

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Pelles-Taskó Beáta

**A pterostilbén és a kolecisztochin mint természetes bioaktív
molekulák szerepe komplex sejtkárosodási mechanizmusok
szabályozásában különböző állatkísérletes modelleken**

DEBRECENI EGYETEM

TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A pterostilbén és a kolecisztoxin mint természetes
bioaktív molekulák szerepe komplex sejtkárosodási
mechanizmusok szabályozásában különböző
állatkísérletes modelleken**

Pelles-Taskó Beáta

Témavezetők: Dr. Benkő Ilona és Prof. Dr. Juhász Béla



DEBRECENI EGYETEM
TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI Doktori Iskola

Debrecen, 2026

Tartalomjegyzék

Gyakran használt rövidítések jegyzéke.....	6
1 Bevezetés	8
2 Irodalmi áttekintés	10
2.1 Természetes molekulák és peptid mediált jelátvitel szerepe sejtkárosodási folyamatokban	10
2.2 Retina	11
2.2.1 Anatómiai felépítés és sejtes szerveződés	11
2.2.2 Vérellátás, vér–retina gát és neurovaszkuláris egység	13
2.2.3 Bioenergetika és sejthálózati működés.....	14
2.2.4 A vizuális ciklus biokémiája	14
2.2.5 Elektroretinográfia	16
2.2.6 Retinális iszkémia–reperfúziós sérülés patomechanizmusa.....	17
2.2.7 Molekuláris stresszválasz-fehérjék retinális iszkémia–reperfúzióban	17
2.3 Antioxidánsok	19
2.3.1 Az antioxidáns védelem rendszere	20
2.3.2 A reaktív oxigénszármazékok és a karcinogenezis	20
2.3.3 Makromolekulák oxidatív károsodása	21
2.3.4 Antioxidáns terápiás stratégiák daganatokban	22
2.3.5 Antioxidánsok szerepe a kemo- és radioterápiás válasz modulálásában	22
2.4 Pterostilbén.....	23
2.5 OLETF-LETO patkánymodell	24
2.6 Kolecisztokinin.....	24
2.7 Közös sejtszintű mechanizmusok obezitásban.....	25
2.8 CCK-receptor-antagonisták.....	27
2.9 A csontvelői sejtképzés folyamata	29
2.10 Karboplatin.....	31
3 Célkitűzések:.....	33

4	Anyagok és módszerek.....	34
4.1	A pterostilbén hatása retinális iszkémia–reperfúziós modellben	34
4.1.1	Kísérleti állatok és kezelések	34
4.1.2	Retinális iszkémia–reperfúziós modell	35
4.1.3	Elektroretinográfia	36
4.1.4	Western blot	37
4.1.5	Hisztológiai vizsgálatok	38
4.1.6	Statisztikai analízis	39
4.2	OETF–LETO patkánymodell	40
4.2.1	Kísérleti állatok	40
4.2.2	Kísérleti terv	40
4.2.3	CFU-GM kolóniaszám meghatározása	43
4.2.4	CFU-GM progenitor sejtek in vitro kezelése LETO patkányok csontvelő- tenyészeiben	43
4.2.5	CCK-1 és CCK-2 receptorok vizsgálata csontvelői sejtekben	44
4.2.6	RNS izolálás és reverz transzkripció.....	44
4.2.7	Valós idejű kvantitatív PCR.....	45
4.2.8	TaqMan assay kiértékelése.....	45
4.2.9	Statisztikai analízis	46
5	Eredmények.....	46
5.1	A pterostilbén hatása retinális iszkémia–reperfúziós modellben	46
5.1.1	Elektroretinográfia	46
5.1.2	Western blot	48
5.1.3	Hisztológia	50
5.2	CCK-1R antagonizmus hatása OETF–LETO patkánymodellben	51
5.2.1	Hemopoézis vizsgálata CCK-1R hiányos, elhízott OETF és nem elhízott LETO patkányokban	51

5.2.2	A proglumid és a lorglumid hatása a csontvelői CFU-GM progenitor sejtekre <i>in vivo</i>	52
5.2.3	A proglumid és a lorglumid <i>in vivo</i> előkezelésének hatása a karboplatin <i>in vitro</i> toxicitására CFU-GM progenitor sejtekben	54
5.2.4	A proglumid és a lorglumid hatása a CFU-GM progenitor sejtek kolóniaképzésére LETO patkányok csontvelő-tenyészeiben <i>in vitro</i>	56
5.2.5	Kolecisztokinin-receptorok vizsgálata csontvelői sejtekben.....	57
6	Megbeszélés.....	58
7	Összegzés - Summary.....	67
8	Az értekezés új megállapításai	68
9	Irodalomjegyzék.....	70
10	Tárgyszavak	80
11	Köszönetnyilvánítás.....	81
12	Függelék.....	82

Gyakran használt rövidítések jegyzéke

ATP – adenzin-trifoszfát (adenosine triphosphate)
BH₄ – tetrahidrobiopterin (tetrahydrobiopterin)
CCK – kolecisztokinin (cholecystokinin)
CCK₁R – kolecisztokinin-1 receptor (cholecystokinin-1 receptor)
CCK₂R – kolecisztokinin-2 receptor (cholecystokinin-2 receptor)
CFU-GM – granulocita–makrofág kolóniaképző egység (colony-forming unit–granulocyte macrophage)
DHA – dokozahexaénsav (docosahexaenoic acid)
eNOS – endotélialis nitrogén-monoxid-szintáz (endothelial nitric oxide synthase)
ER – endoplazmás retikulum (endoplasmic reticulum)
ERG – elektroretinográfia (electroretinography)
G-CSF – granulocita kolónia-stimuláló faktor (granulocyte colony-stimulating factor)
GFAP – glialis fibrilláris savas fehérje (glial fibrillary acidic protein)
GLP-1 – glukagon-szerű peptid (glucagon-like peptide-1)
GM-CSF – granulocita–makrofág kolónia-stimuláló faktor (granulocyte–macrophage colony-stimulating factor)
GPX4 – glutation-peroxidáz 4 (glutathione peroxidase 4)
HDL – nagy sűrűségű lipoprotein (high-density lipoprotein)
HSC – hematopoetikus őssejt (hematopoietic stem cell)
HSP70 – hősokkfehérje 70 (heat shock protein 70)
I/R – iszkémia–reperfúzió (ischaemia/reperfusion)
IC₅₀ – az 50%-os gátlást okozó koncentráció (half maximal inhibitory concentration)
ICAM-1 – intercelluláris adhézións molekula 1 (intercellular adhesion molecule 1)
IKKβ – IκB-kináz béta (IκB kinase beta)
IL-1 – interleukin-1 (interleukin-1)
IL-6 – interleukin-6 (interleukin-6)
IL-8 – interleukin-8 (interleukin-8)
IR- inzulinrezisztencia (insulin resistance)
IRBP – interphotoreceptor retinoidkötő fehérje (interphotoreceptor retinoid-binding protein)
JNK – c-Jun N-terminális kináz (c-Jun N-terminal kinase)
LDL – alacsony sűrűségű lipoprotein (low-density lipoprotein)

LETO – Long-Evans Tokushima Otsuka patkány (Long-Evans Tokushima Otsuka rat)

NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NF- κ B – nukleáris faktor kappa B (nuclear factor kappa B)

NO – nitrogén-monoxid (nitrogen monoxide)

Nrf2 – nukleáris faktor eritroid 2-kapcsolt faktor 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

OETF – Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty patkány (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat)

OP – oszcillációs potenciál (oscillatory potential)

PARP1 – poli(ADP-ribóz)-polimeráz 1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1)

PEDF – pigmenthám-eredetű faktor (pigmentepithelium-derived factor)

RGC – retina ganglionsejt (retinal ganglion cell)

RNS– reaktív nitrogén származékok (reactive nitrogen species)

ROS – reaktív oxigén származékok (reactive oxygen species)

RPE – retinális pigmentepitélium (retinal pigment epithelium)

SD – Sprague–Dawley patkány (Sprague-Dawley rat)

TNF- α – tumor nekrosis faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)

UPR – nem megfelelően feltekeredett fehérjékre adott válasz (unfolded protein response)

VCAM-1 – vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1 (vascular cell adhesion molecule 1)

VEGF –vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

VLDL – nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein (very low-density lipoprotein)

„A tudomány izgalmas kaland. Ajtókat nyitogatunk, keressük az igazságot, s egyszerre ott van előttünk, mint mesebeli kincs, a maga kézzelfogható, tündöklő valóságában.”

Kosztolányi Dezső

1 Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a krónikus, nem fertőző betegségek előfordulása világszerte növekvő tendenciát mutat, ami nemcsak az egészségügyi ellátórendszerek terhelését fokozza, hanem alapvetően formálja a morbiditási és mortalitási mintázatokat is. Ezen kórképek jelentős része nem egyetlen, jól körülhatárolható kiváltó tényező következménye, hanem komplex, egymással kölcsönhatásban álló patobiológiai folyamatok eredménye. A betegségek klinikai megjelenése gyakran szervspecifikus, ugyanakkor a háttérben álló molekuláris és sejtes mechanizmusok számos ponton átfedést mutatnak.

A modern orvosbiológiai kutatás egyik alapvető kihívása ezért annak feltárása, hogy az eltérő klinikai megjelenésű betegségek mögött milyen közös biológiai meghatározók azonosíthatók, és ezek milyen módon befolyásolhatók. E megközelítés középpontjában egyre inkább azok a folyamatok állnak, amelyek a sejtek károsító hatásokra adott válaszait alakítják. Az oxidatív terhelés és a gyulladásos jelátvitel tartós fennmaradása számos szervrendszerben vezet strukturális átalakulásokhoz és működésbeli zavarokhoz, függetlenül attól, hogy a kiváltó inger vaszkuláris, metabolikus vagy toxikus természetű. Amennyiben ezek a folyamatok meghaladják az adott szövet adaptív kapacitását, a károsodás progresszívvá válik, és hosszú távon funkcióvesztéshez vezet. A biológiai válaszok kimenetele ugyanakkor nem kizárólag a károsító hatás jellegétől függ, hanem annak időbeli lefolyásától, intenzitásától és a szöveti környezet aktuális állapotától is.

Különösen érzékenyek ezekre a folyamatokra azok a sejtípusok és szövetek, amelyek magas anyagcsere-igénnyel rendelkeznek, vagy folyamatos megújulásra kényszerülnek. A központi idegrendszer perifériás részének tekinthető retina, valamint a csontvelőben zajló sejtképzés anatómiailag és funkcionálisan elkülönülő rendszerek, mégis közös vonásuk a károsító környezeti hatásokkal szembeni fokozott sérülékenység. A retinában az oxidatív és gyulladásos terhelés funkcióromláshoz és sejtpusztuláshoz vezethet, míg a csontvelőben a progenitorsejtek

érintettsége a vérsejtképzés zavarában és a külső beavatkozásokkal – például citotoxikus kezelésekkel – szembeni fokozott érzékenységben nyilvánulhat meg.

Az elmúlt évek kísérletes eredményei arra utalnak, hogy ezek a válaszok nem tekinthetők egységesnek vagy lineárisnak. Iszkémiás, metabolikus és citotoxikus hatások gyakran egyidejűleg vannak jelen, és kölcsönhatásuk olyan komplex biológiai válaszokat eredményez, amelyek csak több szempont együttes figyelembevételével értelmezhetők. A károsodásra adott biológiai válaszok jellege és mértéke így nemcsak a károsító inger természetétől, hanem az adott szövet állapotától és a beavatkozás időzítésétől is függ.

Mindezek indokolják olyan vizsgálati megközelítések alkalmazását, amelyek eltérő szervrendszerekben teszik vizsgálhatóvá a károsodásra adott biológiai válaszok jellegét és következményeit. A jelen értekezés két, módszertanában elkülönülő vizsgálatsorozaton keresztül közelíti meg a válaszok sejtszintű sajátosságait és befolyásolhatóságát, különböző kísérletes modellekben.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Természetes molekulák és peptid mediált jelátvitel szerepe sejtkárosodási folyamatokban

A komplex sejtkárosodási folyamatok vizsgálata során kiemelt jelentőséggel bír, hogy milyen típusú molekuláris beavatkozásokkal tesszük értelmezhetővé a károsodás egyes komponenseit. A kísérletes farmakológiai megközelítésekben ezért gyakran eltérő eredetű, de konvergáló hatásmechanizmusú molekulák alkalmazása válik indokolttá.

E megközelítés egyik fontos csoportját a természetes eredetű bioaktív molekulák alkotják, amelyek az elmúlt években ismét a gyógyszerkutatás fókuszába kerültek. A fejlett analitikai módszerek, a célpont-azonosítási stratégiák és a hálózatalapú farmakológiai szemlélet térnyerése lehetővé tette, hogy e vegyületek komplex, több jelátviteli útvonalat érintő hatásmechanizmusai részletesebben feltárhatók legyenek. Ennek jelentőségét jól szemlélteti, hogy számos klinikumban alkalmazott hatóanyag természetes molekulákból származik vagy azok szerkezeti módosításán alapul [1, 2]. Ide tartoznak többek között a növényi eredetű daganatellenes szerek (például vinkrisztin, paklitaxel), a kardiovaszkuláris hatóanyagok (digoxin), az antimikrobiális antibiotikumok (penicillin), valamint a természetes peptidek alapján fejlesztett gyógyszerek, így a glükagonszerű peptid-1 (GLP-1) receptor agonisták és a szomatosztatin analógok [3, 4].

A természetes eredetű vegyületek közül a polifenolok különös jelentőséggel bírnak, mivel széles spektrumú biológiai aktivitással rendelkeznek. Antioxidáns tulajdonságaik révén képesek közvetlenül semlegesíteni a reaktív oxigén- és nitrogénszármazékokat, ugyanakkor ennél jelentősebb, hogy befolyásolják a sejtes redox-homeosztázist, valamint a gyulladásos és apoptotikus jelátviteli útvonalakat. Ez a több célpontot érintő hatásmechanizmus különösen alkalmassá teszi őket komplex kórélettani folyamatok vizsgálatára [5]. A stilbenoid típusú polifenolok közé tartozó pterostilbén ezen tulajdonságai miatt került jelen értekezés egyik kísérletes modelljében a vizsgálatok fókuszába [6].

Ezzel párhuzamosan az endogén peptid mediált jelátviteli rendszerek célzott farmakológiai modulációja lehetőséget biztosít a receptor-specifikus mechanizmusok feltárására. A kolecisztoikin (CCK) rendszer esetében a CCK₁ és CCK₂ receptorokon keresztül közvetített jelátvitel szelektív antagonisták alkalmazásával kísérletesen befolyásolható, amely lehetővé teszi a downstream sejtes válaszok funkcionális elkülönítését és a jelátviteli folyamatok

mechanisztikus vizsgálatát [7]. Az eltérő molekuláris kiindulópontok ellenére ezen beavatkozások közös jellemzője, hogy az oxidatív stresszhez, gyulladásos jelátvitelhez és sejttúlélési mechanizmusokhoz kapcsolódó folyamatok szabályozásán keresztül fejtik ki hatásukat. Ez különösen releváns olyan rendszerekben, ahol a károsodási folyamatok dinamikusan és több szinten zajlanak.

A retina iszkémia/reperfúziós károsodás vizsgálatára több kísérletes modell ismert, amelyek közül a leggyakrabban alkalmazottak az intraokuláris nyomás emelésén alapuló modell, a retinalis vaszkuláris okklúziós modellek, valamint a szisztémás iszkémiát indukáló megközelítések. Saját vizsgálatainkban a retina iszkémia/reperfúziós károsodását a szemgolyó mögött alkalmazott, reverzibilis érleszorításon alapuló modellben idéztük elő, amely a retina vérrellátásának átmeneti megszüntetésével, majd a reperfúzió helyreállításával jól reprodukálható I/R károsodást eredményez. Ez a modell jól definiált és érzékeny kísérletes rendszer, amely alkalmas a különböző molekuláris beavatkozások hatásainak összehasonlító vizsgálatára. A következő fejezetben a retina anatómiai, élettani és molekuláris sajátosságait tárgyaljuk részletesen.

2.2 Retina

2.2.1 Anatómiai felépítés és sejtes szerveződés

A retina a központi idegrendszer perifériára települt, funkcionálisan specializált idegszövet, amely a vizuális információk transzdukciójáért és elsődleges feldolgozásáért felelős. A fotonenergiát elektromos jellé alakítja, majd rétegzett neuronális hálózatain keresztül a látóidegen át továbbítja az információt a központi idegrendszer felé [8]. Anatómiailag a szem hátsó szegmensében, az üvegtest és az érhártya között helyezkedik el.

A retina tíz rétegből áll: kilenc neuroretinális rétegből és a retinalis pigmentepitheliumból (RPE). A neuroretina rétegei: belső határhártya (internal limiting membrane), idegrostréteg (nerve fiber layer), ganglionsejt-réteg (ganglion cell layer), belső plexiform réteg (inner plexiform layer), belső magréteg (inner nuclear layer), külső plexiform réteg (outer plexiform layer), külső magréteg (outer nuclear layer), külső határhártya (external limiting membrane) és fotoreceptor-réteg (photoreceptor layer) [9]. A lamináris szerveződés biztosítja a vizuális információk hierarchikus feldolgozását. Az elektroretinográfiás (ERG) válaszok lehetővé teszik ezen rétegek működésének in vivo vizsgálatát, mivel az a-hullám elsősorban a fotoreceptorok

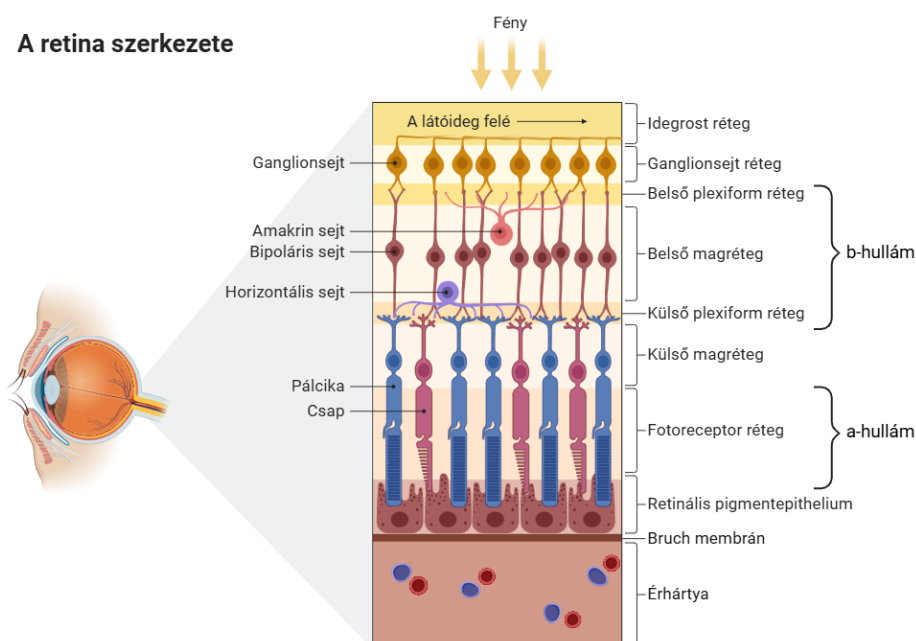
aktivitását tükrözi, míg a b-hullám főként a belső retina – különösen a bipoláris és Müller-sejtek – működéséhez köthető (**1. ábra**).

Az RPE egyrétegű, polarizált hámként a külső vér–retina gát meghatározó eleme, és részt vesz a retinaldehid újrahasznosításában, a fotoreceptor külső szegmentumok fagocitózisában, valamint az ion-, víz- és retinoid-transzportban [10-12]. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) és pigmenthám-eredetű faktor (PEDF) szekréciójával hozzájárul az érhártya kapillárisrétegének és a fotoreceptorok strukturális stabilitásához.

A fotoreceptorok (pálcikák és csapok) az RPE-hez közeli rétegben helyezkednek el, bennük zajlik a fototranszdukció [10]. A jeleket a bipoláris, horizontális és amakrin sejtek modulálják, míg a kimenetet a retinális ganglionsejtek biztosítják, amelyek axonjai a látóidegben egyesülnek [13].

A retina homeosztázisát a gliális mikrokörnyezet tartja fenn: a Müller-sejtek részt vesznek a káliumpufferelésben, az aquaporin-4 (AQP4)-mediált vízforgalom szabályozásában és a glutamát–glutamin kör működtetésében [14-16], az asztrociták a felszíni vaszkuláris plexushoz társulnak, míg a mikroglia az immunfelügyeletet biztosítja.

A retina anyagcsere-igénye kiemelkedően magas. A fotoreceptor-korongmembránok dokozahexaénsavban (DHA) gazdag lipidösszetétele elősegíti a gyors jelátvitelt, ugyanakkor fokozza az oxidatív sérülékenységet [17]. A folyamatos fényexpozíció és az intenzív mitokondriális aktivitás jelentős reaktív oxigénszármazék-képződéssel jár, ami a retinát különösen érzékennyé teszi az oxidatív stresszel szemben [18, 19].



1. ábra. A retina rétegeinek sematikus ábrázolása és az elektroretinográfiás hullámok eredete. (BioRender, saját készítésű ábra)

2.2.2 Vérellátás, vér–retina gát és neurovaszkuláris egység

A retina vérellátása kettős rendszerű, amely a magas anyagcsere-igényhez igazodik. A retina belső rétegeit a retina központi artériája látja el oxigénnel és tápanyagokkal, míg a külső rétegek, különösen a fotoreceptorok, ellátása főként az érhártya fenesztrált kapilláris hálózataiból, diffúzió útján részesülnek ellátásban. [9]. Az retina központi artériája három kapilláris plexusra (felületes, intermedier, mély) ágazik [9], a ganglionsejtek főként a felületes és intermedier hálózathoz kapnak vérellátást, és hipoxia-indukálható faktor-1 α (HIF-1 α) expressziót mutatnak [20].

A belső vér–retina gát (inner blood–retina barrier) alapját a szoros sejtkapcsolatok (tight junctionok; kladinok, okkludin, zonula occludens-1 [ZO-1]) által összekapcsolt endotélsejtek képezik, amelyeket vastag bazális membrán és magas pericita-fedettség stabilizál. A vaszkuláris és idegi elemek közötti kapcsolatot a felszíni és intermedier plexusban asztrociták és Müller-sejtek közvetítik, míg a mély plexusban a perivaszkuláris kálium-homeosztázis fenntartása elsősorban a Müller-sejtekhez és a Kir4.1 káliumcsatornához kötődik [21].

A külső vér–retina gát az RPE szoros sejtkapcsolatain alapul, amely diffúziós gátat képez az érhártya felé, ugyanakkor szelektív transzportot biztosít ionok, víz és metabolitok számára [22, 23].

A retinális véráramlást finom autoregulációs mechanizmusok biztosítják, míg a külső retina perfúzióját meghatározó érhártya keringése kevésbé autoregulált, és döntően az autonóm idegrendszer tónusától függ [24, 25]. Az érfal tónusának fontos mediátora az NO; oxidatív környezetben a tetrahidrobiopterin (BH₄) kimerülése a NO-szintáz „uncouplingjához” vezet, amely a NO-termelés helyett reaktív oxigénszármazék-képződést eredményez [26].

Kóros állapotokban – például diabétesz mellituszban vagy iszkémia–reperfúziós sérülés során – a vér–retina gát integritása sérül: a tight junction fehérjék leépülnek, a bazális membrán megvastagodik, a permeabilitás fokozódik, és a pericita-diszfunkció mikrovaszkuláris instabilitáshoz vezet [16, 27, 28].

2.2.3 Bioenergetika és sejthálózati működés

A retina működése jelentős, sejttypusonként eltérő energiafelhasználással jár, amely a fototranszdukció, a szinaptikus jelátvitel és a gliális támogatás összehangolt aktivitásából ered. A magas metabolikus igény a retina működésének feltétele, ugyanakkor energiaellátási zavar esetén gyors funkcióvesztéshez vezethet. A fotoreceptorok – különösen a pálcikák – oxigéndús környezetben is döntően aerob glikolízist alkalmaznak, ami biztosítja a fototranszdukció gyors kinetikáját és a külső szegmentumok folyamatos megújulását. Ezzel szemben a belső retina neuronjai, elsősorban a retinális ganglionsejtek, nagyobb mértékben támaszkodnak oxidatív foszforilációra, így működésük szorosan függ a mitokondriális integritástól és az oxigénellátástól [16, 29, 30].

A retina energiahomeosztázisában a Müller-sejtek központi szerepet töltenek be, metabolikus közvetítőként kapcsolva össze a vaszkuláris rendszert és a neuronokat. Az általuk termelt laktát a neuronok számára alternatív energiaforrást jelent a laktát-shuttle mechanizmus révén, különösen fokozott terhelés vagy átmeneti hipoxia esetén [27, 29].

A retina belső rétegeiben komplex neuronális hálózat működik: a fotoreceptorok jeleit a bipoláris sejtek továbbítják, a horizontális és amakrin sejtek laterális kapcsolatai finomhangolják, míg a retinális ganglionsejtek a belső plexiform rétegben integrálják a bemeneteket, majd axonjaikon keresztül továbbítják az információt [14-16]. E szerveződés alapozza meg a receptív mezők központ–környezet opponenciáját és az időbeli feldolgozást.

A gliális sejtek aktívan szabályozzák a sejthálózati működést: a Müller-sejtek káliumpuffereléssel, AQP4-mediált vízforgalommal és a glutamát–glutamin kör fenntartásával stabilizálják a szinaptikus környezetet [14-16]. Az asztrociták a felszíni vaszkuláris plexushoz társulnak, míg a mikroglia immunfelügyeleti szerepet lát el. A periciták működése a kapilláris stabilitáson és a belső vér–retina gát integritásán keresztül közvetetten a neuronális mikrokörnyezet metabolikus egyensúlyát is befolyásolja [28, 31].

2.2.4 A vizuális ciklus biokémiája

Jelen fejezet a vizuális ciklus biokémiai folyamatait tárgyalja, amelyek a fotopigmentek fényérzékeny kromofórjának, a 11-cisz-retinálnak a folyamatos regenerációját biztosítják, és ezáltal alapvető szerepet játszanak a retina fényérzékenysége fenntartásában.

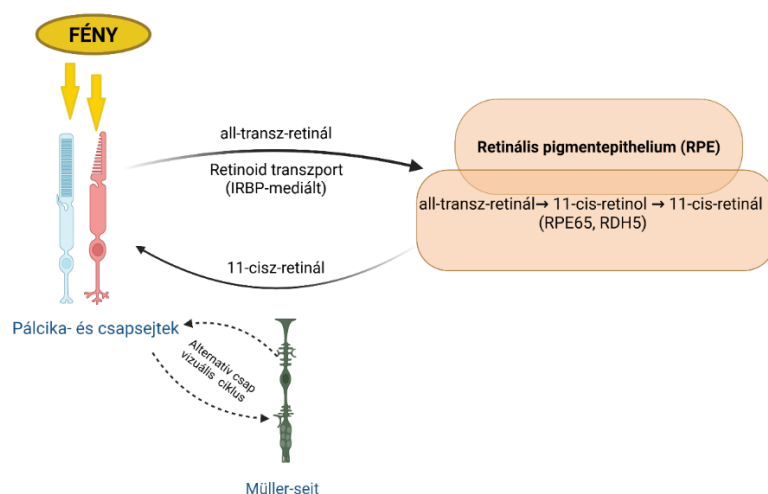
Fényabszorpció hatására a kromofór all-transz-retinállá izomerizálódik, amely a fototranszdukciós kaszkádot indítja el. A fényérzékenység helyreállítása az all-transz-retinoid 11-cisz-retinállá történő visszaalakításával valósul meg, több sejttípus együttműködésével [11, 12].

A pálcikák vizuális ciklusa főként az RPE-ben zajlik. Az all-transz-retinál all-transz-retinollá redukálódik, majd az RPE-be jut, ahol a lecitin–retinol-aciltranszferáz (LRAT) retinil-észtert képez. Ezt követően az RPE65 izomerohidroláz 11-cisz-retinollá alakítja, amelyet a retinol-dehidrogenáz-5 (RDH5) 11-cisz-retinállá oxidál. A kromofór visszajut a fotoreceptor külső szegmentumába és opsinhoz kötődik, regenerálva a fotopigmentet [11, 12]. **(2. ábra).**

A retinoidok intracelluláris és intercelluláris transzportját specifikus kötőfehérjék biztosítják: a sejtes retinolkötő fehérje (CRBP) és a celluláris retinaldehidkötő fehérje (CRALBP) a sejtben belüli stabilizálást, míg az interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) a fotoreceptor és az RPE közötti irányított szállítást végzi [11, 12].

