

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

# **Retinakárosodások farmakológiai kivédése**

Dr. Varga Balázs

TÉMAVEZETŐ: Prof. Dr. Tósaki Árpád



DEBRECENI EGYETEM  
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2014.

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

# **Retinakárosodások farmakológiai kivédése**

Dr. Varga Balázs

TÉMAVEZETŐ: Prof. Dr. Tószaki Árpád

DEBRECENI EGYETEM  
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2014.

**Retinakárosodások farmakológiai kivédése**  
Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Varga Balázs gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája  
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora  
tagok: Dr. Csont Tamás, PhD  
Dr. Káldi Ildikó, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2014. október 28. 11 óra, helye a Debreceni Egyetem GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára (Elméleti Tömb, 5. emelet)

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Facskó Andrea, PhD  
Dr. Pórszász Róbert, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Facskó Andrea, PhD  
Dr. Csont Tamás, PhD  
Dr. Káldi Ildikó, PhD  
Dr. Pórszász Róbert, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2014. október 28. 13 óra, helye a Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme.

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés és célkitűzés .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Anyagok és módszerek.....</b>	<b>3</b>
2.1. Kísérleti állatok .....	3
2.2. Iszkémia és reperfúzió (I/R) .....	3
2.3. Elektroretinográfia (ERG).....	4
2.4. Szövetteni és elektronmikroszkópos mintafeldolgozás.....	6
2.5. Western blot.....	8
2.6. Hemoxigenáz aktivitásmérés .....	9
2.7. Kísérleti protokollok és csoportok.....	10
2.7.1. PACAP-kísérlet .....	10
2.7.2. MSH-kísérlet 1. fázis .....	11
2.7.3. MSH-kísérlet 2.fázis .....	12
2.8. Statisztika .....	13
<b>3. Eredmények .....</b>	<b>14</b>
3.1. A PACAP-kísérlet eredményei .....	14
3.2. Az MSH-kísérlet I. fázisának eredményei .....	15
3.3. Az MSH-kísérlet II. fázisának eredményei .....	17
<b>4. Megbeszélés.....</b>	<b>18</b>
<b>5. Összefoglalás .....</b>	<b>25</b>
<b>6. Közlemények.....</b>	<b>26</b>
6.1. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	26
6.2. További közlemények.....	27
<b>7. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>30</b>

# 1. Bevezetés és célkitűzés

A retina károsodása a szemészeti megbetegedések jelentős hányadában kóroki tényezőként szerepel. Kísérleteinkben hatékony farmakológiai beavatkozások lehetőségeit tanulmányoztuk retinakárosító hatások kivédésére, mint amilyen a glutamát excitotoxicitás és az iszkémia-reperfúzió.

A glutamát és receptorai kulcs fontosságú szerepet játszanak a szem számos neurológiai betegségében valamint patológiai állapotaiban. A mononátrium-glutamát (MSG) – közvetlenül a szembe jutattva vagy újszülött korban akár még subcutan injekció formájában adva is – a belső retinális rétegek tönkretételéhez vezet. Hasonlóképpen az iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodást és a szöveti mikrocirkuláció változását is kóroki tényezőként írták le több szemészeti betegségben, mint például retinális érelzáródás, glaukóma, diabeteses retinopathia stb. Az I/R-társult megbetegedések pathogenezisének egyre alaposabb megismerése ellenére a klinikai gyakorlat számára jelenleg kevés bizonyított hatékonyságú neuroprotektív kezelés áll rendelkezésre.

A hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid (PACAP) egy endogén neuropeptid, nagyon hatékony neurotróf és neuroprotektív hatásokkal, melyről számos retinális degenerációs modellben bebizonyosodott, hogy retinoprotektív hatású. Hazai kutatócsoportok több bizonyítékot is szolgáltatottak már arra nézve, hogy a PACAP az MSG-indukálta retinális léziókban protektív valamint demonstrálták a PACAP védő hatását a retina neurokémiaileg beazonosított sejtípusain. Habár a fentebb említett adatok bizonyítják, a PACAP retinavédő hatásait, nem ismert, hogy vajon a morfológiai változások összefüggésben vannak-e a funkcionális károsodásokkal. Klinikai szempontból nézve nagyon fontos, hogy fel tudjuk mérni a lehetséges funkcionális javulást exogén PACAP-kezelés hatására. Ezért MSG-indukálta retina-károsodást felhasználva kísérletünk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a PACAP funkcionális retinavédő hatásait

elektroretinográfiás méréssel: elsődleges célunk volt a megbízható, reprodukálható méréseket kivitelezni tudó ERG-módszer alkalmazása.

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiban egy, a szervezetben is előforduló peptid hormonnal, az  $\alpha$ -melanocita-stimuláló hormonnal ( $\alpha$ -MSH) végzett kísérleteket. Az  $\alpha$ -MSH bizonyítottan megvédi a szívmot az iszkémia/reperfúzió (I/R) -indukálta károsodásoktól, valamint több kísérletben bebizonyosodott az  $\alpha$ -MSH I/R elleni védő hatása agy szövetben, vese szövetben, valamint a gasztrointesztinális traktusban is. Ezek a korábbi eredmények azt sugallják, hogy az  $\alpha$ -MSH képes lehet az iszkémia-reperfúziós károsodások – beleértve szemészeti betegségek – megelőzésére illetve kezelésére. Habár a szemészeti I/R indukálta kórképek jelentősen károsítják a retinát és annak funkcióját, az  $\alpha$ -MSH retinoprotektív hatására nézve átfogó vizsgálatok mindezidáig nem történtek. Kísérletünk célja volt bemutatni az  $\alpha$ -MSH védő hatását I/R-indukálta retinakárosodásban patkány modellen. Céljaink közé tartozott egy optimális kezelési dózis megállapítása elektroretinográfia segítségével, majd vizsgáltuk olyan iszkémia-reperfúziós paraméterek kezelés hatására történő változását, mint a szöveti ödéma, a retina sejtjeinek strukturális degeneratív elváltozása és az iszkémia-reperfúziós károsodásokban bizonyítottan protektív hatású hősokk fehérje, a hemoxigenáz 1 (HO-1) enzim expressziójának változása. További céljaink közt szerepelt olyan nem-HO-1-függő mechanizmusok létének bizonyítása vagy cáfolása, melyek esetlegesen hozzájárulhatnak az  $\alpha$ -MSH citoprotektív hatásához. Kutatócsoportunk feltételezése volt, hogy az  $\alpha$ -MSH az evolúció egy korábbi szakaszában fontos szerepet tölthetett be a szervezet védekező mechanizmusában (bőrszínváltoztató hatás), ennek alapján stressz hatására felszabaduló hormonként is viselkedhet. Ezért vizsgáltuk a posztiszkémiásan alkalmazott  $\alpha$ -MSH hatását is.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez Wistar és Sprague Dawley típusú patkányokat használtunk fel. A Wistar patkányok esetében az állatok tartására és velük való kísérleti munkára a Pécsi Tudományegyetem, míg a Sprague Dawley patkányok esetében a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság irányelveit tartottuk szem előtt, a vonatkozó Európai Unió előírásokkal összhangban.

Az újszülött Wistar patkányok 12 órás fény-sötét ciklusban voltak tartva, a táplálékhoz (standard rágcsáló táp) és vízhez szabad hozzáférésük volt. A 300-350g súlyú Sprague Dawley patkányokat a Charles River Laboratories Magyarország Kft-től rendeltük; az élelemhez (standard rágcsáló táp) és a vízhez szintén szabad hozzáférésük volt.

### 2.2. Iszkémia és reperfüzió (I/R)

Ketamin/xilazin-al (50/5mg/ttkg) történő általános érzéstelenítést követően a patkányok egyik szemét ellátó arteria centralis retinae sebészileg lekötésre került, egy korábbi cikkekben alkalmazott protokoll szerint: a szemhéjat varratokkal visszahúztuk, az állatok szemébe oxybuprokain tartalmú szemcseppet (Humacain, TEVA) cseppentettünk helyi érzéstelenítés céljából, majd egy külön erre a célra készített elszorítót (egy polietilén kanülön keresztül vezetett sebészeti varrófonál-hurok) alkalmaztunk az arteria centralis retinae lekötéséhez. A hurkot a szemgolyó mögé helyeztük, lazán a nervus opticus, az arteria centralis retinae, a ciliáris artériák és a retrobulbáris kötőszövet köré. A hurok megfeszítésével és a kanül nervus opticus felszínére felé történő nyomásával az iszkémia kiváltható volt és a kívánt ideig volt fenntartható (elektroretinográfiás vizsgálat előtt az iszkémia 30 perc, míg

szövetteni, molekuláris biológiai, elektronmikroszkópos vizsgálatok előtt 90 perc). A hurok folyamatos feszesen tartását egy, a sebészeti varróanyagot húzó érfogó biztosította a lekötés ideje alatt. Egy 120 D-s lencsével makroszkóposan ellenőriztük az iszkémiás állapotot. Az iszkémia ideje alatt a szem kiszáradás elleni védelmét egy karbomer-alapú szemgél (Vidisic, Bausch&Lomb) biztosította. A retina szövetének reperfúziója az elszorító iszkémia utáni felengedésével, így a vér arteria centralis retinae-n keresztüli visszaáramlásával valósult meg. Postoperatív fájdalomcsillapításra Algopyrin A.U.V. injekciót (metamisolum natricum 500,0 mg/ 1,0 ml) alkalmaztunk, fertőzések megelőzésére neomycin (Oculogutta Neomycini, FoNo VII) tartalmú szemcseppet használtunk. Az állatok felébredéséig szemük kiszáradás elleni védelmét ismét karbomer alapú szemgél biztosította (Vidisic, Bausch & Lomb) A reperfúziós periódus az állatok következő napon történő – egyes esetekben elektroretinográfiás mérés utáni – exterminációjáig tartott. A szövettani, molekuláris biológiai, elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a szemeket mindezek kivitelezése után kimetszettük.

