

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Időskorral összefüggő látáskárosodás terápiás
intervencióinak vizsgálata funkcionális és
molekuláris biológiai módszerekkel**

Dr. Szilágyi Anna

Témavezető: Dr. Varga Balázs



DEBRECENI EGYETEM
Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Időskorral összefüggő látáskárosodás terápiás intervencióinak vizsgálata funkcionális és molekuláris biológiai módszerekkel

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az egészségtudományok tudományágban

Írta: dr. Szilágyi Anna okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori
Iskola (Táplálkozástudományi programja) keretében

Témavezető: Dr. Varga Balázs

Az értekezés bírálói:

Dr. Csonka Csaba, PhD
Dr. Ujhelyi Bernadett, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Majoros László, PhD
tagok: Dr. Csonka Csaba, PhD
Dr. Ujhelyi Bernadett, PhD
Dr. Siposné Dr. Fehér Pálma Eszter, PhD
Dr. Dér Péter, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2025. január 30. 13 óra

“Aging is the progressive accumulation of changes with time that are associated with or responsible for the ever-increasing susceptibility to disease and death which accompanies advancing age.”

Harman (1981, p. 7124)

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés	1
2. Anyagok és módszerek.....	3
2.1. Kísérleti állatok	3
2.2. Kísérleti protokollok és csoportok.....	3
2.2.1. A DMT és harmalin anti-iszkémiás hatásának vizsgálata Sprague Dawley patkányokon	3
2.2.2. A rendszeres testmozgás dózis-függő hatásának vizsgálata aging patkánymodellén.....	5
2.3. Western blot	6
2.4. Szövettan	7
2.5. Statisztika	8
3. Eredmények.....	9
3.1. A DMT és harmalin hatásának vizsgálata a szem iszkémia-reperfúziós károsodásában.....	9
3.1.1. A szem ultrahang vizsgálata.....	9
3.1.2. Elektroretinográfia.....	9
3.1.3. Western Blot.....	9
3.1.4. Szövettan	10
3.2. A rendszeres testmozgás dózis-függő hatásának vizsgálata öregedő patkánymodellén.....	11
3.2.1. Elektroretinográfias eredmények.....	11
3.2.2. A második kísérlet western blot eredményei.....	12
4.2.3. Szövettan	13
4. Megbeszélés	14
5. Összegzés	24
6. Az értekezés új megállapításai	25
7. Saját közlemények jegyzéke.....	26
8. Kulcsszavak.....	29
9. Köszönetnyilvánítás	29

1. Bevezetés és célkitűzés

A várható élettartam drámaian megnőtt az elmúlt évtizedekben. A legújabb becslések szerint 2050-re a 60 év felettek száma világszerte csaknem megháromszorozódhat. A kor előrehaladtával párhuzamosan nő a szem degeneratív betegségeinek kockázata, a 80 év felettek körében a látásromlás prevalenciája meghaladja a 20%-ot. Az öregedéshez társuló szembetegségek jelentős hányada ellen a klinikai gyakorlatban még nem áll rendelkezésre hatékony kezelés, ezért kiemelt fontosságú olyan terápiás módszer feltárása, ami alkalmas lehet a retina funkciójának megőrzésére és az időskori látásvesztés megelőzésére.

Az ayahuasca egy tradicionális főzet, amelyet évszázadok óta alkalmaznak elsősorban Dél-Amerikában vallási szertartásokon hallucinogén hatása miatt. A tradicionális ayahuasca ital β -karbolinokban gazdag gyógynövényekből (pl. Banisteriopsis caapi, Peganum harmala) áll, amelyeket hagyományosan N'N-dimetiltriptamin (DMT) tartalmú növényvel (pl. Psychotria viridis, Diplopterys cabrerana) kombinálnak, így érve el a legintenzívebb és leghosszabb pszichoaktív hatást.

Az elmúlt évtizedekben a DMT ígéretes jelöltté vált számos betegség kezelésében. Sigma-1 (Sig-1R) receptor agonista aktivitása révén, felmerült neuroprotektív hatása is. A β -karbolinokhoz tartozó harmalin a monoamino-oxidáz enzim A-típusának (MAO-A) reverzibilis gátlószere ezért képes a triptaminok (pl. a DMT) hatását potenciózni a lebomlásuk gátlása által. A harmalin az elmúlt évtizedben nagy figyelmet kapott, alkalmazása felmerült daganatos, gyulladáso és neurodegeneratív kórképekben, valamint a kognitív hanyatlás kezelésében. A legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy a MAO enzimek fontos szerepet játszanak az oxidatív stressz kiváltásában, mivel a neurotranszmitterek lebontása közben hidrogén-peroxid és reaktív oxigéngyökök keletkeznek. Ennek köszönhetően az enzim gátlása antioxidáns hatást közvetíthet.

Az oxidatív stressz elleni védekezés fokozásában, vagyis az antioxidáns rendszer aktiválásában nagy szerepe van a rendszeres fizikai aktivitásnak. Számos tanulmány feltételezi, hogy a testmozgás dóziszfüggő hatású, ami arra utal, hogy a testmozgás intenzitásának növekedésével a sport jótékony hatásai is fokozódnak. Újabb kutatások azonban rámutattak az életkor fontosságára is, melyek szerint idős korban a magas intenzitású testmozgás nem jár érzékelhető előnyökkel az alacsony intenzitású testmozgással szemben, sőt az oxidatív stressz fokozó hatása miatt felgyorsíthatja az egészséges öregedés folyamatát.

Vizsgálataink fő céljául tűztük ki, hogy potenciális terápiás intervenciók hatékonyságát teszteljük időskorral összefüggő szemészeti betegségek kivédésében. Továbbá célunk volt ezen

preventív módszerek funkcionális és molekuláris hatásainak pontos feltárása. Első kísérletünkben az ayahuasca két fő összetevőjének, a DMT-nek és a harmalinnak biológiai hatásait vizsgáltuk a szem iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodásában, amely számos időskorban jelentkező szembetegség etiológiájában fontos jelenség. A második kísérletünk fő célkitűzése annak megállapítása volt, hogy a nagy intenzitású testmozgás vagy a szabadidős, rekreációs tevékenység előnyösebb idős állatok szemében és azonosítani kívántuk a szem molekuláris és funkcionális változásait az eltérő aktivitású csoportokban. Mindkét vizsgálat során a szem ideghártyájának funkcionális vizsgálatát elektroretinográfiás mérésekkel teszteltük, a retina morfológiáját szövettani vizsgálattal értékeltük, a fehérjeexpressziós változásokat western blot analízissel vizsgáltuk, mely során nagy hangsúlyt fektettünk a sejthalálban, az oxidatív stressz kiváltásában, az antioxidáns hatások közvetítésében fontos fehérjékre.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Kísérleti állatok

Első kísérletünkhöz 12 hetes hím Spargue Dawley (SD, 420-460 g) patkányokat alkalmaztunk. Az állatok 10 hetes korukban érkeztek és 2 hét akklimatizációs időszakot biztosítottunk számukra. Ezalatt a patkányok ketrecben voltak elhelyezve egy olyan ablak nélküli állatházi szobában, ahol 12 órás világos/sötét ciklust és állandó 24 °C hőmérsékletet biztosítottunk számukra. Az állatok szabadon hozzáférhettek vízhez, valamint ad libitum szabványos rágcsálótáphoz. Az állatok az ARVO (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) és az NIH (National Institute of Health) iránymutatásainak megfelelően humánus ellátásban részesültek. A vizsgálat során alkalmazott valamennyi módszert a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (engedélyszám: 12/2019/DEMÁB) jóváhagyta.

Második vizsgálatunkba 3 és 18 hónapos hím Wistar patkányokat vontunk be. A patkányok 10 hónapos korukban érkeztek az állatházba és 18 hónapos korukig semmilyen előkezelésben nem részesültek, míg a fiatal állatok 10 hetes korukban érkeztek és 2 hét akklimatizációs periódust biztosítottunk számukra. Az állatok tartási körülményei és táplálása megegyezett a korábban leírtakkal, azonban figyelembe véve, hogy a tervezett futókerékben töltött aktív ciklusokat a reggeli órákra terveztük, ezért a kísérlet körülményeinek optimalizálása érdekében a 12 órás sötét/világos ciklust mesterségesen felcseréltük. A patkányok az éjszakai órákban aktívak, ezért az aktív futási ciklusra a Wistar patkányok számára az "éjszakai, tehát aktív időszak" kezdetén került sor. A Wistar patkányok humánus bánásmódban részesültek, az ARVO és NIH irányelvei szerint. A Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (engedélyszám: 3/2022/DEMÁB) elfogadta és jóváhagyta a vizsgálat során alkalmazott valamennyi kísérleti módszert.

2.2. Kísérleti protokollok és csoportok

2.2.1. A DMT és harmalin anti-iszkémiás hatásának vizsgálata Sprague Dawley patkányokon

Első kísérletünk célja az volt, hogy megvizsgáljuk az ayahuasca főzet két legfontosabb komponensének, az N,N-dimetiltriptaminnak és a harmalinnak biológiai hatásait a szem iszkémia-reperfúziós károsodásában.

Kéthetes akklimatizációs időszakot követően (12 hetes korukban) az állatokat véletlenszerűen csoportokra osztottuk (n = 10 minden csoportban): vivőanyaggal kezelt (a lekötött szem szolgált a beteg kontrollként – BK; míg az iszkémiának nem kitett szemet

használtuk egészséges kontrollként –EK), DMT-vel és harmalinnal kezelt (DHK) és harmalinnal (HK) kezelt csoportok.