A csapok gyorsabb kromofór-utánpótlása részben Müller-sejteket bevonó alternatív útvonalon keresztül történik, amely kiegészíti az RPE-függő ciklust. A rendszer több dinamikus retinoid-poolra – fotoreceptor-kötött, IRBP-asszociált, CRALBP-kötött és RPE retinil-észter készletekre – támaszkodik, lehetővé téve a fényadaptációt [11, 12].

A ciklus hatékonyságát a sejtek redox-állapota is befolyásolja. A DHA-ban gazdag korongmembránok nagy membránfluiditást biztosítanak, ugyanakkor oxidatív sérülékenységgel járnak. Fokozott oxidatív stressz esetén a kulcsenzimek és retinoid-kötő fehérjék módosulása lassíthatja a 11-cisz-retinoid regenerációját és csökkentheti a fototranszdukció hatékonyságát [11].



2. ábra. A vizuális ciklus fő lépései a fotoreceptorok, az RPE és a Müller-sejtek közötti retinoid-körforgásban. (BioRender, saját készítésű ábra)

2.2.5 Elektroretinográfia

Az elektroretinográfia (ERG) a retina fényingerre adott elektromos válaszain alapuló non-invazív vizsgálómódszer, amely a neuroszenzoros retina és az RPE bioelektromos aktivitását rögzíti. A módszer lehetővé teszi a retina neuronális és nem neuronális elemeinek elkülönített vizsgálatát különböző kórállapotokban. Az ERG-válaszokat felszíni elektródákkal rögzítik, és a stimulációs protokollok megválasztásával célzottan vizsgálhatók a pálcika-, csap- vagy ganglionsejt-eredetű komponensek [32].

Sötétadaptált körülmények között az ERG legkorábbi, korneálisan negatív komponense az a-hullám, amely döntően a fotoreceptorok hiperpolarizációját tükrözi. Amplitúdója és implicit ideje a fototranszdukció kinetikájának érzékeny mutatója, és metabolikus vagy redox-eltérések esetén is változhat [32].

Az a-hullámot követő, korneálisan pozitív b-hullám fő generátora az ON-bipoláris sejtek depolarizációja, kialakulásában a Müller-sejtek kálium-homeosztázist szabályozó szerepe is meghatározó, így a b-hullám a bipoláris és gliális működés állapotáról egyaránt információt ad [33, 34].

A b-hullám csúcsán megjelenő oszcillációs potenciálok (OP-k) az amakrin sejtekhez köthető belső retinális áramkörök aktivitását tükrözik, és különösen érzékenyek a mikrokeringési és metabolikus zavarokra; iszkémiás és diabéteszes állapotokban gyakran ezek mutatják a legkorábbi eltéréseket [33, 34].

Fényadaptált körülmények között a csaprendszer válaszai kerülnek előtérbe. A fotopikus ERG gyorsabb és kisebb amplitúdójú komponensei a nagy időbeli felbontású jelátvitelt tükrözik, míg a flicker-ERG az időbeli feldolgozás integritásának vizsgálatára szolgál [33-35].

Hosszabb fényinger során megjelenik a lassú, pozitív c-hullám, amely elsősorban a fotoreceptor–RPE egység transzepiteliális iontranszport-változásait tükrözi. A fény megszűnését követő d-hullám főként a csap OFF-út aktivitásához köthető [33].

A photopic negative response (PhNR) a b-hullámot követő negatív komponens, amely döntően a retinális ganglionsejtek és axonjaik működését jelzi; amplitúdója érzékenyen csökken belső retinális érintettség esetén, és korrelál a strukturális károsodással [36, 37].

Iszkémia–reperfúziós sérülésben az ERG globális amplitúdócsökkenést és implicitidő-megnyúlást mutat; az egyes komponensek együttes elemzése lehetővé teszi a külső és belső retina funkcionális eltéréseinek elkülönítését [36, 37].

2.2.6 Retinális iszkémia–reperfúziós sérülés patomechanizmusa

A retinális iszkémia–reperfúziós (I/R) sérülés akut kóros állapot, amelyet a véráramlás megszűnése, majd helyreállítása jellemez. Az iszkémiás fázisban az oxigén- és szubsztrátellátás kiesése ATP-kimerüléshez, az ionhomeosztázis felborulásához és glutamát-mediált neurotoxicitáshoz vezet, ami különösen a retinális neuronokat károsítja. [38, 39].

A reperfúzió során a hirtelen reoxigenizáció a mitokondriumok és a NADPH-oxidáz enzimek aktivációján keresztül fokozott reaktív oxigénszármazék- (ROS-) termelést indukál, amely meghaladja az antioxidáns védelmi kapacitást [40, 41]. Az oxidatív stresszhez nitro-oxidatív komponens társul: a nitrogén-monoxid (NO) és a szuperoxid-anion reakciója peroxinitrit (ONOO^-) képződéséhez vezet, míg a BH_4 kimerülése a NO-szintáz „szétkapcsolását” és további ROS-képződést eredményez [26].

A retina magas oxigénfogyasztása és DHA gazdag membránösszetétele fokozza a lipidperoxidáció iránti érzékenységet, ami fehérjeoxidációhoz, DNS-károsodáshoz és membránintegritás-vesztéshez vezethet [17, 19].

Az oxidatív stressz és az energiahomeosztázis zavara gyulladásos jelátviteli folyamatokat aktivál: a mikroglia és a gliasejtek aktiválódnak, a gyulladásos mediátorok termelődése fokozódik, valamint a vér–retina gát integritása sérül, tovább súlyosbítva a neuronális károsodást [9, 40]. Az I/R végső következménye az apoptotikus és nekrotikus sejthalál-útvonalak aktiválódása, különösen a retinális ganglionsejtekben, ami a vizuális információ továbbításának romlásához vezet [13, 18].

2.2.7 Molekuláris stresszválasz-fehérjék retinális iszkémia–reperfúzióban

A hősokkfehérjék családjába tartozó 70 kDa-os hősokkfehérje (HSP70) molekuláris chaperonként elősegíti a fehérjék helyes hajtogatását, gátolja az aggregációt, és támogatja a sejtek túlélését oxidatív, metabolikus és iszkémiás stresszhelyzetekben [42]. Retinális iszkémia–reperfúzió során expressziója szabályozottan emelkedik, ami az adaptív stresszválasz részét képezi, és összefügg a mitokondriális diszfunkció és az apoptotikus jelátvitel mérséklődésével [43]. Fokozott jelenléte a fehérjestruktúrák stabilizálásán keresztül hozzájárulhat a sejtek funkcionális integritásának fenntartásához. A HSP70 szintjének

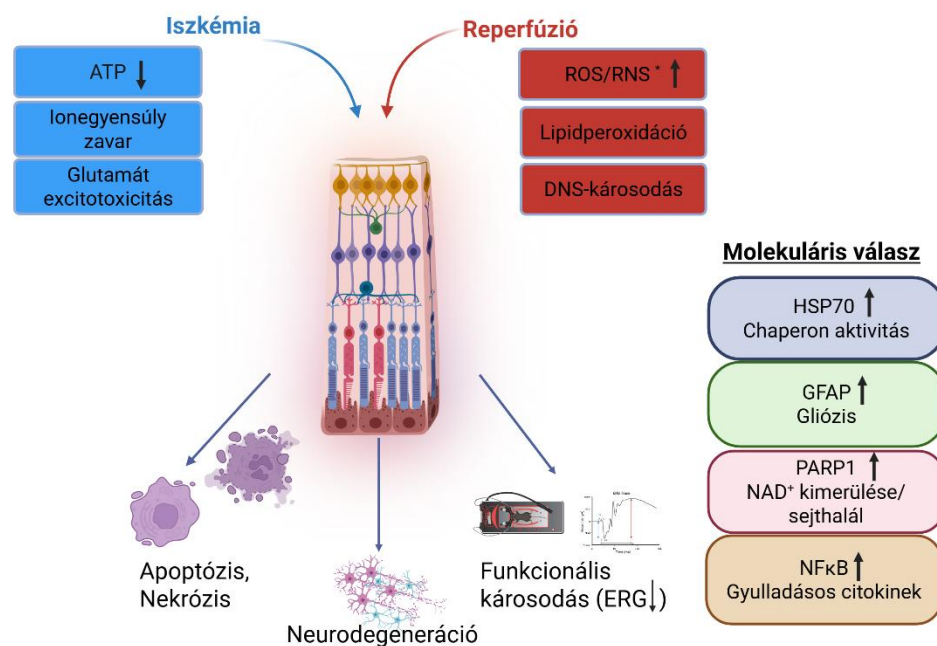
változása így a sejtes stressz mértékét és az adaptív kapacitást egyaránt tükrözheti I/R-modellekben [43].

A gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) a gliasejtek citoszkeletonjának köztes filamentumfehérjéje, a reaktív gliózis elfogadott markere [44]. Retinális I/R során expressziója fokozódik, jelezve a Müller-sejtek és asztrociták aktivációját [45]. A GFAP-upreguláció a Müller-sejtek megnyúlásával, hipertrófiájával és a retina rétegszerkezetének átalakulásával társul. A gliális válasz kezdetben védő jellegű lehet az ionhomeosztázis és a metabolikus támogatás fenntartásában, tartós aktiváció esetén azonban hozzájárulhat a krónikus gyulladás fennmaradásához és a neuronális károsodáshoz. [45]

A poli(ADP-ribóz)-polimeráz-1(PARP1) a DNS-károsodás-válasz központi enzime, amely oxidatív és nitro-oxidatív stressz hatására túlaktiválódhat [46]. Retinális I/R során a fokozott ROS- és reaktív nitrogénszármazék (RNS)-képződés DNS-károsodást idéz elő, ami tartós PARP1-aktivációhoz és nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺) -kimerüléshez vezethet, másodlagosan mitokondriális diszfunkciót, ATP-depléciót és sejthalált okozva, különösen a nagy energiaigényű ganglionsejtekben, ami a retinális neuronpopulációk szelektív sérülékenységét magyarázhatja. [46, 47].

A nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) redox-érzékeny transzkripciós faktor, amely oxidatív és iszkémiás ingerek hatására aktiválódik, és proinflammatorikus mediátorok expresszióját fokozza [48]. Retinális I/R-ben aktivitása összefügg a mikroglia-aktivációval, az endotél-diszfunkcióval és a vér–retina gát integritásának romlásával, hozzájárulva a gyulladás fenntartásához és a neuronális károsodás progressziójához [48, 49].

A HSP70, GFAP, PARP1 és NF- κ B együttesen a retinális iszkémia–reperfúzió során kialakuló sejtes stresszválasz, gyulladás és neurodegeneráció kulcsfontosságú molekuláris szabályozói **(3. ábra)**.



*RNS: Reaktív nitrogénszármazékok

3. ábra A retinális I/R sérülés fő patomechanizmusai és a kapcsolódó molekuláris stresszválasz-útvonalak. (BioRender, saját készítésű ábra)

2.3 Antioxidánsok

Az antioxidáns olyan molekula, amely reaktív oxigénszármazékokkal lép reakcióba, szabályozza azok célmolekulákkal való kölcsönhatását, befolyásolja a redoxfüggő jelátvitelt és mérsékli az oxidatív károsodást [50]. Forrásuk lehet endogén, táplálékeredetű vagy szintetikus. A szervezetben az endogén és táplálékkal bevitt komponensek integrált védőrendszert alkotnak, amely a reaktív oxigénszármazékok szintjét élettani tartományban tartja; a hatékonyság kulcsa a képződés és eltávolítás egyensúlya. Ebben kiemelt szerepet töltenek be a peroxiredoxinok, amelyek a hidrogén-peroxid elsődleges modulátorai, miközben az antioxidáns kapacitás szövet- és sejttípus-specifikus, különösen érzékeny a mitokondriális redox-mikrokörnyezetben, és nemi különbségeket is mutathat [50].

Az antioxidánsok hozzájárulhatnak a látás megőrzéséhez és a funkcióromlás lassításához, ezért jelentős kutatási érdeklődés irányul a táplálkozási antioxidánsok és étrend-kiegészítők potenciális megelőző vagy betegségkontroll-szerepére [51-53].

2.3.1 Az antioxidáns védelem rendszere

A sejtek többkomponensű antioxidáns védelemmel rendelkeznek, amely enzimatis és nem enzimatis elemekből áll [54]. Az enzimatis rendszer fő komponensei a szuperoxid-diszmutázok (SOD 1-3), a kataláz (CAT), a hem-oxigenázok (HO-1 és HO-2) és a glutation-peroxidázok (GPX), amelyek expresszióját és aktivitását elsődlegesen a nukleáris faktor eritroid 2-kapcsolt faktor 2 (Nrf2) [55].

A szuperoxid-diszmutázok a szuperoxid-aniont hidrogén-peroxiddá alakítják, amelyet a kataláz vízzé és oxigénné bont, míg a glutation-peroxidázok a peroxidok és lipid-hidroperoxidok semlegesítésében vesznek részt [56, 57].

E reakciók kulcseleme a glutation, amely redukáló ágensként működik, redoxpufferként védi a makromolekulákat, és részt vesz a C- és E-vitamin regenerálásában. Az oxidált glutation visszaalakítását a glutation-reduktáz NADPH felhasználásával végzi [57, 58].

A NADPH központi szerepű redukáló kofaktor, amely a glutation-, tioredoxin- és peroxiredoxin-rendszerek működését támogatja, így meghatározó a reaktív oxigénszármazékok eltávolításában [59, 60].

A redukatív potenciál fő forrása a pentóz-foszfát útvonal, amelyben a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz a kulcsenzim [61].

A nem enzimatis antioxidánsok közül az aszkorbát erős elektrondonor, amely többféle gyök semlegesítésére képes, regenerációját a glutation és az NADPH segíti [58].

Az alfa-tokoferol lipofil, lánctörő antioxidáns, amely a lipidperoxidációs láncreakció megszakításával védi a membránokat, és szinergiában működik az aszkorbáttal [58, 62]. A húgysav vízoldékony gyökfogó, míg a retinol a látásfolyamatban betöltött szerepe mellett antioxidáns aktivitással is rendelkezik [58, 63, 64].

További molekulák – például az L-cisztein, az L-tirozin, az albumin és a ferritin – a Fenton-reakciók korlátozásával mérséklék a vas-katalizált reaktív oxigénszármazék-képződést [58].

2.3.2 A reaktív oxigénszármazékok és a karcinogenezis

A hosszan fennálló gyulladás preneoplasztikus állapothoz vezethet [65]. Krónikus gyulladásban a nagy mennyiségben termelődő reaktív oxigén- és nitrogénszármazékok immunsejteket toboroznak, felerősítik a szabályozási zavarokat, és olyan mikrokörnyezetet

hoznak létre, amely elősegíti a daganatképződést. Amennyiben képződésük meghaladja az endogén antioxidáns rendszer kapacitását, a nukleinsavakat, lipideket és fehérjéket érő oxidatív károsodás genetikai és epigenetikai módosulásokhoz vezethet, érintve az onkogének és tumorszuppresszor gének szabályozását [66].

Az oxidatív stressz számos proliferációval összefüggő jelátviteli út működését befolyásolja, többek között az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) tengelyét, a RAS/RAF modult, a mitogénaktivált protein kináz (MAPK) kaszkád ERK1/2 és MEK komponenseit, valamint a PI3K, a foszfolipáz C (PLC) és a protein kináz C (PKC) útvonalait, amelyek érzékenyen reagálnak a redoxkörnyezet változásaira. [67].

A reaktív oxigénszármazékok a p53 tumorszuppresszor gén expresszióját is módosíthatják, ami a sejtciklus és az apoptózis szabályozásának zavarán keresztül hozzájárulhat a tumoriniciációhoz és -progresszióhoz [68, 69].

2.3.3 Makromolekulák oxidatív károsodása

A fehérjék oxidatív módosulásai – például szulfhidril-oxidáció, karboniláció, nitrózás vagy keresztkötések kialakulása – szerkezeti és működésbeli zavarokat okoznak, rontják az enzimaktivitást, a jelátvitelt és a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. Tartós terhelés esetén mindez a proteosztázis felborulásához és károsodott fehérjék felhalmozódásához vezet.

A DNS-t elsősorban a hidroxilgyök ($\bullet\text{OH}$) károsítja; a sérülések mutációk, genetikai instabilitás és epigenetikai eltérések forrásai lehetnek, érintve az onkogéneket és tumorszuppresszor géneket [70, 71].

A lipidek oxidatív károsodása lipidperoxidációt vált ki, amely megváltoztatja a membrán fluiditását és permeabilitását, valamint a beágyazott fehérjék működését. A keletkező reaktív aldehidek további fehérje- és DNS-módosulásokat idézhetnek elő. A lipidperoxidáció alacsony mértékben adaptív válaszokat válthat ki, magasabb szinten azonban apoptózist vagy nekrozist indukálhat. A másodlagos aldehidek közül a malondialdehid (MDA) gyakori jelzőmolekula [72].

2.3.4 Antioxidáns terápiás stratégiák daganatokban

Mivel a reaktív oxigénszármazékok a daganatképződés és -progresszió kulcsszereplői, a redox-egyensúly célzott modulálása ígéretes daganatellenes megközelítés. A tumorsejtek gyakran eleve magas reaktív oxigénszármazék-szinttel élnek, ezért érzékenyebbek a további oxidatív terhelésre, ami teret ad a prooxidáns stratégiáknak is. Több antioxidáns és gyenge prooxidáns hatóanyag jutott preklinikai és klinikai vizsgálati fázisba [73].

A klinikai hatásosság változó, ami magyarázható a laboratóriumi és humán környezet közti különbségekkel, farmakokinetikai sajátosságokkal, biohasznosulási eltérésekkel, valamint azzal, hogy egyes vegyületek koncentráció- és oxigénnyomás-függően antioxidáns vagy prooxidáns tulajdonságot mutatnak

További nehézség, hogy számos citosztatikum önmagában is magas ROS-szintet kelt, így az antioxidáns alkalmazása elméletileg gyengítheti a daganatellenes hatást.[74, 75].

2.3.5 Antioxidánsok szerepe a kemo- és radioterápiás válasz modulálásában

Egyes antioxidánsok a kemoterápia és radioterápia hatékonyságát növelhetik a reaktív oxigénszármazékok egyensúlyának áthangolásával és a daganatszövet radioszenzitizálásával [76, 77]. Leírták, hogy E-vitamin és kurkumin bizonyos gyógyszerekkel kombinálva fokozhatja a tumorsejt-apoptózist, részben a reaktív oxigénszármazékok emelésén keresztül [78].

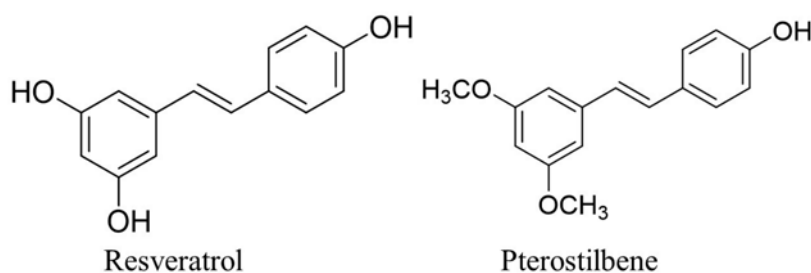
Más antioxidánsok – például C-vitamin vagy N-acetilcisztein – az oxidatív stressz mérséklésével csökkenthetik a kezeléshez társuló szöveti károsodást [79]. A vizsgálati eredmények daganattípusonként és kezelési környezetben eltérnek.

E-vitamin és szelén esetében beszámoltak életminőség-javulásról és alacsonyabb toxicitásról, ugyanakkor bizonyos összefüggésekben a tumorprogresszió kockázatának növekedéséről is [80].

A változatos kimenetek hátterében a daganatok metabolikus heterogenitása állhat; egyes tumorok az oxidatív stresszt túlélési előnyként használják, míg mások az endogén antioxidáns rendszerek – például a glutation-peroxidáz 4 vagy az Nrf2-út vonal – túlaktiválásával válhatnak rezisztenssé. Ígéretes irány a tumorspecifikus antioxidáns-szállító rendszerek fejlesztése és a daganatspecifikus metabolikus sérülékenységek azonosítása [81-83].

2.4 Pterostilbén

A pterostilbén (3,5-dimetoxi-4'-hidroxi-transz-szilbén) természetes stilbenoid és fitolexin, a rezveratrol dimetil-éter analógja [84]. A pterostilbén kémiai szerkezete abban különbözik a rezveratroltól, hogy nem három hidroxilcsoportot, hanem 2 metoxi- és egy hidroxil csoportot tartalmaz. Ez várhatóan jobb membrán-permeabilitást és lipofilitást eredményez, illetve bizonyítottan több modellben erősebb farmakológiai aktivitással társul (4. ábra) [85].



4. ábra. A resveratrol és a pterostilbén kémiai szerkezete. Adaptált forrás: [216]

Növényi másodlagos metaboliként környezeti stresszhatások – például UV-sugárzás, aszály vagy kórokozó-támadás – indukálják [86, 87]. Először a vörös szantálfa (*Pterocarpus santalinus*) gesztjéből izolálták, később több növényben és élelmiszerben, így bogyós gyümölcsökben, szőlőben és földimogyoróban is azonosították [88, 89]. A rezveratrolból történő képződését rezveratrol-O-metiltransferáz katalizálja [90].

Az áfonyakivonat – amely gyakori összetevője szemvitamin-készítményeknek – kiemelkedő antioxidáns-tartalma miatt értékelt, különösen az antociánok és flavonoidok révén [6, 91].

Kémiai váza két fenilgyűrűből és egy szubsztituált etilénhídból áll. A szerkezeti sajátosságokhoz antioxidáns, gyulladáscsökkentő és neuroprotektív aktivitás társul [92, 93].

Neuroprotektív aktivitását több kísérletes modell igazolta [94], ami alapján retinális I/R környezetben a funkcionális károsodás és a neuronális sejtpusztulás mérséklésének racionális célpontja lehet [95-97].

Preklinikai vizsgálatok a pterostilbén kedvező hatásait írták le daganatbiológiai, kardiometabolikus és neurokognitív modellekben egyaránt [207]. Farmakokinetikai szempontból más stilbénekhez viszonyítva kedvezőbb orális biohasznosulást és nagyobb hepatikus stabilitást mutat, ami potenciális klinikai alkalmazhatóságát támogatja [98, 99].

2.5 OLETF-LETO patkánymodell

A kolekisztokinin-1 receptor (CCK₁R) funkcionális szerepének vizsgálatára széles körben alkalmazott genetikai modell az Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) patkánytörzs. E törzsre a CCK₁R gén veleszületett hiánya jellemző, amely lehetővé teszi a CCK₁R-mediált folyamatok tanulmányozását. Fenotípusosan hiperfágia és korai elhízás figyelhető meg, a 18. hét után rendszerint hiperglikémia alakul ki, míg 40 hetes korra a hasnyálmirigy-szigetek fibrózisa észlelhető. A Long Evans Tokushima Otsuka (LETO) törzs genetikailag rokon, nem diabéteszes, CCK₁R-pozitív kontroll vonalnak tekinthető.[100, 101]

2.6 Kolekisztokinin

A perifériás hormonként és központi neurotranszmitterként működő kolekisztokinin (CCK) biológiai aktivitását először egy 33 aminosavas peptid formájában írták le [102].

Étkezésre válaszul a bélhámsejtek CCK-t szekretálnak, amely epehólyag-összehúzódot vált ki, fokozza a hasnyálmirigy-enzim-szekréciót, lassítja a gyomorürülést és hozzájárul a jóllakottságérzet kialakulásához. A központi idegrendszerben a fájdalomérzet, a szorongás és az energia-homeosztázis szabályozásában vesz részt [103] (**5. ábra**).

A CCK-felszabadulást tápanyag-ingerek modulálják: a zsírsavak G-protein-kapcsolt receptor 120 (GPR120) -mediált Ca²⁺-jelátvitelen keresztül, az aminosavak és bizonyos keserű vegyületek pedig fokozzák a szekréciót [104, 105]. A keringésben több biológiailag aktív izoforma fordul elő (CCK-58, CCK-33, CCK-22, CCK-8), míg a rövidebb CCK-8 és CCK-5 főként központi neurotranszmitterként funkcionál [104].

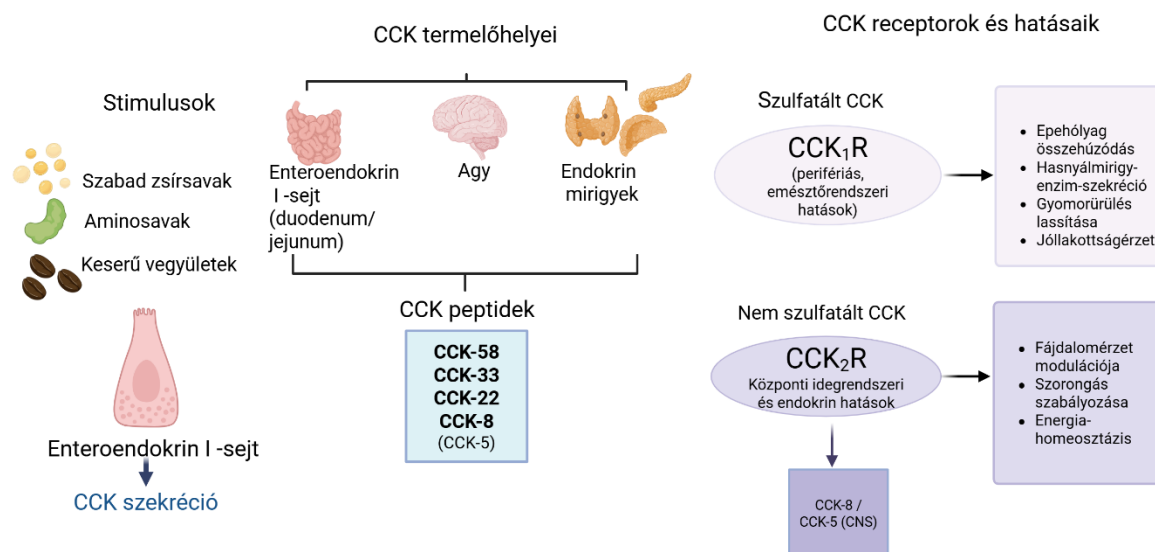
A CCK hatásait két fő G-fehérjéhez kapcsolt receptor közvetíti. A CCK₁R elsősorban a perifériás emésztőrendszeri válaszok mediátora, míg a CCK₂R szélesebb ligandkötési specificitással rendelkezik, és jelentős szerepet tölt be a központi idegrendszeri folyamatokban [106]. Mindkét receptor hét transzmembrán doménnel rendelkező G-fehérjéhez kapcsolt receptor (GPCR), amely Ca²⁺-függő és egyéb másodlagos hírvivő-rendszerek aktiválásán keresztül génexpressziós és funkcionális változásokat indít el [107]. A jelátvitel sejtciklusra és proliferációra gyakorolt hatását több modellben is igazolták, ami túlmutat a klasszikus

emésztőszervi szerepeken, és a CCK-rendszert a proliferációt/differenciálódást szabályozó szöveti citokin rendszerekkel is összekapcsolja [108].

A CCK-rendszer metabolikus jelentőségét jól szemlélteti az Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) patkánymodell, amely veleszületett CCK₁R-hiánnyal rendelkezik. Az állatok hiperfágiát, elhízást és hiperglikémiát mutatnak, ami rámutat a CCK szerepére a metabolikus homeosztázis fenntartásában [100, 101, 109].

Az onkológiai irodalom a CCK-receptorokat több tumor növekedési hajtóerejeként írja le. Fiziológias dózisu exogén CCK *in vitro* serkenti humán hasnyálmirigy-rák-sejtek proliferációját, és *in vivo* fokozza transzplantált daganatok növekedését. Növekedésserkentő hatását számos daganattípusban – többek között gasztrointesztinális, hepatobiliáris, endokrin és központi idegrendszeri tumorokban – is igazolták [110, 111].

A CCK-rendszer funkciója az emésztőrendszeri válaszkóttól a központi idegrendszeri szabályozáson át a proliferációs folyamatok befolyásolásáig terjed, ami indokolja széleskörű kutatási jelentőségét.



5. ábra. A CCK felszabadulása, valamint a CCK₁R és CCK₂R receptorokon keresztül közvetített fő perifériás és központi hatások. (BioRender, saját készítésű ábra)

2.7 Közös sejtszintű mechanizmusok obezításban

A kolecisztokinin rendszer kórélettani szerepének értelmezéséhez fontos figyelembe venni azokat a metabolikus állapotokat is, amelyek a sejtes jelátviteli folyamatokat befolyásolják.

