

A PACAP és specifikus receptorának előfordulása, valamint protektív hatásának igazolása

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

1. Bevezetés

1.1. Látószerv

A szem fejlődésének kezdete nagyjából az embrionális időszak harmadik hetére tehető. A retina, a sugártest, az iris és a látóideg kialakulása a neuroepitheliumból, a lencse, a cornea epithelium és a szemhéjak fejlődése pedig a felszíni ectodermából indul. A mesenchymából indul meg a sclera, a cornea endothelium és stroma, az erek, az izmok és az üvegtestet fejlődése. A látószervet, mint összetett érzékszervet a szemgolyó és a járulékos struktúrái alkotják. A szemgolyó három szerkezeti rétegből épül fel. A külső tunica fibrosa magában foglalja a sclerát és a corneát, a középső tunica vasculosa, amely az irist, a sugártest és a choroideát tartalmazza, illetve a szemgolyó legbelső rétege, a retina. A szemgolyó elülső szegmensében megkülönböztetjük az elülső és a hátsó csarnokot, amelyeket az iris választ el egymástól és a sugártest nyúlványai által termelt csarnokvíz köti össze. A csarnokvíz természetes keringése, amely a hátsó csarnokból az elülső csarnok felé halad, táplálja az elülső szegmens avaszkuláris struktúráit. A csarnokvíz elvezetése a trabekuláris hálózaton keresztül, a Schlemm-csatornán és az aqueous vénákon át, a szem vénás rendszerében valósul meg. A hátsó csarnok mögött található teret az üvegtest tölti ki. A gerincesek retinájában tíz szövettani réteget különböztetünk meg. A rétegek belülről kifelé:

- Belső határmembrán (ILM) – a Müller sejtek végtalpaiból létrejövő határhártya
- Idegrostok rétege (NFL) – a retina ganglionsejtek nyúlványi által alkotott rostos réteg
- Ganglionsejtek rétege (GCL) – a ganglionsejtek sejttestjeit tartalmazó réteg
- Belső rostos réteg (IPL) – egymáshoz kapcsolódó horizontális-, amakrin-, bipolaris- és ganglionsejtek nyúlványai ebben a rétegben szinaptizálnak
- Belső magvas réteg (INL) - horizontális-, amakrin-, bipolaris- és Müller sejtek sejttestjeit tartalmazó réteg
- Külső rostos réteg (OPL) – a fotoreceptorok és a hozzájuk kapcsolódó horizontális-, amakrin- és bipolaris sejtek nyúlványai ebben a rétegben szinaptizálnak
- Külső magvas réteg (ONL) – fotoreceptorok (csapok és pálcikák) sejttestjeit tartalmazó réteg
- Külső határmembrán (OLM) – a Müller sejtek külső nyúlványai által alkotott réteg
- Fotoreceptorok rétege (PL) – a fotoreceptorok külső (OS) és belső (IS) szegmensét tartalmazó réteg
- Pigment epithelium (PE) – retina legkülső rétege

A retina vérellátását az arteria centralis retinae és a hátsó ciliáris artériákat alkotó arteria ophthalmica biztosítja. A retina külső rétegeinek táplálásában a choroidea tölt be jelentős szerepet, míg a retina belső rétegeinek vérellátását a retina saját erei adják. A retinális érplexusokat elhelyezkedésük alapján felszíni, középső, illetve mély vascularis plexusra oszthatjuk. A humán és rágcsáló szem felépítése közel megegyezik, így szemészeti kutatásokban kiválóan alkalmazható modellként szolgálnak. Jelentős különbség, hogy a rágcsálóknak pálcika-domináns látással, arányaiban nagyobb lencsével és kevesebb ganglionsejt típussal rendelkeznek. Mindemellett az emberi (és főemlős) szem rendelkezik foveával, addig patkány esetében az éleslátás helye egy centrálisan elhelyezkedő sáv, az úgynevezett „visual streak”.