A DMT oldatot ozmotikus minipumpával juttattuk be, amely 1 héten keresztül képes volt folyamatosan, állandó sebességgel szubkután adagolni a hatóanyagot. Fő célunk az volt, hogy állandó DMT-koncentrációt tartsunk fenn, és megelőzzük a DMT erős hallucinogén és szerotonerg mellékhatásait. A DMT alkalmazott napi dózisa 10 mg/kg/nap volt. A harmalin és a vivőanyag beadását naponta kétszer rozsdamentes acél gyomorszondán keresztül valósítottuk meg. A mini pumpák korlátozott térfogata (2 ml) miatt nem tudtuk a harmalint a pumpákba tölteni. Figyelembe véve a harmalin viszonylag rövid felezési idejét és a MAO-A enzimre gyakorolt reverzibilis gátló hatását, a szert mindkét kezelési csoportnak naponta kétszer, 10 mg/kg/nap adagban, szájon át történő szondázással adtuk be. A harmalint mucilago hydroxethylcellulosiban diszpergáltuk, ezért a mucilago a vivőanyaggal kezelt csoportban is alkalmaztuk. Tekintettel arra, hogy a DMT felezési ideje MAO-A gátlás nélkül rendkívül rövid, az állatok életét kímélve nem hoztunk létre csak DMT-vel kezelt csoportot (3R állatetikai szabály). Egészséges kontroll (EK) csoportként a kezeletlen Sprague-Dawley patkányok jobb (nem lekötött) szemét használtuk, amivel tovább tudtuk csökkenteni a feláldozott állatok számát.

2.2.1.1. Iszkémia modell

Az állatoknál a mély anesztéziát ketamin/xilazin kombináció (100/10 mg/kg) intramuszkuláris beadásával értük el. Az általános anesztézia mellett lokális érzéstelenítést is alkalmaztunk az állatok bal szemén oxibuprokain tartalmú szemcseppel. Amikor az állatok fájdalomingerre már nem reagáltak, kísérleti úton iszkémiás állapotot idéztünk elő az SD patkányok bal szemén ligációs technikával, a munkacsoport korábbi protokollja szerint. A ligáció során a szemgolyókat kissé kiemeltük a szemüregből, majd a szemgolyók mögé egy vastag, atraumatikus sebészi varróanyagból készült ligatúrát helyeztünk, melynél egy polietilén kanül segítségével egy csúszócsonk alakítottunk ki. A ligatura körülvette a látóideget, a retina ereit és a retrobulbáris kötőszövetet. Az iszkémiát a csomó meghúzásával és rögzítésével indítottuk el, nyomást gyakorolva a retinális erekre. A vérrellátás megszűnését makroszkóposan, oftalmoszkóp segítségével is ellenőriztük. A szemfenék elfehéredése jelezte a globális iszkémia kezdetét. Az állatok szemét az altatás alatt karbomer alapú szemgéllel védtük a kiszáradás ellen (Vidisic, Bausch & Lomb, Berlin, Németország). Az iszkémia időtartama 60 perc volt. Az iszkémiás időszak végén a csomót feloldottuk és a ligatúrát eltávolítottuk, hogy a véráramlás újra elindulhasson.

2.2.1.2. A szem ultrahang vizsgálata

A retina véráramlását a Vevo 3100 ultrahangrendszer segítségével határoztuk meg. A vizsgálatot során az állatok mély altatásban voltak, a megfelelő testhőmérséklet biztosítása érdekében 39 °C hőmérsékletű fűtött melegítőpadra helyeztük őket (hason fekvő pozícióban). Vízalapú, inert ultrahanggélt vittünk fel a szaruhártya felszínére, és a szemet az úgynevezett hosszanti makula (LMAC) nézetben vizualizáltuk. A standard Color Doppler jeleket 9 mm mélységben vettük fel, valamint impulzushullám (PW) Doppler-képeket rögzítettünk a hátsó rövid ciliaris artéria véráramlásának értékelésére (55, kapuméret: 0,27 mm). A véráramlást az 1 órás I/R-sérülés előtt (alapállapot) és után (reperfúzió alatt) értékeltük. A képeket félkvantitatív módon elemeztük, hogy értékeljük az áramlás jelenlétét a kiindulási körülmények között és a reperfúziós fázisban.

2.2.1.3. Az ozmotikus minipumpa beültetése

A 2 ml térfogatú ozmotikus minipumpákat az állatok interszkapuláris régiójába helyeztük be közvetlenül az iszkémiás időszak lezárása után, kihasználva a még fennálló mély anesztézia állapotát. Az állatok hátát a beültetés helyén leborotváltuk, és a bőrt 10%-os povidon-jódoldattal lefertőtlenítettük. Első lépésként a lapocka közötti terület közepvonalaiban egy 1 centiméter hosszúságú bemetszést ejtettünk, majd egy hemosztátot helyeztünk a bőr alatti kötőszövetbe. A hemosztát szárainak folyamatos nyitásával és zárásával létrehoztunk egy zsebet a pumpa számára. Amikor a zseb mérete megfelelő volt, behelyeztük a minipumpát és sebet nem felszívódó varróanyaggal bezártuk, majd újból fertőtlenítettük a felületet. Ezt az eljárást nem csak a DMT és harmalin kezelt csoportnál végeztük el, hanem a harmalinnal és a vivőanyaggal kezelt állatoknál is minipumpa beültetése nélkül (álműtét). Ezzel biztosítottuk, hogy minden kezelési csoport azonos stressz-terhelésnek legyen kitéve.

2.2.2. A rendszeres testmozgás dózis-függő hatásának vizsgálata aging patkánymodellén

A második kísérletünknek a fő célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk az idősödő korban elkezdett különböző intenzitású testmozgás hatását a látószerven.

A vizsgálatunkhoz az alábbi csoportokat hoztuk létre:

I. csoport: fiatal, 3 hónapos patkányok = fiatal kontroll (FK) csoport (testmozgás nélkül) (n=10);

II. csoport: idősödő (18 hónapos), inaktív (fizikai aktivitás nélküli) kontrollcsoport (IIK): a kísérlet során egy futókerék nélküli ketrecben lettek elhelyezve, ez a csoport képviselte a fizikailag inaktív populációt (n=12);

III. csoport: idősödő önkéntes/rekreációs futó (18 hónapos) (IRF) csoport: futókerékkel ellátott ketrecben lettek elhelyezve, ahol a futókereket önként használhatták (2 db állat/ ketrec, n=12);
IV. csoport: idősödő (18 hónapos) erőltetett futó (IEF) csoport: az állatok 6 nap/hét gyakorisággal végeztek magas intenzitású testmozgást egy zárt futókerékben folyamatos felügyelet mellett (n=12). Az erőltetett futást végző állatok esetén ügyeltünk a testmozgás intenzitásának fokozatos emelésére, hogy elkerüljük az esetleges sérüléseket. Először 5 percig a kikapcsolt állapotú futókerékbe helyeztük őket, hogy megismerkedjenek az eszközzel, majd a készüléket 5 m/perc sebességre állítottuk. Minden nap 0,5 m/perccel növeltük a sebességet, amíg el nem értük az ajánlott 13 m/percet. Amikor az állatok ezt teljesítették, elkezdtük növelni az időt: 1 perccel kezdtük (amíg csak a sebességet növeltük, az állatok csak 1 percig futottak), és a cél az volt, hogy minden nap 1 perccel növeljük a futási időtartamot, amíg el nem érjük a kívánt 20 percet. Minden tréninget naponta egyszer, a reggeli órákban végeztünk el (az állatok számára ez éjszakai időszak kezdete volt).

2.3. Western blot

Mindkét kísérlet lezárása után az állatok szemében lezajló fehérje-expressziós változások feltárása érdekében western blot vizsgálatot végeztünk. Az állatok életének humánus kioltása generál anesztetikum túladagolásával történt. Ezt követően eltávolítottuk a szemgolyókat a szemüregből és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk (n=5 csoportonként). A fehérjefrakciók kinyeréséhez a szemgolyókat porrá őröltük és elegyítettük homogenizáló pufferrel, majd az oldatot késes diszpergátorral tovább homogenizáltuk. Az elegyet 2000 rpm fordulatszámon, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk, majd leszívtuk a felülúszót, amely tartalmazta a citoszolikus és mitokondriális frakciókat. A fennmaradó pellet tartalmazta a sejtmagi frakciót, ezt feloldottuk TritonX 100 detergenst tartalmazó homogenizáló oldatban és 1 órán keresztül jégen inkubáltuk. Ezt követően ismét 10 percig centrifugáltuk a nukleáris frakciót tartalmazó elegyet (14 000 rpm, 4 °C), majd a felülúszóval nyertük ki a sejtmagi fehérjéket tartalmazó oldatot. A citoszol- és mitokondrium-tartalmú felülúszót 20 percig centrifugáltuk (10 000 fordulat/perc 4 °C-on). A felülúszó leszívásával nyertük ki a citoplazmatikus fehérjéket tartalmazó frakciót. Az egyes frakciók felülúszóinak 10-10 µl-éből spektrofotométerrel megállapítottuk a teljes fehérjekoncentrációt BCA módszer segítségével, mely után a felülúszók fennmaradó részét Laemmli puffer 1:1 arányban történő hozzáadásával és 5 perc forralással készítettük elő SDS-poliakrilamid gélelektroforézisre. A szem homogenizátum fehérjéit 12%-os poliakrilamid gélen választottuk el molekulatömegük alapján. A poliakrilamid gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránok szabad kötőhelyeinek blokkolása 3%-os BSA

oldatban történt, majd primer antitesteket tartalmazó TBST oldatba helyeztük őket és egy éjszakán át inkubáltuk folyamatos mozgás mellett.

Az első kísérletünkben használt primer antitestek: anti-hisztin H3 rekombináns nyúl monoklonális antitest; anti-béta-aktin egér monoklonális antitest; anti-MMP9 nyúl poliklonális antitest; anti-PARP1 poliklonális antitest; GFAP nyúl poliklonális antitest; anti-NFκB p65 nyúl poliklonális antitest; anti-HSP70 egér monoklonális antitest.

A második kísérletünkben alkalmazott antitestek: anti-hisztin H3 rekombináns nyúl monoklonális antitest; anti-béta-aktin egér monoklonális antitest; anti-BDNF nyúl monoklonális antitest; anti-MAOB monoklonális antitest; GFAP nyúl poliklonális antitest; anti-SIRT6 nyúl monoklonális antitest; anti-PARP1 poliklonális antitest; anti-NFκB p65 nyúl poliklonális antitest; anti-SOD1 nyúl poliklonális antitest; anti-HSP70 egér monoklonális antitest.