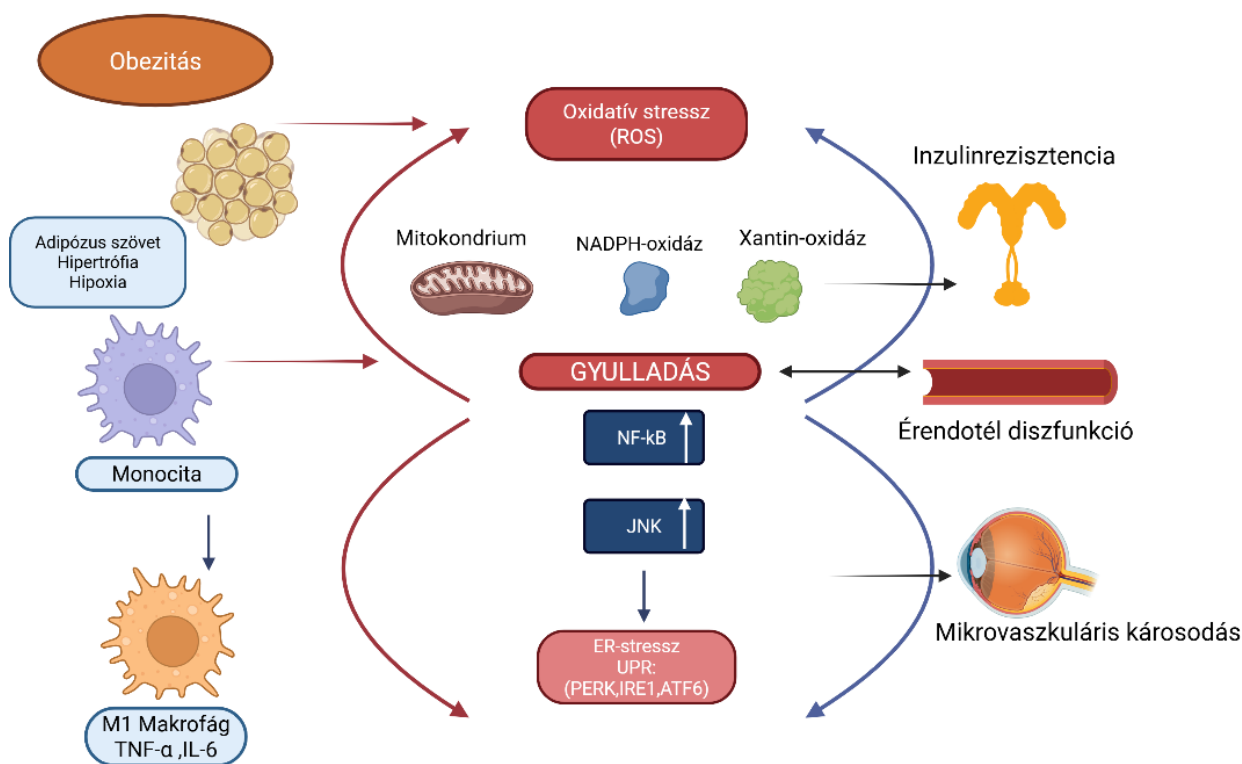
Az obezitás (elhízás) olyan komplex metabolikus állapot, amely krónikus, alacsony fokú gyulladással, oxidatív stresszel és kiterjedt jelátviteli zavarokkal társul. Az obezitás patomechanizmusainak ismertetése a teljesség igénye nélkül történik, a továbbiakban a vizsgált modellek szempontjából releváns sejtszintű mechanizmusokra fókuszálva.

Az obezitás patofiziológiáját az inzulin- és leptinrezisztencia jellemzi, amelyek háttérében krónikus gyulladás, valamint oxidatív és endoplazmatikus retikulum (ER)-stressz áll [112, 113]. A tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) és interleukin-6 (IL-6) mediált gyulladás a JNK és IKK β jelátviteli útvonalakon keresztül rontja az inzulinérzékenységet [114, 115], míg leptinrezisztenciában fokozódik a reaktív oxigénszármazék-képződés, csökken a nitrogén-monoxid biohasznosulása, és fokozódik az adhézis molekulák expressziója [116, 117].

Obezitásban kialakuló gyulladást (,,meta-inflammáció”) az adipózus szövet átépülésének következménye, amely fokozott citokin- és kemokin-termeléssel, valamint az immunsejt-összetétel proinflammatorikus irányú eltolódásával jár [118, 119]. A gyulladással párhuzamosan oxidatív stressz alakul ki, amelynek fő forrásai a mitokondrium, a NADPH-oxidáz és a xantin-oxidáz [120]. A reaktív oxigénszármazékok az NF- κ B és JNK útvonalak aktiválásán keresztül fenntartják a gyulladás–redox visszacsatolási hurkot [121], míg az ER-stressz (PERK, IRE1, ATF6) az unfolded protein response (UPR) aktivációján keresztül proinflammatorikus génexpressziót indukál és rontja az inzulinjelátvitelt [122] (6. ábra).

Az oxidatív stressz és gyulladás biomarkerei obezitásban emelkedettek és korrelálnak az inzulinrezisztencia mértékével [123]. Az obezitásban fennálló gyulladás és oxidatív stressz csökkenti a nitrogén-monoxid biohasznosulását, fokozza az adhézis molekulák expresszióját és a leukocita–endotél interakciókat, ami a mikrokeringés károsodásához vezet [117, 124, 125].

Ezen gyulladásos és redox egyensúlyzavarok olyan alapvető sejtszintű mechanizmusokat érintenek, amelyek az iszkémia–reperfúziós sérülés és a citotoxikus ágensek által indukált sejtkárosodás kialakulásában is meghatározó szerepet játszanak.



6. ábra. Az obezitásban kialakuló gyulladás–oxidatív stressz visszacsatolási kör és annak sejtszintű következményei. (BioRender, saját készítésű ábra)

2.8 CCK-receptor-antagonisták

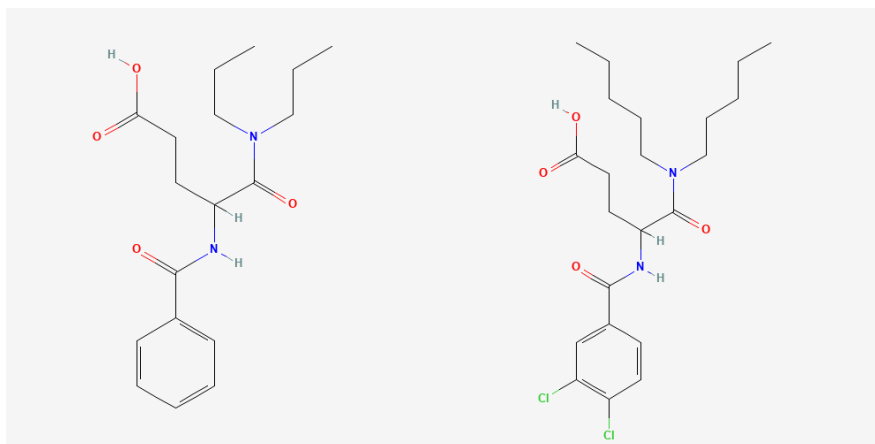
A CCK-receptorok farmakológiai gátlása hatékony eszközt jelent a kolecisztokinin által közvetített jelátviteli folyamatok módosítására. A CCK-receptor-antagonisták a CCK₁R és CCK₂R aktivációjának gátlásával csökkentik a CCK-függő jelátvitelt. Farmakológiailag három csoport különíthető el: nem szelektív antagonisták (pl. proglumid), CCK₁R-szelektív szerek (lorglumid, devazepid) (**7. ábra**), valamint CCK₂R-szelektív antagonisták (pl. L-365,260, LY225910). A szelektivitás jelentősége abból fakad, hogy a CCK₁R elsősorban perifériás emésztőrendszeri és metabolikus válaszokat, míg a CCK₂R központi idegrendszeri és proliferációs folyamatokat közvetít.

A transzlációs érdeklődés alapja, hogy a CCK-jelátvitel több tumorban proliferatív és fibrotikus mikrokörnyezetet támogató, valamint immunmoduláló hatásokat fejt ki, ezért antagonistáit önmagukban és kombinációban is vizsgálják onkológiai modellekben [104, 126, 127].

A receptorblokádk következtében kialakuló antikarcinogén hatás több, egymással összefüggő molekuláris mechanizmuson keresztül érvényesül. A CCK-mediált proliferációs jelátviteli útvonalak – különösen a MAPK/ERK és PI3K/AKT tengelyek – gátlása a sejtciklus G₁/S átmenetének lassulásához, a cyclin D1 expresszió csökkenéséhez és a proliferáció mérséklődéséhez vezet [128]. Ezzel párhuzamosan fokozódhat az apoptózis, amelyet a Bax/Bcl-2 arány eltolódása és a kaspáz kaskád aktivációja közvetít, elsősorban a mitokondriális apoptózis útvonalon keresztül. A CCK-jelátvitel blokkolása megszakítja a tumorsejtek autokrin és parakrin növekedési hurkait, ezáltal csökkenti az önfenntartó proliferációs stimulusokat [129]. Emellett mérséklődik az angiogenezis, részben a VEGF-expresszió és az endothel sejtek proliferációjának csökkenése révén, ami a tumor vaszkularizációjának és tápanyagellátásának korlátozásához vezet. A receptorantagonizmus továbbá gátolja az extracelluláris mátrix lebontásában szerepet játszó metalloproteinázok aktivitását, ezáltal csökkenti a sejtmigrációt és az invazív fenotípus kialakulását. A tumormikrokörnyezet szintjén befolyásolják a stromális és immunsejtek közötti interakciókat, ezáltal a daganat növekedése szempontjából kedvezőtlenebb mikro-környezetet alakítanak ki.[130] Ezen túlmenően a CCK-jelátvitel gátlása indirekt módon a hormonális és metabolikus szabályozás módosításán keresztül is hozzájárulhat a tumornövekedést támogató szignálok csökkentéséhez [110, 131]. Preklinikai és korai klinikai adatok alapján több malignus sejtvonalon antiproliferatív hatás igazolható, és *in vivo* is mérséklődik a tumorprogresszió. A nem szelektív proglumid – bár viszonylag gyenge antagonistá – csökkentette a hasnyálmirigy intraepitheliális neoplázia növekedését és a tumorhoz társuló fibrózist [132], hepatokarcinóma-modellekben lassította a progressziót [133] valamint immune checkpoint-gátlókkal kombinálva javította a túlélést humán hepatocelluláris karcinóma modellben [134]. A CCK₁R-szelektív lorglumid és devazepid hasnyálmirigy karcinogenezisben mutatott gátló hatást [135, 136], míg CCK₂R-antagonistákat hasnyálmirigyrák klinikai vizsgálataiban is teszteltek [137, 138]. Gasztrektómiát követően a gyomor adenokarcinómában szenvedő betegek adjuváns proglumidkezelése kedvezőbb hosszú távú túléléssel társult [139].

A CCK-antagonisták hatása nem korlátozódik a szolid tumorokra. Bár a hemopoézisre gyakorolt hatásukat kevés vizsgálat elemezte, ismert, hogy érett neutrofilek és makrofágok – a granulocita–makrofág progenitorok (CFU-GM) leszármazottai – reagálhatnak CCK-ra és antagonistáira [140, 141]. A CCK₂R mieloid és limfoid eredetű leukémiás sejtvonalakon is

kimutatható [129], és CCK₂R-antagonistákat antileukémiás szerként is vizsgáltak [142]. Kísérletes adatok arra utalnak, hogy a CCK-jelátvitel a csontvelő-eredetű immunsejteken keresztül befolyásolhatja a gyulladásos és granulopoetikus folyamatokat.



7. ábra. A proglumid (PubChem CID: 4922) és a lorglumid (PubChem CID: 3960) kémiai szerkezete. Adaptált forrás: PubChem Compound Database.

2.9 A csontvelői sejtképzés folyamata

A csontvelőben zajló hemopoézis biztosítja a vérsejtek folyamatos utánpótlását, fenntartva a gázcsere, az immunvédelem és a hemosztázis élettani egyensúlyát. A hierarchia csúcsán elhelyezkedő multipotens hematopoetikus őssejtek (HSC-k) önfenntartásra és valamennyi hematopoetikus vonal irányába történő differenciációra képesek (**8. ábra**). A HSC-kből két fő progenitorpopuláció alakul ki: a közös mieloid progenitor (CMP) és a közös limfoid progenitor (CLP). A CMP tovább differenciálódik megakariocita–eritroid progenitorrá (MEP) és granulocita–makrofág progenitorrá (CFU-GM), melyből granulociták, monocita/makrofágok differenciálódnak. [143].

A HSC-k működését a csontvelői mikrokörnyezet, a niche szabályozza. A stromális sejtek által termelt jelzőmolekulák – például az őssejt-faktor (Stem Cell Factor, SCF) és a C–X–C motívumú kemokin ligandum 12 (CXCL12) – elősegítik az őssejtek csontvelőben maradását, túlélését és funkcionális aktivitását. [144]. A differenciációt vonalspecifikus citokinek irányítják: az eritropoietin az eritropoézist, a trombopoietin a megakariopoézist, a G-CSF pedig a granulopoézist támogatja [143].

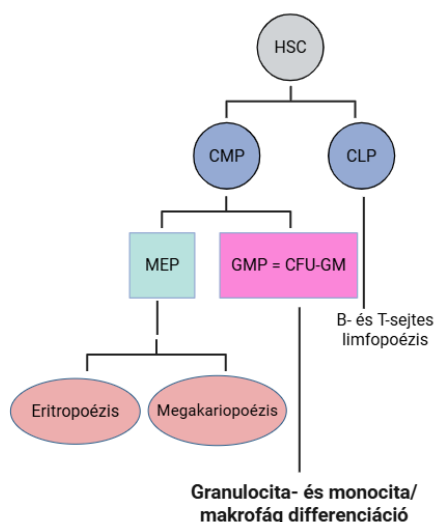
A *granulopoézis* során a CFU-GM-ből mieloblaszt, promielocita, mielocita, metamyelocita és stab forma alakul ki, amelyet érett neutrofil, eozinofil vagy bazofil granulocita követ. Gyulladásos vagy toxikus inger esetén „sürgősségi” granulopoézis aktiválódik, és a periférián éretlenebb alakok is megjelenhetnek.

Az *eritropoézis* a CMP-ből kiindulva megakariocita–eritroid előalak kialakulásával indul, majd proeritroblaszt és további érési stádiumok után retikulocita, végül érett vörösvérsejt képződik; a folyamat kulcsregulátorai az eritropoietin-jelátvitel és a vas-homeosztázis.

A *megakariopoézis* során az előalak endomitózison megy át, poliploiddá válik, majd proplatelet-nyúlványokat képez, amelyekből vérlemezkék szabadulnak fel; a programot döntően a trombopoietin és megakariocita-specifikus transzkripció hálózat szabályozza.

A CLP-ből induló *limfopoézis* során a B- és T-sejtes, valamint veleszületett limfoid sejtvonalak differenciációja valósul meg. A B-sejtes fejlődés során pro-B és pre-B stádiumok követik egymást a nehéz- és könnyű immunoglobulin-láncok rendezett génátrendeződésével; a pozitív szelekción átesett éretlen B-sejtek a perifériában fejezik be érésüket és funkcionális differenciációjukat. A T-sejtek elköteleződése korán megindul, azonban a végleges érési és szelekciós folyamatok a csecsemőmirigyben zajlanak.

A hemopoézis adaptív és életkori dinamikát mutat. Akut vérvesztés, hipoxia vagy fertőzés esetén a niche citokin- és kemokinprofilja módosul, ami gyorsított vonalkimenetet eredményez. Időskorban mieloid irányú eltolódás („myeloid bias”) figyelhető meg, miközben a limfoid termelés csökken, hozzájárulva az immunrendszer funkcionális hanyatlásához [145, 146].



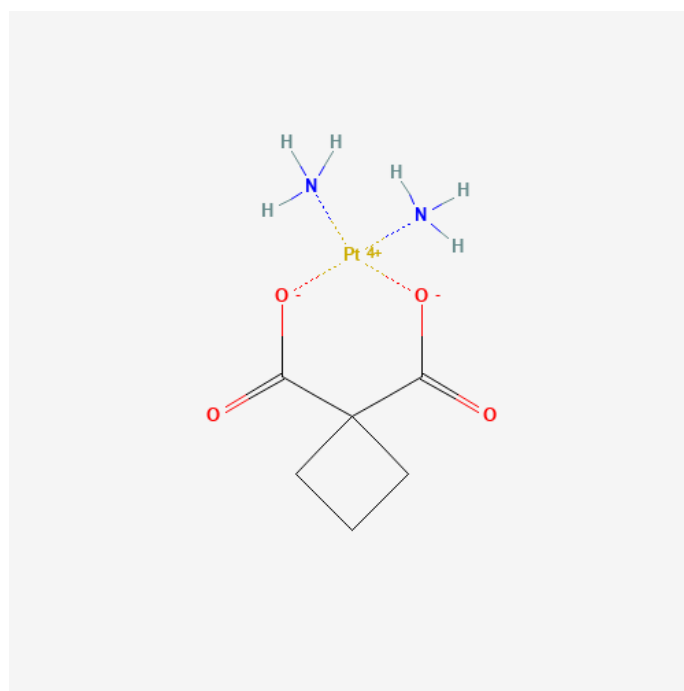
8. ábra. A hematopoetikus sejtvonalak főbb lépései és a CFU-GM helye a mieloid differenciáció során. (BioRender, saját készítésű ábra)

2.10 Karboplatin

A karboplatin intravénásan alkalmazható platina-komplex és a ciszplatin analógja, amelyben a kloridligandumokat a karboxi-ciklobután-dikarbonsav (CBDCA) kelátligandum helyettesíti (**9. ábra**). Alkilező ágensként DNS-láncon belüli és láncok közötti keresztkötéseket hoz létre, gátolja a DNS-, RNS- és fehérjeszintézist, és elsősorban a gyorsan osztódó sejtekben apoptózist indukál. Klinikai alkalmazását 1989-ben engedélyezték; leggyakrabban előrehaladott petefészek-karcinómában használják, de fej-nyaki és tüdőtumzorok kezelésében is elterjedt. Mellékhatásprofilja a platina-származékokra jellemző gasztrointesztinális és szervtoxikus tüneteket foglalja magában (neuro-, oto- és nefrotoxicitás), ugyanakkor általában kedvezőbb tolerálhatóságú, mint a ciszplatin [147, 148].

A karboplatin dózislimitáló toxicitása a csontvelő-szupresszió. A kialakuló neutropénia, trombocitopénia és anémia mértékét az alkalmazott dózis, az expozíció és a csontvelői tartalék határozza meg. A granulopoézis különösen érzékeny a platinaalapú citotoxikus ágensekre; a korai és kifejezett neutropénia a karboplatin-indukálta csontvelő-károsodás megbízható indikátora, ami a CFU-GM központi szerepére utal a csontvelő-toxicitás patomechanizmusában [147].

Kísérletes és klinikai adatok alapján a metabolikus állapot jelentősen befolyásolja a kemoterápiára adott hematológiai választ. Az elhízáshoz és 2-es típusú diabéteszhez társuló inzulinrezisztencia módosítja a csontvelő mikrokörnyezetét, és fokozhatja a progenitorsejtek citotoxikus ágensekkel szembeni sérülékenységét. Obezitásban a CFU-GM populáció funkcionális érzékenysége, sérülékenysége fokozódhat, ami a granulopoézis zavarára és a csontvelői jelátvitel áthangolódására utal [185] [149]. Mindez arra hívja fel a figyelmet, hogy a karboplatin mielotoxicitása nem csupán dózis-, hanem állapotfüggő jelenség [143].



9. ábra. A karboplatin (PubChem CID: 56840877) kémiai szerkezete. Adaptált forrás: PubChem Compound Database.

3 Célkitűzések:

Az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

1. A pterostilbén retina-védő hatásának vizsgálata egészséges körülmények között, valamint iszkémia–reperfúziós károsodást követően, különös tekintettel a retinális ganglionsejtek túlélésére, a gliális reakciók alakulására, a gyulladásos és sejtkárosodással összefüggő molekuláris folyamatokra, a retina szerkezeti változásaira, valamint az elektroretinográfiával mérhető funkcionális eltérésekre.
2. A vizsgálat célja a kolecisztokinin (CCK) jelátvitel szerepének feltárása a csontvelői granulocita–makrofág progenitorsejtek (CFU-GM) citotoxikus sérülékenységeinek alakulásában. Ennek során elemeztük a CCK-1 receptorhiány és a farmakológiai CCK-antagonizmus hatását, valamint vizsgáltuk ezek kölcsönhatását a karboplatin által kiváltott citotoxikus terheléssel.

4 Anyagok és módszerek

4.1 A pterostilbén hatása retinális iszkémia–reperfúziós modellben

4.1.1 Kísérleti állatok és kezelések

A vizsgálatokhoz 18 hetes, 500–600 g testtömegű, hím Sprague–Dawley (SD) patkányokat alkalmaztunk (Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, MA, Egyesült Államok). A Sprague–Dawley törzs széles körben alkalmazott farmakológiai és toxikológiai vizsgálatokban, valamint jól validált retinális iszkémia–reperfúziós modellekben.

Az állatokat a Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet állatházában, standard laboratóriumi körülmények között tartottuk (22–24 °C, 12 órás világos–sötét ciklus), vízhez és standard rágcsálótáphoz korlátlan hozzáféréssel. A kísérlet megkezdése előtt két hét akklimatizációs időszakot biztosítottunk.

Az állatokat ezt követően véletlenszerűen két csoportba osztottuk ($n = 10$ /csoport). A kontrolles csoport hidroxetil-cellulózt tartalmazó, vízbázisú mucilágó vivőanyagot (MUCI) kapott (Formulae Normales VIII, Debreceni Egyetem Gyógyszertára), míg a kezelt csoport az említett vivőanyagban oldott pterostilbén-kezelésben részesült (PTER).

A pterostilbént (Apollo Scientific, BIP1700, HPLC tisztaság $\geq 97\%$) napi 5 mg/kg dózisban, gyomorszondán keresztül adagoltuk, napi egyszeri beadással, öt héten keresztül.

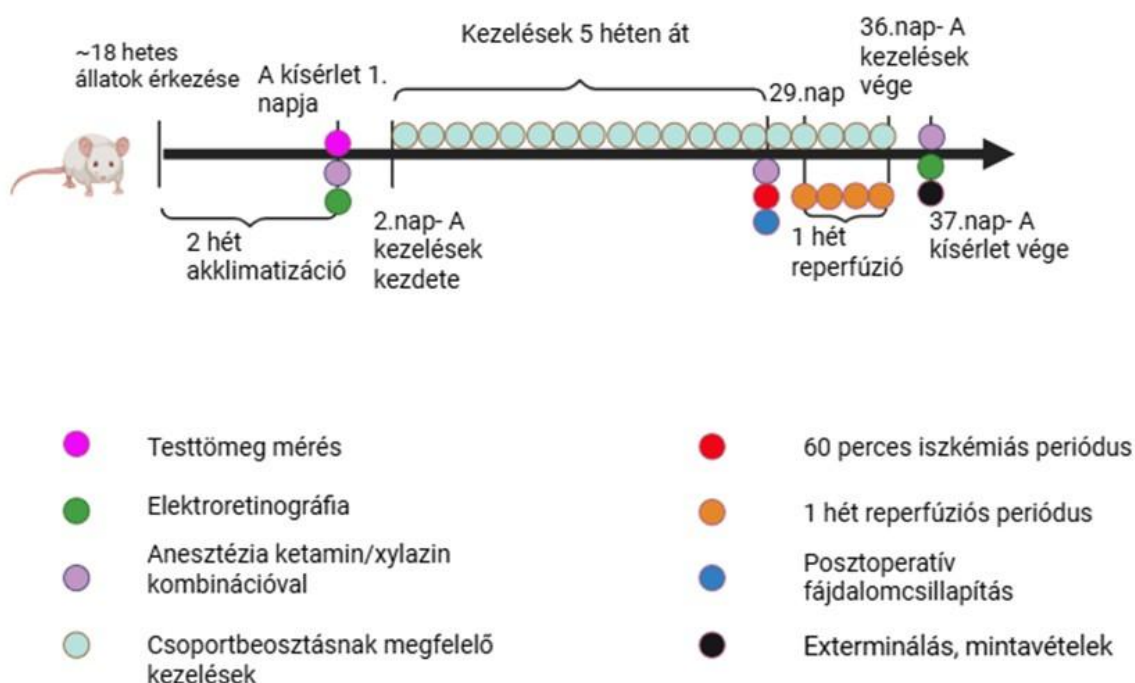
A pterostilbén szisztémás hatásainak kizárása érdekében az iszkémia–reperfúziós (I/R) sérülést kizárólag a bal szemben hoztuk létre, míg a jobb szemek belső kontrollként szolgáltak (NO IR). A csoportbeosztást és a kezelési protokoll részleteit az **1. táblázat** tartalmazza. Valamennyi beavatkozást az érvényben lévő intézményi és etikai irányelveknek megfelelően végeztük, az állatlétszám minimalizálására és a 3R-elv betartására törekedve.

A kísérleti tervet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága vette nyilvántartásba (regisztrációs szám: 14/2022/DEMÁB), és a Hajdú- Bihar Megyei Kormányhivatal, Agrárügyi Főosztály, Élelmiszerlánc- biztonsági és

Állategészségügyi Osztály engedélyezte. A kísérleti protokoll időbeli felépítését a **10. ábra** szemlélteti.

Csoport	Állatok száma	Kezelés	Vizsgálatok
1	10 db hím Sprague–Dawley patkány	<i>Pterostilbén</i> nel kezelt csoport: Bal (ligált) szem: PTER IR Jobb (nem ligált) szem: PTER NO IR	Elektroretinográfia (ERG) Western blot Hisztológia
2	10 db hím Sprague–Dawley patkány	<i>Vivőanyaggal</i> (mucilagó) kezelt csoport: Bal (ligált) szem: MUCI IR Jobb (nem ligált) szem: MUCI NO IR	Elektroretinográfia (ERG) Western blot Hisztológia

1. táblázat. A kísérleti csoportok, kezelések és vizsgálatok áttekintése a retina iszkémia–reperfúziós modellben.



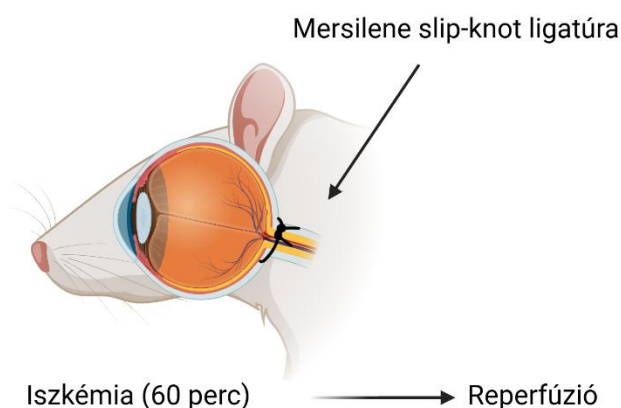
10. ábra. A kísérleti protokoll időbeli felépítése a retina I/R modellben. (BioRender, saját készítésű ábra)

4.1.2 Retinális iszkémia–reperfúziós modell

Az általános érzéstelenítést ketamin–xilazin kombinációval végeztük (100/10 mg/kg, intraperitoneálisan (i.p.). Az anesztézia megfelelő mélységét a fájdalomingerre adott reakció hiánya jelezte. A bal szem felszínére lokális érzéstelenítés céljából oxibuprokain-tartalmú szemcseppet alkalmaztunk (Humacain 4 mg/ml, Teva Zrt., Debrecen, Magyarország).

Az iszkémiás modell kivitelezéséhez korábban közölt protokollt alkalmaztunk [150]. A bal szemgolyót óvatosan előemeltük az orbitából, majd polietilén kanül segítségével poliészterrostos fonalból (Mersilene, 2 mm, Ethicon Inc., Cincinnati, OH, Egyesült Államok) slip-knot hurkot helyeztünk a szem mögé úgy, hogy a ligatúra a látóideget, a retinális ereket és a retrobulbáris kötőszövetet egyaránt körbefogja (**11. ábra**).

A csomó fokozatos meghúzásával a retina vérellátása megszűnt, amely globális retinális iszkiémiát eredményezett. Az iszkiémiá kialakulását oftalmoszkópos vizsgálattal ellenőriztük; a szemfenék elsápadása a keringés megszűnését jelezte. Az altatás ideje alatt a szemfelszínt karbomeralapú géllal védtük a kiszáradástól (Vidisic, Bausch & Lomb, Berlin, Németország). Az iszkiémiás periódust 60 percen keresztül tartottuk fenn, ezt követően a ligatúrát meglazítottuk és eltávolítottuk, lehetővé téve a retina reperfúzióját. A keringés helyreállítását ismételt szemfenékvizsgálattal erősítettük meg.



