

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

FOTOSTRESSZ OKOZTA RETINA DEGENERÁCIÓ ÉS AZ AZT
BEFOLYÁSOLÓ ANTIOXIDATÍV, HORMONÁLIS ÉS
KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK ÁLLATKÍSÉRLETEKBEN

DR. KÁLDI ILDIKÓ

KENÉZY GYULA KÓRHÁZ-RENDELŐINTÉZET,
SZEMÉSZETI OSZTÁLY, DEBRECEN
DEAN A. MCGEE EYE INSTITUTE,
OKLAHOMA CITY, OK, USA

Debrecen, 2005.

TARTALOMJEGYZÉK:

1. Bevezetés.....	3-10.
2. Célkitűzések.....	11.
3. Anyagok és módszerek.....	12-18.
4. Eredmények.....	19-36.
5. Megbeszélés.....	37-44.
6. Összefoglalás.....	45.
7. Gyakorlati alkalmazás.....	46.
8. Köszönetnyilvánítás.....	47.
9. Irodalomjegyzék.....	48-57.
10. Közlemények, prezentációk jegyzéke	58-59.

Az értekezéshez felhasznált közlemények

Egyéb közlemények

Prezentációk

11. A tézisekhez használt közlemények különlenyomatai	
---	--

1. BEVEZETÉS

A retinitis pigmentosa (RP) progresszív, örökletes retinadegenerációk heterogén csoportja, melynek prevalenciája a fejlett országokban kb. 1:3000 (1). A betegség szürkületi vaksággal

és a pálcikák pusztulásának következtében kialakuló koncentrikus, perifériás látótérszűkülettel kezdődik. Az ERG kóros, a fundus perifériáján kezdődő, szabálytalan pigmentfelhalmozódás látható. A folyamat előrehaladtával, a csapok pusztulását követően, a látótér teljesen kiesik, a beteg megvakul. A RP öröklésmenete 19 %-ban autoszomális domináns, 19 %-ban autoszomális recesszív, 8 %-ban X-hez kötött recesszív, 46 %-ban sporadikus és 8 %-ban ismeretlen eredetű (2).

A fotoreceptorsejtek pusztulásának két mechanizmusa ismeretes: apoptózis és nekrozis (3-5). Az apoptózis egy adott sejt gén által regulált öngyilkossága, mely szerepet játszik a fiziológias szövetfejlődésben (6) és különböző patológias folyamatokban egyaránt. Az utóbbiak közé tartoznak a retina fény okozta degenerációi (7), az örökletes retinaelfajulások (8-10) és az időskori macula degeneracio is (5). Az apoptózis és a nekrozis folyamata között alapvető különbségek vannak. A nekrozis sejtek nagyobb csoportjának random pusztulása, mely a feloldódó és elhaló sejtekből felszabaduló proteolitikus enzimek és toxikus komponensek révén mindig hatással van a környező szövetekre (4). Az apoptózis magas szinten szabályozott, irreverzibilis folyamat, mely a retinában az egyes sejtek pusztulásához vezet (6).

1966-ban Noell és munkatársai felfedezték, hogy konstans, erős fénynek kitett albínó patkányok retinájában súlyos retinaelfajulás alakult ki (11). Ebben az állatmodellben és az örökletes retina degenerációkban a fotoreceptorok pusztulásának "végső, közös útja" az apoptózis (6). Ez a magyarázata annak, hogy az állatmodelleket széles körben alkalmazzák a retinitis pigmentosában lezajló sejtpusztulás mechanizmusának tanulmányozására (3, 4, 12).

Számos tanulmány számol be arról, hogy a rodopszin a fénykárosodást mediáló kromofor (11,13-15) és a sejtek sérülékenységének mértéke egyenesen arányos rodopszin tartalmukkal.

A fotostressz provokálta apoptózis során egy intracelluláris jel-kaszád aktíválódik, mely kaszpázok felszabadulásához és a sejt pusztulásához vezet (16).

Más feltételezések szerint a fény hatására szabadgyökök képződnek, melyek a fénykárosodás korai mediátorai (17-20). Az oxidatív stressz teóriáját támasztják alá azok a felfedezések is, melyek szerint az olyan antioxidánsok, mint az aszkorbinsav (21,22) és a dimetiltiourea (23) kivédik az albínó patkányok fénykárosodását. A szabadgyökkötő ágens fenil-N-tert-butilnitron (FBN) szintén protektív hatású a fénystresszel szemben (24,25), csakúgy mint a Gingko biloba kivonat (26) és a metilprednisolon (27). Az E-vitamin fénykárosodásra gyakorolt hatásáról ellentmondó eredmények születtek (28-30).

Korábbi vizsgálatokban azt találták, hogy az N^{G} -nitro-L-arginin-metilészter (L-NAME), mely a nitrogénoxidszintetáz enzim (NOSZ) inhibítora, szintén kivédte a retina erős fény okozta degenerációját (18,31). A nitrogénoxid (NO) számos fiziológiai hatással bíró biológiai mediátor: vazodilatátor, neurotranszmitter, antimikrobiális effector molekula és immunmodulátor (32,33). A NO a szervezetben jótékony és káros hatást is kifejt. Erre a legjobb példa a sepsis, melynek során a NO a parenchymás szervekben értágulatot, így bőségebb vérellátást biztosít, ugyanakkor letális kimenetelű hypotóniát is okozhat (34). A nitrogénoxidot a NOSZ-enzimek szintetizálják L-argininből, melynek során a szabadgyök NO és citrullin keletkeznek. A NOSZ-nak 3 izoenzimje ismeretes (35). Kettő folyamatosan képződik, az egyik a neuronokban így neuronális NOSZ-nak (nNOSZ), a másik az endotelsejtekben így endoteliális NOS-nak (eNOS) nevezik. A harmadik izoenzim, az indukálható NOSZ (iNOSZ) nincs jelen a nyugvó sejtekben, de bizonyos citokinek, mikrobiális termékek és lipopoliszaharidok jelenlétében termelődése megindul (36,37). A nNOSZ-t és az eNOSZ-t kimutatták a retinában (38) és valószínűleg az nNOSZ felelős a

fotoreceptorokban és a bipoláris sejtekben lejátszódó NO termelődésért (35). Az iNOSZ-t a Müller sejtekben (39) és a retinális pigmentepitéliumban (RPE) detektálták (40,41) és feltehetőleg jelentősége van a pálcikák külső szegmensének (PKSZ) normál fagocitózisában. A NO-nak fontos szerepe van a retinális erek bazális tónusának biztosításában is (35) és a NO magas koncentrációban hozzájárul a retina ischaemiás károsodásához (42,43).

A NOSZ gátlókat széles körben alkalmazták a NO különböző biológiai rendszerekben kifejtett hatásának tesztelésére. Az N^G -szubsztituált-L-arginin származékok kompetitíve gátolják a NOSZ aktivitását. A NOSZ inhibitorok farmakokinetikáját több csoport vizsgálta (44-46) mind emberen, mind patkányon. Patkányokban az N^G -nitro-L-arginin (L-NOARG) féléletideje ($t_{1/2}$) intravénás adagolást követően 11.0 ± 3.1 perc (gyorsan leszálló fázis) és 20.0 ± 4.9 óra (lassan leszálló fázis). Ez a viszonylag hosszú féléletidő kedvez az állatkísérleteknek, mert napi egyszeri adagolással kielégítő gyógyszeradag juttatható be (18). Bebizonyosodott, hogy az L-NAME csak egy hatás nélküli előalak, hidrolízis útján alakul L-NOARG-gá, aktív NOSZ gátlóvá (47).

Két tanulmány számolt be arról, hogy az L-NAME intraperitoneális adagolása csökkentette a fénykárosodást albínó patkányokban (18) és egerekben (31).

Irodalmi adatok szerint a női nemi hormonok mind emberen, mind *in vivo* állatkísérletekben védelmet nyújtanak cardiovascularis, neurovascularis és egyéb idegrendszeri betegségek ellen. Premenopauzában levő nőknél alacsonyabb az agyvérzés incidenciája (48-50). Posztmenopauzában az ösztrogén terápia csökkentette a szívbetegség rizikóját (51). Parciális epilepsziában szenvedő nőbetegeknél a menstruációs ciklus luteális fázisban ritkábban jelentkezik roham (52). A progeszteron infúciónak hasonló hatása van olyan macskákban, amelyeknél penicillin adagolással provokáltak epilepsziát (53). Egy tanulmányban 7 parciális

epilepsziában szenvedő nőbetegnek adtak progeszteront tartalmazó infúziót olyan adagban, hogy a hormon szintje elérje a luteális fázis plazmakoncentrációját. A hétből négynél szignifikánsan csökkent a tüske-frekvencia (54). Roof és munkatársai (55) patkányokon, kísérletes agysérülés okozta agyödémában vizsgálták a progeszteron hatását. A szexuálisan érett nőtény állatoknál szignifikánsan kisebb mértékű ödéma alakult ki, mint a hímeknél és az álderhes nőtényeknél szinte egyáltalán nem alakult ki vizenyő. Arra a következtetésre jutottak, hogy az agyödéma csökkenése a keringő progeszteron szintjétől függ. Egy további kísérletben azt találták, hogy a progeszteron hatásosan csökkentette az ödémát akkor is, ha a kezelést csak 24 órával a sérülés után kezdték meg (56). Wright és munkatársai (57) hím patkányokban bilaterális mediális frontális kérgi sérülést idéztek elő és a progeszteronnal kezelt állatok agyának víztartalma szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll állatoké. Jiang és munkatársai (58) hím patkányokon, az artéria cerebri média occlusió (ACMO) után kialakuló agyi ischaemiában vizsgálták a progeszteron neuroprotektív hatását. Az eredmények azt mutatják, hogy progeszteron adása az ACMO létrehozása előtt, vagy 2 órával azután, csökkentette az ischaemiás sejtkárosodást és 2 nappal a kísérletes agyvérzés után javította a fiziológiás és idegi funkciókat. Alkayed és kollégái (59) leírták, hogy idős, fogamzóképtelen patkányoknak ösztrogént és progeszteont adagolva csökkent a 2 órával ACMO után mért kérgi infarctus kiterjedése. A striatalis infarctus kisebb volt az ösztrogén-, de nem változott a progeszteron-kezelt csoportban. Egy másik kísérletben azonos korú hím, nőtény és ovariectomizált nőtény patkányokban váltottak ki 2 órán át tartó ACMO-t, melyet követően megmérték az agykéregben és a törzsdúcok területén a vérátáramlást és az infarctus -volumet (48). A nőtény patkányokban kisebb volt az elhalás kiterjedése és bőségebb a vérátáramlás, mint a hímekben és az ovariectomizált nőtényekben. Ez azt bizonyítja, hogy az

endogen ösztrogén javítja az agyvérvzés kimenetelét. A fentieknek ellent mondanak azok az irodalmi közlések, melyek szerint a petefészekhormonok hatástalanok agyvérvzésben. Murphy és munkatársai (60) ovariectomizált patkányoknak akut és krónikus formában progeszteront adagoltak ACMO után. Eredményeik szerint a hormon krónikus adása szignifikánsan fokozta a törzsdúcok infarctusát. A kérgi és a totális féltekei elhalás mértéke változatlan volt. Az RU 486-ot (mifeperiszone) széles körben alkalmazzák, erős progeszteron és glükokortikoid receptor antagonistá hatása van. A szer protektívnek bizonyult oxidatív stressz okozta neuronális sejtpusztulásban patkányokban, primer hippocampalis neuronokban, klonális egér hippocampus sejtekben és organotipikus hippocampus szeletkultúrákban (61).

A hormonális hatások szerepét a fotostressz okozta fotoreceptor pusztulásban is tanulmányozták. A nõstény albínó patkányokat a pubertás elõtt vagy ovariectomizálták (OVEX), vagy hypophysectomizálták (HYPEX). Mind az operált, mind a kontroll állatokat 45 napon át tartó fényhatásnak tették ki. A retina károsodása az OVEX és a HYPEX állatokban szignifikánsan kisebb mértékû volt, mint a kontroll állatokban (62). Szintén O'Steen egy késõbbi munkában összehasonlította az ösztrogén és/vagy progeszteron adagolásának hatását OVEX patkányokban a hormonok adagolása nélküli ovariectomizálás hatásával (63). Azokban a folyamatos fénynek kitett, OVEX patkányokban, amelyek 0.05 µg esztradiol benzoátot kaptak, szignifikánsan nagyobb mértékû fotoreceptor pusztulás jött létre, mint az OVEX+olajjal (vivõanyaggal) kezelt állatokban. Ugyanakkor 100 µg esztradiol benzoát adagolása jobban csökkentette a retina károsodását, mint az ovariectomia önmagában. A progeszteron adagolás (2.5 mg/nap) önmagában nem fejtett ki hatást a fotostressz okozta

fotoreceptor pusztulásra. Egy új ösztadiol analog, a MITO-4565 intravitreálisan adagolva cytoprotektívnek bizonyult S334ter patkányokban (64).

A progeszteron steroid hormon, az egészséges, nem állapotos nőben a progeszteront a menstruációs ciklus luteális fázisában a sárgatest termeli. Terhesség alatt a hormont a placenta szekretálja. Szintézisének fő forrása a vérben keringő koleszterin.

Androgén, ösztrogén és progeszteron receptor mRNS-t izoláltak hím és nőstény patkány, nyúl és az ember több okuláris szövetében (pl. retina/uvea, retina/koroidea, RPE), melyek a nemi hormonok célszerveit reprezentálják (65). Lanthier és Patwardhan magasabb progeszteron szintet mutattak ki a patkány retinájában, mint a palzmájában, bár úgy tűnik, szintézise nem a szemben zajlik (66,67). Ezek az adatok biztosítanak minket arról, hogy a szer eléri a célszervet, a retinát. Robinson és munkatársai (68) tanulmányozták a progeszteron metabolizmusának dinamikáját. Az exogén progeszteron vérből történő kiürülését két féleletidővel jellemzik: 0.5 perc és 11.7 perc. Patkányokban 500 µg/kg progeszteron egyszeri iv. adását követően az eloszlási és kiürülési fázis féleletideje 0.13 ± 0.024 és 1.21 ± 0.21 óra.