1.2. A retina in vivo vizsgálati eszközei: optikai koherencia tomográfia és elektroretinográfia

Az optikai koherencia tomográfia (OCT) a szemészetben széleskörben alkalmazott képalkotó és diagnosztikai eszköz. A módszer alapja interferometrián és a rövid koherencia hosszúságú fény alkalmazásán alapul, amely segítségével képes nagy felbontású, két- és háromdimenziós felvételeket leképezni a biológiai mintákról visszaverődő fényből. Az OCT jelentős szerepet tölt be különböző retinopathiák diagnosztikájában, kórfolyamatok monitorozásában.

Az elektroretinográfia (ERG) egy másik, a szemészetben alkalmazott diagnosztikai eszköz. Cornea felszíni elektródákkal történő elektromos változások elvezetésével sejt-típus-specifikus funkcionális információt szolgáltat a retina állapotáról. Az elektroretinogramon több hullámformát tudunk megkülönböztetni, az a-hullám a fotoreceptorok (csapok és pálcikák) működését, míg a b-hullám a bipoláris sejtek, a Müller-sejtek és az amakrin sejtek funkcionalitását reprezentálja. Az ERG képes információt nyújtani a retina fiziológiai állapotáról, így a szemészetben is gyakran alkalmazott módszer különböző megbetegedések diagnosztikájára úgy, mint a diabéteszes retinopátia, a retinitis pigmentosa vagy a retinaleválás.

1.3. Glaukóma

A glaukóma a látási rendellenességek heterogén csoportja, amely először a perifériás látótér elvesztését, majd végül visszafordíthatatlan vaktságot okoz. A progresszív betegségcsoport közös jellemzője, hogy lassan kialakul a látóidegfő károsodása, ami végül a látás elvesztéséhez vezethet. Elsődleges nyitott zugú glaukóma esetében a csarnokvíz termelésének és elvezetésének egyensúlya megbomlik, így az elülső csarnokban a csarnokvíz felhalmozódik, amely a belsőszemnyomás emelkedését (IOP) okozza. A IOP emelkedés végül az érzékeny ganglionsejtek elhalásához vezet. Jelenleg a glaukóma kezelésére alkalmazott hatóanyagok

úgy, mint az alfa-adrenerg receptor blokkolók és a béta-blokkolók csak fokozzák a csarnokvíz kiáramlását vagy csökkentik a termelést, ami csupán lassítani tudja a vakság kialakulását. Így a glaukóma terápiában kiemelt jelentőségűnek tekinthető a hosszú távú neuroprotektív kezelések fejlesztése.

A betegség kialakulásának pontos megértéséhez könnyen reprodukálható és megbízható állatmodellekre van szükség, amelyek kiváló eszközt jelenthetnek a patofiziológia vizsgálatára és az ígéretes kezelések hatékonyságának tesztelésére.

1.4. PACAP

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) egy a szervezetünkben széles körben előforduló neuropeptid, amely számos biológiai funkcióval rendelkezik. A szekretin/glükagon/vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) szuperfamilia legkonzerváltabb tagja. A PACAP két biológiailag aktív formával rendelkezik, a rövidebb PACAP1-27 és a domináns formának tekintett, hosszabb PACAP1-38. A PACAP három G-fehérjéhez kapcsolt receptoron keresztül fejti ki hatását, a PACAP-ot specifikusan kötő PAC1 receptor (PAC1-R) valamint a VPAC1 és VPAC2 receptorokon, amelyek a PACAP mellett képesek megkötni a vazoaktív intesztinális peptidet (VIP) egyaránt. Felfedezése óta bizonyításra került, hogy sokrétű fiziológiai funkciókkal rendelkező neuropeptid, amely szerepet játszik idegi ingerlékenységben, az immunmodulációban és a szaporodásban, valamint az embrionális fejlődésben is. In vivo valamint in vitro kísérleti eredmények igazolták a PACAP jelentős neuroprotektív hatását. Tanulmányok kimutatták, hogy a PACAP védő hatást fejt ki a retinopathia különböző modelljeiben, úgymint az ischaemia-indukálta retinopathiában, a koraszülött retinopathiában vagy a diabeteses retinopathiában.

