

**ANESZTETIKUS PREKONDÍCIONÁLÁS ÉS A
VIP/PACAP PEPTIDCSALÁD VÉDŐ
SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA ISZKÉMIÁS
RETINOPÁTIÁBAN**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Dányádi Bese



Témavezetők: Dr. Reglődi Dóra, Dr. Bártai István
Doktori Iskola vezetője: Dr. Kovács L. Gábor
Programvezető: Dr. Horváth Örs Péter

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Anatómiai Intézet/Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet

Pécs, 2017

BEVEZETÉS

A **PACAP** egy neuropeptid, a szekretin/glukagon/VIP (vazoaktív intesztinális polipeptid) peptid szupercsalád tagja. Számos szervben megtalálható, így jelenlétét kimutatták a központi és perifériás idegrendszerben, ill. több perifériás szövetben (here, pancreas, mellékvese, mirigyek excretuma). Hatását a szervezetben G-proteinhez kapcsolt receptorokon fejti ki. Szerteágazó élettani hatásai közül (endokrin, neurothrophikus, viselkedést befolyásoló, stb.) kiemelkedik potens neuroprotektív hatása. Ez bizonyítást nyert szérum megvonás, oxigén glükóz megvonás, toxikus modellekben in vitro vizsgálva; ill. iszkémia, trauma, axonális lézió modelleken in vivo vizsgálva is. Számos kísérletben bizonyították retinoprotektív hatását in vivo vizsgálva retinális neuron és pigment epithelium kultúrákon toxikus modellben; ill. in vitro excitotoxikus degeneráció, iszkémiás retinadegeneráció, nervus opticus lézió, UV sugárzás, ROP, diabéteszes retinopátia modellekben is. A PACAP hatás behatóbb vizsgálatát teszi lehetővé az a Hashimoto és munkatársai által létrehozott KO egértörzs, mely a PACAP peptidet nem expresszálja.

Számos módszer alkalmas **retinadegenerációs modell** létrehozására, ezek közül több alapul iszkémiás károsodás létrehozásán. A patkány retina az emberi retinához hasonló, így a patkány modellen létrehozott akut iszkémia patológiai képe nagyfokú hasonlóságot mutat humán kórképekhez. Több különböző kísérleti modell ismeretes, mellyel iszkémiás retinakárosodás hozható létre, ezek közül kutatócsoportunk rutinszerűen alkalmazta a kétoldali arteria carotis communis okklúziót (BCCAO, vagy 2 ér elzárás modell) globális agyi iszkémia létrehozására. A csökkent perfúzió következtében kialakuló inkomplett iszkémia markáns, jól kvantifikálható morfológiai és morfometriai változásokat okoz a retinában. Ezen károsodások a humán kórképek közül jól modellezik az arteria centralis retinae elzáródását, az arteria ophthalmica elzáródását, valamint az arteria carotis insufficiencia okozta tüneteket.

Prekondicionáló hatásról beszélhetünk, ha egy irreverzibilis noxa hatása csökkenthető egy azt megelőző, rövid ideig tartó, reverzibilis noxával. Noxaként szerepelhet iszkémiás hatás, de a jelenség kiváltható kémiai ágensekkel is, így inhalációs anesztetikumok alkalmazásával.

A szem különböző rétegeiben, vagy külső felszínén (korneális elvezetés) fény ingert követően retinális eredetű, összetett elektromos jel detektálható, melyet elektroretinogramnak nevezünk (**ERG**). Komponensei kialakulásuk sorrendjében:

negatív **a hullám**, mely a fotoreceptorok külső szegmensében fény abszorpció hatására jön létre; **b hullám**, mely egy hirtelen emelkedő, nagy amplitúdójú, pozitív hullám, létejöttéért a bipoláris-, amakrin-, ganglionsejtek együttesen felelősek; **c hullám**, mely egy lassú, elhúzódó, patkányban negatív feszültségű hullám, melyet a pigment epithelium sejtek hoznak létre. Az *a*, *b*, *c* hullámok minden esetben detektálhatóak ép struktúrák esetén. Járulékos alkotóként leírásra került a *d* hullám, az oszcillátoros potenciálok (OP), és a korai receptor potenciál (ERP). Az egyes hullámok keletkezése többnyire jól meghatározható struktúrákhoz, ill. folyamatokhoz köthető, így azok változásából következtetni tudunk a károsodott funkciókra. A mérések ugyanazon állaton többször ismételhetőek, eredményesen standardizálhatóak; a kialakult változások jól mérhetőek.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Kutatócsoportunk korábban számos potenciálisan retinoprotektív kémiai anyagot vizsgált eredménnyel patkány BCCAO modellen. Kísérleteinkkel ezen modell használatával szeretnénk volna igazolni az **inhalációs anesztetikus prekondicionálás** retinoprotektív hatását, ill. két különböző anesztetikum (izoflurán, szevoflurán) vizsgálatával a protektív hatás egymáshoz viszonyított mértékét.

2. Alapozva azon közleményekre, melyek a **PACAP KO** egerek csökkent iszkémiás toleranciájáról számoltak be, célunk volt annak kísérletes bizonyítása morfológiai és funkcionális módszerekkel, hogy ez retinális iszkémia-reperfúzió esetén is megfigyelhető.

3. A **VIP** neuroprotektív hatásáról számos közlemény ismert. Standardizált patkány krónikus hipoperfúziós modellen (BCCAO) szeretnénk volna részletes morfometriai vizsgálatokkal bizonyítani az intravitreális VIP kezelés protektív hatását, mivel erre irodalmi adat eddig nem volt. Felhasználva korábbi adatainkat a PACAP protektív hatásáról ugyanezen modellben vizsgálva, célunk volt a két szer hatáserősségének összehasonlítása is.

4. A patkány BCCAO modellen korábban hisztológiai és immunhisztológiai módszerekkel már bizonyított retinoprotektív PACAP hatást **ERG vizsgálatok** elvégzésével funkcionális vizsgálattal kívántuk igazolni. Kihhasználva az ERG vizsgálatok non invazív jellegét, az iszkémiás károsodás időbeni változásának vizsgálatát is célul tűztük ki.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok, kísérleti csoportok

Inhalációs anesztetikus prekondicionálás hatását vizsgálva iszkémia indukálta retinadegenerációban az állatok felén permanens BCCAO műtétet végeztünk (n=20), a másik fele áloperáción esett át (n=20). Kezelésként 24 órával a műtétet megelőzően 12 állat 1 órás izoflurán-, 14 állat 1 órás szevoflurán prekondicionáláson esett át. 2 hetes túlélést követően az állatokat termináltuk, a bulbusokat in toto eltávolítottuk, majd rutin szövettani feldolgozást követően morfológiai és morfometriai vizsgálatokat végeztünk.