11. ábra. A retina iszkiémiá kiváltására alkalmazott retrobulbáris Mersilene slip-knot ligatúra patkányban. (BioRender, saját készítésű ábra)

4.1.3 Elektroretinográfia

A retina funkcionális vizsgálatát Ganzfeld-típusú flash elektroretinográffal végeztük (HMSeRG, OcuScience, Henderson, NV, Egyesült Államok) korábban közölt protokoll alapján [151].

Az állatokat ketamin–xilazin kombinációval altattuk (100/10 mg/kg, i.p.). A pupillatágítást ciklopentolát-tartalmú szemcseppel végeztük (Humapent, Teva Zrt., Debrecen, Magyarország), majd az állatokat 20 percen át sötétadaptáltuk. A mérések során az állatokat hason fekvő helyzetben, fűthető padon (ATC 2000, WPI, Sarasota, FL, Egyesült Államok) tartottuk, a testhőmérsékletet 37 °C-on fenntartva.

Mindkét szemre aranybevonatú szaruhártya-kontaktlencse elektródát helyeztünk (ERG-jet, Fabrinal SA, La Chaux-De-Fonds, Svájc). Referencia- és földelektródaként rozsdamentes acél tűelektródákat alkalmaztunk, amelyeket szubkután (s.c.) az állkapocs fölé, illetve a farok tövébe helyeztünk. A megfelelő kontaktus és a szaruhártya hidratáltságának biztosítására vezetőképes gélt alkalmaztunk.

A felvételek mindkét szemből egyidejűleg, Ganzfeld-kamrában készültek. Flash-stimulációkat alkalmaztunk sötétadaptált (szkotopikus) és fényadaptált (fotopikus) körülmények között. A fehér fényű flash intenzitása $-2,5$ és $+1 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ között változott. A fotopikus mérések előtt $30 \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ háttérvilágítás mellett 10 perces fényadaptációt végeztünk.

A jelfeldolgozás során 1–300 Hz sávszélességű szűrést alkalmaztunk. Minden intenzitási szinten tíz választ átlagoltunk; az ingerlések közötti időköz az inger erősségétől függően 2–20 másodperc volt.

Az oszcillációs potenciálok (OP) értékelését $3000 \text{mcd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ intenzitású ingerre adott válaszok alapján végeztük, a felvételek utólagos 100–300 Hz tartományban történő szűrésével. Az OP amplitúdóját a legmagasabb pozitív és a legmélyebb negatív csúcs különbségeként, az implicit időt a pozitív csúcs megjelenéséig eltelt időként határoztuk meg. Szemenként négy átlagolt OP-értéket vettünk figyelembe.

Az adatok feldolgozását az ERG rendszerhez biztosított szoftverrel végeztük (ERGView 4.380, OcuScience, Henderson, NV, Egyesült Államok).

4.1.4 Western blot

Az első kísérlet lezárását követően az állatokat anesztetikum túladagolásával eutanizáltuk, majd a szemgolyókat eltávolítottuk és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk a feldolgozásig ($n = 4/\text{csoport}$).

A mintákat porrá zúztuk, majd homogenizáló pufferben szuszpendáltuk (25 mM Tris, 25 mM NaCl, 1 mM Na-ortovanadát, 10 mM NaF, 10 mM Na-pirofoszfát, 10 mM okadainsav, 0,5 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 1 mM fenilmetil-szulfonil-fluorid (PMSF), proteáz inhibitor koktél, Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország). Az első centrifugálás (2000 rpm, 10 perc, 4°C) után a felülúszó a citoplazmatikus és mitokondriális fehérjéket tartalmazta, míg a pelletben a nukleáris komponensek maradtak. A pelletet Triton X-100-at tartalmazó pufferben oldottuk, 1 órán át jégen inkubáltuk, majd 14 000 rpm-en 10 percig

centrifugáltuk (4 °C). A kapott felülúszó a nukleáris frakciót képezte. A citoszolos frakciót a korábbi felülúszó további centrifugálásával (10 000 rpm, 20 perc, 4 °C) nyertük.

A fehérjekoncentrációt bicinkoninsav-próbával (BCA) határoztuk meg (QuantiPro BCA Assay Kit, Sigma-Aldrich Merck KGaA), FLUOstar Optima spektrofotométerrel (BMG Labtech, Ortenberg, Németország).

A mintákat Laemmli pufferrel 1:1 arányban elegyítettük, 5 percig forraltuk, majd nátrium-dodecil-szulfát–poliakrilamid gélelektroforézis (SDS–PAGE) vizsgálatnak vetettük alá. A fehérjék elválasztását 12%-os poliakrilamid gélen végeztük (25 mA, ~220 perc; Hoefer miniVE PAGE SE300, Hoefer Inc., Holliston, MA, USA).

A fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (25 V, 90 perc; GE Healthcare, Darmstadt, Németország) majd a membránokat 5%-os szarvasmarha-szérumalbumin (BSA) -oldattal blokkoltuk. Ezt követően Tween-20-szal kiegészített Tris-pufferolt sóoldatban (TBST-oldatban) feloldott primer antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át, 4 °C-on.

Az alkalmazott primer antitestek: anti-hisztón H3 (ab1791, Abcam), anti- β -aktin (A5316, Sigma-Aldrich), anti-PARP1 (ab227244, Abcam), anti-GFAP (ab7260, Abcam), anti-NF κ B (ab16502, Abcam), anti-HSP70 (SAB4200714, Merck).

A membránokat háromszor, 10 percig mostuk TBST-ben, majd torna-peroxidáz (horseradish peroxidase, HRP) -konjugált szekunder antitestekkel inkubáltuk 45 percig (A4416 és A0545, Sigma-Aldrich).

A jelet ECL Prime detekciós oldattal (Cytiva, Amersham, Egyesült Királyság) tettük láthatóvá és LI-COR C-DiGit® blot szkennelvel rögzítettük (LI-COR Inc., Lincoln, NE, Egyesült Államok).

A blotokat ImageJ szoftverrel (NIH, Bethesda, MD, Egyesült Államok) elemeztük.

A sávintenzitásokat háttérkorrekció után hisztón H3-hoz vagy β -aktinhoz normalizáltuk. Csoportonként 4 állat három független blotjának eredményeit értékeltük.

4.1.5 Hisztológiai vizsgálatok

Az állatok eutanáziáját követően csoportonként négy szemgolyót távolítottunk el (n = 4/csoport). A pontos orientáció biztosítása érdekében a szemek felső pólusát jelöltük.

A mintákat 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk (10 g paraformaldehid, 50 μ L 10 N NaOH, 25 mL 10 $\times$ PBS, 200 mL desztillált víz; pH 7,4) 24 órán keresztül, 4 °C-on. A fixálást

követően a szaruhártyán apró bemetszést végeztünk, majd a szemeket 1 órán át folyó vízben öblítettük, ezt követően 70%-os etanolban tároltuk a feldolgozásig.

A mintákat növekvő koncentrációjú alkoholsorozaton (70%, 90%, 100%) vezettük át, xilollal áttisztítottuk, majd paraffinba ágyasztuk (Histowax, Histolab Products AB, Göteborg, Svédország). A paraffinba ágyazott szemgolyókból 5 μ m vastagságú frontális metszeteket készítettünk mikrotóm segítségével.

A kiértékeléshez minden esetben az optikai papilla környékéről származó metszeteket használtuk. A metszetek deparaffinizálását és rehidratálását követően hematoxilin–eozin festést végeztünk. A szöveteket Gill-típusú hematoxilinnel kezeltük (1,5 perc; GHS2128, Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország), majd csapvízzel öblítettük a kék szín kialakulásáig. Ezt követően 3 másodperces eozinfestést alkalmaztunk (Eosin Y alkoholos oldat, 3801600E, Leica Biosystems, Richmond, India).

A retina alsó szegmenséből, a látóidegfő közelében, 40 $\times$ -es objektívvel készítettünk mikroszkópos felvételeket (Nikon Eclipse 80i mikroszkóp, Nikon DS-Fi3 kamera, Nikon Plan Fluor 40 $\times$ /0.75 DIC M/N2 ∞ /0.17 WD 0.66 objektív, Nikon Europe B.V., Amstelveen, Hollandia).

A képfeldolgozást és a méréseket Nikon NIS-Elements BR szoftverrel (verzió 5.41.00) végeztük.

4.1.6 Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag $\pm$ a középérték standard hibája (SEM) formájában fejeztük ki. Az adatok normalitását D'Agostino–Pearson-tesztel ellenőriztük. A csoportok közötti különbségek vizsgálatára egyutas varianciaanalízist [one-way varianciaanalízis (ANOVA)] alkalmaztunk, Tukey-féle post hoc tesztel. Nem normál eloszlás esetén Mann–Whitney-próbát használtunk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism szoftverrel végeztük (verzió 7.00, Windows; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Egyesült Államok).

4.2 OLETF–LETO patkánymodell

4.2.1 Kísérleti állatok

Az OLETF–LETO modellben alkalmazott Long Evans Tokushima Otsuka (LETO) és Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) patkánytörzseket Kazuya Kawano professzor (Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japán) bocsátotta rendelkezésünkre.

Valamennyi állat hímivarú és 8 hetes korú volt. A LETO patkányok testtömege 256 ± 28 g, az OLETF patkányoké 331 ± 34 g volt a kísérlet kezdetén.

A vércukorszint meghatározását egy éjszakás éheztetést követően végeztük, csapvízhez való szabad hozzáférés mellett, glükométerrel (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Budaörs, Magyarország).

Az állatokat az intézetünk állatházában helyeztük el, 12 órás világos–sötét ciklus, 23 ± 2 °C hőmérséklet és $60 \pm 10\%$ relatív páratartalom mellett. Ketrecenként 3–5 állatot tartottunk, standard laboratóriumi tápot és csapvizet ad libitum biztosítva.

A kísérleti tervet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága vette nyilvántartásba (regisztrációs szám: 13/2022/DEMÁB), és a Hajdú- Bihar Megyei Kormányhivatal, Agrárügyi Főosztály, Élelmiszerlánc- biztonsági és Állategészségügyi Osztály engedélyezte.

4.2.2 Kísérleti terv

A hemopoézist 8 hetes, elhízott OLETF és sovány, nem elhízott LETO patkányok combcsonti csontvelőjében vizsgáltuk (n=10-10). Az állatokat intravénásan adott, 100 mg/kg dózisú tiopental-nátrium túladagolással (Thiopental Sandoz, Sandoz Pharmaceutical PLC, Svájc) humánusan eutanizáltuk. Az intravénás beadás a patkány laterális farokvénáján keresztül történt. A combcsontokat steril körülmények között preparáltuk, majd a csontvelőt teljesen kimostuk McCoy's 5A táptalajjal (Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A csontvelőmintákból vékony tűvel ellátott fecskendő segítségével homogén egysejtes szuszpenziót állítottunk elő, amelyet mikroszkóp alatt ellenőriztünk. Ficoll–jodamid

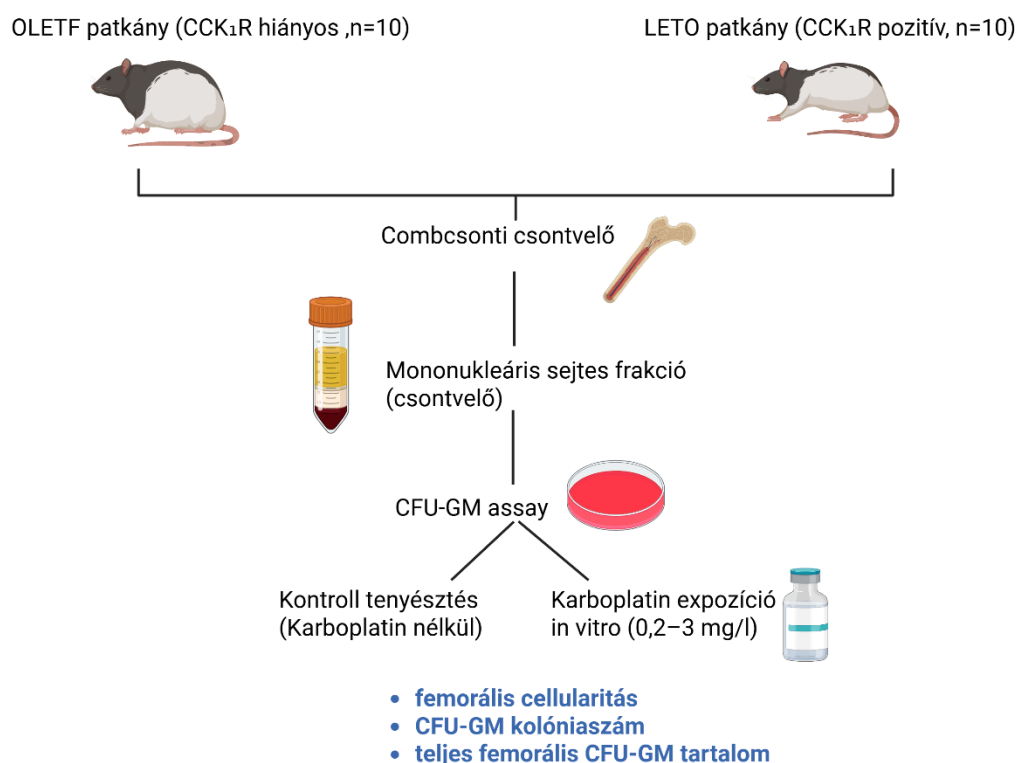
gradienscentrifugálás után a csontvelő mononukleáris sejt frakcióját használtuk fel CFU-GM vizsgálathoz.

A csontvelő-funkciót a teljes femorális cellularitás, a CFU-GM kolóniaszám, valamint a teljes femorális CFU-GM tartalom meghatározásával jellemeztük. A femorális cellularitás a mononukleáris sejtek teljes számát jelzi, amely jól tükrözi a hemopoézis intenzitását valamennyi sejt vonalra kiterjedően. A cellularitást a csontvelő sejtszámlálása és a minták térfogatadatai alapján számítottuk. A CFU-GM progenitorok kolóniaszámát speciális lágy-gél tenyészetekben (CFU-GM assay) határoztuk meg, majd a teljes femorális CFU-GM tartalmat a cellularitás és a kolóniaszám alapján meghatározott gyakoriság szorzataként számoltuk ki. Ez utóbbi paraméter a granulopoézis intenzitását tükrözi. A patkányok csontvelő-mononukleáris sejtjeit normál körülmények között, illetve karboplatin jelenlétében (0,2–3 mg/L végső koncentrációk) tenyésztettük. A karboplatint (Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország) minden kísérlet során frissen oldottuk fel steril desztillált vízben, 50 °C-on ultrahangos fürdőben (XUB5, Bio-Science Ltd., Budapest, Magyarország). A teljes oldódást követően 1 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, amelyet azonnal 100-szorosára hígítottunk McCoy's 5A táptalajjal a CFU-GM assay-hez (**12. ábra**).

A további kísérletekben LETO patkányokat CCK receptorantagonistákkal kezeltünk, proglumid és lorglumid ekvimoláris dózisaiban, kétféle szinten. Az állatok öt csoportba kerültek (n = 12/csoport): az első csoport fiziológiás sóoldatot (0,9% NaCl) kapott, a második és harmadik csoport 3 vagy 10 mg/kg proglumidot (proglumide sodium, Mw = 356,39 g/mol; Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország), míg a negyedik és ötödik csoport 4 vagy 13 mg/kg lorglumidot (lorglumide sodium, Mw = 481,39 g/mol; Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország) kapott, napi egyszeri beadással, egymást követő öt napon át. A választott 2-2 dózisszint a proglumid és a lorglumid $8,4 \cdot 10^{-6}$ mol/kg, illetve $2,7 \cdot 10^{-5}$ mol/kg ekvimoláris mennyiségeinek feleltek meg, így biztosítva a gyógyszerek hatásainak pontos, molekuláris szintű összehasonlítását. A CCK-antagonistákat lassú intravénás bolus formájában adtuk be (3–4 másodperc), miután az állatok farkát 1–2 percre meleg vízbe merítettük a vénák tágítása érdekében. Az injekciók beadása minden nap pontosan azonos időben (9 órai kezdettel) történt, állatról állatra haladva, ugyanabban a sorrendben (**2. táblázat**).

A 6. napon az állatokat tiopentál-nátrium túladagolással eutanizáltuk (100 mg/kg, intravénásan, laterális farokvénán keresztül.). A csontvelő kinyerése és feldolgozása az előző kísérletben leírtakkal megegyezően zajlott, a hemopoézisre és granulopoézisre kifejtett hatások vizsgálata céljából.

Annak meghatározására, hogy a CCK-antagonistákkal történő előkezelés befolyásolja-e a CFU-GM progenitorok karboplatinnal szembeni érzékenységét, a csontvelő mononukleáris sejtjeit normál körülmények között, illetve 1 vagy 2 mg/l végső koncentrációban adott karboplatin jelenlétében tenyésztették. A karboplatin minden kísérletben frissen, a fentiek szerint került feloldásra.



12. ábra. Az OLETF és LETO patkányok combcsonti csontvelőjéből származó mononukleáris sejt frakción végzett CFU-GM vizsgálat kísérleti felépítése és a mért hemopoetikus paraméterek. (BioRender, saját készítésű ábra)

Csoport	CCK-antagonista-kezelés	Dózis (mg/kg)	Ekvimoláris dózis (mol/ttkg)	Beadás módja	Kezelés időtartama	Állatok száma
1	Kontroll (0,9% NaCl)	—	—	intravénás bolus	5 nap, napi 1x, 9:00	12
2	Proglumid	3 mg/kg	$8,4 \times 10^{-6}$	intravénás bolus	5 nap, napi 1x, 9:15	12
3	Proglumid	10 mg/kg	$2,7 \times 10^{-5}$	intravénás bolus	5 nap, napi 1x, 9:30	12
4	Lorglumid	4 mg/kg	$8,4 \times 10^{-6}$	intravénás bolus	5 nap, napi 1x, 9:45	12
5	Lorglumid	13 mg/kg	$2,7 \times 10^{-5}$	intravénás bolus	5 nap, napi 1x, 10:00	12

2. táblázat. A LETO patkányok CCK-receptor-antagonista kezelési csoportjai és az alkalmazott ekvimoláris dózisok.

4.2.3 CFU-GM kolóniaszám meghatározása

A lágy-gél kultúrákat a CFU-GM progenitor sejtekből származó kolóniák szelektálására és fenntartására készítettük, amelyekből a CFU-GM sejtek előfordulási gyakoriságát állapíthattuk meg az inokulumként beoltott csontvelői sejtek között [152].

A csontvelő-sejtszuspenziókat 0,9%-os NaCl-dal 1:1 arányban hígítottuk, majd a mononukleáris sejtes frakciót Ficoll-jodamid gradienscentrifugálással (1077 g/ml; Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország) nyertük ki. A buffy coat élő sejtjeit hemocitóméterrel számoltuk meg, 0,04%-os tripánkéssel történő festést alkalmazva. A sejtek életképessége minden esetben 99–100% volt.

Az inokulumokat 1×10^5 /mL koncentrációban, 35 mm átmérőjű Petri-csészékben (Greiner, Nürtingen, Németország) tenyésztettük McCoy's 5A módosított táptalajban (Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország), amelyet aminosavakkal, Na-piruváttal, NaHCO_3 -tal, antibiotikumokkal (sztreptomycin, penicillin), 20% magzati borjúsérummal (fetal bovine serum-mal, FBS; Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország), valamint kolónia-stimuláló faktorokkal (rrGM-CSF és rhG-CSF; Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország) egészítettünk ki.

A lágy-gél kultúrákhoz 1,2%-os metilcellulózt (Methocel, 3000–5000 centipoise; FLUKA, Buchs, Svájc) használtunk extracelluláris mátrixként. A tenyészeteket duplikátumban, 14 napon át inkubáltuk 37 °C-on, 100% relatív páratartalom mellett, 5% CO_2 -t tartalmazó légkörben.

Az inkubáció végén a kolóniákat sztereomikroszkóppal (Olympus, Hamburg, Németország) számoltuk meg. Kolóniának legalább 50 sejtből álló, granulocitákat és/vagy monocitákat tartalmazó sejtcsoportot tekintettünk, amelyet kenetekkel vagy cytospin preparátumokkal igazoltunk.

4.2.4 CFU-GM progenitor sejtek in vitro kezelése LETO patkányok csontvelő-tenyészeiben

Annak vizsgálatára, hogy a CCK-receptor-antagonisták hatásai közvetlenül érvényesülnek-e a hemopoetikus progenitorsejteken, (nem elhízott) LETO patkányok csontvelőjéből származó mononukleáris sejteket használtunk. A sejteket a korábban ismertetett módszerrel izoláltuk, majd primer lágy-gél kultúrákat hoztunk létre CFU-GM tenyésztés céljából. A tenyészeteket

proglumid vagy lorglumid jelenlétében, illetve azok nélkül inkubáltuk. A vegyületek hatását 12 különböző koncentrációban vizsgáltuk, széles, 0,1–15 000 μ M koncentrációtartományban.

4.2.5 CCK-1 és CCK-2 receptorok vizsgálata csontvelői sejtekben

A CCK₁ és CCK₂ receptorok jelenlétét LETO és OLETF patkányok femorális csontvelőjéből származó mononukleáris sejtekben vizsgáltuk (n = 10/csoport). Az állatok négy héten keresztül napi egyszer, per os 10 mg/kg proglumidot, illetve vivőanyagot (0,9% NaCl) kaptak.

A csontvelőből származó egysejtes szuszpenziókból a mononukleáris sejtes frakciót Ficoll–jodamid gradienscentrifugálással (1077 g/ml) izoláltuk, majd hemocitóméterrel, tripánkék festés mellett meghatároztuk a sejtszámot és az életképességet. A megfelelő sejtmennyiség biztosítása érdekében két állat mintáját összevontuk, így csoportonként 5 minta képezte az analízis alapját.

Az életképes, magvas sejteket 5×10^6 /ml koncentrációban, 10 ml teljes, módosított McCoy's 5A táptalajban tenyésztettük kolónia-stimuláló faktorok jelenlétében, metilcellulóz hozzáadása nélkül, szuszpenziós tenyésztőflaskában (Greiner Bio-One Ltd., Mosonmagyaróvár, Magyarország). A tenyészeteket 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó, 100% relatív páratartalmú légkörben inkubáltuk.

A folyadékkultúrákból naponta cytospin preparátumokat készítettünk a sejtmorfológia követésére. Az 5. napon jelentősen megnövekedett sejtszámot és döntően mononukleáris sejtpopulációt figyeltünk meg, amely kis számban mieloblasztokat tartalmazott, azonban differenciáltabb vagy szegmentált magvú sejtek nem voltak jelen.

Az 5. napon a nem tapadó sejtes frakciót gyűjtöttük össze, kizárva a stromális és előrehaladottabb differenciálódású sejteket. Az így nyert sejtsuszpenzió CFU-GM sejtekben gazdag, differenciálatlan populációt képviselt, amely alkalmas volt a CCK-receptorok vizsgálatára.

4.2.6 RNS izolálás és reverz transzkripció

A fent ismertetett kultúrákból származó csontvelői sejteket RNAlater oldatban (Qiagen, Hilden, Németország) tároltuk az RNS-t izolálásig, az mRNS degradációjának megelőzése érdekében. A teljes RNS izolálását RNA Protect Mini Kit segítségével (Qiagen) végeztük, a gyártó

protokolljának megfelelően. Az RNS koncentrációját SmartSpec™ Plus spektrofotométerrel (Bio-Rad, Hercules, Egyesült Államok) határoztuk meg. Az egyszálú cDNS szintézisét 2 µg teljes RNS felhasználásával, véletlenszerű primerekkel (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Németország) és SuperScript™ II RNase H⁻ reverz transzkriptázzal (Invitrogen) végeztük, a korábban leírt módszer szerint [153].

4.2.7 Valós idejű kvantitatív PCR

A valós idejű PCR vizsgálatokat ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System készülékkel (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) végeztük, 10 µl végső reakciótérfogatban. A reakcióelegy 2× FastStart® TaqMan Master Mixet (ROX) (Roche Applied Science, Mannheim, Németország), 4,5 µl cDNS templátot, valamint 0,5 µl előre validált TaqMan® Gene Expression assay-t tartalmazott a CCK-1 és CCK-2 receptorok meghatározásához.

Belső kontrollként 18S rRNS-re tervezett oligonukleotidokat alkalmaztunk, 500 nM koncentrációjú előre- és visszairányú primerekkel, valamint 100 nM koncentrációjú próbával. A TaqMan próbák 5' végén 6-karboxi-fluorescein (FAM) jelölést, míg 3' végükön minor groove binder (MGB) és nem fluoreszkáló quencher molekulát tartalmaztak. Az 18S rRNS-hez alkalmazott próba tetrametil-rodaminnal (TAMRA) konjugált quencherrel volt ellátva.

A felhasznált TaqMan® Gene Expression assay azonosítók a következők voltak: Rn00562164_m1 a CCK-1 receptorhoz (Acc. No.: NM_012688) és Rn00565867_m1 a CCK-2 receptorhoz (Acc. No.: NM_013165). A referencia-génként alkalmazott 18S rRNS (Acc. No.: EF060919) kimutatásához szükséges oligonukleotid primereket a qPCR Primer version 1.2 szoftverrel terveztük, és a Bio-Science Kft.-től (Budapest, Magyarország) rendeltük.

Az amplifikációs protokoll 95 °C-on 10 perces enzimaktiválással kombinált denaturációból állt, amelyet 40 ciklus követett: 95 °C-on 15 másodpercig tartó denaturáció, majd 60 °C-on 1 percig tartó annealing és amplifikáció.

4.2.8 TaqMan assay kiértékelése

A CCK-1R, CCK-2R és a referencia génként alkalmazott 18S rRNS expresszióját valós idejű PCR-rel határoztuk meg. Minden mintát három technikai párhuzamosban, 384 lyukú PCR-

lemezen vizsgáltunk. A reagensek szennyeződésének kizárására no template control (NTC) mintákat is alkalmaztunk. A küszöbciklus (Ct) értékek meghatározása az Applied Biosystems SDS 2.1 szoftverrel történt. A relatív génexpresszió számítását a Livak és Schmittgen által leírt $\Delta\Delta C_t$ módszerrel végeztük az értékeket a 18S rRNS referencia génhez normalizálva[154].