Korábbi állatkísérletes eredmények rámutattak a PACAP és receptorának előfordulására a corneában, a sclerában, az irisben, a sugártestben, a choroideában, a kötőhártyában és a könnymirigyekben egyaránt. Mindemellett a PACAP a retina több rétegében és sejtjében igazoltan kimutatható úgy, mint a retina ganglionsejtjeiben, a bipoláris sejtekben, az amakrin sejtekben és a horizontális sejtekben, valamint az IPL, NFL rétegben.

2. 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.

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

3.1. Anyagok és módszerek

Kísérleti minták

A kísérleteinkben alkalmazott humán szemek (n=7 beteg; 6 fiú, 1 lány) a PTE ÁOK Pathológiai Intézettel közreműködve, enukleált retinoblastomában szenvedő betegekből származtak (etikai engedély: 6383-PTE 2018). A betegek életkora 16 ± 10 hónap volt. A hisztológiai vizsgálatok során kizárólag a tumormentes, egészséges területeket használtuk fel.

Immunhisztológiai elemzés

A mintákat 10%-os formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, majd a szemekből paraffinba ágyasztást követően mikrotóm segítségével $3 \mu\text{m}$ vastagságú metszeteket készítettünk. Ezután 1 mM (pH=6,0) citrát pufferben történő epitóp-feltárást követően a mintákat anti-PAC1-R antitestben és anti-PACAP38-ban inkubáltuk. A metszeteket HISTOLS-AP-R anti-nyúl alkalikus foszfatáz-jelölt detektálóban inkubáltuk. Ezt követően HISTOLS Resistant AP-Red Chromogen/Substrate System segítségével sötétben elvégeztük az előhívást, a kromogén/szubsztrát pufferben történő inkubálás nagyjából 10 percig tartott. 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. A negatív festési kontroll mintákat elsődleges antitest nélkül inkubáltuk. A metszeteket egy automatikus metszet szkener segítségével fényképeztük, majd a mintákat szemikvantitatív módon elemeztük. Az immunreaktivitást leíró módon, 3 kutató egymástól függetlenül értékelte, 0-+---+++ jelzéssel a jelölés intenzitásától függően.

3.2. Eredmények

A szemgolyó külső rétege, a tunica fibrosa két részre osztható, sclerara és corneara. A scleraban nem detektáltunk sem PACAP, sem PAC1-R immunjelet. A cornea epithelium és endothelium esetében mérsékelt immunpozitivitást találtunk, azonban a stroma rétegben nem találtunk jelet. A szem középső, tunica vasculosa rétege irisből, corpus ciliareből és choroideából áll. Az iris minden rétegében találtunk magenta színű, immunpozitív részeket. A m. sphincter pupillae esetében a PACAP pozitivitás jelentősebb volt a receptorhoz képest, ahol csupán néhány metszetben találtunk immunjelet. A sugártest nyúlványok bázisán erős, a ciliáris izmok esetében azonban nagyon gyenge immunpozitivitást találtunk. A choroidea esetében PACAP és PAC1-R jelölés nem volt detektálható. A szemgolyó legbelső rétege, a retina. A retina tíz

rétegből áll, amelyek közül a legkülső, pimentált réteg fejlődéstani szempontból eltér a többi kilenc rétegtől. A fotoreceptorok rétegében mintánként eltérő módon, helyenként gyenge immunjelölés mutatkozott, hasonlóan a külső magvas- és plexiform rétegekhez, amelyek csak néhány minta esetében mutattak gyenge PAC1-R pozitivitást. A bipoláris-, amakrin és Müller sejtek a retina belső magvas rétegben 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 reakció. A látóideg neuropilben mérsékelt PACAP és PAC1-R pozitivitást detektáltunk, míg a gliasejtek csupán PAC1-R pozitivitással rendelkeztek.