Számtalan külső és belső tényező befolyásolja, hogy a fény milyen mértékű retinakárosodást okoz (69). Ezek közül a legfontosabbak az alkalmazott fény paraméterei: intenzitás, hullámhossz és az expozíció időtartama (70,71). Az intrinzik faktorok közül szerepet játszanak a kor (72), a genotípus (73), az étrend (13,19,74,75), a testhőmérséklet (11,76), a szem pigmentáltsága (77,78), az expozíció idejének viszonya a normál fényciklushoz (79), az érintett retinális terület lokalizációja (77), a stressz- és szexuálhormonok szintje (80,81) és az expozíció előtti fényviszonyok (82,83). Akut fénykárosodásban megemelkedik az endogén citokinek (84-86) és egyéb retinális fehérjék (87-89) szintje. Meg kell még említeni a növekedési hormonokat és a

citokineket (90-94), melyek bizonyos védelmet nyújtanak a retina fénystressz okozta apoptózisa ellen.

Noell és Albrecht (13) korai munkáikban beszámoltak arról, hogy a sötétben nevelkedett albínó patkányok sokkal súlyosabb retinakárosodást szenvedtek, mint azok az állatok, akik ciklikus fényviszonyok (12 óra világos, 12 óra sötét) között éltek. A későbbiekben Penn és munkatársai (95) leírták, hogy az erős fényben (800 lux) született és nevelkedett albínó patkányok védettek voltak a fénykárosodással szemben, míg a félhomályban (5 lux) élő társaik nem. A két csoport biokémiai és morfológiai paramétereinek tanulmányozása rámutatott, hogy az erős fény hatására fokozódott az antioxidáns hatású C és E vitamin, valamint 3 glutation (GSH) enzim: a GSH peroxidáz, a GSH S-transzferáz és a GSH reduktáz termelődése. Huang és mtsai (96) szintén azt tapasztalták, hogy a 400 lux ciklikus fényviszonyok között nevelt patkányok védelmet élveztek a fénystresszel szemben. Ezekben az állatokban az ATP szintetáz-6, a citokrom c oxidáz-III és a NADH dehidrogenáz-3 termelődése csökkent az 5 luxban tartott állatokéhoz képest.

Ugyanakkor a dokozohexánsav (DHS, 22:6n3) szintje, mely a pálcikák külső szegmentjének membránjában legnagyobb mennyiségben jelenlévő többszörösen telítetlen zsírsav, nagymértékben csökkent a világosban tartott állatokban. Ugyancsak csökkent a lipid kettősrétegben a rodopszin mennyisége. Számtalan morfológiai eltérést is találtak a világosban nevelkedett patkányok retinájában. A pálcikák külső szegmense megrövidült és rendezetlenül helyezkedett el, súlyos sejtkárosodás jeleit mutatta (95,97). Ezek az adaptáció jelei és pár hét alatt teljesen megszűnnek, ha az állatot visszahelyezzük gyenge, ciklikus fénybe (98). Ezek az adatok alátámasztják Penn és Williams (99) "fotosztázis" elméletét, mely szerint az állatok retinája biokémiailag és morfológiailag úgy tud alkalmazkodni, hogy minden nap bizonyos, konstans mennyiségű fotont fogadjon be.

Néhány évvel ezelőtt megalkották a “metabolikus stressz” fogalmát annak magyarázatára, hogy az erős fényben nevelkedett állatok retinája miért élvez védelmet (100,101). Röviden arról van szó, hogy minden olyan stressz, ami a retinát éri és a fotoreceptorok károsodásához vezethet, elindít egy választ, mely vagy az endogén neuroprotektív mehanizmusok aktiválódásához, vagy azon folyamatok visszaszorításához vezet, melyek fogékonyak a stressz károsító hatására. Példa erre a reakcióra azoknak a patkányoknak az esete, melyeket a fényexpozíció előtt néhány nappal a félhomályból erős fényre helyeztek át és retinájukban megemelkedett a bFGF (102,103) és a CNTF (103) szintje. Olyan egereknél pedig, melyeket a fénystressz előtt átmenetileg hypoxiássá tettek, kisebb mértékű volt az apoptózis (104).

A retina degenerációk kutatásában zömmel patkányokat alkalmaznak, pedig az egereknek számos előnyük van. Génállományuk könnyen manipulálható és a Mouse Genome Project-en keresztül óriási mennyiségű információhoz lehet hozzáférni. Ezenkívül a retinadegenerációnak számos genetikai egérmodellje van és jelenleg a microarray analízis informatívabb egereknél, mint patkányoknál. Ez a magyarázata annak, hogy a megvilágítási környezet hatására, fokozott vagy csökkent mértékben termelt neuroprotektív faktorok vizsgálatánál inkább egerek alkalmazását terveztük.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk retina degeneráció során a fotoreceptorokban lejátszódó mehanizmusok pontosabb megértése volt. Két kémiai anyag adagolásával, illetve az állatok környezeti

fényviszonyainak megváltoztatásával megpróbáltuk megállítani, illetve lassítani ezt a folyamatot.

2.1 Az antioxidatív L-NAME protektív hatásának vizsgálata vad típusú és rodopszin mutációban szenvedő albínó patkányokban: korábbi közlemények arról számoltak be, hogy az L-NAME, a NOSZ kompetitív inhibitora megvédte az albínó patkányok retináját az erős fény okozta degenerációtól. Célunk kettős volt. Az fenti eredményének megerősítése és annak vizsgálata, hogy ez a protektív hatás kiterjed-e retina degenerációban szenvedő állatokra is.

2.2 A progeszteron neuroprotektív hatását teszteltük hím albínó patkányokban:

humán statisztikai adatok és állatkísérletes adatok támasztják alá a női nemihormonok védő hatását cardiovascularis, cerebrovascularis és egyéb neurológiai betegségekben.

Kísérletes körülmények között, erős, folyamatos (korábbi kísérletekben a pálcikák apoptózisát okozó) fényhatásnak kitett hím, albínó patkányokban vizsgáltuk, vajon ez a hatás érvényesül-e a retinában lejátszódó fotoreceptor pusztulásra is.

2.3 A környezeti fényviszonyok befolyását elemeztük a retina degeneráció súlyosságában:

irodalmi adatok szerint az erős ciklikus megvilágításban nevelkedett albínó patkányok védettek a fénystressz okozta apoptózissal szemben. Jelenlegi munkánkban azt vizsgáltuk, fenn áll-e ez az effektus albínó egereknél is.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK:

3.1 Anyagok:

N^G-nitro-L-arginin metil észter (L-NAME), N^G –nitro-D-arginin metil észter (D-NAME), PBS (phosphate buffered saline) progeszteron (4-pregnen-3,20 dion) és vivôanyagként használt benzilalkohol (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Az állatok altatásához használt szerek: Xylazin , Ketamin (VEDCO, Inc., St. Joseph, MO,USA)

A pupilla tágítására AK-Dilate 10 % szemcseppet (Alcon, Fort Worth, TX, USA) alkalmaztunk.

TUNEL assay : S7101 ApopTag plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit-tel (Intergen Company, Purchase, NY, USA) viteleztük ki.

3.2 Kísérleti állatok:

Az albínó Sprague-Dawley CD vad típusú (VT) patkányokat a Harlan Company-tól (Indianapolis, IN, USA) szereztük be. A P23H és S334ter heterozigóta transzgén patkányok homozigóta P23H /3. vonal/ és S334ter /4. vonal/ hímek (Dr. M.M. LaVail- University of California, San Fransisco,CA, USA- adománya) és vad típusú albinó (ld. fent) nõstények párosodásából születtek. A BALB/c albínó egereket a Jackson Laboratóriumból (Bar Harbour, ME, USA) vásároltuk.

Az állattartás követelményei megfeleltek az ARVO és az Oklahomai Egyetem Egészségtudományi Centrum (OUHSC) által előírt követelményeknek. Az OUHSC és a Dean A. McGee Szemészeti Intézet valamennyi felhasznált protokollt ellenõrzött és jóvá hagyott. Az állatoknak- a transzgén patkányokkal végzett kísérletet kivéve- szabad hozzáférésük volt mind az eleséghez, mind a vízhez.

3.3 Fotostressz kivitelezése

3.3.1 *L-NAME védelem:* Albinó Sprague-Dawley CD kölyköket szigorúan ellenőrzött fényviszonyok között, saját állatistállónkban neveltük születésüktől fogva. A patkányokat 5 hetes korukig félhomályos szobában, ciklikus megvilágítás alatt (5-10 lux, 12 óra fény, 12 óra sötét) tartottuk, ekkor két csoportra osztottuk őket: az egyiket nagyon erős fénynek tettük ki, a másik az eredeti viszonyok között maradt. Mindkét csoporton belül az állatok egyik fele a fénybehatás megkezdése előtt 30 perccel L-NAME-t, a másik fele annak inaktív izomerjét, D-NAME-t kapott intraperitonealis injekció formájában (100 mg/kg, PBS-ben). A fénystressz 24 óráig tartott egy olyan dobozban, melynek fehér, fényvisszaverő falai voltak, 3 fluoreszcens cső (hideg fehér, 34 W) világította meg, melyek 2700 lux fényerősséget biztosítottak az állatok szemének magasságában. A fénybehatás után a patkányokat 24 órára sötétbe, ezután az eredeti, félhomályos viszonyok közé helyeztük. A kontrollcsoport egyedei szintén L-NAME ill. D-NAME injekciót kaptak, de mindvégig félhomályban maradtak. Az ERG vizsgálatokat a fénystressz előtt, ill. 2 nappal annak befejezése után végeztük (a továbbiakban: kiindulási és követéses ERG-k). A kontroll állatok tesztjét az előzőekével párhuzamosan végeztük. A patkányokat 5 nappal a fényexpozíció után leöltük, a szemeket szövettani vizsgálat céljából enucleáltuk.

3.3.2 *Progeszteron védelem:* Albínó Sprague-Dawely patkányokat tenyésztettünk és neveltünk szigorúan ellenőrzött ciklikus, félhomályos fényviszonyok között (ld. fent). Az endogén progeszteron szintézis hatásának kiküszöbölésére 5 hetes korban

a hím állatokat választottuk ki a kísérlet céljára. Az állatokat kétfelé osztottuk. Minden csoportban az állatok fele ($n=5$) intraperitoneálisan progeszteront (60mg/kg 20 μ g benzil alkoholban), a másik fél csak a vivőanyagot, (benzil alkoholt) kapott. Az injekciókat naponta adtuk de. 9 h körül, 4 napon át. A 3. injekciót 30 perccel a fénystressz megkezdése előtt, a negyediket közvetlenül annak befejezése után adtuk. A kontroll állatokat azonos időpontokban injekcióztuk, de végig a félhomályos helyiségben maradtak. A fénystressz 24 óráig tartott, 2700 lux fényerősséggel. Az állatokat megközelítőleg akkor tettük a fénydobozba, amikor egyébként is megkezdődött a nap világos ciklusa. A fénystressz letelte után a patkányok egy napot sötétben töltöttek, majd visszavittük őket a szokásos ciklikus, félhomályos szobájukba. A kiindulási ERG-eket 4 nappal a szer adagolásának megkezdése előtt, a követéses vizsgálatokat pedig 5 nappal a fénystressz befejezése után regisztráltuk. Ezután az állatokat leöltük és szemüket enucleáltuk. A kontroll állatok ERG tesztjeit és az enucleatiót a másik csoporttal párhuzamosan végeztük.

3.3.3 *Környezeti fényviszonyok szerepe:* BALB/c egereket tenyésztettünk, az előző pontban részletezett fényviszonyok között. 1 hetes korban az almok felét áttettük világos ciklikus megvilágításba (400 lux, 12 óra világos, 12 óra sötét) és a kísérlet megkezdéséig ott tartottuk őket. (Tapasztalataink szerint a tenyésztés eredményesebb és az almok népesebbek akkor, ha az egerek gyenge, ciklikus fényben párosodnak és a kölyköket is ott tartjuk legalább 1 hetes korukig.) 5 hetes korban mind a félhomályban, mind a világosban tartott egércsoportot 2 részre osztottuk, ügyelve arra, hogy mindenütt azonos számban legyenek hímek és nőstények. A fotostressznek kitett állatok 72 órát töltöttek el a már korábban leírt

fénydobozban, de a megvilágítás erőssége itt 3000 lux volt az egerek szemének magasságában. A kontrollcsoport (fénystressznek ki nem tett) egyedei mindvégig az eredeti félhomályos ill. világos szobában maradtak. A fényexpozíció után az állatok 48 órás, a kontroll-állatok 24 órás sötétadaptáción estek át, majd a bulbusokat enucleáltuk.

3.4 *P23H és S334ter transzgén patkányok vizsgálata*

Itt, a többi vizsgálattól eltérően, nem alkalmaztunk fotostresszt, mert célunk annak vizsgálata volt, hogy az antioxidatív hatású L-NAME biztosít-e védelmet a rodopszin mutáció okozta retina degenerációval szemben. Állatistálónkban 400 lux ciklikus megvilágítás alatt (12 óra világos, 12 óra sötét) transzgén patkányok születtek és nevelkedtek. A heterozigóta kölykök homozigóta P23H (3. vonal) és S334ter (4. vonal) hímek és VT (vad típusú) albinó (Sprague-Dawley CD) nőtények párosodásából születtek. 3 hetes korukban a VT, P23H és S334ter típusú állatokat 2-2 csoportra osztottuk, az egyiknek L-NAME-et, a másiknak D-NAME-t adtunk. A szert naponta, intraperitoneális injekció (100mg/kg) formájában és az ivóvízhez keverve (naponta átlagosan 40mg/kg) kapták 4 héten át. Az adagolás befejezése után ERG vizsgálatot végeztünk és 3 nappal később a bulbusokat enucleáltuk.

3.5 *Elektroretinográfia*

A sötét-adaptált patkányokat gyenge vörös fény alatt, intramusculáris injekcióban adott Xylazin (6mg/kg) és Ketamin (120mg/kg) keverékével elaltattuk. A pupillát AK-Dilate 10% szemcseppel megtágítottuk és az aktív arany elektródot a cornea felszínéhez

érintettük. A referencia elektródot a szájba helyeztük, a földelést az egyik hátsó lábra csíptettük. A Ganzfeld gömbben (LKC Technologies, Gaithersburg, MD, USA) 10 msec-os pulzusokban fehér fény villant fel. Hatvan secundumos intervallumokkal, emelkedő intenzitással 5 fényfelvillanást alkalmaztunk (-40 dB, -24 dB, -8 dB, 0 dB, 10 dB).