PACAP KO (n=12) és **vad** (n=11) egereken vizsgálva az iszkémia indukálta retinadegeneráció hatását operált (BCCAO, n=11 vad, n=12 PACAP KO), és áloperált (SHAM, n=5 vad, n=6 PACAP KO) állatok csoportjait hoztuk létre. Kezelésként egyszeri intravitrealis PACAP injekció szolgált (jobb oldali bulbus), ennek kontrollja minden esetben a kezeletlen bal oldali bulbus volt. Az egyes csoportoknak megfelelő beavatkozások elvégzése után 2 hetes túlélést követően az állatokat termináltuk, a bulbusokat in toto eltávolítottuk, majd rutin szövettani feldolgozást követően morfológiai és morfometriai vizsgálatokat végeztünk.

Az intravitrealis **VIP** kezelés protektív hatását vizsgálva iszkémia indukálta retinadegenerációban a kísérletbe bevont patkányokat (n=17) négy csoportra osztottuk annak megfelelően, hogy áloperációt, vagy permanens BCCAO-t hajtottunk-e végre, ill. hogy 100pmol-os, vagy 1000pmol-os koncentrációjú VIP-vel történt az intravitrealis kezelés. A vizsgált anyagot ez esetben is mindig a jobb szembe injektáltuk, míg a bal szembe fiziológiás só oldatot juttattunk kontrollként. 2 hetes túlélést követően az állatokat termináltuk, a bulbusokat in toto eltávolítottuk, majd rutin szövettani feldolgozást követően morfológiai és morfometriai vizsgálatokat végeztünk.

Elektroretinográfiás vizsgálataink során, melyel az intravitrealis PACAP kezelés hatását vizsgáltuk iszkémia indukálta retinadegenerációban, először minden a kísérletbe bevont patkányon (n=8) kontroll ERG vizsgálatot végeztünk. Ezt követően valamennyi állaton permanens BCCAO műtétet végeztünk, majd a 2. és 14. posztoperatív napokon ismételt ERG regisztráció történt. A vizsgálat után az állatokat termináltuk, és rutin szövettani feldolgozást követően morfológiai és morfometriai analízist végeztünk az in toto eltávolított bulbusokból készült szövettani metszeteken.

2. Az arteria carotis communis kétoldali lekötése (BCCAO) által indukált retinadegenerációs modell létrehozása

A dolgozatomban ismertetett kísérletekben **patkányok** esetében a korábbi munkáinkban már standardizált **permanens** bilaterális arteria carotis communis lekötetést (BCCAO) alkalmaztuk. Az inhalációs anesztéziában végzett műtét során mindkét oldalon felkerestük az artériát, majd izoláltuk, előemeltük, alatta sebési fonalat áthúzva ligatúrát helyeztünk fel, végül a bőrsébet zártuk.

Tapasztalataink alapján az **egereken** elvégzett permanens BCCAO 100%-ban letális. KO egerekkel megkezdett munkánk első lépéseként ezért különböző időintervallumokra hoztunk létre **transziens** BCCAO-t (5, 10, 15, 20, 30 perc), majd rutin szövettani vizsgálattal kontrolláltuk az iszkémiás hatás mértékét. Eredményeink alapján későbbi kísérleteinkben 10 perces transziens BCCAO-t alkalmaztunk, mely iszkémiás idő már jól detektálható degenerációt hozott létre, és a posztoperatív/intraoperatív letalitás is elfogadható mértékű volt. A transziens BCCAO operáció technikai kivitelezése az artéria izolálásáig megegyezett a korábban a permanens BCCAO kapcsán leírtakkal, ekkor azonban ligáció helyett megközelítőleg egy időben mindkét oldali artériára önzáró műanyag leszorító eszköz (clip) került felhelyezésre. 10 perc elteltével ezeket szemkontroll mellett eltávolítottuk, megbizonyosodtunk a perfúzió visszatéréséről, majd zártuk a sebet.

A rágcsáló retina vérellátásáért 70%-ban a carotis rendszer felel, ezért transziens/permanens BCCAO-val iszkémiás retinadegeneráció hozható létre. A BCCAO-n átesett állatok kontrolljaként minden esetben áloperált (SHAM) állatokat használtunk. Áloperáció esetén minden korábban a BCCAO kapcsán leírt műtéti lépést elvégeztük a ligáció/transziens lefogás kivételével.

3. Inhalációs anesztetikus prekondicionálás

A prekondicionálandó állatokat légmentesen zárható tartályban egyszerre tettük ki 1 MAC (**minimal alveolar concentration**) szevoflurán gőz ill. 1 MAC izoflurán gőz hatásának 10 l/perc gázáramlás, 50% FiO₂. Az állatok spontán légzése a kezelés alatt végig megtartott volt; az oxigén, széndioxid, és az anesztetikum koncentrációját gázanalizátorral folyamatosan monitoroztuk. A prekondicionálás időtartama 1 óra volt, melyet a BCCAO operációt 24 órával megelőzően végeztünk, így hozva létre késői

prekondicionáló hatást. A BCCAO ill. SHAM operációk alatt 1,5 MAC szevofluránnal történt az anesztézia függetlenül attól, hogy történt-e korábban prekondicionálás vagy sem.

4. Intravitreális PACAP/VIP kezelés

A BCCAO ill. SHAM operációkat követően, még a narkózis alatt végeztük az intravitreális injekciós kezeléseket. A korneális limbuson keresztül Hamilton mikrofecskendővel egerek esetében 3 μ l, patkányok esetében 5 μ l térfogatú oldatot injektáltunk a vitreális térbe. Kísérleteinkben minden esetben intravitreális kezelés során a jobb oldali bulbusba injektáltuk a vizsgálati anyagot (100pmol PACAP, 100/1000pmol VIP), a bal oldalra minden esetben a vivőanyag (0,9% NaCl) került beadásra az ellenoldallal megegyező módon és térfogatban.