Másnap reggel 3X10 percig tartó TBST-vel történő mosási lépésekkel távolítottuk el a membránokról az éjszaka folyamán be nem kötődött primer antitesteket, majd torna-peroxidáz enzimmel konjugált másodlagos (nyúl vagy egér ellenes) antitesteket tartalmazó oldatban inkubáltuk a membránt további 45 percig. Az inkubáció végén újabb mosási lépések következtek. A keresett fehérjék láthatóvá tételéhez ECL™ Prime™ western blot előhívó folyadékot és LI-COR C-DiGit® blot szkennert használtunk. A szkennert a kemilumineszcens fényreakció intenzitását detektálva teszi láthatóvá a csoportok közötti különbségeket. Az elkészült blotok kiértékelését az ImageJ szoftverrel végeztük, amellyel először elvégeztük a háttérhez történő normalizálást és egy háztartási fehérjére (hisztin H3 vagy béta-aktin) való standardizálást. Minden kezelési csoportból fehérjénként 5 állat 3 db Western blot eredményét analizáltuk.

2.4. Szövetten

A patkányok humánus gyógyszeres eutanáziája után a szemgolyókat (n=5/csoport) óvatosan kimetszettük a szemüregből, majd szaruhártya felső részét egy ligatura behelyezésével megjelöltük a későbbi pozícionálás céljából. A bulbusokba egy vékony tű segítségével paraformaldehidet fecskendeztünk, hogy biztosítsuk a szem belső részének megfelelő fixálását. Ezt követően a szemgolyókat 24 órára paraformaldehid-oldatba helyeztük. Másnap a szaruhártyákon bemetszést ejtettünk és a szemeket folyó víz alatt mostuk 1 órán keresztül a PFA megfelelő kimosásának érdekében. Ezután a mintákat 70%-os alkoholba helyeztük. Következő lépésként a mintákat dehidráltuk (70%, 90%, 100% etanol), majd derítettük xilollal és végül paraffinba ágyasztuk. Az így létrehozott paraffin blokkokból mikrotómmal 4 μm

metszeteket készítettünk. A szegolyók pozíciója minden esetben megegyező volt: a szegolyók metszését frontális irányból kezdtük el, a behelyezett ligatúra a blokk felső szélével merőleges szöget zárt be (ligatúrát eltávolítottuk a pozicionálás után). A szövettani analízist a retina hátsó-alsó szegmensében található vakfolt-közeli metszeten végeztük el. A metszeteket deparaffinizáltuk, majd rehidratáltuk leszálló alkoholsorral, ezt követően hematoxilín-eozinnal (H & E) festettük. Ennek első lépéseként a lemezeket 10 percig hematoxilinnel festettük, majd 10 percig folyó vízben mostuk, mialatt a metszetek kékre színeződtek. Ezt követte egy 5 percig tartó festés eozinnal. A képeket a retina alsó látóideg közeli részéről 40x objektíven keresztül Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal készítettük. A rögzített képek elemzését és a retinavastagság mérését a Nikon NIS-Elements BR (Ver5.41.00) mikroszkópos szoftverrel végeztük el.

2.5. Statisztika

A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism szoftvert (9.1.2-es verzió) használtunk. A Gauss-eloszlást Shapiro-Wilk normalitástesztel értékeltük. A normál eloszlású adatokat egyutas varianciaanalízissel (ANOVA), míg a nem normál eloszlású adatokat nem-parametrikus Kruskal–Wallis teszttel analizáltuk. A csoportértékek különböző időpontokban történő elemzése esetén kétutas varianciaanalízist alkalmaztunk. Az összehasonlítást akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a valószínűségi értékek 0,05-nél kisebbek voltak ($p < 0.05$). A szignifikancia szintjét a következőképpen jeleztük: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; és **** $p < 0,0001$. Az összes adatot átlag \pm az átlag standard hibája (SEM) formátumban adtuk meg.

3. Eredmények

3.1. A DMT és harmalin hatásának vizsgálata a szem iszkémia-reperfúziós károsodásában

3.1.1. A szem ultrahang vizsgálata

A retina artériás véráramlását, amelyet Color és PW (pulse wave) Doppler echográfiával értékeltünk, helyreállt az iszkémiás periódus után. A ciliáris artériák csúcs véráramlási sebessége 100 és 300 mm/s között változott mind az alap-, mind a reperfúzió utáni fázisokban, ami azt mutatja, hogy a reperfúzió teljes volt a sérülés után.

3.1.2. Elektroretinográfia

A retinakárosodás mértékének megítélésére a kezelési csoportokat az egészséges kontroll (EK) (vivőanyaggal kezelt, nem iszkémiás) csoport eredményéhez viszonyítottuk és százalékos arányban adtuk meg. A legmagasabb százalékos értékeket a harmalinnal kezelt állatok csoportjában figyeltük meg: itt az a-hullámokat $42,92 \pm 1,35$, míg a b-hullámokat $35,38 \pm 0,89$ százalékban határoztuk meg (az egészséges kontroll 100%-os értékéhez viszonyítva), mindkettő szignifikánsan meghaladta ($p < 0,0001$) a kezeletlen (vivőanyaggal kezelt) iszkémiás csoport (BK = beteg kontroll) a- és b-hullám értékeit ($29,49 \pm 0,79$ és $20,08 \pm 0,45$) és DMT és harmalin kezelt csoport (DHK) értékeit ($22,76 \pm 0,52$ és $13,82 \pm 0,24$). A DHK csoportban az a- és b-hullámok százalékos értéke nem érte el a BK állatok értékét és szignifikáns különbség volt kimutatható ($22,76 \pm 0,52$ és $13,82 \pm 0,24$ vs. $29,49 \pm 0,79$ és $20,08 \pm 0,45$; $p < 0,0001$).

3.1.3. Western Blot

A western blot analízis során több olyan fehérje kifejeződését vizsgáltuk a szemben, amelyek fontosak a sejthalálban (PARP1), a gyulladásban (NF κ B, GFAP), a szöveti pusztulásban és átalakulásban (MMP9) és a sejtek homeosztázisának fenntartásában (HSP70). Minden kezelési csoportból 5 állat fehérjénként 3-szor megismételt western blot eredményét átlagoltuk. A kapott eredmények tehát csoportátlagok, melyet a standardizált-normalizált pixelsűrűség meghatározásával, majd statisztikai analízisével kaptunk meg.

A Western blot eredményei alapján a GFAP expressziós profilja szignifikánsan különbözött az EK és a DHK csoportok között ($70,59 \pm 8,879$ vs. $123,0 \pm 17,56$; $p < 0,05$). Ezzel szemben nem volt statisztikailag szignifikáns különbség az EK és a HK ($70,59 \pm 8,879$ vs. $97,20 \pm 10,16$; $p > 0,05$) valamint az EK és a BK csoportok között ($70,59 \pm 8,879$ vs. $97,93 \pm 6,342$; $p > 0,05$).

A HSP70 fehérje expressziója is különbségeket mutatott a kezelési csoportok között. Szignifikáns eltérést találtunk az EK és a DHK csoportok között, valamint a HK és a DHK csoportok között is ($122,6 \pm 8,638$ vs. $87,72 \pm 7,993$, $p < 0,05$ és $120,7 \pm 10,92$ vs. $87,72 \pm$

7,993, $p < 0,05$, az EK vs. DHK, valamint a HK vs. DHK csoportok esetében). Bár a BK csoport látszólag alacsonyabb értéket mutatott ($100,9 \pm 7,191$), mint az egészséges kezeletlen csoport, ez a különbség nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. Az EK és a HK csoportok között nem volt statisztikailag kimutatható szignifikáns különbség ($p > 0,05$).

Az MMP9 esetében a fehérjék szintje ellentétesen változott a HSP70-hez viszonyítva. Szignifikáns eltérést tapasztaltunk az EK és a DHK csoportok, valamint a HK és a DHK csoportok összehasonlításában ($16,11 \pm 8,909$ vs. $78,08 \pm 11,85$, $p < 0,05$ és $19,79 \pm 9,925$ vs. $78,08 \pm 11,85$, $p < 0,05$, az EK vs. DHK, valamint a HK vs. DHK csoportok esetében). A fehérjeszint alacsonyabb volt az EK és a HK csoportokban, míg növekedett a BK és a DHK csoportokban. Az EK és a HK csoportok MMP9 expressziója hasonlóan alacsony volt, közöttük szignifikáns különbség nem volt kimutatható, valamint a látszólag magasabb MMP9 expressziót mutató BK csoport értéke sem tért el szignifikánsan ($16,11 \pm 8,909$, $19,79 \pm 9,925$ és $46,30 \pm 15,06$ az EK, HK és BK csoportok esetében; $p > 0,05$ mindegyik összehasonlításban).

Hasonló tendenciát figyeltünk meg az NF κ B fehérjeexpressziós profiljában is a western blot analízis alapján: az NF κ B p65 fehérje esetében a BK csoport szignifikánsan különbözött mind az EK, mind a HK csoportoktól ($53,21 \pm 6,409$ vs. $3,350 \pm 1,850$, $p < 0,0001$, és $53,21 \pm 6,409$ vs. $19,19 \pm 7,140$, $p < 0,01$, a BK vs. EK, valamint a BK vs. HK kezelt csoportok esetében). A DHK csoport NF κ B p65 szintjei szignifikánsan magasabbak voltak mind a HK, mind az EK csoportok szintjeinél ($40,19 \pm 6,864$ vs. $19,19 \pm 7,140$, $p < 0,05$ és $40,19 \pm 6,864$ vs. $3,350 \pm 1,850$, $p < 0,001$ a DHK vs. HK és a DHK vs. EK csoportok esetében). Nem volt statisztikai különbség az EK és a HK ($3,350 \pm 1,850$ vs. $19,19 \pm 7,140$) valamint a BK és DHK ($53,21 \pm 6,409$ vs. $40,19 \pm 6,864$) csoportok között sem.

