

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A glukagon-típusú peptid-1 (GLP-1) és a melanin koncentráló hormon (MCH) mérésére szolgáló radioimmunoassay (RIA) módszerek kifejlesztése és gyakorlati alkalmazásuk

Lelesz Beáta

Témavezető: Prof. Dr. Szilvássy Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017.

Tartalomjegyzék	1
I. RÖVIDÍTÉSEK	3
II. BEVEZETÉS	6
III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
III.1. Glukagon típusú peptid-1 (GLP-1) irodalmi áttekintése	8
III.2. Melanin koncentrálnó hormon (MCH) irodalmi áttekintése	9
III.3. Radioimmunoassay (RIA) irodalmi áttekintése	14
IV. CÉLKITŰZÉS	18
V. RIA MÓDSZEREK KIFEJLESZTÉSE	20
V.1. RIA módszerek kifejlesztéséhez szükséges peptidok és anyagok	20
V.1.1. GLP-1 (19-37) és Cys ⁽⁰⁾ -GLP-1 (19-37) peptidok szintézise	20
V.1.2. MCH szintézise	21
V.1.3. GLP-1-hez és az MCH-hoz hasonló szerkezetű más peptidok	22
V.1.4. A RIA módszerek kifejlesztéséhez szükséges további anyagok	23
V.2. Immunogének készítése	23
V.2.1. BSA-Cys ⁽⁰⁾ -GLP-1 (19-37) immunogén készítése	24
V.2.2. BSA-MCH immunogén készítése	24
V.3. Antisérumok termelése	24
V.3.1. GLP-1 antisérum	25
V.3.2. MCH antisérum	25
V.4. Antisérumok karakterizálása	25
V.4.1. Antisérumok titere	26
V.4.1.1. „GLP-1 3/7” antisérum titere	26
V.4.1.2. „MCH 1/5” antisérum titere	27
V.4.2. Specifitás (keresztreakciós vizsgálatok)	28
V.4.2.1. „GLP-1 3/7” antisérum specifitása	29
V.4.2.2. „MCH 1/5” antisérum specifitása	30
V.4.3. Affinitás meghatározása	30
V.4.3.1. „GLP-1 3/7” antisérum affinitása	32
V.4.3.2. „MCH 1/5” antisérum affinitása	33
V.5. Radioaktív RIA tracerek előállítása	34
V.5.1. Peptid származékok ¹²⁵ I izotóppal történő jelölése	34
V.5.1.1. GLP-1 (19-37) radioaktív jelölése	35
V.5.1.2. Patkány MCH radioaktív jelölése	35
V.5.2. ¹²⁵ I izotóppal jelölt peptidok tisztítása (hagyományos módszerek)	35
V.5.3. ¹²⁵ I izotóppal jelölt peptidok HPLC-vel történő tisztítása és azonosítása	36
V.5.3.1. ¹²⁵ I izotóppal jelzett GLP-1 (19-37) tisztítása HPLC-vel	37
V.5.3.2. ¹²⁵ I izotóppal jelzett patkány MCH tisztítása HPLC-vel	38
V.6. RIA módszerek gyakorlati megvalósítása	40
V.6.1. RIA puffer	40
V.6.2. RIA standardok	41
V.6.2.1. GLP-1 RIA standard	41
V.6.2.2. MCH RIA standard	41
V.6.3. RIA mérési sorozat készítése	41
V.6.3.1. GLP-1 RIA összeállítása	41

V.6.3.2.	MCH RIA összeállítása	41
V.6.4.	Inkubációs idő és hőmérséklet	42
V.6.4.1.	GLP-1 RIA inkubációs időtartama	42
V.6.4.2.	MCH RIA inkubációs időtartama	43
V.6.5.	Szeparációs technika	44
V.6.6.	Az assay-k kiértékelése	45
V.6.6.1.	GLP-1 RIA kalibrációs görbéje	45
V.6.6.2.	MCH RIA kalibrációs görbéje	46
V.6.7.	Az assay-k minőségének ellenőrzése	47
V.6.7.1.	GLP-1 RIA minőségének ellenőrzése	48
V.6.7.2.	MCH RIA minőségének ellenőrzése	48
VI.	RIA MÓDSZEREK GYAKORALTI ALKALMAZÁSA	49
VI.1.	GLP-1 RIA gyakorlati alkalmazása	49
VI.1.1.	Állatkísérlet	49
VI.1.2.	Plazma előkészítés	49
VI.1.3.	Plazma GLP-1 koncentráció meghatározása	50
VI.1.4.	Vércukorszint mérési eredmények	51
VI.2.	MCH RIA gyakorlati alkalmazása	52
VI.2.1.	Szövetextrakció RIA meghatározáshoz	52
VI.2.2.	Különböző patkány szervek MCH tartalma	53
VI.2.3.	Patkány agyterületek és gerincvelő MCH tartalma	54
VII.	DISZKUSSZIÓ	55
VII.1.	GLP-1 RIA kifejlesztése és alkalmazása	55
VII.2.	MCH RIA kifejlesztése és alkalmazása	58
VII.3.	Önálló munkák	62
VIII.	ÖSSZEFOGLALÁS	63
IX.	SUMMARY	65
X.	IRODALOMJEGYZÉK	67
XI.	TÁMOGATÁS	76
XII.	ETIKAI ENGEDÉLY	76
XIII.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	77
XIV.	FÜGGELÉK	80

I. RÖVIDÍTÉSEK

A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke:

AcN	acetonitril
ACTH	adenokortikotróp hormon
Ala	alanin
ARC	nucleus arcuatus
Arg	arginin
Asp	asparaginsav
Boc-Arg(Tos)	N ^α -terc. butil-oxi-karbonil-N ^ω -tozil-arginin
Boc-Glu(Oc-Hex)	N ^α -terc. butil-oxi-karbonil-N ^ω - ciklohexil észter-glutaminsav
Boc kémiai technika Boc	terc. butil-oxi-karbonil
Boc-Lys(2ClZ)	N ^α -terc. butil-oxi-karbonil-N ^ω -2-klór benzil-oxi-karbonil-L-lizin
BSA	bovine (marha) szérum albumin
But	terc. Butil
Boc-Tyr(2BrZ)	N ^α -terc. butil-oxi-karbonil-N ^ω -2-bróm benzil-oxi-karbonil-tirozin
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
CPBA	kompetitív fehérje kötési analízis
Cys	cisztein
DCC	diciklohexil karbodiimid
DMSO	dimetiksulfoxid
DPP-IV	dipeptidil-peptidáz-IV
DTT	ditiotreitol
Fmoc	fluorenil-metil-oxi-karbonil
GIP	gyomor inhibitor polipeptid
Gln	glutamin
Glu	glutaminsav
GLP-1	Glukagon típusú peptid-1
GLP-2	Glukagon típusú peptid-2
Gly	glicin
HBTU	N,N,N',N'-Tetrametil-O-(benzotriazol-1-yl)urónium tetrafluoroborát

HF	hidrogénfluorid
His	hisztidin
HOBT	1-hidroxi-benzotriazol
HPLC	nagy teljesítményű folyadék kromatográfia
Ile	izoleucin
IP3	inozitol trifoszfát
IRMA	immunoradiometrikus assay
Leu	leucin
Lys	lizin
MAPK	mitogén aktiválta protein kináz
MCH	melanin koncentráló hormon
MCHR1	melanin koncentráló hormon receptor 1
MCHR2	melanin koncentráló hormon receptor 2
Mw	molekulasúly
NPY	neuropeptid Y
OBut	terc. Butilészter
OcHex	ciklohexil észter
OGTT	orális glükóz tolerancia tesztet
Pbf	2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofuran-5-szulfonil
Phe	fenilalanin
PLC/PKC	foszfolipáz C/protein kináz C
RIA	radioimmunoassay
RP-HPLC	fordított fázisú nagy teljesítményű folyadék kromatográfia
SEM	standard error of mean
Ser	szerin
SMCC	succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciklohexán-1-karboxilát
TFA	trifluor-ecetsav
Thr	treonin
Tos	tozil
Trp	triptofán
Trt	tritol
TSA	(two-site) szendvics-típusú immunoassay
Tyr	tirozin
Val	valin

VIP	vazoaktív intesztinális peptid
WHO	world health organization
α MSH	α melanocita stimuláló hormon
2BrZ	2-bróm benzil-oxi-karbonil
2ClZ	2-klór benzil-oxi-karbonil

II. BEVEZETÉS

A Debreceni Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézete hosszú ideje foglalkozik a táplálkozás, az obezitás, az inzulin rezisztencia és a cukorbetegség témakörével. Diákkörös hallgatóként 2008-ban kapcsolódtam be az intézet izotóp laboratóriumában folyó kutatómunkába, amely során radioimmunoassay (RIA) módszerek kifejlesztésének és azok gyakorlati alkalmazásának ismereteit sajátítottam el. A disszertációm témájaként szolgáló peptidek, nevezetesen a glukagon típusú peptid-1 (GLP-1) és a melanin koncentrálnó hormon (MCH) mérésére kifejlesztett RIA módszerek alkalmazása hasznos információkkal járulnak hozzá intézetünk fő kutatási témájához. A vizsgált peptidek legfontosabb biológiai hatásai: a GLP-1 táplálékbevitel arányában fokozza az inzulintermelődést, az MCH részt vesz az éhség és jóllakottság érzés szabályozásában. Az obezitás előfordulási arányának gyors növekedése, az ehhez társuló inzulin rezisztencia, majd a következményesen kialakuló 2-es típusú diabetes mellitus (T2DM) és a cukorbetegséghez társuló szövődmények egyre nagyobb világméretű egészségügyi problémát jelentenek, olyannyira, hogy a XXI. század fő népegészségügyi problémájává vált a T2DM, vezető helyet foglalva el az úgynevezett nem fertőző civilizációs betegségek sorában (Kolovou és mtsai 2007). Az obezitás kialakulásában a genetikai háttér mellett szerepet játszanak a környezeti tényezők, a mozgásszegény életmód, az egészségtelen táplálkozás, valamint egyes gyógyszerek (pl. atípusos antipszichotikumok) tartós használata. A WHO adatai szerint a világon jelenleg több mint 420 millió embert érint a cukorbetegség, hazánkban pedig a lakosság közel 10 %-át, amely adatok évről évre emelkedő tendenciát mutatnak.

Ezen sokakat érintő téma tanulmányozásához nyújt nagy segítséget az újonnan kifejlesztett két RIA módszerünk gyakorlati alkalmazása a kísérletes inzulin rezisztencia és a 2-es típusú diabetes kialakulási körülményeinek vizsgálatában. A kísérletes kutatómunkán kívül elsősorban az MCH RIA módszerünk klinikai gyakorlati alkalmazásától várunk alapvető fontosságú új megfigyeléseket. A disszertációmban ismertetett kísérleti eredményeink és tudományos ismereteink alapján ugyanis feltételezzük, hogy az MCH a szervezetben kettős szereppel rendelkezik. Egyrészt neuro-transzmitter a központi idegrendszerben, másrészt étkezés hatására felszabaduló gasztrointesztinális keringő hormon is, amely fontos szerepet játszhat nemcsak a táplálékfelvétel szabályozásában, hanem az emésztés folyamatában is. Feltételezhetően hatással van olyan betegségek kialakulására, mint a kóros elhízás, vagy éppen a kóros soványság. Nagy érzékenységű és specifikus MCH RIA módszerünk klinikai

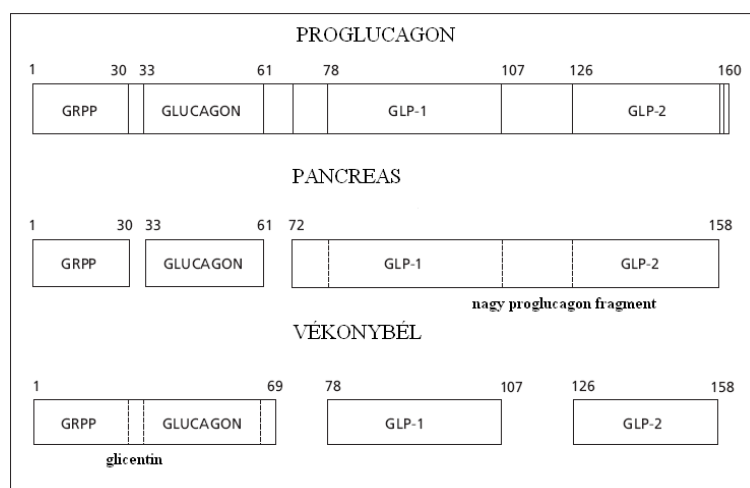
alkalmazása távlatokat nyithat meg akár még eddig ismeretlen kórképek (pl. MCH termelő adenóma) megismeréséhez is.

A 2017 tavaszán benyújtásra került EFOP-3.6.2-es pályázathoz „*A melanin koncentrálnó hormon (MCH) szerepének vizsgálata a juvenális obezitás kialakulásában*” című kutatási tervvel csatlakoztunk. Az alprojekt megvalósításában a Debreceni Egyetem Farmakológiai Intézetén és Gyermekgyógyászati Klinikáján kívül a Szegedi Tudományegyetem és a Pécsi Tudományegyetem Gyermekgyógyászati Klinikái vesznek részt.

III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

III.1. Glukagon típusú peptid-1 (GLP-1) irodalmi áttekintése

A proglucagont, amely molekula prekursora a glucagonnak és további más glucagon-típusú peptideknek (GLP-1, GLP-2, oxintomodulin), kódoló gént 1983-ban klónozták (Bell és mtsai 1983). Kiderült, hogy ugyanaz a gén egyaránt megtalálható a pancreas α -sejtjeiben, valamint a vékonybél L-sejtjeiben. A kétfajta sejtípusban termelődő proglucagon azonos felépítésű (160 aminosavat tartalmaz), ellenben a poszt-transzlációs folyamat, valamint az ennek során képződő biológiailag aktív peptidhormonok teljesen különböznek (Vilsboll 2004). A pancreas α -sejtjeiben képződik a glucagon, a vékonybél L-sejtjeiben a GLP-1 és GLP-2 (1. ábra).



1. ábra: Poszt-transzlációs folyamatok

A GLP-1 megjelölés nem egy adott peptidre vonatkozik, hanem egy egész molekula csoportra, nevezetesen magába foglalja az alábbi peptideket: GPL-1 (1-37), GLP-1 (7-37), GLP-1 (9-37) továbbá az amidált formákat: GLP-1 (1-36)-NH₂, GLP-1 (7-36)-NH₂, GLP-1 (9-36)-NH₂ (Deacon és Holst 2009). Biológiailag aktív formák ezek közül a GLP-1 (7-37) és a GLP-1 (7-36)-NH₂ (2. ábra).

GLP-1 (1-37)

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly

GLP-1 (1-36)-NH₂

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH₂

GLP-1 (7-37)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly

GLP-1 (7-36)-NH₂

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH₂

GLP-1 (9-37)

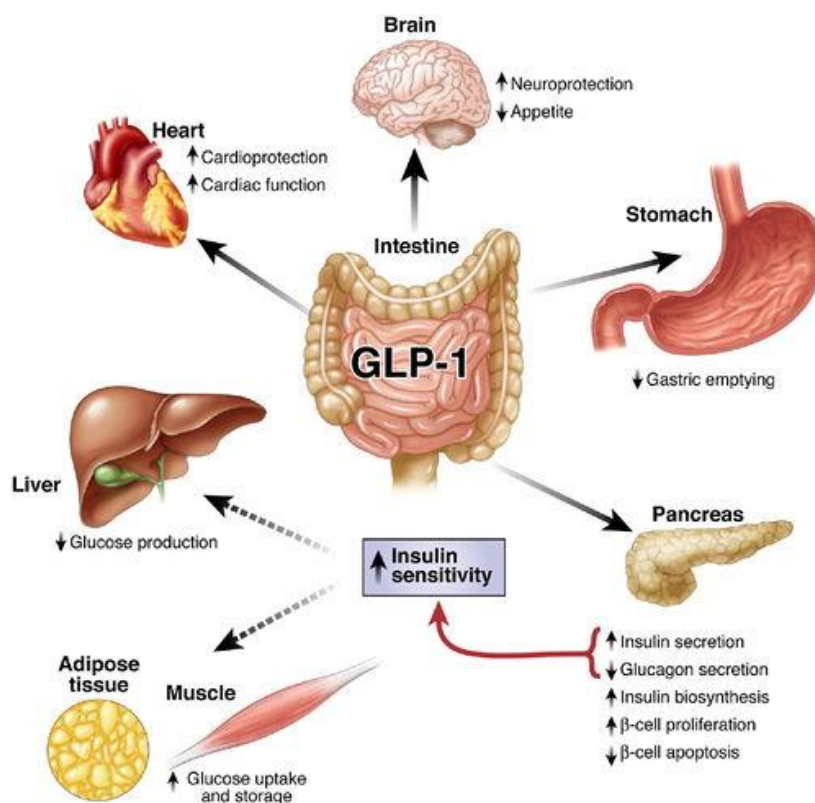
Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly

GLP-1 (9-36)-NH₂

Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH₂

2. ábra: GLP-1 peptidek aminosav szekvenciája

A GLP-1 peptidhormon számos biológiai hatással rendelkezik az élő szervezetben (3. ábra). Javítja a glükóz homeosztázist a tápanyag bevitel által kiváltott inzulin felszabadulás stimulálása és a glucagon elválasztás csökkentése révén. Cukorszint arányában fokozza az inzulin szekrécióját a pancreas-ból, ugyanakkor csökkenti a glucagon termelődését és felszabadulását. Fokozza a pancreas β -sejtjeinek növekedését és az inzulin termelődéséért felelős gén expresszióját. Nagymértékben fokozza az inzulin szenzitivitást. Gátolja a gyomorsav termelődést és csökkenti a gyomor kiürülés sebességét, ezáltal az éhségérzet kialakulása lelassul, a táplálék bevitelt mennyisége visszaesik (Motta és mtsai 2012, Gautier és mtsai 2005, Brubaker 2010). Látható, hogy a GPL-1 direkt és indirekt úton is hatással van a szervezet cukor háztartására, ezáltal fontos és tanulmányozandó faktorrá válik az obezitás és cukorbetegség mechanizmusának tanulmányozásban.



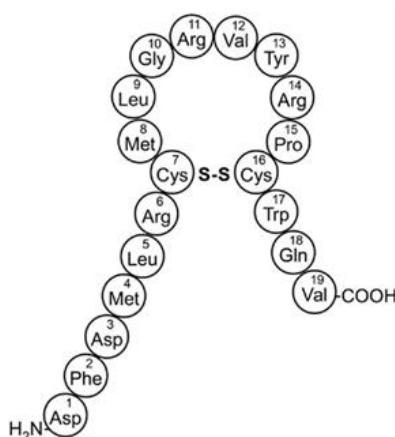
3. ábra: GLP-1 fiziológiai hatásai

A GLP-1 RIA kifejlesztésében nagy nehézséget jelent a molekuláris sokféleség. Lehetetlen olyan RIA módszert kifejleszteni, amelyik egyforma mértékben méri valamennyi GLP-1 peptidet, ugyanakkor olyan assay sem dolgozható ki, amelyik csak egyetlen formát mér a hat variáns közül (Lelesz és mtsai 2014). A peptid mérésre az alábbi RIA módszerek fejleszthetők ki: 1. Specifikus RIA fejleszthető ki a GLP-1 (1-37) és GLP-1 (1-36)-NH₂ formák közös mérésére, olyan ellenanyag használatával, amelyik a két peptid közös N-terminális szekvenciáját (His-Asp-Glu-Phe-Glu) köti meg. Ez az assay a többi négy GLP-1 formát nem mérni. 2. RIA fejleszthető ki a GLP-1 (7-37) és a GLP-1 (7-36)-NH₂ együttes mérésére. Ebben az esetben olyan ellenanyagot kell használni, amelyik a két peptid közös N-terminális szekvenciáját (His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe) köti meg. Ez az assay keresztreakciót adhat a másik 4 peptiddel, vagy azok közül valamelyikkel. 3. RIA fejleszthető ki a GLP-1 (9-37) és GLP-1 (9-36)-NH₂ közös mérésére, ekkor a két peptid közös N-terminális szekvenciáját (Glu-Gly-Thr-Phe-Thr) megkötő ellenanyagot kell használni a mérésnél. Keresztreakció a másik 4 peptiddel itt is elképzelhető. 4. Együttesen mérhetők az amidált formák (GLP-1 (1-36)-NH₂, GLP-1 (7-36)-NH₂, GLP-1 (9-36)-NH₂) olyan ellenanyag alkalmazásakor, amelyik a három peptid közös C-terminális (Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH₂) részéhez kötődik. Keresztreakció a másik 3 peptiddel szinte biztos. 5. Végezetül együttesen mérhetők a GLP-1 (1-37), GLP-1 (7-

37) és GLP-1 (9-37) formák, ha az ellenanyag ezen peptidek C-terminális közös szekvenciáját (Val-Lys-Gly-Arg-Gly) köti meg. Munkacsoportunk ez utóbbi, C-terminális RIA kifejlesztése mellett döntött. Bízunk benne, hogy a beállított assay az amidált formákat is mérni fogja valamilyen mértékben, így olyan assay áll majd a rendelkezésünkre, amelyik a minták teljes GLP-1 tartalmáról ad majd felvilágosítást.

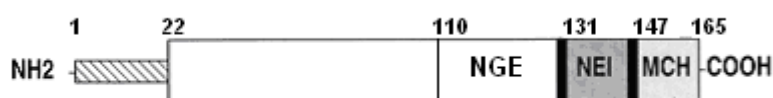
III.2. Melanin koncentráló hormon (MCH) irodalmi áttekintése

A melanin koncentráló hormont először 1983-ban, lazacok agyalapi mirigyéből izolálták és azonosították kémiai szerkezetét. Megállapítást nyert, hogy a halakból izolált MCH 17 aminosavból áll és ciklikus szerkezetű. Biológiai hatását tekintve, nagy szerepet játszik a csontos halak bőrének pigmentáció szabályozásában (Kawauchi és mtsai 1983). Pár évvel később patkány hypothalamusból is sikerült izolálni az MCH-t (Vaughan és mtsai 1989), amelynek szerkezeti képlete a 4. ábrán látható. A patkány és egyben az emlős MCH szintén ciklikus szerkezetű, de nem azonos a korábban lazacokból izolált MCH-val. Az emlős MCH 19 aminosanból áll, (az N-terminális szakaszon 2 aminosavval hosszabb, továbbá a peptidláncban 4 helyen aminosav csere történt), amelyben di-szulfid híd kapcsolja össze a 7-es és 16-os pozícióban található Cys aminosavakat. A peptid Tyr-t is tartalmaz (13-as pozíció), amely a radioaktív (^{125}I) jelölés, a RIA kifejlesztés szempontjából fontos tényező.