5. Szövetteni morfológiai és morfometriai analízis

Szövetteni feldolgozás céljából a szemeket in toto távolítottuk el, majd 4%-os paraformaldehidben tároltuk, miközben sztereomikroszkóp alatt eltávolítottuk a szaruhártyát, a szemlencsét és az üvegtestet. Az így kialakított szemserleg preparátumot legalább 12 órán keresztül fixáltuk. Ezután három napos rutin szövetteni protokoll szerint a szemserlegeket mostuk, dehidráltuk, majd gyanta-blokkokba ágyasztuk. A blokkokból ultramikrotómmal félvékony metszeteket (1-2 μ m) készítettünk, amelyeket tárgylemezre téve, toluidinkékkel festettünk meg, majd lefedtük őket. Az így elkészült retina metszetekről mikroszkóphoz kapcsolt CCD kamerával fotókat készítettünk a későbbi morfológiai vizsgálatokhoz, ill. az elkészült képeken méréseket végeztünk későbbi morfometriai analízis céljából. A következő paramétereket vizsgáltuk szoftver alkalmazásával: a külső és a belső határmembrán távolsága (OLM-ILM, mely ugyan nem a retina teljes vastagságát reprezentálta, de azzal arányos), a külső magvas réteg (ONL), a külső rostos réteg (OPL), a belső magvas réteg (INL), a belső rostos réteg (IPL) vastagsága, valamint a ganglionsejtek rétegében (GCL) levő sejtek száma 100 μ m retinahosszra nézve, és a sejtszám az INL-ben 500 μ m²-en.

6. Elektroretinográfia (ERG)

24 órával a BCCAO operáció előtt minden állatról kontroll ERG regisztrátum készült, majd ismételt mérést végeztünk a 2. és a 14. posztoperatív napokon. Az állatokat a mérés alatt intraperitoneálisan adott ketamin és xylazin keverékével altattuk.

Cyclopentolate szemcseppel pupillatágítást, oxybuprocaine szemcseppel helyi érzéstelenítést végeztünk minden mérés előtt a vizsgált szemeken. A mérés alatt az állatok fejét sztereotaxiás keretben rögzítettük, ezzel kűszöböltük ki a légzésből ill. egyéb nem kívánt mozgásokból adódó durva műtermékek keletkezését. Az aktív corneális és a szemzugban elhelyezett referencia elektródák között regisztrált jeleket differenciál elvű erősítővel amplifikáltuk, majd analóg-digitális átalakító segítségével regisztráltuk. A kiváltott fényválaszt közvetlenül az állatok szeme elé helyezett LED fényforrások periodikus felvillanásával hoztuk létre; a stimulusokat az analóg-digitális átalakítóba integrált jelgenerátor biztosította.

Minden mérés során 150 fényválaszt regisztráltunk mindkét csatornán (jobb és bal szem) egy időben, majd ezeket az analóg-digitális átalakító szoftverének segítségével, a stimulusok alapján kapuzva átlagoltuk. Az átlagértékek alapján képzett görbét szoftveresen ábrázoltuk, majd ugyanezen program segítségével végeztük a standard ERG értékeléshez szükséges méréseket a görbékben (amplitúdó, latencia).

EREDMÉNYEK

1. Morfológia és morfometria

Inhalációs anesztetikus prekondicionálás hatása iszkémia indukálta retinadegenerációban

Morfológia

Fénymikroszkóppal morfológiai különbség nem volt látható az izoflurán, és szevoflurán prekondicionált, ill. a nem prekondicionált SHAM állatok retinája között. SHAM operált csoporttal összehasonlítva a BCCAO-n átesett állatok retinája súlyos fokban degenerálódott, mely degeneráció valamennyi retinális réteget érintette, a retina teljes vastagsága nagymértékben csökkent két héttel a ligációt követően. A sejtes rétegekben nagy területen sejthiányok, degenerálódó, denz, piknotikus magok voltak megfigyelhetőek; a GCL-ben a sejtszám nagymértékben csökkent.

Az intakt retinához hasonló, jóval megőrzöttebb szövettani kép volt látható mind az izoflurán, mind a szevoflurán prekondicionált csoportok esetében BCCAO-t követően. Az izoflurán csoporttal összehasonlítva jóval szembetűnőbb volt a prekondicionálás protektív hatása a szevoflurán esetében: az INL és ONL rétegek nem mosódtak egymásba, az ONL-ben a sejtszlopok elkülöníthetők maradtak.

Sejtszám a GCL-ben

A prekondicionált ill. a nem prekondicionált csoport között különbség nem volt tapasztalható a SHAM csoportokban. Morfometriai vizsgálattal a BCCAO okozta degeneráció szignifikáns mértékű volt a nem prekondicionált SHAM állathoz viszonyítva mind az izoflurán, mind a szevoflurán csoportban. Szignifikánsnak bizonyult mind az izoflurán, mind a szevoflurán protektív hatása.

Teljes retinavastagság ill. az egyes retinális rétegek vastagsága külön-külön

Az **izoflurán csoport** estében (a vékony OPL kivételével) minden vizsgált rétegben és a teljes retinavastagság esetében is szignifikáns volt a BCCAO okozta degeneráció. A prekondicionálás protektív hatása csak a teljes vastagság, ill. az ONL esetében érte el a szignifikáns szintet.

A **szevoflurán csoportban** minden vizsgált rétegben (az ONL kivételével) és a teljes retinavastagság esetében szignifikáns volt a BCCAO okozta károsodás mértéke. Minden vizsgált paraméter esetében szignifikáns mértékű volt a prekondicionálás protektív hatása.

Összehasonlítva a két különböző prekondicionáló ágens protektív hatását, az izofluránhoz viszonyítva a szevoflurán szignifikáns mértékben protektívabb volt a teljes retinavastagság, ill. az INL és IPL tekintetében is.

Iszkémia indukálta retinadegeneráció PACAP KO és vad egereken

Morfológia

Morfológiai vizsgálatokkal a szolvenssel kezelt SHAM vad típusú állatok retinája és a szolvenssel kezelt SHAM homozigóta PACAP KO egerek között nem volt kimutatható különbség. A KO állatok retináját vizsgálva elmondható, hogy a vad típusal összehasonlítva sem annak teljes vastagsága, sem az egyes rétegek vastagsága nem tért el a vad típus retinájától. Nem voltak láthatóak sejtpusztulás, vagy szöveti degeneráció jelei, a szöveti struktúra hasonló volt.

Sem a vad, sem a KO csoport esetében nem volt kimutatható különbség a PACAP kezelt ill. a szolvenssel kezelt SHAM állatok között. Ezen eredmények egyeztek korábbi megfigyeléseinkkel, melyek szerint az intravitreálisan beadott PACAP-nak az intakt retinára nincs hatása.

10 perc BCCAO kezelés hatására a vad típusú állatok retinája súlyosan károsodott. A teljes vastagság jól láthatóan csökkent ugyanúgy, mint az egyes rétegek vastagsága külön-külön. Legszembetűnőbb volt a csökkenés az IPL és a GCL rétegekben. Kismértékben az ONL és az INL rétegek vastagsága is csökkent, de sokkal látványosabb volt ezen rétegek szövettani struktúrájának fellazulása, a magok számának csökkenése, a sejt- és szövethézagok, valamint a piknotikus sejtek jelenléte.

