

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Szilágyi Anna

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

DEBRECENI EGYETEM

TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Időskorral összefüggő látáskárosodás terápiás intervencióinak vizsgálata funkcionális és molekuláris biológiai módszerekkel

Dr. Szilágyi Anna

Témavezető: Dr. Varga Balázs



DEBRECENI EGYETEM

TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Gyakran használt rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés	4
2. Célkitűzés	5
3. Irodalmi áttekintés	6
3.1. Statisztikai adatok	6
3.2. A szem felépítése	8
3.3. Az ideghártya szerkezete.....	10
3.4. A látás élettana	12
3.5. Az elektroretinográfia.....	13
3.6. Az öregedés- és az iszkémia-reperfúzió-okozta szemkárosodások.....	15
3.6.1. Az öregedés és az I/R károsodás molekuláris háttere	16
3.6.2. Az öregedés és az I/R károsodás következménye a szemben	22
3.7. Az ayahuasca komponenseinek hatása.....	22
3.7.1. N'N-dimetiltriptamin	23
3.7.2. Harmalin.....	24
3.8. A testmozgás élettani hatásai	25
3.9. A WHO ajánlása felnőtt és idős korban végzett testmozgásra vonatkozóan	27
4. Anyagok és módszerek.....	29
4.1. Kísérleti állatok	29
4.2. Kísérleti protokollok és csoportok	29
4.2.1. A DMT és harmalin anti-iszkémiás hatásának vizsgálata Sprague Dawley patkányokon	29
4.2.1.1. Iszkémia modell	31
4.2.1.2. A szem ultrahang vizsgálata.....	31
4.2.1.3. Az ozmotikus minipumpa beültetése.....	32
4.2.2. A rendszeres testmozgás dózis-függő hatásának vizsgálata aging patkánymodellén	32
4.3. Western blot	33
4.4. Szövettan	35
4.5. Statisztika	36
5. Eredmények	37
5.1. A DMT és harmalin hatásának vizsgálata a szem iszkémia-reperfúziós károsodásában	37

5.1.1. A szem ultrahang vizsgálata.....	37
5.1.2. Elektoretinográfia	38
5.1.3. Western Blot.....	40
5.1.4. Szövettan	43
5.2. A rendszeres testmozgás dózis-függő hatásának vizsgálata öregedő patkánymodellen	45
5.2.1. Elektoretinográfias eredmények	45
5.2.2. A második kísérlet western blot eredményei	50
5.2.3. Szövettan	53
6. Megbeszélés.....	54
7. Összegzés - Summary.....	66
8. Az értekezés új megállapításai	67
9. Irodalom.....	68
9.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom	68
9.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló és további megjelent közlemények.....	79
10. Tárgyszavak.....	82
11. Köszönetnyilvánítás	83
12. Függelék	84

Gyakran használt rövidítések jegyzéke

5-HT – 5-hidroxi-triptamin = szerotonin

AMD - Age-related Macular Disease – időskori makuladegeneráció

BDNF - Brain-Derived Neurotrophic Factor (agyi eredetű növekedési faktor)

BK – beteg (iszkémiás, vivőanyaggal kezelt) kontroll

DHK – DMT + harmalin kezelt csoport

DMT - N'N-dimetiltriptamin

EK – egészséges (nem iszkémiás, vivőanyaggal kezelt) kontroll

ERG – elektroretinográfia

FK – fiatal kontroll csoport

GFAP – glial fibrillary acidic protein = gliafibrilláris savas fehérje

HK – harmalin kezelt csoport

Hsp70 – 70kDa Heat Shock Protein = 70 kDa molekulatömegű hő sokkfehérje

IEF – idős, erőltetett futó csoport

IIK – idős, inaktív kontroll csoport

IRF – idős, rekreációs futó csoport

I/R – iszkémia-reperfúzió

KIR – központi idegrendszer

NF κ B - nukleáris faktor-kappa B

MAO – monoamin-oxidáz

MMP – mátrix metalloproteináz

PARP - poli-ADP-ribóz polimeráz

ROS – reactive oxygen species = reaktív oxigén gyök

SIG1R – Sigma-1 receptor

SIRT6 – szirtuin 6 fehérje

SOD – szuperoxid dizmutáz

1. Bevezetés

„Az öregedés az idő múlásával megállíthatatlanul felhalmozódó változások összessége, amelyek összefüggnek vagy felelősek a folyamatosan növekvő betegségekkel vagy halállal szembeni fogékonyságért és ezen változások kéz a kézben járnak az előrehaladott életkorral.,,

Dr. Denham Harman 1981.

A várható élettartam drámaian megnőtt az elmúlt évtizedekben. A legújabb becslések szerint 2050-re a 60 év felettek száma világszerte csaknem megháromszorozódhat (1). A hosszabb élettartam azonban gyakran együtt jár az életminőséget korlátozó kórállapotok és kísérőbetegségek terhével (2). A kor előrehaladtával párhuzamosan nő a szem degeneratív betegségeinek kockázata, a 80 év felettek körében a látásromlás prevalenciája meghaladja a 20%-ot (3, 4).

A látószervünk kiemelt fontosságát mutatja a tény, hogy az emberi agy által feldolgozott információk 90%-a vizuális forrásokból származik (5). A retina egy érzékeny idegszövet, amely a környezetünkből származó fényt detektálja, majd vizuális jeleket állít elő, amelyeket az agy nyakszirti lebenyébe továbbít. Életünk során állandó fényexpozíciónak vagyunk kitéve, ami oxidatív stressz provokáló hatása miatt hosszú távon kumulatív retinakárosodást eredményezhet (6, 7). Az öregedéshez társuló szembetegségek jelentős hányada ellen a klinikai gyakorlatban még nem áll rendelkezésre hatékony kezelés, ezért kiemelt fontosságú olyan terápiás módszer feltárása, ami alkalmas lehet a retina funkciójának megőrzésére és az időskori látásvesztés megelőzésére (8).

Az ayahuasca egy tradicionális főzet, amelyet évszázadok óta alkalmaznak elsősorban Dél-Amerikában vallási szertartásokon hallucinogén hatása miatt. Ez a pszichoaktív tulajdonság több növény együttes hatásának köszönhető. A tradicionális ayahuasca ital β -karbolinokban gazdag gyógynövényekből (pl. *Banisteriopsis caapi*, *Peganum harmala*) áll, amelyeket hagyományosan N,N-dimetiltriptamin (DMT) tartalmú növényvel (pl. *Psychotria viridis*, *Diplopterys cabrerana*) kombinálnak, így érve el a legintenzívebb és leghosszabb pszichoaktív hatást (9, 10).

Az elmúlt évtizedekben a DMT ígéretes jelöltté vált számos betegség kezelésében. Sigma-1 (Sig-1R) receptor agonista aktivitása révén, felmerült neuroprotektív hatása is (11). A Sig-1R

"pluripotens modulátorként" funkcionál, amely szabályozza a sejtek túlélését és differenciálódását, valamint az endoplazmatikus retikulumot ért stressz esetén a sejtmagban citoprotektív és antioxidáns fehérjék szintézisét indítja el. Ennek megfelelően a Sig-1R aktiválása csökkenti a hipoxia és az oxidatív stressz okozta károsodást (11, 12). Ezen hatások miatt feltételeztük és vizsgáltuk retinoprotektív hatását.

A β -karbolinokhoz tartozó harmalin a monoamino-oxidáz enzim A-típusának (MAO-A) reverzibilis gátlószere ezért képes a triptaminok (pl. a DMT) hatását potenciózni a lebomlásuk gátlása által (11). A harmalin az elmúlt évtizedben nagy figyelmet kapott, alkalmazása felmerült daganatos, gyulladásos és neurodegeneratív kórképekben, valamint a kognitív hanyatlás kezelésében (13-15). A legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy a MAO enzimek fontos szerepet játszanak az oxidatív stressz kiváltásában, mivel a neurotranszmitterek lebontása közben hidrogén-peroxid és reaktív oxigéngyökök keletkeznek. Ennek köszönhetően az enzim gátlása antioxidáns hatást közvetíthet (16, 17).

Az oxidatív stressz elleni védekezés fokozásában, vagyis az antioxidáns rendszer aktiválásában nagy szerepe van a rendszeres fizikai aktivitásnak. A testmozgás okozta stressz (pl. hipoxia, hő, szabad gyökök stb.) olyan protektív és reparatív funkciókat aktivál a szervezetben, melyek számos endogén mediátor felszabadításával és a génexpresszió megváltoztatásával gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatásokat közvetítenek, valamint javítják az energiahomeosztázist (18). Számos tanulmány feltételezi, hogy a testmozgás dóziszfüggő hatása, ami arra utal, hogy a testmozgás intenzitásának növekedésével a sport jótékony hatásai is fokozódnak (19-21). Újabb kutatások azonban rámutattak az életkor fontosságára is, melyek szerint idős korban a magas intenzitású testmozgás nem jár érzékelhető előnyökkel az alacsony intenzitású testmozgással szemben, sőt negatív hatásai is lehetnek (22-24). Az ilyen intenzív terhelés nagy mértékű szabadgyöktermeléshez, és oxidatív stresszhez vezethet, ezáltal károsíthatja a makromolekulákat és a biológiai folyamatokat a szervezetben. Ennek következtében azt feltételezhetjük, hogy az erőltetett fizikai aktivitás felgyorsíthatja az egészséges öregedés folyamatát (2, 25).

2. Célkitűzés

Vizsgálataink fő céljaul tűztük ki, hogy potenciális terápiás intervenciók hatékonyságát teszteljük idősokkal összefüggő szemészeti betegségek kivédésében. Továbbá célunk volt ezen preventív módszerek funkcionális és molekuláris hatásainak pontos feltárása. Első kísérletünkben az ayahuasca két fő összetevőjének, a DMT-nek és a harmalinnak biológiai

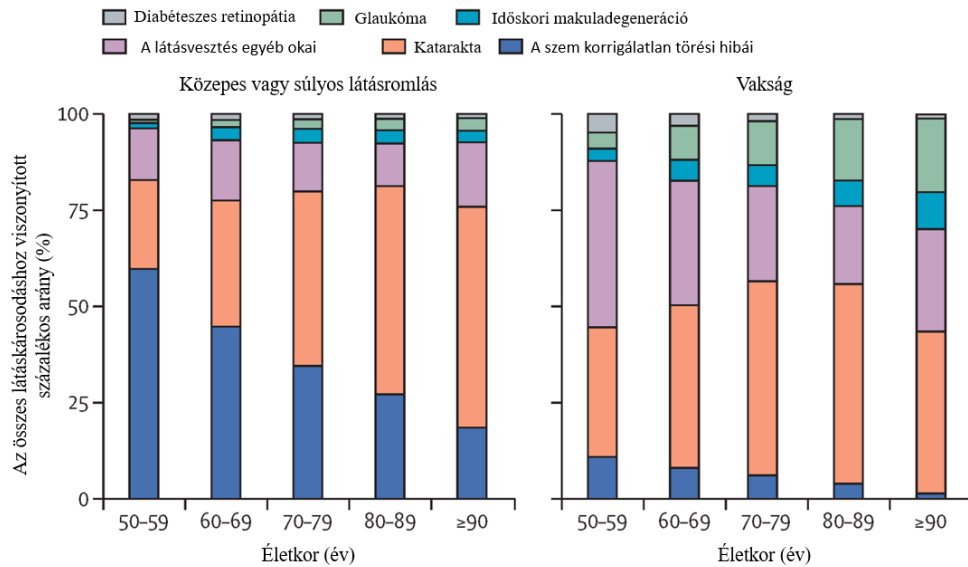
hatásait vizsgáltuk a szem iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodásában, amely számos időskorban jelentkező szembetegség etiológiájában fontos jelenség. A második kísérletünk fő célkitűzése annak megállapítása volt, hogy a nagy intenzitású testmozgás vagy a szabadidős, rekreációs tevékenység előnyösebb idős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

3. Irodalmi áttekintés

Az öregedés a krónikus betegségek legnagyobb rizikófaktora (26). A várható élettartam növekedése magával vonja a krónikus (nem-fertőző) betegségek - úgy mint cukorbetegség, szív-érrendszeri és légzőszervi betegségek, daganatos megbetegedések - emelkedett prevalenciáját és párhuzamosan a szemet érintő degeneratív betegségek kockázatát (3, 27, 28).

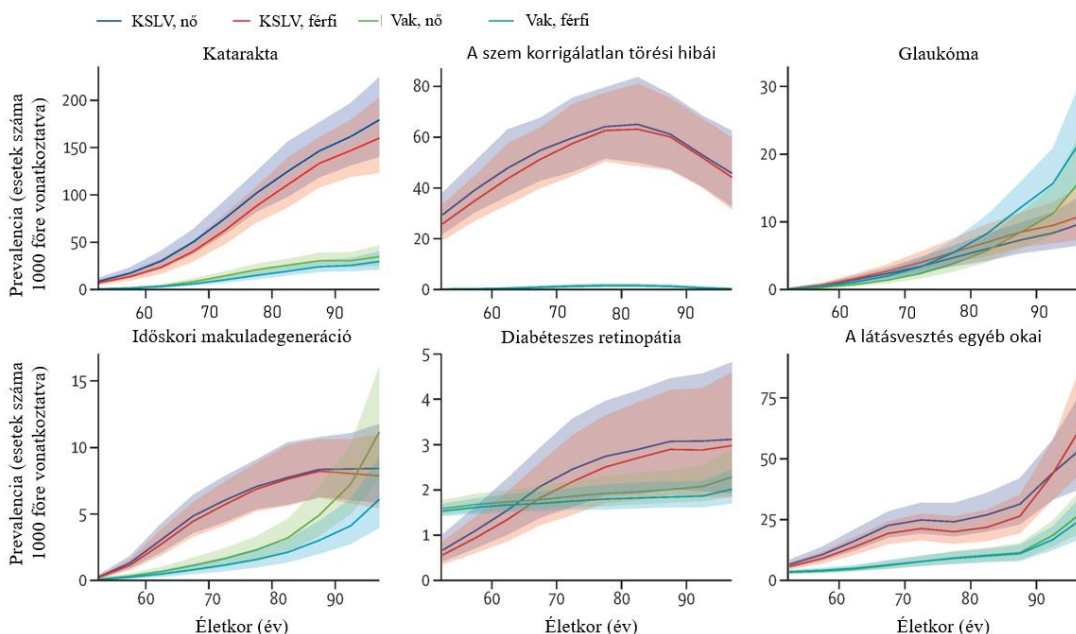
3.1. Statisztikai adatok

Egy 2020-as statisztika alapján a látásromlás megközelítőleg 1,1 milliárd embert érint világszerte, amely becslések szerint 2050-re elérheti az 1,8 milliárd főt (29). A retina vagyis az ideghártya öregedése elkerülhetetlenül annak funkcionális hanyatláshoz, tehát látásromláshoz vezet. Az idősödő népesség látásvesztése a kognitív hanyatlás, a társadalmi elszigetelődés és egyéb szervrendszereket érintő megbetegedések fokozott kockázatával jár együtt, ami jelentősen rontja az életminőséget és növeli az egészségügyi szolgáltatókra nehezedő terheket (3). Az 50 éves és annál idősebb populációban a glaukóma, a diabéteszes retinopátia valamint az időskori makuladegeneráció (a szürkehályog és a szem törési hibái mellett) vezető okként szerepel a közepesen súlyos, súlyos és a teljes látásvesztés etiológiájában, és megközelítőleg 19 millió ember életét korlátozza világszerte (2020-as adatok alapján) (lásd **1. ábra**).



1. ábra: Egyes szemészeti kórképek szerepe a látásromlás etiológiájában az 50 éves és annál idősebb populációban globális adatok alapján (29).

Ezen kórképek előfordulása növekszik az életkorral (lásd **2. ábra**), kezelésük a mai napig nagy kihívást jelent az egészségügyben (29).



2. ábra: A szemészeti kórképek prevalenciája világszerte 50 éves életkorban ésafelett 1000 főre vonatkoztatva (KSLV = közepesen súlyos vagy súlyos látásvesztés), 2020-as adatok alapján. A folytonos vonalak jelzik a nemekre vonatkoztatott adatokat, míg a színezett területek a 95%-os bizonytalansági intervallumokat (29).

3.2. A szem felépítése

A szemet mint funkcionális egységet a szemgolyó, a látóideg, a szemmozgató izmok, a szemhéj, a kötőhártya és a könnymirigyek alkotják, melyek az arckoponya csontos bemélyedésében, a szemgödörben helyezkednek el. Az csontos konkáv üreg anatómiai szempontból komplex képződmény, rágcsálók esetében 8 csont alkotja: os maxillis, os lacrimale, os zygomaticum, os frontale, os temporale, os sphenoidale, os ethmoidale és os palatinum (30). A rágcsálók szemének és látópályájának felépítését a **3.** és **4. ábra** szemlélteti.

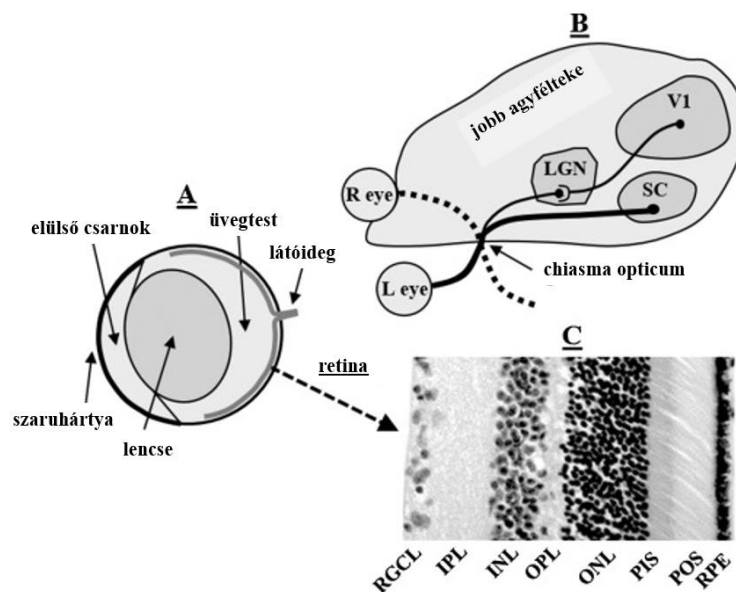
A látás a szem azon képessége, hogy a látható fényt fókuszálja az ideghártyán és lehetővé tegye ezáltal egy kép leképezését az agyban. Ezt a szem hátsó szegmensében található retinális fotoreceptorok teszik lehetővé. Mielőtt azonban a látható fény hullámhossza elérné a retinát, át kell haladnia a szem elülső részein: a szaruhártyán, a szemlencsén és a transzparens üvegtesten. Miután a fény eléri a retinát, penetrálnia kell annak teljes vastagságát, hogy elérje a fotoreceptorok rétegét, mivel azok az üvegtesthez képest a neuronális retina legtávolabbi rétegében helyezkednek el. Anatómiai szempontból a fotoreceptorok rétege és azok szinaptikus rendszere alkotja a "külső retinát", míg az interneuronok (bipoláris, horizontális és amakrin sejtek), a ganglionsejtek valamint azok szinaptikus hálózata hozza létre a "belső retina" rétegét (31). A fotoreceptorok metabolikus aktivitása rendkívül magas, egyes becslések szerint 3-4-szer meghaladja a központi idegrendszeri neuronokét, ezért fundamentális a megfelelő vérrellátás biztosítása. Rágcsálók esetén, az emberi szemhez hasonlóan a retina kettős vérrellátással rendelkezik. Az a. centralis retinae – az a. ophthalmica ága - és annak ágai látják el a neuroszenzoros retina belső kétharmadát. A külső egyharmadot a choriocapillaris rendszer (a. ciliaris ágai) látja el (lásd **5.ábra**). Rágcsálókban általában négy-hat retinális arteriola van, de ez a szám igen nagy variabilitást mutat. A fotoreceptorok közvetlen tápanyagellátását a retinális pigmenthám alatti choroidális érrendszer biztosítja, amely már az érhártya (uvea, tunica vasculosa) része.

Az érhártya 3 részből áll, a choroidea rétegeből, a sugártestből és az íriszből. Az írisz egy gyűrű formájú képződmény, melynek középső részén található a pupilla, és külön választja az elülső és hátsó csarnokot. A sugártest a hátsó csarnokban található és izomrostokból valamint két réteg epitéliumból áll, egy külső pigmentált és egy belső nem-pigmentált epitéliumból, amely a retinális pigment epitéliumban és a retinában folytatódik. Az emberi szem esetében a sugártestben található izomrostok a szemlencséhez kapcsolódnak és szabályozzák annak feszességét, ezáltal a közeli tárgyakra történő fókuszálást teszik lehetővé, mely folyamatot akkomodációnak nevezünk. A rágcsálók sugárizom hiányában képtelenek az akkomodációra. A patkányok szemében a szemlencse a szem 75%-át foglalja el, mely

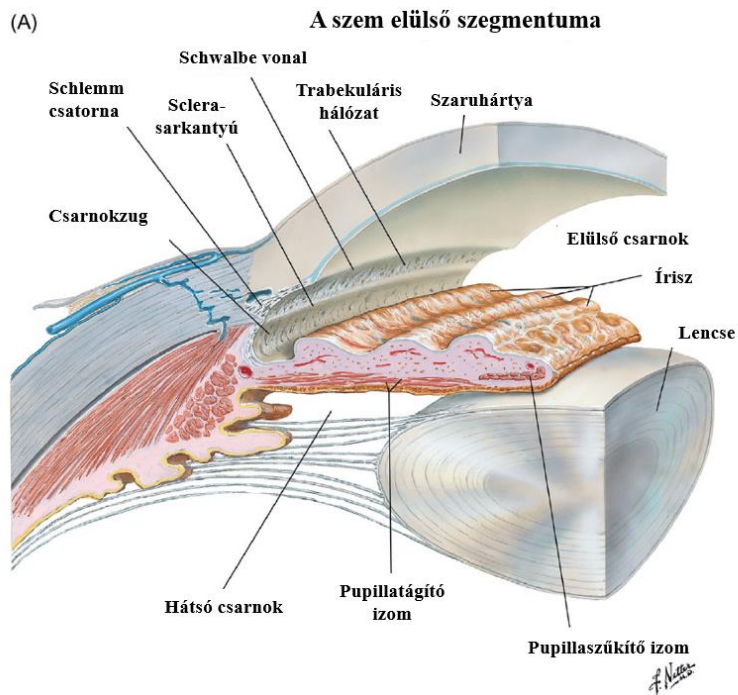
jelentősen eltér a humán szemben látható arányoktól (lásd **3. ábra**). A sugártest nem-pigmentált epitélium rétege felelős a csarnokvíz termelődéséért.

A csarnokvíz termelődésének és elvezetésének szabályozása felelős a szem intraokuláris nyomásának fenntartásáért és szabályozásáért. A csarnokvíz a hátsó csarnokból az elülső irányába áramlik, ahol a cornea és írisz határán lévő elvezetőrendszer (trabekuláris hálózat, Schlemm csatorna, uveosclera útvonal) segítségével távozik.

A szemet kívülről egy rostos burok veszi körbe, amelyet a szem elülső részén szaruhártyának, corneának nevezünk, míg a bulbus többi részét körülölelő szakaszát sclerának nevezzük. A sclera rétegében tapadnak a szemmozgató izmok, melyekből a rágcsálók esetén 7 található (4 egyenes, 2 ferde, 1 szemhéjmelő). Az emberi látószervtől eltérően, a szemmozgató izmok környezetében a bulbus mögött található a Harder-mirigy, amely az ún. „harmadik szemhéj” kiindulási pontjaként szolgál. Lipid és porfirin gazdag szekréciójával lubrikálja a szemet és a szemhéjat. A szem járulékos szervei közé tartoznak még a szemhéjak, a kötőhártya valamint a könnymirigyek, melyek a szem mechanikai és kiszáradás elleni védelmét biztosítják. Anatómiájuk az emberi szemhez hasonló (30).



3. ábra: A rágcsálók szemének, látópályájának felépítése és a retina rétegei. Az angol rövidítések jelentése: RPE = retinális pigment epitélium; POS/PIS = photoreceptor outer/inner segment/fotoreceptorok külső/belső szegmentuma; ONL/INL = outer/inner nuclear layer, külső/belső magvas réteg; OPL/IPL = outer/inner plexiform layer, külső/belső szinaptikus réteg; RGCL = retinal ganglion cell layer, ganglion sejtek sejtmagjainak rétege (31).



4. ábra: A szemgolyó elülső szegmentuma (30).

3.3. Az ideghártya szerkezete

A szem belső rétege a retina, egy összetett, több sejtrétegből álló szövet, amely a fény elnyeléséért és a keletkező szignál agyba történő továbbításáért felelős, és magában foglalja a neuroszenzoros retinát (neuronális rétegek) és a retinális pigment epitéliumot is (30). A retina szerkezetét és a rétegek vérellátását az **5. ábra** szemlélteti.

A neuroszenzoros retinában ötféle neuron található: fotoreceptorok, bipoláris sejtek, ganglionsejtek, horizontális sejtek és amakrin sejtek. Ezen sejtek rétegekbe rendeződnek, kialakítva így a retina 10 réteget. A szem belsejétől kifelé haladva a következő rétegek különíthetők el: belső határhártya (membrana limitans interna), látórostok rétege (stratum neurofibrarum), ganglionsejtek rétege (str. ganglionare), belső szinaptikus réteg (str. plexiforme interna), belső magvas réteg (str. granulosum interna), külső szinaptikus réteg (str. plexiforme externa), külső magvas réteg (str. granulosum externa), külső határhártya (membrana limitans externa) és fotoreceptorok rétege. A neuroszenzoros retinán kívül található a retinális pigment epitélium (str. pigmentosum retinae), amelyet a Bruch-membrán választ el a choroid rétegtől.

A belső és külső határmembránt a belső magvas rétegben elhelyezkedő Müller-sejtek nyúlványai alkotják. A látórostok rétege a ganglionsejtek nem-mielinizált axonjainak gyűjteménye. Rágcsálókban ez a réteg a látóideg felé megvastagszik. Ezen idegrostok az ínhártya egy speciális területén, a lamina cribrosa-n át lépnek ki a szemgolyóból és extraokulárisan már mielinhüvellyel rendelkeznek. A látóideg kilépési helyét a retinán

vakfoltnak nevezzük. Az emberi szemben a sárgafolt (macula) részét képező fovea centralis az éleslátás helye, amely egy avaszkuláris terület, ahol a fotoreceptorok, ezen belül is a csapok nagy sűrűségben, szorosan egymás mellett helyezkednek el. Rágcsálókban nem létezik éleslátásra specializált terület, más néven sárgafolt (macula) a szemfenéken (32).

A rágcsálókban a ganglionsejtek a str. ganglionare területén egy rétegben helyezkednek el és a legnagyobb sűrűségben a látóideg temporális részén található, a dorzális és perifériás retina felé csökkenő sűrűséggel (30). A retina asztrocitái a látórostok és a ganglionsejtek rétegében helyezkednek el (33). A belső szinaptikus réteg a bipoláris sejtek, ganglionsejtek és amakrin sejtek közötti szinapszisokból áll. Itt helyezkednek el leggyakrabban az immunrendszer részét képező mikroglia sejtek is (34). A belső magvas réteg a bipoláris, Müller-sejtek, horizontális és amakrin sejtek sejttestjeit tartalmazza, és általában 6-9 réteg vastagságú. A retina rétegeit a belső magvas réteg belső harmadáig a retina artériái táplálják, míg a külső retina rétegeket a belső magvas réteg külső kétharmadától kezdődően a chorioideális erek látják el.

A külső szinaptikus réteget a horizontális és a bipoláris sejtek közötti szinaptikus kapcsolatok hozzák létre. A külső magvas réteg a fotoreceptorok (csapok és pálcikák) sejttestjeit tartalmazza. A pálcikák emberben és rágcsálókban egyaránt a fotoreceptorok kb. 95%-át teszik ki, és ezen sejtek határozzák meg a külső magvas réteg vastagságát. Rágcsálókban ez a réteg megközelítőleg 10-12 sejt vastagságú. A csapok sejttestei egyetlen rétegben helyezkednek el a külső határmembrán mellett (30).

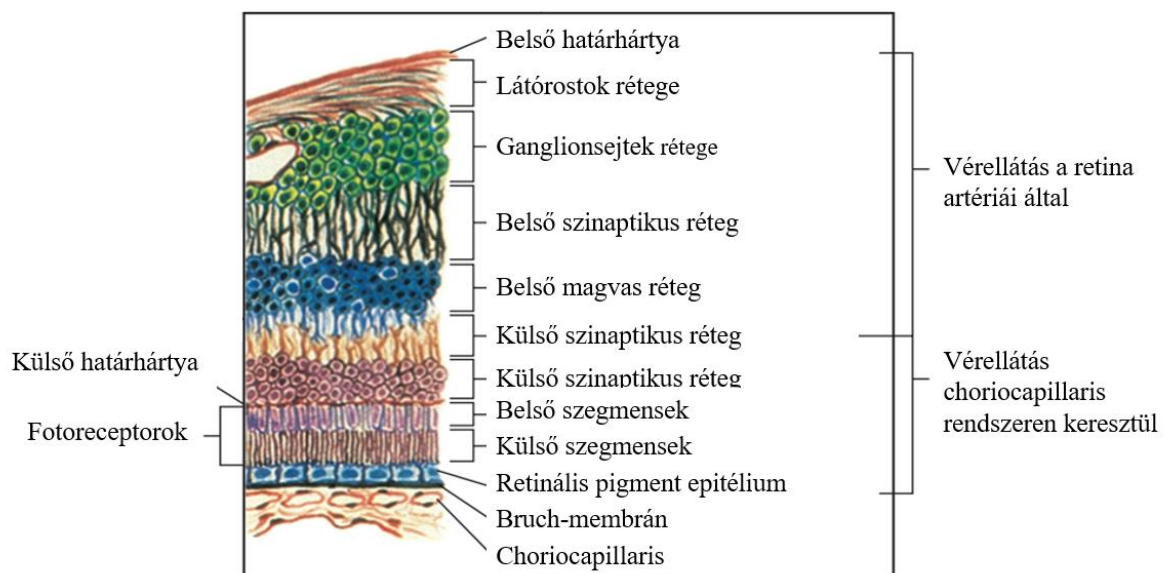
A fotoreceptorok közül a pálcikák érzékenyebbek, melyek az éjszakai (szkotopikus) látásért felelősek, míg a csapok csak erősebb megvilágítás mellett (fotopikus körülmények) aktiválódnak és a nappali, színes látásért felelősek (35).