### 2.3. Elektroretinográfia (ERG)

Ketamin/xilazin-al (50/5 mg/ttkg) történő általános érzéstelenítést követően az állatok mindkét szemébe pupillatágító ciklopentolát hidrokloridot (0,5 %; Humapent, TEVA) és fenilefrin hidrokloridot (10 %; Neosynephrin-HCL, Ursapharm) cseppentettünk. A kombinált altatóoldat összetétele a következő volt (egy fecskendőbe felszívva; 50/5 mg/ttkg): Ketamin (Calypsol 50 mg/ml 10 ml-es ampullákban; Richter Gedeon Gyógyszergyár Nyrt; Magyarország) és Xylazin (CP-Xylazin 2 % injekció A.U.V., 50 ml, CP-Pharma, Németország). Az elektroretinogramm rögzítéséhez minden mérésnél öt ezüst elektródot használtunk: két mérő, két referencia és egy általános föld elektródot. Miután a pupilla teljesen kitágult, az állatok mindkét szeme corneájának felszínére, a cornea legszélén óvatosan beszúrtunk egy-egy mérő

ezüst tőelektrodot felületesen úgy, hogy az a kötőszövetet ne érje és még véletlenül se perforáljuk vele a corneát. A két mérő elektrod ily módon történt behelyezése után a két referencia elektrodot a fülcimpákba helyeztük el, míg az általános föld elektrodot az állat középvonalában a glabella területére szűrtük be. A klinikai gyakorlatban az elektroretinográfiát éppen non-invazív volta miatt dicsérik, ugyanakkor a mi esetünkben, minthogy az állatok szemét exterminálás után további molekuláris-biológiai vizsgálatok miatt kísérleti mintának kivesszük, ez nem volt szempont. Továbbá a hagyományos kontaktlencse elektrodokkal szemben, az ezüst tő elektrodok elektromos kontaktusa és jeltovábbítása sokkal jobbnak bizonyult. A szem kiszáradás elleni védelmét karbomer szemgél (Vidisic, Bausch & Lomb) biztosította. Az elektrodok behelyezése után egy rövid sötét adaptációs periódus következett (20 perc), mely után az állatok szemét egy külön erre a célra készített stroboszkóppal világítottuk meg (20 cd/m<sup>2</sup>; 0,5 Hz). A felvillanó fényre adott retinális elektromos jeleket az elektrodokkal vezettük el és egy elektroretinográfiára alkalmas készülékkel rögzítettük, mely egy erősítőből és egy analog-digital átalakítóból áll (Bridge Amp és PowerLab, ADInstruments), majd egy számítógép monitorán megjelenítve PowerLab Chart szoftverrel (5.2.2. Verziószám, ADInstruments) értékeltük ki. A mérés befejeztével az állatokat ketamin/xylozin kombinációjával túlaltattuk, majd a szemüket további molekuláris biológiai vizsgálati felhasználásra kimetszettük.

A kapott elektroretinogramokon egy állandó, mérsékelt háttérzaj és ebből kiemelkedő, jól azonosítható, határozott tüskék láthatók melyek egy negatív csúcsot követő pozitív maximumból állnak és egy újabb negatív csúcson keresztül csillapodnak le. Az erősen pozitív csúcsok a b-hullámok maximumai, melyeket egy-egy negatív csúcs előz meg (az a-hullámok negatív maximumai). Ezek az elektromos tevékenységek (tüskék) mindig következetesen fény stimulus után jelentkeznek ugyanabban a ritmusban mint a fény felvillanása, tehát a stroboszkópon beállított frekvenciában (0,5Hz). A

regisztrátumokon a legintenzívebb elektromos aktivitás, amely ilyen erősen pozitív csúcsot hoz létre, az jellemzően a b-hullám. Ugyanakkor az a-hullámokat és az ERG más minor összetevőit nem minden esetben lehet tisztán azonosítani: például a lehetséges a-hullámok amplitúdója ugyanolyan a skálán mozog, mint a minden felvételünkön jelenlevő háttérzaj, mely egyes esetekben ellehetetlenítette az a-hullámok egyértelmű azonosítását és kiértékelését. Mindazonáltal a mi kísérletünkben, nem volt szükség arra, hogy olyan apró részleteket mérni tudjunk, mint c-hullámok vagy oszcillátoros potenciálok, csupán a retina fő elektromos tevékenységében bekövetkező változásokat kívántuk mérni, melyek szorosan összefüggenek a retina funkciójával. A b-hullámok tényleges amplitúdóját a túske magasan pozitív csúcsa és az azt megelőző negatív maximum között mértük. A csúcsok kiválasztása számítógépesen történt: egy ún. macro-t írtunk a kiértékelő programon belül, mely aztán a megadott kritériumoknak megfelelően kijelölte b-hullámokat és rögzítette azok adatait. Ez lehetővé tette, hogy egy-egy állat esetében akár több száz csúcsot is képesek legyünk kielemezni. Az ERG méréseink eredményei – melyet a szóbanforgó rendszerrel rögzítettünk – bebizonyították, hogy az itt leírt módszer költség-hatékony, valamint reprodukálható, a retinális sejtek túlélésével szorosan korreláló adatokat szolgáltat a retinfunkcióról.

#### 2.4. Szövetteni és elektronmikroszkópos mintafeldolgozás

Az MSH-val végzett kísérletünkben a retina szövetének fixálásához először – az állatok túlaltatását követően – az aortán keresztül kanuláltuk az állatok szívét, majd sebészi bemetszést ejtettünk a jobb kamrán, hogy onnan a vér szabadon távozhasson. Az állatok érrendszeréből a vért 0,9 %-os fiziológiás só oldattal mostuk ki (perfundáltuk). A folyamat maximum 20 másodpercig tartott, egy esetleges idegszöveti ödémaképződés megelőzése illetve minimalizálása érdekében. Ezt követően a NaCl-perfúzió

felfüggesztése nélkül 100 ml fixáló oldatot (Bouin-oldat) alkalmaztunk (transcardiálisan fixálás). A Bouin-oldat összetétele a következő: ecetsav (5 %), formaldehid (9 %), pikrinsav (0,9 %) víz (85,1 %); (Bouin's solution; Sigma-Aldrich, Magyarország). Ezután a bulbusokat kimetszettük, majd ketté vágtuk az ora serrata mentén coronalis sectio-t alkalmazva. A vitreum eltávolítása után a szegolyót fixáló oldatba helyeztük, ezt követően felszálló koncentrációjú etanol-oldatot (dehidráció), végül paraffin oldatot alkalmaztunk.

A bulbusok egy részéből 7 µm-es sagittális szeleteket metszettünk, amelyeket hematoxylin-eosinnal festettük meg és fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk. Korábbi cikkek alapján az I/R-indukálta szöveti ödéma legjobban a retina belső rétegeiben ismerhető fel és dokumentálható. A belső retinális rétegek (INL+IPL) vastagságát sagittális metszetekben a látóidegfő (vakfolt) közelében mértük és microméterben fejeztük ki manuálisan mérve a tárgylemezeken lévő microméteres beosztás segítségével.

A fixált bulbusok egy másik csoportjából 60 µm-es sagittális szeleteket metszettük, és elektronmikroszkópos (EM) vizsgálatra készítettük elő. A szöveti lipideket ozmium-tetroxiddal ( $\text{OsO}_4$ ) fixáltuk. (A szöveti fehérjék fixálása már korábban megtörtént a Bouin-oldat formaldehid-komponensének köszönhetően.) Az ozmiumozott mintákat víztelenítés (felszálló koncentrációjú etanol-oldatsor) után araldit-epoxi gyantába ágyaztuk („aralditos csónakba szedtük”) és 2 napig  $56^\circ \text{C}$ -on termosztáltuk a polimerizáció teljes végbemenetelének elősegítésére. Ezután a mintákból ultra-mikrotommal ultravékony metszeteket készítettünk, majd EM alatt vizsgáltuk a sejteken belüli, morfológiai elváltozásokat.