4.2.9 Statisztikai analízis

Az egyes állatokból vagy mintákból származó adatokat használtuk fel a statisztikai elemzéshez. Az eredményeket átlag $\pm$ SD formájában adtuk meg. A csoportok közötti különbségeket Kruskal–Wallis-féle varianciaanalízissel értékeltük, két csoport összehasonlítására Mann–Whitney U-próbát alkalmazva. A különbségeket $P < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$; $P < 0,0001$). Az adatok feldolgozását GraphPad Prism szoftverrel végeztük (8.0.1; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Egyesült Államok). Az mRNS-expresszió elemzését a Livak és Schmittgen által leírt $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel végeztük. A CCK-1R és CCK-2R transzkriptumszinteket az 18S rRNS referencia génhez normalizáltuk (ΔC_t), majd a ΔC_t értékeket a kezeletlen LETO és OLETF csoportok megfelelő értékeihez viszonyítottuk ($\Delta\Delta C_t$). A kezeletlen kontroll csoportok relatív expressziós értékét 1-nek (100%) tekintettük. A kapott $2^{-\Delta\Delta C_t}$ értékeket átlag $\pm$ SEM formájában adtuk meg, és Kruskal–Wallis varianciaanalízissel, majd Mann–Whitney U-próbával értékeltük. A különbségeket $P < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5 Eredmények

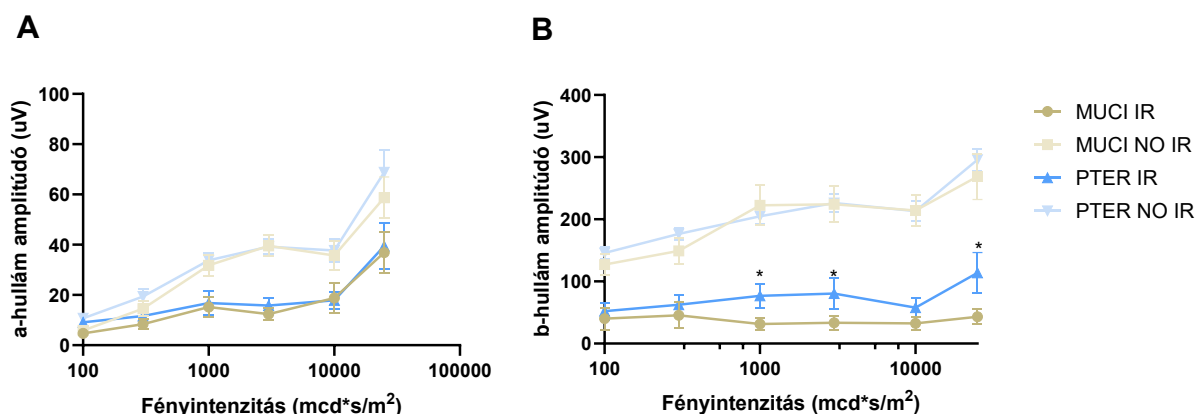
5.1 A pterostilbén hatása retinális iszkémia–reperfúziós modellben

5.1.1 Elektroretinográfia

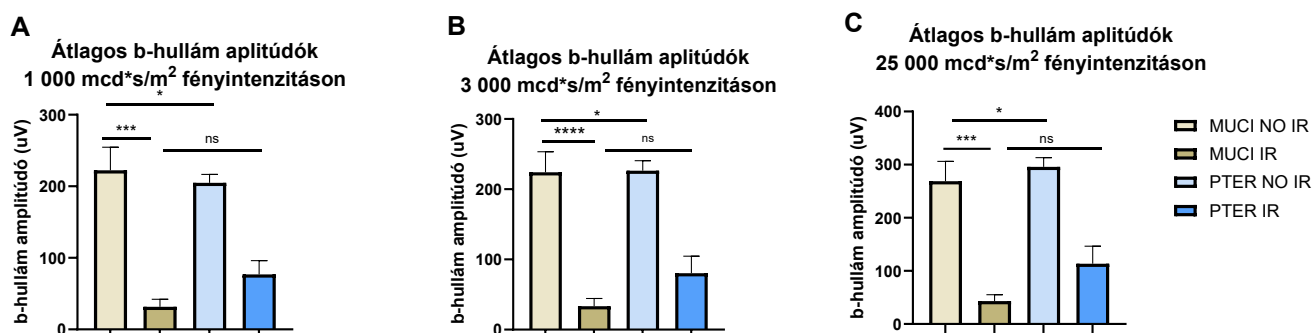
Az ERG vizsgálatok során szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők a kísérleti csoportok között. Mind az a-hullám, mind a b-hullám amplitúdója a MUCI IR csoport mutatta a legalacsonyabb értékeket, amelyek szignifikánsan elmaradtak a többi vizsgálati csoportban mért válaszoktól (13.A–B ábra).

A b-hullám átlagos amplitúdója szignifikánsan csökkent a MUCI IR csoportban, a MUCI NO IR, valamint a PTER IR csoportokhoz képest. A PTER IR csoportban a b-hullám amplitúdója szignifikánsan magasabb volt a MUCI IR csoporthoz viszonyítva (14.A–C ábra).

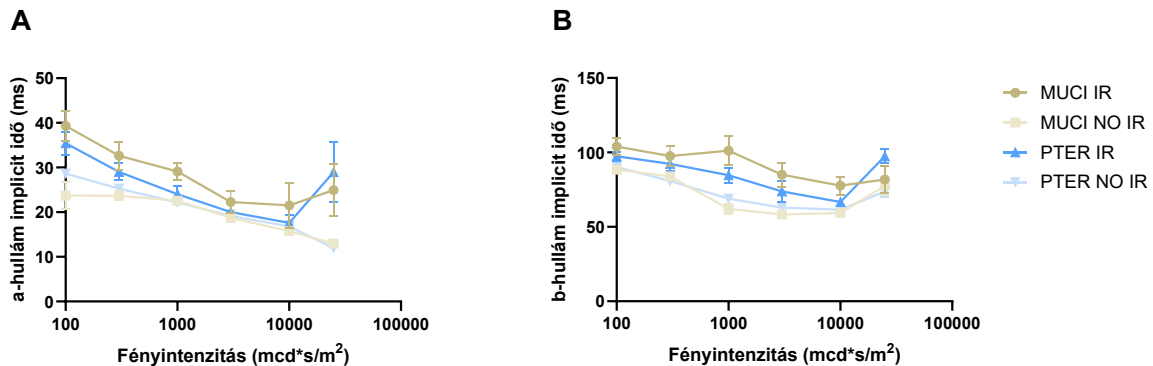
Az a-hullám és b-hullám válaszok implicit idejének elemzése során nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a különböző kezelési csoportok között (15.A–B ábra).



13. ábra. Az a-hullám és b-hullám amplitúdóinak összehasonlítása az ERG-vizsgálatokban I/R modellben. (A) Az a-hullám amplitúdójának elemzése a különböző kísérleti csoportokban. (B) A b-hullám amplitúdójának elemzése a különböző kísérleti csoportokban. Az adatok átlag $\pm$ SEM formájában kerülnek bemutatásra. * $p < 0,05$ a MUCI NO IR csoporthoz viszonyítva.



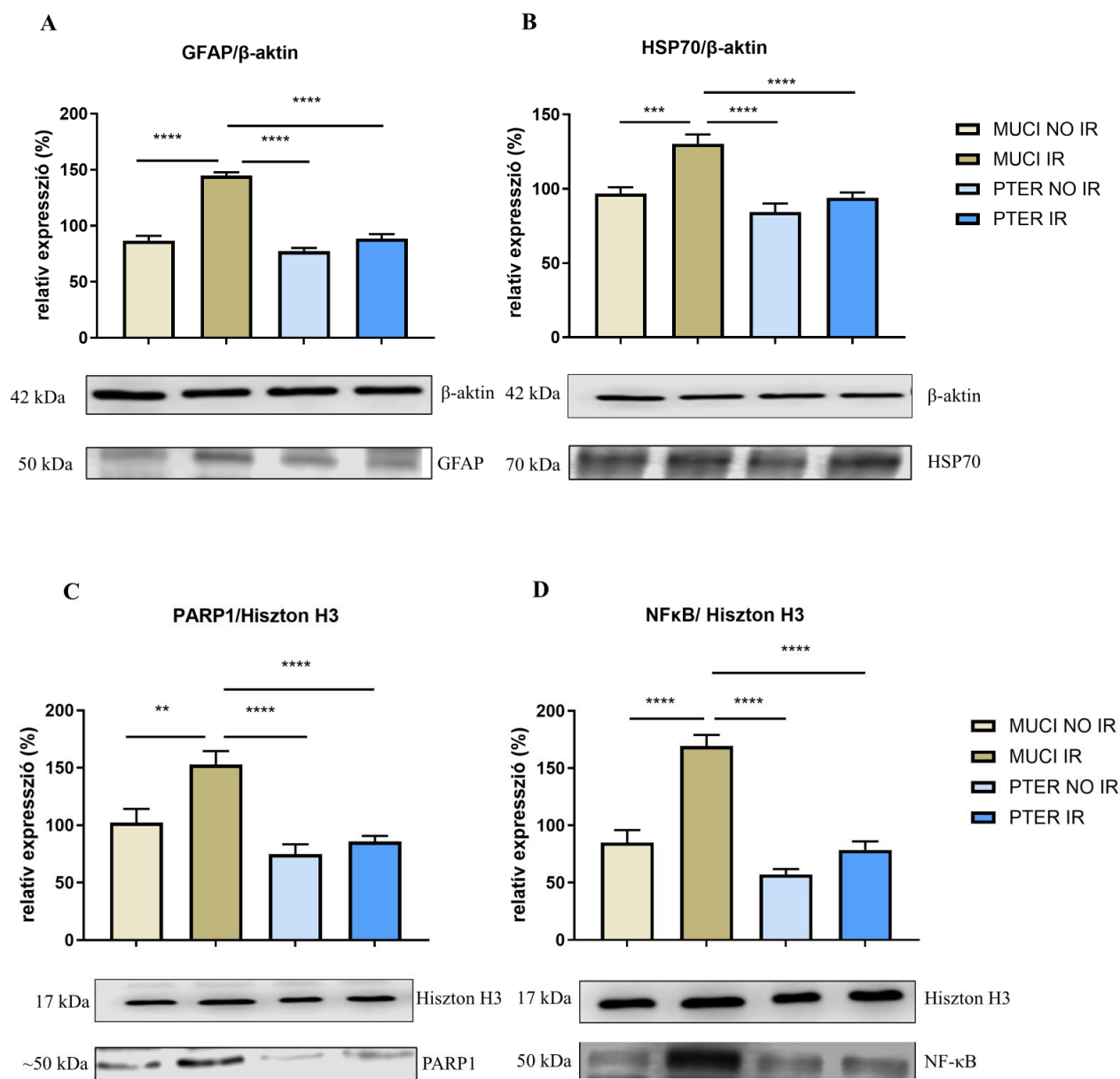
14. ábra. Szkotopikus ERG-mérések során rögzített b-hullám amplitúdók különböző fényintenzitások mellett. (A) 1000 mcd*s/m², (B) 3000 mcd*s/m² és (C) 25 000 mcd*s/m² fényintenzitáson mért átlagos b-hullám amplitúdók (µV). Az adatok átlag $\pm$ SEM formájában kerülnek bemutatásra. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns = nem szignifikáns különbség.



15. ábra. Az a-hullám és b-hullám implicit idejének alakulása ERG vizsgálatok során. (A) Az a-hullám, valamint (B) a b-hullám implicit idejének összehasonlítása a különböző kezelési csoportok között. Az adatok átlag $\pm$ SEM formájában kerülnek bemutatásra.

5.1.2 Western blot

A Western blot analízis során a GFAP és a HSP70 expressziós szintje szignifikánsan megemelkedett a MUCI IR csoportban. Ezek az expressziós értékek mind a MUCI NO IR, mind pedig a PTER IR csoportokhoz viszonyítva szignifikánsan magasabbnak bizonyultak (**16.A–B ábra**). Hasonló tendenciát mutatott a PARP1 és az NF κ B expressziója is. Mindkét fehérje szintje szignifikánsan emelkedett a MUCI IR csoportban a MUCI NO IR, valamint a PTER IR csoportokhoz képest (**16.C–D ábra**).

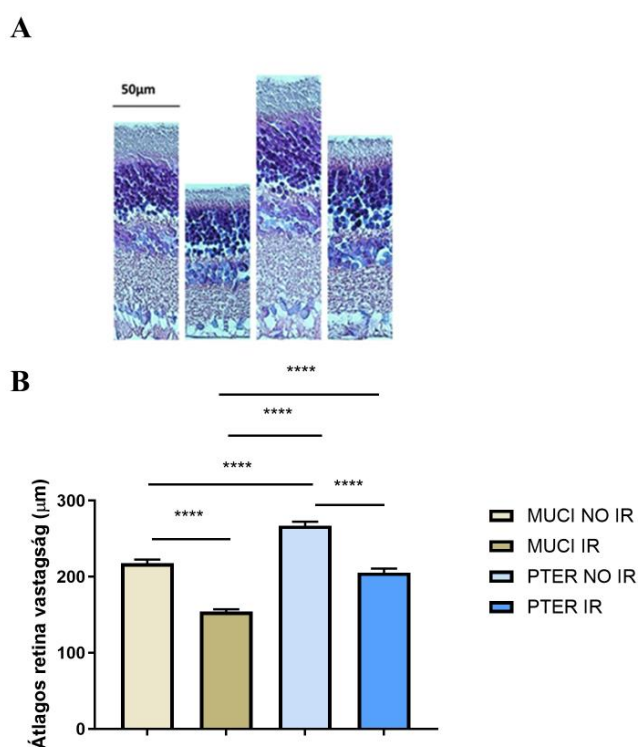


16. ábra. Western blot analízis retina szövetmintákból. (A) GFAP-, (B) HSP70-, (C) PARP1- és (D) NF κ B-expresszió a különböző kísérleti csoportokban. Az adatok átlag $\pm$ SEM formájában kerülnek bemutatásra. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; $n = 4$ /csoport.

A pterostilbén kezelés minden vizsgált fehérje esetében szignifikáns expressziócsökkenést eredményezett a vivőanyaggal kezelt állatokhoz viszonyítva, függetlenül attól, hogy az állatok MUCI IR, vagy MUCI NO IR csoportba tartoztak.

5.1.3 Hisztológia

A szövettani vizsgálatok szignifikáns különbségeket tártak fel a teljes retinaréteg vastagságában a négy vizsgálati csoport között. A legkisebb retina-vastagságot a MUCI IR csoportban mértük, amely szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a MUCI NO IR csoporthoz képest. A nem iszkémiás csoportok összehasonlítása során a PTER NO IR csoportban szignifikánsan nagyobb retinavastagság volt kimutatható, mint a MUCI NO IR csoportban. Hasonló tendencia érvényesült az iszkémiás szemek esetében is, ahol a PTER IR csoport értékei szignifikánsan meghaladták a MUCI IR csoportban mért vastagságot. A PTER csoportokon belül az iszkémia–reperfúzió hatása szintén egyértelműen kimutatható volt, mivel a PTER IR csoport retina-vastagsága szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a PTER NO IR csoporthoz viszonyítva. Mindezek alapján a legnagyobb retinaréteg-vastagságot a PTER NO IR csoportban mértük (17.A–B ábra).



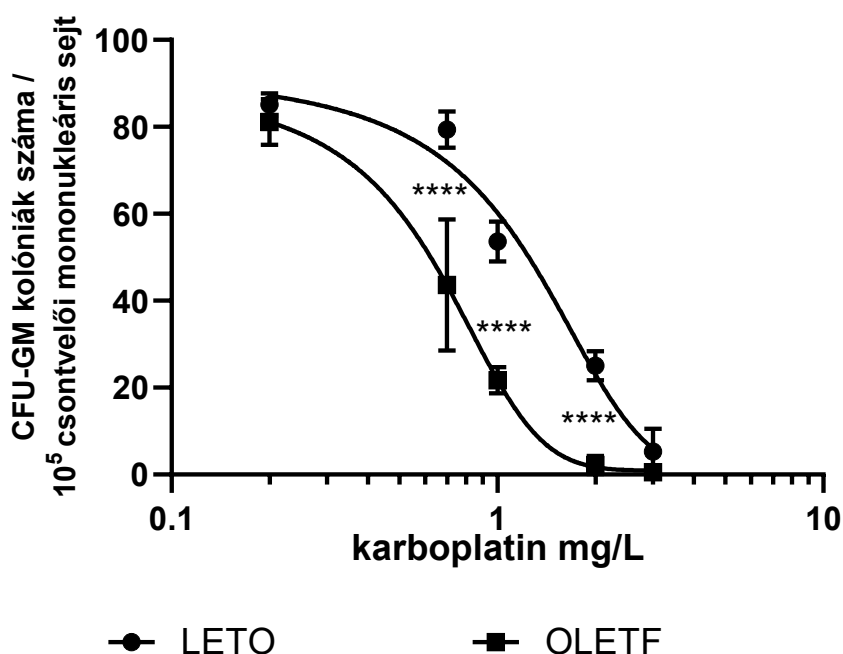
17. ábra. Patkány retina szövettani elemzése. (A) Reprezentatív hematoxin–eozin festett retinametszetek a különböző kísérleti csoportokban (balról jobbra: MUCI NO IR, MUCI IR, PTER NO IR, PTER IR). (B) A teljes retina vastagságának kvantitatív összehasonlítása a vizsgált csoportok között. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formájában mutatjuk be. **** $p < 0,0001$.

5.2 CCK-1R antagonizmus hatása OLETF–LETO patkánymodellben

5.2.1 Hemopoézis vizsgálata CCK-1R hiányos, elhízott OLETF és nem elhízott LETO patkányokban

Az OLETF patkányok vizsgálata során azt elemeztük, hogy a CCK-1R hiánya befolyásolja-e a hemopoézis folyamatát. A csontvelő működését a teljes sejtszám, a CFU-GM kolóniaképző képesség, valamint a femorális csontvelő CFU-GM tartalmának meghatározásával értékeltük. Eredményeink alapján az OLETF patkányokban sem a csontvelői sejtszám, sem a CFU-GM kolóniák száma, sem pedig a femurból származó összes CFU-GM tartalom nem mutatott szignifikáns eltérést a vad típusú, azonos genetikai háttérrel rendelkező LETO patkányokhoz viszonyítva. Ugyanakkor az *in vitro* vizsgálatok során, a karboplatin toxicitásának értékelésekor a CFU-GM sejtek fokozott érzékenysége volt megfigyelhető az OLETF csoportban.

A karboplatin dózis–válasz görbéje balra tolódott, az 50%-os gátlást okozó koncentráció (IC_{50}) értéke az OLETF patkányok CFU-GM sejtjeiben 0,62 mg/l volt, míg a nem elhízott LETO patkányok CFU-GM sejtjeiben 1,16 mg/l-nek adódott (**18. ábra**).



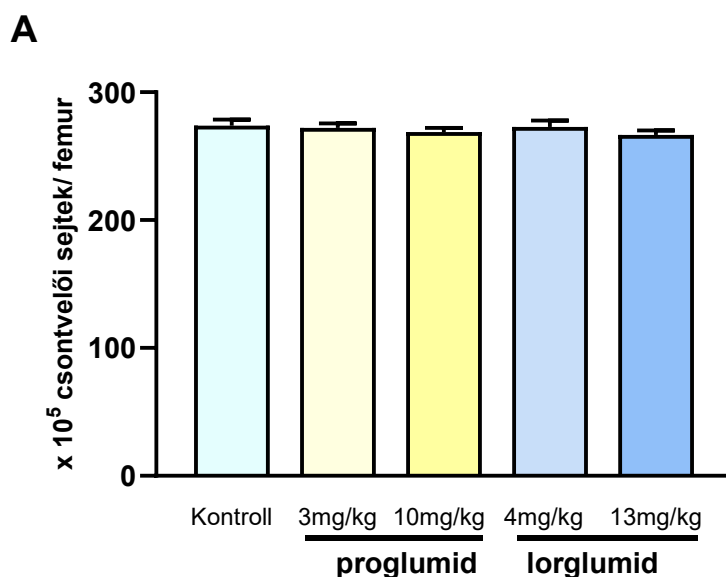
18. ábra. A csontvelői CFU-GM progenitor sejtek karboplatin-érzékenysége elhízott OLETF és nem elhízott LETO patkányokban. Az adatok átlag $\pm$ SEM formájában kerülnek bemutatásra. **** $p < 0,0001$; $n = 10$.

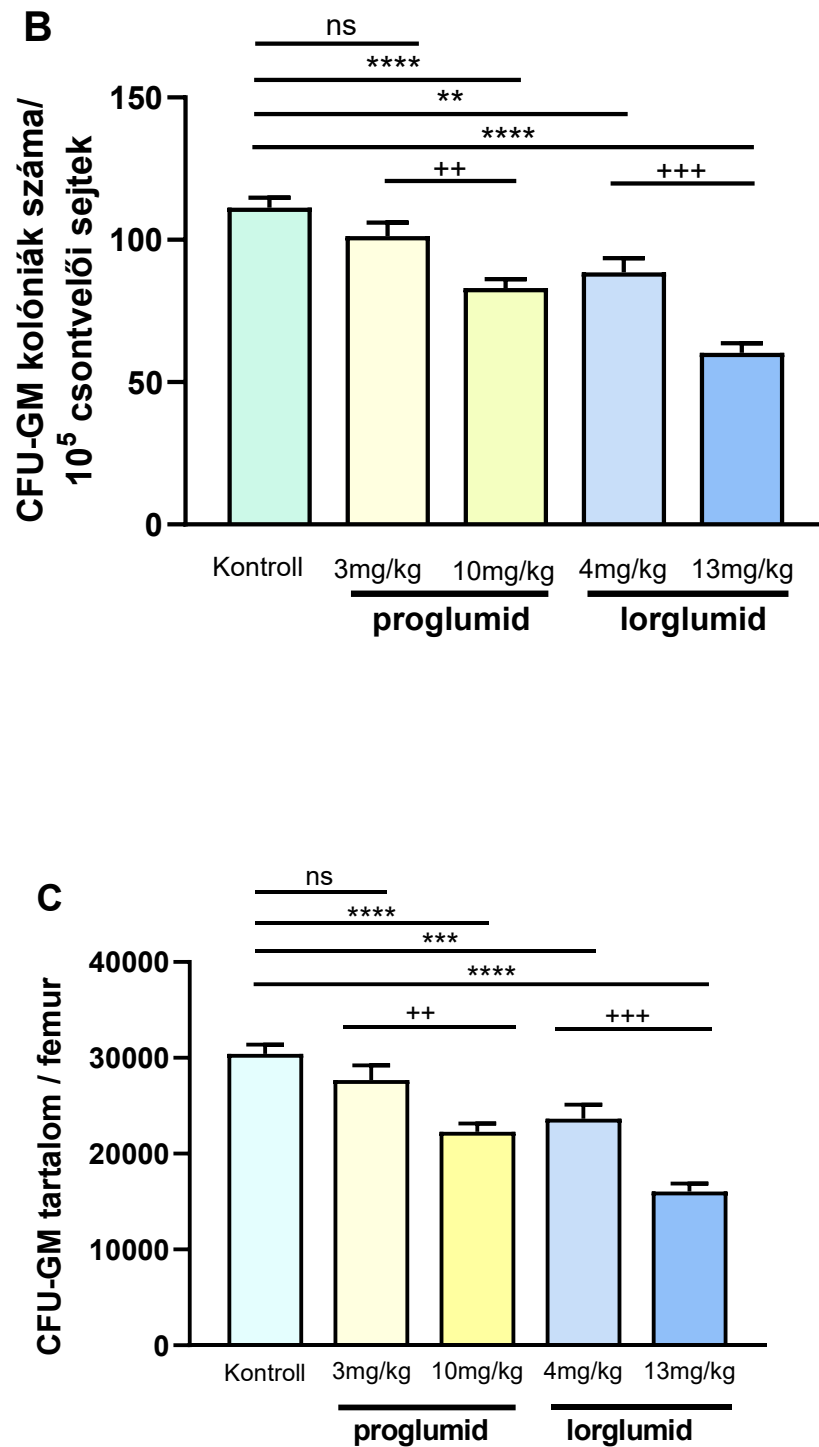
5.2.2 A proglumid és a lorglumid hatása a csontvelői CFU-GM progenitor sejtekre *in vivo*

A femorális csontvelő sejtsűrűsége a mononukleáris sejtek teljes számát tükrözi, amely magában foglalja a hemopoetikus és stromális őssejteket, valamint azok különböző vérképző sejtvonalakba tartozó leszármazottait. Vizsgálataink alapján egyik CCK-antagonista sem befolyásolta szignifikánsan a LETO patkányok csontvelőjének cellularitását, teljes sejt-tartalmát (**19. A ábra**).

Ezzel szemben mindkét CCK-antagonista káros hatást gyakorolt a granulopoézisre *in vivo*. Bár a differenciálódó granulociták nem tartoznak a csontvelő mononukleáris sejtfrakciójába, előalakjaik, a CFU-GM, a hemopoetikus őssejtszám morfológiailag el nem különíthető, de funkcionálisan jól definiált mononukleáris populációját képezik. A CFU-GM sejtek előfordulási gyakorisága, valamint a femurból nyert teljes CFU-GM sejtszám szignifikánsan csökkent a kontrollcsoporthoz képest mind a proglumid 10 mg/kg-os ($2,7 \times 10^{-5}$ mol/kg; $p < 0,0001$), mind a lorglumid 13 mg/kg-os ($2,7 \times 10^{-5}$ mol/kg; $p < 0,0001$) ekvimoláris, magasabb dózisának alkalmazása mellett.

Emellett a CCK-1R-szelektív lorglumid már az alacsonyabb, 4 mg/kg-os dózisban is csökkentette a CFU-GM sejtek számát, míg a proglumid ekvimoláris, 3 mg/kg-os adagban nem fejtett ki hasonló hatást (**19. B–C ábra**).





19. ábra. A proglumid és a lorglumid in vivo kezelések hatása a hemopoézisre LETO patkányokban. (A) Csontvelői sejtsűrűség (cellularity), (B) CFU-GM kolóniaszám, (C) a femorális csontvelő CFU-GM tartalma. A kontrollcsoport állatai vivőanyagot kaptak, míg a kezelt csoportok ekvimoláris dózisban részesültek CCK-antagonistákban (proglumid: 3 vagy 10 mg/kg; lorglumid: 4 vagy 13 mg/kg), intravénásan, 5 egymást követő napon. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ a vivőanyaggal kezelt kontroll LETO patkányokhoz viszonyítva; ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ az azonos gyógyszer eltérő dózisa közötti különbségekre; $n = 12$ /csoport. Az adatok átlag $\pm$ SEM formájában kerülnek bemutatásra.

5.2.3 A proglumid és a lorglumid *in vivo* előkezelésének hatása a karboplatin *in vitro* toxicitására CFU-GM progenitor sejtekben

A CFU-GM kolóniák számát LETO patkányok csontvelői mononukleáris sejtjeiből létrehozott *in vitro* tenyészetekben határoztuk meg (**20–21. ábra**).

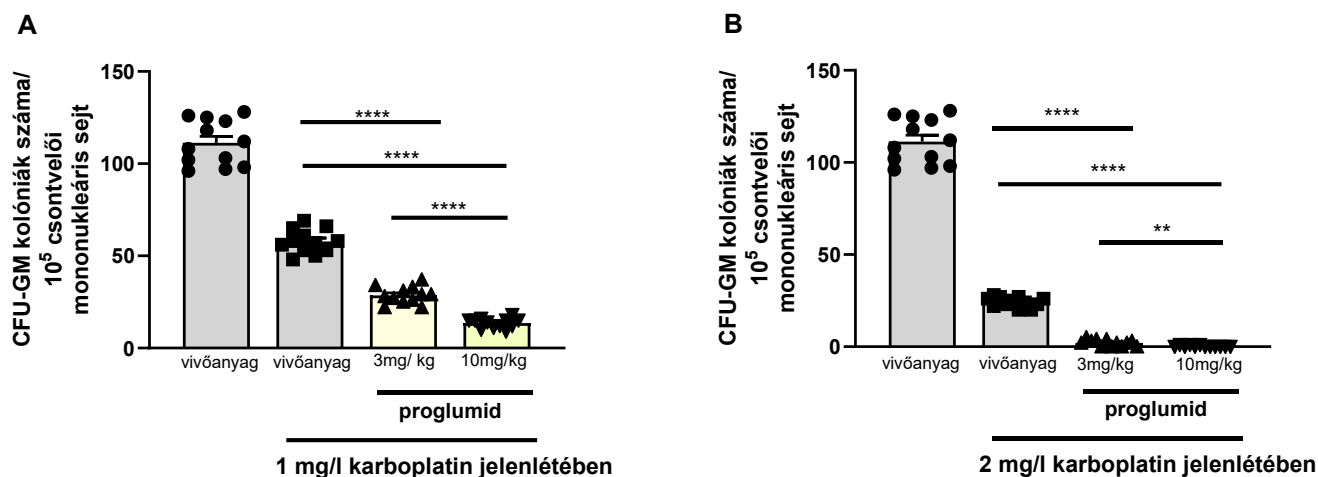
1 mg/l koncentrációjú karboplatin jelenlétében a proglumiddal előkezelt csoportokban (3 mg/kg és 10 mg/kg) a CFU-GM kolóniaszám szignifikánsan alacsonyabb volt a vivőanyaggal kezelt állatokból származó sejtekhez viszonyítva ($p < 0,0001$). A két proglumid dózis között szintén szignifikáns különbség volt kimutatható ($p < 0,0001$) (**20.A ábra**).

2 mg/l karboplatin mellett mindkét proglumid dózis esetén alacsonyabb kolóniaszám volt mérhető a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest ($p < 0,0001$), valamint mindkét proglumid dózissal előkezelt állatcsoport csontvelői CFU-GM kolóniaszáma szignifikánsan alacsonyabb volt a 2 mg/l karboplatinban tenyésztve mint az 1 mg/l karboplatint tartalmazó tenyészetekben ($p < 0,001$) (**20.A és B ábra**).