A külső határmembrán nem valódi bazális membrán, hanem a Müller-sejtek és a fotoreceptorsejtek apikális nyúlványai közötti szoros kapcsolódás alakítja ki. Anatómiai tájékozódási pontként szolgál, amely elválasztja a fotoreceptorok sejttestjeit a fény felfogására szolgáló belső és külső szegmensektől. Ezek a szegmensek a fototranszdukciós szerkezetet tartalmazó membránkorongok halmazaiból állnak. A külső szegmensek új lemezei folyamatosan képződnek a csillónál ugyanolyan ütemben, ahogy a régi lemezek a külső szegmens csúcsáról leválnak, és az RPE rétegében megtörténik a fagocitózisuk (30).

Érdekes módon a látható fénynek a retina teljes vastagságán át kell haladnia, hogy elérje a fotoreceptorok fényérzékelő részeit. A fotoreceptorokban keletkező akciós potenciál először a bipoláris sejtekre kerül át, majd ezt követi a ganglionsejtek aktivációja, ahonnan az ingerület a

ganglionsejtek axonjainak összetömörüléseként létrejövő nervus opticus által távozik a szemszerlegből (36).

Az RPE pigmentált epitelsejtek egyetlen rétegéből áll, amelyek a neuroszenzoros retinán kívül helyezkednek el, és az alatta lévő choroideához kapcsolódnak. A vakfolttól az ora serrata-ig terjed, ahol a ciliáris test pigmentált epitheliumával egyesül. Az RPE-sejtek apikális oldala a fotoreceptorok külső szegmentumához simul, míg az RPE alaphártyája a Bruch-membrán belső lamelláját alkotja. Az RPE-sejtek közötti szoros kapcsolódás (zonulae occludentes) hozza létre a külső vér-retina gátat. Az RPE-nek számos funkciója van: fagocitálja a fotoreceptorok külső szegmenseinek elhasználódott részeit, regenerálja a fotoaktív 11-cis retinalt, kialakítja a külső vér-retina gátat, elnyeli a fényt, ionokat és tápanyagokat szállít, és fenntartja a retina megfelelő adhézióját a szubretinális folyadék aktív eltávolításával (30).



5. ábra: Az ideghártya rétegei

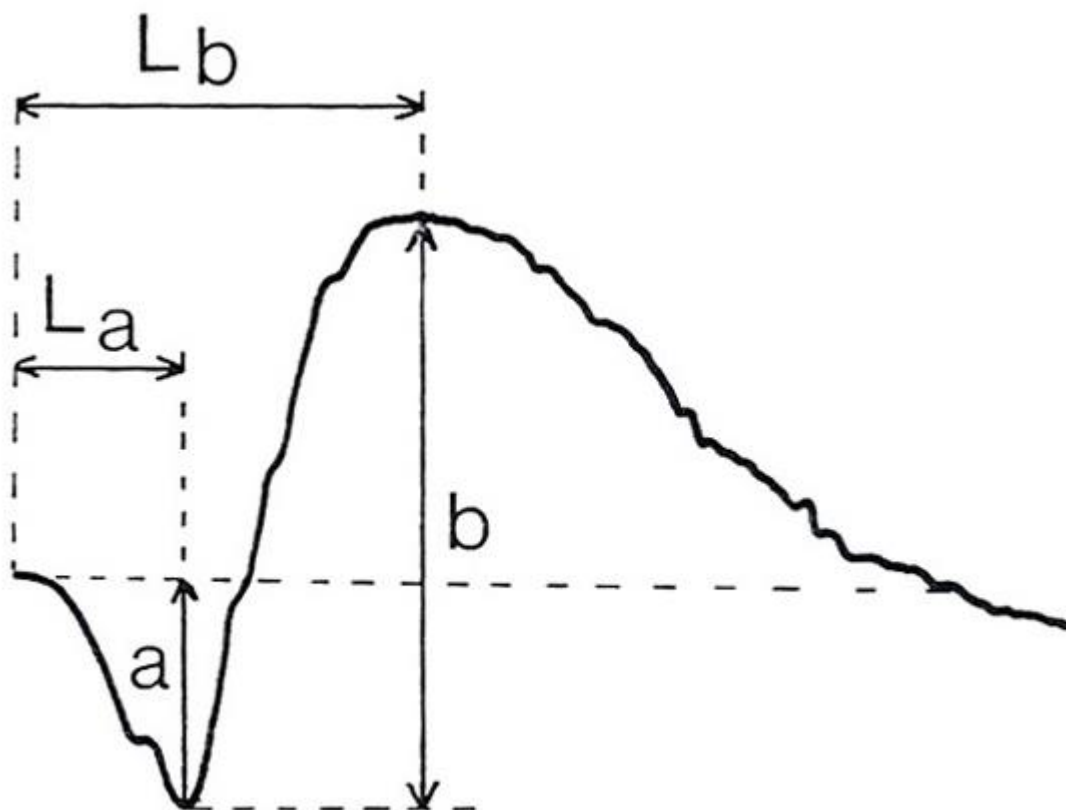
3.4. A látás élettana

A látás, vagyis a fényérzékelés fő területe a retina, amely a látható fényt detektálja, majd elektromos jeleket állít elő, melyeket az agy nyakszirti lebenyébe továbbít a látópályán keresztül (6, 7). A fény érzékelésének és az elektromos szignálok generálásának alapja a fotoreceptorok belsejében zajló biokémiai folyamat, melynek főszereplője egy A-vitamin származék, a retinaldehid, vagy más néven retinal (37). Ez a kromofór molekula a szervezetben 11-cis konfigurációban található, amely egy proton befogadására képes és a folyamat során konformációt vált, majd all-transz izomerré alakul. Ez a szerkezeti változás indítja el a másik kulcsmolekula, az opszin aktivációját. A retinaldehid és az opszin együttesen alkotják az

úgynevezett fotopigmentet, vagy rodopszint. A látószervben többféle opszin fehérje fordul elő, melyek bár csak néhány aminosavban különböznek egymástól, a retinallal komplexben a fény eltérő hullámhosszának detektálására alkalmas fotopigmenteket alkotnak (38). Az emberi szem trikromatikus, ami azt jelenti, hogy három típusú, a rövid, közepes vagy hosszú hullámhosszú fény érzékelésére specializálódott csapot tartalmaz az ideghártyában. Ezzel szemben a rágcsálók szemében található csapok csak a rövid vagy a közepes hullámhosszú fény feldolgozására alkalmas pigmenteket tartalmaznak (dikromatikus látás) (30). Az opszin egy G-fehérjéhez kötött receptor, melyhez rendhagyó módon a ligand, a retinal folyamatosan kötve van. A receptorhoz kötött G-fehérjét transzducinnak nevezzük, melyet az opszin konformációváltozása (az ún. „photobleaching”) aktivál (39). A G-fehérje (transzducin) a foszfodiészteráz 6 (PDE6) enzimet aktiválja, amely bontja a cGMP-t. A cGMP-szint csökkenése a cGMP-függő Na-csatornák záródását eredményezi, tehát a fény hatására a fotoreceptorok membránja hiperpolarizálódik. Fény hiányában a magas cGMP szint következtében a Na-csatornák nyitott állapotban vannak, ezért a fotoreceptorokba szabadon áramlik be a Na^+ . Ezt a jelenséget „sötét áram”-nak is nevezik. A Na^+ beáramlás a fotoreceptorok depolarizációját okozza, amely jelentős glutamát felszabadulást eredményez. A glutamát eltérő hatást fejt ki az egyes retinális sejteken. Az ún. OFF-bipoláris sejteken excitátoros hatása van, tehát aktiválja azokat, míg az ON-bipoláris neuronokat gátolja. Fény jelenlétében a Na-csatornák záródása miatt bekövetkező hiperpolarizáció a glutamát-felszabadulás csökkenését eredményezi. A csökkenő glutamát szint eredményeként az előzővel ellentétes folyamat indul el. Az OFF-bipoláris neuronok hiperpolarizációja következik be, míg az ON-bipoláris sejtek depolarizálódnak, tehát aktiválódnak. A szakirodalom ez a jelenséget „fény-áram”-nak nevezi (40).

3.5. Az elektroretinográfia

Az elektroretinográfia (ERG) a retina rövid fényfelvillanásra adott elektromos tevékenységének a leképezése. Az elektroretinogram rögzítéséhez legalább egy aktív elektródára (amely a szem felszínére simuló kontaktlencse) és egy referenciaelektródára (a külső szemzug közelében) van szükség (41). Az ERG mérés során detektált kitérések, vagyis hullámok, különböző komponensekre oszthatók, melyeknek elemzése betekintést nyújthat az egyes retinális neuronok állapotába és működésébe (42).



6. ábra: Az elektroretinogram: Az a-hullám nagyságát a bázisvonaltól a hullám mélypontjáig mérik. A b-hullám nagyságát az a-hullám mélypontjától a b-hullám csúcsáig mérik. Mindkét hullám (L_a és L_b) implicit idejét az inger kezdetétől a hullámok mélypontjáig vagy csúcsáig eltelt időben határozzák meg (40).

Az negatív a-hullám a fotoreceptorok állapotáról és működéséről, míg a sokkal nagyobb amplitúdójú pozitív b-hullám a retina mélyebb rétegeinek sejtjeiről, úgymint bipoláris, amakrin, horizontális, Müller-és ganglionsejtekről ad információt (43-45). A hullámok morfológiája a **6. ábrán** látható.

A szem stimulációjától és adaptációs állapotától függően lehetséges a pálcikák és csapok funkciójának szeparált vizsgálata. Ez alapján beszélhetünk sötétadaptált (szkotopikus) és fényadaptált (fotopikus) mérésről. Szkotopikus mérés során alacsony megvilágítás esetén a pálcikák, nagyobb fényssűrűség esetén pedig a csapok és pálcikák együttes működéséről kapunk információt. A fotopikus körülmények között rögzített elektroretinogram pedig leginkább a csapok állapotáról ad felvilágosítást. A közepesen erős fényfelvillanására megjelenő első hullám negatív irányú feszültségváltozást jelez, melyet a-hullámnak nevezünk. Ennek háttérben – a fotoreceptorokra nyugalmi állapotban jellemző – „sötét áram” lecsökkenése áll.

A következő hullámkomponens – a b-hullám – egy jelentős pozitív irányú feszültségváltozás. Ennek alapja elsősorban a „fény áram”-ra aktiválódó ON-bipoláris sejtek depolarizációja. Mind az a-hullám, mind a b-hullám amplitúdója növekszik az ingererősséggel, ami jól modellezi a retina ingerelhetőségét és utal a sejtek állapotára. Az a- és b-hullámok a retina működésének értékelésére használt elsődleges ERG-komponensek (40, 42).

A hullámamplitúdók csökkenése és az implicit idő megnyúlása a szem degeneratív állapotának indikátora lehet (46, 47). Az a-és b-hullámok amplitúdója jelentősen csökken a szem iszkémiás károsodásában, diabéteszes retinopátiában és időskori makuladegenerációban. Az amplitúdók változásának monitorozása alkalmas a terápia hatékonyságának megítélésére is (48-50).

Az ERG mérések során hasznos információt szolgáltat az ideghártya sejtjeinek válaszkészségéről az implicit idő, melyet mind az a-és b-hullámok esetén meg lehet határozni. Az a-hullám esetén az implicit időn a bázisonaltól az a-hullám csúcsáig (legnegatívabb pont) eltelt időt értjük, míg b-hullám esetén az a-hullám legmélyebb pontjától a b-hullám legmagasabb pontjáig eltelt időt mérjük (**6. ábra**). Az implicit idő megnyúlása számos szembetegség esetén megjelenik, úgymint diabéteszes retinopátia, időskori makuladegeneráció valamint az időskorral összefüggő látásromlás esetén is (40, 49, 51, 52).

3.6. Az öregedés- és az iszkémia-reperfúzió-okozta szemkárosodások

A látás minőségének romlása a természetes (nem patológiás) öregedés része. Idős életkorban (>70 év) a látásélesség és a térbeli kontraszt-szenzitivitás csökken különösen alacsony fényintenzitás mellett. Ennek háttere komplex. Egyrészt csökkenhet öregedés során a pupilla fényre adott reakciója, valamint a szem „fényáteresztő képessége” is romlik a lencse és az üvegtest degeneratív folyamatai miatt. Ezzel együtt az ideghártya károsodása is hozzájárul a látásromláshoz (53). Az öregedés és a károsító környezeti hatások kivédésére a látószerv számos mechanizmust fejlesztett ki, habár a szervezet stresszel, oxidatív károsodással és betegségekkel szembeni ellenálló képessége az öregedéssel fokozatosan csökken. Az öregedés továbbá a génexpresszió és a metabolikus szabályozás megváltozásával, a gyulladás magasabb szintjével és a reaktív oxigén- és nitrozatív gyökök (ROS, RNS) fokozott képződésével jár együtt (54, 55).

Az öregedés során szignifikánsan emelkedik a szisztémás krónikus betegségek előfordulása, melyek kihatnak a látószerv állapotára is, így nő a szemet érintő degeneratív elváltozásoknak, úgymint időskori makuladegenerációnak (AMD), a diabéteszes és hipertenzív retinopátiának és glaukómának az előfordulása (3, 56). A fokozott gyulladáshoz vezető válasz és a jelentős oxidatív

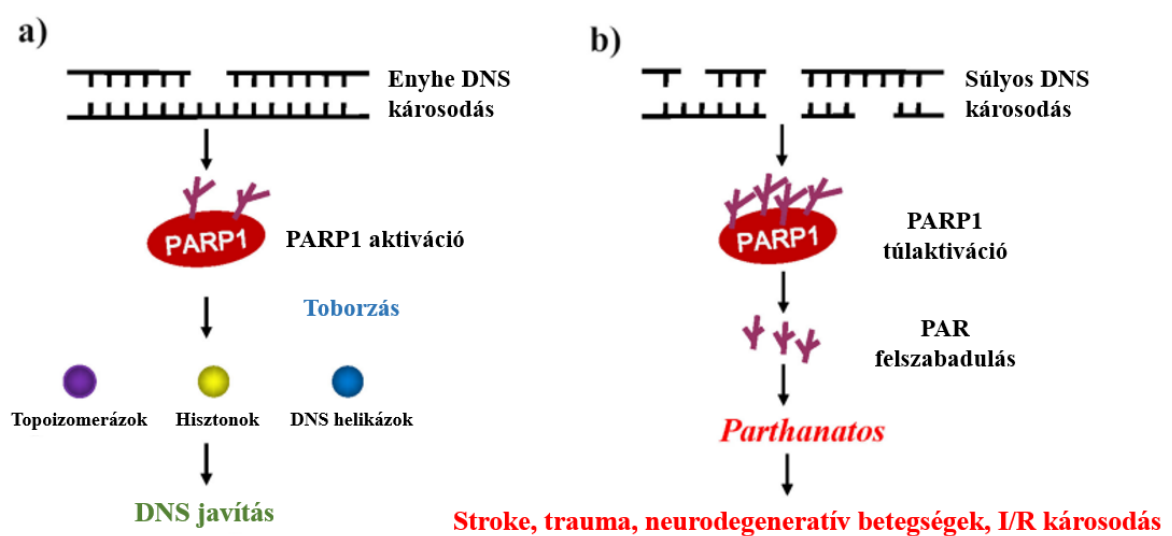
stressz mellett a retina iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodása is kiemelt fontosságú ezen szembetegségek patomechanizmusában (8, 54, 57). Az iszkémia alatt klasszikus értelemben az artériás vérellátás akadályozottságát értjük, amely súlyos metabolikus deficitet és szöveti hipoxiát eredményez. Reperfúzió fázisában az artériás akadály megszűnik, ami a véráramlás és oxigén-ellátás helyreállítását vonja maga után (58). Annak ellenére, hogy a reperfúzió létfontosságú a sejtek túlélése szempontjából, a következményes oxidatív károsodás és az abnormális immunválasz következtében súlyos fokú degenerációt is okozhat, amely visszafordíthatatlan látáskárosodáshoz vezethet (8, 57, 59).

3.6.1. Az öregedés és az I/R károsodás molekuláris háttere

A reaktív oxigéngyökök termelődésének fokozódása döntő lépés lehet a sejtek öregedésének indukciójában és fenntartásában, ami a sejtek makromolekuláinak (fehérjék, DNS, lipidek) és organelumainak károsodásához és pusztulásához vezet (54, 60). A fokozott oxidatív stressz részben a mitokondriális diszfunkció következménye, mely során az elektrontranszportlánc működése elégtelen. Ezzel társul öregedés során a monoamino-oxidáz (MAO) enzimszisztéma fokozott aktivitása és az antioxidáns védelem elégtelen működése, mely folyamatok együttesen oxidatív károsodást eredményeznek (61). Emellett az öregedő sejtek gyulladáscsökkentő citokineket, mátrix metalloproteinázokat (MMP) és növekedési faktorokat termelnek és az úgynevezett szenescenciával összefüggő szekréciós fenotípus alakul ki, ami krónikus, alacsony fokú pro-inflammatorikus állapotot eredményez (26, 62).

A poli-ADP-ribóz polimerázok (PARP-ok) stressz-szenzoroként működnek, és kiemelt szerepük van a DNS-károsodás javításában, a transzkripció szabályozásában és a kromatin szerkezetének modifikációjában. A PARP-ok kulcsfontosságú fenntartói a sejt homeosztázisnak, és számos sejt funkciót szabályoznak, beleértve a proliferációt, differenciálódást, az apoptózist, a gyulladáscsökkentő választ, a mitokondriális funkciót és a metabolikus státuszt. A PARP1 a legintenzívebben vizsgált tagja a PARP szupercsaládnak (63). Habár a PARP-1-nek fontos szerepe van a DNS-javításban, túlzott működése egy speciális programozott sejt haláltípushoz, úgynevezett PARthanatoshoz vezethet. Számos tanulmány szerint a PARthanatos kulcsszerepet játszhat a retina károsodás patomechanizmusában, különösen az öröklött retinadegeneráció, az időskori makuladegeneráció és a szem iszkémia-reperfúziós károsodása esetén (64). Fokozott PARP1 aktivitás figyelhető meg neurodegeneratív kórképekben is, úgymint Alzheimer- és Parkinson-kórban. Ezen betegségekben az aggregálódott és lerakódott patológiás fehérjék (α -szinuklein, β -amiloid) aktiválják a PARP1-et ezzel mitokondriális diszfunkciót és az energiametabolizmus diszregulációját eredményezve.

Ezzel szemben vannak olyan tudományos publikációk is, melyek eredményei szerint a fokozott PARP1 aktivitás pozitív korrelációt mutat a hosszú várható élettartammal (65, 66). Alacsony szintű oxidatív stressz esetén kimutatták, hogy a PARP1 citoprotektív hatású, ugyanis fokozza a DNS javítási mechanizmusokat és ezáltal mérsékeli genomi instabilitást. Ezen eredmények az sugallják, hogy a PARP1 aktivitása rendkívül finoman hangolt a szervezetben, míg a fiziológias öregedés során enyhén megemelkedett oxidatív stressz által kiváltott PARP1 expresszió-fokozódás valószínűleg protektív hatású, addig a fokozott oxidatív stresszel és jelentős PARP1 aktivációval (PARilációval) járó folyamatokban (pl. I/R károsodás, β -amiloid akkumuláció) inkább a proapoptotikus hatás érvényesülhet (lásd 7. ábra) (67, 68).



7. ábra: A PARP1 összetett szerepe enyhe (a) és súlyos (b) DNS károsodás esetén.

PAR = Poli(ADP-ribóz)

Az öregedéshez társuló fokozott gyulladás és oxidatív károsodás telomer rövidüléshez és DNS károsodáshoz vezet, ami sejthalált eredményezhet (54). A genomi instabilitáshoz hozzájárul idős korban a SIRT6 szintjének csökkenése is, melynek nagy szerepe van az oxidatív stressz során a DNS javító enzimek aktivációjában és a DNS kettős szálú törések javításában, ezáltal megelőzve a sejthalált. A SIRT6 expresszójának fokozása hosszabb várható élettartammal hozható összefüggésbe, míg SIRT6 deficiens egerekben korai, felgyorsult öregedést és elhullást figyeltek meg. Kimutatták, hogy a SIRT6 közvetlen aktivátora a PARP1-nek. Ennek következményeként, az emelkedett SIRT6 aktiváció fokozott PARP1 aktivitással jár együtt, ami alátámasztja a PARP1 előnyös hatását az öregedés folyamatában. A SIRT6 emellett mérsékeli a gyulladást is, azáltal hogy gátolja a nukleáris faktor-kappa B (NF κ B) útvonalat (26, 69, 70).

Az NF κ B egy transzkripciós faktor, mely számos patológiás állapotban kulcsfontosságú proapoptotikus és antiapoptotikus gén kifejeződését módosítja. Ezért az NF κ B a PARP1-hez hasonlóan kettős funkciót lát el: védelmi mechanizmusként szolgálhat segítve a sejtek túlélését, valamint elősegítheti a sejthalált azáltal, hogy stimulálja a DNS-károsodásban résztvevő intracelluláris útvonalakat (71). Ezért nem meglepő, hogy szabályozása szorosan összefügg a PARP1-gyel. Az acetilált PARP1 fokozza a gyulladásos választ az NK κ B-függő gének transzkripciójának szabályozása által, valamint az NK κ B koaktivátora is egyben (67). Az NF κ B részt vesz az apoptózis, a neuronális túlélés és proliferáció, a veleszületett és adaptív immunválasz valamint az immunsejtek vándorlásának és érési folyamatának a szabályozásában, mely folyamatok összefüggésbe hozhatók számos neurodegeneratív betegség patomechanizmusával (72). Az NF κ B aktivációja a mikroglia sejtekben alapvető fontosságú a reaktív oxigénradikálok és a gyulladáskeltő citokinek így az IL-1 β , interferon- γ és TNF- α) termelésében, amelyek neuronális károsodást okozhatnak (73). Ennek következtében az NF κ B gátlása vagy downregulációja neuro- és retinoprotektív hatással bír (74, 75).

A PARP1 szerepét I/R károsodásban tovább árnyalja, hogy az NF κ B aktivátor hatása mellett hozzájárulhat a vér-retina gát károsodásához a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) stimulálásával. Az MMP-k felelősek az extracelluláris mátrix lebontásáért és a szöveti átrendeződésért (76). Az MMP-9 promotor régiója kötőhelyekkel rendelkezik az aktivátor protein 1 (AP-1), NF κ B és specifikus protein 1 (SP-1) számára, és expresszióját fokozhatja mind az NF κ B, mind az AP-1 kötődése. A PARP1 az NF κ B és az AP-1 koaktivátorának tekinthető, ami közvetve az MMP-k aktiválásához vezethet (77). Átmeneti intraokuláris nyomásnövekedés esetén, amely retina iszkémiához vezet, az MMP-k expressziója fokozódik a trabekuláris hálózatban, a csarnokvízben, a retinában és a látóidegben (78). Emellett fokozott MMP9 expressziót mutattak ki idős életkorban a központi idegrendszerben is (79). Az MMP9 a legszélesebb körben vizsgált MMP a retinában. Szakirodalmi adatok alapján fokozott kifejeződése hozzájárul a retina destrukciójához I/R károsodás esetén. Ennek eredményeként az MMP-k gátlása ígéretes terápiás megközelítést jelenthet az iszkémiás károsodással összefüggő szembetegségek kezelésében (76).

A szem I/R károsodása aktiválja az asztrocitákat, amelyek ezáltal MMP-ket választanak ki. Az MMP-k részt vehetnek a mátrix remodellingben és a retina destrukciójában (76). A GFAP egy széles körben használt indikátora az asztrociták aktivációjának, és szintje jelentősen megnő a legtöbb idegrendszert érintő patológiás állapotban, beleértve a krónikus neurodegeneratív és a retinát érintő kórképeket. Gyulladásos szignál hatására az asztrociták nemcsak növelik a GFAP termelését, hanem megváltoztatják szerkezetüket is, így szabálytalan megjelenésűvé

válnak, és gyakran mélyen penetrálnak az ideghártya szövetébe. A GFAP expressziójának csökkentése ezért neuroprotektív hatással bírhat (80, 81). A megemelkedett GFAP szint összefüggésbe hozható az öregedéssel, az Alzheimer-kórral, a Parkinson-kórral, a szklerózis multiplexszel és a glaukómával (82-84). Az öregedő retinában kimutatható a mikroglia sejtek diszfunkciója is, ami fokozott aktivációjukkal jár együtt. Emellett a fagocita funkció is károsodik mely gyakran egészséges neuronok károsodásához vagy a pusztuló sejtek nem megfelelő eltávolításához, lerakódások kialakulásához vezethet. A retina oxigén ellátása is csökken a Bruch-membrán, a vaszkuláris bazálmembrán permeabilitásának csökkenése és a drusen depozitok felhalmozódása miatt krónikus, alacsony szintű iszkémiát eredményezve, amely hozzájárul a mitokondriális diszfunkcióhoz (3).

A kialakult depozitumok felszámolásában a HSP70 fehérjének lehet szerepe. A 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérjék (HSP70) minden szövetben jelenlévő chaperone molekulák, melyek felelősek a fehérje homeosztázis fenntartásáért. Biztosítják az újonnan szintetizált proteinek térszerkezetének megfelelő kialakulását (folding), működésüknek szabályozását, gátolják a fehérje-aggregációt, valamint segítik az abberáns vagy aggregálódott proteinek eltakarítását (85). A HSP70 fehérjéknek bizonyítottan protektív szerepe van számos központi idegrendszeri betegségben, amelyekben a kóros fehérjék aggregációja lokális gyulladást indít el, melyet idegsejtpusztulás követ. A HSP70 képes megakadályozni vagy visszafordítani ezen toxikus fehérje-konglomerátumok kialakulását és felhalmozódását, így fejtvé ki antiapoptotikus és antinekrotikus hatását. Neuroprotektív hatása miatt felmerült a hősokkfehérjék védő szerepe szembetegségekkel szemben (86-88). A HSP70 szintjének növelése számos terápiás előnnyel jár, például segíti a sejt-homeosztázis fenntartását, gátolja a gyulladást az IKK-komplex (I κ B-kináz-komplex) aktiváció csökkentésével és az azt követő NF κ B-közvetített gyulladást válasz inhibíciójával. Emellett a HSP70 támogatja a proteosztázis fenntartását, valamint gátolja az asztrogliózist és a proinflammatorikus citokinek felszabadulását (89).