Hasonlóképpen, a poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) 1 fehérje szintjei is magasabbak voltak a BK és a DHK csoportokban ($52,47 \pm 9,597$ és $73,26 \pm 19,42$), míg az EK és a HK csoportokban alacsonyabbak voltak ($11,22 \pm 6,145$ és $17,41 \pm 4,640$). Nem voltak statisztikailag szignifikáns különbségek az előbb említett csoportpárok között ($p > 0,05$ mind a BK vs. DHK, mind az EK vs. HK összehasonlításokban). Ezzel ellentétben a különbségek szignifikánsnak bizonyultak az EK és a BK ($p < 0,05$), a BK vs. HK ($p < 0,05$), a HK vs. DHK ($p < 0,01$), valamint a DHK vs. EK ($p < 0,01$) összehasonlításokban.

3.1.4. Szövettan

A hisztológiai eredmények alapján jelentős eltérések voltak a teljes retina vastagságban a különböző csoportok között. A kontrollcsoport (BK) esetében az iszkémia-reperfúziós károsodást szenvedett retina vastagsága szignifikánsan csökkent a megfelelő nem-iszkémiás

(EK) értékhez képest ($106,2 \pm 2,608 \mu\text{m}$ vs. $147,0 \pm 5,394 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$). Ugyanez a szignifikáns különbség figyelhető meg a két kezelt csoportban is: az I/R károsodott retina vastagsága csökkent a nem-izkémias értékekhez képest ($108,5 \pm 1,716 \mu\text{m}$ vs. $138,2 \pm 4,382 \mu\text{m}$, illetve $122,5 \pm 3,267 \mu\text{m}$ vs. $150,6 \pm 6,283 \mu\text{m}$ a DHK és a HK csoportok esetében; $p < 0,0001$ mindkét összehasonlításban). Ha összehasonlítjuk a különböző kezelési csoportok nem-izkémias értékeit, nem tapasztalható szignifikáns eltérés közöttük ($138,2 \pm 4,382$ vs. $150,6 \pm 6,283$ vs. $147,0 \pm 5,394 \mu\text{m}$ a DHK, a HK és a EK esetében). Az izkémias csoportok retinavastagságai között szignifikáns különbségeket tapasztaltunk: a HK állatok retinavastagsága szignifikánsan nagyobb volt, mint a DHK és BK csoportokban mért átlag ($122,5 \pm 3,267 \mu\text{m}$ vs. $106,2 \pm 2,608 \mu\text{m}$ és $108,5 \pm 1,716 \mu\text{m}$ a HK vs. BK és a DHK csoportok esetében; $p < 0,05$ mindkét összehasonlításban). Nem voltak statisztikailag jelentős eltérés a DHK és a BK csoport értékei között ($106,2 \pm 2,608 \mu\text{m}$ vs. $108,5 \pm 1,716 \mu\text{m}$ a DHK és BK csoport esetében; $p > 0,05$).

3.2. A rendszeres testmozgás dózis-függő hatásának vizsgálata öregedő patkánymodellen

3.2.1. Elektroretinográfiás eredmények

A fiatal (nem futó) kontroll csoport (FK) csoport szignifikánsan magasabb a-hullám amplitúdókat mutatott az idősebb csoportokhoz képest szkotopiás mérés esetén. A három idős eltérő aktivitású csoport a-hullám amplitúdói között nem volt szignifikáns különbség, kivéve magas, $25,000 \text{ mcd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ fényintenzitás mellett, ahol az idős, erőltetett futó (IEF) csoportban szignifikánsan alacsonyabb a-hullám amplitúdó volt megfigyelhető.

Az a-hullám implicit idők tekintetében elmondhatjuk, hogy alacsony ($10 \text{ mcd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$) és kifejezetten magas ($10000, 30000 \text{ mcd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$) fényintenzitás esetén láthatunk kifejezett különbséget a csoportok között. Az a-hullámok implicit ideje jelentősen meghosszabbodott az IEF csoportban, az FK és a többi idős csoporthoz viszonyítva. Magas fényintenzitás mellett nem csak az erőltetett futó csoportban, hanem az idős inaktív kontroll (IIK) valamint az idős rekreációs futó (IRF) csoportban is láthatunk implicit idő megnyúlást a fiatal kontroll csoporthoz képest.

Alacsony intenzitású szkotopikus körülmények között az FK csoport b-hullám amplitúdói szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint az idősebb csoportoké. Ez a különbség csökkent, és végül átfordult a magasabb fényintenzitás esetén és a fotopikus mérések során. Az idősebb csoportok között az IRF csoport következetesen magasabb b-hullám amplitúdókat mutatott

mint az IIK csoport és az IEF csoport a szkotopikus mérések során. Ez a különbség nem volt látható fényadaptáció után, fotopikus mérések esetén.

A fiatal kontroll csoport b-hullám implicit ideje szignifikánsan rövidebb volt, mint az idősebb csoportoké.

3.2.2. A második kísérlet western blot eredményei

Szignifikánsan megemelkedett MAO-B szintet detektáltunk az IIK és az IEF csoportokban az FK és az IRF csoportokhoz képest ($60,08 \pm 7,314$ és $69,17 \pm 5,032$ vs. $23,39 \pm 4,938$ és $35,98 \pm 6,74$, $p < 0,05$). Az FK és IRF csoportok eredményei között nem volt szignifikáns különbség ($23,39 \pm 4,938$ vs. $35,98 \pm 6,74$; $p > 0,05$).

A GFAP fehérje expressziója jelentősen emelkedett volt az IIK és az IEF csoportokban az FK csoporthoz képest ($107,9 \pm 7,929$ és $119,8 \pm 8,034$ vs. $62,7 \pm 6,644$; $p < 0,001$ és $p < 0,0001$), míg az IRF csoport GFAP szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az IEF csoporté ($89,05 \pm 6,185$ vs. $119,8 \pm 8,034$; $p < 0,05$).

Jelentősen alacsonyabb SIRT6 expressziót figyeltünk meg az IIK és az IEF csoportokban az FK csoporthoz képest ($103,8 \pm 6,455$ és $89,51 \pm 5,9$ vs. $134,6 \pm 10,88$; $p < 0,01$ és $p < 0,0001$). Az IRF csoport SIRT6 szintje közelebb állt az FK csoportéhoz ($122,2 \pm 8,278$ vs. $134,6 \pm 10,88$; $p > 0,05$).

A BDNF expressziója jelentősen csökkent az IEF csoportban az FK csoporthoz képest ($27,01 \pm 4,476$ vs. $49,73 \pm 6,539$; $p < 0,05$). Az IRF csoport viszont nem mutatott szignifikáns különbségeket sem az FK, sem az IIK csoportokhoz képest ($38,54 \pm 4,392$ vs. $49,73 \pm 6,539$ és $38,36 \pm 5,65$; $p > 0,05$).

A PARP1 expressziója szignifikánsan magasabb volt a testmozgást végző idős csoportok (IRF és IEF), mint az FK állatok szemében ($91,34 \pm 16,52$, $101,9 \pm 15,01$ vs. $42,57 \pm 5,45$, $p < 0,05$), míg az IIK csoport eredménye ($64,61 \pm 10,92$) nem különbözött tőle.

Második kísérletünkben az NFκB expresszió hasonló mintázatot mutatott, mint a PARP1: az idős csoportok között nem volt szignifikáns különbség, azonban az FK csoporthoz képest az idős állatokban szignifikánsan magasabb volt az NFκB kifejeződése ($114,9 \pm 12,92$, $124,1 \pm 13,93$, $91,47 \pm 10,58$ vs. $12,59 \pm 4,06$, IIK, IRF, IEF vs. FK csoportok összehasonlítása, $p < 0,0001$).

Megvizsgáltuk a SOD1 illetve a HSP70 fehérjék expresszióját is a szemben. A kísérlet eredménye alapján sem az életkor, sem a testmozgás nem befolyásolta ezen fehérjék expresszióját a szemben: a csoportok között nem volt kimutatható szignifikáns eltérés.

4.2.3. Szövettan

Hisztológiai elemzésünk során a retina vastagságának meghatározásához a belső határmembrán (membrana limitans interna) és a külső határmembrán (membrana limitans externa) közötti távolságot mértük. A szakirodalmi adatokkal összehangban IIK csoportban a retina vastagsága jelentősen csökkent ($44,25 \pm 1,813 \mu\text{m}$) a többi kísérleti csoporthoz képest, ami az öregedésnek a retina szerkezetére gyakorolt hatását jelzi ($p < 0,0001$).

Ezzel szemben, a két eltérő intenzitású mozgást végző csoport összehasonlításakor nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a retina vastagságában, továbbá nem különböztek szignifikánsan az FK csoportban mért átlagtól. AZ FK csoport retina vastagsága $68,32 \pm 3,282$, az IRF csoportban mért átlag $62,95 \pm 3,056 \mu\text{m}$, az IEF csoportban pedig $65,77 \pm 3,013 \mu\text{m}$ volt.

4. Megbeszélés

Az öregedés egy elkerülhetetlen és visszafordíthatatlan folyamat, amely az egyén szervezetében típusos változásokat indít el a biológiai funkciók és a fizikai megjelenés terén is. A kor előrehaladtával megnő a szembetegségek incidenciája. Munkacsoportunk fő célkitűzése olyan preventív terápiás lehetőség feltárása volt, amellyel megelőzhetővé vagy késleltethetővé válnának az időskorral társuló szembetegségek. Ezen intervenciók hatékonyságát funkcionális, morfológiai és molekuláris vizsgálatok elvégzésével támasztottuk alá. Emellett olyan molekuláris útvonalak feltárását terveztük, amelyek farmakológiai befolyásolása terápiás hatással bírhat az öregedéssel társuló kórállapotok kezelésében.

Első kísérletünkben a tradicionális ayahuasca főzet két komponensének a DMT-nek és a harmalinnak a hatásait vizsgáltuk a szem iszkémia-reperfúziós károsodásában.