4. ábra: Emlős MCH aminosav szerkezete

A kémiai szerkezet és biológiai hatás összefüggéseit vizsgáló kísérletek során kimutatták, hogy a hurkos szerkezet elengedhetetlen a biológiai aktivitás szempontjából, valamint hogy a gyűrűben található Arg (arginin) és Tyr (tirozin) aminosavak fontos szerepet töltenek be az MCH biológiai hatásának kialakulásában (Kawazoe és mtsai 1987). A peptid típusú antagonistá vegyületek létrehozásánál ezeket az aminosavakat módosítják, vagy cserélik ki. Az emlős MCH a poszt-transzlációs folyamat során egy 165 aminosavat tartalmazó prekursor polipeptid molekulából képződik (5. ábra). Az MCH eredetileg a preprohormon C-terminális részében foglal helyet, majd a 145-ös és 146-os Arg aminosavak közötti proteolitikus hasítás következtében válik szabaddá és alakul át biológiailag aktív peptid hormonná. Az MCH mellett két másik biológiailag aktív peptid is képződhet az azonos prekursor molekulából, nevezetesen a neuropeptid E-I és neuropeptid G-E, más alternatív poszt-transzlációs folyamatok során (Nahon és mtsai 1989, Nahon 1994, Viale és mtsai 1999).



pre-pro-MCH	1-165
szignál peptid	1-21
pro-MCH	22-165
neuropeptid G-E	110-128
neuropeptid E-I	131-143
MCH	147-165

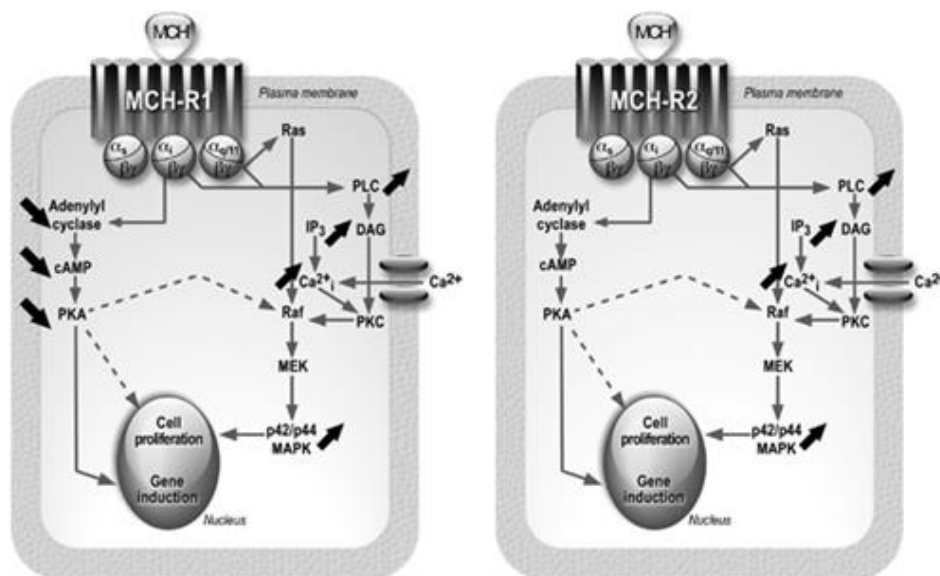
5. ábra: Poszt-transzlációs folyamatok

Az MCH emlősökben túlnyomórészt a laterális hipotalamuszban valamint a zona incertában expresszálódik (Bittencourt és mtsai 1992, Cassati és mtsai 2002), de megjelenése alacsony szinten néhány perifériás szervben, szövetben is megfigyelhető, mint például a hasnyálmirigyben, a vastagbél epiteliális sejtjeiben, valamint az adipocitákban (Tadayyon és mtsai 2000, Kokkotou és mtsai 2008, Bradley és mtsai 2000, Pissios és mtsai 2007).

A peptid emlősökben játszott élettani szerepével kapcsolatban kimutatták, hogy kulcsszerepet tölt be a táplálkozási viselkedés szabályozásában. Kontrol alatt tartja az energia egyensúlyt, a táplálék felvételt, a testsúlyt valamint az anyagcserét (Marsh és mtsai 2002, Ito és mtsai 2003). MCH adásával fokozható a táplálék felvétel, ami hosszú távon súlygyarapodáshoz, majd elhízáshoz vezet (Bradley és mtsai 2000). Ezeken túl bizonyítottan, vagy feltételezhetően részt vesz a cukorbetegség (Tadayyon és mtsai 2000, Pissios és mtsai 2007), a bélgyulladás (Kokotou és mtsai 2008) kialakulásában, valamint az alvás-ébrenlét ciklus szabályozásában (Verret és mtsai 2003).

Az MCH élettani szerepét két G-protein kapcsolt receptoron keresztül fejti ki, nevezetesen az MCHR1 (Saito és mtsai 1999, Chambers és mtsai 1999, Lembo és mtsai 1999) és MCHR2 (Sailer és mtsai 2001, Wang és mtsai 2001, Rodriguez és mtsai 2001) receptorokon. Az MCHR1 egy 353 aminosavból álló fehérje, amely magas fokú homológiát mutat a szomatosztatin receptor családdal. Az MCHR2 340 aminosavból épül fel, hozzávetőlegesen 40%-os egyezést mutat az MCHR1-el. Elsődleges receptornak az MCHR1-et tekintjük.

MCHR1 és MCHR2 receptorok jelátviteli útvonala a 6. ábrán látható (Presse és mtsai 2014). Az MCH receptorok különféle G-proteinekhez (G_i , G_o , $G_{q/11}$) kapcsolódhatnak. A G_i protein aktiválódása az adenilát-cikláz aktivitásának csökkenését eredményezi, valamint csökkenti a ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) képződését. A G_o vagy $G_{q/11}$ proteinek aktiválódása Ras/Raf útvonalon keresztül történő mitogén aktivált protein kináz (MAPK) aktivációhoz, valamint emelkedett Ca^{2+} koncentrációhoz vezet, amely az inozitol trifoszfát (IP3) és foszfolipáz C/protein kináz C (PLC/PKC) útvonalak aktiválódása révén következik be. Ezen kaszkádok működésbe lépése végül a géntranszkripció megváltozásához, sejtproliferációhoz és differenciálódáshoz vezet.



6. ábra: MCHR1 és MCHR2 jelátviteli útvonala emlős sejtekben

Mindkét receptor expressziója a központi idegrendszernek az energia-háztartást szabályozó területeken, mint a nucleus arcuatus (ARC) valamint a ventrális mediális hipotalamusz figyelhető meg. Az ARC a hypothalamus bázisán helyezkedik el, amelynek sejtcsoportjaiból indulnak ki a táplálékfelvétel orexigén és anorexigén pályái. Az orexigén pálya felelős a táplálékfelvételt elősegítéséért, megindításáért és az étvágy fokozódásáért.

Munkacsoportunk, amely a táplálkozás, obezitás és diabétesz témakörben végez tudományos munkát, fontosnak tartotta egy érzékeny és specifikus MCH RIA módszer kifejlesztését, amelyek segítségével vizsgálni tudjuk a peptid szöveti eloszlását és plazma szintjét egészséges (kontroll), beteg és kezelt állatokban.

III.3. Radioimmunoassay (RIA) irodalmi áttekintése

A radioizotóppal jelzett reagenst alkalmazó ligandassay-k kifejlesztése a XX. század hatvanas éveiben kezdődött a radioimmunoassay, vagy röviden RIA kidolgozásával. Steve Berson és Rosalyn Yalow az inzulin mérésére alkalmazta először a módszert 1960-ban (Berson és Yalow 1960). Ligandassay-kben az antigén (mérendő anyag) meghatározására többségében immunglobulinok (immunoassay), de szükség szerint receptor fehérjék (receptorassay, Davenport és Russel 1996), vagy fiziológiás szállító fehérjék (kompetitív fehérje kötési analízis (CPBA), Ekins 1960) használhatók specifikus kötőanyagnak. A RIA

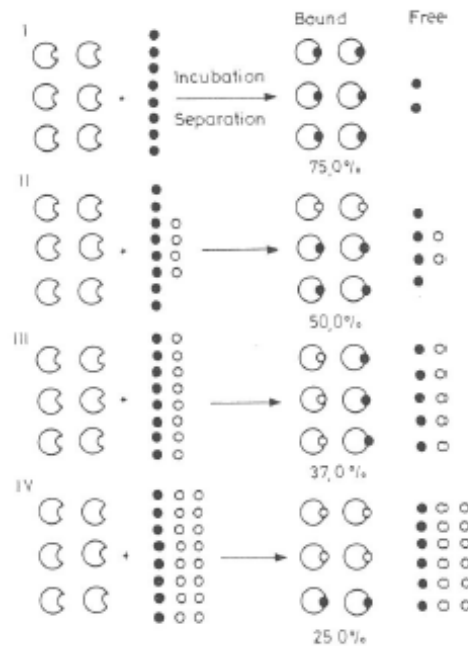
alapja az antigén és az ellene termelt antitestek közötti immunkémiai reakció, amelynek során az antigén izotóppal jelölt és jelöletlen formája vetélkedik az antitest kötési helyeiért. A vetélkedés csak akkor valósul meg, ha a kötőhelyek száma jóval kevesebb, mint a bemért, kötődni képes hideg és jelölt antigén mennyisége. A módszer detektálhatóságát a jól mérhető jelet hordozó radioaktív anyag, a tracer biztosítja. Egy jó RIA-nál a mérési határ a 0,1 fmol/ml antigén koncentráció. A rendkívüli érzékenység abból adódik, hogy a módszer egyesíti magában az antigén-antitest reakciók specifikusságát, valamint az izotópos mérés technika nagy érzékenységet. Az eljárásnak a kifejlesztése óta fennálló töretlen népszerűsége abban rejlik, hogy nagyon kis anyagmennyiségekből lehet pontos koncentráció meghatározást végezni sorozatmérésben. A módszer (amely szövetek és testnedvek hormontartalmának, szteroid koncentrációjának meghatározására alkalmas és ezzel hozzájárult az endokrinológia forradalmi megújításához) kifejlesztését 1977-ben Nobel-díjjal jutalmazták.

Egy RIA eljárás laboratóriumi beállításához a 7. ábrán felsorolt feltételek szükségesek:

- 1. Antigén**
- 2. Radioaktív antigén**
- 3. Antigén specifikus antitest**
- 4. Optimális körülmények meghatározása**
- 5. Szeparációs eljárás**
-
- 6. Minta előkészítés**

7. ábra: RIA kifejlesztésének feltételrendszere

Szükség van nagy tisztaságú antigénre (mérni kívánt anyag), ugyanezen antigénnek radioizotóppal jelölt formájára, valamint az antigénnel és a radioaktív antigénnel specifikusan reagáló antitestre. Ezek után meg kell határozni az antigén-antitest kötődési reakció optimális körülményeit, majd ki kell választani a megfelelő szeparációs lejárást, amellyel elkülöníthetők az antitesthez kötődött és szabadon maradó antigén frakciók. Az adekvát minta előkészítés a pontos mérés előfeltétele.



8. ábra. Radioimmunoassay alapelve

A 8. ábra szemléletesen mutatja be a RIA alapelvét. A csövek limitált, de azonos mennyiségű antitesteket és ugyancsak azonos mennyiségű jelölt anyagot tartalmaznak. (A kötőhelyek száma kevesebb, mint a tracer mennyisége.) Változó mennyiségű hideg antigen (standard, vagy a mérendő minta) hozzáadását követően, az inkubációs periódus alatt zajló reverzibilis kötődési reakció eredményeként beáll a kémiai egyensúly. A képződött jelölt antigén-antitest komplex mennyisége fordított arányban függ a jelen lévő hideg anyag mennyiségétől. Ha növeljük a hideg antigen mennyiségét (kalibrációs görbe felvétele), akkor csökken a radioaktív komplex aránya és nő nem radioaktív komplex aránya, miközben az immunkomplex összes mennyisége állandó.

A klasszikus kompetitív immunoassay (korlátozott mennyiségű antitest, feleslegben alkalmazott jelzett és hideg antigén) mellett, ahol a reakcióban részt vevő és keletkező valamennyi komponens vízoldékony, kifejlesztésre kerültek az úgynevezett immunometrikus módszerek, ahol a radioizotóppal jelzett antitest a tracer, továbbá az egyik komponens szilárd fázishoz kötött (reakciócső falához) formában van jelen. Az immunoradiometrikus assay (IRMA) esetében a korlátozott mennyiségű jelzett antitest megoszlik az oldatban lévő antigén és a szilárd fázishoz kötött antigén között. A reakció lejátszódása után a szilárd fázison mért jel mértéke fordítottan arányos a minta antigén tartalmával (Miles és Hales 1968). A single-site immunometrikus assay továbbfejlesztésével, a jelzett antitest feleslegben adott mennyiségével alakult ki a nem kompetitív two-site, vagy szendvics-típusú immunoassay

(TSA). A mérés során az antigén két különböző epitopja ellen termelt antitestet alkalmaznak feleslegben. Az egyik antitest szilárd fázison rögzített, ez a kötő (capture) antitest, ehhez kapcsolódik a mérendő antigén. A másik antitest radioaktívan jelzett (signal) antitest, amely a kötő antitestek által már megkötött antigénhez kapcsolódik. A szilárd felületen (kémcső falán) olyan immunkomplex jön létre, ahol a két antitest szendvics-szerűen fogja közre a mérendő antigént. Mosást követően a szilárd fázison mért jel mértéke egyenesen arányos a minta antigén tartalmával (Halleen és mtsai 1999).

IV. CÉLKITŰZÉS

Két olyan új radioimmunoassay (RIA) módszer kidolgozását terveztük, amelyek gyakorlati alkalmazása hasznos információkkal járulhat hozzá a Debreceni Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében folyó élettani alapkutatáshoz, nevezetesen a táplálkozás, az obezitás, az inzulin rezisztencia és a 2-es típusú cukorbetegség összefüggéseinek tanulmányozásához. RIA kifejlesztéshez kiválasztott két peptid hormon: a glukagon típusú peptid-1 (GLP-1) és a melanin koncentráló hormon (MCH). Ezek a peptidek biológiai hatásaik alapján (inzulintermelés szabályozása, táplálék felvétel kontrollálása) fontos szerepet játszanak a szervezet energia egyensúlyának és anyagcseréjének a szabályozásában. Mennyiségi meghatározásuk a plazmában és a szövetekben, illetve a kezelésre bekövetkező változások nyomon követése új adatokkal szolgálnak az inzulin rezisztencia és a 2-es típusú cukorbetegség kialakulási körülményeinek a vizsgálatában.

A RIA módszerek kifejlesztéséhez az alábbi részfeladatokat kellett megoldani:

- a GLP-1 és az MCH peptidek szintézise,
- immunogén készítése (a peptidek hordozó fehérjéhez történő kapcsolása),
- immunizálás (ellenanyagok termelése),
- az antiszérumok karakterizálása (titer, affinitás, specificitás),
- a peptidek radioaktív izotóppal történő jelölése,
- a RIA tracerek tisztítása,
- a RIA módszerek gyakorlati kivitelezése (optimális mérési körülmények meghatározása, szeparációs eljárás kiválasztása, az assay-k kiértékelése és ellenőrzése),
- a plazma- és szövetminták mérésre történő előkészítése.

Az újonnan kifejlesztett GLP-1 RIA módszerünk esetében tervbe vettük alkalmazását atípusos, antipszichotikum okozta elhízás és inzulin rezisztencia patkány modellben. A kísérletben Sprague-Dawley patkányokat kezeltünk olanzapinnal, majd a vizsgálat végén megmértük az éhgyomri és a glükóz tolerancia teszt alatti plazma GLP-1 szinteket és meghatároztuk a glükóz toleranciát.

Laboratóriumunkban beállított MCH RIA módszerünk alkalmazásaként szöveti MCH tartalom meghatározásokat terveztünk. Wistar patkányok gasztorintesztinális traktusának egyes szakaszaiból, központi idegrendszeri területeikből és egyéb más perifériás szerveikből szöveti peptid koncentráció meghatározásokat végeztünk.

V. GLP-1 és MCH RIA MÓDSZEREK KIFEJLESZTÉSE

V.1. RIA módszerek kifejlesztéséhez szükséges peptidek és anyagok

A RIA módszerek kifejlesztéséhez szükséges peptidek szintézise, Prof. Dr. Tóth Gábor irányítása mellett a Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézetében történt.

V.1.1. GLP-1 (19-37) és Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) peptidek szintézise

A peptideket: H-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-OH [GLP-1 (19-37)] és H-Cys-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-OH [Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37)] ^tBoc kémiai technika alkalmazásával állították elő. A peptid láncok felépítése Pam gyantán történt (0,73 mmol/g) manuális szintézis technika alkalmazásával. Az oldallánc-védőcsoportok a következők voltak: Boc-Lys(2ClZ), Boc-Tyr(2BrZ), Boc-Arg(Tos) és Boc-Glu(Oc-Hex). A kapcsolást DCC-vel és HOBt-vel hajtották végre. Az aminosav inkorporációt kvantitatív ninhidrin teszttel követték nyomon (Kaiser és mtsai 1970). Az elkészült peptid gyantákat folyékony HF/dimetil-szulfid/p-cresol/p-thiocresol-al kezelték (86:6:4,2 % v/v), 0 °C-on 45 percig. A HF eltávolítása után a kapott szabad peptideket 10 %-os vizes ecetsavval szolubilizálták, szűrték, majd liofilizálták. A nyers peptideket (GLP-1 (19-37): 40 mg, Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37): 100 mg) félpreparatív RP-HPLC-vel (Knauer, Berlin, Németország) tisztították, 0,1%-os TFA és 80 %-os acetonitril (AcN) oldószerrendszer alkalmazásával Phenomenex Jupiter (Torrance, Kalifornia) C18 10 µm-es oszlopon (15x9x250 mm). A gradiens 35 %-ról 55 %-ra nőtt 60 perc alatt mindkét esetben. Az abszorbanciát 220 nm-en detektálták. Az egyesített frakciók liofilizációja a GLP-1 (19-37) esetében 13,5 mg tiszta terméket eredményezett, míg a Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) esetén 23,8 mg-ot. A peptidek tisztaságának analitikai értékelése RP-HPLC-vel 4,6x9x250 mm-es Phenomenex Luna C18 oszlopon történt, HP 1050 HPLC rendszeren (Hewlett Pacard, Palo Alto, Kalifornia). Az analitikai kontrol HPLC vizsgálatok optimális körülményei: áramlási sebesség 1,0 ml/min volt, gradiens: 42 %-ról 52 %-ra változott 15 perc alatt a GLP-1 (19-37) esetében. A Cys⁽⁰⁾-GLP-1(19-37) vizsgálatánál az áramlási sebesség szintén 1,0 ml/min volt, a gradiens: 45 %-ról 60 %-ra emelkedett 15 perc alatt. A retenciós idő (Rt) a GLP-1 (19-37) esetében Rt: 8,65 perc, a Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) peptid esetében Rt: 7,27 perc volt. Végezetül a szintetikus

peptidek karakterizálása tömegspektrometriával történt, Finnigan TSQ 7000 tandem kvadrupol tömegspektrométer (IET, Mundelein, Illinois, USA) használatával, amely elektropray ionforrással van felszerelve. A mért molekulatömeg (Mw) a GLP-1 (19-37) esetén 2136,3 volt (számított Mw: 2136,48). Ugyanezen adatok a Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) esetében: mért Mw: 2239,0 (számított Mw: 2238,61). A peptidszintézis hatásfoka GLP-1 (19-37) esetében 36 %, a Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) esetében 24 % volt. A nagy tisztaságú GLP-1 (19-37) peptidet radioaktív (¹²⁵I) jelölésre, valamint standardként használtuk a későbbiekben a RIA módszer kifejlesztésénél. A Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) peptidet BSA hordozófehérjéhez kapcsolva nyulak immunizálása alkalmaztuk.

V.1.2. MCH szintézise

Az MCH (H-Asp-Phe-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val-OH (diszulfid-híd a Cys⁽⁷⁾ és Cys⁽¹⁶⁾ aminosavak között) peptidet Fmoc kémiai technikával állították elő. A peptid lánc felépítése Wang gyantán (0,41 mmol/g) történt a standard protokollnak megfelelően egy CEM típusú mikrohullámú peptid szintetizátor (Magne-Chem, Budapest, Magyarország) alkalmazásával. Az oldallánc védőcsoportok a következők voltak: Fmoc-Asp(OBut), Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Cys(Trt) és Fmoc-Tyr(But). A kapcsolást HOBt és HBTU segítségével hajtották végre. A szintézist követően a kész peptid gyanta 0,5 g-ját TFA/H₂O 95:5 arányú elegyével kezelték, amely 3 % DTT-t tartalmazott 0 °C-on, 3 órán át. A gyanta leszűrése után nyers peptidet hideg éterrel precipitáltak, majd a kapott szabad peptidet 10 %-os vizes ecetsavval szolubilizáltak, ismét szűrték, végezetül liofilizáltak. A nyers peptidet (100 mg) 0,1 mol/l (pH 7.5) ammónium-acetát puffer/AcN 1:1 arányú elegyében (100 ml) oldották fel és hozzáadtak 627 mg (0,12 mmol, 3 eq.) ClearOx gyantát állandó keverés közben. 2 óra elteltével az oldatot leszűrték, liofilizáltak majd a kész peptidet fél-preparatív RP-HPLC-vel tisztították 0,1 %-os TFA (A oldószer) és 80 %-os AcN (B oldószer) alkalmazásával Phenomenex Jupiter (Torrance, Kalifornia, USA) C18 10 µm-es oszlopon (15x9x250 mm), Shimadzu (Duisburg, Németország) HPLC rendszeren. Peptid detektálása 220 nm abszorpciós hullámhosszon történt. A liofilizáció 10 mg tiszta ciklikus patkány MCH-t eredményezett, amely összességében 10 %-os szintézis hatékonyságnak felel meg. A ciklizált peptid tisztaságának analitikai értékelése RP-HPLC-vel 4,6x9x250 mm-es Phenomenex Luna C18 oszlopon történt, HP 1050 HPLC rendszeren (Hewlett Pacard, Palo Alto, Kalifornia). Az analitikai kontrol HPLC vizsgálatok optimális körülményei a

következők voltak: áramlási sebesség 1,2 ml/min volt, gradiens: 40 %-ról 55 %-ra változott 15 perc alatt. A retenciós idő 7,64 percnak adódott. Végezetül a szintetikus patkány MCH karakterizálása tömegspektrometriával történt, Finnigan TSQ 7000 tandem kvadrupol tömegspektrométer (IET, Mundelein, Illinois, USA) használatával. A mért molekulatömeg (Mw) 2385,6, ami közel azonos az elméleti (számított Mw: 2386,9) értékkel. Ezt a nagy tisztaságú peptidet natív formában radioaktív (^{125}I) jelölésre, valamint standardként használtuk a RIA módszer kifejlesztésénél, konjugált formáját pedig ellenanyag termelés céljából nyulak immunizálására alkalmaztuk.