3.3. Diskusszió

Tanulmányunkban elsőként mutattuk be a PACAP és PAC1-R eloszlását teljes humán szemben immunhisztokémiai módszerrel. Immunpozitivitást volt kimutatható a cornea epithelium és endothelium rétegében, illetve az iris és sugártest stromájában valamint az ott található izmokban. Mindemellet a retina számos rétege 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. Korábbi tanulmányokban PACAP immunreaktivitást találtak macska choroideában, valamint kimutatták a peptid jelenlétét nyúl szem irisben, sugártestben, corneában, retinában és choroideában is. Eredményeink rámutattak, a peptid széleskörű eloszlására a humán retina számos rétegében. A betegség megléte, illetve a betegek kora befolyásoló tényezőként szolgálhat, így a peptid eloszlásában különbség feltételezhető a felnőtt szemhez képest. Azonban az általunk vizsgált szembgolyók teljesen kifejlett okuláris struktúrával rendelkeztek. Emlősökben a születést követően a szem különböző mikroszkópos és makroszkópos szintű növekedési, illetve érési folyamaton megy keresztül. A szembgolyó teljes érettségét nagyjából a serdülőkorra éri el, 16 hónapos gyermekek retinája már jelentősen fejlettnak 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. 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.

A PACAP retinoprotektív hatását már számos állatmodellben és in vitro tanulmányban igazolták. A retina öregedésének kori jeleit mutató, PACAP génkiütött állatok rávilágítottak a PACAP öregedésben betöltött fontos szerepére. Koraszülöttek ideghártya károsodása és ischaemia egér modellben kísérletek igazolták a PACAP-hiány súlyosbító következményeit. A retina legkülső rétegét alkotó pigment epithelium sejtek részt vesznek a fotoprotekcióban, anyagcserében, membrán megújításban, az A vitamin raktározásban és fontos növekedési faktorok raktározásában. A pigment epithelium sejtek PACAP tartalma bizonyítottan protektív hatással rendelkezett diabéteszes retinopathia és öregedéssel összefüggő degenerációk, illetve in vitro vizsgálatokban.

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. A PACAP csarnokvíz termelésében betöltött szerepét számos kutatási eredmény alátámasztja. Emlősökben a cAMP-szint változás a sugártest epithelium sejtjeinek transepitheliális folyadéktranszportját befolyásolja. Mivel a PACAP cAMP stimuláló hatással rendelkezik, valószínűleg endogén módon képes befolyásolni a csarnokvíz termelődést. Korábbi patkány glaukóma modellből származó eredményeink rávilágítottak arra, hogy a PACAP nem csupán a csarnokvíz termelésében, hanem felszívódásában is szerepet játszhat, így szemnyomáscsökkentő hatással is rendelkezik.

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 epithelium sejtek és szenzoros beidegzés regenerációját. Száraz szem szindróma és cornea hiperkeratinizáció tapasztalható PACAP génkiütött egerekben, amely megerősíti a peptid fontos endogén szerepét. A szaruhártya endothelium sejtjei erőteljes PACAP és PAC1-R immunpozitivitása hasonlóságot mutatott. 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 szolgáltunk bizonyítékot a PACAP és PAC1-R széleskörű jelenlétére humán szemben. Emberi szövetekben a PACAP és receptorának eloszlásában eltérések mutatkoznak különböző betegségek esetében. 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 transzlációs értékkel rendelkeznek.