Az agyi eredetű növekedési faktor (BDNF), amely a neurotrofin család sokoldalú tagja, nagy mennyiségben fejeződik ki a központi idegrendszerben (ezzel együtt a retinában), és kulcsszerepet játszik az axonális növekedés, a neuronális differenciálódás, a neuroprotekción és a szinaptikus plaszticitás szabályozásában (90). A szemben a retina ganglionsejtjei, az amakrin sejtek, az asztrociták, a retinális gliasejtek (Müller-sejtek) és a fotoreceptorok termelik. A BDNF átvitele a retinába az agyból is lehetséges a látóidegen keresztül. A retinában a BDNF létfontosságú szerepet játszik a jelátviteli útvonalának létrejöttében azáltal, hogy szabályozza a ganglionsejtek dendritikus hálózatának szerveződését, ami biztosítja az ideghártya

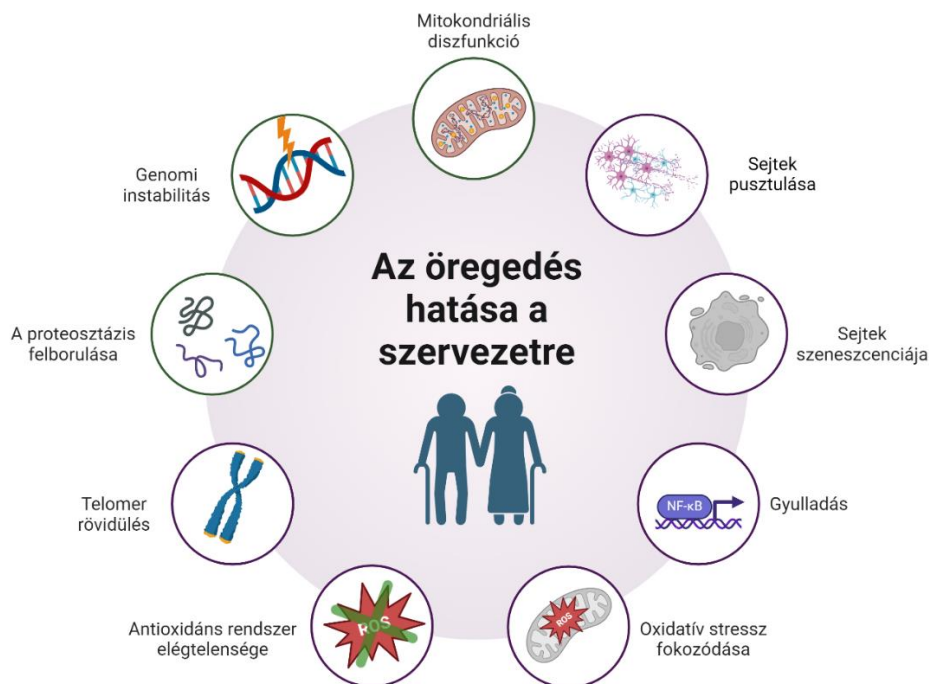
szerkezetének megfelelő kialakulását. Idősödő életkorban az endogén BDNF neuroprotektív hatást fejt ki a ganglionsejtekre, megvédve a dendritikus hálózatot és mérsékelve a látásvesztést a fokozott szemnyomás okozta károsodás esetén, amit glaukóma kísérletes állatmodellekben igazoltak. Emellett a BDNF retinoprotektívnek bizonyult a hipoxia és glükózmegvonás által okozott károsodás esetén is (72, 91). Kimutatták, hogy a BDNF-mediálta kaszkád védi az idegsejteket a károsodástól, és elősegíti a neuronális hálózatok sérülés utáni regenerációját (92). A pszichiátriai és neurodegeneratív kórképekben szenvedő betegek vérében és agyában alacsonyabb BDNF koncentráció detektálható, amely valószínűleg krónikus gyulladással járó állapot következménye (90).

A monoamin-oxidázok a külső mitokondriális membránban lokalizálódnak, és a kulcsfontosságú szerepük van a neurotranszmitterek oxidatív lebontásában. Két izoforma létezik, a MAO-A és a MAO-B, amelyek jellegzetes szöveti eloszlással, szubsztrát- és inhibitor-szelektivitással rendelkeznek. A MAO-A elsősorban a noradrenalin és a szerotonin lebontásáért felelős, míg a MAO-B elsősorban a feniletamin és a benzilamin oxidatív deaminálását katalizálja. Mindkét izoforma nagy affinitással rendelkezik a dopamin és a tiramin iránt. A monoaminok MAO-k általi oxidatív deaminálása során aldehidek, hidrogén-peroxid és reaktív oxigéngyökök keletkeznek, amelyek oxidatív stresszt okoznak. Az aldehid intermedierek károsító hatást fejtenek ki a biológiai rendszerekre és csökkenthetik az aldehid-dehidrogenáz aktivitást, ami tovább fokozza az oxidatív stressz mértékét. Ez a folyamat a neurodegeneratív rendellenességeknél a neuronkárosodás potenciális kockázati tényezője (16, 17). A MAO-A enzimnek kiemelt szerepe lehet az apoptózisban is. De Zutter és munkatársai kísérlete szerint a MAO-A enzim aktivitása megemelkedik a sejthalál során, és az apoptózis megelőzhető MAO-A gátló adásával (93). Egy másik vizsgálatban a MAO-A célzott mikroRNS-sel (miRNS) történő inhibíciója csökkentette a ROS-termelést, és növelte a mitokondriális légzési lánc első enzimének (komplex I) aktivitását és az ATP-szintézist, valamint az antioxidáns glutation és a citoprotektív Bcl-2 szintjét, ami arra utal, hogy a MAO-A hozzájárulhat a mitokondriális diszfunkció kialakulásához (94). Egy közelmúltban elvégzett vizsgálat szerint a MAO-A upregulációja figyelhető meg glaukómában, ami megerősíti azt az elképzelést, hogy a MAO-A enzimnek kulcsszerepe van a degeneratív szembetegségekben (95).

A MAO-B fokozott expressziója az öregedés, a neuroinflammatorikus és neurodegeneratív állapotok fontos jellemzője. Expressziója bizonyítottan megemelkedik Alzheimer-kórban és Parkinson-kórban és szintje közvetlenül korrelál a kognitív károsodás mértékével (96-98). Az enzim gátlása bizonyítottan neuroprotektív hatású az anti-apoptotikus mechanizmusok, a

reaktív oxigéngyökök termelésének csökkentése és a mitokondriális membrán stabilizálása révén (99).

Az öregedéssel járó fokozott oxidatív stressz elleni védelemben kiemelt szerepe van az antioxidáns rendszernek. Az antioxidáns védelem fő részvevői a szuperoxid diszmutáz (SOD) enzimek, melyek a szuperoxid gyökök ($O_2 \cdot^-$) hidrogén peroxiddá (H_2O_2) és oxigénné (O_2) történő transzformációját katalizálják (100). A réz/cink szuperoxid diszmutáz (SOD1) egy intracelluláris antioxidáns enzim, amely a mitokondriális és citoszolikus szuperoxid ($O_2 \cdot^-$) termeléséből eredő oxidatív stressz alapvető szintjének szabályozásáért felelős. Magas citoszolikus szintje különbözteti meg a SOD család másik két tagjától: a kizárólagosan mitokondriumokban lokalizált Mn (mangán) szuperoxid diszmutáztól (SOD2) és az extracelluláris mátrixhoz kötött réz és cink kötésére képes extracelluláris szuperoxid diszmutáztól (SOD3) (101). Számos szembetegség, úgymint időskori makuladegeneráció, szürkehályog, száraz szem szindróma, presbiópia prevalenciája magasabb idős életkorban. Állatkísérletben kimutatták, hogy SOD1 deficiens egerekben drusen-szerű depozitumok keletkeznek a retinán, choroidális neovaszkularizáció indul meg, és a retinális pigment epithelium diszfunkciója alakul ki, ami időskorral-összefüggő retinális degeneratív betegségek kialakulását eredményezi (100). Az időskorral összefüggő folyamatok összegzése a **8. ábrán** látható.



8. ábra: Az öregedéssel összefüggő változások a szervezetben

3.6.2. Az öregedés és az I/R károsodás következménye a szemben

A sejtek pusztulása makroszkóposan is detektálható. Idős korban a szemben megfigyelhető a ganglionsejtek pusztulása, a környező idegrostok vakuolizációja, valamint elindul a neovaszkularizáció a retina rétegeiben. Emellett a belső és külső plexiform réteg spongiform degenerációja is kialakul a belső és külső nukleáris rétegek jelentős elvékonyodása mellett. Ennek eredményeként a retina rétegvastagsága jelentősen csökken (102).

Az ideghártya sejteinek degenerációja elektroretinogramon is megfigyelhető. Bizonyított, hogy a szem degeneratív elváltozása esetén a retina fényre adott válaszkészsége csökken, ezért csökkent hullámamplitúdókat és megnyúlt implicit időt detektálhatunk az elektroretinogramon. Az ERG ezért alkalmas noninvazív módszer a retinoprotektív vagy retinakárosító hatások vizsgálatára (47).

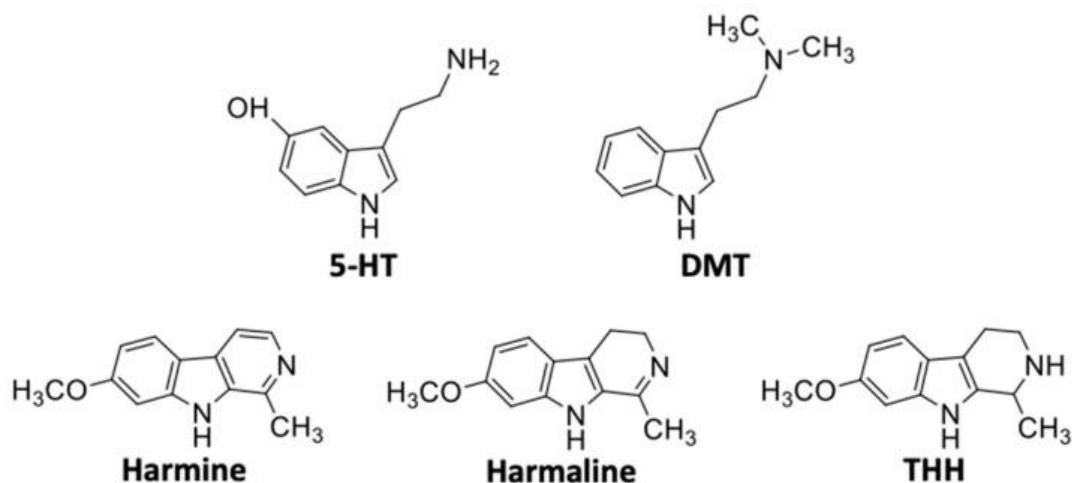
3.7. Az ayahuasca komponenseinek hatása

Pszichedelikus hatásának köszönhetően az ayahuascát évszázadok óta használják Dél-Amerikában vallási rituálékon és napjainkban világszerte elterjedté vált rekreációs használata. Az ayahuasca egy főzet, amely két növény keverékéből áll. A *Banisteriopsis caapi* (vagy *Peganum harmala*) gazdag β -karbolinokban úgy, mint harmin, harmalin és tetrahydroharmin, a *Psychotria viridis* (Kábitó hánytatógyökér) pedig tartalmazza a hallucinogén hatású DMT-t (9. ábra).



9. ábra: *Psychotria viridis* (A) és *Banisteriopsis caapi* (B,C), melyek a leggyakrabban alkalmazott összevevői az ayahuasca főzetnek (103).

A DMT a szervezetben a monoamin-oxidáz A enzim által gyorsan inaktiválódik, azonban a β -karbolinok reverzibilis MAO-A inhibitorokként funkcionálnak, ezért szükséges a két növény kombinációja a DMT hatásának fokozásához (9, 10). Következésképpen a DMT és a harmala alkaloidok együttes alkalmazása a DMT lebomlásának gátlása miatt meghosszabbított pszichotróp hatást biztosít (104).



10. ábra: A szerotonin, a DMT és a β -karbolinok molekuláris szerkezete (103).

3.7.1. N,N-dimetiltriptamin

Szerkezetileg a N,N-dimetiltriptamin (DMT) legmeglepőbb aspektusa az egyszerűsége. Kicsi és hidrofób molekula, ami lehetővé teszi, hogy könnyen átjusson a vér-agy gáton. Kémiai szempontból a szerotoninhoz és a melatoninhoz hasonló, mivel mindhárom molekula triptamin vázzal rendelkezik (**10. ábra**), habár a DMT központi idegrendszerre gyakorolt hatása teljesen eltér ezektől a vegyületekétől (105). Hatását főként az 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} és 5-HT_{2C} receptorokon fejti ki. A szerkezeti hasonlóság és a hatásmechanizmus miatt az DMT a szerotoninerg hallucinogének csoportjába tartozik (9). Az anxiolitikus hatása az 5-HT_{1A} receptor által valósul meg, míg a pszichedelikus hatását az 5-HT_{2A} receptor közvetíti (11). A szerotonin receptorokon kifejtett hatása miatt felmerült hangulati zavarok, pl. depresszió kezelésében történő alkalmazása (106). A DMT emellett hat Sigma-1 receptoron (Sig-1R) is.

A Sig-1R a mitokondrium asszociált endoplazmatikus retikulum membránban (MAM) helyezkedik el, valamint a plazma membránba transzlokálódhat agonista aktiváció hatására. Megtalálható számos szervünkben úgy, mint az agyban, a belekben, a májban, a vesékben illetve az immunsejteken is fontos funkciót lát el. A Sig-1R-t „pluripotens modulátorként” tartják számon, amely kontrollálja a sejtek túlélését és differenciálódását. Emellett chaperon funkciót is ellát és így segíti a fehérjék helyes konformációjának megőrzését (11). A chaperon funkció részeként az endoplazmatikus retikulumot ért stressz esetén biztosítja a citoprotektív (pl. antioxidáns) fehérjék transzkripcióját a sejtmagban. Ennek köszönhetően a Sig-1R aktiváció csökkenti a hipoxia és az oxidatív stressz okozta károsodást.

Szabo. A. és munkatársai igazolták, hogy a DMT HIF-1 α -tól (hipoxia indukált faktor1 α) független úton fejti ki védő hatását a hipoxiával szemben. A Ca²⁺ szignalizáció szabályozása

révén befolyásolja a kinázok működését valamint az ATP szintézist, ezzel javítva a sejtek túlélését a hipoxiával szemben (12). Védő hatását az iszkémia-reperfúziós károsodással szemben vesén vizsgálták, ahol nem védte ki, de mérsékelte az I/R során fellépő metabolikus változásokat (107). Neuroprotektív tulajdonságait több tanulmány is bizonyította. Sig-1R agonista aktivitásának köszönhetően a DMT képes volt enyhíteni az iszkémiás károsodást az agyban epilepszia és fokális iszkémia kiváltása után patkány modellen (108, 109). A retina a központi idegrendszer része és a különböző sejtípusokon igazoltan található Sig-1R, melynek aktiválása védő szerepet játszhat a stressz által kiváltott retinakárosodással szemben (110).

A DMT citoprotektív hatása mellett a veleszületett és szerzett immunitás szabályozásában is részt vesz. Bizonyították, hogy a sigma-1 receptor agonisták csökkentik a proinflammatorikus citokinek termelődését (IL-1 β , IL-6, TNF α) valamint növelik az anti-inflammatorikus IL-10 képződését. Emellett csökkentik az INF γ és GM-CSF szintet és a limfociták proliferációját eger modellen. A DMT hatékony lehet a krónikus gyulladással járó vagy autoimmun betegségekben, mivel gátolja a Th1 és Th17 sejtek keletkezését (CD4+ sejtekből), melyeknek fontos szerepük van ezen betegségek kialakításában (111). A CD4+ sejtvonallal ellentétesen, a daganatos sejtek eliminálásában fontos NK-sejtek aránya megnő, ezért felmerült az ayahuasca daganatterápiás felhasználásának lehetősége is (11).

A DMT-t nem csak exogén bevitel után mutatható ki a szervezetben, hanem jelen van egészséges emberek vérében, agyában, agy- és gerincvelői folyadékában és vizeletében, ami endogén termelődésére utal (9, 11). A DMT fontos endogén molekula lehet neurotranszmitterként, neuromodulátorként, hormonként, immunmodulátorként, terhesség során és a fejlődésben (112).

Néhány triptamin derivátum, köztük a DMT is gyorsan inaktiválódik oxidatív deamináció által, melyet a MAO-A enzim közvetít. Éppen ezért célszerű a DMT-t MAO-A inhibitorral együttesen alkalmazni (harmin, harmalin) (9). Mindkét hatóanyag a szerotonerg működést fokozza, ezért elméletileg fennáll a szerotonin szindróma veszélye. Gyakorlatban azonban extrém ritkán jelentkeztek a szerotonin toxicitás tünetei valószínűleg a β -karbolinok reverzibilis hatása miatt (11).

3.7.2. Harmalin

A harmalin egy β -karbolin, amely a monoamino-oxidáz enzim A-típusának (MAO-A) reverzibilis gátlószere. A Banisteriopsis caapi vagy Peganum harmala növényekből nyerhető ki. A harmalin az elmúlt évtizedben nagy figyelmet kapott, és ismert, hogy számos farmakológiai hatást fejt ki, beleértve az antimikrobiális, trombocita-gátló, tumorellenes,

vazorelaxáns és neuroprotektív tulajdonságokat (113). A harmalin emellett acetil-kolinészterázgátlónak bizonyult, hasonló hatásmechanizmussal, mint az FDA által jóváhagyott Alzheimer-kór terápiájában is alkalmazott galantamin. Ennek megfelelően a harmalin képes javítani a kolinerg rendszer működését, csökkenteni a gyulladást és fokozni a neurotranszmissziót, mely hatásainak köszönhetően javította a kognitív funkciókat (15). Antioxidáns tulajdonságát is leírták MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) és oxidált LDL által okozott sejtkárosodás kivédésében: mindkét tanulmányban a harmalin hatékonyan csökkentette a reaktív oxigénradikálok szintjét, melynek hátterében a MAO enzim gátlása mellett a harmalin „scavenger” funkciója is állhat (114, 115). A harmalin hatékonyan bizonyult a reumatoid arthritis által kiváltott gyulladást mérséklésében, azáltal, hogy gátolta az NFκB útvonalat, valamint gátolta a sejtproliferációt (14). Tumorelles hatását számos sejtvonalon vizsgálták. Ezen tanulmányok eredménye szerint a harmalin növeli a tumoros sejtekben a p53, BAX és mTOR kinázok expresszióját, fokozza az oxidatív stresszt, valamint csökkenti a mátrix metalloproteinázok képződését, így gátolva a migrációt és metasztázisképzést (13, 116, 117). A harmala alkaloidok az ayahuasca főzet fő alkotóelemei, és a DMT mellett ezek a növényi hatóanyagok is erős pszichoaktív tulajdonságokat mutattak. MAO-A gátló és KIR stimuláló hatásuk miatt az ayahuasca antidepresszáns tulajdonságai részben ezeknek az alkaloidoknak tulajdonítható (11).

3.8. A testmozgás élettani hatásai

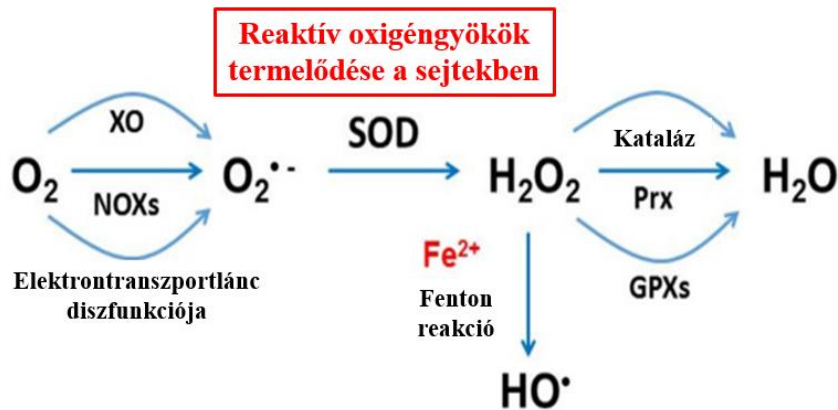
A rendszeres testmozgás védőhatást mutat az öregedés jellemzőivel szemben, lassítja annak folyamatát és szakirodalmi adatok alapján 3-7 évvel megnyújtja a várható élettartamot (1, 22). Ez a protektív hatás bizonyított számos neurológiai és szemészeti kórképben, úgymint Alzheimer-kór, Parkinson-kór, amiotrófiás laterálszklerózis, diabéteszes retinopátia, glaukóma, időskori makuladegeneráció, fény-indukálta retinakárosodás és retinitis pigmentosa esetén. Emellett a fizikai aktivitás javítja a vizuális funkciót öregedő állatokban és befolyásolja a retina normál fiziológiáját (118).

Az aerob testmozgásnak számos hatása van a látószervre. Bizonyított, hogy a gyaloglás, kocogás, biciklizés és a túrázás csökkenti a belső szemnyomást, ezáltal előnyös hatása van glaukómában. A fizikai aktivitás intenzitása fordítottan arányos a belső szemnyomás csökkenésével. Az elektroretinogramon is megfigyelhetők változások. A testmozgás növeli a b-hullámok amplitúdóját edzett és nem edzett egyének esetén is, azonban megerősítő fizikai aktivitás esetén, ami a laktát szint jelentős emelkedésével jár, a nem edzett alanyokban csökkent b-hullám amplitúdókat figyeltek meg. Alacsony intenzitású aktivitás javítja a vazomotoros

választ, míg magas intenzitás esetén az drasztikusan csökken. A rendszeres testmozgás hatással lehet a katarakta kialakulására is (119). Megfigyelték, hogy a fizikálisan aktív pácienseknél kisebb eséllyel alakul ki lencsehomály, ami feltehetően a csökkent oxidatív stressznek és az mozgás-indukálta ozmotikus változásoknak köszönhető (120). Cukorbeteg patkányokban a mozgás csökkentette a VEGF termelődését, így a kóros neovaszularizációt. Fény-indukálta retinakárosodásban pedig a neuroprotektív BDNF termelődését növelte (118). A BDNF szintje függ a glükokortikoid felszabadulás mértékétől. Kimutatták, hogy a glükokortikoidoknak jelentős hatása van a neurális funkciókra, ugyanis stressz, vagy exogén kortikoszteron bevitel hatására csökken a neutrofinok, mint pl. a BDNF mRNS és protein szintje. Ebből következik, hogy az erőltetett testmozgás hatására csökken a BDNF szintézis a központi idegrendszerben, ami a neurogenesis és neuroregeneráció elégtelenségéhez vezethet. Alacsonyabb szintű fizikai aktivitás esetén kisebb mértékű a kortizol felszabadulás, melynek feltételezhetően a gyulladáscsökkentő terápiás hatása érvényesül, így dózisfüggő módon gátolja a komplement aktivitást (121).

A rendszeres fizikai aktivitás csökkenti a diabéteszes retinopátia kialakulásának valószínűségét. Egy kísérlet során, streptozotocin által kiváltott diabéteszes modellben a futópádon végzett edzés csökkentette a pusztuló sejtek számát azáltal, hogy mérsékelte a proapoptotikus Bax fehérje expresszióját, és növelte az anti-apoptotikus hatású Bcl-2 fehérje és a sejttúlélési faktor foszfo-Akt expresszióját a retinában (118).

Számos tanulmány részletezi, hogy a testmozgás dózisfüggő hatású, így a mozgás intenzitásának növekedésével a sport jótékony hatásai fokozódnak (19-21). Habár egyre több vizsgálatot publikálnak, amelyek azt mutatják, hogy a nagy intenzitású testmozgásnak nincs érzékelhető előnye az alacsony intenzitású fizikai aktivitással szemben az idősödő felnőtteknél, sőt, akár negatív hatások is érvényesülhetnek (22-24). A nagy intenzitású testmozgás a küszöbértéket meghaladó mértékben fokozhatja a ROS-termelődést, és oxidatív stresszhez vezethet, ezáltal károsítja a makromolekulákat és a biológiai folyamatokat, amely mechanizmus közvetlenül kapcsolódik számos olyan kóros állapot kialakulásához, amely korlátozza az egészséges öregedést (2, 25). A fokozott oxidatív stressz egy öngerjesztő folyamatot indít el a szervezetben. Állatmodellben igazolták, hogy a fokozott ROS termelés hatására a vörösvértestek (vvt) sérülékennyé válnak, amely fokozott hemolízishez vezet. Erőltetett testmozgást végző állatok vérében alacsonyabb vvt és magasabb hemoglobin koncentráció volt kimutatható. A hemolízis során vasionok kerülnek a véráramba, melyek Fenton-reakció során hidrogén-peroxiddal reagálva tovább fokozzák az oxidatív károsodást (25).



11. ábra: A reaktív oxigéngyökök keletkezésének egyik mechanizmusa a sejtekben, a Fenton reakció: XO: xantin-oxidáz; NOXs: NADPH oxidázok; ETC: electron transport chain/elektrontranszportlánc; $O_2^{\bullet-}$: superoxid; SOD: superoxid dizmutáz; H_2O_2 : hidrogén-peroxid; Prx: peroxiredoxin; GPXs: glutation-peroxidázok; HO^{\bullet} : hidroxilgyök (122).

3.9. A WHO ajánlása felnőtt és idős korban végzett testmozgásra vonatkozóan 18–64 éves életkorban:

Ennél a korcsoportnál a fizikai aktivitás magában foglalja a szabadidős vagy rekreációs tevékenységeket, a közlekedést (pl. gyaloglás vagy kerékpározás), a munkavégzést, a házimunkát, a játékot, sportot vagy tervezett testmozgást a napi, családi és közösségi tevékenységek részeként. A következőket ajánlják a légző- és izomrendszeri fittség, a csontok egészségének javítása, valamint a nem fertőző betegségek és a depresszió kockázatának csökkentése érdekében:

1. A 18–64 éves felnőtteknek hetente legalább 150 perc mérsékelt intenzitású aerob tevékenységet kell végezniük, vagy hetente legalább 75 perc magas intenzitású aerob tevékenységet, vagy ezeknek a mérsékelt és magas intenzitású tevékenységeknek az egyenértékű kombinációját.
2. Az aerob tevékenységeket legalább 10 perces szakaszokban kell végezni.
3. További egészségügyi előnyök érdekében a felnőttek növeljék a mérsékelt intenzitású aerob tevékenységet hetente 300 percre, vagy végezzenek 150 perc magas intenzitású aerob tevékenységet, vagy ezek egyenértékű kombinációját.
4. Az izomerősítő tevékenységeket a nagy izomcsoportokat bevonva hetente legalább 2 vagy több napon kell végezni.

65 év és annál idősebb életkorban:

A 65 évnél idősebb korcsoport esetén az ajánlás teljesen megegyezik a 18-64 éves korosztálynál leírtakkal. A rendszeres fizikai aktivitással csökkenthető a nem fertőző betegségek, a depresszió és a kognitív hanyatlás kockázata.

A javaslat az alábbi kiegészítést tartalmazza:

- Azoknak az időseknek, akiknek gyenge a mozgásképességük, hetente legalább 3 napon végezniük kell egyensúlyjavító tevékenységeket az elesések megelőzése érdekében.

Ha az idősebb felnőttek nem tudják teljesíteni az ajánlott mennyiségű fizikai aktivitást egészségi állapotuk miatt, akkor a képességeiknek és állapotuknak megfelelően annyi fizikai aktivitást végezzenek, amennyit csak tudnak.

Összességében, minden korcsoportnál a fenti ajánlások betartásának, valamint a fizikai aktivitásnak a pozitív hatásai meghaladják az esetleges károkat. A hetente ajánlott 150 perc mérsékelt intenzitású aktivitásnál a vázizomrendszeri sérülések előfordulás ritka. A vázizomrendszeri sérülések kockázatának csökkentése érdekében javasolt alacsony intenzitással kezdeni, majd fokozatosan emelni a terhelést (123).

4. Anyagok és módszerek

4.1. Kísérleti állatok

Első kísérletünkhöz 12 hetes hím Spargue Dawley (SD, 420-460 g) patkányokat alkalmaztunk, melyeket a Janvier Labs (Rte du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Franciaország) biztosított. Az állatok 10 hetes korukban érkeztek és 2 hét akklimatizációs időszakot biztosítottunk számukra. Ezalatt a patkányok ketrecben voltak elhelyezve egy olyan ablak nélküli állatházi szobában, ahol 12 órás világos/sötét ciklust és állandó 24 °C hőmérsékletet biztosítottunk számukra. Az állatok szabadon hozzáférhettek vízhez, valamint ad libitum szabványos rágcsálótáphoz (Ssniff Standard rágcsálótakarmány). Az állatok az ARVO (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) és az NIH (National Institute of Health) iránymutatásainak megfelelően humánus ellátásban részesültek. A vizsgálat során alkalmazott valamennyi módszert a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (engedélyszám: 12/2019/DEMÁB) jóváhagyta.

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

4.2. Kísérleti protokollok és csoportok

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

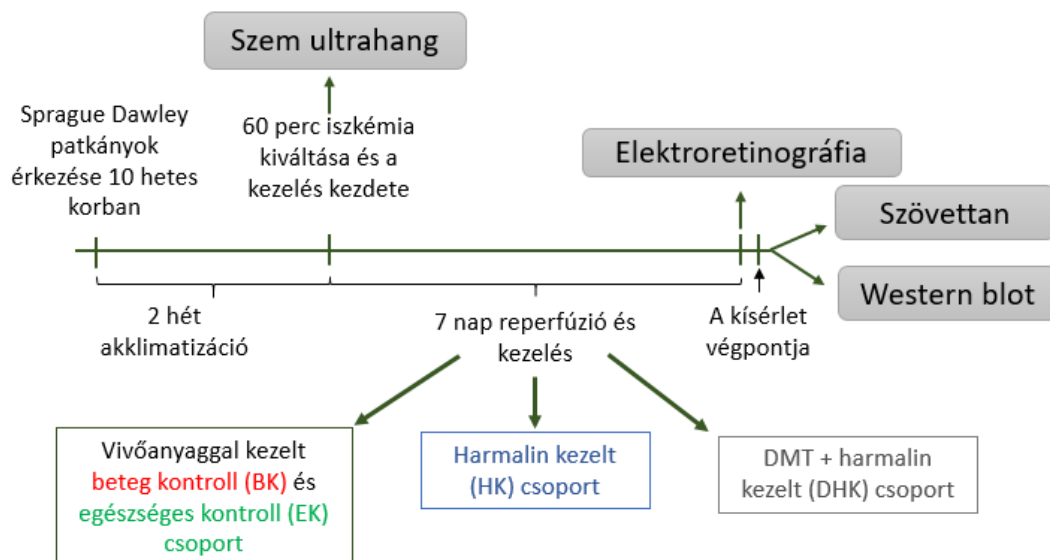
Első kísérletünk célja az volt, hogy megvizsgáljuk az ayahuasca főzet két legfontosabb komponensének, az N,N-dimetiltriptaminnak és a harmalinnak biológiai hatásait a szem iszkémia-reperfúziós károsodásában.