V.1.3. GLP-1-hez és az MCH-hoz hasonló szerkezetű más peptidek

A RIA módszerek kifejlesztésénél a GLP-1-hez és az MCH-hoz hasonló rokon szerkezetű, valamint biológia hatásaikhoz kapcsolódóan az alábbi peptideket használtuk fel keresztreakciós vizsgálatkhoz:

PEPTIDEK

GYÁRTÓ

GLP-1 (1-37)	Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, California, USA)
GLP-1 (7-37)	Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, California, USA)
GLP-1 (9-37)	Novus Biologicals (Littleton, Colorado, USA)
GLP-1 (7-36)-amid	Millipore Corporation (St. Charles, Missouri, USA)
GLP-2	Bachem (Bubendorf, Switzerland)
Glucagon	Bachem (Bubendorf, Switzerland)
GIP	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)
Inzulin	Lilly Hungária (Budapest, Magyarország)
Secretin	Bachem (Bubendorf, Switzerland)
VIP	Bachem (Bubendorf, Switzerland)
Tyr ⁽²⁾ , Phe ⁽¹³⁾ -MCH	Orvosi Vegytani Intézet (Szeged, Magyarország)
MCH (6-17)	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)
Orexin A	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)
Leptin	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)
α -MSH	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)
α -Endorphin	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)

β -Endorphin	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)
ACTH (1-39)	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)
ACTH (1-24)	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)
NPY	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)

I. táblázat: Rokon szerkezetű peptidek

V.1.4. A RIA módszerek kifejlesztéséhez szükséges további anyagok

Sigma (St. Louis, Missouri, USA): jodogén (1,3,4,6-terachloro-3 α ,6 α -difenil glikoluril), szarvasmarha szérum albumin (BSA), nátrium-azid, glutáraldehid, inkomplet Freund adjuváns, inzulin, dialízis cső

Serva (Heidelberg, Németország): Norit A (csontszén), dextrán FP 70

Izotóp Intézet (Budapest, Magyarország): hordozó-mentes Na¹²⁵I

VWR (Debrecen, Magyarország): nátrium-dihidrogén-foszfát, dinátrium-hidrogén-foszfát, nátrium-klorid, diklór-metán, boroszilikát üveg RIA csövek (12 x 75 mm)

Fluka (Buchs, Svájc): trifluor-ecetsav (TFA)

Carlo Erba (Rodano, Olaszország): HPLC-tisztaságú acetonitril, HPLC-tisztaságú metanol

Richter Gedeon (Budapest, Magyarország): olanzapin

Merck (Darmstadt, Németország): polipropilén RIA csövek (12 x 75 mm)

Roche Diagnostics (Basel, Svájc): Accu-Chek vércukorszintmérő

Charles River (Budapest, Magyarország): állatok (Új-Zélandi fehér nyulak, Wistar patkányok, Sprague-Dawley patkányok)

V.2. Immunogének készítése

Az ellenanyag termelésre szánt peptidek (Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37), patkány MCH) molekulaméretükből adódóan haptének, ezért csak hordozófehérjéhez (BSA, tiroglobulin) kapcsoltnak alkalmasak immunválasz kiváltására. Három kapcsolási technika áll rendelkezésre: Vegyes anhidrides kapcsolás esetén a peptid a szabad karboxil-csoportján keresztül kötődik a fehérjemolekulához. A glutáraldehides módszer a szabad amino-csoporton keresztül történő kapcsolást eredményez, míg a karbodi-imides eljárás esetén lehetőség van akár a karboxil-,

akár az amino-csoporton keresztül történő kötés kialakítására (László és Janáky 1986). A különböző kapcsolási technikák lehetőséget teremtenek az immunizálás során termelődő antitestek specificitásának megtervezéséhez, ugyanis az ellenanyag a peptid szabadon maradó vége ellen termelődik.

V.2.1. BSA-Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) immunogén készítése

GLP-1 specifikus ellenanyag termelése céljából a szintetizált Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) peptidet BSA hordozófehérjéhez kapcsoltuk (Lelesz és mtsai 2014). A módszer röviden a következő: A BSA-SMCC-Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) immunogén előállításánál 20 mg BSA-t feloldottunk 4 ml 31 mmol/l koncentrációjú nátrium-foszfát pufferben (pH: 7.4), amely 0,46 mol/l nátrium-kloridot, 2 % PVP-t és 41 mmol/l szacharózt tartalmazott. 7,2 mg szukcinimidil-4-(N maleimidometil)-ciklohexán-1-karboxilátot (SMCC) feloldunk 1 ml DMSO-ban, majd hozzáadtuk a fehérje oldathoz és 2 órán keresztül kevertettük 4 °C-on. Dialízist követően, amely a fent említett pufferrel szemben zajlott egy aktivált BSA állt rendelkezésünkre, amelyet 20 mg Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) peptiddel reagáltattuk 4 órán át szobahőmérsékleten. Az újabb dialízis ionmentesített vízzel szemben történt. Végezetül a keletkezett konjugátumot liofilizáltuk és 37,9 mg BSA-Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) immunogén állt rendelkezésünkre nyulak immunizálásához.

V.2.2. BSA-MCH immunogén készítése

MCH specifikus ellenanyag termelése céljából a szintetizált peptidet BSA hordozófehérjéhez kapcsoltuk a glutáraldehides kapcsolási technika alkalmazásával (Lelesz és mtsai 2016). A módszer leírása: 4 mg tiszta gyűrűs szerkezetű patkány MCH-t és 8 mg BSA-t feloldottunk 5 ml foszfát-pufferben (pH: 7.8), majd 2 µl glutár-dialdehidet adtunk az oldathoz. A kapcsolási reakció állandó keverés mellett 0 °C-on 24 órán keresztül zajlott. A dialízis desztillált vízzel szemben történt. Végezetül az immunogén tartalmú oldatot liofilizáltuk és a keletkezett 11 mg szárazanyagot nyulak immunizálásra használtuk.

V.3. Antisérumok termelése

GLP-1 és MCH ellenes antitestek termelése céljából a hordozófehérjéhez kapcsolt peptidekkel nyulakat immunizáltunk.

V.3.1. GLP-1 antiszérum

RIA mérésre alkalmas antiszérum termeléséhez a BSA-MSCC-Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) immunogénnel négy fiatal Új-Zélandi hím nyulat immunizáltunk. Az állatok súlya az immunizálás kezdetekor 2-2,2 kg volt. Az alapimmunizálásnál állatonként 800 µg konjugátumot inkomplett Freund-adjuváns és steril fiziológiás sóoldat 1:1 arányú, 1 ml térfogatú elegyében emulgeáltuk és a stabil emulziót az állatok subcutan, a hátbőr alá 8-10 helyre elosztva kapták. Az emlékeztető oltásokat 6 hetente ismételtük, de már fele dózissal (400 µg/állat) konjugátumot tartalmazó injekcióval. Az oltásokat addig folytattuk, amíg a rendelkezésükre álló oltóanyag el nem fogyott. Végezetül a hetedik oltást követően 2 héttel az állatokat a fülvénán keresztül elvéreztettük. A véreket lecentrifugáltuk és a nyert szérumokat alikvot mennyiségekben szétmérve -80 °C-on tároljuk. Az antiszérumok tesztelése során meghatároztuk titerüket, specificitásukat és affinitásukat. RIA kifejlesztésre a 3-as állat 7. oltást követően nyert széruma (jelölés: GLP-1 3/7) bizonyult a legalkalmasabbnak.

V.3.2. MCH antiszérum

Az immunizáláshoz 4 fiatal hím Új-Zélandi fehér nyulat használtunk, súlyuk az immunizálás kezdetekor 2-2,2 kg volt. Az első oltásnál állatonként 800 µg BSA-patkány MCH konjugátumot emulgeáltunk 1 ml inkomplett Freund-adjuváns és steril sóoldat (1:1) emulziójában, amely subcutan került beadásra a hátbőr 8-10 pontján. A további, úgynevezett emlékeztető oltások a kezdő dózis felével történtek (400 µg/állat) 5 hetes időközönként. Végül az 5. és egyben utolsó immunizálás után 2 héttel a nyulakat elvéreztettük fülvénájukon keresztül. Az összegyűjtött szérumokat -80 °C tároljuk. RIA mérési körülmények között meghatároztuk a nyert antiszérumok titerét, specificitását, valamint affinitását. RIA módszer kifejlesztésére az 1-es állat 5. oltást követően nyert széruma (MCH 1/5) bizonyult a legalkalmasabbnak.

V.4. Antisérumok karakterizálása

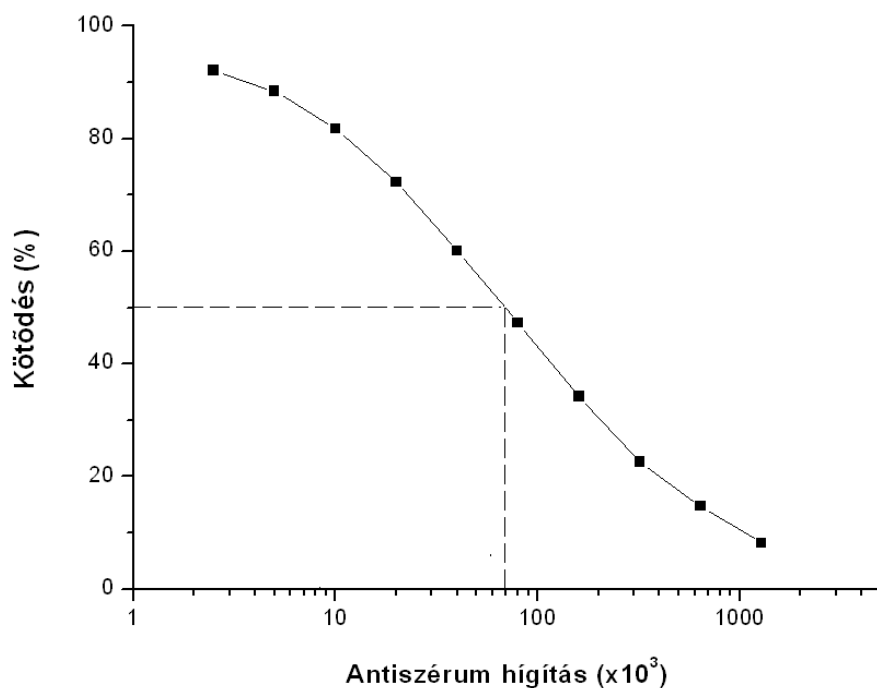
A „GLP-1 3/7” és „MCH 1/5” jelzésű antisérumunk jellemzéséhez meghatároztuk azok titerét, specificitását és affinitását.

V.4.1. Antisérumok titere

A titer az antisérumban található antitestek koncentrációjáról ad felvilágosítást. Irodalmi megfogalmazás szerint, a titer az antisérumnak az inkubációs térfogatra vonatkoztatott azon hígítása, amely jelöletlen antigén távollétében a bemért jelölt antigén 50 %-át köti meg (László és Janáki 1986).

V.4.1.1 „GLP-1 3/7” antisérum titere

RIA mérésre legalkalmasabb GLP-1 antisérumunk titerének megállapításához belőle nagyon széles tartományban hígítási sort készítettünk felező hígítást alkalmazva. A „GLP-1 3/7” antisérum hígítása az 1:2500 és 1:1280000 közötti tartományban változott. A különböző antisérum hígításokat mono-¹²⁵I-GLP-1 (19-37) radioaktív antigén állandó mennyiségével (3000 cpm), 48 óráig 4 °C-on RIA rendszerben inkubáltuk, hogy meghatározzuk az egyes hígításokhoz tartozó kötési százalékokat. Az antisérum hígítások logaritmusának függvényében ábrázolva a kötési százalékokat szigmoid lefutású görbét (titergörbe) kaptunk (9. ábra).

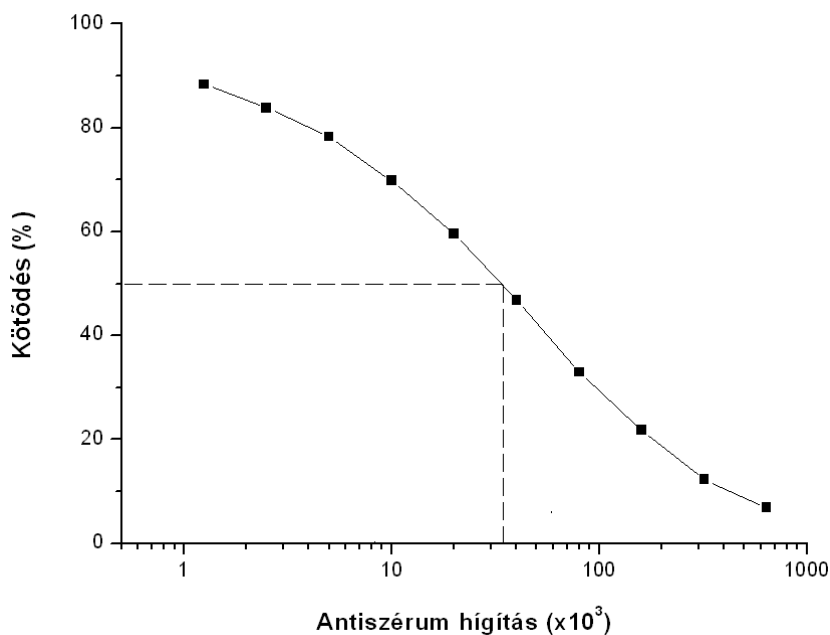


9. ábra: „GLP-1 3/7” jelzésű antiszérum titergörbéje

Az 50 %-os kötéshez szükséges antiszérum hígítás, vagyis a titer a „GLP-1 3/7” antiszérum esetében az 1:70000 hígítás. RIA méréseknél a későbbiekben az így meghatározott antiszérum hígítást használtuk.

V.4.1.2. „MCH 1/5” antiszérum titere

RIA mérésre legalkalmasabb „MCH 1/5” antiszérumunk titerének megállapításához széles tartományú hígítási sort készítettünk belőle az 1:1250 és 1:640000 közötti tartományban, amely hígításokat mono-¹²⁵I-MCH radioaktív antigén állandó mennyiségével (3000 cpm), 48 óráig 4 °C-on inkubáltuk RIA rendszerben. Meghatároztuk az egyes hígításokhoz tartozó kötési százalékokat, amely értékeket az antiszérum hígítások logaritmusaának függvényében ábrázolva szigmoid lefutású görbét (titergörbe) kaptunk (10. ábra).



10. ábra: „MCH 1/5” jelzésű antisérum titergörbéje

Az 50 %-os kötéshez szükséges antisérum hígítás, vagyis a titer az „MCH 1/5” antisérum esetében az 1:35000 hígítás. RIA méréseknél a későbbiekben ezt a meghatározott antisérum hígítást használtuk.

V.4.2. Specifitás (keresztreakciós vizsgálatok)

A specifitás, az antigén és az antitest közötti kötés szelektivitásáról ad információt. Az immunizálás során termelődött antitestek specifitását az antigén azon molekulaszervezete határozza meg, amely az immunogenitásért felelős. A specifitás kérdése különösen akkor fontos, ha a RIA mérési rendszerben a meghatározandó antigénhez hasonló szerkezetű más anyagok is jelen vannak. Az antisérum sepcifitását keresztreakciókkal jellemezzük. Meghatározásánál az anitgénnel és a rokonszerkezetű anyagokkal felvett kalibrációs görbék azon moláris koncentrációban megadott értékeit hasonlítjuk össze, melyek 50 %-ban gátolják a jelzett antigén antitesthez való kötődését. Kiszámítása az alábbi képlet alapján történik:

$$\text{Keresztreakció} = S_{50} / Z_{50} \times 100 (\%)$$

A képletben szereplő „S” az antigén „Z” a rokonszerkezetű anyag 50 %-os kötésgátlást okozó moláris koncentrációja (László és Janáki, 1986).

V.4.2.1. „GLP-1 3/7” antiszérum specificitása

A különböző GLP-1 peptid származékokkal és az azonos hormoncsaládba tartozó más peptidekkel végzett keresztreakciós vizsgálatok eredményeit a II. táblázatban foglaltuk össze. Referencia anyagként a GLP-1 (19-37) peptidet használtuk.

<u>PEPTIDEK</u>	<u>KERESZTREAKCIÓ (%)</u>
GLP-1 (19-37)	100,00
GLP-1 (1-37)	102,72
GLP-1 (7-37)	98,72
GLP-1 (9-37)	96,48
GLP-1 (7-36)-amid	20,44
GLP-2	0,00
Glucagon	0,00
GIP	0,00
Inzulin	0,00
Secretin	0,00
VIP	0,00

II. táblázat: „GLP-1 3/7” antiszérum keresztreakciói

A RIA mérésnél alkalmazott „GLP-1 3/7” antiszérum gyakorlatilag 100 %-ban méri a GLP-1 (19-37) forma mellett a GLP-1 (1-37), GLP-1 (7-37) és GLP-1 (9-37) formákat, ellenben nem detektálja az azonos hormoncsaládba tartozó más peptideket, mint ahogy azt a II. táblázat mutatja.

V.4.2.2. „MCH 1/5” antiszérumspecificitása

A különböző MCH peptidekkel és az azonos hormoncsaládba tartozó más anyagokkal végzett keresztreakciós vizsgálatok eredményeit a III. táblázatban foglaltuk össze. Referencia anyagként a patkány MCH peptidet használtuk.

<u>PEPTIDEK</u>	<u>KERESZTREAKCIÓ (%)</u>
MCH	100,00
Tyr ⁽²⁾ ,Phe ⁽¹³⁾ -MCH	92,40
MCH (6-17)	2,24
Orexin A	0,00
Leptin	0,00
α -MSH	0,00
α -Endorphin	0,00
β -Endorphin	0,00
ACTH (1-39)	0,00
ACTH (1-24)	0,00
NPY	0,00

III. táblázat: „MCH 1/5” antiszérums keresztreakciói

A RIA mérésnél alkalmazott „MCH 1/5” antiszérum 100 %-ban méri a patkány, vagyis az emlős MCH-t, a tervezett receptor kötődési vizsgálatokhoz szintetizált, módosított MCH-t (Tyr⁽²⁾,Phe⁽¹³⁾-MCH), ellenben nem kötődik a peptid molekula gyűrűs szerkezetét adó aminosav szekvenciához, valamint az azonos hormoncsaládba tartozó más peptidekhez.

V.4.3. Affinitás meghatározása

Az antiszérum affinitása az antitest és az antigén közötti kötés erősségéről ad felvilágosítást. Jellemzése az affinitási konstanssal (K) történik, amely a RIA rendszer egyensúlyi állapotára felírható egyenlet egyensúlyi állandója:

$$K = [B] / [F][Ab-B]$$

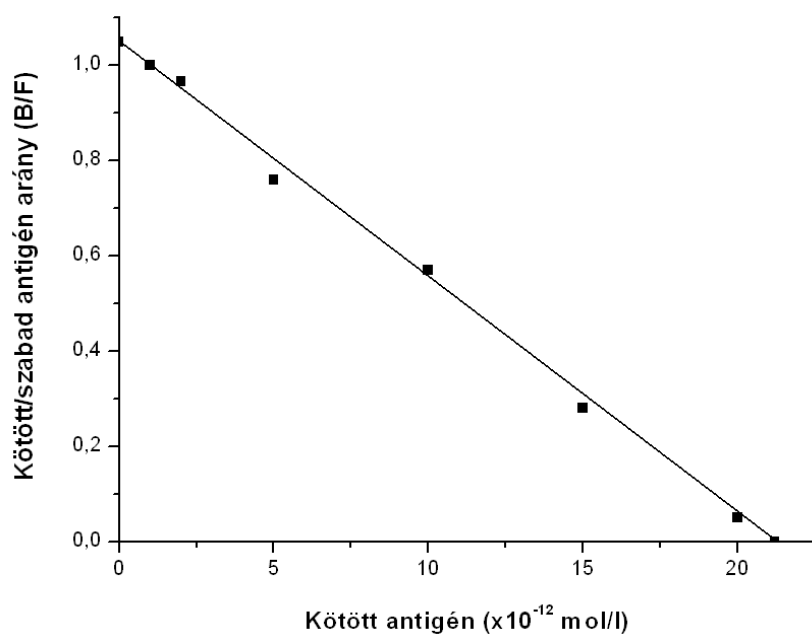
Az egyenletben szereplő [B] a kötött antigén, [F] a szabad antigén, [Ab-B] a szabad antitest egyensúlyi koncentrációja. Az egyenletet átrendezve a Scatchard-egyenese nyerhető:

$$[B] / [F] = -K[B] + K[Ab]$$

Az affinitási konstans meghatározásánál az állandó mennyiségű antitestet telítő, ugyancsak konstans mennyiségű jelzett antigén kötődését gátolják növekvő koncentrációjú jelöletlen (hideg) anyagnak a rendszerhez való hozzáadásával. A kötött/szabad hányadosnak a kötött frakcióval szembeni ábrázolásával kapott egyenes meredeksége az affinitási konstanst (-K), míg az x tengellyel való metszéspontja az antitest koncentrációját [B] adja. Az assay szenzitivitása erős korrelációt mutat az affinitással, a nagy affinitás általában nagy szenzitivitású metodika kifejlesztését teszi lehetővé (Berson és Yalow, 1968; László és Janáki, 1986).