A homozigóta PACAP KO állatok retinája 10 perc BCCAO után hasonló képet mutatott, mint a vad típusé, ám a degeneráció mértéke sokkal súlyosabb volt. A vad típusnál már ismertetett számos szöveti- és sejtdegenerációt jelző elváltozáson felül szembetűnő volt az OPL eltűnése, valamint az IPL-ben megjelenő számos, 1µm átmérőjű denz folt, melyek egyenletes eloszlása a bipoláris sejterminálisok degenerálódására utalhat.

Tíz perc BCCAO-t követően adott intravitreális PACAP kezelés mind a vad típus, mind a homozigóta PACAP KO állat esetében csökkentette a degeneráció mértékét. A protektív hatás megközelítőleg azonos mértékű volt a két csoport esetében. Mindössze a teljes vastagság tekintetében láttunk enyhe különbséget, mely minimális különbség feltételezhetően az IPL kisebb megtartottságának tudható be. A protektív hatás jeleként nagymértékben megőrzött szöveti struktúrát találtunk az ONL-ben (a magoszlopok nagyrészt megtartottak voltak), az INL-ben, és a GCL-ben is. Szövethézagok, piknotikus sejtek csak kis számban voltak jelen.

Teljes retinavastagság

A vad SHAM és a homozigóta PACAP KO SHAM állatok retinája között nem találtunk különbséget. Az áloperált állatok retinájához viszonyítva mind a vad, mind a KO állatok retinája szignifikánsan degenerálódott 10 perc BCCAO hatására, de a KO állatok retinájának vastagsága szignifikánsan nagyobb mértékben csökkent, mint a vad típusé. A PACAP kezelés a KO állatok esetében szignifikánsan csökkentette a degenerációt.

Egyes retinális rétegek vastagsága

Szignifikáns mértékben degenerálódott az **ONL** a KO állatok esetében BCCAO hatására, valamint a PACAP kezelés is szignifikáns mértékben bizonyult protektívnek ebben a csoportban. Az **OPL** vastagságát vizsgálva elmondható, hogy BCCAO hatására szignifikáns sejtpusztulás volt észlelhető mindkét csoportban, azonban az exogén PACAP adásnak nem volt statisztikailag igazolható pozitív hatása.

Az **INL**-ben detektált változások bizonyultak a 10 perc BCCAO által létrehozott károsodás legjobb indikátorának. BCCAO hatására szignifikáns sejtpusztulás volt megfigyelhető a vad csoportban. Nagymértékű, szignifikáns degeneráció volt detektálható a KO állatokban is BCCAO hatására, ennek mértéke a BCCAO-n átesett vad csoporttal összehasonlítva szignifikánsan nagyobb volt. PACAP kezelést követően a KO csoportban szignifikáns protektív hatást mértünk.

Az **IPL** réteget vizsgálva szignifikáns különbség volt kimutatható az áloperált vad és az áloperált homozigóta KO állatok retinája között. BCCAO hatására mind a vad, mind a KO csoportokban szignifikáns degenerációt észleltünk, ennek mértéke pedig szignifikánsan nagyobb volt a KO csoportban. Az exogén PACAP kezelés a vad csoportra nem gyakorolt kimutatható hatást, a KO állatok esetében azonban a protekció szignifikáns volt.

Sejtszám változása a GCL-ben

Nem mutatkozott különbség a két áloperált csoport között ezen paraméter tekintetében. A vad SHAM csoportot véve viszonyítási alapnak mind a vad, mind a homozigóta PACAP KO állatok esetében szignifikánsnak bizonyult a BCCAO hatása éppúgy, mint a PACAP kezelése. A BCCAO-n átesett KO állatok esetében a sejtszám csökkenés szignifikánsan nagyobb volt, mint a vad típus esetében. A PACAP kezelés protektív hatása a KO csoportban bizonyult szignifikánsnak.

Sejtszám az INL-ben

A két áloperált kontrollcsoport között nem találtunk különbséget. A BCCAO okozta degeneráció mindkét csoportban szignifikáns mértékű volt. A PACAP kezelés protektív hatása ezen paraméter esetében nem volt kimutatható.

Intravitreális VIP kezelés protektív hatása iszkémia indukálta retinadegenerációban

Morfológia

Az áloperált állatok esetében az intravitreális VIP kezelés (100pm ill. 1000pm) nem okozott morfológiai változást. Krónikus iszkémia hatására korábbi eredményeinknek megfelelően a retina teljes szerkezete károsodott. Az intravitreálisan alkalmazott 100pm-os koncentrációjú VIP nem okozott látható eltérést, BCCAO-t követően a degeneráció mértéke a kezeletlen állatokéval megegyező volt. 1000pm-os

kezelést követően az intakt retinához nagymértékben hasonló, a kezeletlen iszkémiás állattal összehasonlítva jóval megkíméltebb szövettani szerkezetet találtunk.

Morfometria

A **100pm-os kezelési csoport** esetében morfometriai vizsgálataink igazolták a BCCAO okozta károsodást: a teljes retina vastagság, valamennyi nukleáris és plexiform réteg vastagsága, ill. a károsodásra igen érzékeny GCL sejtek esetében is szignifikáns volt a degeneráció mértéke a SHAM állatokhoz viszonyítva. Egyetlen vizsgált paraméter esetében sem tudtunk különbséget kimutatni a 100pm-os VIP kezelt csoport ill. a BCCAO-n átesett kezeletlen csoport között.

Az **1000pm-os kezelési csoportban** szintén valamennyi vizsgált paraméter esetében szignifikáns BCCAO hatást találtunk. Szignifikáns protektív hatást tudtunk igazolni a teljes retinavastagság, a külső és belső nukleáris réteg, a belső plexiform réteg, ill. a GCL sejtszám esetében.

Korábbi eredményeinkre alapozva összehasonlítottuk a VIP és a PACAP kezelés effektivitását. A PACAP kezelés már 100pm-os koncentrációban is az 1000pm-os VIP kezeléssel megegyező protektív hatást fejtett ki; az egyes retinális rétegeket külön-külön vizsgálva a két szer hatása között nem volt statisztikailag kimutatható különbség. Összehasonlítva a két kezelés neuroprotektív hatását a GCL sejteken, szignifikánsan nagyobbak találtuk a 100pm-os PACAP protektív hatását.