Első kísérletünk eredménye azt mutatja, hogy a harmalinnal kezelt (HK) állatoknál mérhető a legnagyobb a-és b-hullám amplitúdó valamint ebben a csoportban volt a legmegőrzöttebb a retina vastagsága az I/R csoportok között. Ezzel szemben DMT és a harmalin (DHK csoport) együttes adása káros hatással volt a látószervre, az a-és b-hullámok amplitúdója nem érte el a kezeletlen iszkémiás állatoknál meghatározott csoportátlagot. Hogy magyarázatot találjunk erre a meglepő eredményre több olyan fehérje kifejeződését vizsgáltuk a szemben, amelyeknek fontos szerepe van a sejthalálban (PARP1), a gyulladásban (NF κ B, GFAP), a szöveti pusztulásban és átalakulásban (MMP9) és a sejtek homeosztázisának fenntartásában (HSP70).

A poli-ADP-ribóz-polimeráz 1 (PARP1), fontos szabályozója számos sejtfunkciónak, mint amilyenek a sejtproliferáció, differenciálódás, sejthalál, a gyulladási válasz és a mitokondriális funkció. Habár a PARP1 fokozott expressziója protektív faktor lehet pl. öregedésben a DNS-javításban betöltött szerepe miatt, túlműködése egy speciális programozott sejthaláltípushoz vezethet, amely - több tanulmány szerint - jelentős szerepet játszhat a retina károsodásában, az örökletes retinabetegségekben, az időskori makuladegenerációban és a szem iszkémia-reperfúziós károsodásában. Vizsgálatunkban a HK csökkentette a PARP1-expressziót a szemben a BK és a DHK csoportokhoz képest, ami hozzájárulhat a harmalin retinoprotektív hatásához. Hasonlóképpen, számos publikációban beszámoltak arról, hogy a PARP1 inhibíció csökkenti a mikroglia aktivációt és a következményes gyulladási választ, ezzel mérsékelve a neuronkárosodást.

Az NF κ B útvonal aktivációja sorsdöntő a sejtek túlélése szempontjából, mivel részt vesz az apoptózis, a proliferáció, sejtülélés szabályozásában. Az NF κ B útvonal ezen hatások miatt fontos szerepet játszik számos neurodegeneratív betegség patomechanizmusában. A

szakirodalmi adatoknak megfelelően az I/R károsodás megnövelte az NFκB p65 alegység szintjét a szemben kísérletünkben is. A harmalin megakadályozta a NFκB p65 fokozott expresszióját, ami arra utalhat, hogy a harmalin mérsékelte az I/R által kiváltott gyulladási kaszkádot. A gyulladáscsökkentő hatás retinoprotektív lehet, melyet az ERG vizsgálat is alátámasztott a HK csoportban. Meglepő módon ha a DMT-t harmalinnal kombináltuk (DHK), akkor nem volt megfigyelhető csökkenés az NFκB expresszióban a beteg kontroll csoporthoz képest, ami arra utal, hogy a DMT együttes adása ellensúlyozta a harmalin protektív potenciálját. Ennek oka lehet a DHK csoportban megfigyelt magasabb PARP1 szint a HK és a BK csoportokhoz képest, bár ez utóbbi összehasonlítás nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget.

Az MMP-k felelősek az extracelluláris mátrix lebontásáért és a szöveti remodellingért. A belső szemnyomás extrém fokú megemelkedése esetén (pl. glaukómában), amely iszkémiához vezet a szemben, az MMP-k nagymértékű expresszió-fokozódását mutatták ki a bulbus számos szövetében. Kísérletünkben a harmalin kezelés mérsékelni tudta az I/R károsodás-indukálta MMP9 overexpressziót, így a HK csoportban az egészséges kontrollhoz hasonló MMP9 szintet mértünk. Ezzel szemben a DHK csoportban az MMP9-kifejeződése szignifikánsan magasabb volt, mint a HK és EK csoportban, ami egybevet az NFκB és PARP1 fehérjék expressziós mintázatával a korábban leírtak alapján.

A GFAP az asztrocita aktiváció széles körben használt indikátora, és kimutatták hogy a központi idegrendszeri patológiás állapotokban megnő az expressziója. Egy tanulmány szerint a GFAP gátlása protektív a fotoreceptorokra nézve retinaleválás esetén. Első kísérletünkben a GFAP expresszió nem változott szignifikánsan a HK csoportban a BK és az EK állatokhoz képest, viszont a DMT és a harmalin együttes adása valószínűleg fokozta az asztrocita sejtek aktivitását, ami szignifikánsan emelkedett GFAP expressziót eredményezett az állatok szemében.

A 70 kDa molekulatömegű hő sokkfehérje (Hsp70) a fehérjék és fehérjekomplexek fiziológiai térszerkezetének megőrzéséért felelős. A Hsp70 indukciójának számos terápiás előnye van: neuroprotektív hatást fejthet ki, gátolva a gyulladáskeltő citokinek felszabadulását és az asztrogliózist. A Hsp70 gyulladáscsökkentő tulajdonsága sokrétű, több molekuláris útvonalat érint. Gátolja az NFκB, az MMP-k és a reaktív oxigéngyökök termelését. Első kísérletünk western blot eredményei alapján a DMT a Hsp70 esetén is előnytelenül befolyásolta a fehérjeexpressziót. A DHK csoportban a Hsp70 szintje szignifikánsan alacsonyabb volt mint az EK csoport állataiban. A harmalinnal kezelt állatok szemében az egészséges kontrollhoz hasonló, szignifikánsan nem különböző Hsp70 szintet detektáltunk.

Első kísérletünk elektroretinográfiás eredményei összhangban vannak a western blot analízis során észlelt változásokkal. A HK csoportban voltak a legmagasabbak az a- és b-hullámok amplitúdói az iszkémiás csoportok között, ami a MAO-A gátló harmalin védő hatását jelzi. A retinoprotektív hatás molekuláris hátterében a „chaperon” Hsp70 fokozott kifejeződése és a PARP1, NFκB és MMP9 csökkent expressziója állhat, amelyek az apoptózis útvonal, a gyulladási válasz és a szöveti destrukció döntő résztvevői. A DMT azonban ellensúlyozta ezt a védőhatást és retinakárosító hatása igazolódott harmalinnal együttesen adva.

A szövettani vizsgálat eredményei is alátámasztották a harmalin védő hatását a szemben. Az iszkémiás csoportok közül a harmalinnal kezelt állatoknál volt a legmegőrzöttebb a retina rétegvastagsága, amely szignifikánsan meghaladta BK és DHK csoportok átlagát.

A szerotonin (5-HT) szerepe vitatott a retina degeneratív betegségeiben. A MAO-A enzim szisztémás gátlása az 5-HT és a noradrenalin csökkent lebontásához vezet. A DMT molekuláris szerkezete rendkívül hasonlít a szerotoninéhoz, következésképpen képes aktiválni annak receptorait is, elsősorban az 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} és 5-HT_{2C} szubtypusokat. Az 5-HT_{1A} receptor agonisták neuroprotektív hatással rendelkeznek, melyet igazoltak központi idegrendszeri iszkémia, traumás agysérülés, excitotoxicitás és Parkinson-kór állatmodelljeiben. Védő hatását fény által kiváltott retinakárosodásban is bizonyították. Az 5-HT_{1A} receptor stimuláció központi idegrendszerben és retinában kifejtett védőhatásának hátterében álló mechanizmusok nem teljesen ismertek: fokozhatja az antioxidáns enzimek és az antiapoptotikus fehérjék szintézisét.

A MAO-A gátló harmalin és a DMT együttes alkalmazása az 5-HT receptorok túlzott stimulációjához vezethet. Kimutatták, hogy az 5-HT túlermelődése hozzájárulhat a szívbillentyű- és a koszorúér-betegség, a perifériás érbetegségek és a diabéteszes nefropátia kialakulásához. Egy 2021-ben megjelent publikációban leírták, hogy a vesét érintő I/R károsodás esetén megnő a szerotonin, az 5-HT_{2A} receptorok és a MAO-A expressziója. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az 5-HT és annak metabolizmusa is fontos az I/R károsodás folyamatában. Továbbá az 5-HT_{2A} receptor gátlása a MAO-A enzim expressziójának csökkenéséhez vezetett, és mérsékelte az oxidatív károsodást. A fokozott oxigénigények termelés az 5-HT MAO-A általi oxidatív lebontásának lehet a mellékterméke, mely folyamat megelőzhető a szerotonin szintézis csökkentésével, az 5-HT_{2A} receptorok blokkolásával, valamint a MAO-A enzim gátlásával. Fényártalom okozta retinakárosodás esetén BALB/c egerekben az 5-HT_{2A} receptor antagonistá intraperitoneális alkalmazásával megőrizhető volt a retina vastagsága és integritása. Az 5-HT_{2C} receptor aktivációja szintén hozzájárulhat az I/R

károsodáshoz: izolált retinális ganglionsejtekben az 5-HT_{2C} receptor blokkolása védő hatású volt a glutamát túlstimuláció által kiváltott sejthalállal szemben.