V.4.3.1. „GLP-1 3/7” antiszérum affinitása

A GLP-1 radioimmunoassay-nél használt „GLP-1 3/7” ellenanyagunk affinitási konstansának meghatározására vonatkozó kísérleti eredményeink összesítése (Scatchard-egyenes) a 11. ábrán látható.



11. ábra: „GLP-1 3/7” antiszérum Scatchard-egyenes

Az ábrán látható egyenes egyenlete és az antitest koncentrációja:

$$y = -4,95 \times 10^{10} [B] + 1,05$$

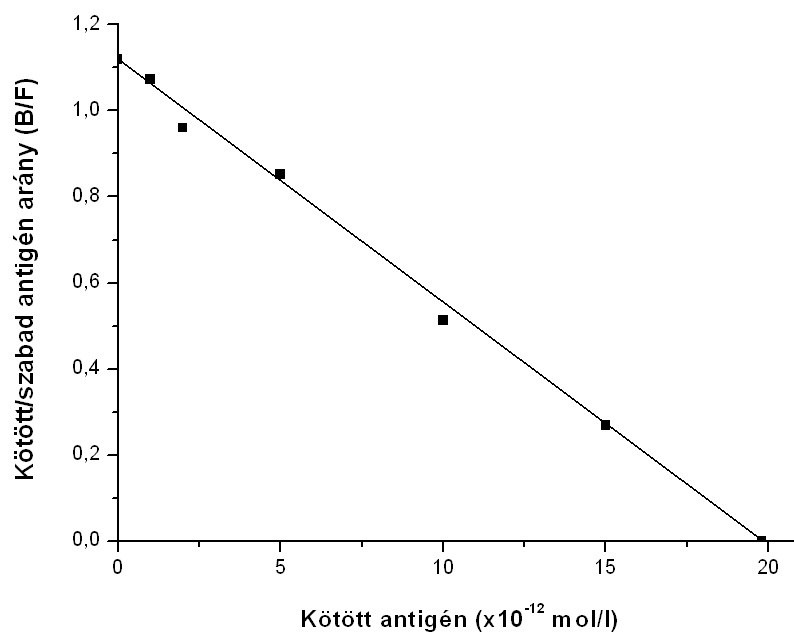
$$[B] = 2,12 \times 10^{-11} \text{ mol/l}$$

Az affinitási konstans számértéke:

$$K = 4,95 \times 10^{10} \text{ l/mol}$$

V.4.3.2. „MCH 1/5” antiszérum affinitása

Az MCH RIA-nál használt „MCH 1/5” ellenanyagunk affinitásának jellemzéséhez végzett kísérleti eredményeinket a 12. ábrán foglaltuk össze.



12. ábra: „MCH 1/5” antiszérum Scatchard-egyenese

Az ábrán látható egyenes egyenlete és az antitest koncentrációja:

$$y = -5,65 \times 10^{10}[B] + 1,12$$

$$[B] = 1,98 \times 10^{-11} \text{ mol/l}$$

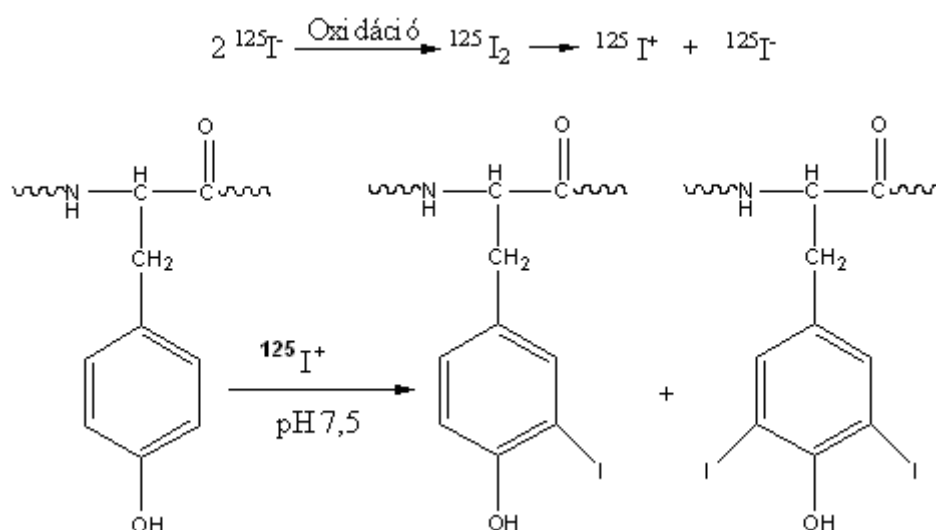
Az affinitási konstans számértéke:

$$K = 5,65 \times 10^{10} \text{ l/mol}$$

V.5. Radioaktív RIA tracerek előállítása

V.5.1. Peptid származékok ^{125}I izotóppal történő jelölése

Peptidek és peptidhormon származékok RIA céljából történő radioaktív jelölése gyakorlatilag csak ^{125}I izotóppal történik, amely izotóp egy elektrofil szubsztitúciós folyamatban reagál a peptidláncban található tirozin (Tyr), vagy hisztidin (His) aminosavakkal. A módszer lényege, hogy a jelölendő peptid molekulába olyan radioaktív jód ionokat visznek be, amelyet Na^{125}I -ből „in statu nascendi” oxidációval állítanak elő (13. ábra).



13. ábra: tirozin aminosav ^{125}I izotóppal történő jelölése

A rendelkezésre álló metodikák: klóramin-T módszer, enzimatisuk jelölés és jodogénus eljárás. Klóramin-T (Hunter és Greenwood, 1962, Németh és mtsai 2000, Motaleb és mtsai 2016, Sallan és mtsai 2016, Jeon és mtsai 2016, Abdel-Bary és mtsai 2013, Rasmi és mtsai 2014, 2015, Rased és mtsai 2014, El-Bayoumy és mtsai 2016, Xie és mtsai 2017) esetében a vizes oldatban képződő hipoklórossav (HOCl), enzimatisuk eljárásnál (Marchalonis 1969) a hidrogén-peroxidból (H_2O_2) felszabaduló oxigén a reakció oxidáló ágense. A jodogénus jelölés (Fraker és Speck, 1978, Salacinski és mtsai 1981, Németh és mtsai, 2000, 2002; Fürjes és mtsai 2012, Sallan és mtsai 2016, Enginar és mtsai 2012, Lelesz és mtsai 2014, 2016, Uzaras és mtsai 2016, Diao és mtsai 2014) heterogén fázisú oxidációs reakcióként játszódik le.

V.5.1.1. GLP-1 (19-37) radioaktív jelölése

A GLP-1 peptid származék ^{125}I izotóppal történő jelölését jodogénus eljárással végeztük. Tapasztalataink szerint ezen eljárás kíméletes kémiai reakcióként játszódik le, ezáltal a folyamat alatt fellépő oxidációs károsodások minimálisra csökkenthetők. A jelölési reakció egymást követő lépései: 40 μg diklór-metánban (100 μl) oldott jodogént nitrogén gáz befűvésével szárazra pároltuk, majd ezt követően sorrendben: 100 μl jelölő puffert (0,25 mol/l, pH: 7.4 foszfát puffer), 15 nmol/30 μl jelölendő peptidet és 9,25 MBq hordozómentes Na^{125}I -ot (5 μl) mértünk a polipropilén reakciócsőbe. A reakció 5 perc alatt játszódott le szobahőmérsékleten, majd ezután 400 μl 0,1 %-os TFA (tri-fluor-ecetsav) hozzáadásával a reakciót leállítottuk és a reakcióelegyet tisztítás céljából azonnal reverz fázisú HPLC oszlopra injektáltuk (Lelesz és mtsai 2014).

V.5.1.2. Patkány MCH radioaktív jelölése

Az MCH ^{125}I izotóppal történő jelölésére szintén jodogénus eljárást alkalmaztunk. A jelölési reakció első lépéseként 15 μg jodogént 100 μl diklór-metánban oldottunk, majd nitrogén áram alatt szárazra pároltuk. Ezt követően a reakciócsőbe bemértünk 100 μl jelölő puffert, 15 nmol/40 μl patkány MCH-t és 9,25 MBq/5 μl hordozómentes Na^{125}I -ot. A reakció 4 perc alatt játszódott le szobahőmérsékleten, majd a jodogén mediálta oxidációs reakciót 400 μl 0,1 %-os TFA hozzáadásával állítottuk le. A reakcióelegy tisztítása ezt követően reverz fázisú HPLC alkalmazásával történt (Lelesz és mtsai 2016).

V.5.2. ^{125}I izotóppal jelölt peptidok tisztítása (hagyományos módszerek)

A ^{125}I izotóppal történő jelölési reakciót követő tisztításnak az a célja, hogy a mono-jódozott peptidokat, amely a RIA tracer, elkülönítsük a jódozási reakció során keletkezett más kísérő termékektől, mint például: a jelölési reakció során fel nem használódott radioaktív jodid-ion, di-jódozott peptid, az esetlegesen keletkezett radioaktív és nem radioaktív peptid töredékek, illetve a meg nem jódozott peptid. Az irodalomban még ma is számos, úgynevezett hagyományos kromatográfiás módszert lehet találni a radioaktív peptid

származékok tisztítására. Továbbra is nagyon gyakran alkalmazott módszer a gélkromatográfia, vagy más néven géliszűrés (Sallam és mtsai 2016, Rasmi és mtsai 2014, 2015, Diao és mtsai 2014, McGuigan 1968, El-Bayoumy és mtsai 2016), a papír kromatográfia (Motaleb és mtsai 2016), a vékonyréteg kromatográfia (Uzaras és mtsai 2016, Enginar és mtsai 2012) és az egymással nem elegyedő vizes/szerves közegben történő tisztítás (Xie és mtsai 2017). Használják az elektorforetikus módszereket: papír elektroforézis (Motaleb és mtsai 2016, Abdel-Bary és mtsai 2013) és gélelektorforézis (Yellow és Berson 1970), valamint az ioncserés kromatográfiát (Németh és mtsai 2000, Stadil és Rehfeld 1972). A felsorolt, kevésbé modern elválasztási módszerekkel is nagy tisztaságú tracert lehet elkülöníteni, de a leghatékonyabb tisztítási eljárás napjainkban a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmazása.

V.5.3. ¹²⁵I izotóppal jelölt peptidek HPLC-vel történő tisztítása és azonosítása

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) 1970-es évek legvégétől használják a fehérjék és peptidek tisztítására és elválasztására. A módszer a nagy érzékenység, kapacitás és kiváló eredményesség mellett nagyon rövid elúciós idővel rendelkezik. A leggyakrabban alkalmazott fordított fázisú elválasztásnál a mobilis fázis poláros, míg az álló fázis apoláros karakterű és a kromatografálandó anyag polaritása határozza meg annak megoszlását a két fázis között, amely az elválasztás alapja. A legáltalánosabban használatos oszloptöltetet a 18 szénatomú szénhidrogén láncsal telített 5 vagy 10 µm átmérőjű szilikagél mikro-szemcsék sokasága alkotja. Kromatografálás során az apoláros állófázishoz kötődött anyagok a mozgófázis poláros jellegének csökkentésével (szerves oldószer hozzáadásával) eluálhatók az oszlopról. A leggyakrabban használatos szerves oldószerek: acetonitril, metanol és propanol. Az elválasztandó molekulák hidrofób jellege dönti el, hogy melyik eluálószeret célszerű alkalmazni. A mozgó fázis poláros alkotója általában a 0,1 %-os TFA, vagy valamely híg pufferoldat. Az elválasztás történhet izokratikusan (az eluálószer összetétele állandó), vagy gradiens elúcióval (az eluáló folyadék szerves oldószer tartalma változó). A gradiens elúció az összetettebb anyagkeverékek gyors elválasztására alkalmas (Alvarez és mtsai, 1981).

Számos tudományos közlemény található, amely munkákban a ¹²⁵I-jelölt peptidek tisztítása HPLC-vel történt (Motaleb és mtsai 2016, Jeon és mtsai 2016, Rased és mtsai 2014, Fürjes és mtsai 2012, Lelesz és mtsai 2014, 2016, Pauwels és mtsai 1986, Jakab és mtsai 2004, Németh

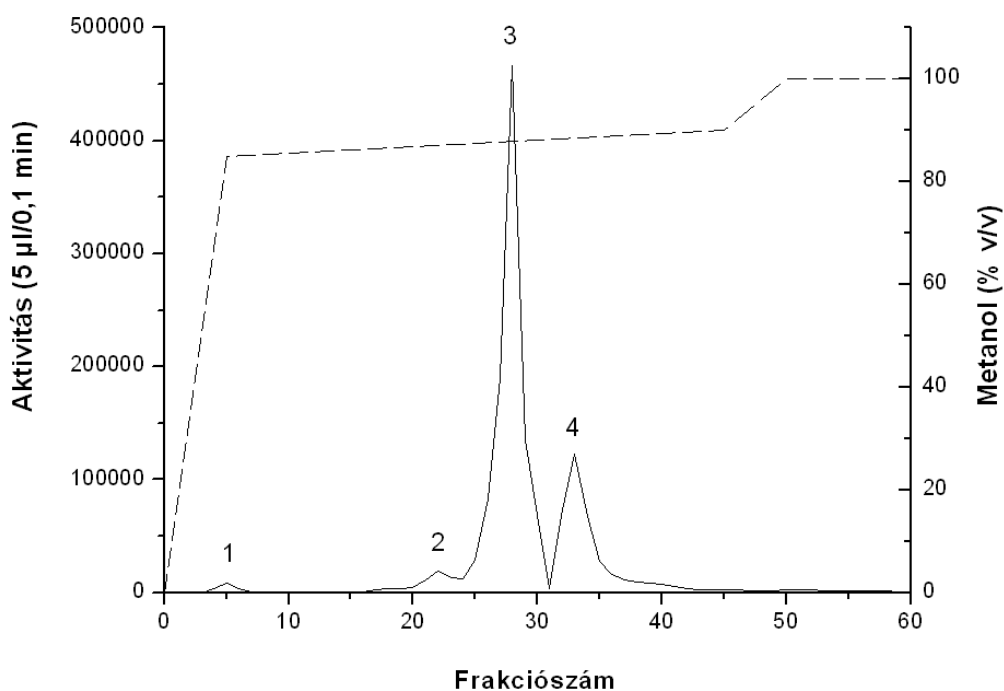
és mtsai 2007), hogy a lehető legtisztább formában álljon rendelkezésre RIA, illetve receptor kötődési vizsgálatokhoz a mono-jódozott tracer.

A HPLC tisztítás során elkülönített termékek azonosítása részben a kromatogrammon történő megjelenés alapján (a radioaktív szabad jodid-ion az első csúcsban eluálódik az oszlopról), az ellenanyaghoz történő kötődésen, illetve a termékek specifikus aktivitásának meghatározásával történik (mono- és di-jódozott peptidek). A specifikus aktivitások meghatározásához használt metodika a Morris által 1976-ban kidolgozott önkiszorításos eljárás.

Az izotóp laboratóriumunkban Merck-Hitachi HPLC rendszert használunk a radioaktív peptidek tisztítására, amely L-7100 típusú pumpát, Rheodyne injektort (típus: 7161), LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m, 4x250 mm) reverz fázisú kromatografáló oszlopot és Merck frakciószedőt (típus: L-7650) tartalmaz. Az alkalmazott reverz fázisú HPLC során a poláros közeget a 0,1 %-os TFA, míg az apoláris közeget HPLC-tisztaságú metanol adta.

V.5.3.1. ¹²⁵I izotóppal jelzett GLP-1 (19-37) tisztítása HPLC-vel

Kromatografálás megkezdése előtt az oszlopot 0,5 ml/min átfolyási sebesség mellett 0,1 %-os TFA-val ekvilibráltunk 30 percig, majd a reakcióelegy oszlopra történő injektálását követően a tisztításhoz metanol gradiens elúciót alkalmaztunk. 40 perc alatt 85 %-ról 90 %-ra változó metanol koncentráció különítette el hatékonyan egymástól a di- és mono-jódozott termékeket. Az elválasztás során 60 frakciót gyűjtöttünk (frakció térfogat: 0,5 ml), majd gammasugárzás mérővel (NZ 310, Gamma, Budapest, Magyarország) mértük az egyes frakciók 5 μ l-nyi részeinek radioaktivitását. A minták aktivitását a frakciószám függvényében ábrázolva a 14. ábrán látható radio-kromatogrammot kaptuk.



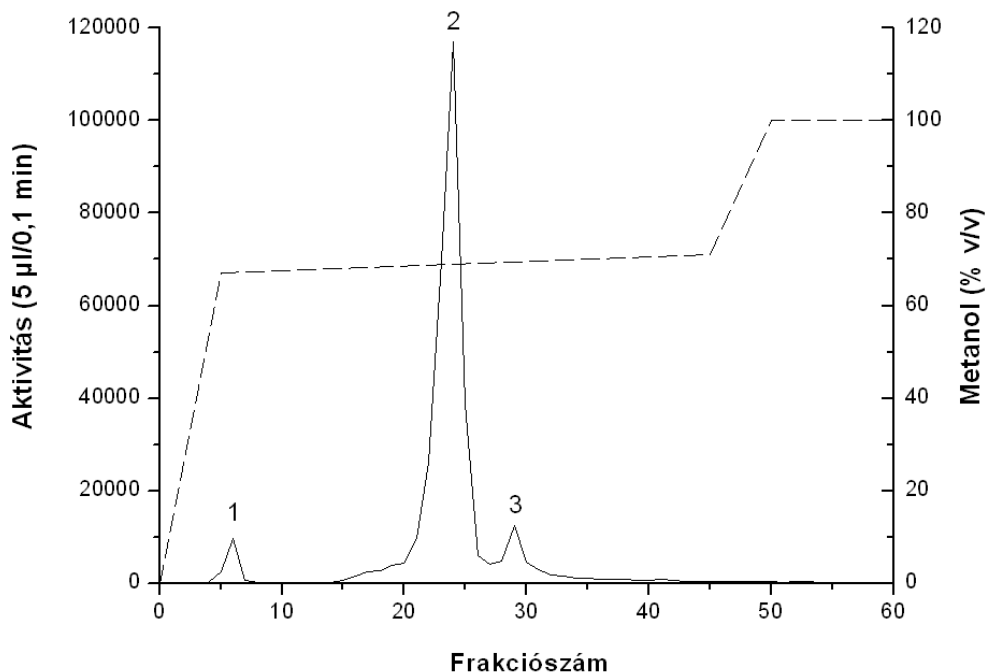
14. ábra: ^{125}I izotóppal jelzett GLP-1 (19-37) tisztítása fordított fázisú HPLC-vel

A jelölési reakció során a jód beépülés hatásfoka meghaladta a 90 %-ot, mivel a szabad radioaktív jodid-ion, amely az első csúcsban eluálódott az oszlopról (Rt: 5 min) elhanyagolható mennyiségben volt jelen. A második csúcs (Rt: 22 min) a GLP-1 RIA ellenanyagunkhoz nem kötődő, általunk nem azonosított radioaktív peptid töredéket tartalmazott, melynek mennyisége szintén elhanyagolható. A harmadik csúcsban (Rt: 28 min) eluálódott a mono-jódozott termék (RIA tracer), melynek aránya mintegy négyszerese a di-jódozott terméknek, amely a negyedik csúcsban (Rt: 33 min) eluálódott az oszlopról. A mono-jódozott GLP-1 (19-37) specifikus aktivitását 73,8 TBq/mmol-nak, a di-jódozott GLP-1 (19-37) specifikus aktivitását 152,6 TBq/mmol-nak határoztuk meg (Lelesz és mtsai 2014).

V.5.3.2. ^{125}I izotóppal jelzett patkány MCH tisztítása HPLC-vel

A jodogén jelölési reakciót követően a keletkezett termékek elkülönítését Merck-Hitachi HPLC kromatográfiás rendszerünkkel végeztük. A reverz fázisú kromatográfiás oszlop ekvilibrálását követően a jelölési reakcióelegyet az oszlopra injektáltuk. A mono- és di-jódozott komponenseket a 40 perc alatt 67 %-ról 71 %-ra változó metanol koncentráció különítette el hatékonyan egymástól. Az átfolyási sebesség 0,5 ml/min volt. Az elválasztás során 60 frakciót gyűjtöttünk, majd mértük az egyes frakciók 5 µl-nyi részeinek

radioaktivitását. A minták aktivitását a frakciószám függvényében ábrázolva a 15. ábrán látható radio-kromatogrammot kaptuk.



15. ábra: ^{125}I izotóppal jelzett patkány MCH tisztítása fordított fázisú HPLC-vel

A jelölési reakció optimális körülményeinek a megválasztásával a radioaktív jód beépülés hatásfoka több mint 90 %-os. Az első csúcsban (Rt: 6 min) eluálódott szabad radioaktív jodid-ion, melynek mennyisége 4 % volt. A második csúcsban (Rt: 24 min) eluálódott a mono-jódozott patkány MCH (RIA tracer), melynek aránya mintegy kilencszerese a di-jódozott terméknek, amely a harmadik csúcsban (Rt: 29 min) eluálódott a kromatográfiás oszlopról. A mono-jódozott MCH specifikus aktivitását 73,2 TBq/mmol-nak, a di-jódozott MCH specifikus aktivitását 148,4 TBq/mmol-nak határoztuk meg (Lelesz és mtsai 2016).