3.6 Szövetteni vizsgálat

Az állatokat széndioxiddal elaltattuk és cervikális csigolyadislokációval elpusztítottuk őket. Az enucleált bulbusokat paraformaldehidbe helyeztük, majd paraffinba ágyasztuk. A vertikális meridián mentén, a papilla n. optici-n (PNO) áthaladó, 5µm vastag metszeteket készítettünk, melyeket haematoxylin-eosinnal megfestettünk. Azokban a kísérletekben, ahol patkányokkal dolgoztunk a külső magvas réteg (KMR) vastagságát és a pálcikák belső (PBSZ) és külső (PKSZ) szegmensének hosszát mértük meg 0.5 mm-es távolságokban a papillától kiindulva az alsó és a felső ora serrataig. Az egérszemeken ugyanezeket a paramétereket mértük meg, de 0.33 mm-es távolságokban.

3.7 A retina kipreparálása

Az egereket gyenge vörös fény alatt elpusztítottuk és az enucleált bulbusokat PBS-t tartalmazó üvegcsében azonnal jégre helyeztük. A preparálást normál megvilágítás mellett, preparáló mikroszkóp alatt végeztük. A cornea és a lencse eltávolítása után mindkét szem retináját tompán lepreparáltuk a pigmentepithelium/choroidea/sclera rétegről. Az ideghártyát ezután -80 °C-on tároltuk a mérések megkezdéséig.

3.8 *Terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) assay*

A retinális sejtek apoptózisát TUNEL assay segítségével mutattuk ki (S7101 ApopTag plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit), a gyártó utasításának megfelelően 5µm vastag paraffinba ágyazott metszeteken. A fénystressznek kitett egereken az enucleációt azonnal, a 72 órás expozíciót követően végeztük el.

3.9 *A DNS-létra (laddering) vizsgálata*

A DNS-laddering a Donovan által korábban leírt módszerének módosításával (31), történt. Röviden, a retinát lízis-pufferben (50mM Tris-Hcl (pH 8.0), 10mM EDTA, 0.5% SDS és 0.5mg/ml proteinase K) homogenizáltuk. A homogenizátumokat fenol/kloroformmal extraháltuk, így eltávolítva a fölösleges fehérjét. A kontaminált RNS emésztését úgy végeztük, hogy inkubáltuk 20µg/ml RNáz A-val 2 órán át 37 °C-on. Végül a genomiális DNS-t 0.5µg/ml etidium bromidot tartalmazó 2%-os agaróz gélen futtattuk.

3.10 *Zsírsav-meghatározás*

Diszkontinuus szukróz gradiens centrifugálás segítségével minden pár retinából kipreparáltuk a pálcikák külső szegmensét (PKSZ). A módszert korábban Papermaster és Dryer írta le, Wiegand és Anderson módosította. A lipideket Bligh és Dyer módszere szerint kloroform/metanolban extraháltuk és metilészterré alakítottuk. A pálcikák külső szegmensének total lipidtartalmának zsírsav komponensét gáz-likvid kromatográfiával határoztuk meg (Agilent Technologies 6890N, Palo Alto, CA, USA; DB-225 kapilláris oszlop, 30m x 0.53mm I.D. x 0.5µm filmvastagság, J&W Scientific, Palo

Alto,CA,USA). A mintákat 20µl kromatográfiás grádiens nonánban oldottuk fel és 250 °C-on , 5:1-es hasítási aránnyal 3µl-t injektáltunk. Az injektáláskor a sütő hőmérséklete 160 °C volt, de később lineárisan emeltük 1 °C/perc sebességgel, amíg el nem érte a 220 °C-ot és ezen a hőmérsékleten tartottuk 5 percig. A hélium vivôgáz áramlási sebessége 39 cm/sec volt, és a láng ionizáció-detektor 270 °C-ra volt állítva. A detektor adatait számítógépen gyűjtöttük és minden görbe alatti területet integráltunk melyet a Chemstation software segítségével dolgoztunk fel (Agilent Technology).

3.11 Statisztikai analízis

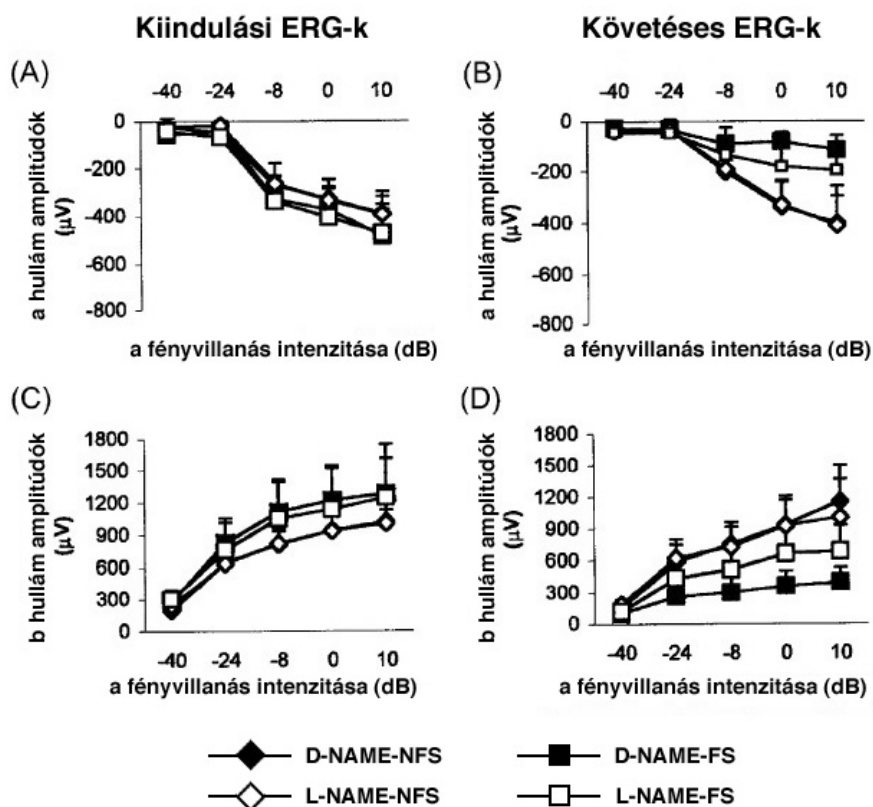
Minden esetben az átlag $\pm$ S.D értékeket tüntettük fel. Páratlan t-tesztet használtunk a különböző csoportok ERG és szövettani eredményeinek összehasonlítására és páros t-tesztet alkalmaztunk ugyanazon állat kiindulási és követéses ERG tesztjeinek összehasonlítására. Valamennyi esetben a 0,05 alatti p értékeket nyilvánítottunk szignifikánsnak. A zsírsavtartalom analízisére Scheffé tesztet használtunk.

4. Eredmények:

4.1 L-NAME adagolásával végzett vizsgálatok

4.1.1 Akut fénystressz alkalmazása

Retinális funkció: mind a négy csoportban 5 patkányon végeztünk ERG vizsgálatot. Két nappal a fénystressz megkezdése előtt végeztük a kiindulási teszteket (mind a fényexpozíciónak kitett, mind a kontrollcsoport állatain), a követéses ERG-ket pedig 2 nappal annak befejezése után regisztráltuk. Az 1. ábrán láthatóak mind a 4 kísérleti csoport a és b görbéi.

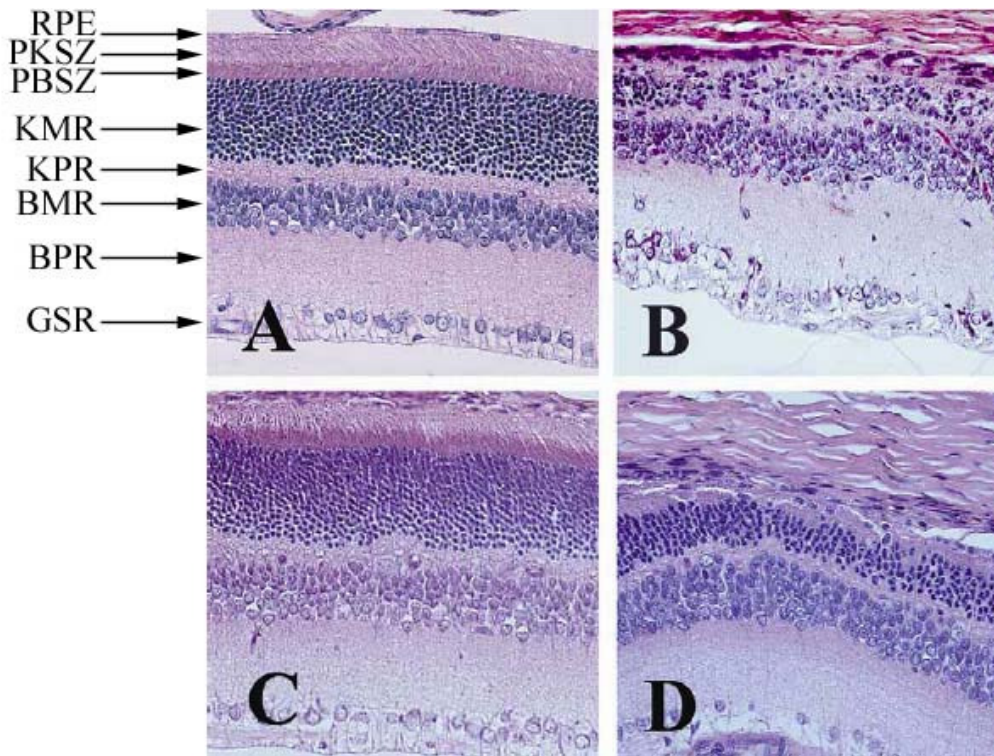


1. ábra 24 óráig tartó, 2700 lux intenzitású fénystressz előtt és után regisztrált ERG görbék. Az L-NAME-mel és D-NAME-mel végzett kezelés eredménye. (A) Kiindulási a hullám amplitudók; (B) Követéses a hullám amplitudók; (C) Kiindulási b hullám amplitudók; (D) Követéses b hullám amplitudók; Rövidítések: NFS= nem fotostresszelt; FS= fotostresszelt. () D-NAME-mel kezelt, nem fotostresszelt, () D-NAME-mel kezelt, fotostresszelt, (◊) L-NAME-mel kezelt, nem fotostresszelt, (□) L-NAME-mel kezelt, fotostresszelt. A mértékegység $\mu\text{volt} \pm \text{S.D.}$ (n=5).

A kontroll állatok kiindulási és követéses görbéi között nem találtunk eltérést (üres és teli rombuszok), ez arra utal, hogy sem az L-NAME, sem a D-NAME nem volt retina-toxikus. A 24 óráig tartó, 2700 lux intenzitású illumináció azonban a válaszok szignifikáns csökkenését okozta mindkét exponált csoportban (üres és teli négyzet). A funkciókárosodás kisebbnek

tűnik az L-NAME csoportjában, de a különbség a fénystresszelt, D-NAME-mel kezelt és fénystresszelt, L-NAME-mel kezelt patkányok ERG válaszai között nem szignifikáns.

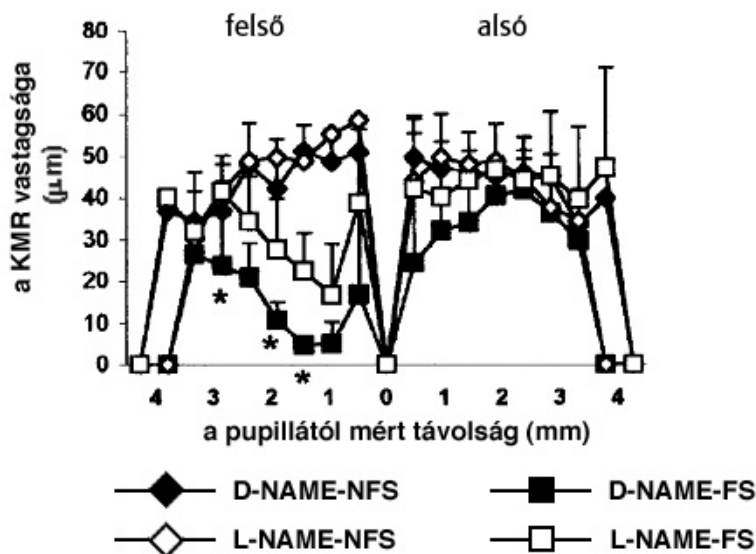
A retina szerkezete: A 4 kísérleti csoportból 1-1 állat retinája a 2. ábrán látható.



2.ábra A patkányok retinájából 2700 lux intenzitású, 24 órán át tartó fénystressz után készített metszetek fénymikroszkópos képe. Az L-NAME-mel és D-NAME-mel végzett kezelés eredménye. A felvételek a felső retinafélben, a vertikális meridián mentén, a papilla n. optici-től 1 mm-re készültek. Rövidítések: RPE: retinális pigment epithelium, PKSZ: pálcikák külső szegmentuma, PBSZ: pálcikák belső szegmentuma, KMR: külső magvas réteg, KPR: külső plexiform réteg, BMR: belső magvas réteg, BPR: belső plexiform réteg, GSR: ganlionsejt réteg. (Haematoxylin-eosin festés) (A) D-NAME-mel kezelt, nem fotostresszelt, (B) D-NAME-mel kezelt, fotostresszelt, (C) L-NAME-mel kezelt, nem fotostresszelt, (D) L-NAME-mel kezelt, fotostresszelt.