Az I/R károsodás gyulladáshoz vezet, amely sejthalált okozhat szöveti pusztulást idézve elő a szemben, különösen a retinában. Eredményeink alapján a MAO-A enzim-inhibitor harmalin ellensúlyozza az I/R-hez társuló patológiás folyamatokat. A szerotonin-központú elméletre ragaszkodva feltételezzük, hogy a MAO-A gátlás az oxidatív deamináció (5-HT lebontás) gátlásával csökkentheti az iszkémia utáni oxidatív stresszt. Tekintettel arra, hogy a szakirodalomban ellentmondásos adatok vannak az 5-HT patológiás állapotokban betöltött szerepéről, feltételezzük, hogy a szemben az 5-HT fiziológiai és patológiás koncentrációja között egy törékeny egyensúly lehet, amelyet a DMT és a harmalin együttes alkalmazása felborított. A HK csoportban a megnövekedett 5-HT koncentráció nem érte el a küszöbértéket, így inkább a szerotonin és annak csökkent metabolizmusa (alacsonyabb oxidatív stressz) védő hatásokat aktivált a szemben. Ezzel szemben a DHK csoportban a 5-HT agonista DMT és a lebontásában gátolt endogén szerotonin együttesen szerotonin-túlstimulációhoz vezethetett. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a szelektív szerotonin-visszavétel-gátlók (SSRI) - melyek megnövelik a központi idegrendszerben a szerotonin szintjét - rontják a látás minőségét, valamint a retinális pigment epitélium (RPE) atrófiáját eredményezik azáltal, hogy a foveális és a perifoveális makuláris ganglionsejt-komplex vastagságát csökkentik. A DMT nagy affinitással kapcsolódik az 5-HT_{2A} receptorokhoz, amelyek nagy számban lokalizálódnak az RPE-ben, és nagy denzitásban találhatóak a claustrumban, a látókéreghez kapcsolódó régióban. A DMT látószervre gyakorolt kedvezőtlen hatását az 5-HT_{2A} (túl)aktivációja közvetítheti. Ezenkívül a DMT gátolhatja a szerotonin transzportot (SERT), ami tovább növelheti az 5-HT koncentrációját a retinában.

Egy másik lehetséges magyarázat a DMT káros hatásaira a látószervben, hogy más receptoron is fejt ki hatást. Az ayahuasca komponenseinek hatását még nem vizsgálták sem a látószerven, sem retinasejteken ezért a szemben lokalizálódhat olyan receptor, amelyhez nagy affinitással kötődik a DMT és káros hatásokat közvetít. Egyik ilyen jelölt lehet a Sigma-2 (Sig-2R) receptor, amelynek a DMT bizonyítottan ligandja. A Sig-2R aktiválása sejthalált indukálhat, sőt, kulcsszerepe lehet a neurodegeneratív betegségekben is. A Sig-2R blokkolása protektív hatású iszkémia és fény-indukálta retinakárosodással szemben, amely megerősíti a receptor szerepét a degeneratív folyamatok patomechanizmusában.

A DMT ígéretes gyógyszerjelölt számos betegség, többek között a PTSD (poszttraumás stressz szindróma), a depresszió, az agy és a vese I/R károsodásának kezelésében. Első kísérletünk eredménye azonban arra hívja fel a figyelmet, hogy egy ígéretes gyógyszerjelölt

hatásait minden szervrendszeren alaposan fel kell tární az esetleges mellékhatások kivédése céljából. Ennek fényében a DMT hatásainak pontosabb felderítése szükséges a látószerven. A kísérlet váratlan nyeresége annak a felismerése, hogy a MAO-A inhibíció terápia potenciált rejt, melynek nagy szerepe lehet a jövőben a I/R károsodással összefüggő szembetegségek kivédésében és kezelésében.

A második kísérletben idős állatmodellen vizsgálatuk a testmozgás dóziszfüggő hatását a látószerven nagy hangsúlyt fektetve a szerkezeti és funkcionális aspektusokra, és az oxidatív stresszel, gyulladással és neuroprotekciónal kapcsolatos molekuláris markerekre. Az életkorral összefüggő retinális funkcióvesztés hatékonyan nyomon követhető az elektroretinográfia segítségével. Második kísérletünk eredménye összhangban van a szakirodalommal, miszerint az ERG paraméterek kedvezőtlen irányú változása előrejelzi a retina degenerációját az öregedés folyamata során. Eredményeink azt mutatják, hogy a rekreációs és az erőltetett testmozgás eltérő hatással van az idős Wistar patkányok látószervi állapotára, rávilágítva a fizikai aktivitás és a szemben zajló öregedés folyamata közötti bonyolult kölcsönhatásra. Igazoltuk, hogy az önkéntes fizikai aktivitás előnyösebb hatásokat közvetít az öregedő retinára mérsékelve annak funkcionális hanyatlását.

ERG elemzésünk jelentős különbségeket tárt fel az a-hullám amplitúdóiban a fiatal és idős patkányok között, ami arra utal, hogy az idős csoportokban csökkent a fotoreceptorok elektromos aktivitása vagy száma. Ez különösen alacsonyabb fényintenzitáznál volt nyilvánvaló, ahol elsősorban a pálcika típusú fotoreceptorok aktívak, amelyek a szkotopikus (gyenge fényviszonyok közötti) látásért felelősek. Az a-hullám amplitúdókban észlelt különbség magasabb fényintenzitás (kevert csap-pálcika válasz) mellett szkotopikus mérés során már nem volt szignifikáns, ami – a kiértékelésre vonatkozó szakirodalom alapján – arra utalhat, hogy a csapok állapota kevésbé érintett az öregedés folyamata során. Ezzel szemben az erőltetett testmozgásnak káros hatása lehet a csapokra, ugyanis fotopikus mérés során, amikor a csapok aktivitása dominál, az IEF csoportban szignifikánsan alacsonyabb a-hullám amplitúdókat detektáltunk.

A megnyúlt implicit idő a fotoreceptorok csökkent válaszkészségére utal. Az a-hullám esetén az implicit idő megnyúlását figyeltük meg az IEF csoportban, különösen nagyon alacsony és magas fényintenzitás mellett. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a pálcikák extrém alacsony fénysűrűség esetén ($10 \text{ mcd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$) az IEF csoportban nehezebben gerjeszthetők. A magas fénysűrűség esetén megjelenő implicit idő megnyúlás, pedig arra utalhat, hogy a megerőltető fizikai aktivitás káros hatással lehet a csapok működésére. Kevert pálcika-csap válasz esetén nem volt szignifikáns különbség az idős csoportok között.

A b-hullám elemzése további betekintést nyújtott az öregedés és a testmozgás retinális sejtekre gyakorolt hatásaira. Meglepő módon a fiatal állatoknál a szkotopikus mérések során, különösen alacsony fényintenzitás mellett (amikor a pálcikák aktívak) alacsonyabb b-hullám amplitúdókat mértünk. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a pálcikák érése lassabb, mint a csapoké. Ezt a megállapítást az is alátámasztja, hogy emelkedő fényintenzitás mellett, amikor a csapok is aktiválódnak a fiatal állatokban magasabb hullámamplitúdókat detektáltunk, mint az idős csoportokban. Az idős csoportok közül a rekreációs mozgást végző állatok teljesítettek a legjobban különösen a szkotopikus mérések során. Ez arra utal, hogy a szabadon választott edzés őrzi meg leghatékonyabban a retina sejtjeinek állapotát, különösen a pálcikák ingerületátvitelében résztvevő posztszinaptikus sejtek esetén.

Az a-hullámoknál tapasztalt tendenciával megegyezően a b-hullámok implicit ideje is megnyúlt az idős csoportokban a fiatal kontroll állatokhoz képest. Ez az implicit idő megnyúlás az a-hullámoknál tapasztalt eltéréssel ellentétben magasabb fényintenzitás mellett is fennmarad arra utalva, hogy a csapok és pálcikák posztszinaptikus útvonala is érintett az öregedés folyamatában, csökkentve azok válaszkészségét. Az idős csoportok közötti b-hullám implicit idők összehasonlítása során egyedi mintázat bontakozott ki. Rendhagyó módon a b-hullámok amplitúdójának mintázata, megegyezett az implicit idők esetén tapasztalttal. Szkotopikus körülmények között a rekreációs mozgást végző csoport implicit ideje jelentősen hosszabb volt (magasabb b-hullám amplitúdó mellett), ám ez a különbség a fényintenzitás növekedésével csökkent, és fotopikus körülmények között eltűnt míg az erőltetett testmozgást végző csoportban alacsonyabb implicit időket mértünk alacsonyabb hullámamplitúdók mellett szkotopikus mérések során alacsonyabb fényintenzitás mellett. Ez arra utalhat, hogy az IEF csoportban a jelátviteli útvonal egyszerűsödött, csökkenhetett a szinaptikus sejtek száma, amely így rövidebb implicit időt eredményezett. Ez a magyarázat összhangban azzal, hogy a b-hullám amplitúdók is csökkentek. A második kísérletünk komplex ERG eredményei világítanak rá arra, hogy a testmozgás szemre kifejtett hatása összetett és bonyolult. Adataink azt sugallják, hogy az önkéntes, rekreációs testmozgás pozitívabban hat a szem funkcionális állapotára, mint az erőltetett testmozgás idős életkorban.

Szakirodalmi adatok alapján, az öregedés folyamata fokozott sejtelhaláshoz vezet a retinában, ami a retina rétegvastagságának csökkenését eredményezi. Második kísérletünk eredménye összhangban volt a szakirodalomban leírtakkal. Jelentős rétegvastagság-csökkenést detektáltunk az idős inaktív kontroll (IIK) csoport állatainál. A testmozgás jelentőségére hívja fel a figyelmet kísérletünk eredménye, ugyanis a fizikai aktivitás, akár önkéntes, akár erőltetett formában, megelőzte a retina atrófiáját a fiatal kontroll (FK) csoportéhoz hasonló ideghártya

morfológiát eredményezve. A retinális vastagság megőrzése és a elektroretinogramon tapasztalt előnyös változások, különösen az önkéntes edzést végző csoportban, alátámasztják azt a hipotézisünket, hogy a fizikai aktivitás enyhítheti az öregedéssel járó retinális degeneráció különböző aspektusait. Ezek az eredmények összhangban vannak a meglévő szakirodalommal, amely hangsúlyozza a rendszeres testmozgás jótékony hatását a retinális egészségre, olyan mechanizmusokon keresztül, mint a trófikus faktorok fokozott termelése, az oxidatív károsodás és a gyulladás csökkentése, a javuló anyagcsere-funkciók, és a fokozott véráramlás a retina szövetében.

Második kísérletünk során célul tűztük ki, hogy feltárjuk a testmozgás által kiváltott molekuláris változásokat is a szemben. Ennek érdekében, és hogy magyarázatot találjunk az ERG és a szövettan eredményeire, több olyan fehérje expresszióját vizsgáltuk a szemben, amelyek fontos szerepet játszanak az oxidatív stresszben (MAO-B), a szöveti átalakulásban és gyulladásban (GFAP, NFκB), sejtfunciók szabályozásába (PARP1, NFκB) valamint a neuroprotektív folyamatokban (BDNF, SIRT6, SOD-1, HSP70).