Kéthetes akklimatizációs időszakot követően (12 hetes korukban) az állatokat véletlenszerűen csoportokra osztottuk (n = 10 minden csoportban): vivőanyaggal kezelt (a lekötött szem szolgált a beteg kontrollként – BK; míg az iszkémiának nem kitett szemet használtuk egészséges kontrollként –EK), DMT-vel (Lipomed, DMT-943-FB-1000, Lot: 943.1B0.2) és harmalinnal (Sigma–Aldrich, 51330-1G, Lot#BCCC2186) kezelt (DHK) és harmalinnal (HK) kezelt csoportok (lásd **1. táblázat**).

Csoport	Iszkémia modell	Reperfúzió és kezelés hossza	Állatok száma	Kezelés	Elvégzett vizsgálatok
1.	Ligáció (60 perc)	7 nap	10 hím SD patkány	DMT (sc. 10 mg/ttkg/nap) + harmalin (po. 10 mg/ttkg/nap) =DHK csoport	Szem ultrahang + Elektroretinográfia + Szövettan + Western Blot
2.	Ligáció (60 perc)		10 hím SD patkány	harmalin (po. 10 mg/ttkg/nap) = HK csoport	
3.	Ligáció (60 perc)		10 hím SD patkány	Kezeletlen (vivőanyaggal kezelt) = BK csoport	

1. táblázat: Kezelési csoportok az első kísérletben. Rövidítések jelentése: SD = Sprague Dawley patkány; sc. = subkután; po. = per os = szájon át.

A DMT oldatot ozmotikus minipumpával (ALZET Osmotic Pump, Model 2ML1) juttattuk be, amely 1 héten keresztül képes volt folyamatosan, állandó sebességgel szubkután adagolni a hatóanyagot. Fő célunk az volt, hogy állandó DMT-koncentrációt tartsunk fenn, és megelőzzük a DMT erős hallucinogén és szerotonerg mellékhatásait. A DMT alkalmazott napi dózisa 10 mg/kg/nap volt [30829033, 29664276]. A harmalin és a vivőanyag beadását naponta kétszer rozsdamentes acél gyomorszondán keresztül valósítottuk meg. A mini pumpák korlátozott térfogata (2 ml) miatt nem tudtuk a harmalint a pumpákba tölteni. Figyelembe véve a harmalin viszonylag rövid felezési idejét és a MAO-A enzimre gyakorolt reverzibilis gátló hatását, a szert mindkét kezelési csoportnak naponta kétszer, 10 mg/kg/nap adagban, szájon át történő szondázással adtuk be. A harmalint mucilago hydroxethylcellulosiban diszpergáltuk, ezért a mucilagot a vivőanyaggal kezelt csoportban is alkalmaztuk. Tekintettel arra, hogy a DMT felezési ideje MAO-A gátlás nélkül rendkívül rövid, az állatok életét kímélve nem hoztunk létre csak DMT-vel kezelt csoportot (3R állatetikai szabály). Egészséges kontroll (EK) csoportként a kezeletlen Sprague-Dawley patkányok jobb (nem lekötött) szemét használtuk, amivel tovább tudtuk csökkenteni a feláldozott állatok számát.



12. ábra: Az első kísérlet menete, és az elvégzett vizsgálatok

4.2.1.1. Iszkémia modell

Az állatoknál a mély anesztéziát ketamin/xilazin kombináció (100/10 mg/kg) intramuszkuláris beadásával értük el. Az általános anesztézia mellett lokális érzéstelenítést is alkalmaztunk az állatok bal szemén oxibuprokain tartalmú szemcseppel (Humacain 4 mg/ml, Teva Ltd., Debrecen, Magyarország). Amikor az állatok fájdalomingerre már nem reagáltak, kísérleti úton iszkémiás állapotot idéztünk elő az SD patkányok bal szemén ligációs technikával, a korábban leírt protokoll szerint [15452083]. A ligáció során a szegolyókat kissé kiemeltük a szemüregből, majd a szegolyók mögé egy vastag, atraumatikus sebészi varróanyagból (Mersilene; 2 mm) készült ligatúrát helyeztünk, melynél egy polietilén kanül segítségével egy csúszócsonkot alakítottunk ki. A ligatura körülvette a látóideget, a retina ereit és a retrobulbáris kötőszövetet. Az iszkémiát a csomó meghúzásával és rögzítésével indítottuk el, nyomást gyakorolva a retinális erekre. A vérrellátás megszűnését makroszkóposan, oftalmoszkóp segítségével is ellenőriztük. A szemfenék elfehéredése jelezte a globális iszkémia kezdetét. Az állatok szemét az altatás alatt karbomer alapú szegéllel védtük a kiszáradás ellen (Vidisic, Bausch & Lomb, Berlin, Németország). Az iszkémia időtartama 60 perc volt. Az iszkémiás időszak végén a csomót feloldottuk és a ligatúrát eltávolítottuk, hogy a véráramlás újra elindulhasson.

4.2.1.2. A szem ultrahang vizsgálata

A retina véráramlását a Vevo 3100 ultrahangrendszer (Fujifilm Visualsonics Inc., Toronto, ON, Kanada) segítségével határoztuk meg, amely egy 32 MHz-es MX550D transzducerrel volt

felszerelve. A vizsgálatot során az állatok mély altatásban voltak, a megfelelő testhőmérséklet biztosítása érdekében 39 °C hőmérsékletű fűtött melegítőpadra helyeztük őket (hason fekvő pozícióban). Vízalapú, inert ultrahanggél (Aquasonic 100, Parkerlab Inc., Fairfield, NJ, USA) vittünk fel a szaruhártya felszínére, és a szemet az úgynevezett hosszanti makula (LMAC) nézetben vizualizáltuk. A méréseket akkor rögzítettük, amikor a szaruhártya, a szivárványhártya és az üvegtest a maximális térfogatban volt látható. A standard Color Doppler jeleket 9 mm mélységben vettük fel, valamint impulzushullám (PW) Doppler-képeket rögzítettünk a hátsó rövid ciliaris artéria véráramlásának értékelésére (55, kapuméret: 0,27 mm). A véráramlást az 1 órás I/R-sérülés előtt (alapállapot) és után (reperfúzió alatt) értékeltük. A képeket félkvantitatív módon elemeztük (VevoLAB ver. 5.1., Fujifilm Visualsonics Inc., Toronto, ON, Kanada), hogy értékeljük az áramlás jelenlétét a kiindulási körülmények között és a reperfúziós fázisban.

4.2.1.3. Az ozmotikus minipumpa beültetése

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

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

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

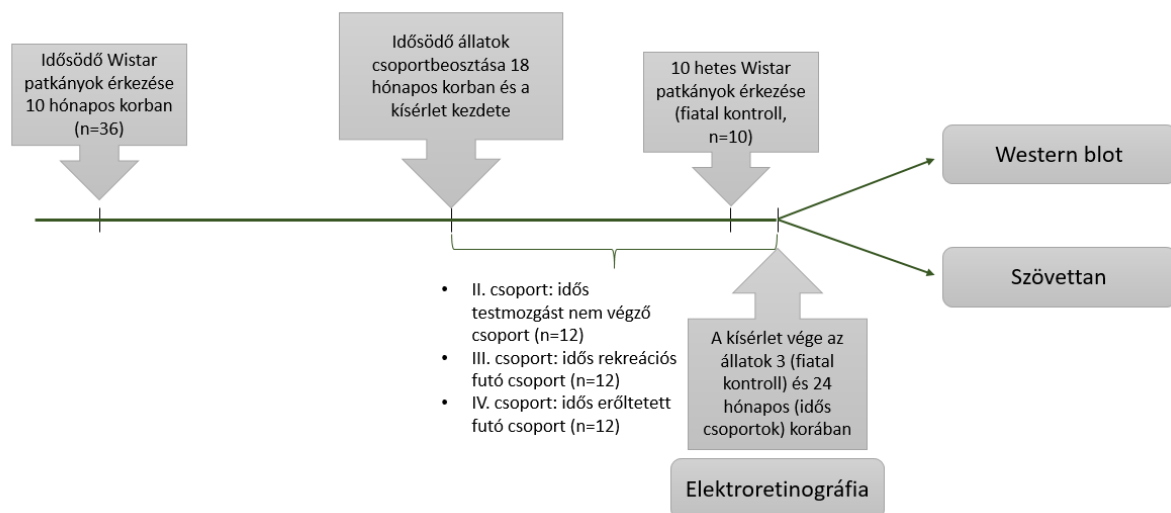
A kísérlet menete a **12. ábrán** látható. A vizsgálatunkhoz az alábbi csoportokat hoztuk létre:

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

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

III. csoport: idősödő önkéntes/rekreációs futó (18 hónapos) (IRF) csoport: futókerékkel ellátott ketrecben lettek elhelyezve, ahol a futókereket önként használhatták (2 db állat/ ketrec, n=12);

IV. csoport: idősödő (18 hónapos) erőltetett futó (IEF) csoport: az állatok 6 nap/hét gyakorisággal végeztek magas intenzitású testmozgást egy zárt futókerékben folyamatos felügyelet mellett (n=12).



13. ábra: A második kísérlet menete

Az erőltetett futást végző állatok esetén ügyeltünk a testmozgás intenzitásának fokozatos emelésére, hogy elkerüljük az esetleges sérüléseket. Először 5 percig a kikapcsolt állapotú futókerékbe helyeztük őket, hogy megismerkedjenek az eszközzel, majd a készüléket 5 m/perc sebességre állítottuk. Minden nap 0,5 m/perccel növeltük a sebességet, amíg el nem értük az ajánlott 13 m/percet. Amikor az állatok ezt teljesítették, elkezdtük növelni az időt: 1 perccel kezdtük (amíg csak a sebességet növeltük, az állatok csak 1 percig futottak), és a cél az volt, hogy minden nap 1 perccel növeljük a futási időtartamot, amíg el nem érjük a kívánt 20 percet. Minden tréninget naponta egyszer, a reggeli órákban végeztünk el (az állatok számára ez éjszakai időszak kezdete volt).

4.3. Western blot

Mindkét kísérlet lezárása után az állatok szemében lezajló fehérje-expressziós változások feltárása érdekében western blot vizsgálatot végeztünk. Az állatok életének humánus kioltása generál anesztetikum túladagolásával történt. Ezt követően eltávolítottuk a szemgolyókat a

szemüregből és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk (n=5 csoportonként). A fehérjefrakciók kinyeréséhez a szemgolyókat porrá őröltük és elegyítettük homogenizáló pufferrel (25 mM Tris, 25 mM NaCl, 1 mM Na-ortovanadát, 10 mM NaF, 10 mM Na-pirofoszfát, 10 mM okadainsav, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF proteáz inhibitor koktél, desztillált víz - Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország), majd az oldatot késes diszpergátorral (T10 Ultra-Turrax, IKA-WERKE, Staufen, Németország) tovább homogenizáltuk. Az elegyet 2000 rpm fordulatszámon, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk, majd leszívtuk a felülúszót, amely tartalmazta a citoszolikus és mitokondriális frakciókat. A fennmaradó pellet tartalmazta a sejtmagi frakciót, ezt feloldottuk TritonX 100 detergenst (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország) tartalmazó homogenizáló oldatban és 1 órán keresztül jégen inkubáltuk. Ezt követően ismét 10 percig centrifugáltuk a nukleáris frakciót tartalmazó elegyet (14 000 rpm, 4 °C), majd a felülúszóval nyertük ki a sejtmagi fehérjéket tartalmazó oldatot. A citoszol- és mitokondrium-tartalmú felülúszót 20 percig centrifugáltuk (10 000 fordulat/perc 4 °C-on). A felülúszó leszívásával nyertük ki a citoplazmatikus fehérjéket tartalmazó frakciót. Az egyes frakciók felülúszóinak 10-10 µl-éből spektrofotométerrel (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország) megállapítottuk a teljes fehérjekoncentrációt BCA módszer segítségével (QuantiPro BCA Assay Kit, Sigma-Aldrich-Merck KGaA), mely után a felülúszók fennmaradó részét Laemli puffer 1:1 arányban történő (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország) hozzáadásával és 5 perc forralással készítettük elő SDS-poliakrilamid gélelektroforézisre. A szem homogenizátum fehérjéit 12%-os poliakrilamid gélen választottuk el molekulatömegük alapján (áramerősség: 25 mA, felső gél: 5%; alsó gél: 12%, ~220 perc, eszköz: Hoefer miniVe PAGE SE300, Hoefer Inc., Holliston, MA, Egyesült Államok). A poliakrilamid gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra (GE Healthcare, Darmstadt, Németország) transzferáltuk (25 V feszültségen, 90 percig). A membránok szabad kötőhelyeinek blokkolása 3%-os BSA oldatban (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország) történt, majd primer antitesteket tartalmazó TBST oldatba helyeztük őket és egy éjszakán át inkubáltuk folyamatos mozgás mellett.

Az első kísérletünkben használt primer antitestek: (anti-hisztón H3 rekombináns nyúl monoklonális antitest (~17 kDa), Cat#ab1791 Abcam, Cambridge, UK; anti-béta-aktin egér monoklonális antitest, (~42 kDa), Cat#A5316, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Germany; anti-MMP9 nyúl poliklonális antitest (~92 kDa), Cat#ab38898, Abcam, Cambridge, UK; anti-PARP1 poliklonális antitest (~113 kDa), Cat#ab227244, Abcam, Cambridge, UK; GFAP nyúl poliklonális antitest (55, 48 kDa), Cat#ab7260, Abcam, Cambridge, UK; anti-NFκB p65 nyúl poliklonális antitest (~64 kDa) Cat#ab16502, Abcam, Cambridge, UK, anti-HSP70

egér monoklonális antitest (~70 kDa) Cat# SAB4200714, Merck KGaA, Darmstadt, Németország.

A második kísérletünkben alkalmazott antitestek: anti-hisztin H3 rekombináns nyúl monoklonális antitest (~17 kDa), Cat#ab1791 Abcam, Cambridge, UK; anti-béta-aktin egér monoklonális antitest, (~42 kDa) Cat#ab8226 Abcam, Cambridge, UK; anti-BDNF nyúl monoklonális antitest (~15 kDa), Cat#ab108319 Abcam, Cambridge, UK; anti-MAOB monoklonális antitest (~59 kDa), Cat# ab259928 Abcam, Cambridge, UK; GFAP nyúl poliklonális antitest (55, 48 kDa), Cat#ab7260 Abcam, Cambridge, UK; anti-SIRT6 nyúl monoklonális antitest (~39 kDa) Cat# ab191385 Abcam, Cambridge, UK; anti-PARP1 poliklonális antitest (~113 kDa), Cat#ab227244, Abcam, Cambridge, UK; anti-NFκB p65 nyúl poliklonális antitest (~64 kDa) Cat#ab16502, Abcam, Cambridge, UK, anti-SOD1 nyúl poliklonális antitest (~17 kDa), Cat# ab52950, Abcam, Cambridge, UK; anti-HSP70 egér monoklonális antitest (~70 kDa) Cat# SAB4200714, Merck KGaA, Darmstadt, Németország,

Másnap reggel 3X10 percig tartó TBST-vel történő mosási lépésekkel távolítottuk el a membránokról az éjszaka folyamán be nem kötődött primer antitesteket, majd torna-peroxidáz enzimmel konjugált másodlagos (nyúl vagy egér ellenes) antitesteket tartalmazó oldatban inkubáltuk a membránt további 45 percig (egérellenes antitest Cat#A4416; nyúl elleni antitest Cat#A0545; mindkettő Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország). Az inkubáció végén újabb mosási lépések következtek. A keresett fehérjék láthatóvá tételéhez ECL™ Prime™ western blot előhívó folyadékot (Cytiva, Amersham, Egyesült Királyság) és LI-COR C-DiGit® blot szkennert (LI-COR Inc., Lincoln, NE, Egyesült Államok) használtunk. A szkennert a kemilumineszcens fényreakció intenzitását detektálva teszi láthatóvá a csoportok közötti különbségeket. Az elkészült blotok kiértékelését az ImageJ szoftverrel (verzió 1.51, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) végeztük, amellyel először elvégeztük a háttérhez történő normalizálást és egy háztartási fehérjére (hisztin H3 vagy béta-aktin) való standardizálást. Minden kezelési csoportból fehérjénként 5 állat 3 db Western blot eredményét analizáltuk.

4.4. Szövettan

A patkányok humánus gyógyszeres eutanáziája után a szemgolyókat (n=5/csoport) óvatosan kimetszettük a szemüregből, majd szaruhártya felső részét egy ligatura behelyezésével megjelöltük a későbbi pozicionálás céljából. A bulbusokba egy vékony tű segítségével paraformaldehidet fecskendeztünk, hogy biztosítsuk a szem belső részének megfelelő fixálását. Ezt követően a szemgolyókat 24 órára paraformaldehid-oldatba (PFA, pH 7,4, 4%

foszfátpufferben: 10 g paraformaldehid, 50 μ L 10 N NaOH, 25 ml 10X PBS, 200 ml ddH₂O) helyeztük. Másnap a szaruhártyákon bemetszést ejtettünk és a szemeket folyó víz alatt mostuk 1 órán keresztül a PFA megfelelő kimosásának érdekében. Ezután a mintákat 70%-os alkoholba helyeztük. Következő lépésként a mintákat dehidráltuk (70%, 90%, 100% etanol), majd derítettük xilollal és végül paraffinba ágyaztuk (Histowax, Histolab Products AB, Göteborg, Svédország). Az így létrehozott paraffin blokkokból mikrotómmal 4 μ m metszeteket készítettünk. A szegmelyök pozíciója minden esetben megegyező volt: a szegmelyök metszését frontális irányból kezdtük el, a behelyezett ligatúra a blokk felső szélével merőleges szöveget zárt be (ligatúrát eltávolítottuk a pozicionálás után). A szövettani analízist a retina hátsó-alsó szegmensében található vakfolt-közeli metszeten végeztük el. A metszeteket deparaffinizáltuk, majd rehidratáltuk leszálló alkoholsorral, ezt követően hematoxilinnel-eozinnal (H & E) festettük. Ennek első lépéseként a lemezeket 10 percig hematoxilinnel (Gill-típusú, GHS2128, Sigma- Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország) festettük, majd 10 percig folyó vízben mostuk, mialatt a metszetek kékre színeződtek. Ezt követte egy 5 percig tartó festés eozinnal. A képeket a retina alsó látóideg közeli részéről 40x objektíven keresztül Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal készítettük (Nikon Plan Fluor 40/0,75 DIC M/N2 ¥/0,17 WD 0,66). A rögzített képek elemzését és a retinavastagság mérését a Nikon NIS-Elements BR (Ver5.41.00) mikroszkópos szoftverrel végeztük el.

4.5. Statisztika

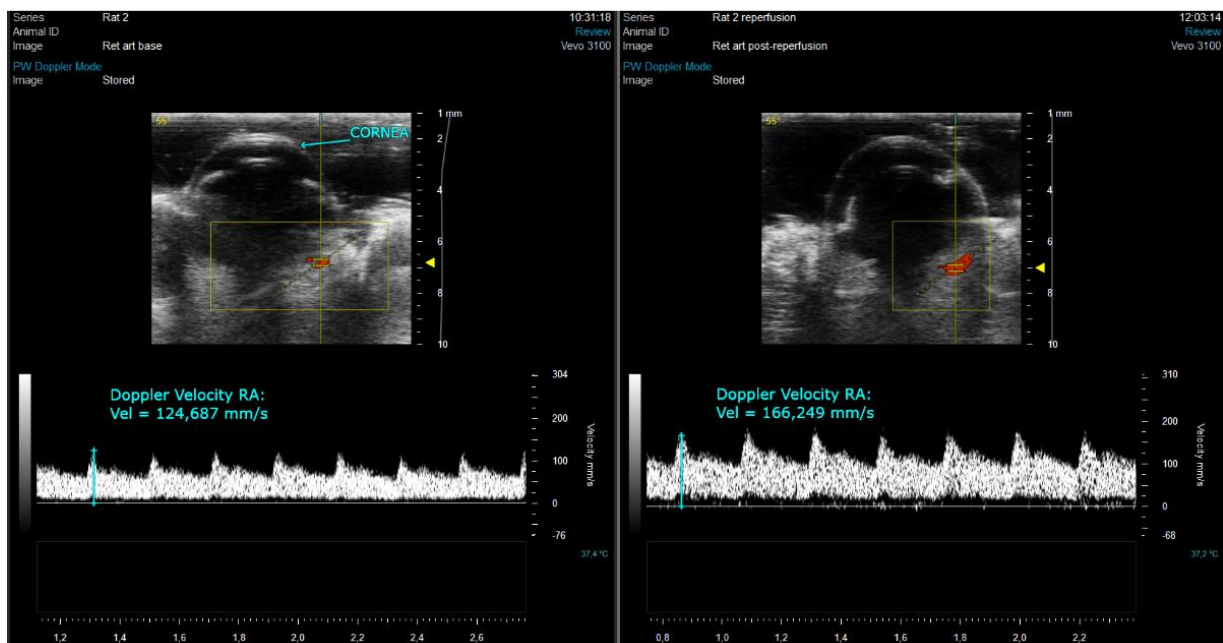
A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism szoftvert (9.1.2-es verzió, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Egyesült Államok) használtunk. A Gauss-eloszlást Shapiro-Wilk normalitástesztel értékeltük. A normál eloszlású adatokat egyutas varianciaanalízissel (ANOVA), míg a nem normál eloszlású adatokat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

5. Eredmények

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

5.1.1. A szem ultrahang vizsgálata

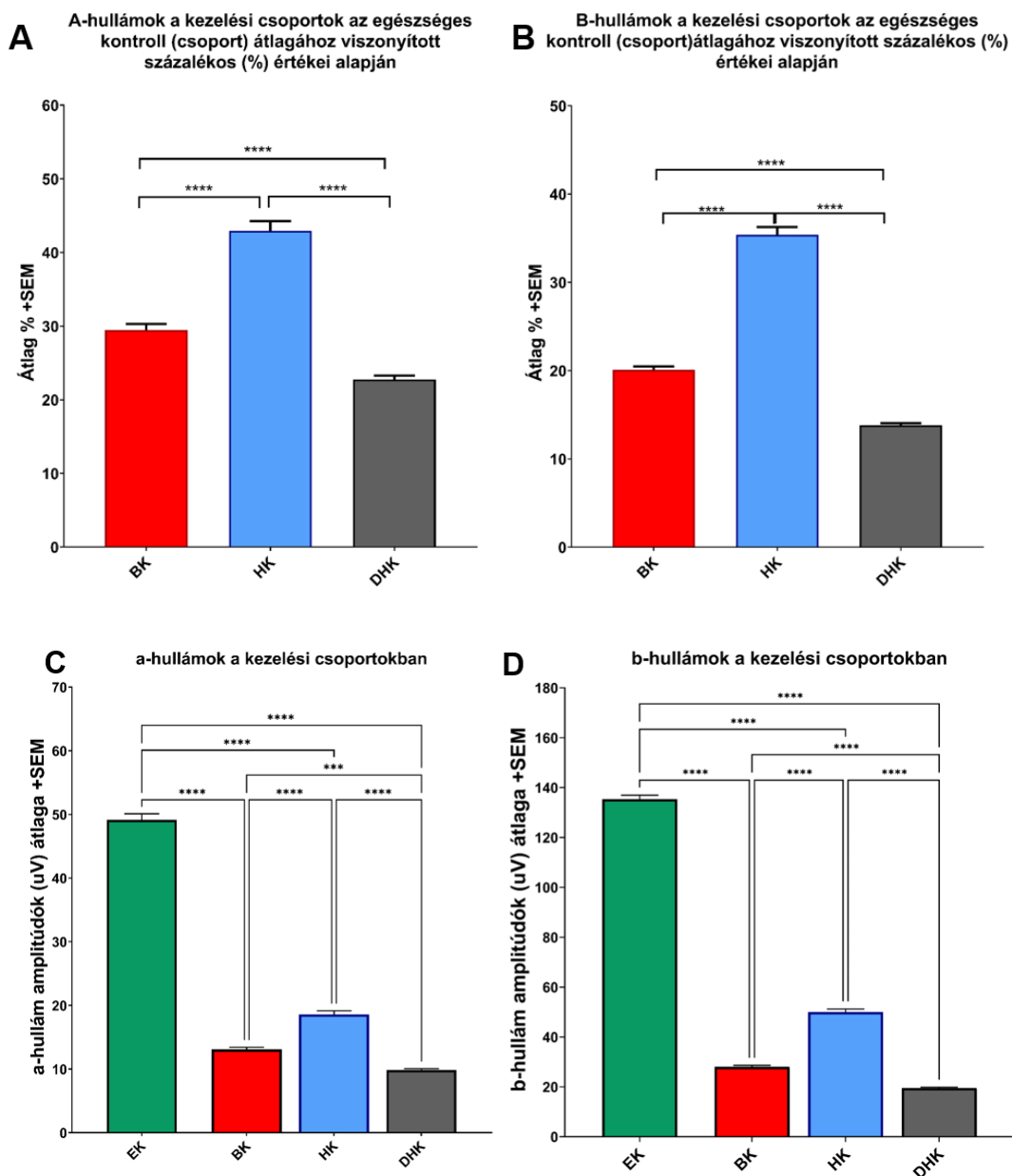
A retina artériás véráramlását, amelyet Color és PW (pulse wave) Doppler echográfiával értékeltünk, helyreállt az iszkémiás periódus után. A ciliáris artériák csúcs véráramlási sebessége 100 és 300 mm/s között változott mind az alap-, mind a reperfúzió utáni fázisokban, ami azt mutatja, hogy a reperfúzió teljes volt a sérülés után (**14. ábra**).



14. ábra: Reprezentatív ultrahangképek, amelyek a szemgolyó vérellátását mutatják az iszkémiát okozó lekötés előtt és után. Sárga négyzet: color doppler detektálási terület. Függőleges sárga vonal, közepén rövid vízszintes párhuzamos sárga vonalakkal: pulzus doppler kapu (a két rövid vízszintes vonal között). Sárga szaggatott keresztvonal: pulzus doppler szöge. Piros: véráramlás a transzducer felé. Kék vonal: a maximális véráramlási sebesség mérőeszköze.

5.1.2. Elektroretinográfia

A retinakárosodás mértékének megítélésére a kezelési csoportokat az egészséges kontroll (EK) (vivőanyaggal kezelt, nem iszkémiás) csoport eredményéhez viszonyítottuk és százalékos arányban adtuk meg az **15. ábra A** és **B** részén látható módon. A legmagasabb százalékos értékeket a harmalinnal kezelt állatok csoportjában figyeltük meg: itt az a-hullámokat $42,92 \pm 1,35$, míg a b-hullámokat $35,38 \pm 0,89$ százalékban határoztuk meg (az egészséges kontroll 100%-os értékéhez viszonyítva), mindkettő szignifikánsan meghaladta ($p < 0,0001$) a kezeletlen (vivőanyaggal kezelt) iszkémiás csoport (BK = beteg kontroll) a- és b-hullám értékeit ($29,49 \pm 0,79$ és $20,08 \pm 0,45$) és DMT és harmalin kezelt csoport (DHK) értékeit ($22,76 \pm 0,52$ és $13,82 \pm 0,24$). A DHK csoportban az a- és b-hullámok százalékos értéke nem érte el a BK állatok értékét és szignifikáns különbség volt kimutatható ($22,76 \pm 0,52$ és $13,82 \pm 0,24$ vs. $29,49 \pm 0,79$ és $20,08 \pm 0,45$; $p < 0,0001$) (lásd **15. ábra A**, és **B**). A **2. ábra C** és **D** részén látható grafikonok mikrovoltban mutatja az a- és b-hullám amplitúdók abszolút értékeit, beleértve a kezeletlen nem iszkémiás (EK) csoportot is.



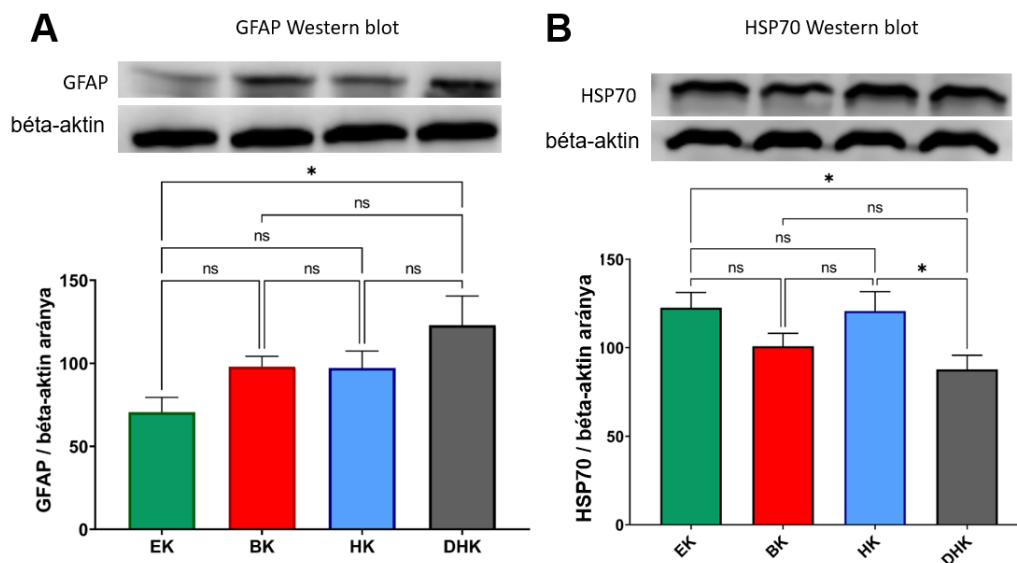
15. ábra: Elektroretinográfiai eredmények. (A): a-hullámok a kezeletlen, nem IR a-hullámok csoportátlagának százalékában kifejezve. (B): b-hullámok a kezeletlen, nem IR b-hullámok csoportátlagának százalékában kifejezve. (C): az IR a-hullámok és a kezeletlen, nem IR a-hullám abszolút értékei μV -ban kifejezve. (D): az IR b-hullámok és a kezeletlen, nem IR b-hullám abszolút értékei μV -ban kifejezve. Az összes eredmény átlag + SEM formában van ábrázolva. *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

5.1.3. Western Blot

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

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

A HSP70 fehérje expressziója is különbségeket mutatott a kezelési csoportok között. Szignifikáns eltérést találtunk az EK és a DHK csoportok között, valamint a HK és a DHK csoportok között is ($122,6 \pm 8,638$ vs. $87,72 \pm 7,993$, $p < 0,05$ és $120,7 \pm 10,92$ vs. $87,72 \pm 7,993$, $p < 0,05$, az EK vs. DHK, valamint a HK vs. DHK csoportok esetében). Bár a BK csoport látszólag alacsonyabb értéket mutatott ($100,9 \pm 7,191$), mint az egészséges kezeletlen csoport, ez a különbség nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. Az EK és a HK csoportok között nem volt statisztikailag kimutatható szignifikáns különbség ($p > 0,05$) **(16. ábra/B)**.