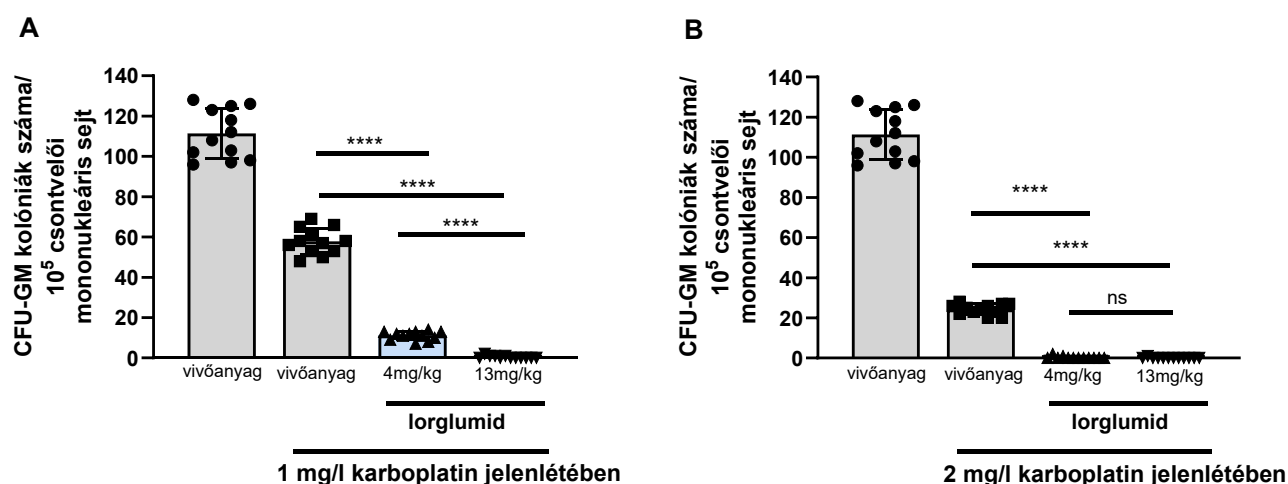
Lorglumid előkezelést követően 1 mg/l karboplatin jelenlétében (4 mg/kg és 13 mg/kg) a kolóniaszám szignifikánsan alacsonyabb volt a vivőanyaggal kezelt állatokból származó sejtekhez viszonyítva ($p < 0,0001$), és a két dózis között is szignifikáns különbség volt megfigyelhető ($p < 0,0001$) (**21.A ábra**).

2 mg/l karboplatin mellett mindkét lorglumid dózis esetén alacsonyabb kolóniaszám volt mérhető a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest ($p < 0,0001$), mindkét lorglumid dózissal előkezelt állatcsoport csontvelői CFU-GM kolóniaszáma szignifikánsan alacsonyabb volt a 2 mg/l karboplatinban tenyésztve mint az 1 mg/l karboplatint tartalmazó tenyészetekben ugyanakkor már az alacsonyabb, 4 mg/kg lorglumiddal előkezelt állatok CFU-GM progenitorain is teljes gátlást okozott a karboplatin 2mg/l koncentrációban (**21.A és B ábra**).

A karboplatin dóziszfüggő módon csökkentette a CFU-GM kolóniák számát LETO patkányok csontvelő-tenyészeiben. Az *in vivo* proglumid- vagy lorglumid-előkezelés tovább fokozta a CFU-GM progenitor sejtek karboplatinnal szembeni érzékenységét. A 4 mg/kg CCK-1 szelektív lorglumid előkezelés hatása szignifikánsan kifejezettebbnek mutatkozott, mint az ekvimoláris 3 mg/kg proglumid dózissal előkezelt patkányok sejtjei esetében ($p < 0,001$) (**20.A és 21.A ábra**).



20. ábra. A CFU-GM progenitor sejtek karboplatinnal szembeni viselkedése proglumiddal (CCK-1 receptor- nem szelektív CCK-antagonista) in vivo előkezelt, vad típusú, nem obez LETO patkányok csontvelő-tenyészteteiben. (A) A vivőanyaggal in vivo kezelt állatokból származó csontvelői mononukleáris sejtek CFU-GM kolóniaszámai karboplatin hiányában, valamint 1 mg/l koncentrációjú karboplatin jelenlétében. A proglumiddal előkezelt állatokból származó sejtek kolóniaszámai ugyanezen karboplatin-koncentráció mellett kerültek meghatározásra. (B) A vivőanyaggal in vivo kezelt állatokból származó csontvelői mononukleáris sejtek CFU-GM kolóniaszámai karboplatin hiányában, valamint 2 mg/l koncentrációjú karboplatin jelenlétében. A proglumiddal előkezelt állatokból származó sejtek kolóniaszámai ugyanezen karboplatin-koncentráció mellett kerültek meghatározásra. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk ($n = 12$). **** $p < 0,0001$ a vivőanyaggal kezelt LETO patkányokból származó, azonos karboplatin-koncentráció mellett tenyésztett sejtek kolóniaszámaihoz viszonyítva. ns = nem szignifikáns különbség.



21. ábra. A CFU-GM progenitor sejtek karboplatinnal szembeni viselkedése lorglumiddal (CCK-1 receptor-szelektív CCK-antagonista) in vivo előkezelt, vad típusú, nem obez LETO patkányok csontvelő-tenyészteteiben. (A) A vivőanyaggal in vivo kezelt LETO patkányokból származó csontvelői mononukleáris sejtek CFU-GM kolóniaszámai karboplatin hiányában, valamint 1 mg/l koncentrációjú karboplatin jelenlétében. A lorglumiddal előkezelt állatokból származó sejtek kolóniaszámai ugyanezen karboplatin-koncentráció mellett kerültek

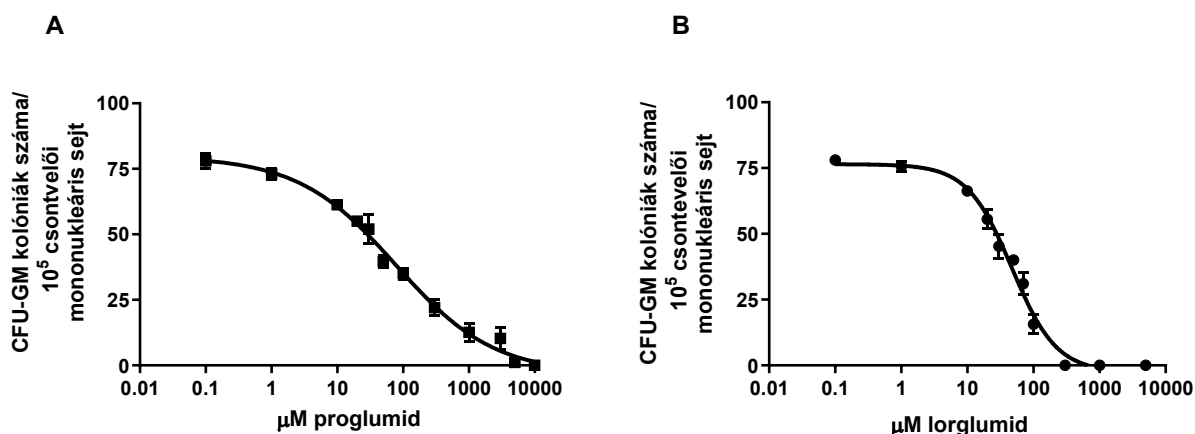
meghatározásra. (B) A vivőanyaggal *in vivo* kezelt LETO patkányokból származó csontvelői mononukleáris sejtek CFU-GM kolóniaszámai karboplatin hiányában, valamint 2 mg/l koncentrációjú karboplatin jelenlétében. A lorglumiddel előkezelt állatokból származó sejtek kolóniaszámai ugyanezen karboplatin-koncentráció mellett kerültek meghatározásra. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk ($n = 12$). **** $p < 0,0001$ a vivőanyaggal kezelt LETO patkányokból származó, azonos karboplatin-koncentráció mellett tenyésztett sejtek kolóniaszámaihoz viszonyítva. ns = nem szignifikáns különbség.

5.2.4 A proglumid és a lorglumid hatása a CFU-GM progenitor sejtek kolóniaképzésére LETO patkányok csontvelő-tenyészteteiben *in vitro*

A LETO patkányok csontvelői mononukleáris sejtjeiből létrehozott CFU-GM tenyészeteket növekvő koncentrációjú proglumid, illetve lorglumid jelenlétében inkubáltuk (22. ábra).

Mindkét CCK-antagonista esetében koncentrációfüggő csökkenés volt megfigyelhető a CFU-GM kolóniák számában. A lorglumid alkalmazása mellett a CFU-GM kolóniaszám csökkenése kifejezettebbnek bizonyult, mint proglumid jelenlétében.

A dózis–hatás görbe csökkenő szigmoid lefutást mutatott mind proglumid (22.A ábra), mind lorglumid (22.B ábra) esetében. A dózis–hatás elemzés alapján a proglumid IC_{50} értéke 76,82 μ M, míg a lorglumid IC_{50} értéke 47,37 μ M volt.



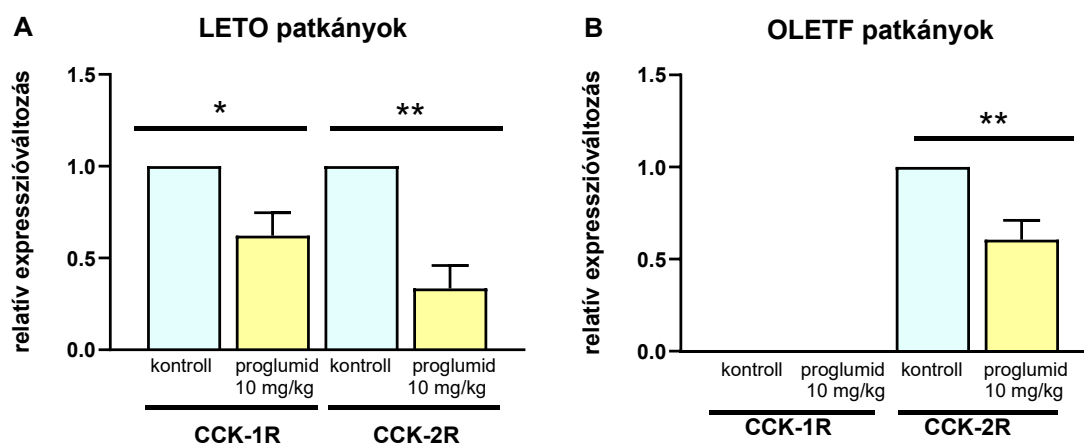
22. ábra. A proglumid (A) és a lorglumid (B) *in vitro* dózis–hatás görbéje a CFU-GM progenitor sejtek kolóniaképző képességére nem obez, vad típusú LETO patkányok csontvelői mononukleáris sejtjeiből létrehozott CFU-GM tenyészetekben. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk ($n = 10$).

5.2.5 Kolecisztokinin-receptorok vizsgálata csontvelői sejtekben

A CCK-1R és CCK-2R relatív mRNS-expresszióját LETO és OLETF patkányok csontvelői mononukleáris sejtjeiben kvantitatív RT-PCR módszerrel határoztuk meg, 4 héten át alkalmazott, napi 10 mg/kg dózisú per os proglumid kezelést követően (23. ábra).

LETO patkányok esetében a proglumid kezelés szignifikánsan csökkentette mind a CCK-1R (* $p < 0,05$), mind a CCK-2R (** $p < 0,01$) relatív mRNS-szintjét a kontrollcsoportához viszonyítva (23.A ábra).

Az OLETF törzsben a CCK-1R expresszió nem volt detektálható. A CCK-2R esetében a proglumid kezelés szignifikánsan alacsonyabb relatív mRNS-szintet eredményezett a kontrollcsoportához képest (** $p < 0,01$) (23.B ábra).



23. ábra. A CCK-1 és CCK-2 receptorok relatív mRNS-expressziója csontvelői progenitor sejtekben. (A) LETO patkányok csontvelői mononukleáris sejtjeiben mind a CCK-1R, mind a CCK-2R mRNS-expressziója kimutatható. (B) OLETF patkányok csontvelői mononukleáris sejtjeiben kizárólag a CCK-2R mRNS-expresszió detektálható. A proglumid kezelés (10 mg/kg, per os, 4 hét) hatása a relatív mRNS-szintekre * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a vivőanyaggal kezelt és a proglumiddal kezelt csoportok összehasonlításában; $n = 5$. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk.

6 Megbeszélés

Első kísérletünk célja annak tisztázása volt, hogy a pterostilbén milyen mértékben képes befolyásolni az I/R által kiváltott retinális károsodás patomechanizmusát, valamint, hogy a hatása miként érvényesül egészséges retinában. Különös figyelmet fordítottunk a retina ganglionsejtek (RGC) apoptózisára, a reaktív gliózis kialakulására és a gyulladásos folyamatokra, mivel ezek az I/R sérülést követő retinális degeneráció meghatározó eseményei. Az eredmények alapján a pterostilbén kezelés funkcionális, strukturális és molekuláris szinten egyaránt kedvező irányú változásokat eredményezett, ami arra utal, hogy a vegyület több, egymással összefonódó kóros jelátviteli útvonal modulálásán keresztül fejti ki retinoprotektív hatását.

A pterostilbén-kezelés szignifikánsan javította a retinális funkciót, amit az ERG-felvételeken mért b-hullám amplitúdó növekedése igazolt, mivel a pterostilbén hozzájárul a retinális sejtek – különösen a bipoláris és Müller-sejtek – funkcionális integritásának megőrzéséhez, amelyek kulcsszerepet játszanak a vizuális jelátvitelben [155, 156]. A funkcionális paraméterek javulása arra enged következtetni, hogy a pterostilbén az akut sejtkárosodás mérséklése mellett, a vizuális információfeldolgozás alapját képező sejthálózat működési stabilitásának fenntartásában is szerepet játszik.

A hisztológiai vizsgálatok alapján a pterostilbén kezelés mérsékelte az I/R károsodás következtében kialakuló retinaelvékonyodást, és hozzájárult a retinális rétegződés szerkezeti megőrzéséhez. I/R során elsősorban a ganglionsejtek és a belső retinális neuronok károsodása figyelhető meg, amely a retina belső rétegeinek progresszív elvékonyodásához és a retina belső rétegeinek szerkezeti károsodását eredményezi [157, 158]. Ezek a strukturális változások szoros összefüggést mutatnak a funkcionális károsodás mértékével, így a morfológiai integritás megőrzése nem pusztán anatómiai jelentőségű, hanem a későbbi vizuális teljesítmény egyik meghatározó tényezője is.

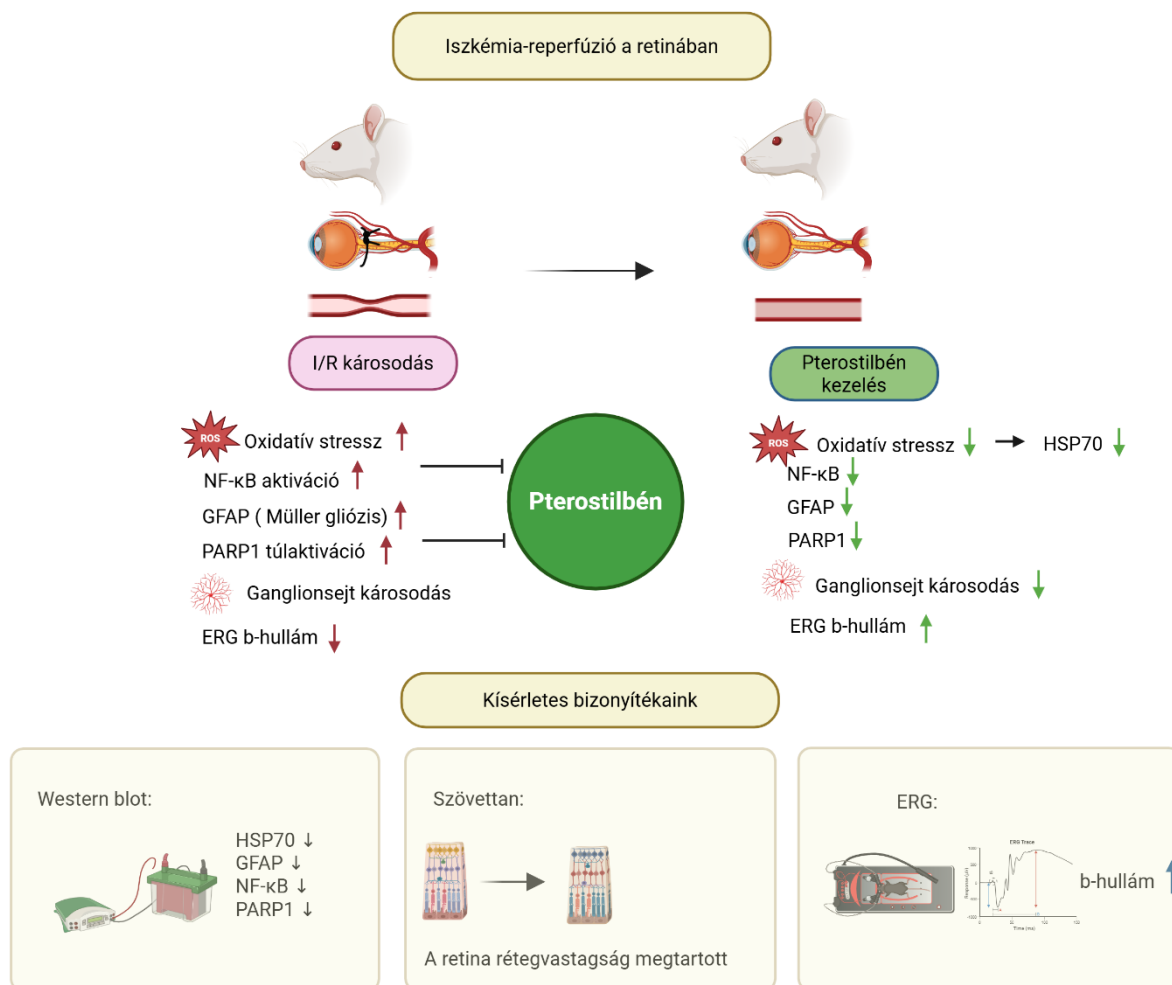
A Western blot vizsgálatokban a GFAP expressziójának csökkenése pterostilbén-kezelést követően a reaktív gliaktiváció mérséklődésére utal [159, 160]. A GFAP a Müller-sejtek és asztrociták aktivációjának egyik legfontosabb markere, amelynek fokozott expressziója az I/R károsodásra adott jellegzetes válaszként értelmezhető. A gliózis a gliasejtek proliferációjával, hipertrofiájával és funkcionális átrendeződésével jár, és bár kezdetben protektív adaptív mechanizmusként jelenhet meg, tartós fennállása hozzájárulhat a gyulladásos mediátorok felszaporodásához, a retinális mikrokörnyezet destabilizálódásához és a másodlagos neuronális

károsodás fokozódásához [161]. A GFAP expresszió csökkenése arra utal, hogy a pterostilbén képes mérsékelni ezt a maladaptív gliális választ, ezáltal kedvezőbb mikrokörnyezetet biztosítva a neuronális túlélés és a retinális funkció megőrzése szempontjából. A sejtes stresszválasz egyik kulcsfontosságú molekulája a HSP70, melynek expressziója csökkent a pterostilbénnel kezelt csoportban. Ellenben oxidatív terhelés, fehérjekárosodás vagy energiahomeosztázis-zavar esetén fokozottan expresszálódik. Emelkedett szintje általában a sejtek fokozott stresszállapotát tükrözi, így csökkent expressziója arra utal, hogy a pterostilbén kezelés mérsékelte az I/R által kiváltott sejtes károsodást [162]. I/R során jelentős mennyiségű ROS keletkezik, amelyek lipidperoxidációt, fehérje- és DNS-károsodást indukálnak. A HSP70-szint mérséklődése ezért összefüggésbe hozható a pterostilbén antioxidáns tulajdonságaival, amelyek révén csökkentheti a ROS-felhalmozódást és mérsékelheti az oxidatív stressz által kiváltott sejtes válaszreakciókat [163-165]. Az általunk megfigyelt molekuláris változások összhangban állnak azokkal a korábbi eredményekkel, amelyek a pterostilbén gyulladáscsökkentő, antioxidáns és antiapoptotikus hatásait írták le [165, 166]. A Western blot vizsgálatok során az NFκB expresszió csökkenése is kimutatható volt a kezelt állatokban. Az NFκB a gyulladásos válasz egyik központi transzkripciós szabályozója, amely aktivációja révén számos proinflammatorikus citokin, kemokin és adhézions molekula expresszióját indukálja [167]. I/R károsodás esetén az NFκB-útvonala aktiválódása jelentősen hozzájárul a másodlagos szöveti sérülés fenntartásához és progressziójához [93, 168]. Az NFκB expresszió mérséklődése arra utal, hogy a pterostilbén a gyulladásos jelátvitel gátlásán keresztül is csökkenti a retinális károsodás súlyosságát, ezáltal mérsékelve a reperfüziós fázisban kialakuló gyulladásos kaszkádot. A PARP1 expresszió csökkenése tovább erősíti azt a feltételezést, hogy a pterostilbén az apoptotikus és energiafüggő sejthalál-mechanizmusokat is befolyásolja. A PARP1 a DNS-károsodás érzékelésében és javításában részt vevő enzim, amely túlzott aktiváció esetén a sejtek NAD⁺- és ATP-készleteinek csökkenéséhez vezet, végső soron pedig sejthalált idéz elő [93, 169, 170]. I/R károsodás során az oxidatív stressz által kiváltott DNS-sérülések a PARP1 túlaktivációját indukálhatják, amely az intracelluláris energiaegyensúly megromlásán keresztül fokozza a sejt-károsodást. A PARP1 expresszió mérséklődése arra utal, hogy a pterostilbén képes mérsékelni ezt a károsodási folyamatot, ezáltal hozzájárulva a sejtek életképességének és funkcionális stabilitásának megőrzéséhez.

A jelen eredmények illeszkednek a pterostilbénnel kapcsolatos korábbi kutatásokhoz, amelyek antioxidáns, gyulladáscsökkentő és neuroprotektív hatásokat írtak le [85, 98, 163]. Ugyanakkor jelen munka kifejezetten a retina I/R károsodás kontextusában igazolja ezen hatásokat. Fontos hangsúlyozni, hogy a vizsgálat több, a károsodás kialakulásában szerepet játszó molekuláris

folyamat egyidejű elemzésével átfogóbb képet ad a vegyület hatásmechanizmusáról, mint az egyetlen biomarkerre korlátozódó megközelítés. A gyulladás, az oxidatív stressz és az apoptózis egyidejű mérséklődése arra utal, hogy a pterostilbén több, egymással összefüggő kóros mechanizmust befolyásol. Az eredmények lehetséges klinikai jelentőségét támasztja alá, hogy az I/R mechanizmusa számos retinális kórkép patogenezisében központi szerepet játszik, így többek között a diabéteszes retinopátiában, az időskori makuladegenerációban, a glaukomában és a centrális retinaartéria-elzáródás esetében is [158, 171, 172]. Ugyanakkor hangsúlyozandó, hogy a vizsgálat állatkísérletes modellen alapult, ami az eredmények közvetlen humán alkalmazhatóságát korlátozza.

A pterostilbén klinikai felhasználhatóságának megítéléséhez elengedhetetlen a megfelelő dózistartomány meghatározása, az alkalmazási mód optimalizálása, a biohasznosulás vizsgálata, valamint a hosszú távú biztonságosság értékelése. További korlátozó tényező, hogy a jelen munka elsősorban az akut I/R fázisra fókuszált, annak igazolásához, hogy a megfigyelt molekuláris és funkcionális változások tartós neuroprotektív előnyt eredményeznek-e, hosszabb távú utánpótlás szükséges. Az eredmények alapján a pterostilbén mérsékelte az I/R károsodáshoz társuló oxidatív stresszt, gyulladásos jelátvitelt és apoptotikus aktivitást, ami összhangban áll a megfigyelt funkcionális és morfológiai javulással. Az oxidatív stressz, a gyulladásos jelátvitel és az apoptotikus aktivitás mérséklődése együttesen arra utal, hogy a vegyület képes csökkenteni a retinális károsodás súlyosságát és hozzájárulni a funkcionális integritás megőrzéséhez. A látásromlás és a kognitív hanyatlás közötti klinikailag igazolt összefüggés alapján a retinális funkció megőrzése nem kizárólag szemészeti szempontból bír jelentőséggel, hanem az életminőség hosszabb távú alakulására is kedvező hatással lehet [173, 174]. A megfigyelt hatásmechanizmus összefoglalását a **24. ábra** szemlélteti.



24. ábra. A pterostilbén hatásának összefoglaló ábrája retina iszkémia–reperfúziós károsodásban. (BioRender, saját készítésű ábra)

Az értekezés második kísérletében a CCK jelátvitel szerepét vizsgáltuk a csontvelői CFU-GM karboplatin által kiváltott károsodással szembeni sérülékenységének alakulásában, különös tekintettel a granulopoézis szabályozására. A mielotoxicitás a karboplatin egyik dóziskorlátozó mellékhatása, amely jelentősen hozzájárul az onkológiai gyógyszerek szűk terápiás ablakához. A vérképzés valamennyi sejtvonala érintett lehet, ugyanakkor a CFU-GM populáció az egyik legfontosabb célpont, mivel károsodásuk közvetlenül korlátozza a kezelési protokollokban alkalmazható dózisokat. Elhízott betegekben bizonyos daganattípusok kockázata magasabb, és a betegség kimenetele is kedvezőtlenebb, mint a normál testsúlyúaknál [175].

A CCK- antagonistákat elsősorban a pancreas- és hepatokarcinómák kezelésére vizsgálják, amelyek gyakorisága obezitásban fokozott, és prognózisuk is kedvezőtlenebb, mint a nem elhízott betegek esetében [176, 177]. Az inzulin, a leptin és a CCK szerepet játszanak a jóllakottság szabályozásában, és e hormonok működészavarai szoros összefüggést mutatnak az obezitás és szövődményeinek kialakulásával [178, 179]. Számos citokin irányítja és támogatja a CFU-GM és elődsejtjeik proliferációját, differenciációját és túlélését. A GM-CSF és a G-CSF elnevezése is e központi szerepükre utal a granulopoézisben. Kevésbé ismert ugyanakkor, hogy az inzulin és a leptin szintén serkentő és védő hatást gyakorolnak a hemopoetikus őssejtekre, valamint a progenitor sejtek széles körére, beleértve a CFU-GM-et is [180, 181].

A leptin serkenti a kolecisztokinin felszabadulását a bélből, míg a kolecisztokinin befolyásolja a leptin eloszlását, valamint szabályozza az inzulin felszabadulását a hasnyálmirigyből. Az említett három hormon között számos szövetben kifejezett szinergista kölcsönhatások figyelhetők meg [182, 183]. A CCK szerepe a hematopoézisben eddig nem volt ismert, ugyanakkor Miyamoto és mtsai [184] kimutatták, hogy CCK-1 receptor-hiányos egerekből származó csontvelő-transzplantáció proinflammatorikus makrofágok kialakulásához vezetett, és súlyosbította a diabéteszes vese károsodását, ami arra utal, hogy a kolecisztokinin a granulopoézist a CCK-1R-függő jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolja.

Vizsgáltuk az OLETF patkányok hematopoézisét, amelyekben genetikai eredetű CCK-1R-hiány áll fenn, valamint a vad LETO patkányokét is, amely törzsből az OLETF patkányok származnak. Az OLETF patkányokat az obezitás és a nem-inzulin-dependens diabétesz mellitusz jól jellemzett állatmodelljeként hozták létre [101]. Korábbi kísérleteinkben a karboplatin csontvelő-toxicitása fokozott volt *in vivo* db/db egerekben, amelyek az obezitással társult diabétesz mellitusz modelljeként szolgálnak [185]. Az OLETF patkányokban körülbelül 18 hetes korban alakul ki diabétesz mellitusz, ezért a diabétesz mellitus hatásainak kizárására kísérleteinkben 8 hetes, normál éhomi vércukorszinttel rendelkező állatokat használtunk. Ugyanakkor az inzulinrezisztencia teljes kizárása ebben az életkorban sem volt lehetséges, mivel az állatok ekkorra már túlsúlyosak voltak. Bár a hematopoézis kezdetben megőrződött az obez OLETF patkányokban, CFU-GM progenitoraik érzékenysége szignifikánsan nagyobb volt a karboplatin toxicitására, mint a LETO patkányoké. Az inzulinrezisztencia önmagában is csökkenti a karboplatin-toxicitással szembeni érzékenységi küszöböt [186]. Ezért a további kísérletekben vad típusú, nem obez LETO patkányokat alkalmaztunk annak vizsgálatára, hogy fiziológiai körülmények között hogyan befolyásolják a CCK-antagonisták a CCK-receptorokon keresztül a granulopoézist.