A monoamin-oxidázok (MAO-A és B) a sejtek külső mitokondriális membránján helyezkednek el, és számos kulcsfontosságú neurotranszmittert metabolizálnak a központi idegrendszerben. A megnövekedett MAO-B expresszió az öregedés, neuroinflammatorikus és neurodegeneratív állapotok egyik fontos jellemzője: a neurotranszmitterek lebontása (oxidatív deaminálás) során aldehidek és H₂O₂ keletkezik, ami oxidatív károsodást és idegsejt-vesztést okozhat. Kísérletünkben a MAO-B kifejeződése szignifikánsan emelkedett az IIK és IEF csoportokban az FK és IRF csoportokhoz képest, míg nem volt különbség az FK és IRF csoportok között, ami azt jelenti, hogy a rekreációs futás képes volt megelőzni a MAO-B expresszió-fokozódását. Másrészt ez az eredmény azt is jelzi, hogy az intenzív fizikai terhelés fokozottabb oxidatív károsodást okozhat az idős patkányokban.

A megnövekedett MAO-B expresszió együtt járt a glia fibrilláris savas fehérje (GFAP) szintjének egyidejű növekedésével. A GFAP szintézise szignifikánsan növekedett az IIK és IEF csoportokban a fiatal állatokhoz képest, ami fokozott asztrocita aktivációra utalhat. A rekreációs fizikai aktivitás megakadályozta a GFAP túlzott kifejeződését.

Az életkorral összefüggő szabályozási változások, az oxidatív stressz, a gyulladás és a géinstabilitás sejtöregedéshez és apoptózishoz vezethetnek. Megvizsgáltuk a SIRT6 szintjét a szemben, amely a genomikus stabilitás kulcsszabályozója. Ez a citoprotektív fehérje oxidatív stressz alatt DNS védő és javító funkciókat aktivál. A SIRT6 deficiencia csökkent élettartamot és öregedésszerű fenotípust eredményezett rágcsálómodellekben. Kísérletünkben a SIRT6

kifejeződése szignifikánsan alacsonyabb volt az IIK és az IEF csoportokban az FK és az IRF csoportokhoz képest, ami az időskorban végzett megerőltető fizikai aktivitás káros hatását jelzi.

Hasonlóan a SIRT6 expresszióhoz, a BDNF szintje is csökkent az IEF csoportban a fiatal állatokhoz képest, ami a megerőltető testmozgás káros hatásaihoz hozzájárulhat. A BDNF egy neurotrofin, amely kulcsszerepet játszik a központi idegrendszer fejlődésében, ahol elősegíti az idegsejtek túlélését és differenciálódását. Idős életkorban a BDNF neuroprotektív szerepe bizonyított. Kimutatták, hogy védő hatást fejt ki a ganglionsejtekre, megvédve a dendritikus hálózatot és mérsékelve a látásvesztést a fokozott szemnyomás okozta károsodás esetén, amit glaukóma kísérletes állatmodellekben igazoltak. Emellett a BDNF retinoprotektívnek bizonyult a hipoxia és glükózmegvonás által okozott károsodás esetén is.

Második kísérletünkben a PARP1 és NF κ B fehérjék expressziós mintázata meglepő eredményt adott, amely látszólag ellentmond az első kísérlet alapján levont következtetéseknek.

Ismert, hogy a PARP1 magas szintje és túlzott aktivitása egy speciális sejthaláltípushoz, a PARthanatoshoz vezethet. A PARthanatos kulcsszerepet játszhat a retina károsodás patomechanizmusában, különösen az öröklött retinadegeneráció, az időskori makuladegeneráció és a szem iszkémia-reperfúziós károsodása esetén. Ezzel szemben a fokozott PARP1 aktivitást összefüggésbe hozták a hosszabb várható élettartammal. Fiziológiás szintű oxidatív stressz esetén kimutatták, hogy a PARP1 citoprotektív hatású. Ezen eredmények az sugallják, hogy a PARP1 aktivitás egyensúlya rendkívül törékeny a szervezetben, míg a fiziológiás öregedés során enyhén megemelkedett oxidatív stressz által kiváltott PARP1 expresszió-fokozódás valószínűleg védő hatású, addig a fokozott oxidatív stresszel és jelentős PARP1 aktivációval járó folyamatokban (pl. I/R károsodás) inkább a sejthalált- okozó hatás érvényesülhet. Második kísérletünkben a mérsékelt és erőltetett fizikai aktivitás egyaránt növelte a PARP1 expressziót a szemben a fiatal kontroll csoporthoz képest. A szövettani eredményeket figyelembe véve feltételezhetjük, hogy ebben az esetben a PARP1 fokozott szintézise protektív hatást közvetít.

Az NF κ B proapoptotikus és antiapoptotikus gének kifejeződését is módosítja, amelyek számos patológiás állapotban játszanak fontos szerepet. Ezért az NF- κ B a PARP1-hez hasonlóan egy „kétélű kard”: citoprotektív mechanizmusokat aktiválhat segítve a sejtek túlélését, valamint elősegítheti a sejthalált azáltal, hogy stimulálja a DNS-károsodásban résztvevő intracelluláris útvonalakat és a gyulladási választ. Szabályozása szorosan összefügg a PARP1-gyel és a SIRT6-tal. Kísérletünk western blot eredménye alapján mindhárom idős csoportban szignifikánsan magasabb NF κ B szint volt detektálható, mint az FK csoport esetében. A fizikai aktivitással nem csökkent szignifikánsan az NF κ B expresszió a szemben,

tehát a mozgás előnyös hatásai nem az NF κ B útvonal expressziójának csökkentése útján valósulnak meg.

A fokozott oxidatív stressz döntő lépés lehet a sejtek öregedésének indukciójában és fenntartásában, ami a sejtek károsodásához és pusztulásához vezet. Annak tisztázására, hogy a testmozgás milyen hatással van az antioxidáns enzimszisztemre, megvizsgáltuk a SOD1 és a HSP70 fehérjék szintjét is a szemben. Meglepő módon egyik fehérje esetén sem detektáltunk szignifikáns különbséget a csoportok között, ami arra utal, hogy az öregedés során nem csökken jelentősen ezen fehérjéknek az expressziója, valamint a rendszeres fizikai aktivitás nem ezen fehérjék indukciójával fejt ki protektív hatását.

Kísérleteink korlátja, hogy a szövettani analízis során csak a retina rétegvastagságát vizsgáltuk, de nem történt immunfluoreszcens analízis, mellyel egyes sejtrétegek és sejttípusok pontosan vizsgálhatók lettek volna. Így az ERG eredmények alapján nem eldönthető, hogy az amplitúdók méretének eltérései a sejtek számának, vagy aktivitásának változásának köszönhető. Tanulmányaink egy másik limitációja, hogy a western blot analízis során a teljes bulbuszt használtuk fel, nem izoláltuk a retinát, ezáltal a fehérjeexpressziós változások a teljes szemre értendők. A legújabb kutatások túlnyomó többsége kizárólag a retina működésére és fehérje-expressziós profiljára összpontosít, és csak néhány foglalkozik a szemgolyóval mint funkcionális egységgel. Számos szembetegség patomechanizmusában kulcsszereplő oxidatív stressz a retina mellett a szem többi részét is károsítja, mely hozzájárul a látásromláshoz. Ezért döntöttünk úgy, hogy az egész szemet vizsgáljuk, hogy feltárjuk annak pontos állapotát.

A fizikai inaktivitás a negyedik vezető halálok világszerte, a világ lakosságának majdnem egyharmada nem teljesíti az egészségügyi előnyök eléréséhez szükséges minimális ajánlást. A nem fertőző betegségekből eredő összes haláletet 6-10%-a világszerte a fizikai inaktivitásnak tulajdonítható, iszkémiás szívbetegség esetén ez az arány eléri a 30%-ot. Felismerve a testmozgás bizonyított szerepét az egészség megőrzésében, valamint a világszerte növekvő inaktivitás tendenciáját, az elmúlt évtizedben egyre nagyobb tudományos és kereskedelmi érdeklődés mutatkozott a bioaktív, szájon át bevihető vegyületek azonosítása iránt, amelyek utánozzák vagy felerősítik a testmozgás hatásait. Ezeket a vegyületeket „edzéspirulák”-nak vagy „edzémimetikumok”-nak nevezték el. Az „edzémimetikumok” létjogosultságát alátámasztja az a kutatás, ahol bizonyították, hogy edzett idős egerek vérében keringő faktorokat, idős inaktív egereknek beadva javítható volt azok fizikális és kognitív állapota, és fokozható volt a neurogenesis a KIR-ben. Ezek a farmakológiai szerek, ha pontos molekuláris célpontokkal és hatékony formulációval rendelkeznek, jelentős előnyöket kínálhatnak, különösen azok számára, akik alapbetegségük miatt nem képesek fizikai aktivitást végezni.

Kísérleteink eredménye alapján felmerül a lehetőség, hogy a monoamin-oxidáz enzimrendszer gátlószerei kitűnő hatóanyagai lehetnének a „edzés-*spiruláknak*”. A MAO-gátlókat már évtizedek óta alkalmazzák hangulati zavarok és Parkinson-kór terápiájában, azonban alkalmazásuk más neurodegeneratív kórképben is felmerült. Testmozgás hatására megemelkedik az 5-HT szintje a szervezetben, mely fokozza a neurogenézist a központi idegrendszerben. A MAO-A gátlással nem csak az oxidatív stressz csökkenthető a szemben, hanem a szerotonin koncentráció (testmozgás hatásához hasonlóan) is, mely neuroprotektív hatásokat közvetíthet. A MAO-B inhibitorok pedig gátolják az apoptózist azáltal, hogy stabilizálják a mitokondriális membránokat, anti-apoptotikus folyamatokat indukálnak, megakadályozzák a mitokondriális membrán permeabilitásának fokozódását és ezáltal a mitokondriumok duzzadását, valamint csökkentik a mitokondriális membránpotenciált és a citokróm C felszabadulását, így gátolva különböző apoptotikus folyamatokat.