A PACAP-pal végzett kísérletünkben az állatok túlaltatását követően szemeket kimetszettük és azonnal jéghideg PBS-oldatban felboncoltuk, majd 0,1 M-os PBS-el kihígított 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk. A szöveteket

Durcupan ACM gyantában (Fluka, Svájc) ágyasztuk, 2  $\mu\text{m}$ -es metszeteket készítettünk és toluidin-kékkel (Sigma, Magyarország) megfestettük. A metszeteket ezután Depex médiumba ágyasztuk és egy Nikon Eclipse 80i (Tokyo, Japán) mikroszkóppal vizsgáltuk. A méréseket a fotókról az NIH Image 1.55-ös verziószámú programjával végeztük. Legalább három állatból 6 szövetblokk készült és a látóidegfőtől (vakfolt) 1-2mm-re lévő retinális területeken végeztük el a méréseket ( $n = 2-5$  mérés minden szöveti blokkra nézve). Kizártuk a vizsgálatból azokat a metszeteket, amelyeknél a GCL réteg többsejtsorosnak látszott. A következő paramétereket mértük: (1) a retina-teljes átmérője a külső limitáló membrántól a belső limitáló membránig, (2) az egyes retinális rétegek vastagsága és (3) a sejtek száma/100  $\mu\text{m}$  hosszú GCL rétegben.

## 2.5. Western blot

A kísérleti folyamatban korábban lefagyasztott enukleált bulbusokat homogenizáló pufferben homogenizáltuk, melynek összetétele a következő volt: Tris (25 mM); NaCl (25 mM); Na-ortovanadát (1 mM); NaF (10 mM); Na-pirofoszfát (10 mM); Okadán sav (10 nM); EDTA (0,5 mM); PMSF (1 mM); protease inhibitor cocktail; desztillált víz. A desztillált víz kivételével, melyet tanszékünkön állítottunk elő, a homogenizáló puffer összes többi összetevőjét a Sigma-Aldrich magyarországi képviselőjétől rendeltük. Az izolátumból, azonos tömegű fehérje mintákat (50  $\mu\text{g}$ ), valamint előfestett protein standardokat (PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder, Fermentas, Németország) frakcionáltunk 12 %-os (akrilamid - bisz-akrilamid arányú) Tris-SDS-poliakrilamid gél elektroforézis segítségével. Ezután következett a Western blot eljárás: a szétválasztott fehérjéket elektroforetikusán transzferáltuk egy nitrocellulóz membránra (Whatman Protran Nitrocellulóz Membrán; Whatman, Egyesült Királyság) egy transzfer-készülék segítségével (Mini

Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad Laboratories Ltd.). A blot-ok blokkolása (1,5 h) TBS-T-vel készített 5 %-os (m/V %) zsírszegény tejpor szuszpenziójával történt. A TBS-T összetétele a következő volt: 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol sósavval alkotott sója (Tris-HCl) (50 mM), pH7,4, NaCl (150 mM), Tween®-20 (0,05% V/V). Ezt követően éjszakán át tartó inkubálás következett 4 °C-on HO-1 ellenes primer antitestekkel (Sigma-Aldrich) TBS-T-ben 1:1000 hígításban alkalmazva. Másnap rövid mosási folyamat után a blot-okat 1 órán át retek-peroxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk (1:2000 hígítás, TBS-T-ben, 5 m/V% zsírszegény tejporral). Egy újabb rövid mosást követően a blot-okat ún. enhanced chemiluminescence reagenssel (a HRP kemiluminescens szubsztrátjával) kezeltük (Millipore, Billerica, MA). A detektálás autoradiográfiás módszerrel történt Röntgen-film segítségével (Agfa-Gevaert N.V., Belgium). A filmeket beszkeneltük és Scion Image szoftver segítségével értékeltük ki (Scion Corporation, Torrance, CA). Kontrollként GAPDH fehérjét használtunk (Sigma-Aldrich, Magyarország).

## 2.6. Hemoxigenáz aktivitásmérés

A hemoxigenáz enzim aktivitásának mérését a következő protokoll alapján végeztük: az eltávolított szemgolyókat homogenizáltuk egy homogenizáló oldatban, melynek összetétele a következő: (4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav) HEPES (10 mM); szukróz (32 mM); (ditiotreitól) DTT (1 mM); (etilén-diamin-tetraecetsav) EDTA (0.1 mM); szójabab tripszin inhibitor (10 µg/ml); Leupeptin (10 µg/ml); Aprotinin (2 µg/ml); pH 7,4. A homogenizáló oldat összetevőit a Sigma-Aldrich magyarországi képviselőjétől rendeltük. A homogenizátum 4 ° C-on, 20,000 g-vel 30 percig tartó centrifugálásával elkülönített felülúszót begyűjtöttük. A hemoxigenáz (HO) aktivitásmérést minden így kapott felülúszó-mintából elvégeztük egy korábban leközölt módszer szerint. Röviden, a HO-aktivitást a bilirubin egy

reakcióelegyben való képződésének spektrofotometriás mérése alapján számoltuk ki. A reakció elegy összetétele a következő: a felülúszó egy alikvotja, glükóz-6-foszfát (2 mM); glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (0.14 U/ml); hem (15  $\mu$ M); NADPH (150  $\mu$ M), patkány máj citoszol biliverdin-reduktáz forrásként (120  $\mu$ g/ml);  $MgCl_2$  (2 mM), és  $KH_2PO_4$  (100 mM). Hatvan perc sötétben történő inkubáció után a reakciót megállítottuk azzal, hogy a mintákat jégbe rakva lehűtöttük. A bilirubin képződést a 460 és 530 nm-en mért optikai denzitások különbségét alapul véve számítottuk ki. Az egy óra alatt egy milligramm fehérjéből képződött bilirubin mennyiségét (nanomolokban kifejezve) egy egység HO-aktivitásnak definiáltuk. Az azonos szövettípusból származó két különböző minta aktivitás mérési eredményei közötti különbség a HO-1 izoforma aktivitás-változásának tulajdonítható, mivel az enzim más izoformái (HO-2, HO-3) nem indukálható, konstitutív formák.

## 2.7. Kísérleti protokollok és csoportok

### 2.7.1. PACAP-kísérlet

A PACAP-pal végzett kísérlet célja az volt, hogy megvizsgáljuk a PACAP funkcionális retinavédő hatásait egy tanszékünkön beállított, jól működő, reprodukálható méréseket biztosító elektroretinográfiás módszerrel.

Az újszülött Wistar patkányok közül a kezelt csoportban lévők (n=16) három alkalommal (az 1., 5. és 9. postnatális napon) subcutan 2 mg/g MSG-t kaptak 100  $\mu$ l fiziológiás sóoldatban. Az MSG-kezelésekkel egy napon az állatok fele egyik szemébe intravitreálisan 100 pmol PACAP38-at is kapott 5  $\mu$ l fizsóban oldva egy Hamilton tű segítségével. Az állatok azonos mennyiségű vivőanyagot kaptak a másik oldali szemükbe. A dózisokat és az időbeosztást egy korábbi kísérletből vettük át. A kontroll állatok semmilyen kezelést nem kaptak (n = 5).

Az ERG-vizsgálatokat 2 hónappal a fentebb leírt kezelések után végeztük el, a fentebb leírt módszer szerint. Az ERG-vizsgálatok kivitelezése után az

állatokat túlaltattuk és a szemeiket szövettani vizsgálatokra készítettük elő, melyeket a fentebb leírt módon végeztük.

### 2.7.2. MSH-kísérlet I. fázis

Az  $\alpha$ -MSH-val végzett kísérlet I. fázisában célunk az  $\alpha$ -MSH I/R-indukálta retinakárosodás elleni védő hatásának felmérése, továbbá elektroretinográfia segítségével egy optimális kezelési dózis megállapítása volt.

Az MSH I. fázisban az állatokat véletlenszerűen két kezelési csoportra osztottuk: I-a és I-b csoport (n=30 mindkét csoportban).

Az I-a csoport egy dózis-hatás vizsgálati csoportként szolgált és öt alcsoportot foglalt magába: egy kontroll csoportot és négy kezelési csoportot (n = 6 mindegyik alcsoportban). Tizenkét órával iszkémia kiváltása előtt a vivőanyag-kezelt kontroll csoport *subcutan* fiziológiás só oldatot kapott, míg a többi négy csoport rendre a következőket kapta *subcutan*: 50, 250, 500 és 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$   $\alpha$ -MSH (Sigma-Aldrich). Az itt leírt kísérlethez használt  $\alpha$ -MSH fiziológiás sóoldatban oldva, oldat formájában volt alkalmazva.