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

4.1. Anyagok és módszerek

Állatok, mikrogyöngyök injekciója és szemcseppkezelése

Kísérleteinkhez 300-500 g tömegű, felnőtt hím Sprague–Dawley (SD) patkányokat (n = 30) alkalmaztunk, melyeket 12 órás világos/sötét ciklus alatt tartottunk, valamint ad libitum etettük és itattuk őket. Kísérleteink megvalósításakor minden esetben betartottuk a PTE Munkahelyi Állatjóléti Bizottság által előírt etikai kódexben foglaltakat (a kísérleti projektek nyilvántartási száma: BA02/2000-16/2017). Kísérleteink során, az állatokat véletlenszerűen négy kísérleti csoportra osztottuk: (i) PBS + vivőanyag (Systane (S)) n = 5, PBS + S; (ii) PBS + PACAP1-38 (P) n = 5, PBS+P; (iii) mikrogyöngy + vivőanyag (S) n = 10, Gyöngy+S; és (iv) mikrogyöngy + PACAP1-38 n = 10, Gyöngy+P. Az állatok szemének elülső kamrájába polisztirol mikrogyöngyöket (10 μ m; 10 μ l) fecskendeztünk, kontroll állatok esetében azonos mennyiségű PBS-t. Az eljárást két héttel később megismételtük. A szemcsepp kezelést az injektálást követő napon megkezdjük, a szemeket Systane vagy PACAP1-38 tartalmú (1 μ g/csepp) szemcseppel kezeltük négy héten keresztül. Az IOP változásait tonométer segítségével követtük nyomon. A kísérleti állatok retináiról a mikrogyöngy injekció előtt, illetve az azt követő nyolcadik héten OCT felvételeket készítettünk. A látóideg kilépését referenciapontként alkalmazva, radiális volumetrikus felvételeket készítettünk mindkét szemről, majd Biotigen Diver programmal elemeztük.

Immunhisztokémia, teljes retina preparátum, érzettség vizsgálat

A gyöngybeadáskövető nyolcadik héten preparáltuk az immunhisztokémiai vizsgálatokra szánt mintákat (n=20 szem). Fixálást követően a szemeket 10-20-30%-os szacharózoldatba víztelenítettük, majd O.C.T. médiumba ágyasztuk, később vékony metszeteket (15-17 μ m) készítettünk, melyeket zselatinnal bevont tárgylemezre vettük fel. A metszeteket blokkolást követően egy éjszakán át nyúl anti-HIF1- α (1:200) vagy egér anti-VEGF-A (1:200) hígított antitestben inkubáltuk, 4 °C-on. Az immunreaktivitást másodlagos antitest alkalmazásával tettük láthatóvá (Alexa Fluor-488; 1:800). Végül propídium-jodid alkalmazásával magfestést

végeztünk és Fluoroshield fedőanyaggal lefedtük. A metszetekről Nikon Eclipse Ti2-E konfokális mikroszkóppal, Nikon C2 konfokális detektorral fotókat készítettünk. A teljes retina preparátum mintákhoz a szemeket 4% PFA oldatban 2 órán keresztül fixáltuk, majd mosás követően a retinát eltávolítottuk a szemserlegről és négy apró vágást ejtettünk rajta. Az erezettség jelöléséhez fluorescensen jelölt isolectin oldatot alkalmaztunk. A teljes preparátumokat tárgylemezen kiterítettük, Fluoroshield médium segítségével lefedtük, majd Nikon Eclipse 80i epifluorescens fénymikroszkóppal fotókat készítettünk. A lectin jelölt mintákon Photoshop segítségével küszöbérték meghatározást és korrigálást végeztünk. A teljes retina érhálózatának analíziséhez AngioTool programot alkalmaztunk. A következő érmorfológiai tulajdonságok mérését végeztük el: teljes érhosszúság, erek elágazási pontjainak száma, végpontok száma, lacunaritás, ami az éredényeket körülvevő üres területek eloszlását mutatja. 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.