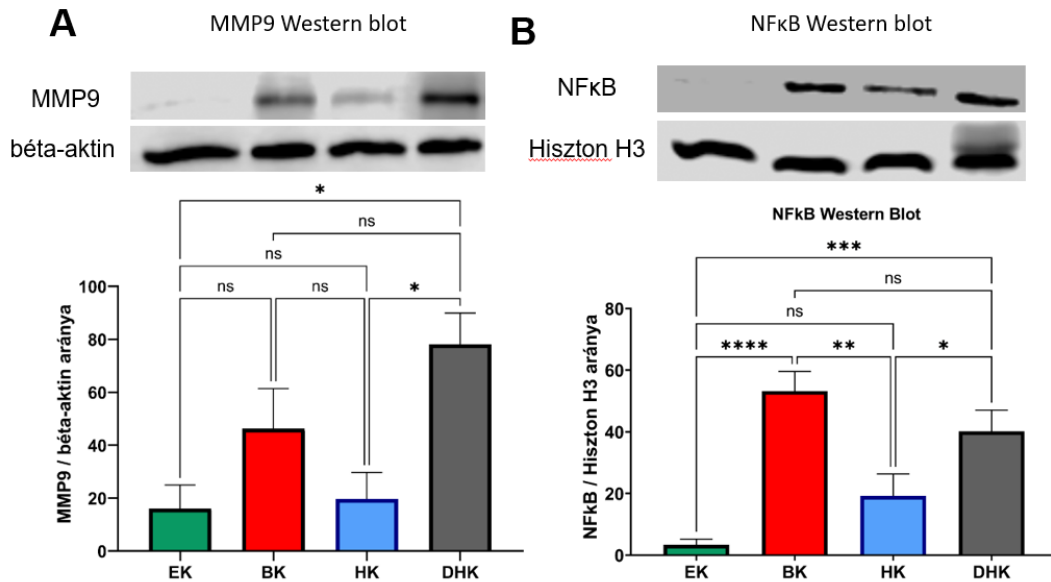


16. ábra: Western blot eredmények. (A): A glia fibrilláris savas fehérje (GFAP) expressziós szintjei a különböző csoportokban. (B): A 70kDa molekulatömegű hő sokkfehérje (HSP70) expressziós szintjei a különböző csoportokban (EK=egészséges kontroll, BK=beteg kontroll, HK=harmalinnal kezelt, DHK=DMT+harmalin kezelt). Az összes eredmény százalékos átlag + SEM formában van ábrázolva. ns = nem szignifikáns; * = $p < 0,05$.

Az MMP9 esetében a fehérjék szintje ellentétesen változott a HSP70-hez viszonyítva. Szignifikáns eltérést tapasztaltunk az EK és a DHK csoportok, valamint a HK és a DHK csoportok összehasonlításában ($16,11 \pm 8,909$ vs. $78,08 \pm 11,85$, $p < 0,05$ és $19,79 \pm 9,925$ vs. $78,08 \pm 11,85$, $p < 0,05$, az EK vs. DHK, valamint a HK vs. DHK csoportok esetében). A fehérjeszint alacsonyabb volt az EK és a HK csoportokban, míg növekedett a BK és a DHK csoportokban. Az EK és a HK csoportok MMP9 expressziója hasonlóan alacsony volt, közöttük szignifikáns különbség nem volt kimutatható, valamint a látszólag magasabb MMP9 expressziót mutató BK csoport értéke sem tért el szignifikánsan ($16,11 \pm 8,909$, $19,79 \pm 9,925$ és $46,30 \pm 15,06$ az EK, HK és BK csoportok esetében; $p > 0,05$ mindegyik összehasonlításban) (17. ábra/A).

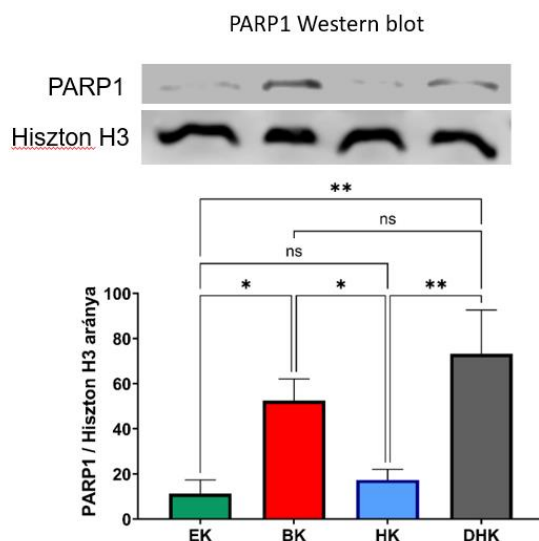
Hasonló tendenciát figyeltünk meg az NF κ B fehérjeexpressziós profiljában is a western blot analízis alapján: az NF κ B p65 fehérje esetében a BK csoport szignifikánsan különbözött mind az EK, mind a HK csoportoktól ($53,21 \pm 6,409$ vs. $3,350 \pm 1,850$, $p < 0,0001$, és $53,21 \pm 6,409$ vs. $19,19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

csoportok szintjeinél ($40,19 \pm 6,864$ vs. $19,19 \pm 7,140$, $p < 0,05$ és $40,19 \pm 6,864$ vs. $3,350 \pm 1,850$, $p < 0,001$ a DHK vs. HK és a DHK vs. EK csoportok esetében). Nem volt statisztikai különbség az EK és a HK ($3,350 \pm 1,850$ vs. $19,19 \pm 7,140$) valamint a BK és DHK ($53,21 \pm 6,409$ vs. $40,19 \pm 6,864$) csoportok között sem (**17. ábra/B**).



17. ábra: Western blot eredmények. (A): Az MMP9 (mátrix metalloproteináz 9) expressziós szintjei a különböző csoportokban. (B): Az NFκB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) p65 alegységének expressziós szintjei a különböző csoportokban. Az összes eredmény százalékos átlag + SEM formában van ábrázolva. ns = nem szignifikáns; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

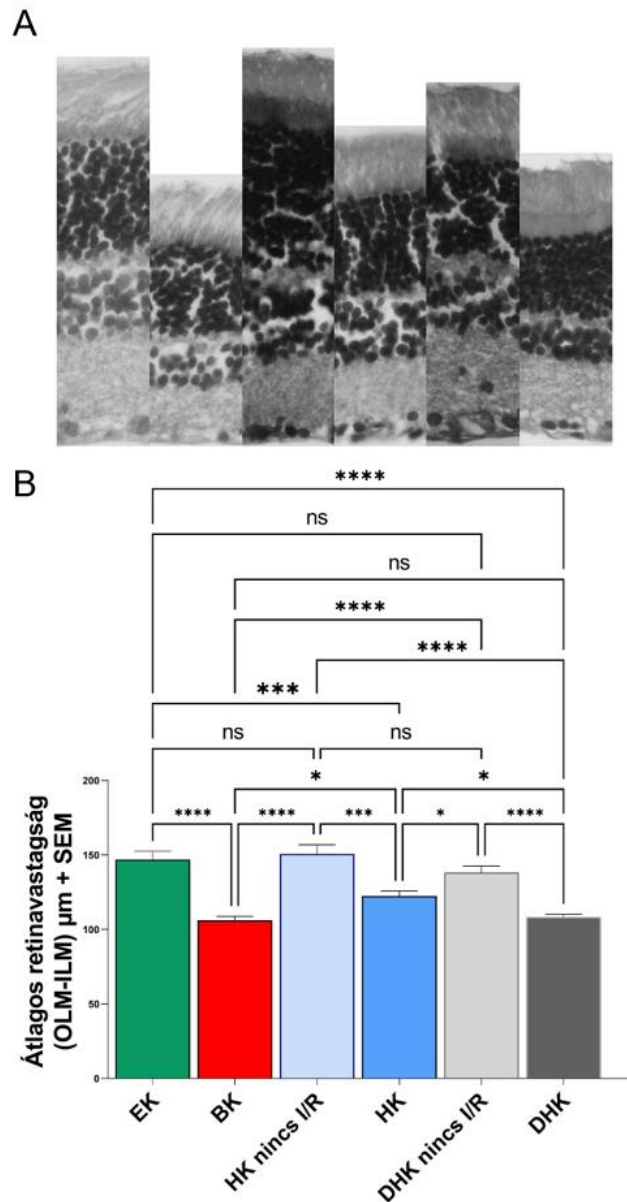
Hasonlóképpen, a poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) 1 fehérje szintjei is magasabbak voltak a BK és a DHK csoportokban ($52,47 \pm 9,597$ és $73,26 \pm 19,42$), míg az EK és a HK csoportokban alacsonyabbak voltak ($11,22 \pm 6,145$ és $17,41 \pm 4,640$). Nem voltak statisztikailag szignifikáns különbségek az előbb említett csoportpárok között ($p > 0,05$ mind a BK vs. DHK, mind az EK vs. HK összehasonlításokban). Ezzel ellentétben a különbségek szignifikánsnak bizonyultak az EK és a BK ($p < 0,05$), a BK vs. HK ($p < 0,05$), a HK vs. DHK ($p < 0,01$), valamint a DHK vs. EK ($p < 0,01$) összehasonlításokban (**18. ábra**).



18. ábra: Western blot eredmények: A poli-ADP-ribóz-polimeráz (PARP1) expressziós szintjei a különböző csoportokban. Az összes eredmény százalékos átlag + SEM formában van ábrázolva. ns = nem szignifikáns; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

5.1.4. Szövettan

A hisztológiai eredmények alapján (**19. ábra**) jelentős eltérések voltak a teljes retina vastagságban a különböző csoportok között. A kontrollcsoport (BK) esetében az iszkémiareperfüziós károsodást szenvedett retina vastagsága szignifikánsan csökkent a megfelelő nem-iszkémiás (EK) értékhez képest ($106,2 \pm 2,608 \mu\text{m}$ vs. $147,0 \pm 5,394 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$). Ugyanez a szignifikáns különbség figyelhető meg a két kezelt csoportban is: az I/R károsodott retina vastagsága csökkent a nem-iszkémiás értékekhez képest ($108,5 \pm 1,716 \mu\text{m}$ vs. $138,2 \pm 4,382 \mu\text{m}$, illetve $122,5 \pm 3,267 \mu\text{m}$ vs. $150,6 \pm 6,283 \mu\text{m}$ a DHK és a HK csoportok esetében; $p < 0,0001$ mindkét összehasonlításban). Ha összehasonlítjuk a különböző kezelési csoportok nem-iszkémiás értékeit, nem tapasztalható szignifikáns eltérés közöttük ($138,2 \pm 4,382$ vs. $150,6 \pm 6,283$ vs. $147,0 \pm 5,394 \mu\text{m}$ a DHK, a HK és a EK esetében). Az iszkémiás csoportok retinavastagságai között szignifikáns különbségeket tapasztaltunk: a HK állatok retinavastagsága szignifikánsan nagyobb volt, mint a DHK és BK csoportokban mért átlag ($122,5 \pm 3,267 \mu\text{m}$ vs. $106,2 \pm 2,608 \mu\text{m}$ és $108,5 \pm 1,716 \mu\text{m}$ a HK vs. BK és a DHK csoportok esetében; $p < 0,05$ mindkét összehasonlításban). Nem voltak statisztikailag jelentős eltérések a DHK és a BK csoport értékei között ($106,2 \pm 2,608 \mu\text{m}$ vs. $108,5 \pm 1,716 \mu\text{m}$ a DHK és BK csoport esetében; $p > 0,05$).



19. ábra: Retina vastagsága a különböző kezelési csoportokban. (A): Reprezentatív képek a retina vastagságáról a különböző kezelési csoportokban, amelyeket mikroszkóp alatt rögzítettünk a hisztológiai elemzés során. (B): A retina vastagságának csoportátlaga, amelyet a különböző kezelési csoportok metszetein mértünk a szövettani elemzés során. A metszetek és a grafikonok sorrendje azonos. Az összes eredmény átlag vastagság (μm) + SEM formában van ábrázolva. ns = nem szignifikáns; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

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

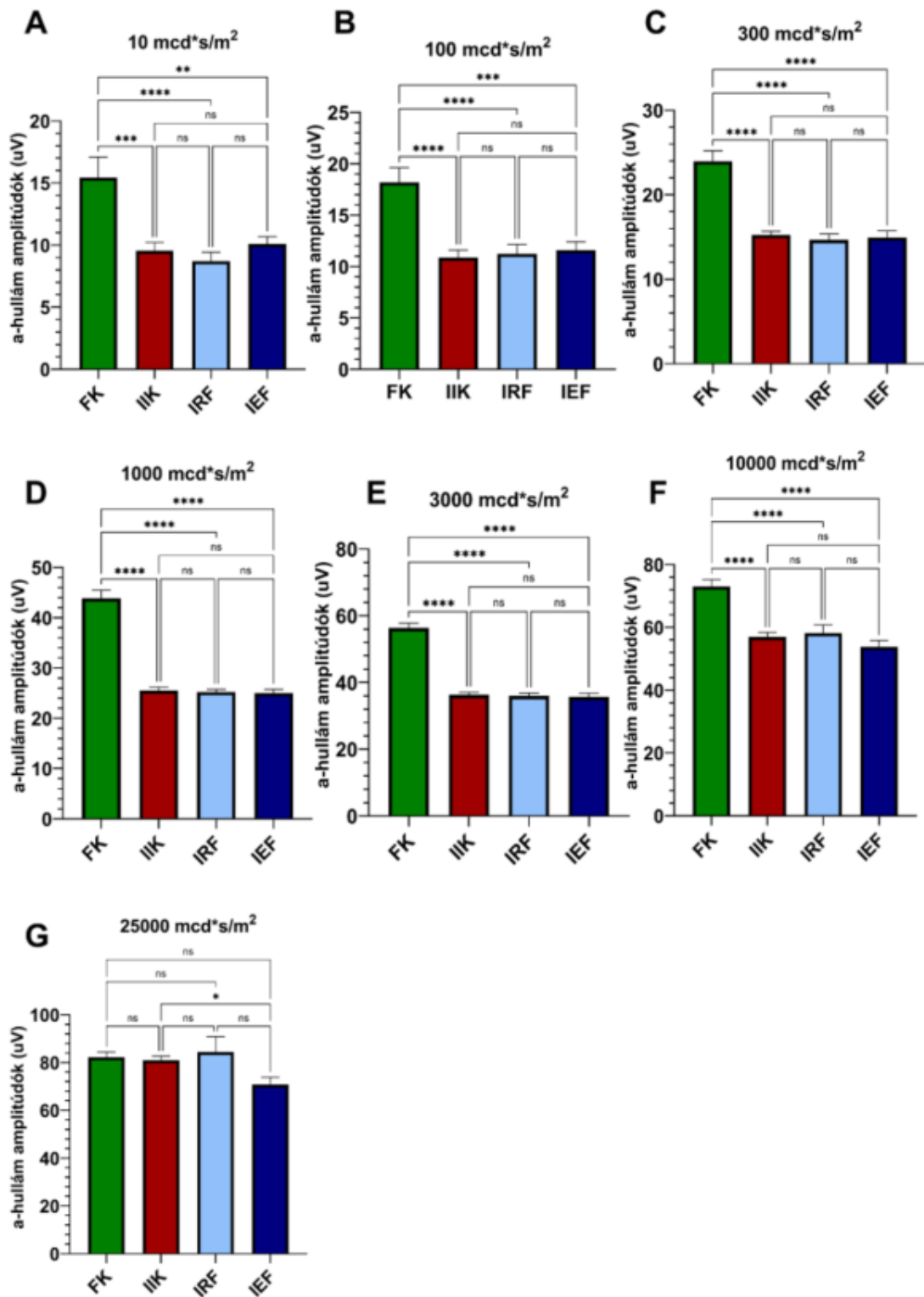
5.2.1. Elektroretinográfiás eredmények

A fiatal (nem futó) kontroll csoport (FK) csoport szignifikánsan magasabb a-hullám amplitúdókat mutatott az idősebb csoportokhoz képest szkotopiás mérés esetén. A három idős eltérő aktivitású csoport a-hullám amplitúdói között nem volt szignifikáns különbség, kivéve magas, 25,000 mcd·s/m² fényintenzitás mellett, ahol az idős, erőltetett futó (IEF) csoportban szignifikánsan alacsonyabb a-hullám amplitúdó volt megfigyelhető **(20. ábra)**.

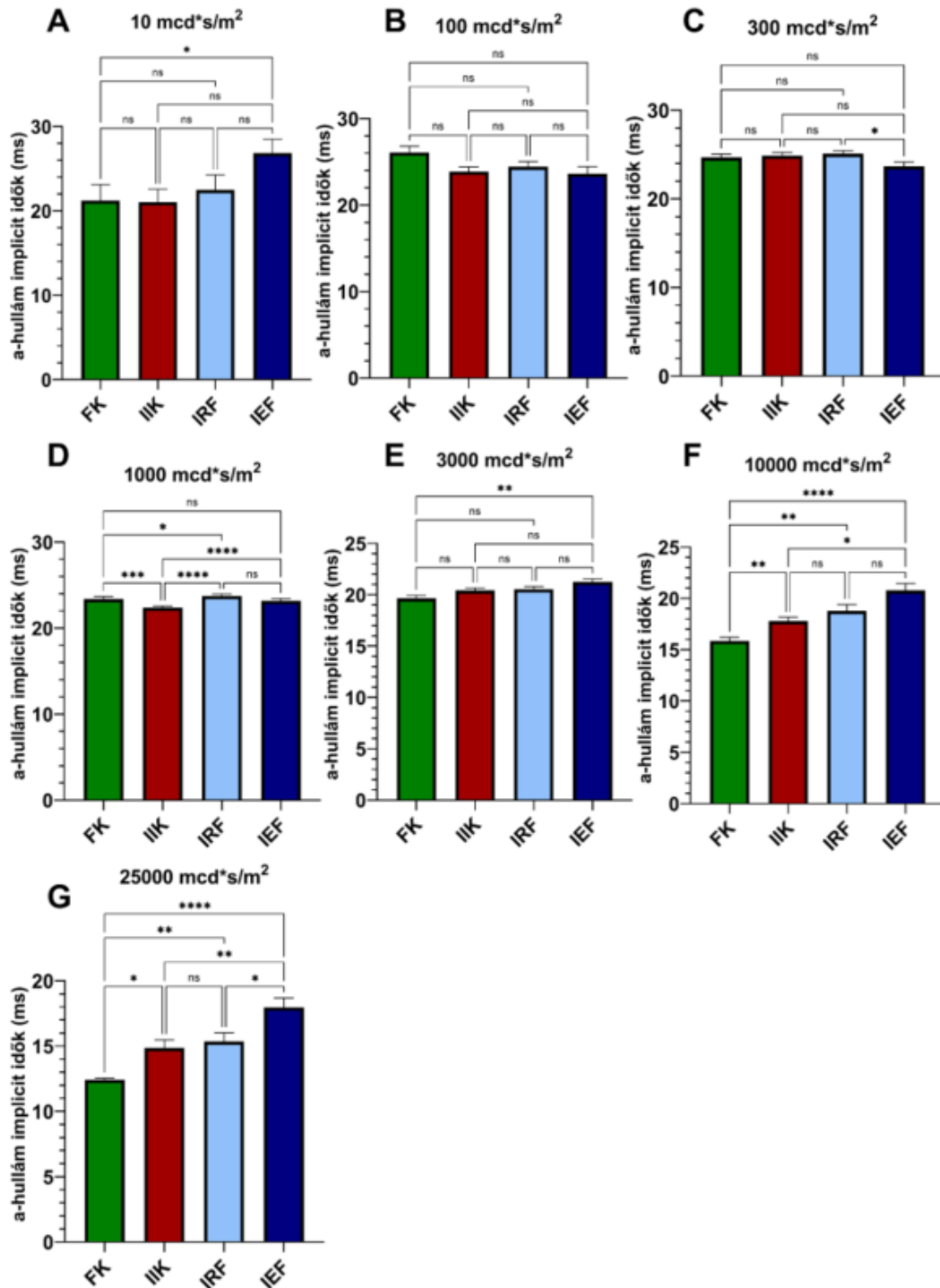
Az a-hullám implicit idők tekintetében elmondhatjuk, hogy alacsony (10mcd*s/m²) és kifejezetten magas (10000, 30000 mcd*s/m²) fényintenzitás esetén láthatunk kifejezett különbséget a csoportok között. Az a-hullámok implicit ideje jelentősen meghosszabbodott az IEF csoportban, az FK és a többi idős csoporthoz viszonyítva **(21. ábra)**. Magas fényintenzitás mellett nem csak az erőltetett futó csoportban, hanem az idős inaktív kontroll (IIK) valamint az idős rekreációs futó (IRF) csoportban is láthatunk implicit idő megnyúlást a fiatal kontroll csoporthoz képest.

Alacsony intenzitású szkotopikus körülmények között az FK csoport b-hullám amplitúdói szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint az idősebb csoportoké. Ez a különbség csökkent, és végül átfordult a magasabb fényintenzitás esetén és a fotopikus mérések során. Az idősebb csoportok között az IRF csoport következetesen magasabb b-hullám amplitúdókat mutatott mint az IIK csoport és az IEF csoport a szkotopikus mérések során **(22. ábra)**. Ez a különbség nem volt látható fényadaptáció után, fotopikus mérések esetén.

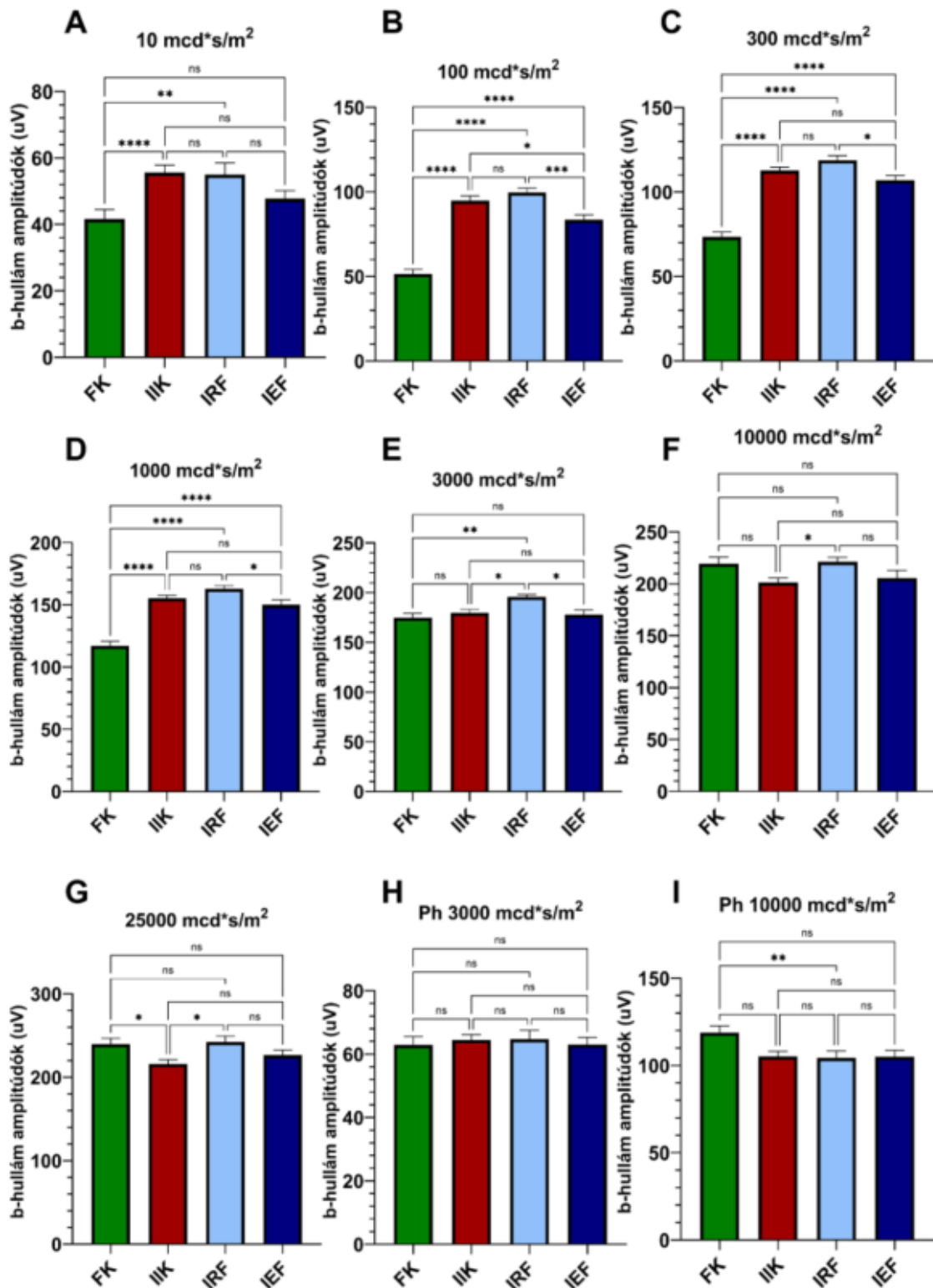
A fiatal kontroll csoport b-hullám implicit ideje szignifikánsan rövidebb volt, mint az idősebb csoportoké **(23. ábra)**.