Az I-b csoport, melyet az  $\alpha$ -MSH hatásának felmérésére használtunk, két alcsoportot foglalt magába (n=15 mindkét alcsoportban). Tizenkét órával iszkémia kiváltása előtt a vivőanyag-kezelt kontroll csoport *subcutan* fiziológiás oldatot kapott, míg a másik alcsoport 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$   $\alpha$ -MSH-t, mely az I-a csoportban elektroretinográfiásan meghatározott dózis volt.

Az I-a csoportbeli állatok egyik szeme 30 perc iszkémiának lett kitéve a fentebb leírt módszer szerint, melyet 24 órás reperfúziós periódus, majd a korábban részletezett módon kivitelezett ERG mérés követett, mely után az állatokat túlaltatással extermináltuk. Az I-b csoportba tartozó állatok egyik szeme 90 perc iszkémiának lett kitéve, melyet ugyanúgy egy 24 órás reperfúzió követett, mint az I-a csoport esetén. Ezután az állatok túlaltatásos exterminációját követően az állatok szemeit eltávolítottuk.

Az előbb említett iszkémiás időtartamok kiválasztásának egy korábbi megfigyelés volt az alapja, hogy a retinális ödéma, mely ezen vizsgálatnak is egyik meghatározó eleme volt, mindössze 30 perc iszkémiát követően nem jelentkezik, viszont határozottan kialakul 90 perces iszkémia alatt patkány szemén. Ugyanakkor, a 90 perc iszkémia szinte teljes vakságot okoz, amely az ERG méréseket praktikusán ellehetetleníti. Így a kísérleti elrendezésünk az MSH-kísérlet I. fázisában két fő állatcsoportot foglalt (I-a és I-b) magába, melyek között a fő különbség a reperfúziót megelőző iszkémiás periódus hossza.

Az I-b csoportból begyűjtött szem mintákat további három csoportra osztottuk (n = 5 mindegyik csoportban). A minták egy csoportján szövettani vizsgálatot végeztünk hematoxillin-eozin festést és fénymikroszkópot alkalmazva, a második csoportot ozmiumozást követően elektronmikroszkóposan vizsgáltuk meg, míg a harmadik minta-csoportot Western blot analízisnek vetettük alá. Mindhárom módszert a fentebb leírtak szerint végeztük.

### 2.7.3. MSH-kísérlet 2.fázis

Az  $\alpha$ -MSH-kísérlet II. fázisában célunk a posztiszkémiásan beadott  $\alpha$ -MSH hatásának vizsgálata, valamint olyan nem-HO-1-függő hatásútvonalak létének bizonyítása vagy cáfolása volt, melyek esetlegesen hozzájárulhatnak az  $\alpha$ -MSH citoprotektív hatásához.

Az MSH-kísérlet II. fázisában az állatokat véletlenszerűen négy kezelési csoportra osztottuk (n = 5 mindegyik csoportban).

Az első, az ún. kontroll csoport állatai 5, 3 és 1 nappal az iszkémia kiváltása előtt *intraperitonealis* úton az SnPP vivőanyagával (alább részletezve) lettek kezelve, majd a posztiszkémiás reperfúzió kezdetén *subcutan* (az  $\alpha$ -MSH vivőanyagát, vagyis) fiziológias sóoldatot kaptak.

A második, ún. MSH csoport állatai 5, 3 és 1 nappal az iszkémia

kiváltása előtt *intraperitonealis* úton az SnPP vivőanyagával (alább részletezve) lettek kezelve, majd a posztisztkémiás reperfúzió kezdetén *subcutan* 500 µg/kg α-MSH-t kaptak. Az itt leírt kísérlethez használt α-MSH fiziológias sóoldatban oldva, oldat formájában volt alkalmazva.

A harmadik, ún. SnPP+MSH csoport állatai 5, 3 és 1 nappal az iszkémia kiváltása előtt *intraperitonealis* úton 50 µmol/kg SnPP-t, majd a posztisztkémiás reperfúzió kezdetén *subcutan* 500 µg/kg α-MSH-t kaptak. Az SnPP (Sn(IV) Protoporphyrin IX dichloride; Frontier Scientific Inc., Logan, Utah) a HO-1 hatékony gátlószere. Az SnPP 0,1 N nátrium-hidroxid oldatban lett feloldva, majd az oldat kémhatása (pH 7,4-re) sósavval, koncentrációja fiziológias sóoldattal lett beállítva. Az SnPP oldat használat előtt 1 órával, fénytől védve, frissen lett elkészítve.

A negyedik, ún. SnPP csoport állatai 5, 3 és 1 nappal az iszkémia kiváltása előtt *intraperitonealis* úton 50 µmol/kg SnPP-t, majd a posztisztkémiás reperfúzió kezdetén *subcutan* (az α-MSH vivőanyagát, vagyis) fiziológias sóoldatot kaptak.

Mind a négy csoport állatainak egyik szeme 30 perc iszkémiának lett kitéve a fentebb leírt módszer szerint, melyet 24 órás reperfúziós periódus, majd a korábban részletezett módon kivitelezett ERG mérés követett, mely után az állatok túlaltatásos exterminációját követően az állatok szemei eltávolításra kerültek.

A begyűjtött szem mintákat a fentebb részletezett módszer szerint hemoxigenáz aktivitásmérésnek vetettük alá.

## 2.8. Statisztika

Az adatokat D'Agostino és Person omnibus típusú normalitásvizsgálatnak vetettük alá. Az adatok Gauss-eloszlása esetén egyszempontú variancia-analízist (one-way ANOVA) hajtottunk végre Tukey posztteszttel. Nem parametrikus eloszlás esetén az adatokat Kruskal-Wallis

teszttel és Dunn's poszt-teszttel elemeztük ki.

### 3. Eredmények

#### 3.1. A PACAP-kísérlet eredményei

A kontroll metszeteken standard szövettani technikákat alkalmazva az emlős retina jellegzetes rétegei jól látszottak: fotoreceptorok rétege (stratum photosensorium retinae; photoreceptor layer, PL), külső magvas réteg (stratum granulosum externum; outer nuclear layer, ONL), külső fonatos vagy szinaptikus réteg (stratum plexiforme externum; outer plexiform layer, OPL), belső magvas réteg (stratum granulosum internum; inner nuclear layer, INL), belső szinaptikus réteg (stratum plexiforme internum; inner plexiform layer, IPL) valamint a ganglionsejtek rétege (stratum ganglionare; ganglion cell layer, GCL). A kontroll állatokhoz viszonyítva a háromszori MSG kezelésnek kitett patkányok retinájának teljes vastagsága szignifikánsan lecsökkent, és a teljes belső retina szignifikáns károkat szenvedett. A IPL szinte teljes eltűnése mellett az INL és GCL rétegek összeolvadását figyelhettük meg metszeteken. A degeneráció számos jele – sejttest-alakú üres helyek – is megfigyelhető volt a magvas rétegekben (ONL és INL). A belső és külső membrana limitans közötti távolság a normál retinákban mérhető 47 %-ára esett. Minden retinális réteg jelentősen csökkent (ONL = 75 %, OPL = 66 %, INL = 26 %, IPL = 15 %). A ganglion sejtek rétegében a 100 µm-re eső sejtszám körülbelül 38 %-ra csökkent.

Korábbi megfigyelésekkel megegyezően eredményeink szerint az MSG-indukálta súlyos retinadegeneráció enyhíthető háromszori PACAP-kezeléssel. A PACAP háromszori intravitreális injektálása szignifikáns javulást okozott a retinális rétegekben (ONL = 89 %, OPL = 95 %, INL = 74 %, IPL = 60 %). Az IPL látható maradt, az INL és GCL mindenütt jól elkülönült. A GCL-ben a sejtszám szignifikánsan magasabbnak (65 %)

bizonyult, mint a csak MSG-kezelt retinákban.

Az elektroretinográfiás mérések alapján elmondható, hogy a kezelés nélküli kontroll állatok b-hulláma  $220,9 \pm 19,5 \mu\text{V}$ -nak bizonyult, míg MSG-kezelés hatására ez az érték  $37,76 \pm 8,3 \mu\text{V}$ -ra csökkent le. Az intravitreális PACAP-kezelés protektív hatású volt MSG-indukálta károsodás ellen és a b-hullámok amplitúdója  $60,9 \pm 12,0 \mu\text{V}$ -ra emelkedett.

Annak érdekében, hogy közvetlenül is jellemezhessük a pálcska fotoreceptorok működését, az elektroretinogram szkotopikus a-hullámát is mértük, mely szinte kizárólagosan a pálcska fotoreceptorokból ered. A kontroll állatok szemének a-hullám amplitúdó értékei ( $65,0 \pm 6,0 \mu\text{V}$ ) MSG-kezelés hatására  $9,4 \pm 3,0 \mu\text{V}$ -ra csökkentek.