V.6. RIA módszerek gyakorlati megvalósítása

A GLP-1 és MCH radioimmunoassay módszereink kifejlesztéséhez az alábbi részfeladatokat kellett megoldanunk:

- a RIA puffer összetételének meghatározása
- a standard kiválasztása
- a mérési sorozat elkészítése
- az inkubációs idő és hőmérséklet megválasztása
- szeparációs technika kidolgozása
- radioaktivitás mérés
- az assay kiértékelése
- az assay ellenőrzése

V.6.1. RIA puffer

Az assay puffer biztosítja a megfelelő környezetet a reakciócsőben zajló állandó asszociációs és disszociációs folyamatok lejátszódásához. Általános követelmény, hogy a bemért anyagoknak (antigén, radioaktív antigén, antitest) és a képződött radioaktív és nem-radioaktív immunkomplexeknek stabilnak kell maradniuk az inkubáció során. A mérendő peptid karakterétől függően vagy enyhén lúgosak, vagy enyhén savasak, továbbá védelmet nyújtanak a befertőződés és az enzimatis lebonató hatások ellen. Mindig tartalmaznak a nem-specifikus kötődést (NSB) csökkentő anyagokat (BSA, zselatin).

GLP-1 és MCH RIA módszereinknél egyaránt a 0,05 mol/l koncentrációjú (pH: 7.4) foszfát-puffer bizonyult a legalkalmasabb assay puffernek, amely oldat 0,1 mol/l NaCl-t, 0,25 % BSA-t és 0,05 % NaN_3 -t tartalmazott (Lelesz és mtsai 2014, 2016).

V.6.2. RIA standardok

V.6.2.1. GLP-1 RIA standard

GLP-1 RIA standardként szolgáló „hideg” peptid azonos a radioaktív jelöléshez is használt GLP-1 (19-37)-el, melynek hígítása az assay pufferben történt. A mérés során alkalmazott koncentráció tartomány: 0-2 pmol/ml, amely tartományban felező hígítással követték egymást az ismert standard koncentrációk (Lelesz és mtsai 2014).

V.6.2.2. MCH RIA standard

MCH RIA standardként a Tóth G. professzor által szintetizált patkány MCH-t használtuk 0-2 pmol/ml-es koncentráció tartományban. Az ismert koncentrációjú standard oldatok elékszítése assay pufferben, felező hígítással történt (Lelesz és mtsai 2016).

V.6.3. RIA mérési sorozat készítése

V.6.3.1. GLP-1 RIA összeállítása

A GLP-1 RIA megvalósításához a boroszilikát alapú üveg kémcső bizonyult a legalkalmasabbnak (12 x 75 mm, 5 ml). A komponensek összemérésénél elsőként mindig a RIA-puffert mértük be a megszámozott csövekbe, miközben figyelembe vettük a többi bemérendő anyag mennyiségét is úgy, hogy a végtérfogat végül minden csőben 1 ml legyen. Másodikként a 100 µl titer-hígítású antiszérumot (GLP-1 3/7, munkahígítás: 1:7000), harmadikként az ismert koncentrációjú RIA standardot (100 µl), illetve a mérendő mintákat pipettáztuk a megfelelő sorszámú csövekbe. Végezetül minden csőhöz RIA tracer (mono-¹²⁵I-GLP-1 (19-37)) adtunk 3000 cpm/100 µl mennyiségben (Lelesz és mtsai 2014).

V.6.3.2. MCH RIA összeállítása

Az MCH RIA összemérése polipropilén teszt csőben történt (12 x 75 mm, 5 ml). Az assay puffer bemérését követően 100 µl titer-hígítású antiszérumot (MCH 1/5, munkahígítás:

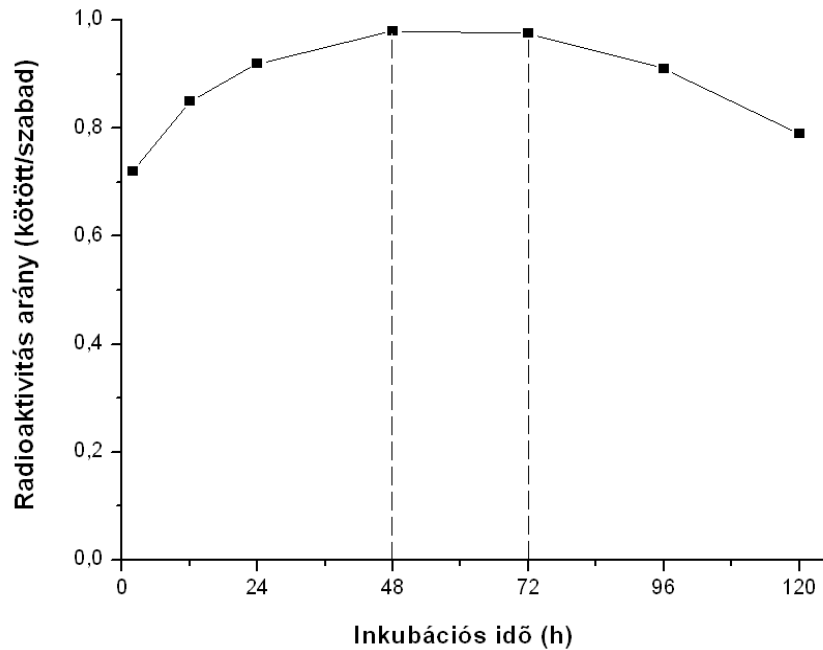
1:3500), 100 µl ismert koncentrációjú RIA standardot, illetve a mérendő mintákat pipettázzuk a megfelelő sorszámú csövekbe. Utolsóként mérjük be a RIA tracert (mono-¹²⁵I-MCH) 3000 cpm/100 µl mennyiségben (Lelesz és mtsai 2016)

V.6.4. Inkubációs idő és hőmérséklet

A mérési sorozat elkészítését követően az assay-t adott hőmérsékleten, meghatározott ideig inkubálva beáll az egyensúlyi állapot. Ez azt jelenti, hogy az állandó asszociáció és disszociáció eredményeként a jelölt és jelöletlen antigén molekulák olyan arányban kötődnek az antitestekhez, amilyen arányban az adott kémcsőben jelen vannak. Mivel az inkubáció a legidőigényesebb lépés a RIA metodika kivitelezésénél, ezért ismerete a meghatározás időszükségeltére is felvilágosítással szolgál. Miként más peptidhormonok, úgy a GLP-1 és MCH is alacsony hőmérsékleten bizonyultak a legstabilabbnak, ezért az inkubáció idejének meghatározása 4 °C-on történt.

V.6.4.1. GLP-1 RIA inkubációs időtartalma

Az inkubáció optimális idejének meghatározásánál a boroszilikát RIA csövekbe az assay pufferen kívül bemértünk 100 µl titer hígítású antiszérumot (GLP-1 3/7, munkahígítás: 1:7000), valamint RIA tracert (mono-¹²⁵I-GLP-1 (19-37)) 3000 cpm/100 µl mennyiségben. Az 1 ml tértfogató mintákat az összekeverést követően 4 °C-on inkubáltuk 2-120 óra között és adott időpontokban (2, 12, 24, 48, 72, 96, 120 óra) vizsgáltuk a RIA tracer antitesthez való kötődését. A csontszentes elválasztást követően meghatároztuk a kötött/szabad radioaktivitási arányt, amelyet az indukációs idő függvényében ábrázoltuk (16. ábra).

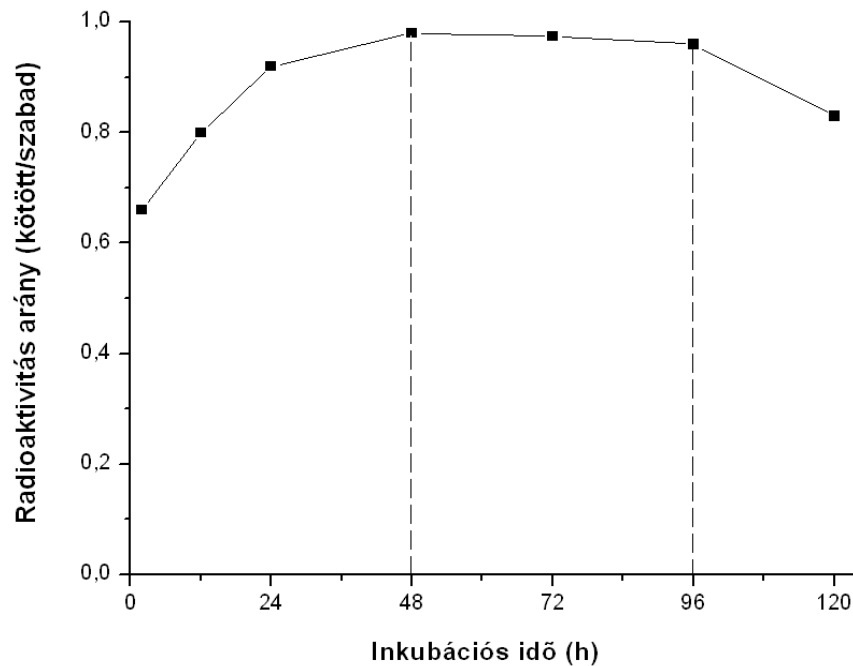


16. ábra: GLP-1 RIA optimális inkubálási időtartama

A görbe lefutásából megállapítható, hogy a RIA összemérését követően 48 óra múlva lesz maximális a kötődés és ez a plató fázis 72 óráig fennáll. Ebben az időintervallumban kell a RIA szeparálását elvégezni, kötött és szabad frakciókat elkülöníteni egymástól.

V.6.4.2. MCH RIA inkubációs időtartalma

Az MCH RIA optimális inkubációs idejének meghatározásánál a reakciócsövekbe bemértünk 100 µl titer hígítású antiszérumot (MCH 1/5, munkahígítás: 1:3500), 3000 cpm/100 µl RIA tracert (mono-¹²⁵I-MCH), valamint assay puffert olyan mennyiségben, hogy a végtérfogat minden csőben 1 ml legyen. A mintákat meghatározott ideig (2, 12, 24, 48, 72, 96, 120 óra) 4 °C-on inkubáltuk, majd a csontszén szeparálást követően meghatároztuk az egyes inkubációs időpontokhoz tartozó kötési %-okat, amely adatokat az inkubációs idő függvényében ábrázolva a 17-es ábrán látható görbét kaptuk.



17. ábra: MCH RIA optimális inkubálási időtartama

Az MCH RIA összemérését követően 48 óra múlva lesz maximális a kötődés és a plató fázis 96 óráig áll fenn. A RIA szeparálását a kötődési képesség csökkenésének elkerülése érdekében ebben az időintervallumban kell elvégezni.

GLP-1 és MCH RIA módszereink kivitelezésének egységesítése érdekében, mindkét esetben a 4 °C-on 48 óra időtartamú inkubálást alkalmazzuk.

V.6.5. Szeparációs technika

Az antigén és antitest közötti komplex képződéssel járó immunkémiai reakció lejátszódása után az antitestekhez kötődött és szabadon maradt antigén frakciókat egymástól el kell különíteni (szeparálás) annak érdekében, hogy a beállt egyensúlyi állapot az egyes elkülönített frakciók radiaktivitásának a megméréseivel megítélhető legyen. A szeparációhoz több metodika áll rendelkezésre: *abszorpciós technika* alkalmazásakor felületaktív anyagot (csontszen, szilikát) adunk a rendszerhez, mely a szabadon maradt antigént köti meg, majd azt centrifugálással tudjuk elkülöníteni a kötött frakciótól (szabadon maradt frakció az üledékben, kötött frakció a felülúszóban jelenik meg). A *precipitációs eljárás* során szerves oldószeres

vagy polietilén-glikolos kicsapás történik, majd az azt követő centrifugálás után a kötött frakció távolítható el a rendszerből, mely üledék formájában jelenik meg. *Kettős antitest módszer* esetében a primer antitest ellen termeltetett ellenanyagot egy újabb inkubációs lépésben reagáltatják az elsődleges antitesttel. Ezt követően az összekapcsolódott két immunglobulint precipitáltatjuk és kicentrifugáljuk a rendszerből.

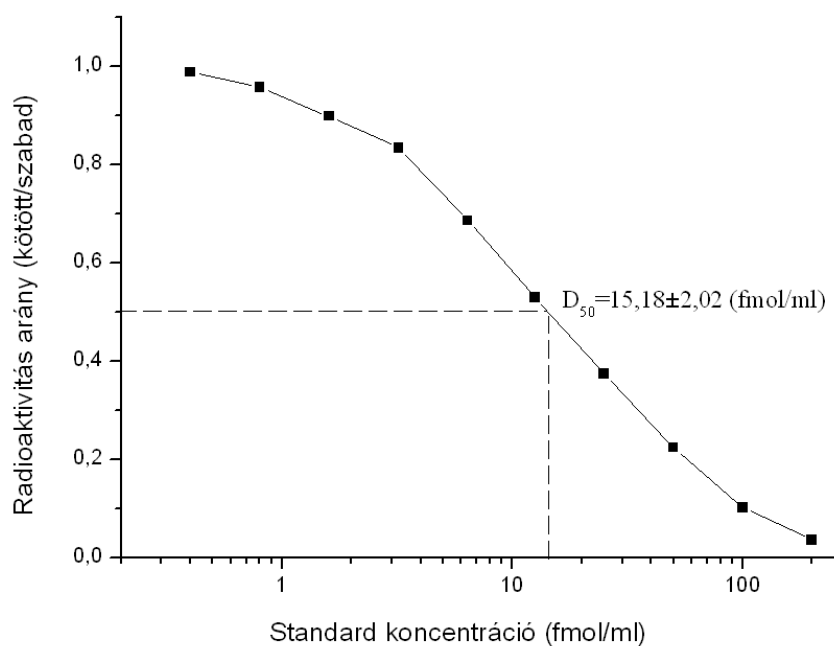
Laboratóriumunkban mindkét RIA módszer esetében a csontszemes abszorpciós technikát használjuk. A szeparáláshoz felhasznált desztillált vizes szuszpenzió összetétele: 10 g mosott, majd kihevített csontszén, 1 g dextrans, 0,2 g zsírmentes tejpor 100 ml desztillált vízben elszuszpendálva. A 4 °C-ra hűtött és folyamatosan kevert szeparáló szuszpenzióból 100 µl-nyi mennyiségeket mértünk az elválasztandó mintához. A 10 perces, 4000 rpm fordulatszámon, hűthető centrifugában (Eppendorf 5810 R) 4 °C-on végzett üleptetés után a felülúszókat üres RIA csőbe öntöttük át és mind az üledékek, mind a felülúszók radioaktivitását megmértük, amelyhez NZ 310 automatikus mintaváltót használtunk. A mérés időtartama 2 perc volt és a méréseket 3-szor ismételve végeztük.

V.6.6. Az assay-k kiértékelése

A radioaktivitási értékek ismeretében, a grafikus módszerrel felvett dózis-válasz görbe segítségével határoztuk meg a minták ismeretlen antigén koncentrációját.

V.6.6.1. GLP-1 RIA kalibrációs görbéje

A kalibrációs görbe felvételénél a GLP-1 (19-37) standard ismert koncentrációjú pontjaihoz tartozó kötött/szabad (B/F) radioaktivitási arányt a standard koncentráció logaritmusának függvényében ábrázoltuk. A B/F értékek meghatározásához az NSB-t is figyelembe vettük. GLP-1 RIA módszerünk szigmoid lefutású kalibrációs görbéje az 18. ábrán látható.

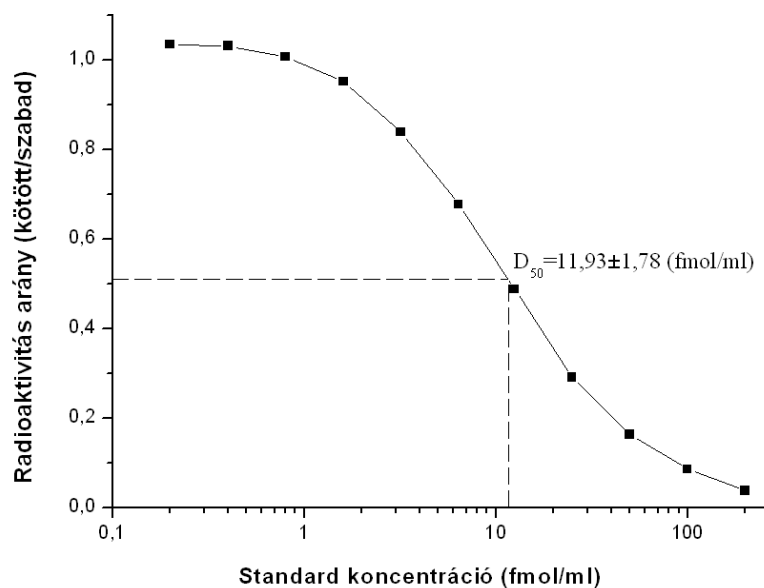


18. ábra: GLP-1 RIA kalibrációs görbéje

Tíz egymást követő assay-nél a kalibrációs görbék D_{50} értékeinek átlaga $15,18 \pm 2,02$ fmol/ml volt. A RIA érzékenységének jellemzésére a kalibrációs görbe legkisebb koncentrációjú standard pontját szokták megadni és ez egyben a módszer kimutatási határát is jelenti. RIA módszerünk estében a GLP-1 (19-37) peptidre vonatkozó kimutatási határkoncentráció 0,4 fmol/ml-nek adódott (Lelesz és mtsai 2014).

V.6.6.2. MCH RIA kalibárciós görbéje

A kalibrációs görbe felvételénél a patkány MCH standard ismert koncentrációjú pontjaihoz tartozó kötött/szabad (B/F) radioaktivitási arány értékeket a standard koncentráció logaritmusának függvényében ábrázoltuk. MCH RIA módszerünk szigmoid lefutású kalibrációs görbéje az 19. ábrán látható.



19. ábra: MCH RIA kalibrációs görbéje

Tíz egymást követő assay alapján a kalibrációs görbék D_{50} értékeinek átlaga $11,93 \pm 1,78$ fmol/ml volt. Az MCH RIA módszerünk kimutatási határa patkány MCH-ra vonatkoztatva 0,2 fmol/ml volt (Lelesz és mtsai 2016) .

V.6.7. Az assay-k minőségének ellenőrzése

GLP-1 és MCH RIA módszereink pontosságának (reprodukálhatóságának) megítéléséhez meghatároztuk az eljárásokhoz tarozó intra- és interassay variációs koefficienseket. A koefficiensek kiszámítása az alábbi képlet alapján történt:

$$V_k = S / X \times 100 (\%)$$

A képletben szereplő „X” ugyanazon minta egy sorozaton belüli többszöri mérési eredményének vagy az egymást követő meghatározások során kapott mérési eredményeknek az átlaga, a képletben szereplő „S” pedig a szórása, azaz a standard deviáció (László és Janáki, 1986). A variációs koefficiensek meghatározása 10 mérés alapján történt, amelyhez alacsony, közepes és magas antigén koncentrációjú úgynevezett belső standardokat használtunk.

V.6.7.1. GLP-1 RIA minőségének ellenőrzése

A GLP-1 RIA módszerünk variációs koefficienseinek meghatározására vonatkozó kísérleti eredményeinket a IV. táblázatban foglaltuk össze.

Minta (koncentráció)	Intra-assay		Inter-assay	
	átlag (fmol/ml)	koefficiens (%)	átlag (fmol/ml)	koefficiens (%)
alacsony	4,78	8,03	5,09	10,63
közepes	12,41	5,84	13,42	9,13
magas	21,42	6,53	19,68	8,23

IV. táblázat: GLP-1 RIA módszerünk variációs koefficiens értékei

V.6.7.2. MCH RIA minőségének ellenőrzése

Az MCH RIA módszerünk mérési eredményeinek reprodukálhatósági mutatóit a V. táblázat tartalmazza.

Minta (koncentráció)	Intra-assay		Inter-assay	
	átlag (fmol/ml)	koefficiens (%)	átlag (fmol/ml)	koefficiens (%)
alacsony	3,26	9,11	3,65	11,92
közepes	10,02	6,84	9,58	9,32
magas	18,63	5,78	19,19	7,86

V. táblázat: MCH RIA módszerünk variációs koefficiens értékei

Mindkét RIA módszerünk a közepes és a magas koncentráció tartományban megbízhatóbb mérési eredményekkel rendelkezik, mint az az alacsony antigén koncentrációjú minták esetében tapasztalható.

VI. RIA MÓDSZEREK GYAKORLATI ALKALMAZÁSA

VI.1. GLP-1 RIA gyakorlati alkalmazása

A kifejlesztett GLP-1 RIA módszerünket atípusos, antipszichotikum okozta elhízás és inzulin rezisztencia patkány modellben alkalmaztuk elsőként. A kísérletben Sprague-Dawley patkányokat kezeltünk olanzapinnal, majd a vizsgálat végén megmértük az éhgyomri és a glükóz tolerancia teszt alatti plazma GLP-1 szinteket és meghatároztuk a glükóztoleranciát (Lelesz és mtsa 2014).

VI.1.1. Állatkísérlet

A kísérletben hat Sprague-Dawley patkányt kezeltünk az antipszichotikus hatású olanzapinnal, 5 mg/kg (testsúlyra vonatkoztatva) dózisban napi egyszeri *per os* adagolással négy héten keresztül. A kontroll csoportba bevont másik hat állat oldószeres kezelést kapott. Az egy hónapos kezelést követően orális glükóz tolerancia tesztet (OGTT) végeztünk a kísérleti állatokon (Ali és mtsai 2012). Az OGTT kivitelezése: egész éjszakán át tartó éheztetést követően a patkányok nyaki artériájába helyezett kanülön keresztül vérmintákat vettünk a kiindulási vércukor szintek és a kiindulási a GLP-1-koncentrációk meghatározására. Ezt követően 2 g/testsúly kg dózisban glükóz-oldatot kaptak az állatok gyomorszondán keresztül, majd további négy vérminta került levételre a beadást követően a 10., 30., 60. és 90. percben. A vérminták glükóz-szintjét Accu-Chek mérőeszközzel határoztuk meg. A plazma-GLP-1 koncentrációk meghatározására a vérmintákat boroszilikát kémcsövekbe gyűjtöttük, amelyek dipeptidil-peptidáz-IV (DPP-IV) inhibitor tartalmúak (1 ml vérhez 10 µl enzim inhibitor adtunk). Ezt követően a vérmintákat 5 percen át centrifugáltuk, 4 °C-on, 10000 rpm fordulatszámon. Az elkülönített plazma mintákat RIA meghatározásig -70 °C-on tároltuk.