2. Elektroretinográfia

Iszkémia indukálta retinadegeneráció PACAP KO és vad egereken

Az ERG regisztrátumokon a BCCAO okozta *b* hullám amplitúdó csökkenés a PACAP KO csoport esetében kifejezettebb volt, mint a vad típusú csoportban. Az intravitrealisan injektált exogén PACAP csökkentette a *b* hullám amplitúdó csökkenés mértékét a PACAP KO csoportban.

Az ERG regisztrátumok morfometriai analízise során az *a* és *b* hullámok amplitúdóját hasonlítottuk össze a különböző kísérleti csoportokban. Szignifikánsnak bizonyult mind a BCCAO, mind a PACAP kezelés hatása az *a* és *b* hullámok esetében. A kezeletlen, BCCAO-n átesett KO állathoz viszonyítva a vad típus *b* hulláma szignifikánsan nagyobb volt a BCCAO-t követően. Az *a* hullám eltérése nem bizonyult

szignifikánsnak. Szignifikánsnak találtuk mind az *a*, mind a *b* hullám változásának mértékét exogén PACAP hatására.

Intravitrealis PACAP kezelés hatása iszkémia indukálta retinadegeneráció esetén

Az ERG regisztrátumokon morfológiai különbség nem volt megfigyelhető az intravitrealisan PACAP-pal kezelt kontrollcsoport, ill. a szolvenssel kezelt kontroll állatok között. BCCAO hatására a 2. posztoperatív napon mind a két csoportban markáns *b* hullám depresszió, *a* hullám növekedés, oszcillátoros potenciál mező kiszélesedés volt tapasztalható; ezen hatások azonban a kezelt csoportban kisebb mértékűek voltak. A 14. posztoperatív napon készült regisztrátumokon a szolvenssel injektált csoportban a korábbi degeneratív jelek fokozódása volt megfigyelhető; ezzel ellentétben a PACAP kezelt csoportban a 2. naphoz viszonyítva a degeneráció mértéke jóval kisebb volt a 14. napon.

Az ERG regisztrátumok morfometriai vizsgálata során az egyes hullámokat külön-külön vizsgálva szignifikáns amplitúdó csökkenés volt kimutatható BCCAO hatására a kontrollcsoporthoz viszonyítva a *b* hullám esetében, ill. szignifikánsan nagyobb amplitúdó volt mérhető PACAP kezelés esetén. Az *a* hullámot vizsgálva csak a BCCAO-n átesett állatok esetében volt detektálható szignifikáns változás. A *c* hullám amplitúdója egyik csoportban sem mutatott változást.

A *b* hullámok amplitúdóját vizsgálva a 2. ill. a 14. posztoperatív napon elmondható, hogy mindkét időpontban szignifikáns mértékű volt a BCCAO okozta csökkenés. A PACAP kezelt csoportban a protektív hatás már a 2. napon észlelhető volt, azonban szignifikáns mértékű hatást csak a 14. napon tudtunk kimutatni.

A *b/a* hullámok amplitúdóhányadosát vizsgálva nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a kísérleti csoportok között. A *b/a* hullámok idő latencia hányadosát vizsgálva a BCCAO okozta degeneráció mértéke szignifikánsnak bizonyult a kontrollcsoporthoz viszonyítva, a PACAP kezelt csoport esetében nem tudtunk eltérést kimutatni.

Az oszcillátoros potenciál mező szélessége szignifikáns mértékben csökkent BCCAO hatására, ez a hatás pedig szignifikáns mértékben volt kisebb a PACAP kezelt csoport esetében.

DISZKUSSZIÓ

1. Inhalációs anesztetikus prekondicionálás hatása iszkémia indukálta retinadegenerációban

A nagyszámú in vitro és in vivo állatkísérlet mellett emberi vizsgálatok is igazolták az inhalációs anesztetikumok szívre, májra, vesére és központi idegrendszerre kifejtett prekondicionáló hatását. Cerebrális iszkémia esetén a szevoflurán, az izoflurán és a halotán prekondicionáló hatását is leírták. Bár több prekondicionáló ágens is sikerrel vizsgáltak retinopátiás modelleken, az anesztetikus prekondicionálás retinális hatásairól korábbi közlemény nem szólt. Munkacsoportunk számos más neuroprotektív szer vizsgálatában korábban már eredménnyel használt, standardizált modellen bizonyította mind az izoflurán, mind a szevoflurán prekondicionáló hatását morfológiai módszerrel; utóbbiról elsőként közölt adatokat. A két szer összehasonlítva, a szevoflurán protektív hatása szignifikánsan nagyobb volt az izoflurán hatásánál.

Annak ellenére, hogy a szevoflurán prekondicionálás neuroprotektív hatását számos esetben bizonyították, a pontos hatásmechanizmus nem ismert. Feltehetőleg igen komplex, számos sejttéltani rendszert magában foglaló folyamatról van szó, melynek egyes elemeit ma már magyarázni tudjuk. Bizonyított, hogy a szevoflurán prekondicionálás hatására ROS mediátorokon keresztül az antioxidáns enzimek up-regulálódnak. Anti-inflammatorikus mechanizmusra szintén számos eredmény utal. Protein kinázok, pl. extracelluláris szignál által szabályozott protein kinázok szerepe is bizonyított. Mind a pre-, mind a poszt-kondicionáló hatás kialakulásához nélkülözhetetlen az ATP érzékeny K^+ csatornák szerepe is. Az inhalációs anesztetikumok sejtmembránt hiperpolarizáló hatása szintén fontos tényezőnek bizonyult. Mivel ez a mechanizmus a szevoflurán esetében sokkal erősebb, mint az izoflurán esetében, ezért ez részben magyarázhatja a két szer prekondicionáló hatása közti különbséget. Számos antiapoptotikus útvonal aktivációját is kimutatták szevoflurán expozíciót követően. A prekondicionálás retinoprotektív hatásának pontos mechanizmusáról nincsenek adatok, azonban azt feltételezve, hogy mind a cerebrális, mind a retinális iszkémiás degeneráció mechanizmusa hasonló, az eddigi eredmények a

neuroprotektív effektus háttérben felhasználhatóak a retinoprotektív mechanizmusok magyarázatára is.

2. Iszkémia indukálta retinadegeneráció PACAP KO és vad egereken

A látásvesztés egyik legfőbb oka a retina iszkémiás károsodása, számos betegség háttérben (iszkémiás optikus neuropátia, retinopátia arteriális elzáródást követően, vénás trombózis, diabéteszes retinopátia, csecsemőkori retinopátia, öregségi makulopátia, glaukóma) ez a mechanizmus áll. Számos különböző állatmodellt használtak eredményesen az iszkémiás retinakárosodás mechanizmusának megértéséhez, ill. a protektív kölcsönhatások feltérképezéséhez.