Western blot analízis

A retinákat ($n = 16$) 8 héttel az első injekciót követően preparáltuk. A mintákat homogenizáltuk, majd fehérjekoncentráció meghatározást végeztünk. A membránokat nyúl anti-HIF1- α (1:2000) valamint egér anti-VEGF-A (1:100) hígított atitestben inkubáltuk. Belső kontrollként nem foszforilált anti-GAPDH-t (1:20000) alkalmaztunk. A membránokat ezt követően torma-peroxidáz konjugálta másodlagos antitestben (1:3000) 1 órát, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az antitest-antigén komplexeket kemilumineszcens reakcióval tettük láthatóvá. A western blotból származó eredményeinket NIH ImageJ program segítségével elemeztük.

Statisztika

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 + középérték közepes hibája (SEM) került feltüntetésre.

4.2. Eredmények

A PACAP szemcsepp hatása a szemnyomás változására

Abszolút kontroll állapotban az átlagos szemnyomás értéke normális tartományon belülnek bizonyult. A kontroll csoportok (PBS+S, PBS+P) szemnyomása a normális napi ritmusfüggő fluktuáción kívül nem mutatott jelentős változást. A glaukómás csoportok esetében a mikrogöngy injektálást követő 2. héten az IOP szignifikáns, 40%-os növekedése volt megfigyelhető. A 4. héttől kezdve a Gyöngy+P csoportban IOP csökkenés volt megfigyelhető. A 8. héten a Gyöngy+S csoportban szignifikánsan emelkedett szemnyomást mértünk a kontroll csoportokhoz képest, míg a PACAP kezelésben részesült, mikrogöngy injektált csoport értékei nem mutattak szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest.

A retina morfológiai változásai

A kontroll csoportban a gyöngybeadást követő 8. héten PACAP szemcseppkezelés esetén sem volt különbség. A mikrogöngyökkel injektált vivőanyaggal kezelt (Gyöngy+S) csoportban súlyos retina degenerációt mutatkozott a PBS-injektált kontrollcsoportokhoz képest. A retina számos rétegét érintő szignifikáns változás volt megfigyelhető a vivőanyag kezelt glaukómás csoportban. Változást találtunk a teljes retina vastagságban, az, az OPL és az IS és OS rétegében. A PACAP kezelés a teljes retina rétegvastagság védelmét eredményezte. Összefoglalva, a mikrogöngy injektált vivőanyaggal kezelt csoportban megjelentek a glaukómában jellegzetes retinadegeneráció jelei, míg a PACAP kezelés ellensúlyozta a káros hatásokat, ezáltal megvédte a retinát a magas szemnyomás káros hatásaitól.

Érhálózat elemzés

A PBS injektált állatok érhálózata nem mutatott jelentős változást sem a vivőanyaggal kezelt, sem a PACAP kezelt csoportban. A Gyöngy+S csoportban a teljes érhálózat 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. Az érhálózat denzitásának vizsgálata során a Gyöngy+S csoportban szignifikáns, közel 20% csökkenés jelentkezett az érhálózat sűrűségében. A PACAP kezelésben részesült mikrogöngy injektált

csoportban (Gyöngy+P) az érhálózat szerkezete a kontroll csoportokhoz hasonló értékeket mutatott.

Immunhisztokémiai és fehérjeszint változások

Kontroll csoportok (PBS+S; PBS+P) esetében nem tapasztaltunk jelentős immunreaktivitást sem HIF1- α , sem VEGF-A esetében. A Gyöngy+S csoportban lényegesen megemelkedett HIF1- α immunpozitivitás volt kimutatható a retina metszetekben (IPL, GCL) és a western blot paneleken egyaránt. A kontroll csoportokhoz képest a Gyöngy+P csoportban egy gyenge HIF1- α pozitivitást találtunk a retina metszeteken (GCL) és a western blot eredményekben. Azonban a Gyöngy+S csoportban nagymértékű VEGF-A immunpozitivitás volt kimutatható a ganglionsejt rétegben és az idegrostos rétegben, melyet a western blot eredmények is alátámasztottak. A PACAP-kezelt glaukómás csoportban alacsonyabb mértékű VEGF-A immunreakció volt kimutatható a Gyöngy+S csoporthoz viszonyítva.