Korábbi vizsgálatainkban a proglumid gátolta az étkezést követő teljes test inzulin-szenzitizációt 10 mg/kg feletti dózisban [187], míg a lorglumid 10 mg/kg dózisban gátolta a cerulein által kiváltott pancreas-amiláz szekréciót patkányokban [188]. Ennek megfelelően 10 mg/kg proglumidot és 13 mg/kg lorglumidot alkalmaztunk, amelyek ekvimoláris adagolást biztosítanak, ezáltal azonos számú molekula expozícióját eredményezik, és a patkányban élettani hatással bíró dózistartományba esnek. Az inzulinérzékenységhoz/-rezisztenciához kapcsolódó közvetett hatások, valamint a CCK-antagonisták csontvelői sejtekre gyakorolt közvetlen hatásainak elkülönítése érdekében egy alacsonyabb, $8,4 \cdot 10^{-6}$ mol/kg dózist is alkalmaztunk, amely 3 mg/kg proglumidnak, illetve 4 mg/kg lorglumidnak felel meg. Továbbá a proglumid és a lorglumid közvetlen hatásait *in vitro* is vizsgáltuk csontvelői sejtenyészetekben. Megállapítottuk, hogy a CCK-antagonisták szignifikáns gátló hatást fejtettek ki a CFU-GM progenitorokra mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között. Nemcsak a nem szelektív proglumid, hanem a CCK-1R-szelektív lorglumid is károsította a CFU-GM sejteket, ugyanakkor a lorglumid hatása kifejezettebbnek bizonyult, mint a proglumidé. A lorglumid már 4 mg/kg dózisban is mérhetően rontotta a granulopoézist, míg a proglumid az ekvimoláris dózistartományban nem fejtett ki kimutatható hatást. Magasabb dózisok alkalmazása esetén azonban mindkét CCK-antagonista gátolta a CFU-GM progenitor sejtek működését.

In vitro körülmények között a CCK-antagonisták dózisfüggő módon csökkentették a CFU-GM progenitor sejtek aktivitását, ami egyértelműen alátámasztotta a csontvelői progenitorokra kifejtett közvetlen sejtszintű hatásukat. Az IC_{50} értékek a lorglumid és proglumid esetében sorrendben 47,37 μ M és 76,82 μ M voltak.

Mindkét CCK-receptor szerepet játszik a hasnyálmirigy-daganatok karcinogenezisében, ugyanakkor a rendelkezésre álló klinikai adatok alapján a CCK-1 receptor specifikusabb jelentősége valószínűsíthető, mivel egy rendkívül szelektív CCK-2R-antagonista (Z-360) nem bizonyult hatékonynak áttétes hasnyálmirigy-karcinómában egy II. fázisú klinikai vizsgálat során [189]. Mind a proglumid, mind a lorglumid hatékonynak bizonyult *in vivo* állatkísérletes modellekben a hasnyálmirigy -karcinóma ellen [135]. A devazepid, amely a lorglumidtól és a proglumidtól eltérő kémiai szerkezetű, CCK-1R-szelektív antagonista, szintén szignifikánsan csökkentette a hasnyálmirigy-daganatos sejtek invazivitását egérmodellekben [136], ami a CCK-1 receptor közvetített, specifikus hatásmechanizmusra utal.

Tehát megállapítható, hogy az állatkísérletekben antitumor hatékonyságot mutató dózistartományok átfedést mutattak azokkal a dózisokkal, amelyek saját kísérleteinkben a normál csontvelői CFU-GM progenitor sejtek proliferációjának gátlását eredményezték. A

lorglumid 10 mg/kg parenterális adagolás mellett gátolta a hasnyálmirigy-karcinogenezist patkányokban [135, 188], míg a proglumid pancreas- és hepatokarcinómával szemben mutatott hatékonyságot 0,1 mg/ml koncentrációban az ivóvízben, ami egérmodellben megközelítőleg 30 mg/kg orális dózissal felelt meg [133, 190, 191]. Ezenfelül a CCK-antagonistákkal végzett előkezelés fokozta a CFU-GM progenitor sejtek karboplatinral szembeni érzékenységét. A platinaalapú gyógyszerek a daganatellenes kezelések egyik alapvető pillérét képezik, és a kemoterápiában részesülő betegek mintegy fele részesül ilyen típusú kezelésben. A karboplatin a platinaszármazékok között kedvezőbb nem-hematológiai toxicitási profillal rendelkezik, mivel a nefro- és neurotoxicitás mértéke mérsékeltebb, mint más platina-vegyületek esetében. Paklitaxellel kombinálva a karboplatint számos szolid tumor kezelésében alkalmazzák, így például petefészek-, endometrium-, nem kissejtes tüdő- és méhnyak-daganatokban [192-195]. Valamint hatékonynak bizonyult előrehaladott pancreas adenokarcinómák és hepatocelluláris karcinómák terápiájában is [196, 197].

A karboplatin dóziskorlátozó mellékhatása ugyanakkor a mielotoxicitás, amely trombocitopéniában és kifejezett neutropéniában nyilvánul meg. Paklitaxellel történő kombináció esetén a trombocitopénia mértéke mérsékelhető, azonban a karboplatin által indukált neutropénia érdemben nem befolyásolható [198].

Saját eredményeink alapján a CCK-1R-szelektív lorglumiddal végzett előkezelés a CFU-GM progenitor sejtek érzékenységét nagyobb mértékben fokozta, és a karboplatin myelotoxikus hatását kifejezettebben erősítette, mint a nem-szelektív proglumid. A proglumid, mint nem szelektív CCK-receptor-antagonista, septicus állapotban csökkentette a neutrofilek és makrofágok fertőzéses gócba történő migrációját [199]. A CCK-2 receptor jelenlétét humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben [200, 201], valamint perifériás vérből származó polimorfonukleáris leukocitákon is igazolták [129]. Patkány tüdő intersticiális makrofágjaiban mind a CCK-1R, mind a CCK-2R expresszióját kimutatták, és lipopoliszacharid-stimuláció hatására ezen receptorok génexpressziója fokozódott [202]. Peritoneális makrofágokban ezzel szemben kizárólag CCK-1R volt detektálható, míg a CCK-2R jelenléte nem volt kimutatható, és a CCK-1R génexpressziója lipopoliszacharid hatására szignifikánsan emelkedett. A CCK gyulladáscsökkentő és immunmoduláló hatásai túlnyomórészt a CCK-1 receptor közvetítésével érvényesülnek, beleértve az iNOS expresszió csökkentését, az NF- κ B-jelátviteli útvonal aktivitásának mérséklését, valamint a fagocitózis és a makrofágok által közvetített szöveti infiltráció gátlását, amelyek potenciálisan kedvező hatással bírhatnak septicus állapotokban. Ezzel szemben a devazepid, egy CCK-1R-szelektív antagonista, képes volt ezen immunmoduláló hatások egy részének gátlására [130] [141]. Azonban a HL-60 promielocitás

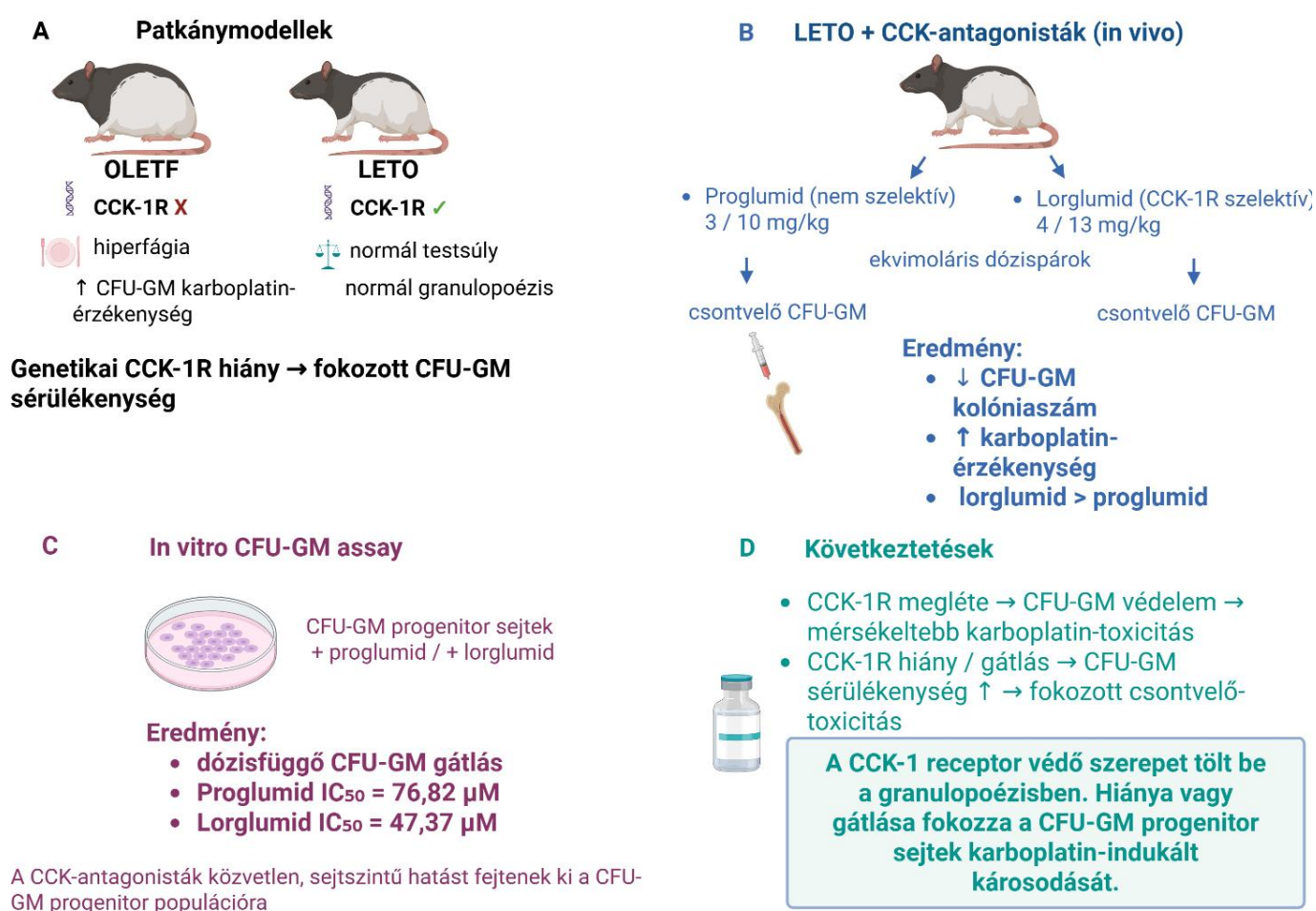
leukémiás sejtvonalban kimutatták a CCK-2R jelenlétét [129]. Ugyanakkor jelenleg nem állnak rendelkezésre egyértelmű adatok arra vonatkozóan, hogy ezek a receptorok normál hematopoetikus sejtekben is megtalálhatók-e. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a normál CFU-GM progenitor sejtekben nemcsak a CCK-2R, hanem a CCK-1R is expresszálódik, és potenciálisan védő szerepet tölthet be. Mindkét receptort kimutattuk a LETO patkányok CFU-GM-ben gazdag csontvelőjében. A proglumid 10 mg/kg dózisu, négy héten át alkalmazott orális kezelése mindkét receptor expresszióját csökkentette. Az OLETF patkányokban, ahol genetikai okból a CCK-1R funkcionálisan hiányzik, kizárólag a CCK-2R volt kimutatható. A LETO patkányok CFU-GM sejteiben mindkét CCK-receptort detektáltuk, és a CCK-antagonistákkal végzett kísérleteink arra utaltak, hogy az obese OLETF patkányokban fennálló CCK-1R-hiány legalább részben hozzájárulhat a csontvelői progenitor sejtek karboplatinnal szembeni fokozott érzékenységehez. Érdemes megemlíteni, hogy az anorexién hatású inzulin és leptin is szerepet játszik a limfo- és mielopoézis fenntartásában [180, 181], és korábbi vizsgálatainkban az inzulin granulopoézist védő hatását is igazoltuk [203].

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a CCK szintén védő szerepet tölthet be a granulopoézisben. A jelen vizsgálat adatai összességében arra utalnak, hogy a CCK-1 receptorok szerepet játszanak a granulopoézis szabályozásában. Az a tény, hogy a leptin- vagy CCK-agonistákkal végzett terápiás próbálkozások nem bizonyultak hatékonynak az obezitasban jelentkező étvágyfokozódás csökkentésében, arra utal, hogy az inzulinrezisztencia mellett más citokinekkal szembeni csökkent érzékenység kialakulása is feltételezhető [204]. Ezt támasztják alá Desai és mtsai. [205] eredményei is, akik kimutatták, hogy a CCK-1 válaszkészsége populáción belül változó, és obese betegekben csökkent a normál súlyú betegekhez képest. Korábban kimutattuk, hogy az inzulinrezisztencia a csontvelői progenitor sejtek működését is érinti, és hogy a rosiglitazon, egy inzulinérzékenyítő szer, védőhatással bír a 5-fluorouracil által kiváltott mielotoxicitással szemben [203, 206]. Legutóbbi eredményeink összhangban állnak Miyamoto és munkatársai [184] megfigyeléseivel, amelyek szerint a CCK védő szerepet játszik a granulopoézisben a CCK-1 receptor közvetítésével, a normál csontvelő-eredetű makrofágok képződése során. A CCK-antagonisták alkalmazása befolyásolta a granulopoézist, és érzékenyebbé tette a CFU-GM sejteket a karboplatin toxicitásával szemben, feltehetően azért, hogy gátolta a koleciszto kinin CCK-1 receptoron keresztül érvényesülő védőhatását, amely a funkcionálisan releváns, specifikus koleciszto kinin-receptor. Összhangban a korábbi publikációkkal, amelyek a koleciszto kinin immunmoduláló hatásait írták le az érett makrofágokon [129, 141, 199, 202], vizsgálataink igazolták, hogy ezek a szabályozó funkciók a csontvelői progenitor sejtek szintjén is érvényesülnek.

További vizsgálatok szükségesek a CCK-receptorok CFU-GM sejtekben betöltött funkcionális szerepének és biológiai jelentőségének pontosabb megértéséhez.

Amennyiben a CCK védő szerepe különböző élettani és kóros állapotokban is megerősítést nyer, annak számottevő klinikai relevanciája lehet, nemcsak a daganatok kezelésében alkalmazott CCK-antagonisták esetében, hanem egyéb indikációkban is, például elhízásban vagy immunszuppresszív terápiák során.

A második kísérletsorozat során feltárt eredmények és összefüggések összefoglalását a **25. ábra** mutatja be.



25. ábra. A CCK-jelátvitel és a CFU-GM progenitor sejtek karboplatin-érzékenysége közötti összefüggések összefoglalása. (BioRender, saját készítésű ábra)

7 Összegzés - Summary

Kutatócsoportunk célja a pterostilbén, valamint a kolecisztokinin és antagonistái szerepének vizsgálata volt kísérletes patkánymodellekben, eltérő kórélettani környezetben. Munkánk során olyan folyamatokat vizsgáltunk, amelyekben a sejtkárosodás mértéke kísérletesen befolyásolható egy természetes eredetű vegyület alkalmazásával, illetve endogén szabályozó rendszerek működésének módosításával.

Az értekezés első részében patkány retina iszkémia–reperfúziós modellben elemeztük a pterostilbén hatását. Eredményeink alapján a pterostilbén kedvezően befolyásolta a retina funkcionális állapotát, és csökkentette az iszkémia–reperfúzióhoz társuló funkcionális, strukturális és molekuláris eltérések mértékét.

Az értekezés második részében a csontvelői CFU-GM karboplatinmal szembeni érzékenységet vizsgáltuk kolecisztokinin receptor antagonisták alkalmazása, illetve CCK-1 receptorhiány mellett. A kapott eredmények szerint mind a kolecisztokinin receptorok farmakológiai gátlása, mind a CCK-1 receptorhiány fokozta a progenitor sejtek citotoxikus hatásokkal szembeni érzékenységet, ami a kolecisztokinin granulopoézisben betöltött szerepét támasztja alá.

The aim of our research group was to investigate the role of pterostilbene, as well as cholecystokinin and its antagonists, in experimental rat models under different pathophysiological conditions. In our work, we examined processes in which the extent of cellular damage can be experimentally modulated by the administration of a natural compound and by the modification of endogenous regulatory systems.

In the first part of the dissertation, the effects of pterostilbene were analyzed in a rat model of retinal ischemia–reperfusion injury. Based on our results, pterostilbene favorably influenced retinal functional status and reduced the extent of ischemia–reperfusion–associated functional, structural, and molecular alterations.

In the second part of the dissertation, we investigated the sensitivity of bone marrow CFU-GM progenitors to carboplatin under conditions of cholecystokinin receptor antagonist treatment and CCK-1 receptor deficiency. According to the obtained results, both factors increased the sensitivity of progenitor cells to toxic insults, supporting the role of cholecystokinin in the regulation of granulopoiesis.

8 Az értekezés új megállapításai

Patkány retinális iszkémia–reperfúziós modellben a retina funkcionális állapota pterostilbén kezelés hatására szignifikánsan javul, amit az ERG vizsgálatok során mért szkotópiás b-hullám amplitúdók növekedése igazol a vivőanyaggal kezelt iszkémiás csoporthoz viszonyítva.

A retina strukturális integritásának megőrzése pterostilbén kezelés mellett mind iszkémiás, mind nem iszkémiás körülmények között kimutatható, mivel a kezelés szignifikánsan mérsékli az iszkémia–reperfúzió következtében kialakuló retinavékonyodást.

A retina I/R károsodására jellemző reaktív gliózis és sejtes stresszválasz pterostilbén kezelés hatására szignifikánsan csökken, amit a GFAP és HSP70 fehérjék expressziójának mérséklődése támaszt alá.

A gyulladásos és apoptotikus jelátviteli folyamatok aktivációja pterostilbén kezelés mellett jelentősen mérséklődik a retina szövetében, amit az NF κ B és PARP1 fehérjék csökkent expressziója igazol.

CCK-1 receptorhiányos, elhízott OLETF patkányokban a CFU-GM karboplatinral szembeni érzékenysége szignifikánsan fokozott, amit a dózis–hatás görbe balra tolódása és az IC₅₀ érték csökkenése mutat.

CCK receptor antagonisták alkalmazása nem elhízott LETO patkányokban szignifikánsan csökkenti a CFU-GM progenitor sejtek számát *in vivo*, ami a granulopoézis károsodását tükrözi.

A CCK-1R-szelektív lorglumid alacsony dózisban is kifejezettebb CFU-GM-csökkentő hatást fejt ki, mint az azonos mólszámú, nem szelektív proglumid, ami a CCK-1 receptor kiemelt szerepét támasztja alá a granulopoézis szabályozásában.

Proglumid és lorglumid előkezelés fokozza a CFU-GM progenitor sejtek karboplatinral szembeni érzékenységét, ami dózisfüggő módon csökkent kolóniaképző képességben nyilvánul meg.

In vitro csontvelői sejttenyészetekben mindkét CCK antagonistát közvetlen, dóziszfüggő gátló hatást fejt ki a CFU-GM progenitor sejtek proliferációjára, kizárva az indirekt metabolikus mechanizmusok elsődleges szerepét.

CFU-GM progenitor sejtekben mind a CCK-1R, mind a CCK-2R expressziója kimutatható, míg CCK-1R-hiányos OLETF patkányokban kizárólag a CCK-2R van jelen. Eredményeink arra utalnak, hogy a kolekisztokinin protektív hatást fejt ki a granulopoézis során, amely döntően CCK-1R-mediált mechanizmusokon keresztül érvényesül.

9 Irodalomjegyzék

1. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019*. J Nat Prod, 2020. **83**(3): p. 770-803.
2. Atanasov, A.G., et al., *Natural products in drug discovery: advances and opportunities*. Nat Rev Drug Discov, 2021. **20**(3): p. 200-216.
3. Pezzuto, J.M., *Plant-derived anticancer agents*. Biochem Pharmacol, 1997. **53**(2): p. 121-33.
4. Drucker, D.J., *The biology of incretin hormones*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 153-65.
5. Liang, H., et al., *Methyl gallate: Review of pharmacological activity*. Pharmacol Res, 2023. **194**: p. 106849.
6. Tsai, H.Y., C.T. Ho, and Y.K. Chen, *Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene*. J Food Drug Anal, 2017. **25**(1): p. 134-147.
7. Herranz, R., *Cholecystokinin antagonists: pharmacological and therapeutic potential*. Med Res Rev, 2003. **23**(5): p. 559-605.
8. Hoon, M., et al., *Functional architecture of the retina: development and disease*. Prog Retin Eye Res, 2014. **42**: p. 44-84.
9. Ruan, Y., et al., *Oxidative Stress and Vascular Dysfunction in the Retina: Therapeutic Strategies*. Antioxidants (Basel), 2020. **9**(8).
10. Hurley, J.B., *Retina Metabolism and Metabolism in the Pigmented Epithelium: A Busy Intersection*. Annu Rev Vis Sci, 2021. **7**: p. 665-692.
11. Thierry, M., et al., *Metabolic syndrome triggered by high-fructose diet favors choroidal neovascularization and impairs retinal light sensitivity in the rat*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112450.
12. Ates, O., et al., *Increased serum levels of leptin in retinal vein occlusion*. Tohoku J Exp Med, 2008. **215**(4): p. 373-6.
13. Reinhard, K. and T.A. Münch, *Visual properties of human retinal ganglion cells*. PLoS One, 2021. **16**(2): p. e0246952.
14. Arredondo Zamarripa, D., et al., *Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 333.
15. Xia, T. and L.J. Rizzolo, *Effects of diabetic retinopathy on the barrier functions of the retinal pigment epithelium*. Vision Res, 2017. **139**: p. 72-81.
16. Kinder, L., T. Palumaa, and M. Lindner, *[Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells]*. Ophthalmologe, 2022. **119**(4): p. 358-366.
17. O'Leary, F. and M. Campbell, *The blood-retina barrier in health and disease*. Febs j, 2023. **290**(4): p. 878-891.
18. Hsueh, Y.J., et al., *The Pathomechanism, Antioxidant Biomarkers, and Treatment of Oxidative Stress-Related Eye Diseases*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(3).
19. Nita, M. and A. Grzybowski, *The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 3164734.
20. Caprara, C., et al., *HIF1A is essential for the development of the intermediate plexus of the retinal vasculature*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(5): p. 2109-17.
21. Daruich, A., et al., *Mechanisms of macular edema: Beyond the surface*. Prog Retin Eye Res, 2018. **63**: p. 20-68.
22. Cogger, V.C., et al., *The response of fenestrations, actin, and caveolin-1 to vascular endothelial growth factor in SK Hep1 cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **295**(1): p. G137-g145.

23. Behar-Cohen, F., et al., *Potential antiedematous effects of intravitreal anti-VEGF, unrelated to VEGF neutralization*. Drug Discov Today, 2019. **24**(8): p. 1436-1439.
24. Böhm, E.W., B. Stoffelns, and A. Gericke, *β -Adrenoreceptors as Therapeutic Targets for Ocular Tumors and Other Eye Diseases-Historical Aspects and Nowadays Understanding*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(5).
25. Reiner, A., et al., *Neural control of choroidal blood flow*. Prog Retin Eye Res, 2018. **64**: p. 96-130.
26. Crabtree, M.J. and K.M. Channon, *Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease*. Nitric Oxide, 2011. **25**(2): p. 81-8.
27. Choo, P.P., et al., *Review of Evidence for the Usage of Antioxidants for Eye Aging*. Biomed Res Int, 2022. **2022**: p. 5810373.
28. Stone, W.L., et al., *Retinopathy*, in *StatPearls*. 2025, StatPearls Publishing

Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

29. Lee, D., et al., *Recent Insights into Roles of Hypoxia-Inducible Factors in Retinal Diseases*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(18).
30. Alarcon-Martinez, L., et al., *Neurovascular dysfunction in glaucoma*. Prog Retin Eye Res, 2023. **97**: p. 101217.
31. Nowak, J.Z., *Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration*. Pharmacol Rep, 2013. **65**(2): p. 288-304.
32. Kremers, J., *The assessment of L- and M-cone specific electroretinographical signals in the normal and abnormal human retina*. Prog Retin Eye Res, 2003. **22**(5): p. 579-605.
33. Perlman, I., *The Electroretinogram: ERG*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, et al., Editors. 1995, University of Utah Health Sciences Center

Copyright: © 2026 Webvision . Salt Lake City (UT).

34. McCulloch, D.L., et al., *ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update)*. Doc Ophthalmol, 2015. **130**(1): p. 1-12.
35. Robson, A.G., et al., *ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2022 update)*. Doc Ophthalmol, 2022. **144**(3): p. 165-177.
36. Zhao, Y., et al., *Changes in retinal morphology, electroretinogram and visual behavior after transient global ischemia in adult rats*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65555.
37. Wilsey, L.J. and B. Fortune, *Electroretinography in glaucoma diagnosis*. Curr Opin Ophthalmol, 2016. **27**(2): p. 118-24.
38. Li, R., Z. Jia, and M.A. Trush, *Defining ROS in Biology and Medicine*. React Oxyg Species (Apex), 2016. **1**(1): p. 9-21.
39. Yu, D.Y., et al., *Retinal capillary perfusion: Spatial and temporal heterogeneity*. Prog Retin Eye Res, 2019. **70**: p. 23-54.
40. Chinskey, N.D., C.G. Besirli, and D.N. Zacks, *Retinal cell death and current strategies in retinal neuroprotection*. Curr Opin Ophthalmol, 2014. **25**(3): p. 228-33.
41. Carrera-Julía, S., et al., *Antioxidant Alternatives in the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Comprehensive Review*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 63.
42. Mayer, M.P. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(6): p. 670-84.
43. Liu, W., et al., *Neuroprotective Effects of HSF1 in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019. **60**(4): p. 965-977.
44. Yang, Z. and K.K. Wang, *Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker*. Trends Neurosci, 2015. **38**(6): p. 364-74.

45. Zhang, X., et al., *Protective effects of remote ischemic conditioning against ischemia/reperfusion-induced retinal injury in rats*. Vis Neurosci, 2014. **31**(3): p. 245-52.
46. Li, X., et al., *PARP-1 Is a Potential Marker of Retinal Photooxidation and a Key Signal Regulator in Retinal Light Injury*. Oxid Med Cell Longev, 2022. **2022**: p. 6881322.
47. Yang, Y., et al., *Olaparib, a PARP-1 inhibitor, protects retinal cells from ocular hypertension-associated oxidative damage*. Front Cell Dev Biol, 2022. **10**: p. 925835.
48. Palazzo, I., et al., *NFkB-signaling promotes glial reactivity and suppresses Müller glia-mediated neuron regeneration in the mammalian retina*. Glia, 2022. **70**(7): p. 1380-1401.
49. Liu, T., et al., *NF-κB signaling in inflammation*. Signal Transduct Target Ther, 2017. **2**: p. 17023-.
50. Halliwell, B., *Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2024. **25**(1): p. 13-33.
51. Sideri, O., et al., *The potential role of nutrition on lens pathology: a systematic review and meta-analysis*. Surv Ophthalmol, 2019. **64**(5): p. 668-678.
52. Loskutova, E., et al., *Nutritional supplementation in the treatment of glaucoma: A systematic review*. Surv Ophthalmol, 2019. **64**(2): p. 195-216.
53. Li, C., et al., *Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 9702820.
54. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13659.
55. Hybertson, B.M., et al., *Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation*. Mol Aspects Med, 2011. **32**(4-6): p. 234-46.
56. Taurone, S., et al., *Oxidative stress and visual system: a review*. Excli j, 2022. **21**: p. 544-553.
57. Lushchak, V.I., *Classification of oxidative stress based on its intensity*. Excli j, 2014. **13**: p. 922-37.
58. Marchitti, S.A., et al., *Ultraviolet radiation: cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes*. Eye Contact Lens, 2011. **37**(4): p. 206-13.
59. Franco, R., G. Navarro, and E. Martínez-Pinilla, *Antioxidant Defense Mechanisms in Erythrocytes and in the Central Nervous System*. Antioxidants (Basel), 2019. **8**(2).
60. Kirkman, H.N., et al., *Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 13908-14.
61. Ho, H.Y., M.L. Cheng, and D.T. Chiu, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases*. Redox Rep, 2007. **12**(3): p. 109-18.
62. Liebler, D.C., *The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E*. Crit Rev Toxicol, 1993. **23**(2): p. 147-69.
63. Glantzounis, G.K., et al., *Uric acid and oxidative stress*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(32): p. 4145-51.
64. Palace, V.P., et al., *Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(5-6): p. 746-61.
65. Guina, T., et al., *Inflammatory and redox reactions in colorectal carcinogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1340**: p. 95-103.
66. Murata, M., et al., *Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 623019.
67. Korbecki, J., et al., *The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid*. J Physiol Pharmacol, 2013. **64**(4): p. 409-21.