5. Összegzés

Munkacsoportunk ezen két kísérletének eredményei rávilágítottak a monoamin-oxidáz enzimrendszer vitathatatlan szerepére iszkémia-reperfúziós károsodással és öregedéssel társuló szemészeti kórképekben lehetséges terápiás célpontot szolgáltatva ezen betegségek megelőzésében és kezelésében. Első kísérletünk eredményei alapján a MAO-A inhibitor harmalin mérsékelte az I/R károsodás mértékét a szemben az NFκB, a PARP1 és az MMP9 expressziójának csökkentésével, valamint a Hsp70 szint emelésével. A DMT és harmalin együttes adása azonban ezzel ellentétes, káros hatást fejtett ki a Sprague Dawley patkányok szemében. Második kísérletünkben bizonyítottuk, hogy idős Wistar patkányok esetén előnyösebb az alacsony intenzitású testmozgás a magas intenzitású formával szemben. Fokozott terhelés hatására nő az oxidatív stressz a szervezetben a MAO-B magas expressziója miatt, ami káros kaszkádot indíthat be. A MAO-B mellett nőtt a GFAP szintje is, ami fokozott gyulladásra utalhat. A protektív SIRT6 és BDNF kifejeződése szignifikánsan csökkent erőltetett testmozgást végző csoportban. A rekreációs futás ezzel ellentétesen hatott a látószerven, és a csoport átlagai összevethetők a fiatal kontroll állatok eredményeivel, ami arra utal, hogy az alacsony intenzitású fizikai aktivitás alkalmasabb az egészség megőrzésére idős életkorban.

6. Az értekezés új megállapításai

- A harmalin kezelés az ERG és a szövettani analízis eredményei alapján protektív hatású a szem iszkémia-reperfúziós károsodásával szemben fiatal hím Sprague Dawley patkánymodellen azáltal, hogy csökkentette az NF κ B, MMP9 és PARP1 fehérjék expresszióját
- A DMT és harmalin kombinációs kezelés az ERG és szövettani vizsgálatok eredményei alapján kedvezőtlen hatást fejtett ki a szem iszkémia-reperfúziós károsodása esetén hím Sprague Dawley patkányokon, melynek hátterében a megemelkedett GFAP, NF κ B, MMP9 és PARP1 expresszió, valamint a HSP70 chaperon fehérje csökkent kifejeződése állhat
- Idősödő korban (18 hónap) elkezdett önkéntes testmozgás kedvezőbben hat a szem funkcionális állapotára, mint az erőltetett testmozgás Wistar patkánymodellen
- Az erőltetett testmozgás csökkentette a protektív SIRT6 és BDNF expressziót, míg növelte az oxidatív stressz kiváltásában és a gyulladásban fontos MAO-B, a GFAP fehérjék kifejeződését az idős (24 hónapos) hím Wistar patkányok szemében, míg a rekreációs testmozgás ezzel ellentétes, előnyösebb hatásokat közvetített
- A 6 hónapig tartó rendszeres fizikai aktivitás, intenzitástól függetlenül, mérsékeli a retina rétegvastagság-csökkenését idős (24 hónapos) Wistar patkányok szemében

7. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/514/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szilágyi Anna
Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Táplálkozástudományi Doktori Program
MTMT azonosító: 10083831

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szilágyi, A., Takács, B., Szekeres, R., Tarjányi, V., Nagy, D., Priksz, D., Bombicz, M., Kiss, R., Szabó, A. M., Lehoczki, A., Gesztelyi, R., Juhász, B., Szilvássy, Z., Varga, B.: Effects of voluntary and forced physical exercise on the retinal health of aging Wistar rats. *GeroScience*. 46 (5), 4707-4728, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-024-01208-x>
IF: 5.3 (2023)
2. Szilágyi, A., Takács, B., Szekeres, R., Tarjányi, V., Bombicz, M., Priksz, D., Kovács, A. I., Juhász, B., Frecska, E., Szilvássy, Z., Varga, B.: Therapeutic Properties of Ayahuasca Components in Ischemia/Reperfusion Injury of the Eye. *Biomedicines*. 10 (5), 1-19, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10050997>
IF: 4.7

További közlemények

3. Takács, B., Szilágyi, A., Priksz, D., Bombicz, M., Szabó, A. M., Pelles-Taskó, B., Rusznyák, Á., Haimhoffer, Á., Gesztelyi, R., Szilvássy, Z., Juhász, B., Varga, B.: Electroretinographical Analysis of the Effect of BGP-15 in Eyedrops for Compensating Global Ischemia-Reperfusion in the Eyes of Sprague Dawley Rats. *Biomedicines*. 12 (3), 1-16, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines12030637>
IF: 3.9 (2023)





4. Pelles-Taskó, B., Szekeres, R., Takács, B., Szilágyi, A., Ujvárosy, D., Bombicz, M., Priksz, D., Varga, B., Gesztelyi, R., Szabó, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: From Nature to Treatment: The Impact of Pterostilbene on Mitigating Retinal Ischemia-Reperfusion Damage by Reducing Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Life (Basel)*. 14 (9), 1-13, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life14091148>
IF: 3.2 (2023)
5. Blága, Z., Czine, P., Takács, B., Szilágyi, A., Szekeres, R., Wachal, Z., Hegedűs, C., Buchholz, G., Varga, B., Priksz, D., Bombicz, M., Szabó, A. M., Kiss, R., Gesztelyi, R., Romanescu, D. D., Szabó, Z., Szűcs, M., Balogh, P., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Examination of Preferences for COVID-19 Vaccines in Hungary Based on Their Properties: Examining the Impact of Pandemic Awareness with a Hybrid Choice Approach. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 20 (2), 1-16, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph20021270>
6. Szekeres, R., Priksz, D., Kiss, R., Romanescu, D. D., Bombicz, M., Varga, B., Gesztelyi, R., Szilágyi, A., Takács, B., Tarjányi, V., Pelles-Taskó, B., Forgács, I. N., Gálné Remenyik, J., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Therapeutic Aspects of Prunus cerasus Extract in a Rabbit Model of Atherosclerosis-Associated Diastolic Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 24 (17), 1-19, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241713253>
IF: 4.9
7. Viczján, G., Szilágyi, A., Takács, B., Óvári, I., Szekeres, R., Tarjányi, V., Erdei, T. D., Teleki, V., Zsuga, J., Szilvássy, Z., Juhász, B., Varga, B., Gesztelyi, R.: The effect of a long-term treatment with cannabidiol-rich hemp extract oil on the adenosinergic system of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat atrium. *Front. Pharmacol.* 13, 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.1043275>
IF: 5.6
8. Viczján, G., Erdei, T. D., Óvári, I., Lampé, N., Szekeres, R., Bombicz, M., Takács, B., Szilágyi, A., Zsuga, J., Szilvássy, Z., Juhász, B., Gesztelyi, R.: A Body of Circumstantial Evidence for the Irreversible Ectonucleotidase Inhibitory Action of FSCPX, an Agent Known as a Selective Irreversible A1 Adenosine Receptor Antagonist So Far. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (18), 1-21, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22189831>
IF: 6.208





9. Wachal, Z., Szilágyi, A., Takács, B., Szabó, A. M., Priksz, D., Bombicz, M., Szilvássy, J., Juhász, B., Szilvássy, Z., Varga, B.: Improved Survival and Retinal Function of Aging ZDF Rats in Long-Term, Uncontrolled Diabetes by BGP-15 Treatment. *Front. Pharmacol.* 12, 1-11, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.650207>
IF: 5.988
10. Hegedűs, C., Muresan, M., Badale, A., Bombicz, M., Varga, B., Szilágyi, A., Sinka, D. Z., Bácskay, I., Popoviciu, M., Magyar, I., Szarvas, M. M., Szöllősi, E., Németh, J., Szilvássy, Z., Pallag, A., Kiss, R.: SIRT1 Activation by Equisetum Arvense L. (Horsetail) Modulates Insulin Sensitivity in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Molecules.* 25 (11), 2541-2561, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25112541>
IF: 4.411

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 44,207

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10**

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

Debrecen, 2024.10.16.



8. Kulcsszavak

Retina, öregedés, iszkémia-reperfúzió, Sprague Dawley patkány, Wistar patkány, ayahuasca, DMT, harmalin, rekreációs testmozgás, erőltetett testmozgás, elektroretinográfia (ERG), Western blot, szövettan

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Szilvássy Zoltánnak, az DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, hogy lehetővé tette munkám elvégzését az általa vezetett intézetben. Továbbá köszönöm Prof. Dr. Juhász Bélának a PhD hallgatói éveim alatt nyújtott minden szakmai segítségét.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Varga Balázs egyetemi adjunktusnak (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet), hogy kísérletes munkámat végigvezette, továbbá, hogy mindvégig támogatott és biztatott és így mindig új lendülettel és lelkesedéssel tudtam tovább folytatni. A PhD-képzésem alatt és disszertációm írása közben mindig számíthattam segítségére és iránymutatására.

Köszönetemet fejezem ki a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden munkatársának, különösképpen Szegváriné Erdős Andreának és Oláh Krisztinának.

Köszönöm családomnak, férjemnek, Vikornak, aki végig mellettem volt, támogatott és bármiben számíthattam rá és szüleimnek, akik hatalmas terhet vettek le a vállamról bármikor nehéz időszakom volt.

Köszönöm barátaimnak a velük kikapcsolódással, feltöltődéssel eltöltött időt!

TKP2021-EGA-18 azonosítójával számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a TKP2021-EGA-pályázati program finanszírozásában valósult meg.

A kutatást támogatták továbbá a GINOP-2.3.4-15-2016-00002, GINOP-2.3.4-15-2020-00008, GINOP-2.3.3-15-2016-00021, TKP2020-IKA-04, TKP2020-NKA-04, TKP2021-NKTA-47, valamint a TKP2021-NKTA-47 azonosító számú pályázati projektek.