A PACAP neurotrófikus és neuroprotektív hatása igen sok különböző modell esetében bizonyítást nyert, így fokális és globális agyi iszkémia esetén is. Munkacsoportunk ezen eredményekre alapozva korábbi kísérleteivel bizonyította az intravitreális PACAP kezelés protektív hatását BCCAO indukálta krónikus hipoperfúziós retinadegenerációs modellben. A regenerációs folyamatokban játszott jelentős szerepe feltehetőleg erős embrionális neuronális differenciációs hatásával magyarázható. Ezen feltételezést alátámasztják azon közlemények, melyek neuronális sérülést követően aktiválódó endogén PACAP expresszióról ill. PACAP KO állatokon neuronális károsodás esetén csökkent toleranciáról számoltak be. Az endogén PACAP védő hatása iszkémiás károsodás esetén is kifejezett: PACAP KO egerekben cerebrális iszkémia modellben kiterjedtebb infarktusz területet figyeltek meg. Alapozva ezen eredményekre, jelen kísérletünkben bizonyítottuk a PACAP KO egerek megnövekedett érzékenységét BCCAO indukálta tranziens iszkémia-reperfúziós retinadegenerációs modellben. Mind a főbb hisztomorfológiai paraméterek, mind az ERG vizsgálatok szignifikánsan nagyobb károsodást mutattak a KO állatok esetében. A vad és KO állatok között az intakt retinát vizsgálva nem találtunk kimutatható különbséget. A degeneratív hatás kísérletünkben mind morfológiai, mind funkcionális eredmények alapján szignifikánsan csökkenthető volt exogén PACAP intravitreális adásával. Korábban számos különböző modellen bizonyítást nyert az exogén PACAP protektív szerepe: excitotoxikus károsodás, nervus opticus átvágás, anisomycin indukálta laesio, UV fény indukálta degeneráció, koraszülöttek ideghártya károsodása. Az endogén PACAP gátlása intravitreálisan adott antagonistá hatású PACAP6-38-cal súlyosbította a

glutamát okozta excitotoxikus hatást és aktiválta a proapoptotikus szignáltranszdukciós utakat. Endogén PACAP teljes hiányában a KO állatok retinája gyorsabban öregszik, az öregedés során kialakuló károsodások mértéke nagyobb. Az endogén PACAP részleges hiánya is kimutatható károsodást okoz: heterozigóta KO állatokat vizsgálva NMDA toxicitás modellben a retinális ganglionsejtek pusztulása nagyobb volt. Munkacsoportunk eredményeihez hasonlóan ezen kísérletek is bizonyították, hogy a protektív hatás 2 héttel az iszkémia-reperfúziós károsodás után is kimutatható, tehát a PACAP egy hosszú hatású neuroprotektív peptid.

Eredményeinkkel összhangban, az idegrendszeren kívül számos más szervrendszerben is igazolódott az endogén PACAP hiányának negatív hatása. Renális ill. intesztinális iszkémia-reperfúzió esetén a KO állatok sebezhetősége nagyobb volt. Az endogén PACAP antiinflammatorikus hatásának hiányában a KO állatok mind colitis, mind légúti gyulladás modellekben sokkal súlyosabb tüneteket mutattak, a gyulladásos aktivitás jóval nagyobb volt. Doxorubicin indukálta kardiomiopátiában a KO állatok mortalitása jóval nagyobb volt, melynek hátterében a nagyobb mértékű fibrózis és degeneratív elváltozások, nagyobb mennyiségű ROS felszabadulás igazolódott.

3. Intravitreális VIP kezelés protektív hatása iszkémia indukálta retinadegenerációban

A VIP egy multifunkcionális peptid; vazóaktív, immunmoduláló, antiinflammatorikus, viselkedést befolyásoló hatásai jól ismertek. A vele egy peptidcsaládba tartozó, ugyanazon receptorokhoz, de más affinitással kötődő PACAP iszkémiás protektív hatása mellett retinoprotektív hatása is jól ismert. A VIP retinoprotektív hatásáról csak kevés adat áll rendelkezésre. Mind a PACAP (in vitro és in vivo), mind a VIP (in vitro) igen potens protektív hatást fejt ki glutamát indukálta excitotoxikus retinakárosodás esetén. Fény indukálta retinopátia esetén szintén mindkét peptid hatásosnak bizonyult: a PACAP csökkentette az UV-fény okozta retinadegeneráció mértékét munkacsoportunk korábbi kísérletében. A retinában az endogén VIP-szint csökkenés miatt feltételezik a VIP protektív hatását streptozotocin indukálta diabéteszes retinopátiában. A PACAP protektív hatását ugyanezen modellben munkacsoportunknak sikerült igazolnia.

Mind a VIP, mind a PACAP protektív hatása igazolódott iszkémiás/hipoxiás retinális károsodás esetén. Iszkémia-reperfúziós modellben (ophthalmicus erek lekötése) a VIP mind intravitreálisan, mind szisztémásan adva csökkentette az oxidatív stresszt, valamint a lipid peroxidáció mértékét. Kilencven perc iszkémia, majd 3 óra reperfúziót követően a VIP kezelt csoportokban csökkent a szövettani károsodás mértéke. Ezen eredmények összhangban vannak jelen kísérletünk eredményeivel, melyben sikerrel mutattuk ki a VIP neuroprotektív hatását a retinában iszkémiás degeneráció esetén. Eredményeink bizonyítékot szolgáltatnak a VIP hosszú távú neuroprotektív hatására is, mivel kísérletünkben a hatás 2 héttel a BCCAO operációt követően is megfigyelhető volt. Kiemelendő továbbá, hogy az általunk használt dózis alacsonyabb volt, mint a fentebb ismertetett kísérletben: 1 nmol VIP intravitreális injektálása már hatásosnak bizonyult, kisebb koncentráció esetén szövettani változás nem volt kimutatható. Korábbi eredményeinket felhasználva összehasonlítást végeztünk, mellyel megállapítható volt, hogy a PACAP kezelés már 100pmol-os koncentrációban azonos hatást fejt ki, mint az 1nmol-os VIP kezelés. Az egy nagyságrendnyi különbség az effektív dózisban a két szer között számos más modellben is bizonyítást nyert korábban. Néhány esetben ellentétes hatást is megfigyeltek: míg a neonatális excitotoxikus fehérállomány károsodást a VIP csökkenteni képes, a PACAP ugyanezen modellben hatástalan. Összességében a rendelkezésre álló eredmények alapján feltételezhető, hogy a PACAP azon modellekben effektívebb a VIP-nél, melyekben a sejtpusztulás legfőbb oka az apoptózis. Azon modellek esetén, ahol a károsodásért inflammációs mechanizmusok felelnek, a VIP a PACAP-pal megegyező, vagy erősebb hatást képes kiváltani. Jelen kísérletben használt BCCAO modell esetében feltehetőleg az apoptózis mediálta sejtpusztulás dominál, ezért bizonyult a PACAP hatásosabbnak a VIP-nél; a retinoprotektív mechanizmusok kialakításában pedig a PACAP-ra szenzitívebb PAC1 receptor dominál. A PAC1 receptorra szelektív, agonista hatású maxadilánnal végzett kísérleteink igazolták ez utóbbi feltevést: a BCCAO-ban PACAP kezelés mellett már kimutatott retinoprotektív hatás kiváltható maxadilánnal is.