4.3. Diszkusszió

Korábbi kutatásunkban bebizonyítottuk a PACAP szemcseppkezelés neuroprotektív és szemnyomás csökkentő hatását. Jelen tanulmányunkban igazoltuk a PACAP védőhatását vascularis és hypoxiás faktorok változásával szemben patkány glaukóma modellben.

Kutatócsoportunk korábban sikeresen bizonyította, hogy a PACAP1-38 szemcsepp formájában képes átjutni az okuláris barriereken, és elérve a retinát protektív hatást képes kiváltani. Továbbá szintén ismert, hogy szemcsepp formájában a peptid stabilitása nem változik, így non-invazív terápiás potenciállal rendelkezik.

Glaukómás betegek OCT vizsgálata során az RNFL réteg változásának detektálása fontos a károsodás mértékének felmérésében. Humán és főemlős glaukóma esetén szövettani károsodást írtak le fotoreceptorok rétegében is. Korábbi kutatásokban összefüggést találtak a retina pigment epithelium és a fotoreceptorok külső szegmens vastagságának változásában. Kísérletünkben a mikrogönggy-indukálta hipertenzió a retina több rétegében (teljes retina rétegvastagság, RNFL, OPL, IS, OS) morfológiai változást indukált. Ezek a változások korábban már leközölt tanulmányokhoz hasonlóan bizonyultak egy SD patkány törzsben kialakított glaukóma modellben tapasztaltnak. A fotoreceptorok rétegének külső- és belső szegmenseinek rétegvastagság csökkenése összefüggésben áll, a korábban általunk ERG vizsgálat alapján tapasztalt szignifikáns funkciócsökkenéssel. Továbbá, más kutatócsoportokhoz hasonlóan mi is szignifikáns RNFL rétegvastagság csökkenést tapasztaltunk. A retina teljes

rétegvastagsága szignifikánsan csökkent előző kísérletünkben tapasztaltakhoz hasonlóan. A Gyöngy+S csoportban az RNFL réteg közel 10%-os rétegvastagság csökkenést mutatott a kontroll csoportokhoz képest. Az állatmodellből származó eredményeink továbbá hasonlóságot mutatnak a humán betegekben tapasztaltakkal, ahol korai stádiumában már változás lép fel a teljes retina rétegvastagságban. A szemcseppként 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. A vivőanyaggal kezelt glaukómás csoportban jelentős károsodást figyeltünk meg a retina erezettségében, azonban a PACAP kezelés képes volt megvédeni az erek állapotát. Mágneses mikrogöngyökkel indukált patkány glaukóma modellben közel megegyező eredményeket tapasztaltak a retina erezettségében. Glaukómás betegeknél hasonló változást írtak le a véráramlás csökkenésében. Jelen eredményeink megerősítik a glaukóma retinális érrendszerre gyakorolt hatását, mivel a PACAP szemcseppek kezelésében részesült mikrogöngy injektált csoportban a vascularis hálózat a kontroll csoportokéhoz hasonló maradt.