A PACAP protektív hatása az a-hullámok amplitúdójának  $16,8 \pm 6,0 \mu\text{V}$ -ra történt növekedésében jelentkezett. Az ERG hullámok legyengültek MSG-kezelés hatására, mely így az a- és b-hullámok amplitúdójának változásában is jelentkezett. A PACAP-kezelés enyhítette az MSG-indukált funkcionális változásokat, mely az MSG-kezelt és az MSG+PACAP-kezelt retinák között enyhe, de szignifikáns különbségként jelentkezett. A fotopikus a- és b-hullámok tekintetében nem volt statisztikailag szignifikáns különbség az MSG- és PACAP-kezelt csoportok között.

### 3.2. Az MSH-kísérlet I. fázisának eredményei

Az ERG b-hullámok mérésével megállapíthatóan az I/R-károsodás a retina funkcióját 31,64 %-ra csökkentette a kontroll állatok nem-izkémias szeméhez viszonyítva. Az  $\alpha$ -MSH-kezelés a retinafunkciót az állatok I/R-károsodott szemében dóziszfüggően akár a nem-izkémias kontroll 66,18 %-ára is feljavította, mely szignifikáns eredményt az 1000  $\mu\text{g}/\text{ttkg}$   $\alpha$ -MSH-val kezelt állatok I/R-károsodott szemén mértük ( $p < 0,001$  vs. kontroll I/R). Az izkémia-reperfúziós retinakárosodás olyan súlyosnak bizonyult, hogy az  $\alpha$ -MSH-

kezelés nem volt képes teljesen helyreállítani a szövet működését a normál szintre. Továbbá a szöveti működést jelző funkcionális paraméterek dózisfüggő javulása tetőzött 1000 µg/ttkg-os dózisonál, melyen túl vélhetően elhanyagolható további javulás volna megfigyelhető.

A jelen kísérlet alapján meghatározott optimális, hatékony dózis 500 µg/ttkg α-MSH lett. Az ERG b-hullámokon az α-MSH-kezelés mérhető hatásai már olyan kis dózisban is megfigyelhetők voltak, mint 50 µg/ttkg (a nem-iszkémiás kontroll értékek 35,64 %-a), jóllehet a javulás mértéke statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ezen dózis esetén, csak magasabb dózisok esetén, mint például 250 (48,00 %,  $p < 0,001$  vs. kontroll I/R) és 500 µg/kg-os dózisonál (64,36 %,  $p < 0,001$  vs. kontroll I/R). Az 1000 µg/ttkg-os dózissal való kezelés szignifikáns protektív hatást közvetített, de mivel az 500 és 1000 µg/ttkg-os kezelések eredményei között nem volt statisztikailag szignifikáns javulás megfigyelhető (64,36 % vs. 66,18 %), az 500 µg/ttkg-os dózist elégségesnek és feltehetően optimálisnak ítéltük meg az I/R-kiváltotta retinális károsodás kivédésére.

A szövettani eredmények alapján a retina rétegei megvastagodtak az I/R-indukálta intersticiális ödéma képződés miatt. Az 500 µg/ttkg-os α-MSH kezelés az I/R-indukált károsodás kialakulását gátolja, elsődlegesen a retinális ödémát és a következményes vastagodást. A kontroll és a kezelt nem-I/R értékek között szignifikáns különbségek nem voltak megfigyelhetők.

A retinális sejtek mitokondriumanak I/R-kiváltotta károsodása jól kivehető volt az elektronmikroszkópos felvételeken is. A kontroll állatokból származó I/R-károsodott retinaszövet sejtjeiben a mitokondriumok belső vakuolumok képződése miatti szétesése látszott. Ezzel szemben az 500 µg/ttkg-os α-MSH-val kezelt állatokból származó I/R-károsodott retina sejtjeinek mitokondriumai érintetlenek maradtak. A külső retinális rétegek

sejtjeiben iszkémia-reperfúziót követően a retinális pigment sejtek és a fotoreceptorok elektronmikroszkópos ultrastruktúrájában morfológiai elváltozások kevésbé voltak jellemzők. A kontroll és kezelt nem-I/R ultrastruktúrák között szignifikáns különbségek nem voltak megfigyelhetők.

A hemoxigenáz 1 enzim expresszióját a szem szöveteiből végzett Western blot analízis volt hivatott feltárni, mely szerint az 500 µg/ttkg-os α-MSH-val kezelt állatokból származó I/R-károsodott szemgolyókban szignifikánsan nagyobb HO-1 fehérje mennyiség volt jelen, mint a vivőanyag kezelt patkányokból származóakban ( $p < 0,05$ ). A kontroll és kezelt nem-I/R értékek között nem voltak szignifikáns különbségek.

#### 4.3. Az MSH-kísérlet II. fázisának eredményei

Az MSH II. fázis ERG-vizsgálatainak eredményeiből az egyes kezelések retinális integritásra való hatásában három fő irányvonal látható: a nem-iszkémiás retinákban felvett hullámformákhoz képest, az I/R-károsodás és az SnPP-kiváltotta HO-1 gátlás csökkentette a hullámok amplitúdóját és megváltoztatta a hullámformák karakterisztikáját oly módon, amely a csökkent retina-funkció jelzője. Ezzel szemben az 500 µg/ttkg-os α-MSH-kezelés a retinális válaszokat a javuló retinális funkció irányába tolta el. Az SnPP-kezelés az α-MSH-val együtt adva csökkentette, de nem szüntette meg teljesen az α-MSH protektív hatását.

A b-hullámok nem-iszkémiás kontrollhoz viszonyított százalékos átlaga (vagyis a poszt-iszkémiás kezelés hatása) a nem-iszkémiás kontroll 67,69 %-ának adódott a 500 µg/ttkg-os α-MSH-val kezelt állatok esetében ( $p < 0,001$  vs. kontroll I/R). Ez az érték kissé magasabb is az I. fázisban mértnél, ami 64,36 % volt ( $p < 0,001$  vs. kontroll I/R). A vivőanyag-kezelt patkányok I/R-károsodott retináiban a b-hullámok nem-iszkémiás kontrollhoz viszonyított százalékos átlaga 33,44 %-nak bizonyult. Az SnPP-kezelt I/R-károsodott

állatcsoport b-hullámainak nem-iszkémiás kontrollhoz viszonyított százalékos aránya 19,76 %-nak bizonyult ( $p < 0,001$  vs. kontroll I/R). A kettős kezelés (SnPP+MSH) szignifikánsan csökkentette a b-hullám-százalékokat a csak MSH-val történt kezeléshez képest (55,77 % vs. 67,69 %;  $p < 0,01$ ). Ugyanakkor az SnPP+MSH-kezelt I/R retinák százaléka szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a csak SnPP-kezelés esetében (55,77 % vs 19,76 %;  $p < 0,001$ ). A kontroll és kezelt nem iszkémiás értékek között nem volt szignifikáns különbség.

A szöveti hemoxigenáz aktivitás I/R hatására szignifikánsan megemelkedett (a nem-iszkémiás kontroll 119,56 %-ára), és 500  $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ -os  $\alpha$ -MSH-kezelés hatására tovább emelkedett (159,42 %). Utóbbi hatást megszüntette az  $\alpha$ -MSH-val együtt adott HO-1 gátló SnPP (108,77 %). Ugyanakkor kis különbség volt megfigyelhető az SnPP+MSH- és a csak SnPP-kezelt csoportok között (108,77 vs 96,60 %, az említés sorrendjében). A kontroll és a kezelt nem-I/R értékek között nem volt szignifikáns különbség (fel nem tüntetett adatok).

## 4. Megbeszélés

Számos szemészeti betegség hátterében az iszkémiás retinakárosodás áll. Munkacsoportunk ezért célul tűzte ki maga elé, hogy a retina funkciójának mérésére egy megbízható, reprodukálható elektrofiziológiai módszert alkalmazzon, az elektroretinográfiát. Az ERG eredmények összhangban állnak az állatok retinájának tényleges állapotával, retinális károsodás esetén a retina mérhető, csökkent funkciója pedig korrelál a retina szövettani károsodásával.