A VIP neuroprotektív hatásának molekuláris háttere nem teljesen ismert. A PACAP-pal azonos affinitással kötődik a VPAC1 és VPAC2 receptorokhoz. A PAC1 receptorhoz is kötődik, de kisebb affinitással, mint a PACAP. A komplex hatás kialakításában antiapoptotikus, anti-inflammatórikus, antioxidáns hatások dominálnak. Indirekt hatása is ismert: indukálja a neuroprotektív fehérjék szintézisét és szekrécióját az asztrocitákban. A legtöbb tanulmányban a PACAP antiapoptotikus hatását erősebbnek

találták a VIP-vel összehasonlítva, míg az anti-inflammatórikus hatásokat vizsgálva a VIP bizonyult potensebbnek

4. Intravitreális PACAP kezelés hatása iszkémia indukálta retinadegeneráció esetén

Munkacsoportunk elsőként bizonyította a PACAP retinoprotektív hatását BCCAO indukálta retinadegeneráció esetén morfológiai és neurokémiai eredmények alapján. Arra vonatkozólag azonban, hogy a protektív hatás funkcionálisan is kimutatható-e, nem voltak adataink. Elektroretinográfiás vizsgálatok során egy komplex elektromos választ kapunk, amelynek létrehozásában valamennyi retinális réteg részt vesz a pigment epitheliumtól egészen a belső rétegekig, képet adva így a retina funkcionális állapotáról. A módszer előnye továbbá, hogy non invazív, ismételhető mérésekre ad lehetőséget, így alkalmas a funkcionális változások időbeli követésére, a retinális diszfunkció korai detektálására. Jelen kísérlettel korábbi morfológiai és neurokémiai eredményeinket kívántuk alátámasztani parallel elvégzett funkcionális vizsgálatokkal. A kontrollméréseink során detektált ERG regisztrátumok mért paraméterei minden esetben a korábban publikált normálérték tartományokon belül voltak.

BCCAO hatására a retina perfúziója jelentősen csökken. A súlyos iszkémiás hatás először a retinális ganglionsejteket érinti, pusztulásuk kiemelkedően magas BCCAO-t követően. Később a károsodás kiterjed a belső retina többi rétegére, végül a fotoreceptorok károsodása is bekövetkezhet. Munkacsoportunk 2 hét elteltével végzett vizsgálatait szintén valamennyi sejtes réteg nagymértékű károsodását mutatták. Összhangban korábbi publikációkkal elmondható, hogy jelen kísérletünkben a *b* hullám bizonyult a legszenzitívebbnek a funkcionális változások igazolására BCCAO indukálta retinális iszkémia modellben. A PACAP funkcionális protektív hatását legmarkánsabban ugyancsak a *b* hullám amplitúdójának megváltozása mutatta. Korábbi tanulmányok az oszcillátoros potenciálokat (OP) alkalmasnak találták a retinális cirkuláció abnormalitásainak detektálására. A diszfunkció kvantitatív, objektív, igen korai markereinek bizonyultak nemcsak iszkémiás károsodás, de diabéteszes retinopátia esetén is. Utóbbi megfigyelést feltehetőleg a folyamat során romló retinális cirkuláció, ill. a felszabaduló ROS magyarázza.

Támaszkodva korábbi hisztológiai, és neurokémiai vizsgálatainkra, jelen kísérletünk eredményei alapján elmondható, hogy a PACAP terápia csökkentette a funkcionális károsodások mértékét. Összehasonlítva a preoperatív (kontroll) értékekkel, kísérletünkben az *a* és *b* hullámok amplitúdója erősen csökkent a BCCAO-t követően, a PACAP terápia azonban csökkentette a műtét által kiváltott funkcionális változásokat. A PACAP kezelés teljes mértékben nem tudta visszafordítani a műtét okozta degenerációt, azonban már a 2. posztoperatív napon megfigyelhető volt a protektív hatás, mely a vizsgált 2 hetes intervallumában tartósnak bizonyult.

Kísérletünkéből kiemelendő két érdekes megfigyelés. Az első, hogy BCCAO-t követően az *a* hullám amplitúdója meredeken emelkedett, feltehetőleg az aránylag késői, kismértékű fotoreceptor károsodás ill. az intraretinális feedback mechanizmusok megszakadása miatt. Alátámasztja ezt az elképzelést, hogy az ONL károsodása sokkal kisebb mértékű volt, mint a belső retinális rétegeké; ill. az, hogy a fotoreceptorok komolyabb hisztológiai eltérést nem mutattak. Második megfigyelésünk, hogy a *b/a* arány nem emelkedett a PACAP kezelést követően, ellentétben a *b* hullámnál megfigyelt hatással. Ennek oka feltehetőleg az, hogy a 2 hetes mérési idő nem volt elegendő ahhoz, hogy a fotoreceptorok retrográd károsodása kialakuljon.

Jelen kísérletünk megfigyelései összhangban vannak azon korábbi eredményünkkel, melyben excitotoxikus retinakárosodás modellben a PACAP protektív hatását morfológiai vizsgálatokkal parallel végzett funkcionális (ERG) módszerrel is igazoltuk. Két különböző retinadegenerációs modell eredményei alapján összegezve elmondható tehát, hogy a PACAP kezelés védő hatása nemcsak morfológiai és neurokémiai változásokat okoz, hanem ezzel párhuzamosan a funkció is kedvező irányban változik.

ÚJ EREDMÉNYEK

- Kísérleteinkkel igazoltuk az inhalációs anesztetikumok retinoprotektív hatását iszkémiás állatmodellben, ill. elsőként vizsgáltuk két különböző anesztetikum (izoflurán, szevoflurán) retinoprotektív hatásának egymáshoz viszonyított mértékét.
- Igazoltuk a PACAP KO egerek csökkent toleranciáját retinadegenerációs modellben iszkémia-reperfúziós károsodás esetén morfológiai és funkcionális módszerekkel.
- Igazoltuk morfometriai vizsgálatokkal az intravitreális VIP kezelés protektív hatását krónikus hipoperfúziós modellen (BCCAO). Felhasználva korábbi adatainkat

megállapítottuk, hogy az effektív kezeléshez szükséges VIP dózis tízszer nagyobb, mint a PACAP kezelése.

