P.; Tamas, A.; Kovacs, K.; Fabian, E.; Kvarik, T.; Mammel, B.; Danyadi, B.; et al. Protective effects of PACAP in the retina. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP*; Reglodi, D., Tamas, A., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; pp. 501–527.
18. Miyata, A.; Arimura, A.; Dahl, R.R.; Minamino, N.; Uehara, A.; Jiang, L.; Culler, M.D.; Coy, D.H. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *164*, 567–574. [[CrossRef](#)]
19. Vaudry, D.; Falluel-Morel, A.; Bourgault, S.; Basille, M.; Burel, D.; Wurtz, O.; Fournier, A.; Chow, B.K.C.; Hashimoto, H.; Galas, L.; et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 Years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* **2009**, *61*, 283–357. [[CrossRef](#)]
20. Amin, F.M.; Schytz, H.W. Transport of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide across the blood-brain barrier: Implications for migraine. *J. Headache Pain* **2018**, *19*, 4–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Vaudry, D.; Gonzalez, B.J.; Basille, M.; Yon, L.; Fournier, A.; Vaudry, H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: From structure to functions. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 269–324.
22. Soles-Tarres, I.; Cabezas-Llobet, N.; Vaudry, D.; Xifró, X. Protective Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Peptide Against Cognitive Decline in Neurodegenerative Diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*, 221. [[CrossRef](#)]
23. Yang, R.; Jiang, X.; Ji, R.; Meng, L.; Liu, F.; Chen, X.; Xin, Y. Therapeutic potential of PACAP for neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2015**, *20*, 265–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wada, N.; Shioda, S.; Hirabayashi, T.; Nakamachi, T.; Takenoya, F.; Seki, T.; Wada, N.; Hirabayashi, T.; Seki, T.; Nakamachi, T.; et al. Pleiotropic and retinoprotective functions of PACAP. *Anat. Sci. Int.* **2016**, *91*, 313–324.
25. Nakamachi, T.; Matkovits, A.; Seki, T.; Shioda, S. Distribution and protective function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the retina. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2012**, *3*, 1–10. [[CrossRef](#)]
26. Werling, D.; Reglodi, D.; Banks, W.A.; Salameh, T.S.; Kovacs, K.; Kvarik, T.; Vaczy, A.; Kovacs, L.; Mayer, F.; Danyadi, B.; et al. Ocular Delivery of PACAP1-27 Protects the Retina From Ischemic Damage in Rodents. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2016**, *57*, 6683. [[CrossRef](#)]

27. Vaczy, A.; Reglodi, D.; Somoskeoy, T.; Kovacs, K.; Lokos, E.; Szabo, E.; Tamas, A.; Atlasz, T. The Protective Role of PAC1-Receptor Agonist Maxadilan in BCCAO-Induced Retinal Degeneration. *J. Mol. Neurosci.* **2016**, *60*, 186–194. [[CrossRef](#)]
28. Maugeri, G.; D'Amico, A.G.; Bucolo, C.; D'Agata, V. Protective effect of PACAP-38 on retinal pigmented epithelium in an in vitro and in vivo model of diabetic retinopathy through EGFR-dependent mechanism. *Peptides* **2019**, *119*, 170108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Atlasz, T.; Szabadfi, K.; Kiss, P.; Marton, Z.; Griecs, M.; Hamza, L.; Gaal, V.; Biro, Z.; Tamas, A.; Hild, G.; et al. Effects of PACAP in UV-A radiation-induced retinal degeneration models in rats. *J. Mol. Neurosci.* **2011**, *43*, 51–57. [[CrossRef](#)]
30. Maugeri, G.; D'Amico, A.G.; Saccone, S.; Federico, C.; Rasà, D.M.; Caltabiano, R.; Broggi, G.; Giunta, S.; Musumeci, G.; D'Agata, V. Effect of PACAP on Hypoxia-Induced Angiogenesis and Epithelial-Mesenchymal Transition in Glioblastoma. *Biomedicines* **2021**, *9*, 965. [[CrossRef](#)]
31. Vaczy, A.; Kovari, P.; Kovacs, K.; Farkas, K.; Szabo, E.; Kvarik, T.; Kocsis, B.; Fulop, B.; Atlasz, T.; Reglodi, D. Protective Role of Endogenous PACAP in Inflammation-induced Retinal Degeneration. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *24*, 3534–3542. [[CrossRef](#)]