Felvetődött, hogy a szövettanilag már bizonyítottan retinakárosító nátrium-glutamát (MSG), vajon funkcionális romlást is okoz-e, valamint, hogy az ezt a károsodást strukturálisan kivédeni képes, retinoprotektív PACAP a

retina funkcióját is javítja-e. Kísérletünkben bizonyítottuk, hogy az intravitreális PACAP-kezelés szignifikáns funkcionális javulást váltott ki MSG-indukált retinakárosodásban. Számos kísérletben vizsgáltak már lehetséges retinoprotektív stratégiákat mind morfológiai, mind funkcionális szempontból. A károsodás mértéke és a morfológiai retina védelem gyakran összhangban van a funkcionális javulással. A fibroblaszt növekedési faktorról például bebizonyosodott, hogy serkenti a morfológiai és a hozzátartozó ERG javulást is retinakárosodásban. Mindazonáltal, a funkcionális mérések nem mindig követik a szövettani eredményeket legyen akár szó humán vizsgálatról vagy állatkísérletekről. Még paradox hatások is ismertek az irodalomból, mint például a ciliáris neurotróp faktor esetében, amely bár csökkenti az ERG-hullámokat, mégis elősegíti a fotoreceptorok túlélését. Kísérleteink eredményei azt bizonyítják, hogy a PACAP-kezelés igen jelentős morfológiai változásokhoz vezet az MSG-kezelt patkányok retinájában. A funkcionális kimenetel – bár kisebb mértékben – úgyszint szignifikánsan javult PACAP-kezelés után.

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a szkotopikus hullámokban MSG-kezelés hatására történt változásokat a PACAP részben ellensúlyozta: a PACAP-által okozott javulás mind az a-, mind a b-hullámokon megfigyelhető volt, amelyek rendre a fotoreceptorok és a belső retinális sejtek működését jellemzik. A glutamát serkentő szinaptikus transzmissziót közvetít a fotoreceptorok és bipoláris sejtek, valamint a bipoláris és ganglion sejtek között. Az MSG-kezelés nagyon súlyos károsodásokat okozott a belső retinában valamint a fotoreceptor-réteget is károsította. A glutamát excitotoxicitást, melyet a magas glutamát koncentráció vált ki, vélhetően mind közvetlen, mind közvetett mechanizmusok okozzák a glutamát receptorsűrűségtől függően. Számos kísérlet mutatta már be a glutamát receptorok eloszlását a retinában, melyek alapján a belső retinális sejtekben magas koncentrációban fordulnak elő. Ez megmagyarázhatja a belső retina

magas sérülékenységet, melyet mi is tapasztaltunk. Korábbi tanulmányokban, ahol a patkányok retináit újszülöttkori MSG kezelés után 3 hónapos korukban szövettanilag elemezték, a súlyos belső retinális károsodás látszólag érintetlen fotoreceptor-réteggel jelentkezett. Jelen kísérlet elektroretinográfiás méréseinek tanulsága szerint azonban fotoreceptor réteg funkcionálisan károsodott, melyet az a-hullámok csökkenése jelzett: a fotoreceptorok jeltovábbításának hosszútávú károsodásával a fotoreceptorok maguk is károsodnak.

A PACAP-kezelés enyhíteni tudta az MSG-indukálta változásokat mind morfológiai, mind funkcionális szinten. A PACAP különböző a retinára és a retinális útvonalakra gyakorolt hatásai ismertek. A PACAP minden belső retinális sejtréteget megvédett egy korábbi, a PAC1 receptor retinán belüli eloszlását tárgyaló cikkel összhangban. Habár a funkcionális javulás enyhébb volt, mint a morfológiai, jelen megfigyeléseink klinikai szempontból fontosak, mivel elsőként mutatják be, hogy a PACAP képes javítani a retina működését excitotoxikus sérülés esetén. Továbbá kísérletes szempontból is előremutatóak az eredmények: a funkcionális változás összeeseng a morfológiai, szövettani változásokkal.

Munkacsoportunk egy korábbi cikke alapján a melanocita-stimuláló hormon alfa-típusa ( $\alpha$ -MSH) képes a szívizom iszkémia-reperfúziós károsodását csökkenteni. Felvetődött, hogy vajon a sok más szövetben – agy, vese, bőr, emésztő rendszer – is leírt I/R elleni védelem megvalósul-e a szem szövetében is szisztémásan adagolva a hormont.

Az MSH-kísérlet I. fázisában az  $\alpha$ -MSH azon hatását vizsgáltuk, hogy képes-e védelmet nyújtani I/R-indukálta retinakárosodással szemben. Ezekben a vizsgálatokban az  $\alpha$ -MSH szignifikánsan megőrizte a I/R-nek kitett szem funkcióit. Erre bizonyítékot az ERG-vizsgálat szolgáltatott, mely bemutatta, hogy az I/R-károsodott retina b-hullámainak amplitúdója  $\alpha$ -MSH-

dózisfüggően emelkedett. Ezzel bizonyítást nyert, hogy az  $\alpha$ -MSH védelmet biztosít a retinának I/R-károsodással szemben. Az előbb említett eredmények összefüggésben állnak más szerzők cikkeivel a hatás háttérében álló HO-1 upreguláció tekintetében is: egy 2013-as cikk, mely egy növényi polifenolos vegyületnek, a rezveratrolnak a magas szemelnyomás miatt kialakuló retinális iszkémia elleni védő hatásáról számol be, az ERG b-hullám amplitúdóját növelő hatás háttérében HO-1 upregulációt nevez meg, mint jelentős hatásmechanizmust. Mi szintén azt tapasztaltuk, hogy a HO-1 expresszió  $\alpha$ -MSH hatására szignifikánsan megemelkedett, vagyis ez a folyamat az  $\alpha$ -MSH hatásmechanizmusának is része lehet. A HO-1 expresszió növekedése  $\alpha$ -MSH hatására – melyet mi most retinában igazoltunk – más szövetekben is bizonyított.

A HO-1 expressziója sérült szövetben egy igen megőrzött, magasan konzervált adaptív válasz, mely számos szövetben és élőlényben megfigyelhető. Munkacsoportunk korábbi munkájában ezen enzim terápiás lehetőségeit próbálta kihasználni és bemutatta, hogy a HO-1 upregulációja egy serkentő anyag által igen erős terápiás hatást képes *in vivo* kiváltani, mely a HO-1-et upreguláló hatóanyagok lehetséges klinikai felhasználását még jobban alátámasztja.

A HO-1 expressziója stresszorok széles skálájára megnövekszik, mint például oxidatív és gyulladásos bántalmak miatt csakúgy, mint olyan metabolikus és hemodinámiás faktorok következtében, mint a magas vércukorszint. Ugyanakkor a legtöbb esetben a HO-1 patofiziológiás aktivációja csak átmeneti vagy csekély HO-1 aktivitás-növekedést eredményez, mely nem éri el azt a küszöbszintet, ami szükséges volna a HO-jelátvitelrendszer további downstream összetevőinek olyan szintű aktiválására, hogy az a súlyos gyulladásos kórképek szignifikáns remisszióját eredményezze. Azok a kezelési stratégiák, melyek a HO-1-et kifejezetten retinopátiák és más betegségek megelőzésére vagy kezelésére kívánják

alkalmazni, várhatóan egyre növekvő mértékben vesznek igénybe olyan gyógyszeres hatóanyagokat, melyek képesek ezen enzim expresszióját és aktivitását növelni. Munkacsoportunk korábban már bemutatta, hogy például a meggy mag kivonat is képes ilyen módon megvédeni a retinát az I/R károsodástól *in vivo* a HO-1 aktiválásán keresztül. Jelen vizsgálat Western blot eredményei pedig úgyszintén szignifikánsan megnövekedett HO-1 expressziót mutattak az 500 µg/ttkg α-MSH-val kezelt patkányok I/R károsodott szemének retinaszövetében a vivőanyagkezelte állatok I/R-t elszenvedett szemének enzimexpressziójához képest, mely arra enged következtetni, hogy az α-MSH alkalmazása jelentősen felerősíthet egy vele egyidejűleg zajló patofiziológiai HO-1 upregulációt, vagyis kezelési stratégia lehet.

A retina szövettani vizsgálata során kiderült, hogy az α-MSH-kezelte állatok szignifikánsan csökkent mértékű ödémát mutattak I/R sérülés következtében. Ez a megállapítás a HO-1 retinális ödéma elleni védelemben betöltött szerepe szempontjából is jelentős. A kapott eredmények hozzájárulnak új, retinális ödémát csökkentő stratégiák kifejlesztéséhez szemészeti rendellenességekben.

Kísérletsorozatunk elektronmikroszkópiai igazolását adta annak, hogy az α-MSH a belső retinális sejtekben az I/R-indukálta mitokondriális károsodásokat csökkenti a sejtalkotók szintjén, mely szintén egy új eredmény.

Az α-MSH tehát egy hatékony retinoprotektív szer lehet iszkémiás retinakárosodásban. Felmerült azonban a kérdés, hogy vajon a HO-1 enzim mennyire fontos, esetleg kizárólagos szerepet játszik-e az α-MSH hatásában.