A metszeteket a retina felső részén, a papillától kb. 1 mm-re készítettük. A nem exponált, D-NAME-mel ill. L-NAME-mel kezelt állatok retinája ép maradt (2. ábra, A és C). A fénystressz a fotoreceptorok számának szignifikáns csökkenéséhez vezetett mindkét drog adása mellett (2. ábra, B és D), de az L-NAME-mel kezelt állatoknál kisebb a veszteség (2. ábra D). Ezeknél a patkányoknál a külső magvas réteg (KMR) 6-7 sejtmagot tartalmaz, míg a

D-NAME-mel kezeltéknél csak 0-5-öt és a KMR szerkezete szabálytalan. A retina vertikális meridiánjának 0.5 milliméterenkénti vizsgálata azt mutatta, hogy a pusztulás a felső félen volt súlyosabb (3. ábra).

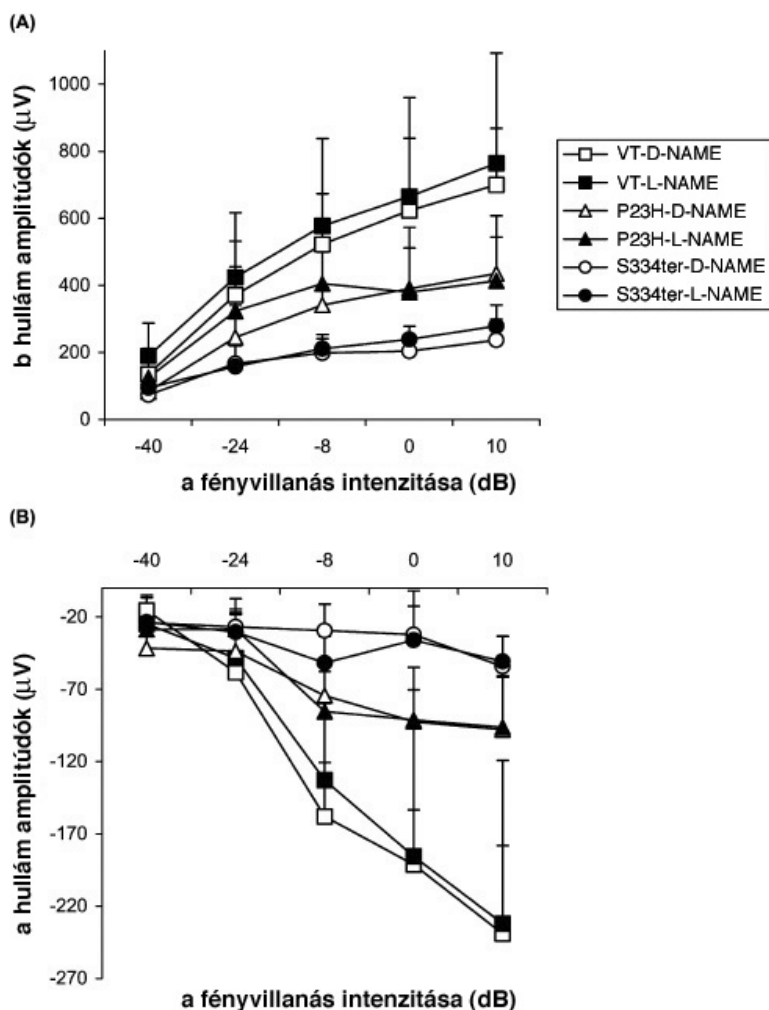


3.ábra A külső magvas réteg (KMR) vastagsága a papilla n. optici-tól mért különböző távolságokban. A méréseket 0.5 mm-enként végeztük a vertikális meridián mentén az alsó és a felső ora serrataig. Az eredmények átlagvastagságot $\pm$ S.D. jelentenek (n=5). Rövidítések: NFS= nem fotostresszelt; FS= fotostresszelt. () D-NAME-mel kezelt, nem fotostresszelt, () D-NAME-mel kezelt, fotostresszelt, (◇) L-NAME-mel kezelt, nem fotostresszelt, (□) L-NAME-mel kezelt, fotostresszelt. A * azokat a retinális pontokat jelöli, ahol a D-NAME-mel és az L-NAME-mel kezelt csoportok KMR vastagsága között szignifikáns különbséget ($p < 0.05$) mértünk.

Minden állatnál kiszámoltuk a KMR átlagos vastagságát mindkét hemiszfériumban. A D-NAME csoport a felső retinafélben a kontroll állatok KMR vastagságának csak a 35%-át őrizte meg, míg ez az érték az L-NAME csoportban 64% volt. Azokat a retinális pontokat, ahol a különbség statisztikailag szignifikáns volt, az ábrán csillaggal jelöltük. Az alsó retinafélben a KMR vastagsága a D-NAME csoportban 77%, az L-NAME-mel kezelt csoportban 99% volt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az L-NAME morfológiai védelmet nyújt akut fénystressz esetén.

4.1.2. A transzgén patkányok vizsgálata

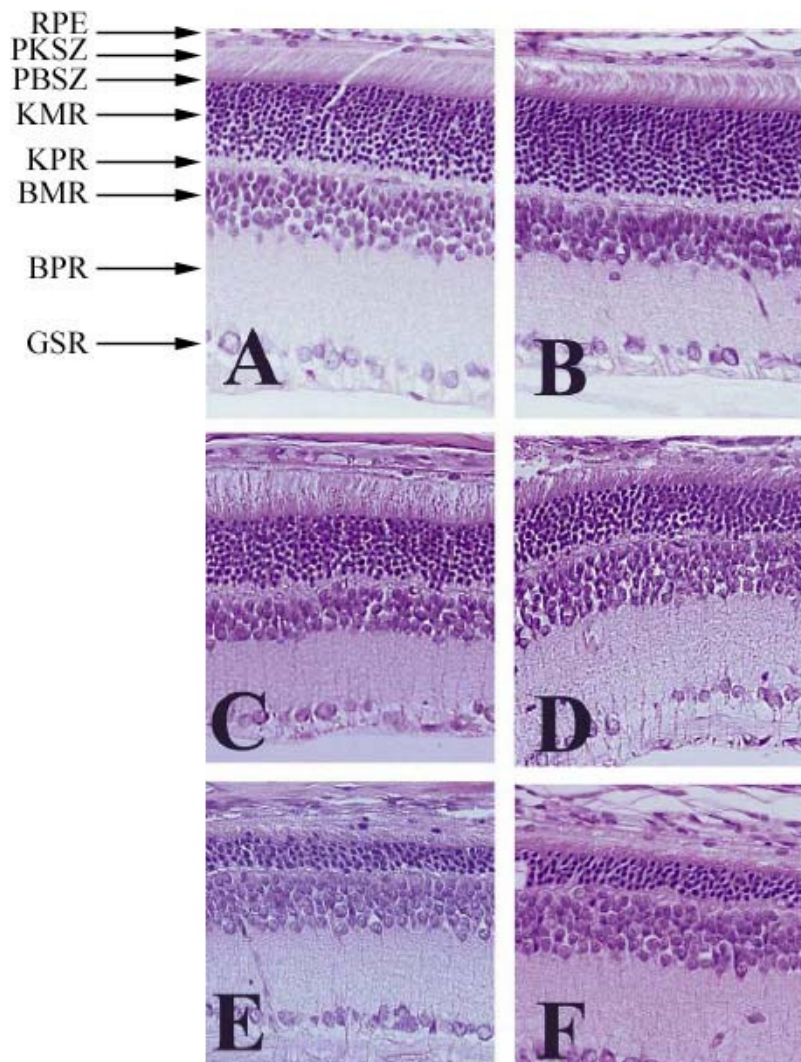
Retinális funkció: Csoportonként 6 állat ERG vizsgálatát végeztük el 1 nappal a szer utolsó adagjának beadása után. Az a és b görbéket a 4. ábrán mutatjuk be.



4.ábra. A D-NAME-mel vagy L-NAME-mel 4 héten át kezelt patkányok ERG görbéi. (A) b hullámok, (B) a hullámok. Rövidítés: VT=vad típusú. ($\square$) VT, D-NAME kezelt, ($\circ$) VT, L-NAME kezelt, ($\triangle$) P23H, D-NAME kezelt, ($\circ$) P23H, L-NAME kezelt, ($\bullet$) S334ter, D-NAME kezelt, ($\bullet$) S334ter, L-NAME kezelt. A mértékegység μV volt $\pm$ S.D. (n=6).

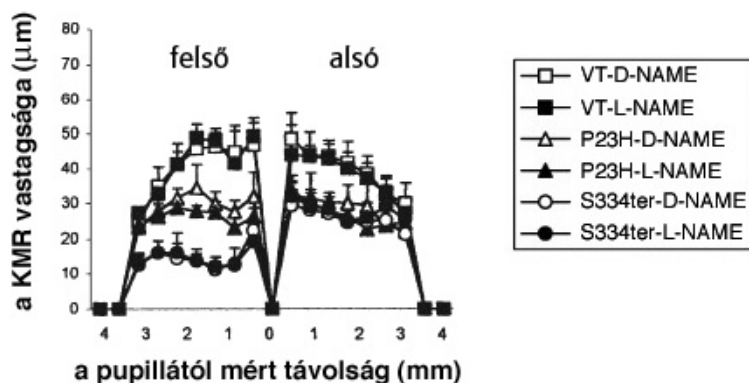
Az ERG görbék a várakozásnak megfelelően alakultak: a P23H és S334ter transzgén patkányok regisztrátumainak amplitúdói szignifikánsan alacsonyabbak, mint a vad típusú kontroll állatoké. A két transzgén vonal közül az S334ter-nél volt súlyosabb a funkcióvesztés. Az azonos típusú transzgén patkányok adatait összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy az L-NAME adagolása nem biztosított szignifikáns funkcionális védelmet a D-NAME-hez viszonyítva.

A retina szerkezete: A VT, P23H és S334ter patkányok retinájának morfológiai vizsgálata az ERG eredményei által előrejelzett eredményt hozta. A legnagyobb fotoreceptorsejt veszteség a 2 transzgen vonalban volt, azok közül is az S334ter-ben a legsúlyosabb. Az 5. ábrán látható a 6 csoportból 1-1 állat retinájának fénymikroszkópos képe.



5.ábra Hét hetes, 400 lux ciklikus megvilágításban nevelt, 4 héten át L-NAME-mel vagy D-NAME-mel kezelt patkányok retinájának fénymikroszkópos képe. A metszetek a vertikális meridián mentén a papilla n. optici fölött 1 mm-re készültek. Rövidítések: RPE: retinális pigment epithelium, PKSZ: pálcikák külső szegmentuma, PBSZ: pálcikák belső szegmentuma, KMR: külső magvas réteg, KPR: külső plexiform réteg, BMR: belső magvas réteg, BPR: belső plexiform réteg, GSR: ganlionsejt réteg. (Haematoxylin-eosin festés) (A) VT, D-NAME kezelt, (B) VT, L-NAME kezelt, (C) P23H, D-NAME kezelt, (D) P23H, L-NAME kezelt, (E) S334ter, D-NAME kezelt, (F) S334ter, L-NAME kezelt.

A metszeteket itt is a felső félben, a papillától kb. 1 mm-re készítettük. A VT patkányok retinája mindkét szer adása mellett ép maradt (5. ábra, A és B). A 7 hetes P23H transzgén patkányoknál 8-9 fotoreceptor sejtsor megmaradt, a pálcikák belső és külső szegmense csaknem sértetlennek látszik, talán a PKSZ kicsit megrövidült (5. ábra, C és D). Nem volt különbség az L- illetve a D-NAME-mel kezelt állatok között. Súlyosabb degeneráció látható az S334ter vonalnál, ahol mindössze 3-4 sejtsor maradt és a PKSZ jelentősen megrövidült (5. ábra, E és F). Az L-NAME adása nem biztosított védelmet. A 6. ábrán, mely a KMR vastagságát ábrázolja, látható, hogy a legkifejezettebb a károsodás a felső retinafélben és az S334ter patkányoknál.



6.ábra A külső magvas réteg (KMR) vastagsága a papilla n. optici-tól mért különböző távolságokban. A méréseket 0.5 mm-enként végeztük a vertikális meridián mentén az alsó és a felső ora serrataig. Az eredmények átlagvastagságot $\pm$ S.D. jelentenek (n=6). ($\square$) VT, D-NAME kezelt, ($\blacksquare$) VT, L-NAME kezelt, ($\triangle$) P23H, D-NAME kezelt, ($\blacktriangle$) P23H, L-NAME kezelt, ($\circ$) S334ter, D-NAME kezelt, ($\bullet$) S334ter, L-NAME kezelt.

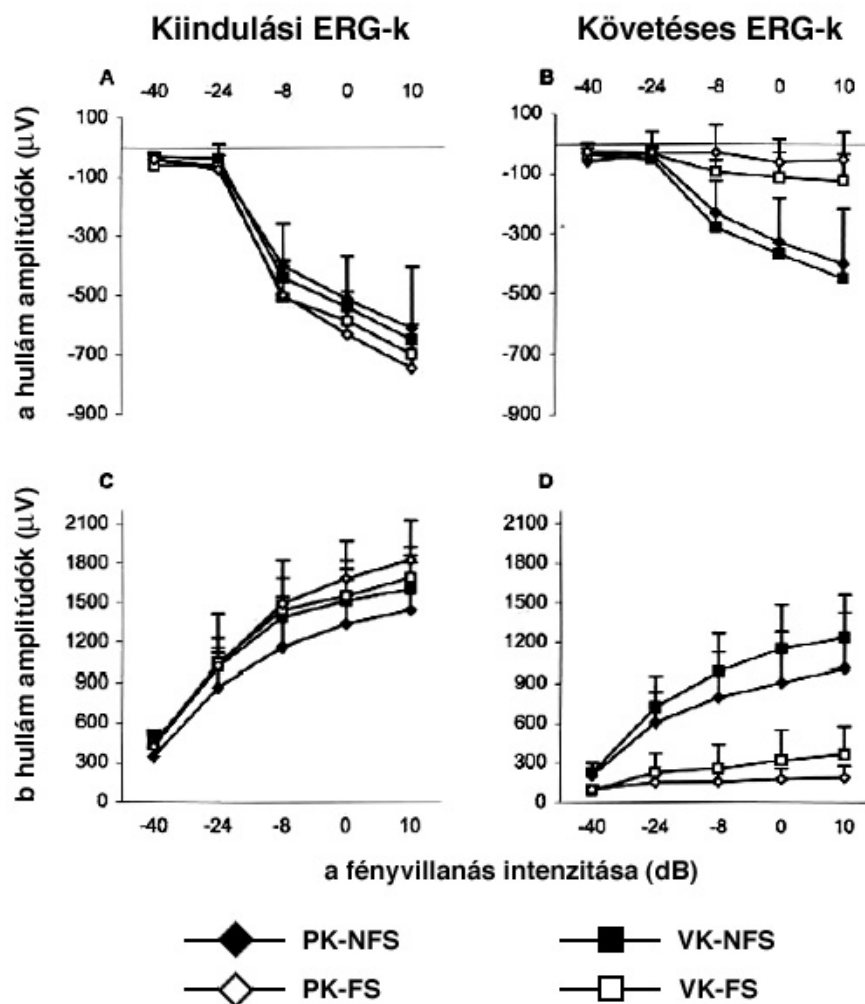
Egyik genotípusban sem volt azonban különbség az L-NAME és a D-NAME-mel kezelt állatok retinája között. Az L-NAME tehát védelmet nyújt a fotostresszel szemben, de nem protektív az általunk vizsgált kétféle rodopszinmutáció okozta örökletes retina degenerációban.