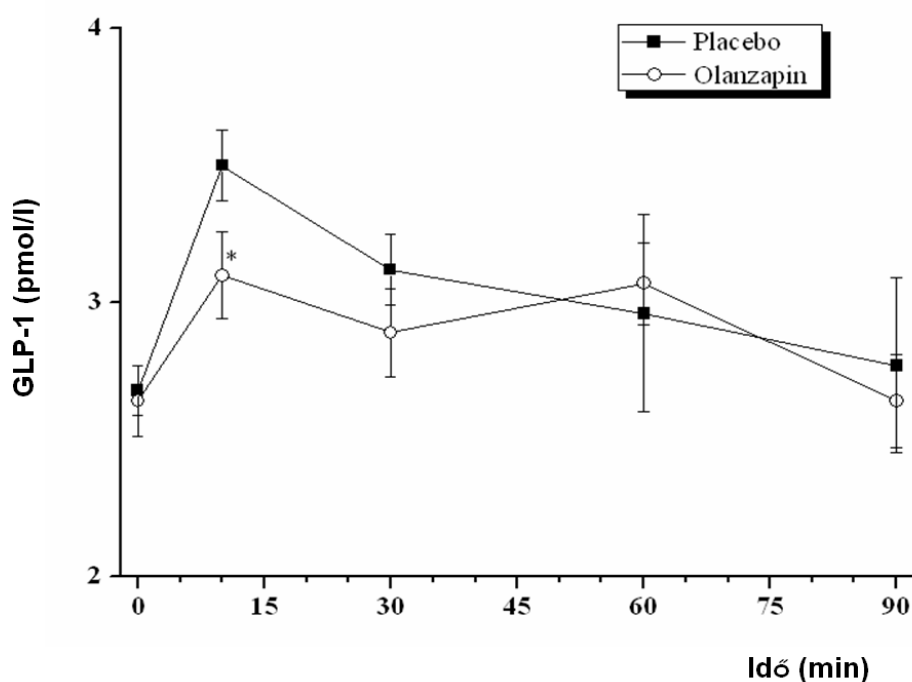
VI.1.2. Plazma előkészítés

A GLP-1 koncentráció meghatározás céljából a plazma mintákat alkohollal extraháltuk. Boroszilikát üvegcsőben 300 µl plazmát 1,1 ml abszolút etanolhoz csepegtettünk, majd vortex keverővel elegyítettük. Ezt követően a mintákat jégfürdőbe helyeztük 30 percre, majd egy újabb vortex keverés után a kicsapódott plazma fehérjét 10 percen át 4 °C-on, 10000 rpm

fordulatszámokon centrifugálva ülepítettük ki. A felülúszókat leszívtuk boroszilikát üveg RIA csövekbe, majd az extraktum mintákat nitrogénáram alatt beszárítottuk. RIA meghatározásig az extrahált és beszárított mintákat -70 °C-on tároltuk.

VI.1.3. Plazma GLP-1 koncentráció meghatározása

A GLP-1 RIA összemérése a „IV.6.3.1. GLP-1 RIA összeállítása” című alfejezet alapján történt. Vagyis a megfelelő sorszámú csövekbe elsőként a RIA puffert mértük be, ezt követte a titer hígítású antiszérum, a standard, végül a jelölt anyag bemérése. A korábban leírttól eltérés annyiban volt, hogy jelen esetben a mérendő minták nem folyadék állapotban voltak jelen, hanem beszárítva a RIA csövekben. Ezeket a beszárított plazma mintákat a mérés során 300 µl assay pufferben oldottuk vissza. Az assay összeállítását követően az inkubálás 4 °C-on 48 órán át történt, majd a csövekhez szenes szeparáló szuszpenziót adtunk. A kötött és a szabad hormonfrakciók elválasztása és radioaktivitás mérés után a minták GLP-1 koncentrációit a mérés során felvett kalibrációs görbéről olvastuk le. A kiértékelésnél figyelembe vettük, hogy a kiindulási plazma térfogatok 300 µl-ek voltak. Meghatároztuk a plazma GLP-1 koncentrációk átlagát, valamint a standard error értékeket (átlag ± SEM). A koncentráció változások statisztikai összehasonlításához one-way ANOVA módszert alkalmaztunk. Eredményeinket a 20. ábrán foglaltuk össze.

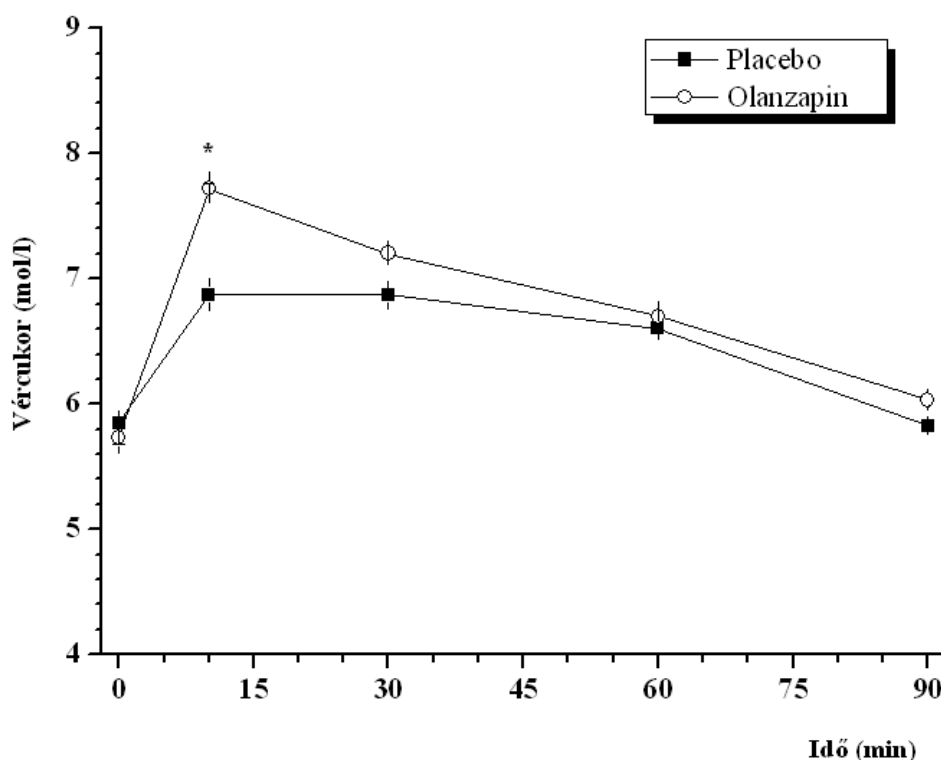


20. ábra: Krónikus olanzapin kezelés hatása a patkány plazma GLP-1 szint változására OGTT alatt (n=6, átlag $\pm$ SEM, szignifikáns eltérés: $p < 0,05$)

Az olanzapinnal kezelt állatokban az éhgyomri GLP-1 szint nem tért el szignifikánsan az oldószerrel kezelt csoporttól, azonban a glükóz terhelés hatására az antipszichotikummal kezelt állatoknál a 10. percben szignifikánsan kevesebb GLP-1 szabadult fel, mint a kontroll csoportban, majd ezt követően 60 és 90 perc között a görbék lefutása fedésbe került egymással.

VI.1.4. Vércukorszint mérési eredmények

Az oldószerrel és az antipszichotikummal kezelt állatok vérmintáinak glükóz-szintjét Accu-Chek mérőeszközzel határoztuk meg. Mérési eredményeinket a 21. ábrán foglaltuk össze.



21. ábra: Krónikus olanzapin kezelés hatása a vércukorszint változására OGTT alatt patkányban (n=6, átlag $\pm$ SEM, szignifikáns eltérés: $p < 0,05$)

Az olanzapinnal és az oldószerrel kezelt állatok éhgyomri vércukorszintje közel azonos értéket mutatott, ellenben glükóz terhelés hatására az antipszichotikummal kezelt állatoknál a 10. percben szignifikánsan magasabb vércukorszintet mértünk, mint a kontroll csoportban, majd ezt követően a görbék lefutása közel fedésbe került egymással.

A 20. és 21. ábra összevetése alapján megállapítható, hogy az egyes időpontokhoz tartozó GLP-1 és vércukorszint értékek ellentétes módon változtak. A plazma GLP-1 koncentrációk az olanzapinnal kezelt csoportban alacsonyabb értékeket mutattak a kontroll csoporthoz képest, a vércukorszint értékek ezzel szemben az antipszichotikummal kezelt csoportban voltak magasabbak.

VI.2. MCH RIA gyakorlati alkalmazása

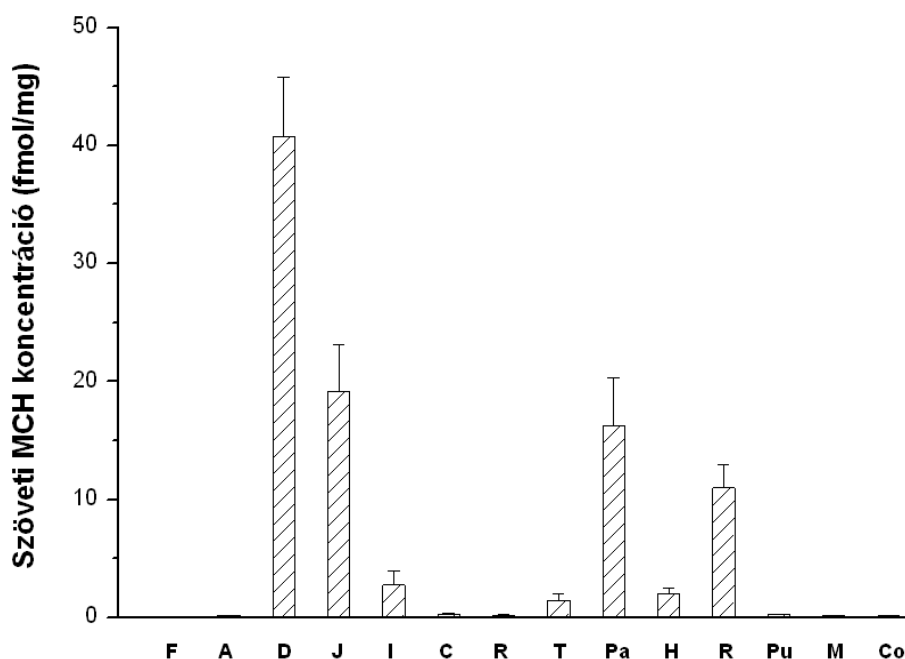
Újonnan kifejlesztett MCH RIA módszerünk alkalmazásaként, patkányok gasztorintesztinális traktusának egyes szakaszaiból, központi idegrendszeri területeikből és egyéb más perifériás szerveikből szöveti peptid koncentráció meghatározásokat végeztünk (Lelesz és mtsai 2016).

VI.2.1. Szövetextrakció RIA meghatározáshoz

Hat hím Wistar-patkányt (súly: 250-300 g) egész éjszakán át tartó éheztetést követően pentobarbitál-nátrium (Nembutal) ip. adásával (dózis: 50 mg/kg) elaltattuk, majd cervikális diszlokációt (csigolyatörés) követően elvégeztettük. A következő 14 szervből távolítottuk el MCH meghatározáshoz szövetmintákat: fundus, antrum, duodenum, jejunum, ileum, colon, rectum, trachea, hasnyálmirigy, máj, vese, tüdő, vázizom, szív. A teljes agy kivételét követően hét agyterületet különítettünk el: nagyagy, köztiagy, kisagy, nyúltvelő, hipotalamusz, agytörzs, agykéreg továbbá a gerincvelő nyaki szakasza. Az eltávolításra került mintákat jégre helyeztük, majd lehülés után a kísérő szövetektől megtisztítottuk. Súlymérést követően a mintákat olyan térfogatú jégbe hűtött desztillált vízben homogenizáltuk el - figyelembe véve a szövetminták térfogatát - hogy a keletkezett homogenizátumok koncentrációja 10 %-os (w/v) legyen. Végezetül a homogenizátumokat lecentrifugáltuk

(10000 rpm, 4 ° C, 10 perc), a felülúszókat eltávolítottuk és MCH RIA meghatározásig -80 °C-on tároltuk. Az MCH RIA kivitelezése a IV.6.3.1. alfejezetben leírtak alapján történt. A különböző szövetminták és agyterületek MCH tartalmát nedves szövetsúlyra számolva fmol/mg egységben fejeztük ki.

VI.2.2. Különböző patkány szervek MCH tartalma



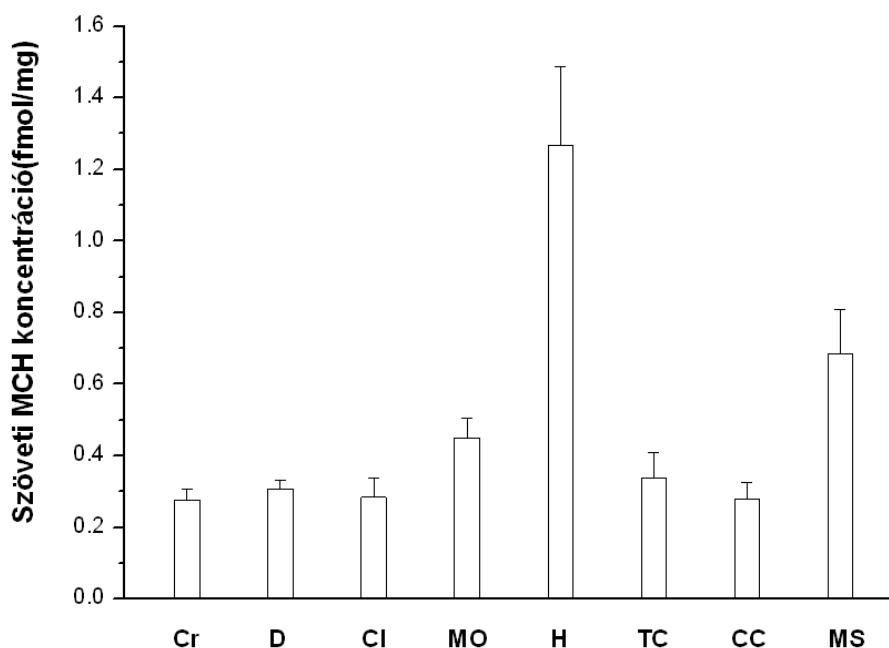
22. ábra: MCH tartalom megoszlása patkány gasztrointesztinális traktusban és egyéb más szervekben (n=6, átlag ± SEM)

Rövidítések: F = fundus, A = antrum, D = duodenum, J = jejunum, I = ileum, C = colon, R = rectum, T = trachea, Pa = hasnyálmirigy (pancreas), H = máj (hepar), R = vese (ren), Pu = tüdő (pulmo), M = vázizom (musculus), Co = szív (cor)

Valamennyi vizsgált patkány szövetmintában RIA módszerünkkel MCH immunreaktivitást tudtunk kimutatni. Legnagyobb koncentrációban a vékonybélben található MCH (koncentráció sorrendjében: duodenum > jejunum > ileum). Nagy MCH koncentráció volt megfigyelhető a hasnyálmirigyben és vesében. Sokkal alacsonyabb MCH tartalmat mértünk a

trachea és a máj esetében, míg a többi vizsgált perifériás szövetekben (fundus, antrum, colon, rectum, tüdő, izom, szív) alacsony koncentrációban mutatható ki MCH (22. ábra).

VI.2.3. Patkány agyterületek és gerincvelő MCH tartalma



23. ábra: MCH tartalom megoszlása patkány központ idegrendszer egyes területein (n=6, átlag $\pm$ SEM)

Rövidítések: Cr = nagyagy (cerebrum), D = köztiagy (diencephalon), Cl = kisagy (cerebellum), MO = nyúltvelő (medulla oblongata), H = hypothalamus, TC = agytörzs (truncus cerebri), CC = agykéreg (cortex cerebri), MS = gerincvelő (medulla spinalis)

Kifejlesztett RIA módszerünk alkalmazásaként megmértük különböző patkány agyterületek MCH tartalmát. MCH immunreaktivitás valamennyi vizsgált patkány agyterületben kimutatható volt. A legmagasabb MCH koncentrációt a hypothalamuszban találtuk, majd ezt követte a gerincvelő és a nyúltvelő. A többi vizsgált agyterület esetében (nagyagy, köztiagy, kisagy, agytörzs, agykéreg) a RIA meghatározás során szignifikánsan alacsonyabb MCH koncentrációkat találtunk (23. ábra).

VII. DISZKUSSZIÓ

Intézetünk izotóp laboratóriumában az utóbbi években két új RIA módszert fejlesztettünk ki biológiailag aktív peptidok, nevezetesen a glukagon típusú peptid-1 (GLP-1) és a melanin koncentráció hormonnal (MCH) mérésére. Mindkét peptid fontos szerepet tölt be a szervezet energiaháztartásának szabályozásában és miután intézetünk egyik fontos kutatási területe a táplálkozás, az elhízás, valamint a cukorbetegség kialakulásának tanulmányozása, a magas színvonalú laborháttér biztosítása érdekében fontosnak tartottuk az új RIA eljárások kifejlesztését, hogy használatuk napi rutinszerű alkalmazása váljon elérhetővé.

VII.1. GLP-1 RIA kifejlesztése és alkalmazása

A GLP-1 irodalmi áttekintésénél (II.1. fejezet) ismertettük, hogy a GLP-1 hormon megjelölés nem egy adott peptidre, hanem egy egész peptidcsoportra vonatkozik (Deacon és Holst 2009). A GLP-1 RIA kifejlesztése során azt a célt tartottuk szem előtt, hogy a beállítandó RIA-val lehetőleg a hormon összes molekuláris variánsát mérni tudjuk, vagyis módszerünkkel a mérendő minták teljes GLP-1 koncentrációját határozzuk meg. Ezt a célt egy megfelelő antiszérum termeltetésével tudtuk megvalósítani. A RIA módszert a célunk megfelelően tudatosan fejlesztettük ki, figyelembe véve, hogy egy RIA használhatósága a mérésnél alkalmazott antiszérum specificitásán múlik, azt pedig módunkban áll befolyásolni egy megfelelő immunogén készítésével, amelyet állatok immunizálására használunk ezt követően. Egy RIA eljárás kifejlesztésénél, az immunizáláshoz ugyanis nem szükséges a teljes peptidlánc felhasználása, hogy a hormont mérni tudjuk, elég a specificitásért felelős szegmens alkalmazása. Ezt az utat akkor szokták választani, ha a mérni kívánt célmolekula hosszú, sok aminosavból áll (Arimura és mtsai 1991). Ezért mi is csak a hormon C-terminális (19-37) aminosav szakaszát használtunk az immunizáláshoz. Mivel, a különböző aminosav számú GLP-1 peptidok C-terminális vége azonos, eltérés az N-terminális szakaszban van, ezért C-terminális érzékenységű ellenanyagot kellett termeltetnünk. Annak érdekében, hogy egy sokkal homogénebb immunogént kapjunk a már jól ismert glutár-aldehides kapcsolási módszer (Fürjes és mtsai 2012, Németh és mtsai 1992) helyett a Michael addíción alapuló kapcsolási módszert (Ranu és Banerjee 2005, Chi és Gellman 2005) választottunk, amely segítségével a Cys⁽⁰⁾-GLP-1 (19-37) peptidfragmenst BSA hordozófehérjéhez kapcsoltuk

(IV.2.1. fejezet). A BSA-hoz történő kapcsolódás a peptid N-terminális végén található Cys aminosavon keresztül történt. Következésképpen az immunogénben a GLP-1 peptid C-terminális része maradt szabad, így az antitestek (főként IgG) a GLP-1 ezen régiójával szemben termelődtek az immunizálás során, ennél fogva az antitest a hormon C-terminális szekvenciáját ismeri fel, amely valamennyi GLP-1 molekuláris variánsban megtalálható.

A különböző peptidekkel elvégzett keresztreakciós vizsgálatok azt mutatták, hogy a RIA módszernél használt „GLP-1 3/7” jelzésű antiszérum C-terminalis érzékenységgű, a peptid (Val-Lys-Gly-Arg-Gly) szekvenciáját ismeri fel. Előzetes elvárásainknak megfelelően, 100 %-ban méri a GLP-1 (1-37), GLP-1 (7-37) és GLP-1 (9-37) formákat és mintegy 20 %-ban az amidált GLP-1 peptideket, ellenben nem detektálja az azonos hormoncsaládba tartozó más peptideket, így a GLP-2-öt, a glukagont, az inzulint, a szekretint, a VIP-et és a GIP-et, vagyis megállapítható, hogy ellenanyagunk GLP-1 specifikusnak tekinthető. A keresztreakciós vizsgálatok alapján az is kijelenthető, hogy olyan RIA módszer áll rendelkezésünkre, amely az adott minta teljes GLP-1 tartalmát méri.

RIA módszer kifejlesztésénél a megfelelő antiszérum termeltetése mellett, a nagy tisztaságú és stabil tracer előállítása a másik sarkalatos pont a megbízható mérések kivitelezéséhez. A kifejlesztett GLP-1 RIA módszerünk esetében a nagy tisztaságú mono-¹²⁵I-GLP-1 (19-37) szolgál RIA tracerként. A szintetizált GLP-1 (19-37) peptid alkalmas a ¹²⁵I izotóppal történő jelölésre, ugyanis a 19-es aminosav tirozin (Tyr), amely könnyen megjelölhető az elektrofil szubsztitúciós jelölési reakció során. Az optimális RIA tracer készítésénél érvényesülnie kell annak az elvnek, hogy a peptidláncban a radioaktív jelölés helyének a lehető legtávolabb kell lennie a kötő régiótól. A ¹²⁵I beépülése a peptidláncba ugyanis eltorzítja annak eredeti szerkezetét, és ha ez a változás azon a szakaszon következik be, amely az antitestekhez való kötődésért felelős, akkor az a kötőképesség megváltozásához, esetenként teljes megszűnéséhez is vezethet. Ez a kritérium jelen esetben teljes mértékben megvalósult, hiszen a jelölés a 19-es aminosavon (N-terminális vég) történt, míg az antitestek a peptid C-terminális részét ismerik fel, azt kötik meg. A GLP-1 (19-37) peptid jódogénus eljárás alkalmazásával jelöltük meg (IV.5.1.1. alfejezet), majd reverz fázisú HPLC oszlopon tisztítottuk (IV.5.3.1. alfejezet). Optimális jelölési és tisztítási körülmények között a jódozási reakció során felhasznált teljes radioaktivitás 70-75 %-a jelenik meg mono-jódozott peptid formájában. A mono- és di-jódozott GLP-1 (19-37) formák specifikus radioaktivitási értékeit Morris önkiszorító módszerével határoztuk meg (Morris 1976). Ez a technika általánosan használt RIA laboratóriumokban a tracer specifikus radioaktivitásának pontos meghatározására gasztrointesztinális peptidek, neurotranszmitterek, fehérjék valamint szteroid

hormonk estében. A mono- és di-jódozott GLP-1 (19-37) specifikus radioaktivitási értékei (IV.5.3.1. alfejezet) közel azonosak az elméleti értékekkel (78,63 és 157,26 TBq/mmol) (Wang 1969) igazolva a fordított fázisú HPLC elválasztási technika magas hatásfokát.