Azt is meg kívántuk vizsgálni, hogy az α-MSH-nak van-e posztiszkémiás hatása, mellyel munkacsoportunk egy feltevésére is, ha nem is közvetlenül, de legalább indirekt módon választ kívántunk adni: hipotézisünk az volt, hogy az evolúció egy korábbi szakaszában az α-MSH esetleg stressz hatására felszabaduló, ún. stressz-hormonként viselkedhetett. Az állatvilágban ma is megfigyelhető a rejtőzködő szín használata, melynek egészen

különleges formája – például a kaméleon esetében – a bőr színének változtatása. A bőrszín stresszre való gyors változtatása nemcsak kaméleonok, de polipok, szépiák, békák, halak esetében is ismert. Definíció szerint stressznek nevezünk minden olyan hatást, amelynek következtében a hipotalamuszban CRH szabadul fel, ennek következtében pedig a proopiomelanocortin prekursorát enzimek hasítják, mely útvonalon képződhet  $\alpha$ -MSH is. A melanocita stimuláló hormon alfa – nevéből adódóan – a bőr pigmentációjában fontos szerepet vállaló melanocitákat serkenti, mely összefüggésben áll a bőr színének változtatásával, mint védekező magatartással. Vagyis abból a két tényállásból, hogy stresszre egyes állatok színváltozással reagálnak valamint, hogy a színváltozáshoz  $\alpha$ -MSH kell, logikailag az következik, hogy stressz hatására  $\alpha$ -MSH kell felszabaduljon. Így joggal merülhet fel a kérdés, hogy vajon az  $\alpha$ -MSH-nak szerepe lehet-e másfajta protektív, stresszre adott válaszban. Tovább követve ezt a logikai szálát, az iszkémia-reperfúziós károsodás egy stressz hatás, mely ellen az  $\alpha$ -MSH előkezelés formájában protektív hatásúnak bizonyult az I. fázis kísérletei szerint. Ezek alapján felvetődött, hogy utókezelés formájában (mintha stresszt követően szabadult volna fel a szervezetben) vajon protektív-e az  $\alpha$ -MSH?

Az MSH-kísérlet II. fázisában végzett elektroretinográfiás mérések eredményei azt mutatták, hogy a hullámformák amplitúdója, mely az egészséges retinafunkció függvénye, iszkémia-reperfúziós károsodások hatására csökkent, míg posztiszkémiás  $\alpha$ -MSH kezelés hatására megnövekedett. Ebből az a következtetés vonható le, hogy az  $\alpha$ -MSH iszkémia után adagolva is képes a retina funkciót javítani, vagyis képes az iszkémiás esemény bekövetkezte után is kifejteni retinoprotektív hatását. Az irodalomban más szövetekkel kapcsolatban is írtak már le hasonló, posztiszkémiás  $\alpha$ -MSH-hatást: agyi, mezenterialis valamint vese-iszkémiában is ismert ez a jelenség, viszont retina-iszkémiában mi írtuk le a jelenséget

először.

Másik fontos eredményünk, hogy a HO-1 gátló SnPP-vel és  $\alpha$ -MSH-val egyszerre kezelt patkányok retinája csökkent ERG hullám-amplitúdót mutatott, mely azt jelenti, hogy az  $\alpha$ -MSH hatásában szerepet kell játszania HO-1 mediált szignáltranszdukciós útvonalnak. Az SnPP-kezelés azonban nem szüntette meg teljesen az  $\alpha$ -MSH hatását, ami viszont arra enged következtetni, hogy az  $\alpha$ -MSH hatásmechanizmusában nem csak a HO-1 játszik szerepet. A HO-1 aktivitás korrelált az ERG hullámformák amplitúdójával: a HO-1 aktivitás az  $\alpha$ -MSH adagolással összefüggve emelkedett, míg az SnPP kezelés hatására az  $\alpha$ -MSH HO-1 aktivitásnövelő hatása csökkent, de nem szűnt meg. Így ismét ugyanarra a következtetésre juthatunk: a HO-1 aktivitás összefügg az  $\alpha$ -MSH terápiás hatásával, de nem kizárólagos komponense annak.

Az  $\alpha$ -MSH adagolása, a retina I/R-károsodásának csökkentése és a HO-1 részvétele közötti egyértelmű kölcsönös összefüggés tehát azt mutatja, hogy az  $\alpha$ -MSH az I/R elleni védelmet legalább részben egy HO-1-függő útvonalon keresztül fejt ki. Eredményeink nem zárják ki más, mindezidáig nem azonosított, a hemoxigenáz enzimtől független mechanizmusok részleges közreműködését. Ennek a lehetőségnek a felderítése jövőbeni kutatások témáját képezi majd. A vizsgálódásoknak irányvonalat más kutatók munkája is adhat, akik bemutatták, hogy az  $\alpha$ -MSH-nak anti-citokin aktivitása is van, továbbá gátolja a proinflammatorikus fehérjék kifejeződését, csökkenti a lázat, és modulálja a neuroimmun-aktivitást. Jelen tanulmány elsőként mutatja be az  $\alpha$ -MSH hatásosságát I/R-indukálta retinakárosodásban mind az iszkémiás inzultus előtt adva, mind pedig posztiszkémiásan. A hormon azon képessége, hogy egy iszkémiás periódus után adagolva is képes megvédeni a retinát, megerősíti azon feltevésünket, hogy az  $\alpha$ -MSH expressziója egy jelentős fiziológiás ellensúly, óvintézkedés stresszorok széles spektrum ellen, mely feltehetőleg a gerincesek korai evolúciójában alakult ki és konzerválódott,

mint fontos túlélési adottság, jelleg. Az a megfigyelés, hogy a posztiszkémiásan adott  $\alpha$ -MSH azonos nagyságrendű protektív hatást vált ki, mint iszkémia előtt adva, biztató a lehetséges farmakoterápiás alkalmazása tekintetében.

## 5. Összefoglalás

A kutatómunkában célul tűztük ki a retinafunkció mérésére szolgáló elektroretinográfia alkalmazását. Ezzel a módszerrel sikerrel igazoltuk, hogy a PACAP MSG-indukálta retinopátia ellenes, morfológiai védő hatásának háttérében funkcionális javulás is fennáll. Ez megalapozhatja a PACAP jövőbeni gyógyászati felhasználását excitotoxikus retinakárosodásban. Az  $\alpha$ -MSH-val végzett kísérleteink eredményei pedig igazolják azt a feltevést, hogy az  $\alpha$ -MSH enyhíti az iszkémia/reperfúzió-indukálta retinális károsodás súlyosságát funkcionális, szöveti és sejtes szinten, valamint bizonyítékot szolgáltatnak a hormon hatásmechanizmusában a HO-1 jelentős, de nem kizárólagos részvételéről. Figyelemre méltó az  $\alpha$ -MSH azon tulajdonsága, hogy képes visszaállítani a retinaszövet funkcióját az iszkémiás periódust követően, posztiszkémiásan alkalmazva, mely arra enged következtetni, hogy az  $\alpha$ -MSH potenciálisan széleskörűen felhasználható lehet az I/R-mediálta patológiai állapotokban akár megelőzőként, akár kezelésként alkalmazva.

Iktatószám: DEENKÉTK/43/2014.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Varga Balázs

Neptun kód: TU35Q0

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10037794

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Varga, B.**, Gesztelyi, R., Bombicz, M., Haines, D., Szabó, A.M., Kemény-Beke, Á., Antal, M., Vecsernyés, M., Juhász, B., Tószaki, Á.: Protective Effect of Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone ( $\alpha$ -MSH) on the Recovery of Ischemia/Reperfusion (I/R)-Induced Retinal Damage in A Rat Model.

*J. Mol. Neurosci.* 50 (3), 558-570, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-013-9998-3>

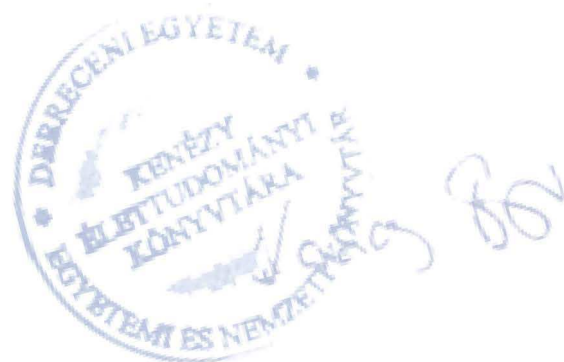
IF:2.891 (2012)

2. **Varga, B.**, Szabadfi, K., Kiss, P., Fábrián, E., Tamás, A., Griecs, M., Gabriel, R., Reglődi, D., Kemény-Beke, Á., Pamer, Z., Biró, Z., Tószaki, Á., Atlasz, T., Juhász, B.: PACAP improves functional outcome in excitotoxic retinal lesion: An electroretinographic study.

*J. Mol. Neurosci.* 43 (1), 44-50, 2011.