32. Werling, D.; Banks, W.; Salameh, T.; Kvarik, T.; Kovacs, L.; Vaczy, A.; Szabo, E.; Mayer, F.; Varga, R.; Tamas, A.; et al. Passage through the Ocular Barriers and Beneficial Effects in Retinal Ischemia of Topical Application of PACAP1-38 in Rodents. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Szabo, E.; Patko, E.; Vaczy, A.; Molitor, D.; Csutak, A.; Toth, G.; Reglodi, D.; Atlasz, T. Retinoprotective Effects of PACAP Eye Drops in Microbead-Induced Glaucoma Model in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sappington, R.M.; Carlson, B.J.; Crish, S.D.; Calkins, D.J. The microbead occlusion model: A paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51*, 207–216. [[CrossRef](#)]
35. Mukai, R.; Park, D.H.; Okunuki, Y.; Hasegawa, E.; Klokman, G.; Kim, C.B.; Krishnan, A.; Gregory-Ksander, M.; Husain, D.; Miller, J.W.; et al. Mouse model of ocular hypertension with retinal ganglion cell degeneration. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0208713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Morgan, J.E.; Tribble, J.R. Microbead models in glaucoma. *Exp. Eye Res.* **2015**, *141*, 9–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tribble, J.R.; Otmani, A.; Kokkali, E.; Lardner, E.; Morgan, J.E.; Williams, P.A. Retinal Ganglion Cell Degeneration in a Rat Magnetic Bead Model of Ocular Hypertensive Glaucoma. *Transl. Vis. Sci. Technol.* **2021**, *10*, 21. [[CrossRef](#)]
38. Patko, E.; Szabo, E.; Toth, D.; Tornoczky, T.; Bosnyak, I.; Vaczy, A.; Atlasz, T.; Reglodi, D. Distribution of PACAP and PAC1 Receptor in the Human Eye. *J. Mol. Neurosci.* **2022**, *72*, 2176–2187. [[CrossRef](#)]
39. Ruggeri, M.; Wehbe, H.; Jiao, S.; Gregori, G.; Jockovich, M.E.; Hackam, A.; Duan, Y.; Puliafito, C.A. In vivo three-dimensional high-resolution imaging of rodent retina with spectral-domain optical coherence tomography. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 1808–1814. [[CrossRef](#)]
40. Guo, L.; Normando, E.M.; Nizari, S.; Lara, D.; Cordeiro, M.F. Tracking Longitudinal Retinal Changes in Experimental Ocular Hypertension Using the cSLO and Spectral Domain-OCT. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51*, 6504. [[CrossRef](#)]
41. Kim, K.H.; Puoris'haag, M.; Maguluri, G.N.; Umino, Y.; Cusato, K.; Barlow, R.B.; de Boer, J.F. Monitoring mouse retinal degeneration with high-resolution spectral-domain optical coherence tomography. *J. Vis.* **2008**, *8*, 17. [[CrossRef](#)]
42. Matsuura, M.; Fujino, Y.; Kanamoto, T.; Murata, H.; Yanagisawa, M.; Hirasawa, K.; Inoue, T.; Shoji, N.; Inoue, K.; Yamagami, J.; et al. Improving the structure-function relationship in glaucomatous and normative eyes by incorporating photoreceptor layer thickness. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10450. [[CrossRef](#)]
43. Nork, T.M.; Ver Hoeve, J.N.; Poulsen, G.L.; Nickells, R.W.; Davis, M.D.; Weber, A.J.; Vaegan, S.H.; Lemley, H.L.; Millecchia, L.L. Swelling and loss of photoreceptors in chronic human and experimental glaucomas. *Arch. Ophthalmol.* **2000**, *118*, 235–245. [[CrossRef](#)]
44. Fan, N.; Huang, N.; Lam, D.S.C.; Leung, C.K. Measurement of Photoreceptor Layer in Glaucoma: A Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Study. *J. Ophthalmol.* **2011**, *2011*, 1–5. [[CrossRef](#)]
45. Lakshmanan, Y.; Wong, F.S.Y.; Zuo, B.; Bui, B.V.; Chan, H.H.-L. Longitudinal outcomes of circumlimbal suture model-induced chronic ocular hypertension in Sprague-Dawley albino rats. *Graefé's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2020**, *258*, 2715–2728. [[CrossRef](#)]
46. Velten, I.M. The a-wave of the dark adapted electroretinogram in glaucomas: Are photoreceptors affected? *Br. J. Ophthalmol.* **2001**, *85*, 397–402. [[CrossRef](#)]
47. Asrani, S.; Challa, P.; Herndon, L.; Lee, P.; Stinnett, S.; Allingham, R.R. Correlation among Retinal Thickness, Optic Disc, and Visual Field in Glaucoma Patients and Suspects: A Pilot Study. *J. Glaucoma* **2003**, *12*, 119–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sathyan, P.; Agarwal, P.; Sharma, A.; Saini, V. Macular Thickness Variability in Primary Open Angle Glaucoma Patients using Optical Coherence Tomography. *J. Curr. Glaucoma Pract.* **2014**, *8*, 10–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Li, Y.; Wang, Q.; Muir, E.R.; Kiel, J.W.; Duong, T.Q. Retinal Vascular and Anatomical Features in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Curr. Eye Res.* **2020**, *45*, 1422–1429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Tezel, G. Hypoxia-Inducible Factor 1 α in the Glaucomatous Retina and Optic Nerve Head. *Arch. Ophthalmol.* **2004**, *122*, 1348. [[CrossRef](#)]