Végeztünk egy másik, hasonló kísérletsorozatot is, a különbség az volt, hogy a szereket csak ivóvízben adagoltuk (kb. 85 mg/kg-t). Ennek a megközelítésnek az a magyarázata, hogy

megpróbáltunk egy magasabb átlag szisztémás szintet biztosítani és elkerülni az L-NAME koncentrációjának hirtelen megemelkedésével járó mellékhatásokat, mint a myocardialis ischaemia (105), vérnyomásemelkedés (106) és csökkent átlagos túlélési idő (107). Ennek a kísérletnek itt be nem mutatott eredményei lényegében megegyeztek a fentiekkel.

4.2 A progeszteron hatásának vizsgálata fénystresszben

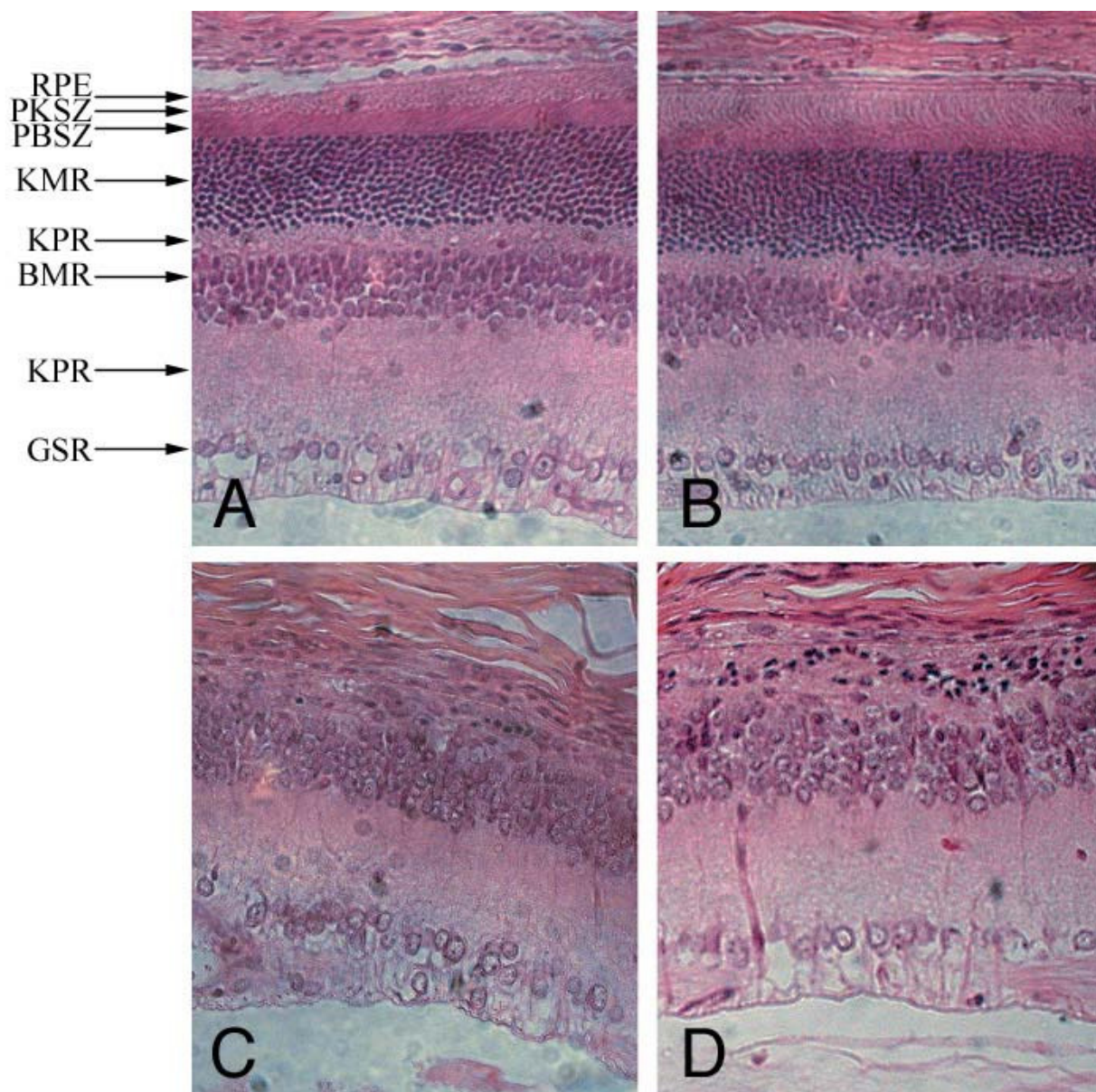
A retina funkciója: A kiindulási ERG-ket 7 nappal a fénystressz előtt végeztük, a követéset pedig 5 nappal annak befejezése után. Az 7. ábrán láthatóak a 4 csoport ERG regisztrátumai.



7.ábra 24 órán át tartó, 2700 lux intenzitású fénystressz után regisztrált ERG görbék. A progeszteron és a vivôanyag hatása. (A) Kiindulási a hullám amplitúdók; (B) Követéses a hullám amplitúdók; (C) Kiindulási b hullám amplitúdók; (D) Követéses b hullám amplitúdók; Rövidítések: NFS= nem fotostresszelt, FS= fotostresszelt, PK= progeszteronnal kezelt, VK= vivôanyaggal kezelt., () vivôanyaggal kezelt, nem fotostresszelt, () progeszteronnal kezelt, nem fotostresszelt, (□) vivôanyaggal kezelt, fotostresszelt, (✧) progeszteronnal kezelt, fotostresszelt. A mértékegység μ volt $\pm$ S.D. (n=5).

A 24 órán át tartó erős fényexpozíció az a és b hullámok amplitúdójának nagymértékű csökkenését okozta. Szignifikáns különbség ($p < 0.05$) volt a fénystresszelt és a kontroll csoport patkányainak a és b amplitúdói között. Ha azonban a fénystresszelt-progeszteronnal kezelt és a fénystresszelt-progeszteronnal nem kezelt állatok követéses ERG eredményeit hasonlítottuk össze, azt tapasztaltuk, hogy itt a különbség statisztikailag nem szignifikáns (a hullámok: $p = 0.12$, b hullámok: $p = 0.08$). Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy a progeszteron adása nem nyújt funkcionális védelmet fénystressz okozta retinakárosodással szemben.

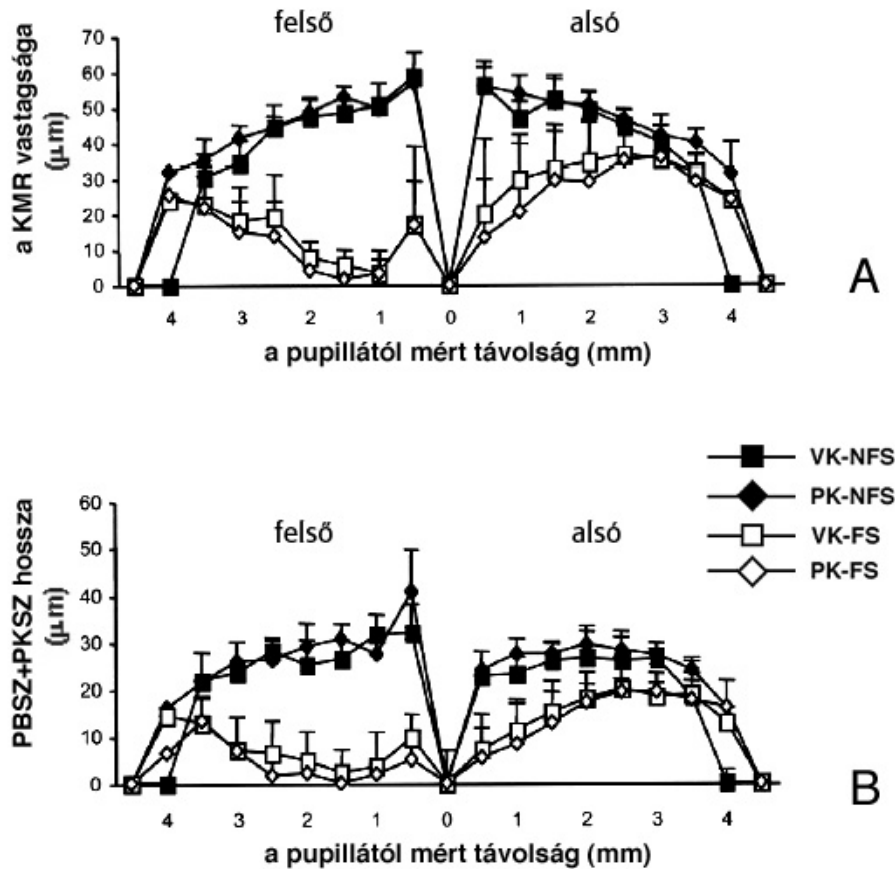
A retina szerkezete: A felső retinafélben, a papillától ~ 1 mm-re készített felvételek a 8. ábrán láthatóak.



8. ábra A patkányok retinájának fénymikroszkópos képe. A felvételek a felső retinafélben, a vertikális meridián mentén, a papilla n. optici-tól 1 mm-re készültek. Rövidítések: RPE: retinális pigment epithelium, PKSZ: pálcikák külső szegmentuma, PBSZ: pálcikák belső szegmentuma, KMR: külső magvas réteg, KPR: külső plexiform réteg, BMR: belső magvas réteg, BPR: belső plexiform réteg, GSR: ganlionsejt réteg. (Haematoxylin-eosin festés) (A) vivőanyaggal kezelt, nem fotostresszelt, (B) progeszteronnal kezelt, nem fotostresszelt, (C) vivőanyaggal kezelt, fotostresszelt, (D) progeszteronnal kezelt, fotostresszelt.

A nem exponált csoport egyedeinek retinája ép volt, függetlenül attól, hogy progeszteron- vagy csak vivőanyag injekciót kaptak (8. ábra A és B). A fénystresszelt állatok retinája azonban súlyosan károsodott (8. ábra, C és D). A pálcikák belső és

külső szegmense megrövidült és szabálytalan alakú. A KMR vékony, mindössze 2-3 sejtmagsor maradt meg. Megmértük a KMR vastagságát és a pálcikák belső + külső szegmensének hosszát (PBSZ+PKSZ) a vertikális meridián mentén a papillától az ora serratáig mindkét irányba. A 9. ábra azt mutatja, hogy a károsodás mindkét fényexponált csoportban a felső retinális régióban a legkifejezettebb.



9. ábra (A) a külső magvas réteg (KMR) vastagsága, (B) a pálcikák belső (PBSZ) + külső szegmensének (PKSZ) hossza a papilla n. optici-től mért különböző távolságokban. A méréseket 0.5 mm-enként végeztük a vertikális meridián mentén az alsó és a felső ora serratáig. Az eredmények átlagvastagságot/ átlaghosszat $\pm$ S.D. jelentenek (n=5). Rövidítések: NFS= nem fotostresszelt, FS= fotostresszelt, PK= progeszteron kezelt, VK= vivőanyaggal kezelt., () vivőanyaggal kezelt, nem fotostresszelt, () progeszteronnal kezelt, nem fotostresszelt, (□) vivőanyaggal kezelt, fotostresszelt, (◇) progeszteronnal kezelt, fotostresszelt.