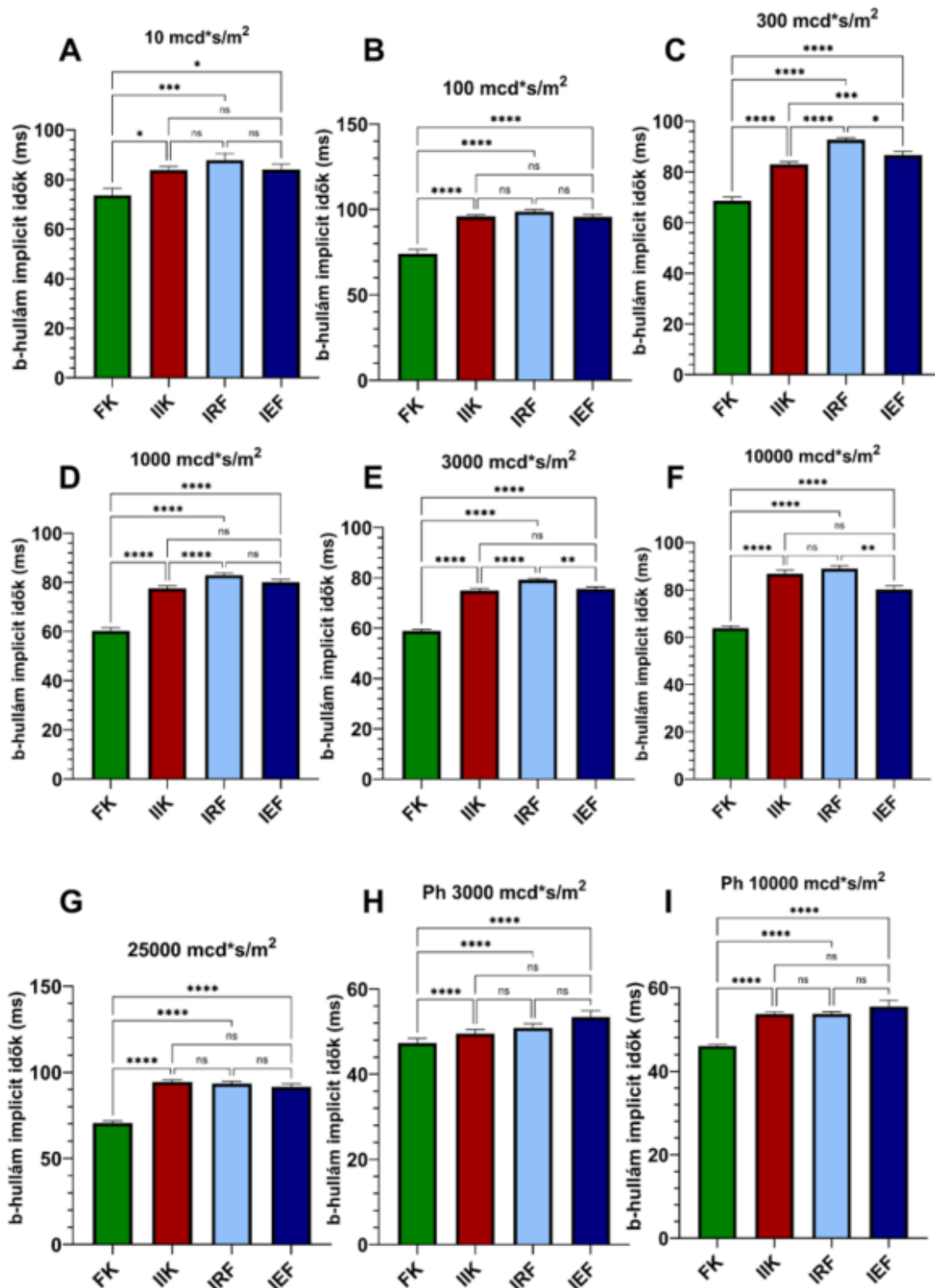
20. ábra: Elektroretinográfias eredmények: a-hullám amplitúdók eltérő fényintenzitás mellett. Az amplitúdók μV -ban vannak kifejezve. A grafikon a csoportátlagokat + az átlag standard hibáját (standard error of the mean = SEM) ábrázolja. ns = nem szignifikáns; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$



21. ábra: Elektroretinográfias eredmények: a-hullám implicit idők eltérő fényintenzitás mellett. Az implicit idők ms-ban vannak kifejezve. A grafikon a csoportátlagokat + az átlag standard hibáját (standard error of the mean = SEM) ábrázolja. ns = nem szignifikáns; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ **** = $p < 0,0001$



22. ábra: Elektroretinográfiás eredmények: b-hullám amplitúdók eltérő fényintenzitás mellett. Az amplitúdók μV -ban vannak kifejezve. A grafikon a csoportátlagokat + az átlag standard hibáját (standard error of the mean = SEM) ábrázolja. ns = nem szignifikáns; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$



23. ábra: Elektroretinográfiás eredmények: b-hullám implicit idők eltérő fényintenzitás mellett. Az implicit idők ms-ban vannak kifejezve. A grafikon a csoportátlagokat + az átlag standard hibáját (standard error of the mean = SEM) ábrázolja. ns = nem szignifikáns; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; **** = $p < 0.0001$

5.2.2. A második kísérlet western blot eredményei

Szignifikánsan megemelkedett MAO-B szintet detektáltunk az IIK és az IEF csoportokban az FK és az IRF csoportokhoz képest ($60,08 \pm 7,314$ és $69,17 \pm 5,032$ vs. $23,39 \pm 4,938$ és $35,98 \pm 6,74$, $p < 0,05$). Az FK és IRF csoportok eredményei között nem volt szignifikáns különbség ($23,39 \pm 4,938$ vs. $35,98 \pm 6,74$; $p > 0,05$) (**24. ábra/A**).

A GFAP fehérje expressziója jelentősen emelkedett volt az IIK és az IEF csoportokban az FK csoporthoz képest ($107,9 \pm 7,929$ és $119,8 \pm 8,034$ vs. $62,7 \pm 6,644$; $p < 0,001$ és $p < 0,0001$), míg az IRF csoport GFAP szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az IEF csoporté ($89,05 \pm 6,185$ vs. $119,8 \pm 8,034$; $p < 0,05$) (**24. ábra/B**).

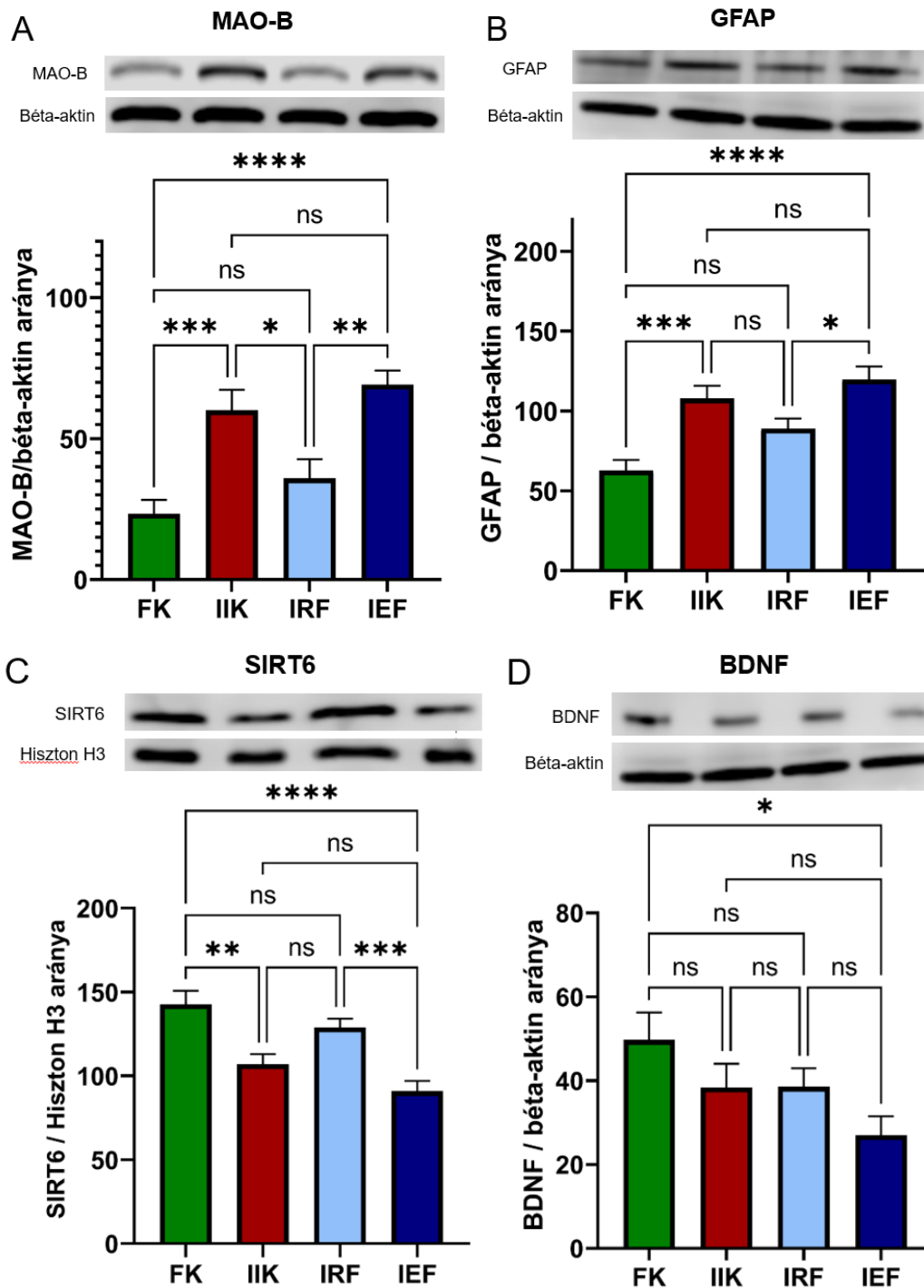
Jelentősen alacsonyabb SIRT6 expressziót figyeltünk meg az IIK és az IEF csoportokban az FK csoporthoz képest ($103,8 \pm 6,455$ és $89,51 \pm 5,9$ vs. $134,6 \pm 10,88$; $p < 0,01$ és $p < 0,0001$). Az IRF csoport SIRT6 szintje közelebb állt az FK csoportéhoz ($122,2 \pm 8,278$ vs. $134,6 \pm 10,88$; $p > 0,05$) (**24. ábra/C**).

A BDNF expressziója jelentősen csökkent az IEF csoportban az FK csoporthoz képest ($27,01 \pm 4,476$ vs. $49,73 \pm 6,539$; $p < 0,05$). Az IRF csoport viszont nem mutatott szignifikáns különbségeket sem az FK, sem az IIK csoportokhoz képest ($38,54 \pm 4,392$ vs. $49,73 \pm 6,539$ és $38,36 \pm 5,65$; $p > 0,05$) (**24. ábra/D**).

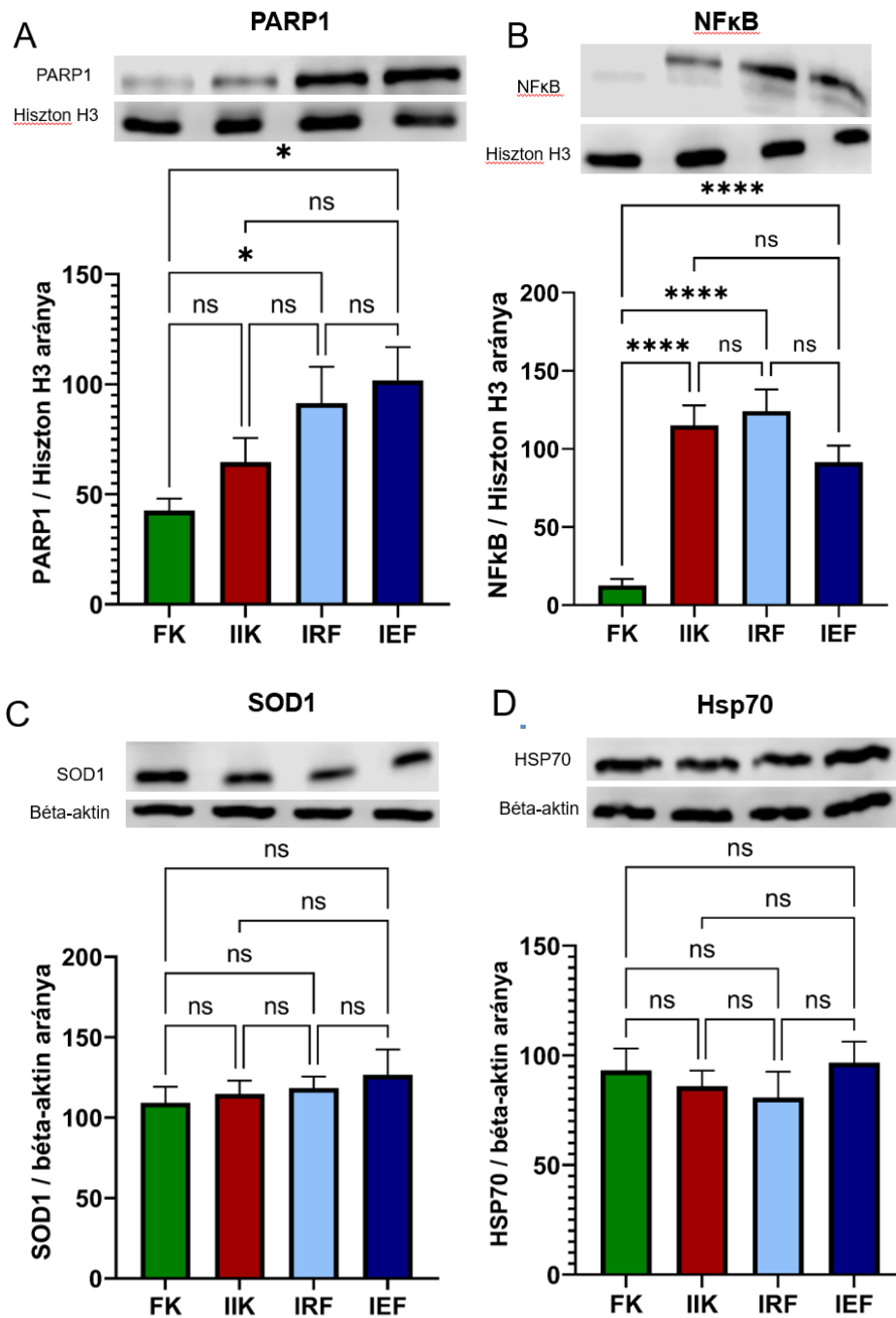
A PARP1 expressziója szignifikánsan magasabb volt a testmozgást végző idős csoportok (IRF és IEF), mint az FK állatok szemében ($91,34 \pm 16,52$, $101,9 \pm 15,01$ vs. $42,57 \pm 5,45$, $p < 0,05$), míg az IIK csoport eredménye ($64,61 \pm 10,92$) nem különbözött tőle (**25. ábra/A**).

Második kísérletünkben az NF κ B expresszió hasonló mintázatot mutatott, mint a PARP1: az idős csoportok között nem volt szignifikáns különbség, azonban az FK csoporthoz képest az idős állatokban szignifikánsan magasabb volt az NF κ B kifejeződése ($114,9 \pm 12,92$, $124,1 \pm 13,93$, $91,47 \pm 10,58$ vs. $12,59 \pm 4,06$, IIK, IRF, IEF vs. FK csoportok összehasonlítása, $p < 0,0001$) (**25. ábra/B**).

Megvizsgáltuk a SOD1 illetve a HSP70 fehérjék expresszióját is a szemben. A kísérlet eredménye alapján sem az életkor, sem a testmozgás nem befolyásolta ezen fehérjék expresszióját a szemben: a csoportok között nem volt kimutatható szignifikáns eltérés (**25. ábra/ C és D**).



24. ábra: Western blot eredmények: A: MAO-B; B: GFAP; C: SIRT6; és D: BDNF fehérjék expressziós szintjei a különböző csoportokban. A fehérjék a grafikon Y tengelyén megnevezett háztartási fehérjére vannak standardizálva. FK – fiatal kontroll, IIK – idős inaktív kontroll, IRF – idős rekreációs futó, és IEF – idős, erőltetett futó (n=5 mindegyikben). Az összes eredmény százalékos átlag + SEM formában van ábrázolva. ns = nem szignifikáns; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

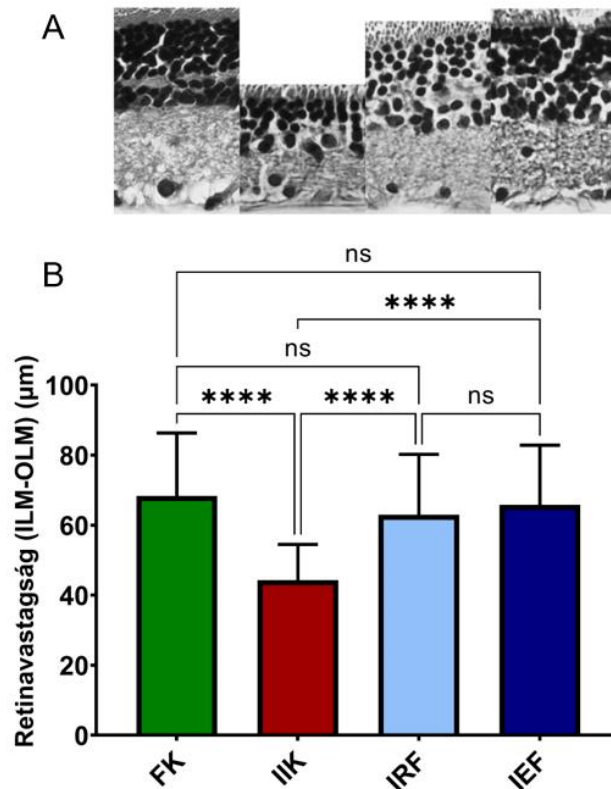


25. ábra: Western blot eredmények: A: PARP1; B: NFκB; C: SOD1; és D: Hsp70 fehérjék expressziós szintjei a különböző csoportokban. A fehérjék a grafikon Y tengelyén megnevezett háztartási fehérjére vannak standardizálva. FK – fiatal kontroll, IIK – idős inaktív kontroll, IRF – idős rekreációs futó, és IEF – idős, erőltetett futó (n=5 mindegyikben). Az összes eredmény százalékos átlag + SEM formában van ábrázolva. ns = nem szignifikáns; * = $p < 0,05$; **** = $p < 0,0001$.

5.2.3. Szövettan

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

Ezzel szemben, a két eltérő intenzitású mozgást végző csoport összehasonlításakor nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a retina vastagságában, továbbá nem különböztek szignifikánsan az FK csoportban mért átlagtól. AZ FK csoport retina vastagsága $68,32 \pm 3,282$, az IRF csoportban mért átlag $62,95 \pm 3,056 \mu\text{m}$, az IEF csoportban pedig $65,77 \pm 3,013 \mu\text{m}$ volt (26. ábra).



26. ábra: A retina vastagságának összehasonlítása a kezelési csoportok között. A) Reprezentatív mikroszkópos felvételek B) A retina vastagságának adatai a különböző kezelési csoportokban az inner és outer limiting membrane (ILM, OLM; belső és külső határhártya) közötti mérések alapján, a hibásávok pedig az átlag standard hibáját (SEM) jelzik. FK – fiatal kontroll, IIK – idős inaktív kontroll, IRF – idős rekreációs futó, és IEF – idős, erőltetett futó ($n = 6$ mindegyikben). ns = nem szignifikáns; **** = $p < 0,0001$.

6. Megbeszélés

Az öregedés egy elkerülhetetlen és visszafordíthatatlan folyamat, amely az egyén szervezetében típusos változásokat indít el a biológiai funkciók és a fizikai megjelenés terén is (124). Az öregedéshez társuló jellegzetes fenotípus sokrétű, egymással összefüggő folyamatok eredménye, mely magában foglalja a testösszetétel változásait, az energiatermelés és -felhasználás közötti egyensúlyvesztést, a homeosztázis diszregulációját, neuroplaszticitás csökkenését valamint a neurodegenerációt. Jelen tudásunk szerint a folyamat egyik alappillére a stresszhatások és az azt semlegesítő (puffer) mechanizmusok közötti kiegyenlítetlenség, mely a kompenzációs mechanizmusok és tartalékok kimerülésével jár együtt. Ennek következményeként a szervezet védtelenné válik a káros hatásokkal szemben, ami így halmozott károsodáshoz vezet. (26). A csökkent gyógyulási képesség és az antioxidáns rendszer elégtelensége időskorban a látószervben is megjelenik (125). Az érzékszerveink közül a látás által jut a legtöbb információ a központi idegrendszerbe (5). A retina épsége és megfelelő működése kulcsszerepet játszik a látásélesség fenntartásában, azonban az ideghártya életünk során folyamatosan környezeti stresszhatásoknak van kitéve. Az állandó fényexpozíció hosszútávon kumulatív retinakárosodást eredményezhet, amely felgyorsítja az egészséges öregedési folyamatot (7).

A kor előrehaladtával megnő a szembetegségek incidenciája. Az életminőség-romlással járó látásvesztés minden ötödik 80 év feletti egyént érinti, ami izolációhoz és a demencia fokozott kockázatához vezethet (4). Munkacsoportunk fő célkitűzése olyan preventív terápiás lehetőség feltárása volt, amellyel megelőzhetővé vagy késleltethetővé válnának az időskorral társuló szembetegségek. Ezen intervenciók hatékonyságát funkcionális, morfológiai és molekuláris vizsgálatok elvégzésével támasztottuk alá. Emellett olyan molekuláris útvonalak feltárását terveztük, amelyek farmakológiai befolyásolása terápiás hatással bírhat az öregedéssel társuló kórállapotok kezelésében.

Első kísérletünkben a tradicionális ayahuasca főzet két komponensének a DMT-nek és a harmalinnak a hatásait vizsgáltuk a szem iszkémia-reperfúziós károsodásában. A retina degeneratív folyamatai hatékonyan nyomon követhetők az ERG segítségével, amely egy nem invazív diagnosztikai technika, és részletes betekintést nyújt a retinális sejtek funkcionális állapotába. Az ERG első, negatív komponense – az a-hullám – a fotoreceptorok aktivitását jelzi, amelyek felelősek a fény elektromos impulzusokká történő átalakításáért (42). Az ERG második kitérése pozitív irányú, mely elsősorban az ON-bipoláris és más, a fotoreceptorokat

követő, tehát posztszinaptikusan elhelyezkedő sejtek által generált áramok eredménye. Ezt nevezzük b-hullámnak (35, 42).

Első kísérletünk eredménye azt mutatja, hogy a harmalinnal kezelt (HK) állatoknál mérhető a legnagyobb a-és b-hullám amplitúdó valamint ebben a csoportban volt a legmegőrzöttebb a retina vastagsága az I/R csoportok között. Ezzel szemben DMT és a harmalin (DHK csoport) együttes adása káros hatással volt a látószervre, az a-és b-hullámok amplitúdója nem érte el a kezeletlen iszkémiás állatoknál meghatározott csoportátlagot (**15. ábra**). Hogy magyarázatot találjunk erre a meglepő eredményre több olyan fehérje kifejeződését vizsgáltuk a szemben, amelyeknek fontos szerepe van a sejthalálban (PARP1), a gyulladásban (NF κ B, GFAP), a szöveti pusztulásban és átalakulásban (MMP9) és a sejtek homeosztázisának fenntartásában (HSP70).

A poli-ADP-ribóz-polimeráz 1 (PARP1), fontos szabályozója számos sejtfunciónak, mint amilyenek a sejtproliferáció, differenciálódás, sejthalál, a gyulladásos válasz és a mitokondriális funkció (63). Habár a PARP1 fokozott expressziója protektív faktor lehet pl. öregedésben a DNS-javításban betöltött szerepe miatt, túlműködése egy speciális programozott sejthaláltípushoz vezethet, amely - több tanulmány szerint - jelentős szerepet játszhat a retina károsodásában, az örökletes retinabetegségekben, az időskori makuladegenerációban és a szem iszkémia-reperfúziós károsodásában (64, 67). Vizsgálatunkban a HK csökkentette a PARP1-expressziót a szemben a BK és a DHK csoportokhoz képest, ami hozzájárulhat a harmalin retinoprotektív hatásához (**18. ábra**). Hasonlóképpen, számos publikációban beszámoltak arról, hogy a PARP1 inhibíció csökkenti a mikroglia aktivációt és a következményes gyulladásos választ, ezzel mérsékelve a neuronkárosodást (126).

A PARP1 továbbá fokozza a központi idegrendszer immunsejtjeinek aktiválódását, és befolyásolja számos transzkripciófaktor, köztük az NF- κ B, a p53 és az AP-1 expresszióját, amelyek részt vesznek a gyulladásos válaszban és a szövetek regenerációjában (127). Az NF κ B útvonal aktivációja sorsdöntő a sejtek túlélése szempontjából, mivel részt vesz az apoptózis, a proliferáció, sejt túlélés szabályozásában. Az NF κ B útvonal ezen hatások miatt fontos szerepet játszik számos neurodegeneratív betegség patomechanizmusában (72). A szakirodalmi adatoknak megfelelően az I/R károsodás megnövelte az NF κ B p65 alegység szintjét a szemben kísérletünkben is. A harmalin megakadályozta a NF κ B p65 fokozott expresszióját, ami arra utalhat, hogy a harmalin mérsékelte az I/R által kiváltott gyulladásos kaskádót. A gyulladáscsökkentő hatás retinoprotektív lehet, melyet az ERG vizsgálat is alátámasztott a HK csoportban. Meglepő módon ha a DMT-t harmalinnal kombináltuk (DHK), akkor nem volt megfigyelhető csökkenés az NF κ B expresszióban a beteg kontroll csoporthoz képest, ami arra

utal, hogy a DMT együttes adása ellensúlyozta a harmalin protektív potenciálját (**17. ábra/B**). Ennek oka lehet a DHK csoportban megfigyelt magasabb PARP1 szint a HK és a BK csoportokhoz képest, bár ez utóbbi összehasonlítás nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget.

A PARP1 az NF κ B aktiváló hatása mellett a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) stimulálásával hozzájárulhat a vér-retina gát károsodásához is. Az MMP9 expressziója fokozható mind az NF κ B, mind az AP-1 kötődésével, melyeknek a PARP1 koaktivátora (77). Az MMP-k felelősek az extracelluláris mátrix lebontásáért és a szöveti remodellingért (76). A belső szemnyomás extrém fokú megemelkedése esetén (pl. glaukómában), amely iszkémiához vezet a szemben, az MMP-k nagymértékű expresszió-fokozódását mutatták ki a bulbus számos szövetében (78). Következésképpen az MMP-k inhibíciója ígéretes terápiás megközelítés lehet a degeneratív szembetegségek kezelésében. Kísérletünkben a harmalin kezelés mérsékelni tudta az I/R károsodás-indukálta MMP9 overexpressziót, így a HK csoportban az egészséges kontrollhoz hasonló MMP9 szintet mértünk. Ezzel szemben a DHK csoportban az MMP9-kifejeződése szignifikánsan magasabb volt, mint a HK és EK csoportban, ami egybevág az NF κ B és PARP1 fehérjék expressziós mintázatával a korábban leírtak alapján (**17. ábra/A**).

Iszkémia-reperfüziós károsodásban, a MMP-k fokozott szekréciója figyelhető meg az asztrociták aktivációjának következtében (76). A GFAP az asztrocita aktiváció széles körben használt indikátora, és kimutatták hogy a KIR-i patológiás állapotokban megnő az expressziója (81). Egy tanulmány szerint a GFAP gátlása protektív a fotoreceptorokra nézve retinaleválás esetén (80). Első kísérletünkben a GFAP expresszió nem változott szignifikánsan a HK csoportban a BK és az EK állatokhoz képest, viszont a DMT és a harmalin együttes adása valószínűleg fokozta az asztrocita sejtek aktivitását, ami szignifikánsan emelkedett GFAP expressziót eredményezett az állatok szemében (**16. ábra/A**).

A 70 kDa molekulatömegű hő sokkfehérje (Hsp70) a fehérjék és fehérjekomplexek fiziológiás térszerkezetének megőrzéséért felelős. Patológiás körülmények között a Hsp70 megvédi sejtet a proteotoxikus noxák széles skálájának káros hatásaitól (85). A Hsp70 indukciójának számos terápiás előnye van: neuroprotektív hatást fejthet ki, gátolva a gyulladáskeltő citokinek felszabadulását és az asztrogliózist (89). A Hsp70 gyulladáscsökkentő tulajdonsága sokrétű, több molekuláris útvonalat érint. Gátolja az NF κ B, az MMP-k és a reaktív oxigéngyökök termelését (128). Első kísérletünk western blot eredményei alapján a DMT a Hsp70 esetén is előnytelenül befolyásolta a fehérjeexpressziót. A DHK csoportban a Hsp70 szintje szignifikánsan alacsonyabb volt mint az EK csoport állataiban. A harmalinnal kezelt

állatok szemében az egészséges kontrollhoz hasonló, szignifikánsan nem különböző Hsp70 szintet detektáltunk (**16. ábra/B**).

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

A szövettani vizsgálat eredményei is alátámasztották a harmalin védő hatását a szemben. Az iszkémiás csoportok közül a harmalinnal kezelt állatoknál volt a legmegőrzöttebb a retina rétegvastagsága, amely szignifikánsan meghaladta BK és DHK csoportok átlagát (**19. ábra**).

A szerotonin (5-HT) szerepe vitatott a retina degeneratív betegségeiben. A MAO-A enzim szisztémás gátlása az 5-HT és a noradrenalin csökkent lebontásához vezet (16). A DMT molekuláris szerkezete rendkívül hasonlít a szerotoninéhoz, következésképpen képes aktiválni annak receptorait is, elsősorban az 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} és 5-HT_{2C} szubtypusokat (9, 104). Az 5-HT_{1A} receptor agonisták neuroprotektív hatással rendelkeznek, melyet igazoltak KIR-i iszkémia, traumás agysérülés, excitotoxicitás és Parkinson-kór állatmodelljeiben. Védő hatását fény által kiváltott retinakárosodásban is bizonyították. Az 5-HT_{1A} receptor stimuláció KIR-ben és retinában kifejtett védőhatásának hátterében álló mechanizmusok nem teljesen ismertek: fokozhatja az antioxidáns enzimek és az antiapoptotikus fehérjék szintézisét (129).