- ERG vizsgálatok elvégzésével funkcionális eredményekkel tudtuk alátámasztani a patkány BCCAO modellen korábban már hisztológiai és immunhisztológiai módszerekkel bizonyított retinoprotektív PACAP hatást. Non invazív vizsgálatainkkal a károsodás ill. a protektív hatás időbeli lefolyásáról is tudtunk eredményeket közölni.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként mondanék köszönetet témavezetőimnek: dr. Reglódi Dóra professzor asszonynak, aki TDK-s koromtól kezdve nagy bizalommal, és még nagyobb türelemmel irányította kutatói tevékenységemet; ill. dr. Bártai Istvánnak, aki klinikai orvosi munkám során volt állandó mentorom, pártfogóm.

Köszönöm dr. Szabadfi Krisztina mindenre kiterjedő segítségét, gondosságát, pontosságát, barátságát. A hét bármely napján, soron kívül, önzetlenül és vidáman segített bármiben, amivel csak hozzá fordultam. Fájó szívvel őrizzük emlékét.

Köszönöm dr. Gábrriel Róbert professzor úrnak, hogy a Természettudományi Kar Kísérletes Állattani és Neurobiológiai tanszékével közös kísérletekben munkámat segítette Kovács-Valasek Andreával és dr. Szalontai Bálinttal együtt.

Köszönöm dr. Kovács Zsoltnak, hogy pótolhatatlan lehetőséget biztosított számomra az ERG vizsgálatok alapjainak elsajátítására a Nyugat-Magyarországi Egyetem Savaria Egyetemi Központjában működő laborjában. Kollégáit is köszönet illeti türelmükért, segítségükért.

Köszönöm dr. Mihalik Ágoston, Leeseug Woo, Alan Brunker, Gábris Fanni, dr. Kvárik Tímea, dr. Mammel Barbara, Váczy Alexandra, dr. Atlasz Tamás és Lőkös Emese közvetlen segítségét, melyel az ERG vizsgálatok gyorsabb, pontosabb elvégzését lehetővé tették.

Köszönöm dr. Kiss Péternek, hogy az állatkísérletek terén szerzett páratlan rutinjával a kezdetektől segítette gyakorlati munkámat. Továbbá köszönetet szeretnék mondani az Anatómiai Intézet, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, és a Központi Állatház valamennyi dolgozójának a kísérleteim során nyújtott segítségért.

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy nemcsak türelmükkel, hanem sokszor tevőlegesen is segítették kutatásaimat, vagy a labor kialakítását.

Köszönöm édesapámnak, Dányádi Tibornak, hogy bokros teendői mellett az ERG vizsgálatokhoz szükséges hardver és szoftver fejlesztésére is időt tudott szakítani.

Támogatók: GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS”; KTIA 13 NAP-A-III/5, Centre for Neuroscience of the University of Pecs, MTA-TKI.

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk jegyzéke

Dányadi B., Szabadfi K., Reglodi D., Mihalik A., Dányadi T., Kovacs Zs., Batai I., Tamas A., Kiss P., Toth G., Gabriel R. (2014) PACAP application improves functional outcome of chronic retinal ischemic injury in rats – evidence from electroretinographic measurements. *J. Mol. Neurosci.*; 54: 293-299 (IF: 2,343)

Szabadfi K., **Dányadi B.***, Kiss P., Manavalan S., Gabriel R., Reglodi D., Tamas A., Trasy D., Batai I. (2012) Preconditioning with volatile anaesthetic sevoflurane in ischemic retinal lesion in rats. *J. Mol. Histol.*; 43: 565-569 (IF: 1,551). (*Megosztott első szerző)

Szabadfi K., Atlasz T., Kiss P., **Dányadi B.**, Tamas A., Helyes Zs., Hashimoto H., Shintani N., Baba A., Toth G., Gabriel R., Reglodi D. (2012) Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotox. Res.*; 21: 41-48. (IF: 2,865)

Szabadfi K., **Dányadi B.**, Kiss P., Tamas A., Fabian E., Gabriel R., Reglodi D. (2012) Protective effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) in ischemic retinal degeneration. *J. Mol. Neurosci.*; 48: 501-507 (IF: 2,891)

A disszertációhoz nem csatlakozó publikációk jegyzéke

Werling D., Reglodi D., Banks W.A., Salameh T.S., Kovacs K., Kvarik T., Vaczy A., Kovacs L., Mayer F., **Dányadi B.**, Lokos E., Tamas A., Toth G., Biro Z., Atlasz T. (2016) Ocular Delivery of PACAP1-27 Protects the Retina From Ischemic Damage in Rodents. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; 1;57(15):6683-6691.(IF: 3.303)

Atlasz T., Vaczy A., Werling D., Kiss P., Tamas A., Kovacs K., Fabian E., Kvarik T., Mammel B., **Dányadi B.**, Lokos E., Reglodi D. (2016) Neuroprotective effects of PACAP in the retina. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP, szerkesztette Reglodi Dóra és Tamás Andrea, Springer Nature, New York. pp. 501-527., könyvfejezet

Dányadi B. (2015) Ebola vérzések: növekvő kockázat, nem csak Nyugat-Afrikában. *Honvédségi szemle*; 143., 97-106

Szabadfi K., Kiss P., Reglodi D., Fekete E.M., Tamas A., **Dányadi B.**, Atlasz T., Gabriel R. (2014) Urocortin 2 treatment is protective in excitotoxic retinal degeneration. *Acta. Physiol. Hung.*; 101: 67-76 (IF: 0,734)

Szabo A., **Danyadi B.**, Bognar E., Szabadfi K., Fabian E., Kiss P., Mester L., Manavalan S., Atlasz T., Gabriel R., Toth G., Tamas A., Reglodi D., Kovacs K.(2012) Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neurosci. Lett.*; 523: 91-98. (IF: 2,026)

Szabadfi K., Atlasz T., Reglodi D., Kiss P., **Danyadi B.**, Fekete E.M., Zorilla E.P., Tamas A., Szabo K., Gabriel R.. (2009) Urocortin 2 protects against retinal degeneration following bilateral common carotid artery occlusion in the rat. *Neurosci. Lett.*; 455: 42-45. (IF:1,925)