Módszerünk gyakorlati alkalmazásaként patkány plazma GLP-1 szint meghatározásokat végeztünk atípusos, antipszichotikum okozta elhízás és inzulin rezisztencia patkány modellben, amelyhez Sprague-Dawley állatokat kezeltünk 28 napig *per os* egy antipszichotikus hatóanyaggal (olanzapin) 5 mg/kg/nap dózisban adagolva. Az olanzapinnal történő kezelés befejezését követően az állatokon glükóz tolerancia tesztet végeztünk és megmértük az éhgyomri és a glükóz felvétel alatti plazma vércukor és GLP-1 szinteket. Az irodalomból köztudott (Gautier és mtsai 2005), hogy a keringésben található GLP-1 peptid rendkívül gyorsan degradálódik a dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV) enzim által (a keringésben a GLP-1 felezési ideje kevesebb, mint 2 perc), ezért a vérminták gyűjtése kritikus pontja a plazma GLP-1 koncentráció meghatározás folyamatának. Boroszilikát kémcsövek és DPP-IV enzim inhibitor használata, valamint a vérminták jeges vízfürdőben való gyors hűtése betartandó követelmények, ugyanis ezzel akadályozható meg a biológiailag aktív molekula átalakulása inaktív peptiddé.

Mérési eredményeink azt mutatták, hogy az olanzapinnal kezelt állatokban az éhgyomri GLP-1 szint nem tért el szignifikánsan az oldószerrel kezelt csoporttól, azonban glükóz terhelés hatására az olanzapinnal kezelt csoportban a 15. percnél szignifikánsan kevesebb GLP-1 szabadult fel, mint a kontroll csoportban. Az egyes időpontokhoz tartozó vércukor szint értékek azonban éppen ellentétes módon változtak, vagyis az olanzapinnal kezelt csoportban szignifikánsan magasabb koncentrációk voltak mérhetők, mint a kontroll csoportban. Véleményünk szerint, a krónikus olanzapin kezeléskor fellépő glükóz intolerancia oka a csökkent GLP-1 felszabadulás, amelyet a kísérlet sorozat alkalmával GLP-1 RIA módszerünk segítségével mutattunk ki.

Összegzésként megállapítható, hogy kifejlesztett GLP-1 RIA módszerünk nagy érzékenységű és specifikus az általunk mérni kívánt GLP-1-re peptidre. Alkalmas arra, hogy szöveti és plazma koncentráció meghatározásokat végezzünk vele, amelyek segítségével további információkat nyerhetünk a GLP-1 biológiai szerepét illetően és tanulmányozhatjuk a hormonszint változások következményeit. Hasznosan tudjuk majd alkalmazni az esetlegesen szóba jöhető anti-diabetikus hatással rendelkező molekulák tesztelésénél.

VII.2. MCH RIA kifejlesztése és alkalmazása

Az MCH irodalmi áttekintésében (II.2. fejezet) ismertettük a hormon emlősökben játszott élettani hatásait, amelyek közül ki kell emelni, hogy szabályozó szerepet tölt be a szervezet energia egyensúlyának fenntartásában. Befolyással van a táplálék felvételre, az anyagcsere folyamatokra és a testsúly változására (Marsh és mtsai 2002, Ito és mtsai 2003). Munkacsoportunk, amelynek kutatási területe az MCH biológiai hatásait teljes mértékben lefedi, egy érzékeny és specifikus RIA módszert fejlesztett ki a hormon szövetekből és plazmából történő kvantitatív meghatározására. Miként korábban is tettük (Fűrjes és mtsai 2012, 2017, Lelesz és mtsai 2014, Németh és mtsai 2002) a módszer kifejlesztésének valamennyi lépését intézetünkben magunk valósítottuk meg, néhány részfeladatát kooperációs együttműködés alapján. A peptidek szintézise és hordozó fehérjéhez történő kapcsolása a Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézetében történt, prof. Dr. Tóth Gábor vezetése mellett. A RIA kifejlesztésének többi lépését: ellenanyag termelés nyulak immunizálásával, az antiszérumok karakterizálása (titer, affinitás, specificitás), a ^{125}I izotóppal jelölt RIA tracer előállítása (radioaktív jelölés, HPLC tisztítás), a RIA optimális működési körülményeinek beállítása, a módszer analitikai jellemzőinek meghatározása, majd a beállított módszer gyakorlati alkalmazása (szöveti és plazma MCH szintek mérése), intézetünk izotóp laboratóriumában magunk végeztük.

Az MCH szintézisét szilárd fázisú technikával (IV.1.2. alfejezet) valósították meg, majd a peptidet glutáraldehydes módszer alkalmazásával BSA hordozó fehérjéhez kapcsolták (IV.2.2. alfejezet). Ez a kapcsolási módszer a peptidet a szabad amino-terminális végén kapcsolja a BSA-hoz (Fűrjes és mtsai 2012, 2017, Németh és mtsai 1992, 2002), ezáltal a peptid C-terminális vége marad szabad és az ellenanyag (főként IgG) a peptid ezen molekula része ellen termelődik az immunizálás során. Előzetes elvárásainknak megfelelően, a keresztreakciós vizsgálatok (IV.4.2.2. alfejezet) eredményei azt mutatták, hogy valóban C-terminális érzékenységgű ellenanyag termelődött, mivel a peptid gyűrűs szerkezete csak kis mértékben kötődik az ellenanyaghoz, továbbá aminosav csere a gyűrűn belül és az N-terminális szakaszon nem befolyásolta a módosított peptid ellenanyaghoz való kötődését. Az MCH a C-terminális (Trp-Gln-Val) szekvenciáján keresztül kapcsolódik az ellenanyaghoz. A további keresztreakciós vizsgálatok azt mutatták, hogy az „MCH 1/5” jelzésű ellenanyag nem kötődik más rokon szerkezetű anyagokhoz, vagyis MCH specifikusnak tekinthető.

A szintetizált patkány MCH felhasználható ^{125}I izotóppal történő jelölésre, RIA tracer előállítására is, ugyanis a peptid a 13-as pozícióban tartalmaz egy Tyr aminosavat, amely könnyen megjelölhető ^{125}I izotóppal az elektrofil szubsztitúciós jelölési reakció során. A radioaktív jelölés végrehajtásakor gondosan kell eljárni, ugyanis a peptid a 4-es és a 8-as pozíciókban metionint (Met) tartalmaz. Ezen aminosavak oxidációs károsodást szenvedhetnek a reakció során és metionin-szulfoxiddá alakulhatnak át. Ez a kémiai változás hatással lehet a jelzett peptid antitesthez való kötődésére, amelyet lehetőleg el kell kerülnünk. Figyelemmel kell lenni továbbá arra a tényre is, hogy a 7-es és a 16-os pozíciókban található Cys aminosavak között di-szulfid híd található, ezáltal az MCH molekula gyűrűs szerkezettel rendelkezik. Erős oxidációs hatás esetében a di-szulfid híd felszakadhat, a gyűrűs szerkezet megszűnhet. Ez a végbemehető struktúrális változás szintén a kötődési képesség megváltozását eredményezi. A felsorolt okok miatt a jelölés során az általunk legkevésbé károsítónak tartott jodogénus módszert választottuk (IV.5.1.2. alfejezet), amellyel korábban már megbízható tapasztalatokat szereztünk (Fűrjes és mtsai 2012, 2017, Lelesz és mtsai 2014, Jakab és mtsai 2004, Németh és mtsai 1992, 1998, 2002a, 2002b, 2002c, 2007). Az oxidációs folyamat heterogén fázisú reakcióként játszódik le, mivel a jodogén szilárd fázisként a reakció cső falát borítja. A reakcióidő perces nagyságrendű szobahőn, ezért a jelölés optimális körülményei kísérletileg könnyen meghatározhatók. A jelölési reakciót követően, a mono- ^{125}I -MCH (RIA tracer) elkülönítése érdekében a keletkezett reakcióelegyet Merck-Hitachi L7100 típusú HPLC rendszerünkkel tisztítottuk, reverz fázisú elválasztást alkalmazva (Fűrjes és mtsai 2012, 2017, Lelesz és mtsai 2014, Jakab és mtsai 2004, Németh és mtsai 1998, 2002a, 2002b, 2002c, 2007). Eredményeink alapján megállapítható, hogy az optimális jelölési és HPLC elválasztási körülményeket sikerült megtalálnunk. A mono-jódzott MCH forma radioaktivitási aránya elérte a jelöléshez felhasznált teljes Na^{125}I radioaktivitásának a 80-85 %-át. A mono- és di-jódzott MCH formák specifikus radioaktivitási értékei közel azonosak az irodalomban közölt adatokkal (78,625 és 157,25 TBq/mmol) (Wang 1969). A jód beépülése egy peptidbe módosíthatja a molekula szerkezetét és ha ez a módosulás a kötődési régióban történik, akkor az képes megváltoztatni a jelölt anyag kötődési tulajdonságait. Kisebb affinitású kötődés csökkenti a RIA meghatározás érzékenységét. Az MCH RIA tracer esetében nem volt ilyen probléma, mivel a peptid C-terminális végét ismeri fel az ellenanyag, a radioaktív jelölés pedig középen, a gyűrűben található 13-as pozíciójú tirozinon történt.

Az újonnan kifejlesztett RIA módszer gyakorlati alkalmazásaként különböző patkány szövetekben mértük az MCH koncentrációt (központi idegrendszer, gyomor-bél traktus, perifériás szervek).

A patkány központi idegrendszer vizsgált területei közül a legmagasabb MCH koncentrációt a hipotalamuszban találtuk, majd ezt követte a gerincvelő (medulla spinalis) és a nyúltvelő (medulla oblongata). A többi vizsgált agyterület közel azonos mennyiségben, de alacsonyabb koncentrációban tartalmazott MCH-t. A patkány központi idegrendszer MCH tartalmára vonatkozó munkák összhangban van más kutatócsoportok által közölt adatokkal (Zamir és mtsai 1986a, 1986b, Sekiya és mtsai 1988, Takahasi és mtsai 1995). A legmagasabb MCH koncentrációt ők is a hipotalamuszban találták.

A patkány gyomor-bél traktus, valamint a perifériás szervek MCH tartalmának eloszlására vonatkozó eredményeink azonban teljesen új irodalmi adatokat szolgáltatnak. Az összes vizsgált patkány szövetmintában jól mérhető MCH immunreaktivitás volt megfigyelhető. Különösen magas MCH koncentrációt mértünk a vékonybélben, elsősorban a duodenumban, majd ezt követte a jejunum és az ileum. Szintén magas MCH koncentrációkat találtunk a hasnyálmirigyben és a vesében. Alacsonyabb MCH tartalom volt kimutatható a légcsőben és a májban, míg végül az MCH immunreaktivitás a többi vizsgált szövetmintában (fundus, antrum, vastagbél, végbél, tüdő, vázizom, szív) mutatta a legalacsonyabb értékeket. A patkány perifériás szervek szöveti MCH tartalmára vonatkozó kísérleti eredményeink ellentétben állnak egy japán kutatócsoport eredményeivel (Takahasi és mtsai 1995). Ők szintén hasonló patkány szöveti területek MCH koncentráció meghatározását végezték el, de nem találtak MCH immunreaktivitást patkány perifériális szövetekben és plazmában. Az ellentmondás feltehetően abból adódik, hogy ők a patkány MCH koncentráció meghatározáshoz is azt a RIA módszert alkalmazták, amelyet a csontos halak szöveteinek MCH szintjének a mérésére fejlesztettek ki. A patkány (emlős) MCH és a halakban található MCH azonban szerkezetileg lényegesen eltér egymástól. Mindkét MCH ciklikus szerkezetű ugyan, de eltérés van az aminosav számban (a patkány MCH 19 aminosavból áll, a hal MCH-t 17 aminosav alkotja), továbbá a peptidláncban 4 helyen is eltérés található az aminosav sorrendben (II.2. fejezet). A patkány szöveti MCH koncentráció meghatározáshoz nem a megfelelő RIA módszert használták, ezért nem találtak jól mérhető immunreaktivitást, vagyis a hal MCH mérésére kifejlesztett RIA, nem alkalmas emlős MCH mérésre.

Más kutatócsoportok munkáikban arról számoltak be (Bradley és mtsai 2000, Kishida és mtsai 1989, Lyon és Baker 1993), hogy alacsony koncentrációban megtalálható az MCH a pisztrángok vérben, valamint patkány plazmában. Saját, nagy érzékenységgű RIA módszerünket felhasználva, kutatócsoportunk is alacsony, de jól mérhető MCH szinteket talált humán plazmában (nem leközlött adatok).

Kísérleti eredményeink és tudományos ismereteink alapján feltételezzük, hogy az MCH, más biológiailag aktív peptidhez (szomatosztatin: Polak és mtsai 1975, Yamada 1986) hasonlóan, kettős szereppel rendelkezik. Egyrészt idegi mediátor (neuro-transzmitter) a központi idegrendszerben, másrészt étkezés hatására felszabaduló gasztriontesztinalis keringő hormon is, amely fontos szerepet játszhat nemcsak a táplálékfelvétel szabályozásában, hanem az emésztés folyamatában is. Feltételezhetően hatással van olyan betegségek kialakulására, mint a kórós elhízás, vagy éppen a kórós soványság. Nagy érzékenységű és specifikus MCH RIA módszerünk, amely szöveti és plazma MCH tartalom meghatározására egyaránt felhasználható, klinikai alkalmazása jelentős távlatokat nyithat meg akár még eddig ismeretlen kórképek megismeréséhez is.

VII.3. Önálló munkák

A doktori disszertáció készítése során általam végzett kísérletes és iroda háttér munkák felsorolása:

- Nyulak immunizálása
- Ellenanyagok karakterizálása (specifitás, titer, affinitás)
- Plazma - és szövetminták extrakciója
- RIA mérések kivitelezése
- RIA mérési eredmények kiértékelése
- Jelölt anyagok specifikus aktivitásának meghatározása
- Kísérleti eredmények statisztikai kiértékelése
- Doktori disszertáció szövegének megírása, ábráinak megrajzolása, táblázatainak összeállítása

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

Az értekezésben két biológiailag aktív peptid hormon, nevezetesen a glukagon típusú peptid-1 (GLP-1) és a melanin koncentráló hormon (MCH) mérésére szolgáló radioimmunoassay (RIA) módszerek kifejlesztését, valamint elsődleges gyakorlati alkalmazásukkal kapott eredményeinket foglaltam össze. Mindkét peptid fontos szerepet tölt be a szervezet energiaháztartásának szabályozásában és miután intézetünk egyik fontos kutatási területe a táplálkozás, az elhízás, az inzulin rezisztencia, valamint a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásának tanulmányozása, a magas színvonalú laborhátter biztosítása érdekében fontosnak tartottuk ezen új RIA eljárások kifejlesztését, hogy használatuk napi rutinszerű alkalmazása váljon elérhetővé.

A módszerek kidolgozásához szükséges GLP-1 és MCH peptidek szintézise, valamint a nyulak immunizálásához szüksége immunogének előállítása (a peptidek BSA hordozó fehérjéhez történő kapcsolása) a Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézetében történt, prof. Dr. Tóth Gábor vezetése mellett. A RIA módszerek kifejlesztésének többi lépését: ellenanyagok termelése nyulak immunizálásával, az antiszérumok karakterizálása (titer, affinitás, specificitás), a ^{125}I izotóppal jelölt RIA tracer előállítása (radioaktív jelölés, HPLC tisztítás), a RIA eljárások optimális működési körülményeinek beállítása, a módszerek analitikai jellemzőinek meghatározása, majd a beállított módszer gyakorlati alkalmazása (plazma GLP-1, valamint szöveti MCH szintek mérése), intézetünk izotóp laboratóriumában magunk végeztük.

A kidolgozott RIA módszerek nagy érzékenységgűek és specifikusak a mérni kívánt peptid hormonra.

GLP-1 RIA módszerünk esetében a kalibrációs görbe D_{50} értéke 10 meghatározás alapján: $15,18 \pm 2,02$ fmol/ml. Az assay kimutatási határkoncentrációja GLP-1 peptidre: 0,4 fmol/ml. MCH RIA esetében a kalibrációs görbe D_{50} értéke: $11,93 \pm 1,78$ fmol/ml, az MCH-ra vonatkoztatott kimutatási határkoncentráció: 0,2 fmol/ml.

Az újonnan kifejlesztett GLP-1 RIA módszerünket atípusos, antipszichotikum okozta elhízás és inzulin rezisztencia patkány modellben alkalmaztuk elsőként. A kísérlet során olanzapinnal kezeltünk patkányokat, majd a vizsgálat végén megmértük az éhgyomri és a glükóz tolerancia teszt alatti plazma GLP-1 szinteket és meghatároztuk a glükóztoleranciát. A plazma GLP-1 koncentrációk az olanzapinnal kezelt csoportban alacsonyabb értékeket mutattak a kontroll csoporthoz képest, a vércukorszint értékek ezzel szemben az antipszichotikummal kezelt csoportban voltak magasabbak.

MCH RIA módszerünk első alkalmazásaként, patkányok gasztorintesztinális traktusának egyes szakaszaiból, központi idegrendszeri területeikből és egyéb más perifériás szerveikből szöveti peptid koncentráció meghatározásokat végeztünk. A gyomor-bél traktus, valamint a perifériás szervek MCH tartalmának eloszlására vonatkozó eredményeink teljesen új irodalmi adatokat szolgáltatnak. Nagyon magas MCH koncentrációt mértünk a vékonybélben, elsősorban a duodenumban, majd ezt követte a jejunum és az ileum. Szintén magas MCH koncentrációkat találtunk a hasnyálmirigyben és a vesében. Alacsonyabb MCH tartalom volt kimutatható a légcsőben és a májban, nagyon alacsony értékeket mértünk a többi vizsgált szövetmintában (fundus, antrum, vastagbél, végbél, tüdő, vázizom, szív). Nagy érzékenységű RIA módszerünket felhasználva, kutatócsoportunk alacsony, de jól mérhető MCH szinteket talált humán plazmában (nem publikált adat). Kísérleti eredményeink és tudományos ismereteink alapján feltételezzük, hogy az MCH a szervezetben kettős szereppel rendelkezik. Egyrészt neuro-transzmitter a központi idegrendszerben, másrészt étkezés hatására felszabaduló gasztorintesztinális keringő hormon is, amely fontos szerepet játszhat nemcsak a táplálékfelvétel szabályozásában, hanem az emésztés folyamatában is. Feltételezhetően hatással van olyan betegségek kialakulására, mint a kóros elhízás, vagy éppen a kóros soványság. Nagy érzékenységű és specifikus MCH RIA módszerünk klinikai alkalmazása távlatokat nyithat meg akár még eddig ismeretlen kórképek (pl. MCH termelő adenoma) megismeréséhez is.

KULCSSZAVAK

RIA, GLP-1, MCH, ¹²⁵I, HPLC tisztítás, radioaktív jelölés

IX. SUMMARY

The thesis summarized our results about the development of radioimmunoassay (RIA) methods for the measurement of two biologically active peptide hormones, namely the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the melanin concentrating hormone (MCH) and it also contains a summary about the result of the methods primary practical application. Both peptides play main role in the regulation of the body's energy balance. Investigation of the nutrition, the obesity, the insulin resistance, as well as studying the development of type 2 diabetes are important research fields of our institute, therefore we decided to develop these new RIA methods to ensure a high-quality laboratory background which can make available these methods for routine daily use.

The GLP-1 and the MCH peptide synthesis which required for the development of the methods and the production of the immunogen (coupling the peptides to a carrier BSA protein) which essential to the rabbits immunization were happened at the University of Szeged, Institute of Medical Chemistry under the leadership of Professor Gábor Tóth. The other several steps of the RIA methods development: producing antibodies by rabbits immunization, the antisera characterization (titer, affinity, specificity), ^{125}I -labeled RIA tracer preparation (radioactive labeling, HPLC purification), set the RIA procedures optimal operating conditions, determination of the methods analytical characteristics, and then the practical application of the set methods (plasma GLP-1 and tissue MCH levels measuring) were carried out in the isotope laboratory of our institute by ourselves.

The developed RIA methods are high sensitive and specific for the measured peptide hormone. In case of the GLP-1 RIA method the D_{50} value of the calibration curve which based on 10 determinations was 15.18 ± 2.02 fmol/ml. The detection limit concentration of the assay for GLP-1 peptide is 0.4 fmol/ml.

In case of the MCH RIA method the D_{50} value of the calibration curve was 11.93 ± 1.78 fmol/ml, the detection limit concentration relative to MCH is 0.2 fmol/ml.

Our newly developed GLP-1 RIA method was used first in atypical antipsychotic-induced obesity and insulin resistance rat models. During the experiment rats were treated with olanzapine and at the end of the treatment the fasting plasma GLP-1 levels were determined. Thereafter we measured the glucose tolerance and the plasma GLP-1 levels during the glucose tolerance test. Plasma GLP-1 concentrations in the olanzapine-treated group showed lower

levels than the control group, whereas the values of blood sugar were higher at the antipsychotic-treated group.