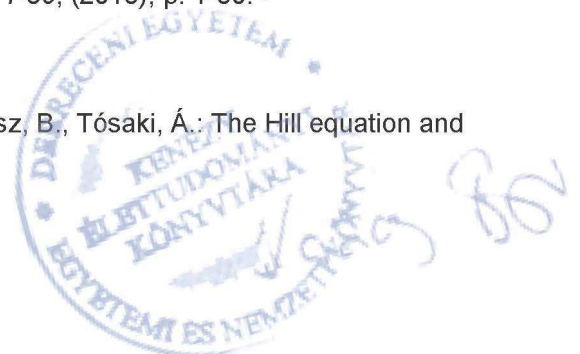
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-010-9406-1>

IF:2.504

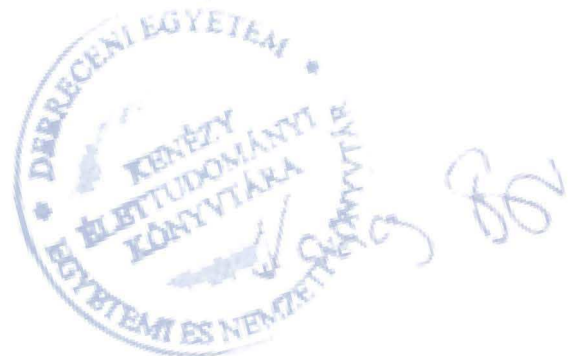


### További Közlemények

3. Juhász, B., Kertész, A., Balla, J., Balla, G., Szabó, Z., Bombicz, M., Priksz, D., Gesztelyi, R., **Varga, B.**, Haines, D.D., Tósaki, Á.: Cardioprotective Effects of Sour Cherry Seed Extract (SCSE) on the Hypercholesterolemic Rabbit Heart.  
*Curr. Pharm. Design.* 19 (39), 6896-6905, 2013.  
IF:3.311 (2012)
4. Kalantari, H., Galehdari, H., Zaree, Z., Gesztelyi, R., **Varga, B.**, Haines, D., Bombicz, M., Tósaki, Á., Juhász, B.: Toxicological and mutagenic analysis of *Artemisia dracunculus* (tarragon) extract.  
*Food Chem. Toxicol.* 51, 26-32, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.052>  
IF:3.01 (2012)
5. Kertész, A., Bombicz, M., Priksz, D., Balla, J., Balla, G., Gesztelyi, R., **Varga, B.**, Haines, D.D., Tósaki, Á., Juhász, B.: Adverse Impact of Diet-Induced Hypercholesterolemia on Cardiovascular Tissue Homeostasis in a Rabbit Model: Time-Dependent Changes in Cardiac Parameters.  
*Int. J. Mol. Sci.* 14 (9), 19086-19108, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140919086>  
IF:2.464 (2012)
6. Kiss, Z., Pak, K., Zsuga, J., Juhász, B., **Varga, B.**, Szentmiklósi, J.A., Haines, D.D., Tósaki, Á., Gesztelyi, R.: The guinea pig atrial A1 adenosine receptor reserve for the direct negative inotropic effect of adenosine.  
*Gen. Physiol. Biophys.* 32 (3), 325-335, 2013.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.4149/gpb\\_2013041](http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2013041)  
IF:0.852 (2012)
7. Pak, K., Papp, C., Galajda, Z., Szerafin, T., **Varga, B.**, Juhász, B., Haines, D., Szentmiklósi, J.A., Tósaki, Á., Gesztelyi, R.: Approximation of A1 adenosine receptor reserve appertaining to the direct negative inotropic effect of adenosine in hyperthyroid guinea pig left atria.  
*Gen. Physiol. Biophys. Epub ahead of print, (2013), p. 1-30, (2013), p. 1-30.* -  
IF:0.852 (2012)
8. Gesztelyi, R., Zsuga, J., Kemény-Beke, Á., **Varga, B.**, Juhász, B., Tósaki, Á.: The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology.  
*Arch. Hist. Exact Sci.* 66 (4), 427-438, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00407-012-0098-5>  
IF:0.514



9. Bak, I., Czompa, A., Csépanyi, E., Juhász, B., Kalantari, H., Najm, K., Aghel, N., **Varga, B.**, Haines, D.D., Tósaki, Á.: Evaluation of systemic and dermal toxicity and dermal photoprotection by sour cherry kernels.  
*Phytother. Res.* 25 (11), 1714-1720, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3580>  
IF:2.086
10. Haines, D.D., **Varga, B.**, Bak, I., Juhász, B., Mahmoud, F.F., Kalantari, H., Gesztelyi, R., Lekli, I., Czompa, A., Tósaki, Á.: Summative interaction between astaxanthin, Ginkgo biloba extract (EGb761) and vitamin C in Suppression of respiratory inflammation: A comparison with ibuprofen.  
*Phytother. Res.* 25 (1), 128-136, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3160>  
IF:2.086
11. Juhász, B., **Varga, B.**, Czompa, A., Bak, I., Lekli, I., Gesztelyi, R., Zsuga, J., Kemény-Beke, Á., Antal, M., Szendrei, L., Tósaki, Á.: Postischemic cardiac recovery in heme oxygenase-1 transgenic ischemic/reperfused mouse myocardium.  
*J. Cell. Mol. Med.* 15 (9), 1973-1982, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01153.x>  
IF:4.125
12. Juhász, B., Das, D.K., Kertész, A., Juhász, Á., Gesztelyi, R., **Varga, B.**: Reduction of blood cholesterol and ischemic injury in the hypercholesteromic rabbits with modified resvaratrol, logevinex.  
*Mol. Cell. Biochem.* 348 (1-2), 199-203, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0615-2>  
IF:2.057
13. Kalantari, H., Jalali, M., Jalali, A., Salimi, A., Alhalvachi, F., **Varga, B.**, Juhász, B., Jakab, A., Kemény-Beke, Á., Gesztelyi, R., Tósaki, Á., Zsuga, J.: Protective effect of Cassia fistula fruit extract on bromobenzene-induced nephrotoxicity in mice.  
*Hum. Exp. Toxicol.* 30 (10), 1710-1715, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0960327110396532>  
IF:1.772



14. Bak, I., Lekli, I., Juhász, B., Varga, E., **Varga, B.**, Gesztelyi, R., Szendrei, L., Tósaki, Á.: Isolation and Analysis of Bioactive Constituents of Sour Cherry (*Prunus cerasus*) Seed Kernel: An Emerging Functional Food.  
*J. Med. Food.* 13 (4), 905-910, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2009.0188>  
IF:1.461
15. Juhász, B., **Varga, B.**, Gesztelyi, R., Kemény-Beke, Á., Zsuga, J., Tósaki, Á.: Resveratrol: A multifunctional cytoprotective molecule.  
*Curr. Pharm. Biotechnol.* 11 (8), 810-818, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138920110793262079>  
IF:3.455

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 33.44**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5.395**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.03.04



## 7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Tósaki Árpád egyetemi tanárnak (DE GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék), hogy lehetővé tette munkám elvégzését az általa vezetett tanszéken.

Köszönöm Dr. Juhász Béla egyetemi adjunktusnak (DE GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék), hogy kísérletes munkámat mindvégig követte és mindig iránymutatást adott, mikor kellett.

Köszönöm Dr. Gesztelyi Rudolf egyetemi adjunktusnak (DE GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék), hogy mindig volt egy szabad perce rám, ha valami szakmai – kiváltképp, ha statisztikai – kérdésem merült fel.

Köszönöm Dr. Atlasz Tamás és Dr. Szabadfi Krisztina (PTE TTK, Testnevelés- és Sporttudományi Intézet) kooperációs együttműködését, továbbá köszönettel tartozom minden velük kapcsolatban álló tanszék munkatársainak, akik elősegítették kollaborációs munkánkat és közös cikkünk megjelenését.

Köszönettel tartozom Dr. Antal Miklós professzor úrnak és Kis Grétának (DE ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Tanszék) az elektronmikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm Dr. Pósa Anikónak és Dr. Varga Csabának (SZTE TTIK, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék) hemoxigenáz aktivitás-mérésben nyújtott segítségüket.

Köszönetemet fejezem ki a tanszékünkön dolgozó munkatársaimnak, különösképpen dr. Bombicz Mariannak és dr. Priksz Dánielnek.

Köszönöm családomnak, feleségemnek, Adriennek, kislányaimnak, Panninak és Alíznak, valamint szüleimnek, öcsémnek és nagyszüleimnek szerető támogatásukat!

Köszönöm barátaimnak a velük kikapcsolódással, feltöltődéssel eltöltött időt!

A kutatás a Richter Gedeon Talentum Alapítvány támogatásával valamint az OTKA 104017, OTKA 78223, TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 kereteiből valósult meg. A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



Nemzeti Fejlesztési Ügynökség  
[www.ujsechenyiterv.gov.hu](http://www.ujsechenyiterv.gov.hu)  
06 40 638 638