A glaukómában fellépő véráramlás szabályozásának zavara és az azt követő hypoxia összefüggést mutat a retina ganglionsejt csökkenésével. Post-mortem humán glaukómás retina mintákban hypoxiás állapotra utaló megemelkedett HIF1- α szintet közöltek le immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével. Az általunk vizsgált glaukómás csoportban hasonló mértékben megemelkedett HIF1- α immunpozitivitást találtunk, amelyet western blot analízissel is megerősítettünk. A glaukóma számos rizikófaktora közül, a megemelkedett szemnyomás a retina ischaemiás állapotát eredményezi. Hypoxiás körülmények között a HIF1- α különböző gének aktiválódását indukálja, úgymint a glükóz transzporterek és a VEGF, amivel igyekszik kompenzálni a csökkent oxigénmennyiséget. A VEGF-A megtalálható a RPE rétegben, a ganglionsejtekben, a pericitákban, a Müller-sejtekben valamint az endothelium, és a simaizom sejtekben is. A VEGF-A a kis erekre hatva, a kapillárisok eltömődését és folyadékiszvárgást indukál, ami felerősíti a hypoxiás állapotot és fokozza a VEGF-A termelődését. Korábbi vizsgálatokban kimutatták a VEGF-A mennyiségének emelkedését glaukómás betegek vérplazmájában és csarnokvizében. Eddigi eredmények 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. Korábban igazolták, hogy a PACAP képes csökkenteni és gátolni a HIF1- α és VEGF-A expresszióját diabeteses macula ödéma modellben. Jelen eredményeink megerősítették, a glaukóma során fellépő hypoxiás állapotot, ezáltal a fokozott HIF1- α , valamint VEGF-A expressziót. Továbbá a hypoxia okozta érhálózat károsodás mértékét is csökkenteni tudta a PACAP szemcseppkezelés.

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.

Köztudott, hogy a PACAP anti-apoptotikus, gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatással rendelkezik, ami a neuroprotektív hatás hátterében áll. Száraz szem szindróma tüneteinek kezelésére a PACAP szemcsepp igazoltan jótékony hatású. Képes fokozni a könnytermelődést a cAMP felszabadító és aquaporin expresszió indukáló hatásával. A PACAP továbbá protektív hatással rendelkezik számos hipoxiás állatmodellben, úgy, mint BCCAO-indukált retinopátiában, diabeteses macula ödémában és koraszülöttek retinopátiájában. A lista most már tovább bővíthet a glaukómával is. Összefoglalva kutatásunk során bebizonyítottuk 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 potenciális jövőbeli terápiás lehetőség alapjait képezheti glaukóma kezelésében. Azonban további vizsgálatokra van szükség a védőhatás mögött meghúzódó pontos mechanizmus megértéséhez.

5. Új eredmények összefoglalása

I) A Ph.D. munkám első részében humán szemben vizsgáltunk a PACAP és specifikus receptorának (PAC1-R) eloszlását. Immunhisztokémiai jelölést követő szemikvantitatív analízisből származó eredményeink arra engedtek következtetni, hogy humán szemben a korábban emlős modellekben leírtakhoz hasonló a PACAP és PAC1-R eloszlása. Tanulmányunkban így elsőként írtuk le a PACAP és specifikus receptorának előfordulását a humán szemben. Mindezen eredmények megerősítik, hogy a korábbi in vitro és in vivo kutatásokból származó állatkísérleti eredmények 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 mikroglyöngy-indukálta glaukóma modellben. A OCT-, az immunhisztokémiai-, érhálózat- valamint western blot analízisünk eredményei alátámasztották, hogy a PACAP szemcseppkezelés védőhatással rendelkezik az általunk alkalmazott állatmodellben. Eredményeink egy jövőbeli terápiás lehetőség alapjait képezhetik, amely egy szemcseppes terápia kidolgozásával könnyen alkalmazható, nem-invazív módon szerepelhetne a glaukóma kiegészítő kezelésében.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a PACAP és specifikus receptora széleskörben van jelen humán szemben, ami megerősíti a korábbi in vitro és in vivo származó eredmények értékét. Kutatócsoportunk korábbi és jelenlegi eredményeinek ismeretében a PACAP kutatásból származó eredmények transzlációs potenciállal bírnak és lehetséges terápiás lehetőségeket nyújthat glaukóma esetében.

6. 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. Reglódi 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 biztatott 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.

7. Publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények (össz. impakt faktor (IF): **9,652**)

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)

Egyéb tudományos közlemények (össz. IF: **9,123**)

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**.