For the first application of our MCH RIA method we performed tissue peptide concentration determinations from some sections of rat gastrointestinal tract, parts of the central nervous system and other peripheral organs. The results about the gastrointestinal tract and the peripheral organs, MCH content distribution have provided new data in the literature. Very high MCH concentration was determined in the small intestine, particularly in the duodenum, followed by the jejunum and the ileum. Also high MCH concentrations were found in the pancreas and in the kidney. Lower MCH content was detected in the trachea and in the liver, very low values were detected in the other examined tissue samples (fundus, antrum, colon, rectum, lung, skeletal muscle, heart). Using our high sensitive RIA method our research group found low but measurable MCH levels in human plasma (unpublished data). We assumed on the basis of our experimental results and the scientific knowledge that the MCH has a dual role in the body. First, a neurotransmitter in the central nervous system and secondary a meal effect released gastrointestinal circulating hormone, which can play an important role not only in the regulation of food intake, but also the process of digestion. Presumably it affects the development of diseases such as obesity or even emaciation. Clinical applications of the highly sensitive and specific MCH RIA method could open up horizons at the understanding of yet unknown diseases (eg. MCH-producing adenoma).

KEYWORDS

RIA, GLP-1, MCH, ¹²⁵I, HPLC purification, radioactive labeling

X. IRODALOMJEGYZÉK

Abdel-Bary HM, Moustafa KA, Abdel-Ghaney IY, Sallam KM, Shamsel-Din HA (2013) Synthesis and radioiodination of new dipeptide coupled with biologically active pyridine moiety.

J Radioanal Nucl Chem 298: 9-18

Ali MA, Sagar HA, Khatin MCS, Azad AK, Begum K, Wahed II (2012) Antihyperglycemic and analgesic activities of ethanolic extract of *Cassia fistula* L. stem bark.

J Pharm Sci Res 3: 416-423

Alvarez V.L., Roitsh C.A., Henriksen O. (1981) High-pressure liquid chromatography of proteins and peptides. In: Immunological methods, Eds. Lefvokits B.

Academic Press, New York, pp. 83-103

Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes.

Endocrinology 129: 2787-2789

Bell GI, Sanchez PR, Laybourn PJ, Najarian RC (1983) Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene.

Nature 304: 368-371

Berson SA, Yalow RS (1968) General principles of radioimmunoassay.

Clin Chim Acta 22: 51-69

Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Petro C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization.

J Comp Neurol 319: 218-245

Bradley RI, Kokkotou EG, Maratos-Flier E, Cheatham B (2000) Melanin-concentrating hormone regulates leptin synthesis and secretion in rat adipocytes.

Diabetes 49: 1073-1077

Brubaker PL (2010) Update on incretin biology: focus on glucagon-like peptide-1.

Endocrinology 151: 1984-1989

Casatti CA, Elias CF, Sita LV, Frigo L, Furlani VCG, Bauer JA, Bittencourt JC (2002) Distribution of melanin-concentrating hormone neurons projecting to the medial mammillary nucleus.

Neurosci 115: 899-915

Chambers J, Ames RS, Bergsma D, Muir A, Fitzgerald LR, Hervieu G, Dytko GM, Foley JJ, Martin J, Liu WS, Park J, Ellis C, Ganguly S, Konchar S, Cluderay J, Leslie R, Wilson S, Sarau HM (1999) Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1.
Nature 400: 261-265

Chi Y, Gellman SH (2005) Diphenylprolinol methyl ether: a highly enantioselective catalyst for Michael addition of aldehydes to simple enones.
Org Lett 19: 4253-4256

Davenport AP, Russell FD (1996) Radioligand binding assays: theory and practice.
In: Current directions in radiopharmaceutical research and development. Ed: Mather SJ
Springer Netherlands pp. 169-179

Deacon CF, Holst JJ (2009) Immunassays for the incretin hormones GIP and GLP-1.
Best Pract & Res Clin Endocrinol Metab 23: 425-432

Diao Y, Zhao W, Li Y, Liao L, Wang O, Liu J, Zhao X, Yu C, Cui Z (2014) Radiolabeling of EGCG with ¹²⁵I and its biodistribution in mice.
J Radioanal Nucl Chem 301: 167-173

Ekins RP (1960) The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique.
Clin Chim Acta 5: 453-459

El-Bayoumy ASA, Ebeid NH, EL-Refay GhR, Abdel-Hamid FF, Mehany NL, Shadia FA (2016) Biochemical studies on production and evaluation of radioimmunoassay system for follicle stimulating hormone in human serum.
J Radioanal Nucl Chem 310:1115-1122

Enginar H, Unak P, Biber Müftüler FZ, Lambrecht FY, Yurt Kilcar A, Yolcular S, Seyitoglu B, Medine EI, Bulduk I (2012) Synthesis, radiolabeling and biodistribution of a new opioid glucoronide derivative: ethyl-morphine glucoronide (em-glu).
J Radioanal Nucl Chem 292: 667-673

Fraker PJ, Speck JC (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble choloamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3- α -diphenylglycoluril.
Bioch Bioph Res Comm 80: 849-857

Fürjes G, Lelesz B, Tóth GK, Arady A, Szilvássy Z, Varga A, Berényi E, Németh J (2017) Comparative distribution of somatostatin and thritene bioactive peptides in the central nervous system of rat measured by radioimmunoassay.
J Radioanal Nucl Chem (in press)

Fürjes G, Tóth GK, Peitl B, Pórszász R, Lelesz B, Sári R, Tóth A, Szilvássy Z, Németh J (2012) Thritene radioimmunoassay: description and application of a novel method.

J Radioanal Nucl Chem 292: 113-118

Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, Salaün-Martin C (2005) Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. Diabetes Metab 31: 233-242

Halleen JM, Karp M, Viloma S, Laarksonen P, Hellman J, Kakönen SM, Stepan JJ, Holmes S, Vaananen HK, Pettersson K (1999) Two-site immunoassay for osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase based on characterization of six monoclonal antibodies. J Bone Miner Res 14: 464-469

Hunter WM, Greenwood EC (1962) Preparation of iodine-131 labelled growth hormone of high specific activity. Nature 194: 495-496

Ito M, Gomori A, Ishihara A, Oda Z, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M, Ito M, Sano H, Tokita S, Moriya M, Iwaasa H, Kanatani A (2003) Characterization of MCH-mediated obesity in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 284: E940-945

Jakab B, Reglödi D, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Oroszi G, Szilvássy Z, Szolcsányi J, Németh J (2004) Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. J Biochem Biophys Methods 61: 189-198

Jeon J, Shim HE, Mushtaq S, Kang JA, Nam YR, Yoon S, Kim HR, Choi DS, Jang BS, Park SH (2016) Radiosynthesis and in vivo evaluation of [¹²⁵I]2-(4-iodophenethyl)-2-methylmalonic acid as a potential radiotracer for detection of apoptosis. J Radioanal Nucl Chem 308: 23-29

Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Anal Biochem 34: 595-598

Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BI (1983) Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. Nature 305: 321-323

Kawazoe I, Kawauchi H, Hirano T, Naito N (1987) Structure-activity relationships of melanin-concentrating hormone. Int J Pept Protein Res 29: 714-721

Kishida M, Baker BI, Eberle AN (1989) The measurement of melanin-concentrating hormone in trout blood. Gen Comp Endocrinol 74: 221-229

Kokkotou E, Moss AC, Torres D, Karagiannides I, Cheifetz A, Liu S, O'Brian M, Maratos-Flier E, Pothoulakis C (2008) Melanin-concentrating hormone as a mediator of intestinal inflammation.

Proc Natl Acad Sci 105: 10613-10618

Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Salpea KD, Mikhailidis DP (2007) The prevalence of metabolic syndrome in various populations.

Am J Med Sci 333: 362-371

László F, Janáky T (1986) Antisérum, radioaktív antigén In: Radioimmunoassay, eds. Antoni F, Árky I

Medicina Könyvkiadó, Budapest, pp. 34-75

Lelesz B, Szilvássy Z, Tóth GK, Tóth A, Enyedi A, Felszeghy E, Varga A, Juhász B, Németh J (2016) Radio-analytical methods for the measurement of melanin concentrating hormone (MCH) and detection its receptor in rat tissues.

J Radioanal Nucl Chem 310: 1325-1333

Lelesz B, Tóth KG, Peitl B, Hegedűs Cs, Drima L, Sári R, Szilvássy Z, Németh J (2014) Description and application of a novel glucagon-like peptide-1 (GLP-1) radioimmunoassay.

J. Radioanal. Nucl. Chem. 299: 157-164

Lembo PM, Grazzini E, Cao J, Hubatsch DA, Pelletier M, Hoffert C, St-Onge S, Pou C, Labrecque J, Groblewski T, O'Donnell D, Payza K, Ahmad S, Walker P (1999) The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor.

Nat Cell Biol 1: 267-271

Lyon VE, Baker BI (1993) The effect of photoperiod on plasma levels of melanin-concentrating hormone in the trout.

J Neuroendocrinol 5: 493-499

Marchalonis JJ (1969) An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins.

Biochem J 113: 299-305

Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Qian S (2002) Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism.

Proc Natl Acad Sci 99: 3040-3245

McGuigan JE (1968) Immunochemical studies with synthetic human gastrin.

Gastroenterology 54: 1005-1011

Miles LE, Hales CN (1968) Immunoradiometric assay of human growth hormone.
Lancet 2: 492-493

Morris BJ. (1976) Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement: a re-evaluation.
Clin Chim Acta 72: 213-216

Motaleb MA, Abdel-Gnaney IY, Abdel-Bary HM, Shamsel-Din HA (2016) Sythesis, radioiodination and biological evaluation of a novel phthalimide derivative.
J Radioanal Nucl Chem 307: 363-372

Motta AJ, Koska J, Reaven P, Migrino RQ (2012) Vascular protective effects of diabetes medications that mimic or increase glucagon-like pepetide-1 activity.
Rec Pat Cardiovas Drug Disc. 7: 2-9

Nahon JL (1994) The melanin-concentrating hormone: from the peptide to the gene.
Crit Rev Neurobiol 8: 221-262

Nahon JL, Presse F, Bittencourt JC, Sawchenko PE, Vale W (1989) The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus.
Endocrinology 125: 2056-2065

Németh J, Görcs T, Helyes Zs, Oroszi G, Kocsy T, Pintér E, Szolcsányi J (1998) Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research.
Neurobiology 6: 473-475

Németh J, Jakab B, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Kiss P, Oberitter Zs, Horváth B, Szilvássy Z, Reglődi D (2007) PACAP-27 radioimmunoassay: description and application of a novel method.
J Radioanal Nucl Chem 273: 327-332

Németh J, Jakab B, Reglődi D, Lubics A, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lengvári I, Görcs T, Szolcsányi J (2002c) Comparative distribution of VIP in the central nervous system of various species measured by a new radioimmuniassay.
Regul Peptides 109: 3-7

Németh J, Oroszi G, Jakab B, Magyarlaki M, Szilvássy Z, Róth E, Farkas B (2002a) ¹²⁵I-labelling and purification of peptide hormones and bovine serum albumin.
J Radioanal Nucl Chem 251: 129-133

Németh J, Oroszi G, Jakab B, Schweibert I, Szolcsányi J, Szilvássy Z (2002b) Gastrin radioimmunoassay: description and application of a novel method.

J Radioanal Nucl Chem 254: 277-281

Németh J, Varró A, Bridson J, Walker R, Dockray GJ (1992) Increased tissue concentrations of the gastrin precursor in patients treated with omeprazole.
Eur J Clin Invest 22: 638-644

Németh J, Vecsernyes M, Oroszi G, Balla Zs, Helyes Zs, Farkas B, Szilvassy Z (2000) Preparation of mono-¹²⁵I-labelled gastrin-17 for radioimmunoassay measurements.
J Labelled Compd Rad 43: 855-863

Pauwels S, Desmond H, Dimaline R, Dockray GJ (1986) Identification of progastrin in gastrinomas, antrum and duodenum by a novel radioimmunoassay.
J Clin Invest 77: 376-381

Pissios P, Ozcan U, Kokkotou E, Okada T, Liew CW, Liu S, Peters JN, Dahlgren G, Karamchandani J, Kudva YC, Kurpad AJ, Kennedy RT, Maratos-Flier E, Kulkarni RN (2007) Melanin concentrating hormone is a novel regulator of islet function and growth.
Diabetes 56: 311-319

Polak J, Pearse AGE, Grimelius L, Bloom S, Arimura A (1975) Growth hormone release-inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D cells.
Lancet 1: 1220-1222

Presse F, Conductier G, Rovere C, Nahon JL (2014) The melanin-concentrating hormone receptors: neuronal and non-neuronal functions.
Int J Obes 4: 31-36

Ranu BC, Banerjee S (2005) Ionic liquid as catalyst and reaction medium. The dramatic influence of a task-specific ionic liquid, [bmIm]OH, in Michael addition of active methylene compounds to conjugated ketones, carboxylic esters, and nitriles.
Org Lett 14: 3049-3052

Rased HM, Ibrahim IT, Motaleb MA, El-Bary AA (2014) Preparation of radioiodinated ritodrine as a potential agent for lung imaging.
J Radioanal Nucl Chem 300: 1227-1233

Rasmi RR, Shenoy KB, Kadwad VB, Sarnaik J, Somashekarappa HM (2015) Application of novel magnetizable cellulose particles in the development of immunoradiometric assay for C-peptide.
J Radioanal Nucl Chem 304: 1115-1122

Rasmi RR, Shenoy KB, Sarnaik J, Kadwad VB, Somashekarappa HM, Sivaprasad N (2014) Standardization of radioimmunoassay for human insulin employing magnetizable cellulose particles.
J Radioanal Nucl Chem 302: 1271-1275

Rodriguez M, Beauverger P, Naime I, Rique H, Ouvry C, Souchaud S, Dromaint S, Nagel N, Suply T, Audinot V, Boutin JA, Galizzi JP (2001) Cloning and molecular characterization of the novel human melanin-concentrating hormone receptor MCH2.
Mol Pharmacol 60: 632-639

Sailer AW, Sano H, Zeng Z, McDonald TP, Pan J, Pong SS, Feighner SD, Tan CP, Fukami T, Iwaasa H, Hreniuk DL, Morin NR, Sadowski SJ, Ito M, Ito M, Bansal A, Ky B, Figueroa DJ, Jiang Q, Austin CP, MacNeil DJ, Ishihara A, Ihara M, Kanatani A, Van der Ploeg LH, Howard AD, Liu Q (2001) Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R.
Proc Natl Acad Sci 98: 7564-7569

Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F, Civelli O (1999) Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor.
Nature 400: 265-269

Salacinski PRP, McLean C, Sykes JEC, Clement-Jones VV, Lowry PJ (1981) Iodination of proteins, glycoproteins and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetracholo-3alfa, 6alfa-diphenyl glycorulil (Iodogen).
Anal Biochem 117: 136-146

Sallam KM, El-Bayoumy ASA, Mehany NL (2016) Development of solid phase immunoradiometric assay for determination of carcinoembryonic antigen as a tumor marker. J Radioanal Nucl Chem 307: 1375-1383

Sekiya K, Ghatei MA, Lacoumenta S, Burnet PW, Zamir N, Burrin JM, Olak JM, Bloom SR (1988) The distribution of melanin-concentrating hormone-like immunoreactivity in the central nervous system of rat, guinea-pig, pig and man.
Neurosci 25: 925-930

Stadil F, Rehfeld JF (1972) Preparation of ¹²⁵I labeled synthetic human gastrin I for radioimmunoanalysis.
Scand J Clin Lab Invest 30: 361-368

Tadayyon M, Welters HJ, Haynes AC, Cluderay JE, Hervieu G (2000) Expression of melanin-concentrating hormone in insulin-producing cells: MCH stimulates insulin release in RINm5F and CRI-G1 cell-lines.
Biochem Biophys Res Commun 275: 709-712

Takahashi K, Suzuki H, Totsune K, Murakami O, Satoh F, Sone M, Sasano H, Mouri T, Shibahara S (1995) Melanin-concentrating hormone in human and rat.
Neuroendocrinol 61: 493-498

Uzaras C, Avcibasi U, Demiroglu H, Medine EI, Kilcar AY, Müftüler FZB, Ünak P (2016) Investigation of therapeutic efficiency of phenytoin (PHT) labeled with radioactive ^{131}I in the cancer cell lines.
J Radioanal Nucl Chem 307: 131-140

Vaughan JM, Fischer WH, Hoeger C, Rivier J, Vale W (1989) Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus.
Endocrinology 125: 1660-1665

Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Léger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep.
BMC Neurosci 4: 19-24

Viale A, Ortola C, Hervieu G, Furuta M, Barbero P, Steiner DF, Seidah NG, Nahon JL (1999) Cellular localization and role of prohormone convertases in the processing of pro-melanin concentrating hormone on mammals.
J Biol Chem 274: 6536-6545

VilSBoll T (2004) On the role of the incretin hormones GIP and GLP-1 in the pathogenesis of Type 2 diabetes mellitus.
Danish Med Bull 51: 364-370

Wang J (1969) Handbook of radioactive nuclides. p 47, CPCP Press, Cleveland

Wang S, Behan J, O'Neill K, Weig B, Fried S, Laz T, Bayne M, Gustafson E, Hawes BE (2001) Identification and pharmacological characterization of a novel human melanin-concentrating hormone receptor, mch-r2.
J Biol Chem 276: 34664-34670

Xie Q, Li X, Wang G, Hou X, Wang J, Yu H, Qu C, Luo S, Cui Y, Xia C, Wang R (2017) Preparation and evaluation of ^{131}I -quercetin as a novel radiotherapy agent against dedifferentiated thyroid cancer.
J Radioanal Nucl Chem 311: 1697-1708

Yalow RS, Berson SA (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J Clin Invest 39: 1157-1175

Yalow RS, Berson SA (1970) Radioimmunoassay of gastrin.
Gastroenterology 58: 1-14

Yamada T (1986) In: LR Johnson (ed) Physiology of the gastrointestinal tract.
Raven, New York, p 131-142

Zamir N, Skofitsch G, Bannon MJ, Jacobowitz DM (1986) Melanin-concentration hormone: Unique peptide neuronal system in the rat brain and pituitary gland.
Proc Natl Acad Sci 83: 1528-1531

Zamir N, Skofitsch G, Jacobowitz DM (1986) Distribution of immunoreactive melanin-concentrating hormone on the central nervous system of the rat.
Brain Res 373: 240-245

XI. TÁMOGATÁS

A tudományos kutatás és a PhD disszertáció az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA) 75965 sszámú pályázatának, és a Magyar Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal AGR-PIAC-13-1-2013-0008 és GINOP-2.3.4.-15-2015-00002 számú projektjeinek támogatásával készült.

XII. ETIKAI ENGEDÉLY

Vizsgálataink során minden állatkísérletet a laboratóriumi állatok védelméről és használatáról szóló rendelkezések és az ezzel összhangban lévő, a Debreceni Egyetem helyi etikai irányelveinek a betartásával végeztük (08/2007/DE MÁB&16/2007 DE MÁB).

XIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kiemelt köszönettel tartozom Szilvássy Zoltán Professzor Úrnak, a Debreceni Egyetemek Rektorának, valamint az Általános Orvostudományi, Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének és egyben témavezetőmnek, hogy támogatta és lehetővé tette számomra az intézetben végzett munkát.

Köszönetemet szeretném kifejezni mentoromnak Dr. Németh Józsefnek, hogy időt és energiát nem sajnálva, munkámat hasznos elméleti és gyakorlati tanácsaival maximálisan támogatta és lehetővé tette, hogy sikeresen végezzem tudományos munkámat, és ez által megírhattam doktori disszertációm.

Köszönettel tartozom a Szegedi Egyetem, Orvosi Vegytani Intézetében dolgozó Tóth Gábor Professzor Úrnak, az antigének szilárd fázisú szintézisének elkészítéséért.

Külön köszönöm a munkáját Dr. Kovács Diána Klárának és Dr. Hegedűs Csabának, akik az állatkísérletek kivitelezésében, a patkány szervek és szövetminták kivételében nyújtottak nélkülözhetetlen segítséget, valamint a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi dolgozójának.

Külön köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akik mindvégig kitartottak mellettem és maximálisan támogattak céljaim elérésében.



Nyilvántartási szám: DEENK/99/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lelesz Beáta
Neptun kód: SRGZTO
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lelesz, B.**, Szilvássy, Z., Tóth, G. K., Tóth, A., Enyedi, A., Felszeghy, E. N., Varga, A., Juhász, B., Németh, J.: Radioanalytical methods for the measurement of melanin concentrating hormone (MCH) and detection its receptor in rat tissues.
J. Radioanal. Nucl. Chem. 310 (3), 1325-1333, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-016-4952-9>
IF: 0.983 (2015)
2. **Lelesz, B.**, Tóth, G. K., Peitl, B., Hegedűs, C., Drimba, L., Sári, R., Szilvássy, Z., Németh, J.: Description and application of a novel glucagon-like peptide-1 (GLP-1) radioimmunoassay.
J. Radioanal. Nucl. Chem. 299, 157-164, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-013-2751-0>
IF: 1.415





További közlemények

3. Fűrjes, G., **Lelesz, B.**, Tóth, G. K., Arday, A., Szilvássy, Z., Varga, A., Berényi, E., Németh, J.: Comparative distribution of somatostatin and thirtene bioactive peptides in the central nervous system of rat measured by radioimmunoassay.
J. Radioanal. Nucl. Chem. 311, 1741-1749, 2017.
IF: 0.983 (2015)
4. Tamás, A., Jávorszky, A., Reglődi, D., Sarlós, D. P., Bányai, D., Semjén, D., Németh, J., **Lelesz, B.**, Fülöp, D. B., Szántó, Z.: Examination of PACAP-Like Immunoreactivity in Urogenital Tumor Samples.
J. Mol. Neurosci. 59 (2), 177-183, 2016.
IF: 2.352 (2015)
5. Horváth, G., Kiss, P., Németh, J., **Lelesz, B.**, Tamás, A., Reglődi, D.: Environmental enrichment increases PACAP levels in the CNS of adult rats.
Neuroendocrinol. Lett. 36 (2), 143-147, 2015.
IF: 0.946
6. Fűrjes, G., Tóth, G. K., Peitl, B., Pórszász, R., **Lelesz, B.**, Sári, R., Tóth, A., Szilvássy, Z., Németh, J.: Thirtene radioimmunoassay: description and application of a novel method.
J. Radioanal. Nucl. Chem. 292 (1), 113-118, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-011-1516-x>
IF: 1.467

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,146

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
2,398

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományos ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.04.13.