68. Barrera, G., *Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy*. ISRN Oncol, 2012. **2012**: p. 137289.
69. Matsuzawa, A. and H. Ichijo, *Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(11): p. 1325-36.
70. Dizdaroglu, M., et al., *Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(11): p. 1102-15.
71. Dizdaroglu, M. and P. Jaruga, *Mechanisms of free radical-induced damage to DNA*. Free Radic Res, 2012. **46**(4): p. 382-419.
72. Ayala, A., M.F. Muñoz, and S. Argüelles, *Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal*. Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 360438.
73. Forman, H.J. and H. Zhang, *Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2021. **20**(9): p. 689-709.
74. Hayes, J.D., A.T. Dinkova-Kostova, and K.D. Tew, *Oxidative Stress in Cancer*. Cancer Cell, 2020. **38**(2): p. 167-197.
75. Peng, L., et al., *Redox-sensitive cyclophilin A elicits chemoresistance through realigning cellular oxidative status in colorectal cancer*. Cell Rep, 2021. **37**(9): p. 110069.
76. Cui, Q., et al., *Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer*. Drug Resist Updat, 2018. **41**: p. 1-25.
77. Zhang, P., et al., *Disulfide bond based polymeric drug carriers for cancer chemotherapy and relevant redox environments in mammals*. Med Res Rev, 2018. **38**(5): p. 1485-1510.
78. Abraham, A., et al., *Vitamin E and its anticancer effects*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019. **59**(17): p. 2831-2838.
79. Wang, W., et al., *Curcumin in cancer therapy: Exploring molecular mechanisms and overcoming clinical challenges*. Cancer Lett, 2023. **570**: p. 216332.
80. Bryan, R.T., et al., *Selenium and Vitamin E for Prevention of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Recurrence and Progression: A Randomized Clinical Trial*. JAMA Netw Open, 2023. **6**(10): p. e2337494.
81. Liang, X., et al., *Oxidative stress in cancer: from tumor and microenvironment remodeling to therapeutic frontiers*. Mol Cancer, 2025. **24**(1): p. 219.
82. Martinez-Outschoorn, U.E., et al., *Cancer metabolism: a therapeutic perspective*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(1): p. 11-31.
83. Rojo de la Vega, M., E. Chapman, and D.D. Zhang, *NRF2 and the Hallmarks of Cancer*. Cancer Cell, 2018. **34**(1): p. 21-43.
84. Wang, P. and S. Sang, *Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene*. Biofactors, 2018. **44**(1): p. 16-25.
85. Kim, H., K.H. Seo, and W. Yokoyama, *Chemistry of Pterostilbene and Its Metabolic Effects*. J Agric Food Chem, 2020. **68**(46): p. 12836-12841.
86. Estrela, J.M., et al., *Pterostilbene: Biomedical applications*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2013. **50**(3): p. 65-78.
87. Kosuru, R., et al., *Promising therapeutic potential of pterostilbene and its mechanistic insight based on preclinical evidence*. Eur J Pharmacol, 2016. **789**: p. 229-243.
88. Pan, Z., et al., *Identification of molecular pathways affected by pterostilbene, a natural dimethylether analog of resveratrol*. BMC Med Genomics, 2008. **1**: p. 7.
89. Manickam, M., et al., *Antihyperglycemic activity of phenolics from Pterocarpus marsupium*. J Nat Prod, 1997. **60**(6): p. 609-10.
90. Schmidlin, L., et al., *A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine*. Plant Physiol, 2008. **148**(3): p. 1630-9.

91. McCormack, D. and D. McFadden, *Pterostilbene and cancer: current review*. J Surg Res, 2012. **173**(2): p. e53-61.
92. Li, J., et al., *Blueberry Component Pterostilbene Protects Corneal Epithelial Cells from Inflammation via Anti-oxidative Pathway*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19408.
93. Surien, O., et al., *Potential Chemopreventive Role of Pterostilbene in Its Modulation of the Apoptosis Pathway*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(11).
94. Tonev, D. and A. Momchilova, *Oxidative Stress and the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) Pathway in Multiple Sclerosis: Focus on Certain Exogenous and Endogenous Nrf2 Activators and Therapeutic Plasma Exchange Modulation*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(24).
95. de Queiroz, K.B., et al., *Resveratrol Acts Anti-Inflammatory and Neuroprotective in an Infant Rat Model of Pneumococcal Meningitis by Modulating the Hippocampal miRNome*. Mol Neurobiol, 2018. **55**(12): p. 8869-8884.
96. Liu, H., et al., *Pterostilbene Attenuates Astrocytic Inflammation and Neuronal Oxidative Injury After Ischemia-Reperfusion by Inhibiting NF- κ B Phosphorylation*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2408.
97. Qu, X., L. Zhang, and L. Wang, *Pterostilbene as a Therapeutic Alternative for Central Nervous System Disorders: A Review of the Current Status and Perspectives*. J Agric Food Chem, 2023. **71**(40): p. 14432-14457.
98. Remsberg, C.M., et al., *Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity*. Phytother Res, 2008. **22**(2): p. 169-79.
99. Kapetanovic, I.M., et al., *Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **68**(3): p. 593-601.
100. Kawano, K., et al., *Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain*. Diabetes, 1992. **41**(11): p. 1422-8.
101. Miyasaka, K., et al., *Lack of satiety effect of cholecystokinin (CCK) in a new rat model not expressing the CCK-A receptor gene*. Neurosci Lett, 1994. **180**(2): p. 143-6.
102. Rehfeld, J.F., *Cholecystokinin: Clinical aspects of the new biology*. J Intern Med, 2025. **298**(3): p. 251-267.
103. Martin, A.M., E.W. Sun, and D.J. Keating, *Mechanisms controlling hormone secretion in human gut and its relevance to metabolism*. J Endocrinol, 2019. **244**(1): p. R1-r15.
104. Rehfeld, J.F., *Cholecystokinin-From Local Gut Hormone to Ubiquitous Messenger*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 47.
105. Tanaka, T., et al., *Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **377**(4-6): p. 523-7.
106. Innis, R.B. and S.H. Snyder, *Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(11): p. 6917-21.
107. Alexander, S.P.H., et al., *The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2023/24: G protein-coupled receptors*. Br J Pharmacol, 2023. **180** Suppl 2: p. S23-s144.
108. Zeng, Q., et al., *Gastrin, Cholecystokinin, Signaling, and Biological Activities in Cellular Processes*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 112.
109. Lavine, J.A., et al., *Cholecystokinin expression in the β -cell leads to increased β -cell area in aged mice and protects from streptozotocin-induced diabetes and apoptosis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015. **309**(10): p. E819-28.
110. Smith, J.P. and T.E. Solomon, *Cholecystokinin and pancreatic cancer: the chicken or the egg?* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014. **306**(2): p. G91-g101.

111. Reubi, J.C., J.C. Schaer, and B. Waser, *Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors*. Cancer Res, 1997. **57**(7): p. 1377-86.
112. Bastard, J.P., et al., *Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance*. Eur Cytokine Netw, 2006. **17**(1): p. 4-12.
113. Kelly, A.C., T.L. Powell, and T. Jansson, *Placental function in maternal obesity*. Clin Sci (Lond), 2020. **134**(8): p. 961-984.
114. Kosmas, C.E., et al., *Insulin resistance and cardiovascular disease*. J Int Med Res, 2023. **51**(3): p. 3000605231164548.
115. Ahmed, B., R. Sultana, and M.W. Greene, *Adipose tissue and insulin resistance in obese*. Biomed Pharmacother, 2021. **137**: p. 111315.
116. Enriori, P.J., et al., *Leptin resistance and obesity*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14 Suppl 5**: p. 254s-258s.
117. Kajikawa, M. and Y. Higashi, *Obesity and Endothelial Function*. Biomedicines, 2022. **10**(7).
118. Russo, S., et al., *Meta-Inflammation and Metabolic Reprogramming of Macrophages in Diabetes and Obesity: The Importance of Metabolites*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 746151.
119. Kawai, T., M.V. Autieri, and R. Scalia, *Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity*. Am J Physiol Cell Physiol, 2021. **320**(3): p. C375-c391.
120. Li, H., et al., *Oxidative stress: The nexus of obesity and cognitive dysfunction in diabetes*. Front Endocrinol (Lausanne), 2023. **14**: p. 1134025.
121. Fernández-Sánchez, A., et al., *Inflammation, oxidative stress, and obesity*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(5): p. 3117-32.
122. Ong, G., et al., *IRE1 signaling increases PERK expression during chronic ER stress*. Cell Death Dis, 2024. **15**(4): p. 276.
123. Jovanović, M., et al., *Oxidative Stress Linking Obesity and Cancer: Is Obesity a 'Radical Trigger' to Cancer?* Int J Mol Sci, 2023. **24**(9).
124. Petrie, J.R., T.J. Guzik, and R.M. Touyz, *Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms*. Can J Cardiol, 2018. **34**(5): p. 575-584.
125. Ahn, S.J., et al., *Impairment of endothelial glycocalyx in atherosclerosis and obesity*. Curr Top Membr, 2023. **91**: p. 1-19.
126. Dunlop, J., *CCK receptor antagonists*. Gen Pharmacol, 1998. **31**(4): p. 519-24.
127. Rehfeld, J.F., *Cholecystokinin and the hormone concept*. Endocr Connect, 2021. **10**(3): p. R139-r150.
128. Zhang, Q., et al., *Erianin induces apoptosis and pyroptosis via MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways and synergizes with anlotinib in anaplastic thyroid carcinoma*. Front Pharmacol, 2025. **16**: p. 1596873.
129. Iwata, N., et al., *Autocrine loop through cholecystokinin-B/gastrin receptors involved in growth of human leukemia cells*. Blood, 1996. **88**(7): p. 2683-9.
130. Batty, M.J., et al., *Metabolic Hormones Modulate Macrophage Inflammatory Responses*. Cancers (Basel), 2021. **13**(18).
131. Smith, J.P., L.K. Fonkua, and T.W. Moody, *The Role of Gastrin and CCK Receptors in Pancreatic Cancer and other Malignancies*. Int J Biol Sci, 2016. **12**(3): p. 283-91.
132. Smith, J.P., et al., *Cholecystokinin receptor antagonist halts progression of pancreatic cancer precursor lesions and fibrosis in mice*. Pancreas, 2014. **43**(7): p. 1050-9.
133. Gay, M.D., et al., *Targeting the Cholecystokinin Receptor: A Novel Approach for Treatment and Prevention of Hepatocellular Cancer*. Cancer Prev Res (Phila), 2021. **14**(1): p. 17-30.

134. Shivapurkar, N., et al., *Treatment with a Cholecystokinin Receptor Antagonist, Proglumide, Improves Efficacy of Immune Checkpoint Antibodies in Hepatocellular Carcinoma*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(4).
135. Watanapa, P., et al., *Inhibitory effect of a cholecystokinin antagonist on pancreatic carcinogenesis after pancreatobiliary diversion*. Br J Cancer, 1993. **67**(4): p. 663-7.
136. Matters, G.L., et al., *Cholecystokinin mediates progression and metastasis of pancreatic cancer associated with dietary fat*. Dig Dis Sci, 2014. **59**(6): p. 1180-91.
137. Abbruzzese, J.L., et al., *A pilot clinical trial of the cholecystokinin receptor antagonist MK-329 in patients with advanced pancreatic cancer*. Pancreas, 1992. **7**(2): p. 165-71.
138. Chau, I., et al., *Gastrazole (JB95008), a novel CCK2/gastrin receptor antagonist, in the treatment of advanced pancreatic cancer: results from two randomised controlled trials*. Br J Cancer, 2006. **94**(8): p. 1107-15.
139. Chen, Y.P., et al., *Long-term effects of proglumide on resection of cardiac adenocarcinoma*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(17): p. 2549-51.
140. De la Fuente, M., et al., *Inhibition of murine peritoneal macrophage functions by sulfated cholecystokinin octapeptide*. Regul Pept, 1995. **55**(1): p. 47-56.
141. Saia, R.S., et al., *Cholecystokinin inhibits inducible nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 896029.
142. Stubbs, M., et al., *CCK2 gastrin receptor as a potential target for therapy in leukaemia cell lines*. Oncol Rep, 2005. **14**(4): p. 1055-8.
143. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-44.
144. Ding, L. and S.J. Morrison, *Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches*. Nature, 2013. **495**(7440): p. 231-5.
145. Purton, L.E. and D.T. Scadden, *Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 263-70.
146. Zhang, Y., et al., *Hematopoietic Hierarchy - An Updated Roadmap*. Trends Cell Biol, 2018. **28**(12): p. 976-986.
147. *Carboplatin*, in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. 2012, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda (MD).
148. Canetta, R., M. Rozenzweig, and S.K. Carter, *Carboplatin: the clinical spectrum to date*. Cancer Treat Rev, 1985. **12 Suppl A**: p. 125-36.
149. Bowers, E. and K. Singer, *Obesity-induced inflammation: The impact of the hematopoietic stem cell niche*. JCI Insight, 2021. **6**(3).
150. Szilágyi, A., et al., *Therapeutic Properties of Ayahuasca Components in Ischemia/Reperfusion Injury of the Eye*. Biomedicines, 2022. **10**(5).
151. Varga, B., et al., *Protective effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) on the recovery of ischemia/reperfusion (I/R)-induced retinal damage in a rat model*. J Mol Neurosci, 2013. **50**(3): p. 558-70.
152. Benko, I., et al., *Comparison of the toxicity of fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro*. J Antimicrob Chemother, 1999. **43**(5): p. 675-81.
153. Varga, A., et al., *Effect of experimental hypercholesterolaemia on K⁺ channel α -subunit mRNA levels in rabbit hearts*. Eur J Pharmacol, 2007. **562**(1-2): p. 130-1.
154. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta$ C_T) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

155. Ozawa, Y., et al., *Aquaporin 4 Suppresses Neural Hyperactivity and Synaptic Fatigue and Fine-Tunes Neurotransmission to Regulate Visual Function in the Mouse Retina*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(12): p. 8124-8135.
156. Lawrenson, J.G., C.C. Hull, and L.E. Downie, *The effect of blue-light blocking spectacle lenses on visual performance, macular health and the sleep-wake cycle: a systematic review of the literature*. Ophthalmic Physiol Opt, 2017. **37**(6): p. 644-654.
157. Luo, H., et al., *Resveratrol Delays Retinal Ganglion Cell Loss and Attenuates Gliosis-Related Inflammation From Ischemia-Reperfusion Injury*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018. **59**(10): p. 3879-3888.
158. Chronopoulos, P., et al., *Effects of Resveratrol on Vascular Function in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury*. Antioxidants (Basel), 2023. **12**(4).
159. Fang, X.L., et al., *Suppression of cAMP/PKA/CREB signaling ameliorates retinal injury in diabetic retinopathy*. Kaohsiung J Med Sci, 2023. **39**(9): p. 916-926.
160. Subirada, P.V., et al., *Rapamycin and Resveratrol Modulate the Gliotic and Pro-Angiogenic Response in Müller Glial Cells Under Hypoxia*. Front Cell Dev Biol, 2022. **10**: p. 855178.
161. Guo, J., et al., *Pterostilbene Protects the Optic Nerves and Retina in a Murine Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Activation of SIRT1 Signaling*. Neuroscience, 2022. **487**: p. 35-46.
162. Liu, J., et al., *Pterostilbene exerts an anti-inflammatory effect via regulating endoplasmic reticulum stress in endothelial cells*. Cytokine, 2016. **77**: p. 88-97.
163. Li, Y.R., S. Li, and C.C. Lin, *Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity*. Biofactors, 2018. **44**(1): p. 69-82.
164. Shen, H. and H. Rong, *Pterostilbene impact on retinal endothelial cells under high glucose environment*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(10): p. 12589-94.
165. Lee, D., et al., *Therapeutic Effects of Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Nutritional Supplementation in Retinal Ischemic Diseases*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(10).
166. Dvorakova, M. and P. Landa, *Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review*. Pharmacol Res, 2017. **124**: p. 126-145.
167. Lin, Y.J., et al., *Pterostilbene as treatment for severe acute pancreatitis*. Genet Mol Res, 2016. **15**(3).
168. Li, J., et al., *Resveratrol attenuates inflammation in the rat heart subjected to ischemia-reperfusion: Role of the TLR4/NF- κ B signaling pathway*. Mol Med Rep, 2015. **11**(2): p. 1120-6.
169. Wang, Y., W. Luo, and Y. Wang, *PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response*. DNA Repair (Amst), 2019. **81**: p. 102651.
170. Liu, S., W. Luo, and Y. Wang, *Emerging role of PARP-1 and PARthanatos in ischemic stroke*. J Neurochem, 2022. **160**(1): p. 74-87.
171. Zheng, L., et al., *Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(1): p. 361-7.
172. Renner, M., et al., *Optic Nerve Degeneration after Retinal Ischemia/Reperfusion in a Rodent Model*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 254.
173. Kwan, R.Y.C., et al., *Cognitive decline, sensory impairment, and the use of audio-visual aids by long-term care facility residents*. BMC Geriatr, 2022. **22**(1): p. 216.
174. Aubin, G., et al., *Visual and cognitive functioning among older adults with low vision before vision rehabilitation: A pilot study*. Front Psychol, 2023. **14**: p. 1058951.
175. Petrelli, F., et al., *Association of Obesity With Survival Outcomes in Patients With Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis*. JAMA Netw Open, 2021. **4**(3): p. e213520.

176. Gupta, A., et al., *Obesity is Independently Associated With Increased Risk of Hepatocellular Cancer-related Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Am J Clin Oncol, 2018. **41**(9): p. 874-881.
177. Xu, M., et al., *Obesity and Pancreatic Cancer: Overview of Epidemiology and Potential Prevention by Weight Loss*. Pancreas, 2018. **47**(2): p. 158-162.
178. Chang, M.L., *Fatty Pancreas-Centered Metabolic Basis of Pancreatic Adenocarcinoma: From Obesity, Diabetes and Pancreatitis to Oncogenesis*. Biomedicines, 2022. **10**(3).
179. Vilariño-García, T., et al., *Role of Leptin in Obesity, Cardiovascular Disease, and Type 2 Diabetes*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(4).
180. Claycombe, K., L.E. King, and P.J. Fraker, *A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2017-21.
181. Machado-Neto, J.A., et al., *Insulin Substrate Receptor (IRS) proteins in normal and malignant hematopoiesis*. Clinics (Sao Paulo), 2018. **73**(suppl 1): p. e566s.
182. Guilmeau, S., et al., *Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion: evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1664-72.
183. Cano, V., et al., *Regulation of leptin distribution between plasma and cerebrospinal fluid by cholecystokinin receptors*. Br J Pharmacol, 2003. **140**(4): p. 647-52.
184. Miyamoto, S., et al., *Cholecystokinin plays a novel protective role in diabetic kidney through anti-inflammatory actions on macrophage: anti-inflammatory effect of cholecystokinin*. Diabetes, 2012. **61**(4): p. 897-907.
185. Géresi, K., et al., *Myelotoxicity of carboplatin is increased in vivo in db/db mice, the animal model of obesity-associated diabetes mellitus*. Cancer Chemother Pharmacol, 2015. **75**(3): p. 609-18.
186. Géresi, K., et al., *Toxicity of cytotoxic agents to granulocyte-macrophage progenitors is increased in obese Zucker and non-obese but insulin resistant Goto-Kakizaki rats*. Eur J Pharmacol, 2012. **696**(1-3): p. 172-8.
187. Peitl, B., et al., *Involvement of cholecystokinin in baseline and post-prandial whole body insulin sensitivity in rats*. Eur J Pharmacol, 2010. **644**(1-3): p. 251-6.
188. Scarpignato, C., et al., *Effect of a new potent CCK antagonist, lorglumide, on caerulein- and bombesin-induced pancreatic secretion and growth in the rat*. Br J Pharmacol, 1989. **96**(3): p. 661-9.
189. Ueno, M., et al., *A randomized phase II study of gemcitabine plus Z-360, a CCK2 receptor-selective antagonist, in patients with metastatic pancreatic cancer as compared with gemcitabine plus placebo*. Cancer Chemother Pharmacol, 2017. **80**(2): p. 307-315.
190. Smith, J.P., et al., *Cholecystokinin receptor antagonist alters pancreatic cancer microenvironment and increases efficacy of immune checkpoint antibody therapy in mice*. Cancer Immunol Immunother, 2018. **67**(2): p. 195-207.
191. Tucker, R.D., et al., *A Cholecystokinin Receptor Antagonist Halts Nonalcoholic Steatohepatitis and Prevents Hepatocellular Carcinoma*. Dig Dis Sci, 2020. **65**(1): p. 189-203.
192. Gridelli, C., et al., *nab-Paclitaxel/carboplatin in elderly patients with advanced squamous non-small cell lung cancer: a retrospective analysis of a Phase III trial*. Drug Des Devel Ther, 2018. **12**: p. 1445-1451.
193. Egawa-Takata, T., et al., *Adjuvant Chemotherapy for Endometrial Cancer (ACE) trial: A randomized phase II study for advanced endometrial carcinoma*. Cancer Sci, 2022. **113**(5): p. 1693-1701.

194. Ngoi, N.Y., et al., *Weekly versus tri-weekly paclitaxel with carboplatin for first-line treatment in women with epithelial ovarian cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2022. **2**(2): p. Cd012007.
195. Liu, Y., et al., *Nab-paclitaxel plus platinum versus paclitaxel plus platinum as first-line therapy in patients with metastatic or recurrent cervical cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2024. **150**(6): p. 321.
196. Azmy, A.M., et al., *Gemcitabine Plus Carboplatin in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma: Results of a Phase II Study*. ISRN Oncol, 2012. **2012**: p. 420931.
197. Chaigneau, T., et al., *Efficacy and tolerance of LV5FU2-carboplatin chemotherapy in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma after failure of standard regimens*. Ther Adv Med Oncol, 2023. **15**: p. 17588359231163776.
198. Appleman, L.J., et al., *Phase I study of veliparib (ABT-888), a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, with carboplatin and paclitaxel in advanced solid malignancies*. Cancer Chemother Pharmacol, 2019. **84**(6): p. 1289-1301.
199. Zuelli, F.M., E.C. Cárnio, and R.S. Saia, *Cholecystokinin protects rats against sepsis induced by Staphylococcus aureus*. Med Microbiol Immunol, 2014. **203**(3): p. 165-76.
200. Sacerdote, P., et al., *Visualization of cholecystokinin receptors on a subset of human monocytes and in rat spleen*. Peptides, 1991. **12**(1): p. 167-76.
201. Schmitz, F., et al., *Identification of CCK-B/gastrin receptor splice variants in human peripheral blood mononuclear cells*. Regul Pept, 2001. **101**(1-3): p. 25-33.
202. Xu, S.J., et al., *Effect of cholecystokinin octapeptide on diacylglycerol-PKC signaling pathway in rat pulmonary interstitial macrophages stimulated by lipopolysaccharide*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(12): p. 1497-504.
203. Benko, I., et al., *Rosiglitazone-induced protection against myelotoxicity produced by 5-fluorouracil*. Eur J Pharmacol, 2003. **477**(2): p. 179-82.
204. De la Cruz-Color, L., et al., *Evidence That Peripheral Leptin Resistance in Omental Adipose Tissue and Liver Correlates with MASLD in Humans*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(12).
205. Desai, A.J., et al., *Cholecystokinin responsiveness varies across the population dependent on metabolic phenotype*. Am J Clin Nutr, 2017. **106**(2): p. 447-456.
206. Djazayeri, K., et al., *Accelerated recovery of 5-fluorouracil-damaged bone marrow after rosiglitazone treatment*. Eur J Pharmacol, 2005. **522**(1-3): p. 122-9.

10 Tárgyszavak

Magyar tárgyszavak:

pterostilbén, retina iszkémia–reperfúzió, neuroprotekció, oxidatív stressz, gyulladás, apoptózis, elektroretinográfia, kolecisztokinin, kolecisztokinin receptor antagonisták, granulopoézis, CFU-GM, karboplatin-toxicitás

Angol tárgyszavak:

pterostilbene, retinal ischemia–reperfusion, neuroprotection, oxidative stress, inflammation, apoptosis, electroretinography, cholecystokinin, cholecystokinin receptor antagonists, granulopoiesis, CFU-GM, carboplatin toxicity

11 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Szilvássy Zoltán rektor úrnak, hogy az általa vezetett Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében végezhettem PhD-munkámat inspiráló és szakmailag támogató környezetben.

Külön hálával és köszönettel tartozom Prof. Dr. Juhász Béla témavezetőmnek a tudományos munkám során nyújtott szakmai útmutatásáért, valamint azért a bizalomért, amellyel már a kezdetektől támogatott egy számomra új kutatási területen. Az általa képviselt szemlélet és támogatás meghatározó szerepet játszott kutatói fejlődésemben és a disszertáció elkészítésében.

Köszönettel tartozom Dr. Benkő Ilona társtémavezetőmnek a doktori munka során nyújtott értékes szakmai segítségéért és tanácsaiért, amiért elindított kutatói pályámon és mindvégig támogatott.

Köszönöm Prof. Dr. Gesztelyi Rudolfnak és Dr. Hegedűs Csabának a statisztikai elemzések értelmezésében, valamint az ábrák elkészítésében nyújtott segítségüket.

A sejttenyésztési kísérletek kivitelezése során Dr. Megyeri Attila szakmai támogatása nagy segítséget jelentett számomra, Köszönöm.

Dr. Géresi Krisztinának köszönöm az OLETF–LETO modellel kapcsolatos kísérletes módszertani segítségét.

Köszönöm Dr. Varga Angelikának a PCR-vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Varga Balázsnak, Dr. Bombicz Mariannak, Dr. Szilágyi Annának, Dr. Takács Barbarának és Dr. Tarjányi Verának a retina iszkémia–reperfúziós modellhez kapcsolódó vizsgálatokban nyújtott szakmai támogatásukat.

Szeretném megköszönni Dr. Kiss Ritának és Dr. Lelesz Beátának a mindenkori segítőkészségüket és pozitív hozzáállásukat.

Köszönettel tartozom Lévainé Nagy Kingának, Oláh Krisztinának, Demján Krisztinának és Szegváriné Erdős Andreának, valamint a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi munkatársának a mindennapokban tanúsított segítőkészségükért és türelmükért.

Szívből köszönöm Dr. Szekeres Rékának és Szalai Andreának azt a szakmai és baráti támogatást, amellyel kutatómunkámat mindvégig és jelenleg is kísérik.

Végül hálás szívvel köszönöm Családomnak azt a biztos háttérrel, türelmet és szeretetet, amely a mindennapjaimat betölti.

12 Függelék



**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/263/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Pelles-Taskó Beáta

Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Táplálkozástudományi Doktori Program

MTMT azonosító: 10105317

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pelles-Taskó, B.**, Varga, A., Géresi, K., Juhász, B., Szilvássy, Z., Benkő, I.: CCK-1R-selective and non-selective cholecystokinin antagonists, lorglumide, and proglumide increased toxicity of carboplatin to granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM) of bone marrow of rats. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 399 (1), 129-141, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-025-04391-6>
IF: 3.1 (2024)
2. **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: 3.4

További közlemények

3. Károlyi, P. K., Képes, Z., Pelyvás, B., Marosi, M., Juhász, B., Berényi, E., Englohner, A., Kocsi, E., **Pelles-Taskó, B.**, Trouvé-Carpena, A., De Santis, S., Canals, S., Trencsényi, G., Meszár, Z., Papp, T.: Multimodal preclinical study of long-term effects of prenatal ultrasound on the mouse central nervous system. *Sci. Rep. [Epub ahead of print]*, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-026-49034-9>
IF: 3.9 (2024)





4. Leiter, I., Lelesz, B., Hegedűs, C., Németh, J., **Pelles-Taskó, B.**, Ujlaki, G., Bhattoa, H. P., Felszeghy, E. N., Lengyel, S., Páll, D., Balla, G., Szilvássy, Z., Juhász, B., Kiss, R.: Plasma Melanin-Concentrating Hormone in Childhood Obesity and Its Association with Metabolic Parameters: a Clinical Observational Study.
Diabetes Metab. Syndr. Obes. "Accepted by Publisher", 2026.
IF: 3 (2024)
5. Szekeres, R., Priksz, D., Bombicz, M., **Pelles-Taskó, B.**, Szilágyi, A., Bernát, B., Pósa, A., Varga, B., Gesztelyi, R., Somodi, S., Szabó, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Exercise Types: Physical Activity Mitigates Cardiac Aging and Enhances Mitochondrial Function via PKG-STAT3-Opa1 Axis.
Aging Dis. 16 (5), 3040-3054, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2024.0959>
IF: 6.9 (2024)
6. Takács, B., Szilágyi, A., Priksz, D., Bombicz, M., Szabó, A. M., **Pelles-Taskó, B.**, Rusznayk, 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
7. 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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,1

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,5**

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

Debrecen, 2026.05.08.