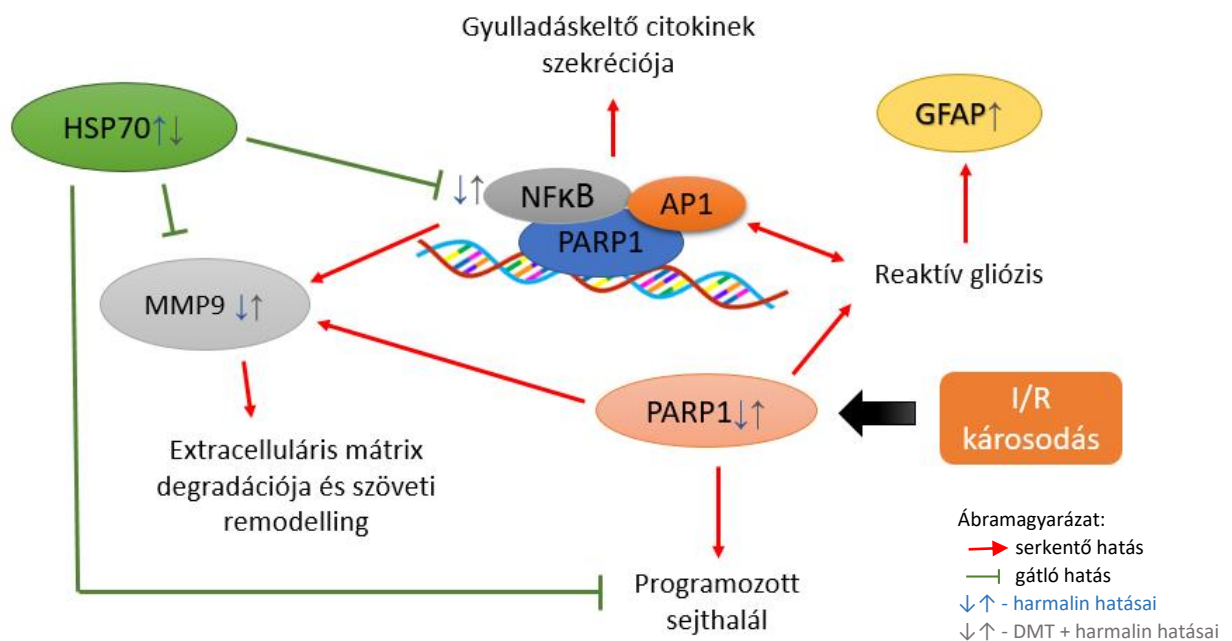
A MAO-A gátló harmalin és a DMT együttes alkalmazása az 5-HT receptorok túlzott stimulációjához vezethet. Kimutatták, hogy az 5-HT túltermelődése hozzájárulhat a szívbillentyű- és a koszorúér-betegség, a perifériás érbetegségek és a diabéteszes nefropátia kialakulásához (130). Egy 2021-ben megjelent publikációban leírták, hogy a vesét érintő I/R károsodás esetén megnő a szerotonin, az 5-HT_{2A} receptorok és a MAO-A expressziója (131). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az 5-HT és annak metabolizmusa is fontos az I/R károsodás folyamatában. Továbbá az 5-HT_{2A} receptor gátlása a MAO-A enzim expressziójának csökkenéséhez vezetett, és mérsékelte az oxidatív károsodást. A fokozott oxigénhiányok termelés az 5-HT MAO-A általi oxidatív lebontásának lehet a mellékterméke, mely folyamat megelőzhető a szerotonin szintézis csökkentésével, az 5-HT_{2A} receptorok blokkolásával, valamint a MAO-A enzim gátlásával (16, 131). Fényártalom okozta retinakárosodás esetén BALB/c egerekben az 5-HT_{2A} receptor antagonistá intraperitoneális alkalmazásával megőrizhető volt a retina vastagsága és integritása (132). Az 5-HT_{2C} receptor aktivációja

szintén hozzájárulhat az I/R károsodáshoz: izolált retinális ganglionsejtekben az 5-HT_{2C} receptor blokkolása védő hatású volt a glutamát túlstimuláció által kiváltott sejthalállal szemben (133).

Az I/R károsodás gyulladással válaszol, amely sejthalált okozhat szöveti pusztulást idézve elő a szemben, különösen a retinában (134). Eredményeink alapján a MAO-A enzim-inhibitor harmalin ellensúlyozza az I/R-hez társuló patológiás folyamatokat. A szerotonin-központú elméletre ragaszkodva feltételezzük, hogy a MAO-A gátlás az oxidatív deamináció (5-HT lebontás) gátlásával csökkentheti az iszkémia utáni oxidatív stresszt. Tekintettel arra, hogy a szakirodalomban ellentmondásos adatok vannak az 5-HT patológiás állapotokban betöltött szerepéről, feltételezzük, hogy a szemben az 5-HT fiziológiai és patológiás koncentrációja között egy törekeny egyensúly lehet, amelyet a DMT és a harmalin együttes alkalmazása felborított. A HK csoportban a megnövekedett 5-HT koncentráció nem érte el a küszöbértéket, így inkább a szerotonin és annak csökkent metabolizmusa (alacsonyabb oxidatív stressz) védő hatásokat aktivált a szemben. Ezzel szemben a DHK csoportban a 5-HT agonista DMT és a lebontásában gátolt endogén szerotonin együttesen szerotonintúlstimulációhoz vezethetett. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a szelektív szerotoninvisszavétel-gátlók (SSRI) - melyek megnövelik a központi idegrendszerben a szerotonin szintjét - rontják a látás minőségét, valamint a retinális pigment epitélium (RPE) atrófiáját eredményezik azáltal, hogy a foveális és a perifoveális makuláris ganglionsejt-komplex vastagságát csökkentik (133). A DMT nagy affinitással kapcsolódik az 5-HT_{2A} receptorokhoz, amelyek nagy számban lokalizálódnak az RPE-ben, és nagy denzitásban találhatóak a claustrumban, a látókéreghez kapcsolódó régióban (135). A DMT látószervre gyakorolt kedvezőtlen hatását az 5-HT_{2A} (túl)aktivációja közvetítheti. Ezenkívül a DMT gátolhatja a szerotonin transzportot (SERT), ami tovább növelheti az 5-HT koncentrációját a retinában (136).

Egy másik lehetséges magyarázat a DMT káros hatásaira a látószervben, hogy más receptoron is fejt ki hatást. Az ayahuasca komponenseinek hatását még nem vizsgálták sem a látószerven, sem retinasejteken ezért a szemben lokalizálódhat olyan receptor, amelyhez nagy affinitással kötődik a DMT és káros hatásokat közvetít. Egyik ilyen jelölt lehet a Sigma-2 (Sig-2R) receptor, amelynek a DMT bizonyítottan ligandja (137). A Sig-2R aktiválása sejthalált indukálhat (138), sőt, kulcsszerepe lehet a neurodegeneratív betegségekben is (138, 139). A Sig-2R blokkolása protektív hatású iszkémia és fény-indukálta retinakárosodással szemben, amely megerősíti a receptor szerepét a degeneratív folyamatok patomechanizmusában (140, 141).

A DMT ígéretes gyógyszerjelölt számos betegség, többek között a PTSD (poszttraumás stressz szindróma), a depresszió, az agy és a vese I/R károsodásának kezelésében (108, 109, 142). Első kísérletünk eredménye azonban arra hívja fel a figyelmet, hogy egy ígéretes gyógyszerjelölt hatásait minden szervrendszeren alaposan fel kell tárnunk az esetleges mellékhatások kivédése céljából. Ennek fényében a DMT hatásainak pontosabb felderítése szükséges a látószerven. A kísérlet váratlan nyeresége annak a felismerése, hogy a MAO-A inhibíció terápia potenciált rejt, melynek nagy szerepe lehet a jövőben a I/R károsodással összefüggő szembetegségek kivédésében és kezelésében.



27. ábra: Az első kísérlet eredményének összefoglalása.

A második kísérletben idős állatmodellen vizsgáltuk a testmozgás dóziszfüggő hatását a látószerven nagy hangsúlyt fektetve a szerkezeti és funkcionális aspektusokra, és az oxidatív stresszel, gyulladással és neuroprotekciónal kapcsolatos molekuláris markerekre. Az életkorral összefüggő retinális funkcióvesztés hatékonyan nyomon követhető az elektroretinográfia segítségével (143). Második kísérletünk eredménye összhangban van a szakirodalommal, miszerint az ERG paraméterek kedvezőtlen irányú változása előrejelzi a retina degenerációját az öregedés folyamata során (52, 144). Eredményeink azt mutatják, hogy a rekreációs és az erőltetett testmozgás eltérő hatással van az idős Wistar patkányok látószervi állapotára, rávilágítva a fizikai aktivitás és a szemben zajló öregedés folyamata közötti bonyolult kölcsönhatásra. Igazoltuk, hogy az önkéntes fizikai aktivitás előnyösebb hatásokat közvetít az öregedő retinára mérsékelve annak funkcionális hanyatlását.

ERG elemzésünk jelentős különbségeket tárt fel az a-hullám amplitúdóiban a fiatal és idős patkányok között, ami arra utal, hogy az idős csoportokban csökkent a fotoreceptorok elektromos aktivitása vagy száma. Ez különösen alacsonyabb fényintenzitásnál volt nyilvánvaló, ahol elsősorban a pálcika típusú fotoreceptorok aktívak, amelyek a szkotopikus (gyenge fényviszonyok közötti) látásért felelősek. Az a-hullám amplitúdókban észlelt különbség magasabb fényintenzitás (kevert csap-pálcika válasz) mellett szkotopikus mérés során már nem volt szignifikáns, ami – a kiértékelésre vonatkozó szakirodalom alapján (35, 42) – arra utalhat, hogy a csapok állapota kevésbé érintett az öregedés folyamata során. Ezzel szemben az erőltetett testmozgásnak káros hatása lehet a csapokra, ugyanis fotopikus mérés során, amikor a csapok aktivitása dominál, az IEF csoportban szignifikánsan alacsonyabb a-hullám amplitúdókat detektáltunk (**20. ábra**).

A megnyúlt implicit idő a fotoreceptorok csökkent válaszkészségére utal (47). Az a-hullám esetén az implicit idő megnyúlását figyeltük meg az IEF csoportban, különösen nagyon alacsony és magas fényintenzitás mellett. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a pálcikák extrém alacsony fénysűrűség esetén ($10 \text{ mcd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$) az IEF csoportban nehezebben gerjeszthetők. A magas fénysűrűség esetén megjelenő implicit idő megnyúlás, pedig arra utalhat, hogy a megerőltető fizikai aktivitás káros hatással lehet a csapok működésére. Kevert pálcika-csap válasz esetén nem volt szignifikáns különbség az idős csoportok között (**21. ábra**).

A b-hullám elemzése további betekintést nyújtott az öregedés és a testmozgás retinális sejtekre gyakorolt hatásaira. Meglepő módon a fiatal állatoknál a szkotopikus mérések során, különösen alacsony fényintenzitás mellett (amikor a pálcikák aktívak) alacsonyabb b-hullám amplitúdókat mértünk. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a pálcikák érése lassabb, mint a csapoké (145). Ezt a megállapítást az is alátámasztja, hogy emelkedő fényintenzitás mellett, amikor a csapok is aktiválódnak a fiatal állatokban magasabb hullámamplitúdókat detektáltunk, mint az idős csoportokban. Az idős csoportok közül a rekreációs mozgást végző állatok teljesítettek a legjobban különösen a szkotopikus mérések során. Ez arra utal, hogy a szabadon választott edzés őrzi meg leghatékonyabban a retina sejtjeinek állapotát, különösen a pálcikák ingerületátvitelében résztvevő posztszinaptikus sejtek esetén (**22. ábra**).

Az a-hullámoknál tapasztalt tendenciával megegyezően a b-hullámok implicit ideje is megnyúlt az idős csoportokban a fiatal kontroll állatokhoz képest. Ez az implicit idő megnyúlás az a-hullámoknál tapasztalt eltéréssel ellentétben magasabb fényintenzitás mellett is fennmarad arra utalva, hogy a csapok és pálcikák posztszinaptikus útvonala is érintett az öregedés folyamatában, csökkentve azok válaszkészségét. Az idős csoportok közötti b-hullám implicit idők összehasonlítása során egyedi mintázat bontakozott ki. Rendhagyó módon a b-hullámok

amplitúdójának mintázata, megegyezett az implicit idők esetén tapasztaltnal. Szkotopikus körülmények között a rekreációs mozgást végző csoport implicit ideje jelentősen hosszabb volt (magasabb b-hullám amplitúdó mellett), ám ez a különbség a fényintenzitás növekedésével csökkent, és fotopikus körülmények között eltűnt míg az erőltetett testmozgást végző csoportban alacsonyabb implicit időket mértünk alacsonyabb hullámamplitúdók mellett szkotopikus mérések során alacsonyabb fényintenzitás mellett. Ez arra utalhat, hogy az IEF csoportban a jelátviteli útvonal egyszerűsödött, csökkenhetett a szinaptikus sejtek száma, amely így rövidebb implicit időt eredményezett. Ez a magyarázat összhangban azzal, hogy a b-hullám amplitúdók is csökkentek. A második kísérletünk komplex ERG eredményei világítanak rá arra, hogy a testmozgás szemre kifejtett hatása összetett és bonyolult. Adataink azt sugallják, hogy az önkéntes, rekreációs testmozgás pozitívabban hat a szem funkcionális állapotára, mint az erőltetett testmozgás idős életkorban (**23. ábra**).

Szakirodalmi adatok alapján, az öregedés folyamata fokozott sejtelhaláshoz vezet a retinában, ami a retina rétegvastagságának csökkenését eredményezi (146-148). Második kísérletünk eredménye összhangban volt a szakirodalomban leírtakkal. Jelentős rétegvastagság-csökkenést detektáltunk az idős inaktív kontroll (IIK) csoport állatainál. A testmozgás jelentőségére hívja fel a figyelmet kísérletünk eredménye, ugyanis a fizikai aktivitás, akár önkéntes, akár erőltetett formában, megelőzte a retina atrófiáját a fiatal kontroll (FK) csoportéhoz hasonló ideghártya morfológiát eredményezve (**26. ábra**). A retinális vastagság megőrzése és a elektroretinogramon tapasztalt előnyös változások, különösen az önkéntes edzést végző csoportban, alátámasztják azt a hipotézisünket, hogy a fizikai aktivitás enyhítheti az öregedéssel járó retinális degeneráció különböző aspektusait. Ezek az eredmények összhangban vannak a meglévő szakirodalommal, amely hangsúlyozza a rendszeres testmozgás jótékony hatását a retinális egészségre, olyan mechanizmusokon keresztül, mint a trófikus faktorok fokozott termelése (149), az oxidatív károsodás és a gyulladás csökkentése (150, 151), a javuló anyagcsere-funkciók, és a fokozott véráramlás (152-157) a retina szövetében.

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

A monoamin-oxidázok (MAO-A és B) a sejtek külső mitokondriális membránján helyezkednek el, és számos kulcsfontosságú neurotranszmittert metabolizálnak a központi

idegrendszerben (16, 17). A megnövekedett MAO-B expresszió az öregedés, neuroinflammatorikus és neurodegeneratív állapotok egyik fontos jellemzője (96, 97): a neurotranszmitterek lebontása (oxidatív deaminálás) során aldehidek és H₂O₂ keletkezik, ami oxidatív károsodást és idegsejt-vesztést okozhat (93). Kísérletünkben a MAO-B kifejeződése szignifikánsan emelkedett az IIK és IEF csoportokban az FK és IRF csoportokhoz képest, míg nem volt különbség az FK és IRF csoportok között, ami azt jelenti, hogy a rekreációs futás képes volt megelőzni a MAO-B expresszió-fokozódását. Másrészt ez az eredmény azt is jelzi, hogy az intenzív fizikai terhelés fokozottabb oxidatív károsodást okozhat az idős patkányokban **(24. ábra/A)**.

A megnövekedett MAO-B expresszió együtt járt a glia fibrilláris savas fehérje (GFAP) szintjének egyidejű növekedésével. A GFAP szintézise szignifikánsan növekedett az IIK és IEF csoportokban a fiatal állatokhoz képest, ami fokozott asztrocita aktivációra utalhat (81). A rekreációs fizikai aktivitás megakadályozta a GFAP túlzott kifejeződését **(24. ábra/B)**.

Az életkorral összefüggő szabályozási változások, az oxidatív stressz, a gyulladás és a géinstabilitás sejttöregedéshez és apoptózishoz vezethetnek (158). Megvizsgáltuk a SIRT6 szintjét a szemben, amely a genomikus stabilitás kulcsszabályozója. Ez a citoprotektív fehérje oxidatív stressz alatt DNS védő és javító funkciókat aktivál (70). A SIRT6 deficiencia csökkent élettartamot és öregedésszerű fenotípust eredményezett rágcsálómodellekben (159). Kísérletünkben a SIRT6 kifejeződése szignifikánsan alacsonyabb volt az IIK és az IEF csoportokban az FK és az IRF csoportokhoz képest, ami az időskorban végzett megerőltető fizikai aktivitás káros hatását jelzi **(24. ábra/C)**.

Hasonlóan a SIRT6 expresszióhoz, a BDNF szintje is csökkent az IEF csoportban a fiatal állatokhoz képest **(24. ábra/D)**, ami a megerőltető testmozgás káros hatásaihoz hozzájárulhat. A BDNF egy neurotrofin, amely kulcsszerepet játszik a központi idegrendszer fejlődésében, ahol elősegíti az idegsejtek túlélését és differenciálódását (90). Idős életkorban a BDNF neuroprotektív szerepe bizonyított. Kimutatták, hogy védő hatást fejt ki a ganglionsejtekre, megvédve a dendritikus hálózatot és mérsékelve a látásvesztést a fokozott szemnyomás okozta károsodás esetén, amit glaukóma kísérletes állatmodellekben igazoltak. Emellett a BDNF retinoprotektívnek bizonyult a hipoxia és glükózmegvonás által okozott károsodás esetén is (72, 91).

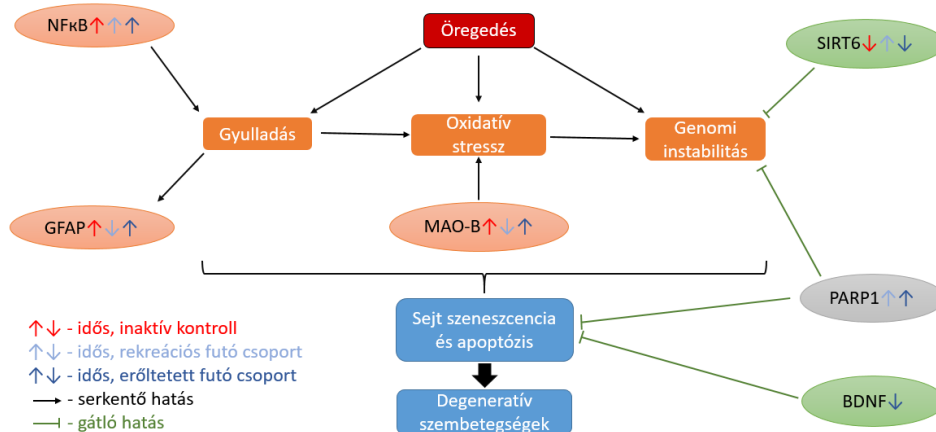
Második kísérletünkben a PARP1 és NFκB fehérjék expressziós mintázata meglepő eredményt adott, amely látszólag ellentmond az első kísérlet alapján levont következtetéseknek.

Ismert, hogy a PARP1 magas szintje és túlzott aktivitása egy speciális sejthaláltípushoz, a PARthanatoshoz vezethet. A PARthanatos kulcsszerepet játszhat a retina károsodás

patomechanizmusában, különösen az öröklött retinadegeneráció, az időskori makuladegeneráció és a szem iszkémia-reperfúziós károsodása esetén (64). Ezzel szemben a fokozott PARP1 aktivitást összefüggésbe hozták a hosszabb várható élettartammal (65, 66). Fiziológiás szintű oxidatív stressz esetén kimutatták, hogy a PARP1 citoprotektív hatású. Ezen eredmények az sugallják, hogy a PARP1 aktivitás egyensúlya rendkívül törekeny a szervezetben, míg a fiziológiás öregedés során enyhén megemelkedett oxidatív stressz által kiváltott PARP1 expresszió-fokozódás valószínűleg védő hatású, addig a fokozott oxidatív stresszel és jelentős PARP1 aktivációval járó folyamatokban (pl. I/R károsodás) inkább a sejthalált-okozó hatás érvényesülhet (67). Második kísérletünkben a mérsékelt és erőltetett fizikai aktivitás egyaránt növelte a PARP1 expressziót a szemben a fiatal kontroll csoporthoz képest. A szövettani eredményeket figyelembe véve feltételezhetjük, hogy ebben az esetben a PARP1 fokozott szintézise protektív hatást közvetít **(25. ábra/A)**.

Az NFκB proapoptotikus és antiapoptotikus gének kifejeződését is módosítja, amelyek számos patológiás állapotban játszanak fontos szerepet. Ezért az NF-κB a PARP1-hez hasonlóan egy „kétélű kard”: citoprotektív mechanizmusokat aktiválhat segítve a sejtek túlélését, valamint elősegítheti a sejthalált azáltal, hogy stimulálja a DNS-károsodásban résztvevő intracelluláris útvonalakat és a gyulladáshoz vezető választ (71). Szabályozása szorosan összefügg a PARP1-gyel és a SIRT6-tal (73). Kísérletünk western blot eredménye alapján mindhárom idős csoportban szignifikánsan magasabb NFκB szint volt detektálható, mint az FK csoport esetében. A fizikai aktivitással nem csökkent szignifikánsan az NFκB expresszió a szemben, tehát a mozgás előnyös hatásai nem az NFκB útvonal expressziójának csökkentése útján valósulnak meg **(25. ábra/B)**.

A fokozott oxidatív stressz döntő lépés lehet a sejtek öregedésének indukciójában és fenntartásában, ami a sejtek károsodásához és pusztulásához vezet (54, 60). Annak tisztázására, hogy a testmozgás milyen hatással van az antioxidáns enzimrendszerre, megvizsgáltuk a SOD1 és a HSP70 fehérjék szintjét is a szemben. Meglepő módon egyik fehérje esetén sem detektáltunk szignifikáns különbséget a csoportok között, ami arra utal, hogy az öregedés során nem csökken jelentősen ezen fehérjéknek az expressziója, valamint a rendszeres fizikai aktivitás nem ezen fehérjék indukciójával feje ki protektív hatását **(25. ábra/C/D)**.



28. ábra: A második kísérlet western blot eredményeinek összefoglalása.

Kísérleteink korlátja, hogy a szövettani analízis során csak a retina rétegvastagságát vizsgáltuk, de nem történt immunfluoreszcens analízis, mellyel egyes sejtrétegek és sejttípusok pontosan vizsgálhatók lettek volna. Így az ERG eredmények alapján nem eldönthető, hogy az amplitúdók méretének eltérései a sejtek számának, vagy aktivitásának változásának köszönhető. Tanulmányaink egy másik limitációja, hogy a western blot analízis során a teljes bulbuszt használtuk fel, nem izoláltuk a retinát, ezáltal a fehérjeexpressziós változások a teljes szemre értendők. A legújabb kutatások túlnyomó többsége kizárólag a retina működésére és fehérje-expressziós profiljára összpontosít, és csak néhány foglalkozik a szemgolyóval mint funkcionális egységgel. Számos szembetegség patomechanizmusában kulcsszereplő oxidatív stressz a retina mellett a szem többi részét is károsítja, mely hozzájárul a látásromláshoz (160). Ezért döntöttünk úgy, hogy az egész szemet vizsgáljuk, hogy feltárjuk annak pontos állapotát.

A fizikai inaktivitás a negyedik vezető halálok világszerte, a világ lakosságának majdnem egyharmada nem teljesíti az egészségügyi előnyök eléréséhez szükséges minimális ajánlást (lásd 2.8. fejezet). A nem fertőző betegségekből eredő összes haláleset 6-10%-a világszerte a fizikai inaktivitásnak tulajdonítható, iszkémiás szívbetegség esetén ez az arány eléri a 30%-ot. Felismerve a testmozgás bizonyított szerepét az egészség megőrzésében, valamint a világszerte növekvő inaktivitás tendenciáját, az elmúlt évtizedben egyre nagyobb tudományos és kereskedelmi érdeklődés mutatkozott a bioaktív, szájon át bevihető vegyületek azonosítása iránt, amelyek utánozzák vagy felerősítik a testmozgás hatásait. Ezeket a vegyületeket „edzéspirulák”-nak vagy „edzémimetikumok”-nak nevezték el (160). Az „edzémimetikumok” létjogosultságát alátámasztja az a kutatás, ahol bizonyították, hogy edzett idős egerek vérében keringő faktorokat, idős inaktív egereknek beadva javítható volt azok fizikális és kognitív állapota, és fokozható volt a neurogenesis a KIR-ben (161). Ezek a

farmakológiai szerek, ha pontos molekuláris célpontokkal és hatékony formulációval rendelkeznek, jelentős előnyöket kínálhatnak, különösen azok számára, akik alapbetegségük miatt nem képesek fizikai aktivitást végezni.

Kísérleteink eredménye alapján felmerül a lehetőség, hogy a monoamin-oxidáz enzimrendszer gátlószerei kitűnő hatóanyagai lehetnének a „edzéspiruláknak”. A MAO-gátlókat már évtizedek óta alkalmazzák hangulati zavarok és Parkinson-kór terápiájában, azonban alkalmazásuk más neurodegeneratív kórképben is felmerült (162). Testmozgás hatására megemelkedik az 5-HT szintje a szervezetben, mely fokozza a neurogenézist a központi idegrendszerben. A MAO-A gátlással nem csak az oxidatív stressz csökkenthető a szemben, hanem a szerotonin koncentráció (testmozgás hatásához hasonlóan) is, mely neuroprotektív hatásokat közvetíthet (16, 161). A MAO-B inhibitorok pedig gátolják az apoptózist azáltal, hogy stabilizálják a mitokondriális membránokat, anti-apoptotikus folyamatokat indukálnak, megakadályozzák a mitokondriális membrán permeabilitásának fokozódását és ezáltal a mitokondriumok duzzadását, valamint csökkentik a mitokondriális membránpotenciált és a citokróm C felszabadulását, így gátolva különböző apoptotikus folyamatokat (99).

7. Összegzés - Summary

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

The results of these two experiments conducted by our research team have highlighted the indisputable role of the monoamine oxidase enzyme system in ophthalmic conditions associated with ischemia-reperfusion injury and aging, offering a potential therapeutic target for the prevention and treatment of these diseases. Based on the findings of our first experiment, the MAO-A inhibitor harmaline reduced I/R damage of the eye by decreasing the expression of NFκB, PARP1, and MMP9, while increasing Hsp70 levels. However, the combined administration of DMT and harmaline had the opposite, detrimental effect on the eyes of Sprague Dawley rats. In our second experiment, we demonstrated that in elderly Wistar rats, low-intensity physical exercise was more beneficial compared to high-intensity regimen. Increased exertion caused elevated oxidative stress in the body due to the high expression of MAO-B, which could trigger a harmful cascade. Along with MAO-B, there was also an increase in GFAP levels, which may indicate accelerated inflammation. The expression of the protective factors, SIRT6 and BDNF, significantly decreased in the group subjected to forced exercise. Conversely, recreational running had a protective effect on the visual system, and the group averages were comparable to the results of the young control animals, suggesting that low-intensity physical activity is more suitable for maintaining health in old age.