51. Zhou, J.; Chen, F.; Yan, A.; Xia, X. Role of mammalian target of rapamycin in regulating HIF-1 α and vascular endothelial growth factor signals in glaucoma. *Arch. Physiol. Biochem.* **2021**, *127*, 44–50. [[CrossRef](#)]
52. Ergorul, C.; Ray, A.; Huang, W.; Wang, D.Y.; Ben, Y.; Cantuti-Castelvetri, I.; Grosskreutz, C.L. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and some HIF-1 target genes are elevated in experimental glaucoma. *J. Mol. Neurosci.* **2010**, *42*, 183–191. [[CrossRef](#)]
53. Mathew, B.; Ravindran, S.; Liu, X.; Torres, L.; Chennakesavalu, M.; Huang, C.-C.; Feng, L.; Zelka, R.; Lopez, J.; Sharma, M.; et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles and retinal ischemia-reperfusion. *Biomaterials* **2019**, *197*, 146–160. [[CrossRef](#)]

54. Liang, X.; Liu, X.; Lu, F.; Zhang, Y.; Jiang, X.; Ferriero, D.M. HIF1 α Signaling in the Endogenous Protective Responses after Neonatal Brain Hypoxia-Ischemia. *Dev. Neurosci.* **2018**, *40*, 617–626. [[CrossRef](#)]
55. Aiello, L.P.; Wong, J.S. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int. Suppl.* **2000**, *58*, 113–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wang, Y.; Nakayama, M.; Pitulescu, M.E.; Schmidt, T.S.; Bochenek, M.L.; Sakakibara, A.; Adams, S.; Davy, A.; Deutsch, U.; Lüthi, U.; et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* **2010**, *465*, 483–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Lip, P.L.; Felmeden, D.C.; Blann, A.D.; Matheou, N.; Thakur, S.; Cunliffe, I.A.; Lip, G.Y.H. Plasma vascular endothelial growth factor, soluble VEGF receptor FLT-1, and von Willebrand factor in glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* **2002**, *86*, 1299–1302. [[CrossRef](#)]
58. Huang, W.; Gao, X.; Chen, S.; Li, X.; Zhang, X.; Zhang, X. Vascular Endothelial Growth Factor is Increased in Aqueous Humor of Acute Primary Angle-Closure Eyes. *J. Glaucoma* **2016**, *25*, e647–e651. [[CrossRef](#)]
59. Ergorul, C.; Ray, A.; Huang, W.; Darland, D.; Luo, Z.K.; Grosskreutz, C.L. Levels of vascular endothelial growth factor-A165b (VEGF-A165b) are elevated in experimental glaucoma. *Mol. Vis.* **2008**, *14*, 1517–1524.
60. Ozaki, H.; Yu, A.Y.; Della, N.; Ozaki, K.; Luna, J.D.; Yamada, H.; Hackett, S.F.; Okamoto, N.; Zack, D.J.; Semenza, G.L.; et al. Hypoxia inducible factor-1 α is increased in ischemic retina: Temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1999**, *40*, 182–189.
61. Maugeri, G.; D’Amico, A.G.; Saccone, S.; Federico, C.; Cavallaro, S.; D’Agata, V. PACAP and VIP Inhibit HIF-1 α -Mediated VEGF Expression in a Model of Diabetic Macular Edema. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *232*, 1209–1215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Nakamachi, T.; Ohtaki, H.; Seki, T.; Yofu, S.; Kagami, N.; Hashimoto, H.; Shintani, N.; Baba, A.; Mark, L.; Lanekoff, I.; et al. PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12034. [[CrossRef](#)]
63. Kvarik, T.; Reglodi, D.; Werling, D.; Vaczy, A.; Kovari, P.; Szabo, E.; Kovacs, K.; Hashimoto, H.; Ertl, T.; Gyarmati, J.; et al. The Protective Effects of Endogenous PACAP in Oxygen-Induced Retinopathy. *J. Mol. Neurosci.* **2021**, *12*, 2546–2557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bucolo, C.; Leggio, G.M.; Drago, F.; Salomone, S. Dopamine outside the brain: The eye, cardiovascular system and endocrine pancreas. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *203*, 107392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Bucolo, C.; Leggio, G.M.; Maltese, A.; Castorina, A.; D’Agata, V.; Drago, F. Dopamine-3 receptor modulates intraocular pressure: Implications for glaucoma. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 680–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.