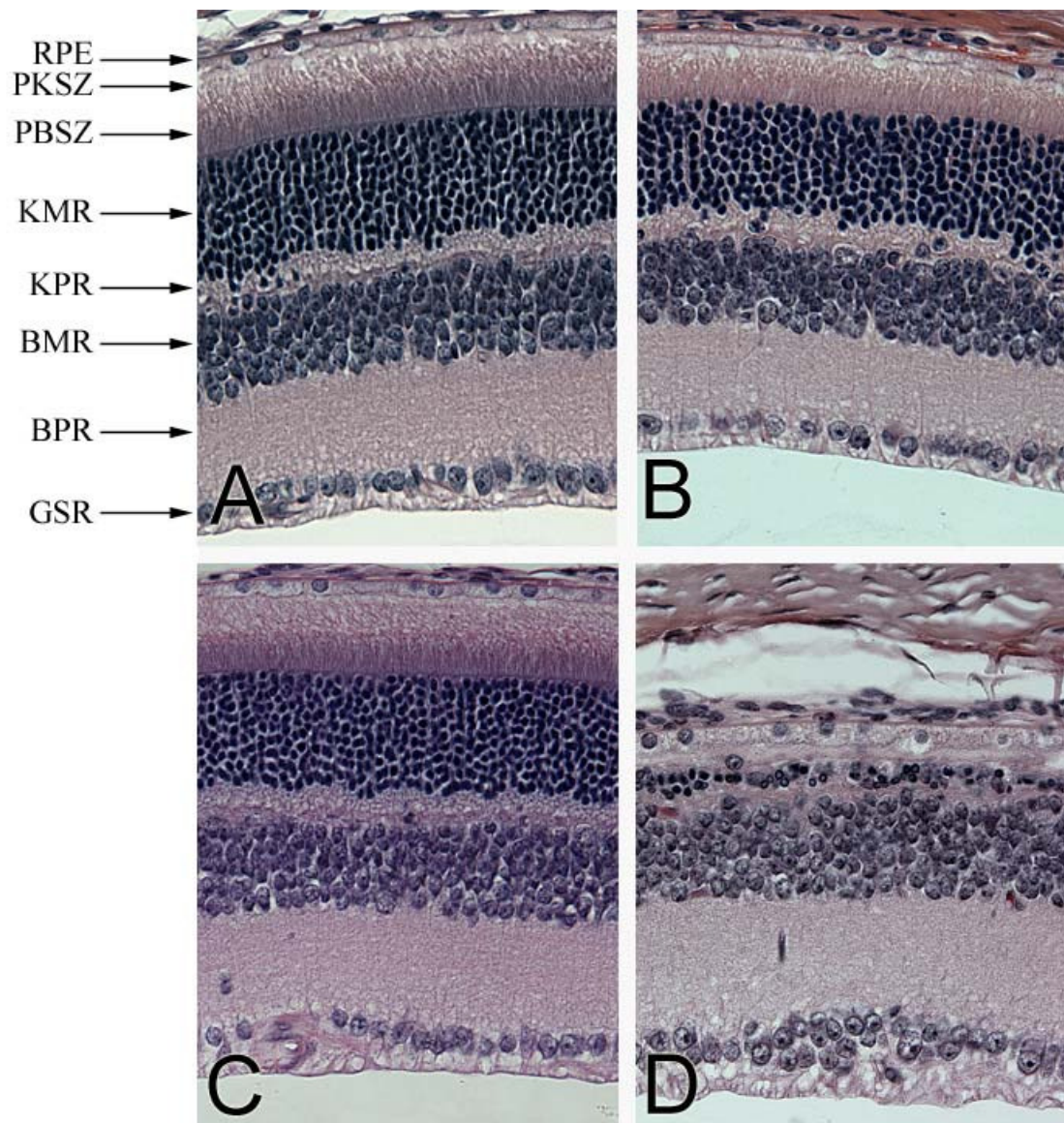
Kiszámoltuk az átlagos KMR vastagságot és PBSZ+PKSZ hosszúságot. A különbség a progeszteronnal kezelt és exponált, valamint a vivőanyaggal kezelt és exponált

patkányok adatai között nem volt szignifikáns (KMR: $p=0.61$, PBSZ+PKSZ: $p=0.51$).

A fenti eredmények az elektrofiziológiai teszt adatait támasztják alá és együtt azt bizonyítják, hogy a progeszteron nem protektív erős fény okozta retina degenerációval szemben.

4.3 A környezeti fényviszonyok befolyásának elemzése

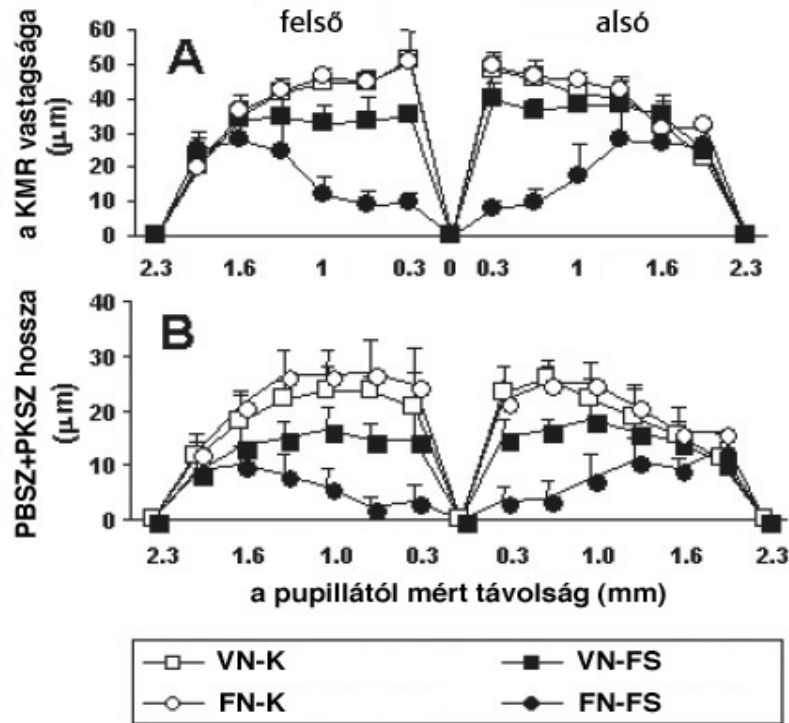
A retina szerkezete: A fénymikroszkópos felvételeken nem találtunk különbséget a 400 illetve az 5 lux ciklikus megvilágítási viszonyok között született és nevelkedett, 5 hetes albínó egerek retinája között (10. ábra A és C).



10. ábra ábra: Az egerek retinájának fénymikroszkópos képe. A metszetek a felső retinafélben, a vertikális meridián mentén, a papilla n. optici-tól 1 mm-re készültek. Rövidítések: RPE: retinális pigment epithelium, PKSZ: pálcikák külső szegmentuma, PBSZ: pálcikák belső szegmentuma, KMR: külső magvas réteg, KPR: külső plexiform réteg, BMR: belső magvas réteg, BPR: belső plexiform réteg, GSR: ganlionsejt réteg. (Haematoxylin-eosin festés) (A) világosban nevelt, kontroll, (B) világosban nevelt, fotostresszelt, (C) félhomályban nevelt, kontroll, (D) félhomályban nevelt, fotostresszelt.

A bemutatott részletek a patkányokban legfényérzékenyebb területen (77.), a papilla fölött 1 mm-rel helyezkednek el. A pálcikák külső szegmense ép és szabályos, a KMR-ben 11-12 sejtsor látható. A papillától kiindulva, az alsó és felső ora serrataig

0.33 mm-enként kiszámoltuk a KMR átlagos vastagságát és a PBSZ+PKSZ átlagos hosszát. Nem volt szignifikáns különbség a két csoport adatai között: ONL $p=0.44$, PBSZ+PKSZ $p=0.13$ (11. ábra).

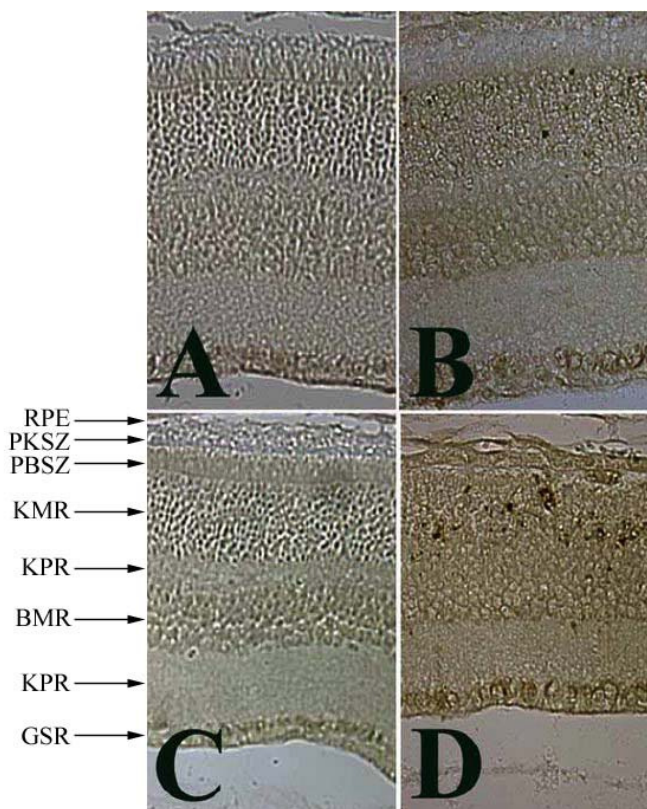


11. ábra A ciklikus környezeti fényviszonyok hatása a fotoreceptorok fénystressz okozta apoptózisára. KMR vastagság (A) és PBSZ+PKSZ hossz (B) a PNO-tól mért különböző távolságokban. A méréseket 0.33 mm-enként végeztük a vertikális meridián mentén az alsó és a felső ora serratáig. Az adatok átlagvastagságot $\pm$ S.D. jelentenek ($n=6-13$). Rövidítések: VN=világosan nevelt, FN=félhomályban nevelt, K=kontroll, FS=fotostresszelt. ($\square$) világosan nevelt, kontroll, ($\circ$) világosan nevelt, fotostresszelt, ($\bullet$) félhomályban nevelt, kontroll, ($\square$) félhomályban nevelt, fotostresszelt.

A 72 órán tartó, 3000 lux intenzitású fénnel elvégzett expozíció azonban kifejezett károsodást okozott mindkét kísérleti csoportban, de a félhomályban tartott egereknél volt súlyosabb a pusztulás. A világosan tartott egerek retinájában csak a KMR jelzett elvékonyodását és a PKSZ mérsékelt megrövidülését láttuk (10. ábra B). Az ugyancsak világosan nevelt, de fénystressznek ki nem tett állatok retinájával összehasonlítva, az átlagos KMR vastagság (11. ábra) 17%-kal ($p<0.0001$), az átlagos

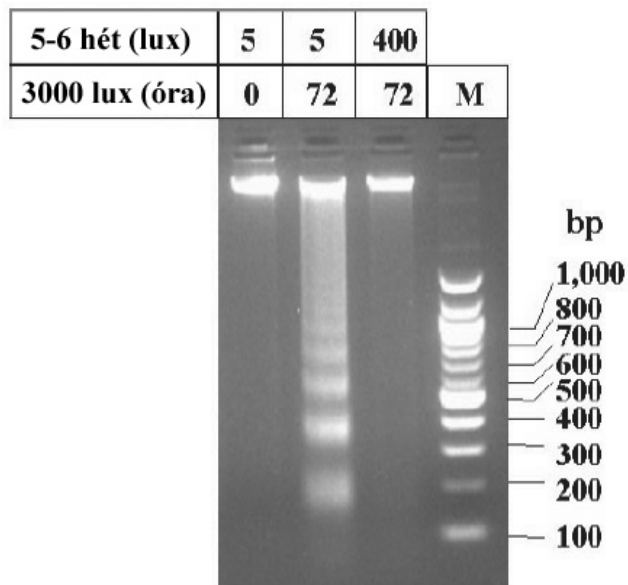
PBSZ+PKSZ hossz 28%-kal ($p<0.0001$) csökkent. A félhomályban nevelt egerek retináján azonban drámai fotoreceptor pusztulás látható, a megmaradt magok többsége piknotikus, a PKSZ nagymértékben károsodott (10. ábra D). A gyenge fényben nevelt kontroll egerekkel összehasonlítva az átlagos KMR vastagság 59%-kal ($p<0.0001$), az átlagos PBSZ+PKSZ hossz pedig 71 %-kal csökkent ($p<0.0001$, 11. ábra). A két fényexponált csoportot összevetve azt találtuk, hogy a félhomályban tartott állatoknál az átlagos KMR vastagság 50 %-kal ($p<0.0001$), az átlagos PBSZ+PKSZ hossz pedig 56 %-kal ($p<0.0001$) volt kevesebb mint a világosban nevelt, fényexponált állatoknál.

A környezeti fényviszonyok hatása az apoptózisra: Hogy jobban megismerjük az egyes kísérleti csoportokban végbemenő apoptózis mértékét, a 72 órás fénystressz letelte után a bulbusokat azonnal enucleáltuk és TUNEL assay-t végeztünk (12. ábra).



12. ábra A ciklikus környezeti fényviszonyok és a fotostressz hatása a fotoreceptorok TUNEL-jelölésére. Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) után készített fénymikroszkópos felvételek. A metszetek a felső retinafélben, a vertikális meridián mentén, a papilla n. optici-től 1 mm-re készültek. Rövidítések: RPE: retinális pigment epithelium, PKSZ: pálcikák külső szegmentuma, PBSZ: pálcikák belső szegmentuma, KMR: külső magvas réteg, KPR: külső plexiform réteg, BMR: belső magvas réteg, BPR: belső plexiform réteg, GSR: ganlionsejt réteg. (A) világosban nevelt, kontroll, (B) világosban nevelt, fotostresszelt, (C) félhomályban nevelt, kontroll, (D) félhomályban nevelt, fotostresszelt.

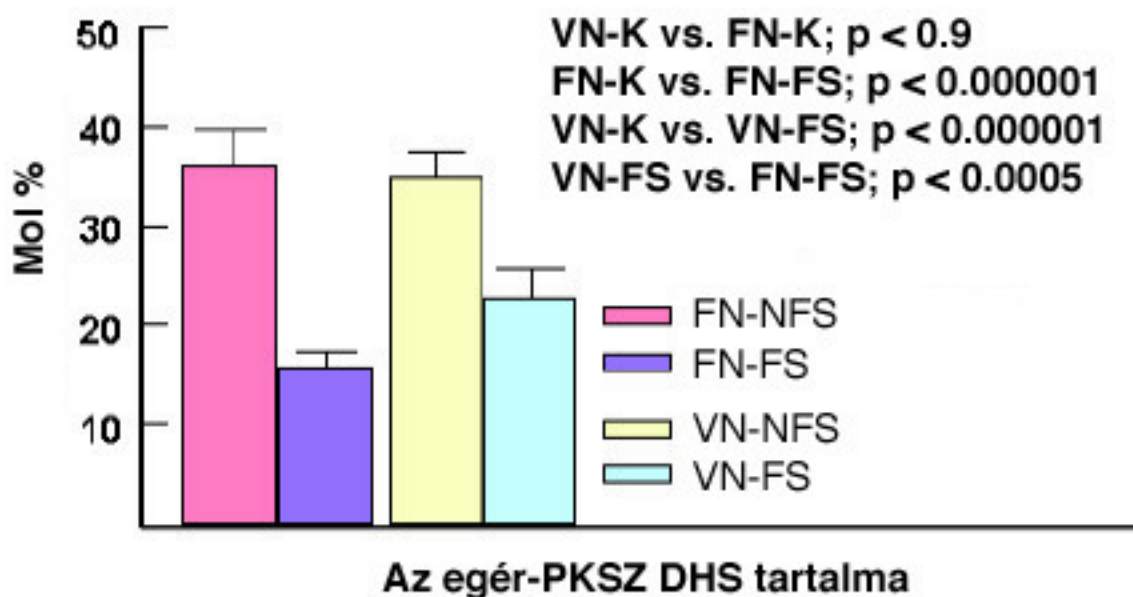
Sem a halvány fényben, sem a világosban tartott kontroll egerek retinájában nem találtunk TUNEL-pozitív sejteket (12. ábra, A és C). Ezzel szemben mindkét fotostresszelt csoportnál ábrázolódtak TUNEL-pozitív sejtek, a félhomályban nevelkedetteknél nagyobb számban (12. ábra B és D). Csoportonként 3-4 állatnál végeztük el a tesztet, hasonló eredménnyel. A neutrális gél elektroforézissel meghatározott DNS fragmentációs minta megerősítette a TUNEL assay eredményét (13. ábra).