8. Az értekezés új megállapításai

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

9. Irodalom

9.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom

1. Garatachea N, Pareja-Galeano H, Sanchis-Gomar F, Santos-Lozano A, Fiuza-Luces C, Moran M, et al. Exercise attenuates the major hallmarks of aging. *Rejuvenation Res.* 2015;18(1):57-89.
2. Vatner SF, Zhang J, Oydanich M, Berkman T, Naftalovich R, Vatner DE. Healthful aging mediated by inhibition of oxidative stress. *Ageing Res Rev.* 2020;64:101194.
3. Chen M, Luo C, Zhao J, Devarajan G, Xu H. Immune regulation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res.* 2019;69:159-72.
4. Varadaraj V, Ehrlich JR, Swenor BK. Vision Impairment Has Implications for Aging and Health Outcomes, Beyond Ophthalmology. *JAMA Netw Open.* 2022;5(5):e2214610.
5. Kosmyna N, Lindgren JT, Lecuyer A. Attending to Visual Stimuli versus Performing Visual Imagery as a Control Strategy for EEG-based Brain-Computer Interfaces. *Sci Rep.* 2018;8(1):13222.
6. Fan B, Zhang C, Chi J, Liang Y, Bao X, Cong Y, et al. The Molecular Mechanism of Retina Light Injury Focusing on Damage from Short Wavelength Light. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:8482149.
7. Shen J, Tower J. Effects of light on aging and longevity. *Ageing Res Rev.* 2019;53:100913.
8. Qin X, Li N, Zhang M, Lin S, Zhu J, Xiao D, et al. Tetrahedral framework nucleic acids prevent retina ischemia-reperfusion injury from oxidative stress via activating the Akt/Nrf2 pathway. *Nanoscale.* 2019;11(43):20667-75.
9. Araujo AM, Carvalho F, Bastos Mde L, Guedes de Pinho P, Carvalho M. The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Arch Toxicol.* 2015;89(8):1151-73.
10. Simao AY, Goncalves J, Gradillas A, Garcia A, Restolho J, Fernandez N, et al. Evaluation of the Cytotoxicity of Ayahuasca Beverages. *Molecules.* 2020;25(23).
11. Frecska E, Bokor P, Winkelman M. The Therapeutic Potentials of Ayahuasca: Possible Effects against Various Diseases of Civilization. *Front Pharmacol.* 2016;7:35.
12. Szabo A, Kovacs A, Riba J, Djurovic S, Rajnavolgyi E, Frecska E. The Endogenous Hallucinogen and Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Displays Potent Protective Effects against Hypoxia via Sigma-1 Receptor Activation in Human Primary iPSC-Derived Cortical Neurons and Microglia-Like Immune Cells. *Front Neurosci.* 2016;10:423.
13. Shariat Razavi SA, Taghdisi Khaboushan M, Jafari R, Shahini A, Ferns GA, Bahrami A. Harmaline induces apoptosis and inhibits migration in A2780 ovarian cancer cells in vitro. *Physiol Rep.* 2024;12(6):e15984.
14. Zheng D, Zuo Y, Li L, McDowell A, Cao Y, Ye X, et al. Natural harmaline acts as novel fluorescent probe for hypochlorous acid and promising therapeutic candidate for rheumatoid arthritis. *J*

- Photochem Photobiol B. 2024;258:112995.
15. Adnan M, Anwar S, DasGupta D, Patel M, Elsbali AM, Alhassan HH, et al. Targeting inhibition of microtubule affinity regulating kinase 4 by Harmaline: Strategy to combat Alzheimer's disease. *Int J Biol Macromol*. 2023;224:188-95.
 16. Manni ME, Rigacci S, Borchini E, Bargelli V, Miceli C, Giordano C, et al. Monoamine Oxidase Is Overactivated in Left and Right Ventricles from Ischemic Hearts: An Intriguing Therapeutic Target. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4375418.
 17. Kaludercic N, Carpi A, Menabo R, Di Lisa F, Paolocci N. Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1323-32.
 18. Mee-Inta O, Zhao ZW, Kuo YM. Physical Exercise Inhibits Inflammation and Microglial Activation. *Cells*. 2019;8(7).
 19. Diaz KM, Shimbo D. Physical activity and the prevention of hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2013;15(6):659-68.
 20. Moore KM, Girens RE, Larson SK, Jones MR, Restivo JL, Holtzman DM, et al. A spectrum of exercise training reduces soluble Aβ in a dose-dependent manner in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2016;85:218-24.
 21. Kirk-Sanchez NJ, McGough EL. Physical exercise and cognitive performance in the elderly: current perspectives. *Clin Interv Aging*. 2014;9:51-62.
 22. Parry-Williams G, Sharma S. The effects of endurance exercise on the heart: panacea or poison? *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(7):402-12.
 23. Gallardo-Gomez D, Del Pozo-Cruz J, Noetel M, Alvarez-Barbosa F, Alfonso-Rosa RM, Del Pozo Cruz B. Optimal dose and type of exercise to improve cognitive function in older adults: A systematic review and bayesian model-based network meta-analysis of RCTs. *Ageing Res Rev*. 2022;76:101591.
 24. Zotcheva E, Haberg AK, Wisloff U, Salvesen O, Selbaek G, Stensvold D, et al. Effects of 5 Years Aerobic Exercise on Cognition in Older Adults: The Generation 100 Study: A Randomized Controlled Trial. *Sports Med*. 2022;52(7):1689-99.
 25. Toriumi T, Kim A, Komine S, Miura I, Nagayama S, Ohmori H, et al. An Antioxidant Nanoparticle Enhances Exercise Performance in Rat High-intensity Running Models. *Adv Healthc Mater*. 2021;10(10):e2100067.
 26. Bektas A, Schurman SH, Sen R, Ferrucci L. Aging, inflammation and the environment. *Exp Gerontol*. 2018;105:10-8.
 27. Ge H, Yang Z, Li X, Liu D, Li Y, Pan Y, et al. The prevalence and associated factors of metabolic syndrome in Chinese aging population. *Sci Rep*. 2020;10(1):20034.
 28. Hambleton IR, Caixeta R, Jeyaseelan SM, Luciani S, Hennis AJM. The rising burden of non-communicable diseases in the Americas and the impact of population aging: a secondary analysis

- of available data. *Lancet Reg Health Am.* 2023;21:100483.
29. Marques AP, Ramke J, Cairns J, Butt T, Zhang JH, Jones I, et al. The economics of vision impairment and its leading causes: A systematic review. *EClinicalMedicine.* 2022;46:101354.
 30. Zeiss CJ, Tu DC, Phan I, Wong R, Treuting PM. 21 - Special Senses: Eye. In: Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS, editors. *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2018. p. 445-70.
 31. Leinonen H, Tanila H. Vision in laboratory rodents-Tools to measure it and implications for behavioral research. *Behav Brain Res.* 2018;352:172-82.
 32. Fletcher EL, Jobling AI, Greferath U, Mills SA, Waugh M, Ho T, et al. Studying age-related macular degeneration using animal models. *Optom Vis Sci.* 2014;91(8):878-86.
 33. Chang ML, Wu CH, Jiang-Shieh YF, Shieh JY, Wen CY. Reactive changes of retinal astrocytes and Muller glial cells in kainate-induced neuroexcitotoxicity. *J Anat.* 2007;210(1):54-65.
 34. Silverman SM, Wong WT. Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annu Rev Vis Sci.* 2018;4:45-77.
 35. Balicka A, Trbolová A, Vrbovská T. Electroretinography (A Review). *Folia Veterinaria.* 2016;60(1):53-8.
 36. Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong RO. Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2014;42:44-84.
 37. Liden M, Eriksson U. Understanding retinol metabolism: structure and function of retinol dehydrogenases. *J Biol Chem.* 2006;281(19):13001-4.
 38. Terakita A. The opsins. *Genome Biol.* 2005;6(3):213.
 39. (szerk.) FA. *Az orvosi élettan tankönyve: Medicina Kiadó; 2013.*
 40. Perlman I. The Electroretinogram: ERG. In: Kolb H, Fernandez E, Jones B, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT)1995.
 41. Tsang SH, Sharma T. Electroretinography. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1085:17-20.
 42. Pasmarter N, Petersen-Jones SM. A review of electroretinography waveforms and models and their application in the dog. *Vet Ophthalmol.* 2020;23(3):418-35.
 43. Dong CJ, Hare WA. GABA_c feedback pathway modulates the amplitude and kinetics of ERG b-wave in a mammalian retina in vivo. *Vision Res.* 2002;42(9):1081-7.
 44. Lei B, Perlman I. The contributions of voltage- and time-dependent potassium conductances to the electroretinogram in rabbits. *Vis Neurosci.* 1999;16(4):743-54.
 45. Miller RF, Dowling JE. Intracellular responses of the Muller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *J Neurophysiol.* 1970;33(3):323-41.
 46. Schatz A, Arango-Gonzalez B, Fischer D, Enderle H, Bolz S, Rock T, et al. Transcorneal electrical stimulation shows neuroprotective effects in retinas of light-exposed rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(9):5552-61.
 47. Greenstein VC, Holopigian K, Seiple W, Carr RE, Hood DC. Atypical multifocal ERG responses

- in patients with diseases affecting the photoreceptors. *Vision Res.* 2004;44(25):2867-74.
48. Lelyte I, Ahmed Z, Kaja S, Kalesnykas G. Structure-Function Relationships in the Rodent Streptozotocin-Induced Model for Diabetic Retinopathy: A Systematic Review. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2022;38(4):271-86.
 49. Moschos MM, Nitoda E. The Role of mf-ERG in the Diagnosis and Treatment of Age-Related Macular Degeneration: Electrophysiological Features of AMD. *Semin Ophthalmol.* 2018;33(4):461-9.
 50. Xiong S, Xu Y, Ma M, Wang H, Wei F, Gu Q, et al. Neuroprotective effects of a novel peptide, FK18, under oxygen-glucose deprivation in SH-SY5Y cells and retinal ischemia in rats via the Akt pathway. *Neurochem Int.* 2017;108:78-90.
 51. Safi H, Safi S, Hafezi-Moghadam A, Ahmadi H. Early detection of diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol.* 2018;63(5):601-8.
 52. Freund PR, Watson J, Gilmour GS, Gaillard F, Sauve Y. Differential changes in retina function with normal aging in humans. *Doc Ophthalmol.* 2011;122(3):177-90.
 53. Gresh J, Goletz PW, Crouch RK, Rohrer B. Structure-function analysis of rods and cones in juvenile, adult, and aged C57bl/6 and Balb/c mice. *Vis Neurosci.* 2003;20(2):211-20.
 54. Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'Arca D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3565127.
 55. Youssef PN, Sheibani N, Albert DM. Retinal light toxicity. *Eye (Lond).* 2011;25(1):1-14.
 56. Ge H, Yang Z, Li X, Liu D, Li Y, Pan Y, et al. The prevalence and associated factors of metabolic syndrome in Chinese aging population. *Scientific Reports.* 2020;10(1):20034.
 57. Jiang N, Li Z, Li Z, Zhang Y, Yu Z, Wan P, et al. Laquinimod exerts anti-inflammatory and antiapoptotic effects in retinal ischemia/reperfusion injury. *Int Immunopharmacol.* 2020;88:106989.
 58. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):1391-401.
 59. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature.* 2014;515(7527):431-5.
 60. Franssen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(9):1363-73.
 61. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3-4):222-30.
 62. Uyar B, Palmer D, Kowald A, Murua Escobar H, Barrantes I, Moller S, et al. Single-cell analyses of aging, inflammation and senescence. *Ageing Res Rev.* 2020;64:101156.
 63. Hurtado-Bages S, Guberovic I, Buschbeck M. The MacroH2A1.1 - PARP1 Axis at the Intersection Between Stress Response and Metabolism. *Front Genet.* 2018;9:417.

64. Greenwald SH, Pierce EA. Parthanatos as a Cell Death Pathway Underlying Retinal Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1185:323-7.
65. Muir ML, Muller M, Schachter F, Burkle A. Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians. *J Mol Med (Berl).* 1998;76(5):346-54.
66. Chevanne M, Calia C, Zampieri M, Cecchinelli B, Caldini R, Monti D, et al. Oxidative DNA damage repair and parp 1 and parp 2 expression in Epstein-Barr virus-immortalized B lymphocyte cells from young subjects, old subjects, and centenarians. *Rejuvenation Res.* 2007;10(2):191-204.
67. Mao K, Zhang G. The role of PARP1 in neurodegenerative diseases and aging. *FEBS J.* 2022;289(8):2013-24.
68. Ke Y, Wang C, Zhang J, Zhong X, Wang R, Zeng X, et al. The Role of PARPs in Inflammation- and Metabolic-Related Diseases: Molecular Mechanisms and Beyond. *Cells.* 2019;8(9).
69. Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaidya A, et al. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science.* 2011;332(6036):1443-6.
70. Watroba M, Szukiewicz D. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv Med Sci.* 2016;61(1):52-62.
71. Singh S, Singh TG. Role of Nuclear Factor Kappa B (NF-kappaB) Signalling in Neurodegenerative Diseases: An Mechanistic Approach. *Curr Neuropharmacol.* 2020;18(10):918-35.
72. Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx R, Bromberg E, de Vries EFJ. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol.* 2019;56(5):3295-312.
73. Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front Mol Neurosci.* 2015;8:77.
74. Nor Arfuzir NN, Agarwal R, Iezhitsa I, Agarwal P, Ismail NM. Magnesium acetyltaurate protects against endothelin-1 induced RGC loss by reducing neuroinflammation in Sprague dawley rats. *Exp Eye Res.* 2020;194:107996.
75. Alomar SY, B MB, Eldosoky M, Atef H, Mohamed AS, Elhawary R, et al. Protective effect of metformin on rat diabetic retinopathy involves suppression of toll-like receptor 4/nuclear factor-k B expression and glutamate excitotoxicity. *Int Immunopharmacol.* 2021;90:107193.
76. Lin FL, Cheng YW, Yu M, Ho JD, Kuo YC, Chiou GCY, et al. The fungus-derived retinoprotectant theissenolactone C improves glaucoma-like injury mediated by MMP-9 inhibition. *Phytomedicine.* 2019;56:207-14.
77. Kowluru RA, Mishra M. Regulation of Matrix Metalloproteinase in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;148:67-85.
78. De Groef L, Van Hove I, Dekeyster E, Stalmans I, Moons L. MMPs in the neuroretina and optic nerve: modulators of glaucoma pathogenesis and repair? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(3):1953-64.
79. Ritzel RM, Lai YJ, Crapser JD, Patel AR, Schrecengost A, Grenier JM, et al. Aging alters the

- immunological response to ischemic stroke. *Acta Neuropathol.* 2018;136(1):89-110.
80. Luna G, Keeley PW, Reese BE, Linberg KA, Lewis GP, Fisher SK. Astrocyte structural reactivity and plasticity in models of retinal detachment. *Exp Eye Res.* 2016;150:4-21.
 81. Jurga AM, Paleczna M, Kadluczka J, Kuter KZ. Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules.* 2021;11(9).
 82. Rutigliani C, Tribble JR, Hagstrom A, Lardner E, Johannesson G, Stalhammar G, et al. Widespread retina and optic nerve neuroinflammation in enucleated eyes from glaucoma patients. *Acta Neuropathol Commun.* 2022;10(1):118.
 83. Benedet AL, Mila-Aloma M, Vrillon A, Ashton NJ, Pascoal TA, Lussier F, et al. Differences Between Plasma and Cerebrospinal Fluid Glial Fibrillary Acidic Protein Levels Across the Alzheimer Disease Continuum. *JAMA Neurol.* 2021;78(12):1471-83.
 84. Magliozzi R, Cross AH. Can CSF biomarkers predict future MS disease activity and severity? *Mult Scler.* 2020;26(5):582-90.
 85. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B. The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(11):665-80.
 86. Turturici G, Sconzo G, Geraci F. Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochem Res Int.* 2011;2011:618127.
 87. Piri N, Kwong JM, Gu L, Caprioli J. Heat shock proteins in the retina: Focus on HSP70 and alpha crystallins in ganglion cell survival. *Prog Retin Eye Res.* 2016;52:22-46.
 88. Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers Dement.* 2016;12(6):719-32.
 89. Salminen A, Lehtonen M, Paimela T, Kaarniranta K. Celastrol: Molecular targets of Thunder God Vine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(3):439-42.
 90. Caviedes A, Lafourcade C, Soto C, Wyneken U. BDNF/NF-kappaB Signaling in the Neurobiology of Depression. *Curr Pharm Des.* 2017;23(21):3154-63.
 91. Fudalej E, Justyniarska M, Kasarello K, Dziedziak J, Szaflik JP, Cudnoch-Jedrzejewska A. Neuroprotective Factors of the Retina and Their Role in Promoting Survival of Retinal Ganglion Cells: A Review. *Ophthalmic Res.* 2021;64(3):345-55.
 92. Wu SY, Pan BS, Tsai SF, Chiang YT, Huang BM, Mo FE, et al. BDNF reverses aging-related microglial activation. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):210.
 93. De Zutter GS, Davis RJ. Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(11):6168-73.
 94. Fitzgerald JC, Ugun-Klusek A, Allen G, De Girolamo LA, Hargreaves I, Ufer C, et al. Monoamine oxidase-A knockdown in human neuroblastoma cells reveals protection against mitochondrial toxins. *FASEB J.* 2014;28(1):218-29.
 95. Feng J, Xu J. Identification of pathogenic genes and transcription factors in glaucoma. *Mol Med Rep.* 2019;20(1):216-24.

96. Nam MH, Sa M, Ju YH, Park MG, Lee CJ. Revisiting the Role of Astrocytic MAOB in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8).
97. Tong J, Meyer JH, Furukawa Y, Boileau I, Chang LJ, Wilson AA, et al. Distribution of monoamine oxidase proteins in human brain: implications for brain imaging studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(6):863-71.
98. Carradori S, D'Ascenzio M, Chimenti P, Secci D, Bolasco A. Selective MAO-B inhibitors: a lesson from natural products. *Mol Divers.* 2014;18(1):219-43.
99. Riederer P, Muller T. Use of monoamine oxidase inhibitors in chronic neurodegeneration. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017;13(2):233-40.
100. Watanabe K, Shibuya S, Ozawa Y, Nojiri H, Izuo N, Yokote K, et al. Superoxide dismutase 1 loss disturbs intracellular redox signaling, resulting in global age-related pathological changes. *Biomed Res Int.* 2014;2014:140165.
101. Trist BG, Hilton JB, Hare DJ, Crouch PJ, Double KL. Superoxide Dismutase 1 in Health and Disease: How a Frontline Antioxidant Becomes Neurotoxic. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2021;60(17):9215-46.
102. El-Sayyad HI, Khalifa SA, El-Sayyad FI, Mousa SA, Mohammed EA. Analysis of fine structure and biochemical changes of retina during aging of Wistar albino rats. *Clin Exp Ophthalmol.* 2014;42(2):169-81.
103. Brito-da-Costa AM, Dias-da-Silva D, Gomes NGM, Dinis-Oliveira RJ, Madureira-Carvalho A. Toxicokinetics and Toxicodynamics of Ayahuasca Alkaloids N,N-Dimethyltryptamine (DMT), Harmine, Harmaline and Tetrahydroharmine: Clinical and Forensic Impact. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(11).
104. Hamill J, Hallak J, Dursun SM, Baker G. Ayahuasca: Psychological and Physiologic Effects, Pharmacology and Potential Uses in Addiction and Mental Illness. *Curr Neuropharmacol.* 2019;17(2):108-28.
105. Cameron LP, Olson DE. Dark Classics in Chemical Neuroscience: N, N-Dimethyltryptamine (DMT). *ACS Chem Neurosci.* 2018;9(10):2344-57.
106. Lima da Cruz RV, Moulin TC, Petiz LL, Leao RN. A Single Dose of 5-MeO-DMT Stimulates Cell Proliferation, Neuronal Survivability, Morphological and Functional Changes in Adult Mice Ventral Dentate Gyrus. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:312.
107. Peto K, Nemeth N, Mester A, Magyar Z, Ghanem S, Somogyi V, et al. Hemorheological and metabolic consequences of renal ischemia-reperfusion and their modulation by N,N-dimethyltryptamine on a rat model. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;70(1):107-17.
108. Nardai S, Laszlo M, Szabo A, Alpar A, Hanics J, Zahola P, et al. N,N-dimethyltryptamine reduces infarct size and improves functional recovery following transient focal brain ischemia in rats. *Exp Neurol.* 2020;327:113245.
109. Szabo I, Varga VE, Dvoracko S, Farkas AE, Kormoczi T, Berkecz R, et al. N,N-

- Dimethyltryptamine attenuates spreading depolarization and restrains neurodegeneration by sigma-1 receptor activation in the ischemic rat brain. *Neuropharmacology*. 2021;192:108612.
110. Zhao J, Gonsalvez G, Bartoli M, Mysona BA, Smith SB, Bollinger KE. Sigma 1 Receptor Modulates Optic Nerve Head Astrocyte Reactivity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2021;62(7):5.
111. Szabo A, Kovacs A, Frecska E, Rajnavolgyi E. Psychedelic N,N-dimethyltryptamine and 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine modulate innate and adaptive inflammatory responses through the sigma-1 receptor of human monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2014;9(8):e106533.
112. Jimenez JH, Bouso JC. Significance of mammalian N, N-dimethyltryptamine (DMT): A 60-year-old debate. *J Psychopharmacol*. 2022;36(8):905-19.
113. Khan FA, Maalik A, Iqbal Z, Malik I. Recent pharmacological developments in beta-carboline alkaloid "harmaline". *Eur J Pharmacol*. 2013;721(1-3):391-4.
114. Berrougui H, Isabelle M, Cloutier M, Hmamouchi M, Khalil A. Protective effects of Peganum harmala L. extract, harmine and harmaline against human low-density lipoprotein oxidation. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(7):967-74.
115. Lee CS, Han ES, Jang YY, Han JH, Ha HW, Kim DE. Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and dopamine-induced damage of brain mitochondria and PC12 cells. *J Neurochem*. 2000;75(2):521-31.
116. Vahedi MM, Shahini A, Mottahedi M, Garousi S, Shariat Razavi SA, Pouyamanesh G, et al. Harmaline exerts potentially anti-cancer effects on U-87 human malignant glioblastoma cells in vitro. *Mol Biol Rep*. 2023;50(5):4357-66.
117. Zhang Y, Shi X, Xie X, Laster KV, Pang M, Liu K, et al. Harmaline isolated from Peganum harmala suppresses growth of esophageal squamous cell carcinoma through targeting mTOR. *Phytother Res*. 2021;35(11):6377-88.
118. Li HY, Rong SS, Hong X, Guo R, Yang FZ, Liang YY, et al. Exercise and retinal health. *Restor Neurol Neurosci*. 2019;37(6):571-81.
119. Wylegala A. The Effects of Physical Exercises on Ocular Physiology: A Review. *J Glaucoma*. 2016;25(10):e843-e9.
120. Paunksnis A, Kusleika S, Kusleikaite M. The relationship of the intensity of lens opacity with physical activity. *Medicina (Kaunas)*. 2006;42(9):738-43.
121. Mees LM, Coulter MM, Chrenek MA, Motz CT, Landis EG, Boatright JH, et al. Low-Intensity Exercise in Mice Is Sufficient to Protect Retinal Function During Light-Induced Retinal Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019;60(5):1328-35.
122. Xie LH, Fefelova N, Pamarthi SH, Gwathmey JK. Molecular Mechanisms of Ferroptosis and Relevance to Cardiovascular Disease. *Cells*. 2022;11(17).
123. Global recommendations on physical activity for health. Switzerland: World Health Organization; 2010 [Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241599979>].
124. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, et al. Ageing as a risk factor for

- neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(10):565-81.
125. Wang AL, Lukas TJ, Yuan M, Neufeld AH. Age-related increase in mitochondrial DNA damage and loss of DNA repair capacity in the neural retina. *Neurobiol Aging*. 2010;31(11):2002-10.
126. Liu S, Luo W, Wang Y. Emerging role of PARP-1 and PARthanatos in ischemic stroke. *J Neurochem*. 2022;160(1):74-87.
127. Kauppinen TM, Gan L, Swanson RA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-induced NAD(+) depletion promotes nuclear factor-kappaB transcriptional activity by preventing p65 de-acetylation. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(8):1985-91.
128. Kim JY, Han Y, Lee JE, Yenari MA. The 70-kDa heat shock protein (Hsp70) as a therapeutic target for stroke. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(3):191-9.
129. Collier RJ, Patel Y, Martin EA, Dembinska O, Hellberg M, Krueger DS, et al. Agonists at the serotonin receptor (5-HT_{1A}) protect the retina from severe photo-oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(5):2118-26.
130. Doggrell SA. The role of 5-HT on the cardiovascular and renal systems and the clinical potential of 5-HT modulation. *Expert Opin Investig Drugs*. 2003;12(5):805-23.
131. Jin J, Xu F, Zhang Y, Guan J, Liang X, Zhang Y, et al. Renal ischemia/reperfusion injury in rats is probably due to the activation of the 5-HT degradation system in proximal renal tubular epithelial cells. *Life Sci*. 2021;285:120002.
132. Tullis BE, Ryals RC, Coyner AS, Gale MJ, Nicholson A, Ku C, et al. Sarpogrelate, a 5-HT_{2A} Receptor Antagonist, Protects the Retina From Light-Induced Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(8):4560-9.
133. Masson J. Serotonin in retina. *Biochimie*. 2019;161:51-5.
134. Minhas G, Sharma J, Khan N. Cellular Stress Response and Immune Signaling in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Immunol*. 2016;7:444.
135. Halberstadt AL, Geyer MA. Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens. *Neuropharmacology*. 2011;61(3):364-81.
136. Nichols DE. N,N-dimethyltryptamine and the pineal gland: Separating fact from myth. *J Psychopharmacol*. 2018;32(1):30-6.
137. Fontanilla D, Johannessen M, Hajipour AR, Cozzi NV, Jackson MB, Ruoho AE. The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science*. 2009;323(5916):934-7.
138. Jonhede S, Petersen A, Zetterberg M, Karlsson JO. Acute effects of the sigma-2 receptor agonist siramesine on lysosomal and extra-lysosomal proteolytic systems in lens epithelial cells. *Mol Vis*. 2010;16:819-27.
139. Kargbo RB. Sigma-1 and Sigma-2 Receptor Modulators as Potential Therapeutics for Alzheimer's Disease. *ACS Med Chem Lett*. 2021;12(2):178-9.
140. Mavlyutov TA, Li J, Liu X, Shen H, Yang H, McCurdy CR, et al. Retinal Photoreceptor Protection

- in an AMD-Related Mouse Model by Selective Sigma-1 or Sigma-2 Receptor Modulation. *Genes (Basel)*. 2022;13(12).
141. Wang H, Peng Z, Li Y, Sahn JJ, Hodges TR, Chou TH, et al. sigma(2)R/TMEM97 in retinal ganglion cell degeneration. *Sci Rep*. 2022;12(1):20753.
 142. Nemes B, Peto K, Nemeth N, Mester A, Magyar Z, Ghanem S, et al. N,N-dimethyltryptamine Prevents Renal Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Model. *Transplant Proc*. 2019;51(4):1268-75.
 143. Sugita Y, Yamamoto H, Maeda Y, Furukawa T. Influence of Aging on the Retina and Visual Motion Processing for Optokinetic Responses in Mice. *Front Neurosci*. 2020;14:586013.
 144. Campello L, Singh N, Advani J, Mondal AK, Corso-Diaz X, Swaroop A. Aging of the Retina: Molecular and Metabolic Turbulences and Potential Interventions. *Annu Rev Vis Sci*. 2021;7:633-64.
 145. Westall CA, Panton CM, Levin AV. Time courses for maturation of electroretinogram responses from infancy to adulthood. *Doc Ophthalmol*. 1998;96(4):355-79.
 146. Iwase A, Higashide T, Fujii M, Ohno Y, Tanaka Y, Kikawa T, et al. Aging-associated changes of optical coherence tomography-measured ganglion cell-related retinal layer thickness and visual sensitivity in normal Japanese. *Jpn J Ophthalmol*. 2024;68(2):117-25.
 147. Leley SP, Ciulla TA, Bhatwadekar AD. Diabetic Retinopathy in the Aging Population: A Perspective of Pathogenesis and Treatment. *Clin Interv Aging*. 2021;16:1367-78.
 148. Silva MF, Harvey BM, Jorge L, Canario N, Machado F, Soares M, et al. Simultaneous changes in visual acuity, cortical population receptive field size, visual field map size, and retinal thickness in healthy human aging. *Brain Struct Funct*. 2021;226(9):2839-53.
 149. Chrysostomou V, Galic S, van Wijngaarden P, Trounce IA, Steinberg GR, Crowston JG. Exercise reverses age-related vulnerability of the retina to injury by preventing complement-mediated synapse elimination via a BDNF-dependent pathway. *Aging Cell*. 2016;15(6):1082-91.
 150. Chu-Tan JA, Kirkby M, Natoli R. Running to save sight: The effects of exercise on retinal health and function. *Clin Exp Ophthalmol*. 2022;50(1):74-90.
 151. Sadeghian R, Shahidi S, Komaki A, Habibi P, Ahmadiasl N, Yousefi H, et al. Synergism effect of swimming exercise and genistein on the inflammation, oxidative stress, and VEGF expression in the retina of diabetic-ovariectomized rats. *Life Sci*. 2021;284:119931.
 152. Zwierko T, Czepita D, Lubinski W. The effect of physical effort on retinal activity in the human eye: rod and cone flicker electroretinogram studies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010;248(5):659-66.
 153. Schmitz B, Nelis P, Rolfes F, Alnawaiseh M, Klose A, Kruger M, et al. Effects of high-intensity interval training on optic nerve head and macular perfusion using optical coherence tomography angiography in healthy adults. *Atherosclerosis*. 2018;274:8-15.
 154. Zwierko T, Czepita DM, Lubinski W, Lubkowska A. Effects of physical effort on neuroretinal function in athletes and non-athletes: an electroretinographic study. *Eur J Ophthalmol*.

- 2010;20(2):381-8.
155. Zhang Y, San Emeterio Nateras O, Peng Q, Rosende CA, Duong TQ. Blood flow MRI of the human retina/choroid during rest and isometric exercise. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(7):4299-305.
 156. Vogel J, Kruse C, Zhang M, Schroder K. Nox4 supports proper capillary growth in exercise and retina neo-vascularization. *J Physiol.* 2015;593(9):2145-54.
 157. Hua D, Xu Y, Heiduschka P, Zhang W, Zhang X, Zeng X, et al. Retina Vascular Perfusion Dynamics During Exercise With and Without Face Masks in Healthy Young Adults: An OCT Angiography Study. *Transl Vis Sci Technol.* 2021;10(3):23.
 158. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell.* 2023;186(2):243-78.
 159. Kawahara TL, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell.* 2009;136(1):62-74.
 160. Siu AW, Maldonado M, Sanchez-Hidalgo M, Tan DX, Reiter RJ. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *J Pineal Res.* 2006;40(2):101-9.
 161. Gubert C, Hannan AJ. Exercise mimetics: harnessing the therapeutic effects of physical activity. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(11):862-79.
 162. Duarte P, Cuadrado A, Leon R. Monoamine Oxidase Inhibitors: From Classic to New Clinical Approaches. *Handb Exp Pharmacol.* 2021;264:229-59.

9.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló és további megjelent közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

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

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

Jelölt: Szilágyi Anna

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

MTMT azonosító: 10083831

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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





9. Wachal, Z., **Szilágyi, A.**, Takács, B., Szabó, A. M., Priksz, D., Bombicz, M., Szilvássy, J., Juhász, B., Szilvássy, Z., Varga, B.: Improved Survival and Retinal Function of Aging ZDF Rats in Long-Term, Uncontrolled Diabetes by BGP-15 Treatment.

Front. Pharmacol. 12, 1-11, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.650207>

IF: 5.988

10. Hegedűs, C., Muresan, M., Badale, A., Bombicz, M., Varga, B., **Szilágyi, A.**, Sinka, D. Z., Bácskay, I., Popoviciu, M., Magyar, I., Szarvas, M. M., Szöllősi, E., Németh, J., Szilvássy, Z., Pallag, A., Kiss, R.: SIRT1 Activation by Equisetum Arvense L. (Horsetail) Modulates Insulin Sensitivity in Streptozotocin Induced Diabetic Rats.

Molecules. 25 (11), 2541-2561, 2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25112541>

IF: 4.411

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 44,207

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

10

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

Debrecen, 2024.10.16.



10. Tárgyszavak

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

Angol tárgyszavak: retina, aging, ischemia-reperfusion, Sprague Dawley rat, Wistar rat, ayahuasca, DMT, harmaline, recreational physical activity, forced physical activity, electroretinography (ERG), Western blot, histology

11. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

Köszönöm barátaimnak a velük kikapcsolódással, feltöltődéssel eltöltött időt!

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

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

12. Fűggelék