13.ábra A ciklikus környezeti fényviszonyok és a fotostressz hatása a retinális DNS feltöredezésére. DNS fragmentációs minta félhomályban és világosban nevelt egerekben. A megvilágítás erősségét és az expozíciós időket a gél felső részén jelöltük. A ciklikus félhomályban nevelt, fénystressznek ki nem tett egereket használtuk kontrollként és genomikus DNS-üket a bal oldali oszlopra vittük fel. Az M oszlop 100bp DNS markert tartalmaz.

A ciklikus, gyenge fényviszonyok között tartott egereknél nagyobb mértékű volt a DNS laddering, mint a ciklikus, erős megvilágításban nevelkedetteknél.

A környezeti fényviszonyok hatása a pálcikák külső szegmensének DHS tartalmára: Az 14. ábra a négy kísérleti csoport pálcikájának külső szegmensében mért DHS tartalmat mutatja.



14. ábra A ciklikus környezeti fényviszonyok és a fotostressz hatása a pálcikák külső szegmens-membránjának zsírsav összetételére. A 4 kísérleti csoport pálcika külső szegmensének zsírsav összetétele. A méréseket az egerek mindkét retinájából kipreparált pálcika külső szegmentből végeztük (n=8). Rövidítések: VN=világosban nevelt, FN=félhomályban nevelt, K=kontroll, FS=fotostresszelt.

A membránokat a fénystresszelt állatoknál 48 órás, a kontroll egereknél 24 órás sötétadaptációt követően preparáltuk ki. A legmagasabb DHS szintet a két kontrollcsoportban mértük és nem volt szignifikáns különbség a félhomályban nevelt (36 mol% DHS) és a világosban tartott (35 mol% DHS) egerek adatai között. A 72 órán át tartó folyamatos fényexpozíciót követően a DHS tartalom mindkét exponált csoportban szignifikánsan csökkent a kontroll egyedekkel összehasonlítva (5. ábra). A nagyobb mértékű csökkenés a félhomályban tartott állatoknál jelent meg (16 mol% 23 mol%-kal szemben).

5. Megbeszélés

5.1 L-NAME adagolásával végzett vizsgálatok

Bár a fotoreceptorok pusztulásához vezető molekuláris lépések pontosan még nem tisztázottak, bizonyos hipotézisek szerint az erős fény elnyelődése a fotoreceptor sejtek károsodását okozó szabad gyökök felszabadulásához vezet. A nNO ilyen szabadgyök, mely normálisan a fototranszdukciós kaszkádon keresztül fejti ki hatását a guanilát cikláz aktiválása révén. Ez az enzim alakítja a guanozin trifoszfátot (GTP) ciklikus guanozin monofoszfáttá (cGMP). Ennek a folyamatnak csökkent aktivitása valószínűleg szerepet játszik a fénykárosodás okozta fotoreceptorpusztulásban (31).

A mi kísérletünkben Az L-NAME az inaktív izomer D-NAME-mel szemben megvédte a pálcikákat a fénystressztől. Ez megerősíti Goureau és mtsai (18) valamint Donovan és mtsai (31) közlését, mely szerint a NOSZ gátlók neuroprotektív hatást fejtenek ki a retinában. Az említett munkák egyikében sem alkalmaztak ERG-t a funkcionális protekció vizsgálatára. Mi azt állapítottuk meg, hogy az L-NAME a D-NAME-nél jobban megőrizte a retina működését, de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. Ennek egyik magyarázata az lehet, hogy a védőhatás csak a felső hemiszfériumban volt szignifikáns és ez a terület talán kicsi ahhoz, hogy érvényesüljön a “ tömegválaszt” reprezentáló ERG-ben. Nagyszámú állatcsoporton elvégzett fokális ERG informatívabb lenne ebben a kérdésben. Emellett, a mi eredményeinkhez hasonlóan nem találtak megtartott ERG választ jelentős morfológiai védelem mellett olyan vizsgálatokban, ahol különböző retina degenerációk (rds, P23H, S334ter) állatmodelljeinek többféle növekedési faktort (FGF-2, FGF-5, FGF-18 és CNTF) adtak (108-110). Sôt, Liang és mtsai (110) CNTF adagolása után

alacsonyabb ERG válaszokat regisztráltak, mint a kontroll csoport egyedeinél. A jelenség tisztázása további kutatást igényel.

Annak vizsgálatára, hogy az L-NAME pozitív hatása kiterjed-e rodopszin mutáció miatt létrejött örökletes retina degenerációkra, két transzgén vonalat használtunk. A P23H vonalban a 23. helyen pontmutáció van, a prolint hisztidin helyettesíti. Ez a rodopszin hibás összehajtogatásához, defektív PKSZ-korong szintéziséhez és korong instabilitáshoz vezet (111). Az S334ter patkányoknál a rodopszin C-terminális 15 aminosavja hiányzik, mely miatt hiányzik a rodopszin kináz két szubsztrátja, a szerin és a treonin. Így meghiúsul az arresztin kötődése, a transzdukciós kaszkád inaktíválódása (112). Mi azért választottuk a P23H/3 és az S334ter/4-es vonalat, mert a degeneráció sebessége elég lassú ahhoz, hogy a terápiás beavatkozást elhalaszthassuk az elválasztásig (3 hét), de elég gyors ahhoz, hogy 4 hét kezelés után lemérhessük a neuroprotektív hatást. Az állatok 400 lux fényben születtek és növekedtek, mert ismeretes, hogy a P23H mutáns patkányok és egerek retinája gyorsabban degenerálódik erős megvilágításban (115).

Mi sem szerkezeti, sem működésbeli különbséget nem találtunk az L-NAME-mel illetve D-NAME-mel kezelt csoportok között, egyik transzgén genotípusban sem. A NOSZ gátlása a mi kísérleti körülményeink között semmilyen védelmet nem nyújtott a P23H és az S334ter rodopszin mutáció okozta retinaelfajulás ellen.

Az L-NAME-hez hasonlóan a FBN is hatásos volt fénysterssz ellen (24), de ineffektív örökletes retina degenerációban (114). Ugyanakkor bizonyos ágensek, főleg növekedési faktorok protektívek mindkét retina degeneráció modellben (108-110). Ez a differenciált gyógyszerhatás hasznos információkat nyújthat a specifikus

mutációkban lezajló sejtpusztulásról. Például, mivel a FBN és az L- NAME nem nyújt védelmet a degeneráció ellen P23H és S334ter patkányokban, valószínűtlen, hogy a szabadgyök mehanizmus szerepet játszana az elfajulásban. Green és mtsai (112) munkájában az szerepel, hogy a sötétben való nevelkedés az S334ter állatoknál nem lassítja a degeneráció ütemét. Ugyanakkor a P23H egereknél a félhomályban/sötétben tartás fékezi a sejtpusztulás sebességét (113). Ez cáfolni látszik azt az elméletet, hogy az S334ter állatokban a transzdukciós kaszkád konstitutív aktiválódása okozná a fotoreceptor sejtek pusztulását. Azt találták, hogy a ciklikus félhomályban nevelt S334ter patkányok kevésbé érzékenyek a fénystresszre, mint a VT és P23H egyedek (Ranchon, személyes közlés). Ennek fényében egyet értünk Greenel (112) abban, hogy az S334ter vonalban nem a rodopszin konstitutív aktiválódása vagy a fénystressz okozza a fotoreceptorok halálát, hanem a mutáns opszin hibás összehajródása.

A fénystresszben és a mutációs kísérletekben a különböző drogokra adott eltérő válaszok a két folyamat között fennálló alapvető különbségekre mutatnak rá. Bár az apoptózis a “végső közös út”, az odáig elvezető lépésekben jelentős különbségek vannak. A szabad gyökök és a lipid peroxidáció szerepet játszanak a fénykárosodásban, de nem tényezők az általunk vizsgált két retina degenerációkban.

5.2. A progeszteron hatásának vizsgálata fénystresszben

Azok a megfigyelések, melyek szerint a fotostressz okozta retina degeneráció súlyosságát befolyásolja a nemi hormonok szintje, és hogy a prémenopauzában levő nőknél ritkábban fordul elő agyvérzés, felvetette a női nemi hormonok jelentőségének kérdését stresszben. A mi eredményeink azt mutatták, hogy a fényexpozíció az ERG

válaszok szignifikáns csökkenését okozta mindkét fotostresszelt csoportban, de nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a progeszteronnal és a vivôanyaggal kezelt állatok között. A morfológiai adatok is ezt támasztották alá. Eredményeink tehát nem igazolják azt a feltételezést, hogy hím albínó patkányokban a progeszteron adása kivédi a fénystressz okozta retina degenerációt.

Valószínű, hogy a fény okozta retinális stressz egyéb stresszektől eltérően (pl. agysérülés, agyvérzés, epilepsziás görcs) nem védhető ki progeszteronnal. A mi kísérleteinkben a progeszteron önmagában hatástalannak bizonyult, lehetséges azonban, hogy a két női steroid hormon, az ösztrogén és a progeszteron közötti kölcsönhatás felelős a neuro- és kardioprotektív hatásért. Ehhez szolgáltat adalékot Yu és mtsai közleménye (115), mely szerint ösztrogén adása ovariectomizált patkányokban védelmet nyújtott fény által kiváltott apoptózis ellen.

5.3 A környezeti fényviszonyok befolyásának elemzése

Munkánk során strukturális és biokémiai bizonyítékokat találtunk arra, hogy albínó egerek erős, ciklikus fényviszonyok között történő nevelésével kivédhető a fotoreceptorok fotostressz okozta apoptózisa. Az albínó egerek is képesek a környezeti fényviszonyokhoz adaptálódni, ugyanúgy, ahogy azt már több szerző (13, 79,82,83,95,97-99,103,116,117,118) korábban leírta albínó patkányokkal kapcsolatban. Az erős fényben történő tartás valószínűleg subletális stresszként hat a fotoreceptorokra, mely neuroprotektív adaptációs változásokat okoz. Ez megnyilvánulhat a védekezési mehanizmusok fokozódásában vagy olyan metabolikus folyamatok visszaszorításában, melyeket az akut fényhatás károsíthat.

Genetikai faktorok is befolyásolják azt, hogy az albínó patkányok és egerek mennyire fogékonyak a fénysterssz okozta apoptózisra. LaVail és mtsai (69) hét különböző albínó egérfajta fényérzékenységét vizsgálták és az adatokat összehasonlították a BALB/c egerek fényérzékenységével. Azt találták, hogy a A/J, AKR/J és N2W/LacJ törzsek érzékenysége megegyezett a BALB/c egerekével. Az Ma/My J és az RF/J törzsek azonban szenzitívebbek voltak a BALB/c-nél és az RIII/J volt a legérzékenyebb fajta. Ez azt bizonyítja, hogy az azonos fenotípussal (albinizmus), de eltérő genotípussal rendelkező egerek eltérő fényérzékenységgel bírnak. Ezek között a törzsek között fennálló genetikai differenciák vizsgálata információt nyújthat a fény szenzitivitást befolyásoló tényezőkről. Az is valószínű azonban, hogy így fals pozitív eredményeket is kapunk, mivel bizonyos eltérések nem a neuroprotekciónak különbségéből adódnak. Ezeket a fals pozitív adatokat úgy küszöbelhetjük ki, hogy azonos genetikai háttérrel rendelkező egerek adaptív válaszait elemezzük.

A ciklikus világosban nevelt (82, 83, 95, 97,98), vagy felnőttkorban ahhoz adaptált (102,119) patkányokban lassú fotoreceptorpusztulás figyelhető meg, míg a ciklikus félhomályban tartott állatoknál nem. A ciklikus, erős fényben való nevelés mindkét esetben kivédi a retina fénykárosodását, de a proteomikai és genomikai elemzést két folyamat, az adaptáció és az apoptózis nehezíti. A 7-től 35 napos korukig erős ciklikus fényben nevelt egereknél apoptózisra utaló jelet nem találtunk. Ezért minden, a félhomályban és a világosban nevelt egerek között kimutatott eltérés a különböző "fénytörténetük" következtében kialakult adaptációnak tudható be.

Penn és Williams (99) kimutatták, hogy a világos, ciklikus fényben nevelt albínó patkányok retinája kevesebb rodopszint tartalmaz, mint a félhomályban tartott

patkányoké. A jelenséget azzal magyarázták, hogy a retina a magas, illetve az alacsony fotonbeáramlásra a pálcikák külső szegmensének rodopszin tartalmának megváltoztatásával válaszolt, ezzel biztosítva a naponta befogadott fotonok konstans mennyiségét, mely jelenséget fotosztázisnak nevezték el. Penn és Anderson később publikált tanulmánya (83) azt igazolta, hogy a világosban nevelt patkányok pálcikájában a külső szegmentben, a lipid kettősrétegében kisebb a rodopszin sűrűsége és a külső szegment egyben rövidebb is. Ezek, és a többi, a bevezetésben tárgyalt változások a retina erős fényhez történő anatómiai és funkcionális adaptációját szolgálják és céljuk a fotostressz okozta apoptózis iránti fogékonyság csökkentése. A folyamat gyorsan követi a környezeti fényviszonyok változását és nagy rugalmasságot mutat. A 800 luxról 5 luxra áthelyezett patkányoknál mind a retina rodopszin tartalma, mind az ERG válaszok amplitudója megnőtt (82). Hasonló eredményeket írtak le Schremser és Williams (117,118). Azokban a patkányokban, amelyeknél a megvilágítás erősségét 3 luxról 200 luxra emelték, csökkent a korongok rodopszin tartalma és a korongok sűrűsége, valamint megrövidült a pálcikák külső szegmenetje. Bár mi nem mértük az egerek retinájának rodopszintartalmát, de minden valószínűség szerint, a patkányokhoz hasonlóan lejárásodott a fotosztázis jelensége. A retina nagy mennyiségben tartalmaz hosszú láncú többszörösen telítetlen zsírsavakat, elsősorban dokozahexánsavat (22:6n-3). A DHS fontos szerepet játszik a humán retina fejlődésében (120,121) és nélkülözhetetlen a patkányok (122), a tengerimalacok (123) és a majmok (124) retinájának normális működéséhez is. Mivel az állatok nem képesek az n-3-as kettőskötés szintézisére, a DHS-t a tápláléknak tartalmaznia kell (125). Táplálkozási n-3 hiányban a retina úgy jut hozzá, hogy a DHS-

t a retinális pigment epitéliumból visszamenti (126). Az nem tisztázott, hogy a retina miért preferálja a DHS-t az n-6 többszörösen telítetlen zsírsavakkal szemben, holott az állatokban a DHS a lipid peroxidációra legfogékonyabb zsírsav és a PKSZ ideális környezet a lipid peroxidáció számára (fényelnyelés, nagymértékű oxigénátáramlás). A pálcikák külső szegmensének DHS tartalmát nehéz diétával csökkenteni, de van két állapot, melyben alacsony: erős fényben történő tartáskor (83,116) és örökletes retina degenerációkban (127-132). Feltételezték, hogy mindkét állapot oxidatív stressz a retina számára és a DHS szintjének mérséklése egy adaptív válasz, ezzel mintegy csökkentve a lipid peroxidáció szubsztrátjának mennyiségét (100,101). Jelen tanulmányunkban a DHS szintje nem különbözött a ciklikus félhomályban ill. világosban nevelkedett egerekben. A fénystresszt követően azonban a félhomályban nevelkedett állatokban volt nagyobb a DHS veszteség, azt sugallva, hogy náluk kevésbé volt hatékony a lipid peroxidáció megelőzését szolgáló antioxidáns védelem. Ezek az eredmények összecsengenek azokkal, amelyeket patkányokban találtak. Itt a világosban tartás a glutation antioxidáns enzimek (reduktáz, peroxidáz és S-transzferáz) aktivitásának fokozódásához és a kismolekulájú antioxidánsok (C és E vitamin) szintjének emelkedéséhez vezetett (83).

Egerek és patkányok retinájában számos olyan endogén választ írtak le, amelyek tartós erős fényben tartás vagy akut fénystressz hatására jöttek létre. Ezek a reakciók nagyjából három kategóriába sorolhatók. (i) Strukturális és molekuláris változások, melyek csökkentik a fotonelnyelés és a fototranszdukció hatékonyságát. (ii) Olyan endogén folyamatok elősegítése, amelyek védelmet nyújtanak az apoptózissal szemben. (iii) Stressz-okozta, apoptózisra érzékeny endogén mechanizmusok

visszaszorítása. Ezen folyamatok molekuláris etiológiájának azonosítása és annak tanulmányozása, hogy hogyan lehet azokat befolyásolni, alapul szolgálhat a különböző örökletes retina degenerációk kezeléséhez. Munkánkban azt igazoltuk, hogy az ilyen jellegű kutatások végzésére az egerek is alkalmasak, sőt géntérképük alaposabb ismerete miatt alkalmazásuk előnyösebb a patkányokénál.

6. Összefoglalás

- 6.1 A NOSZ gátló L-NAME statisztikailag szignifikáns morfológiai védelmet nyújtott vad típusú albínó patkányokban fotostressz okozta fotoreceptor pusztulás ellen. A funkcionális védelem is jelentős volt, de statisztikailag nem szignifikáns.
- 6.2 Az L-NAME nem protektív rodopszin mutáció okozta retina degenerációban P23H és S334ter transzgén albínó patkányokban.
- 6.3 Progeszteron adagolása nem nyújt védelmet az erős fény hatására kialakult fotoreceptor apoptózissal szemben hím albínó patkányokban.
- 6.4 Az erős, ciklikus megvilágításban nevelt albínó egerek védelmet élveznek fénystressz indukálta retinaelfajulással szemben.

7. Gyakorlati alkalmazás

Az retinitis pigmentosa prognózisa rossz, 50 éves korukra a betegek kb. felének vízusa 0.1 alá csökken, látóterük centrális 2-3°-ig beszűkül (133.). Hatásos terápia napjainkig nem áll rendelkezésre. Állatkísérletekben az aszkorbinsav, a DMTU, a PBN, a Gingko Biloba, az E vitamin és a metilprednisolon védelmet nyújtottak az erős fény kiváltotta retina degeneráció ellen. Humán gyógyászatban az aszkorbinsavat, a Ginkgo bilobát és az E vitamint alkalmazzák antioxidáns hatásuk miatt, de a retina degenerációk terápiájában ezek a szerek sem hoztak áttörést. Olyan gyógyszerre lenne szükség, mely az apoptózis folyamatát blokkolná, vagy legalábbis lassítaná és így a betegek tovább élhetnének használható vízzel. A kísérletünkben használt koncentrációban az L-NAME nem bizonyult olyan hatásosnak, mint pl. a PBN vagy az aszkorbinsav. Ez ugyan határt szabhat a későbbiekben történő alkalmazásának, de egy lépéssel közelebb kerültünk az apoptózis molekuláris mechanizmusának megértéséhez, mivel a NO bizonyosan szerepet játszik benne.

A progeszteron adása kecsegtetett a leggyorsabb eredménnyel, mert ugyan más indikációkkal, de az orvoslásban már régóta alkalmazott szer. Sajnos azonban, a cerebrovasculáris és cardiovascularis betegségektől eltérően, a retina degenerációban nem bizonyult protektívnek.

Annak bebizonyításával, hogy az erős, ciklikus megvilágításban történő neveléssel az albínó egerekben is fénystressz elleni neuroprotekciónak alakítható ki, új utak nyílhatnak meg a retina degenerációk kutatásában. Az egerek génállományának alaposabb ismerete, könnyebb manipulálhatósága előnyösebbé teszi alkalmazásukat a patkányokkal szemben.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Berta Andrásnak, hogy Magyarországon és Robert E. Andersonnak, hogy az Amerikai Egyesült Államokban értékes segítséget nyújtottak munkámhoz. Hálás vagyok Dr. Török Magdolna főorvosnőnek, amiért engedélyezte, hogy a betegellátást átmenetileg elhagyva betekintést nyerhessek a szemészeti alapkutatás lenyűgözően sokszínű világába. Antal Csaba az ábrák csinosításával kötelezett le. S végül köszönetet mondok Dr. Kappelmayer Jánosnak az értekezés összeállításához adott nagyon hasznos gyakorlati tanácsaiért.

8. Irodalomjegyzék

1. Hafezi, F., Abbeg, M., Grimm, C., Wenzel, A., Munz, K., Stürmer, J., Farber, D.B., Remé,

- C.E., 1998. Retinal degeneration in the *rd* mouse in absence of *c-fos*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 2239-2244.
2. Shastry, B.S., 1997. Signal transduction in the retina and inherited retinopathies. Cell Mol. Life Sci. 53, 419-429.
3. Remé, C.E., Weller, M., Szczesny, P., Munz, K., Hafezi, F., Reinboth, J.-J., Clausen, M., 1995. Light induced apoptosis in the rat retina in vivo: morphologic features, threshold on a time course. In: Anderson, R.E., LaVail, M.M., Hollyfield, J.G. (Eds.), Degenerative Diseases of the Retina, Plenum, New York, pp. 19-25.
4. Hafezi, F., Marti, A., Munz, K., Remé, C.E., 1997. Light induced apoptosis: differential timing in the retina and pigment epithelium. Exp. Eye Res. 64, 963-970.
5. Wenzel, A., Grimm, C., Samardzija, M., Remé, C.E., 2005. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. Prog. Retin. Eye Res. 24, 275-306.
6. Remé, C.M., Grimm, C., Hafezi, F., Marti, A., Wenzel, A., 1998a. Apoptotic cell death in retinal degenerations. Prog. Retin. Eye Res. 17, 443-464.
7. Grimm, C., Wenzel, A., Behrens, A., Hafezi, F., Wagner, E.F., Remé, C.E., 2001a. AP-1 mediated photoreceptor apoptosis is independent of N-terminal phosphorylation of c-Jun. Cell Death Differ. 8, 859-867.
8. Adler, R., 1996. Mechanisms of photoreceptor death in retinal degenerations. From the cell biology of the 1990s to the ophthalmology of 21st century? Arch. Ophthalmol. 114, 79-83.
9. Nickells, R.W., Zack, D.J., 1996. Apoptosis in ocular disease: molecular overview. Ophthalmic Genet. 17, 145-165.
10. van Soest, S., Westerveld, A., de Jong, P.T., Bleeker-Wagemakers, E.M., Bergen, A.A., 1999. Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view. Surv. Ophthalmol. 43, 321-334.
11. Noell, W.K., Walker, V.S., Kang, B.S., Berman, S., 1966. Retinal damage by light in rats. Invest. Ophthalmol. 5, 450-473.
12. Bird, A.C., 1987. Clinical Investigation of retinitis pigmentosa. In: Hollyfield, J.G., Anderson, R.E., LaVail, M.M., (eds.) Degenerative retinal disorders: clinical and laboratory investigations. Progress in clinical and biological research, Vol. 247. Proceedings of the Sendai Symposium on Retinal Degeneration. 1986. Sep. 20-24. Sendai, Japan. New York: Liss, pp. 3-20.
13. Noell, W.K., Albrecht, L., 1971. Irreversible effects of light on the retina: role of vitamin A. Science 172, 76-79.
14. Remé, C.E., Hafezi, F., Munz, K., Reinboth, J.-J., 1998b. Light damage to the retina and pigment epithelium. In: Marmor, M.F., Wolfensberger, T.J., (eds.), The Pigment Epithelium, Current Aspects of Function and Disease, Oxford Up, New York, pp. 563-586.
15. Grimm, C., Wenzel, A., Hafezi, F., Yu, S., Redmond, T.M., Remé, C.E., 2000. Protection of

Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration? Nat. Genet. 25, 63-66.

16. Remé, C.E., Grimm, C., Hafezi, F., Wenzel, A., Williams, T.P., 2000. Apoptosis in the retina: the silent death of vision. News Physiol. Sci. 15, 120-125.
17. Wiegand, R.D., Giusto, N.M., Rapp, L.M., Anderson, R.E., 1983. Evidence for rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 24, 1433-1435.
18. Goureau, O., Jeanny, J.C., Becquet, F., Hartmann, M.P., Courtois, I., 1993a. Protection against light-induced retinal degeneration by an inhibitor of NO synthase. Neuroreport 5, 233-236.
19. Koutz, C.A., Wiegand, R.D., Rapp, L.M., Anderson, R.E., 1995. Effect of dietary fat on the response of the rat retina to chronic and acute light stress. Exp. Eye Res. 60, 307-316.
20. Grimm C., Wenzel, A., Williams, T.P., Pascal, O.R., Hafezi, F., Remé, C.E., 2001b. Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42, 497-508.
21. Li, Z.Y., Tso, M.O., Wang, H.M., Organisciak, D.T., 1985. Amelioration of photic injury in rat retina by ascorbic acid: a histopathology study. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 26, 1589-1598.
22. Organisciak, D.T., Wang, H.M., Li, Z.Y., Tso, M.O., 1985. The protective effect of ascorbate in retinal light damage of rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 26, 1580-1588.
23. Organisciak, D.T., Darrow, R.M., Jiang, Y.-L. Marak, G.E., Blanks, J.C., 1992. Protection by dimethylthiourea against retinal light damage in rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 33, 1599-1609.
24. Ranchon, I., Chen, S., Alvarez, K., Anderson, R.E., 2001. Systemic administration of phenyl-*N-tert*-butylnitron protects the retina from light damage. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42, 1375-1379.
25. Ranchon, I., White, J., Chen, S., Alvarez, K., Kotake, Y., Anderson, R.E., 2002. Chronic administration of phenyl-*N-tert*-butylnitron protects the retina against light damage. In: Anderson, R.E., LaVail, M.M., Hollyfield, J.G., (eds.), New Insights into Retinal Degenerative Diseases, Plenum, New York, pp. 95-103.
26. Ranchon, I., Gorrand, J.-M., Cluzel, J., Droy-Lefaix, M.-T., Doly, M., 1999. Functional protection of photoreceptors from light-induced damage by dimethylthiourea and Ginkgo biloba extract. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40, 1191-1199.
27. Rosner, M., Lam, T.T., Fu, J., Tro, M.O., 1992. Methylprednisolone ameliorates retinal photic injury in rats. Arch. Ophthalmol. 110, 857-861.
28. Katz, M.L., Eldred, G.E., 1989. Failure of vitamin E to protect the retina against damage resulting from bright cyclic light exposure. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30, 29-36.
29. Snodderly, D. M., 1995. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. Am. J. Clin. Nutr. 62, 1448S-1461S.

30. Aonuma, H., Koide, K., Masuda, K., Watanabe, I., 1997. Retinal light damage: protective effect of alpha-tocopherol. *Jpn. J. Ophthalmol.* 41, 160-167.
31. Donovan, M., Carmody, R.J., Cotter, T.G., 2001. Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. *J. Biol. Chem.* 276, 23000-23008.
32. Holan, V., Krulova, M., Zajicova, A., Pindjakova, V., 2002. Nitric oxide as a regulatory and effector molecule in immune system. *Mol. Immunol.* 38, 989-995.
33. Levy, H., Twig, G., Perlman, I., 2004. Nitric oxide modulates the transfer function between cones and horizontal cells during changing conditions of ambient illumination. *Eur. J. of Neurosci.* 20, 2963-2974.
34. Geller, D.A., Billiar, T.R., 1998. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev.* 17, 7-23.
35. Roth, S., 1997. Role of nitric oxide in retinal cell death. *Clin. Neurosci.* 4, 216-223.
36. Nussler, A.K., Di Silvio, M., Billiar, T.R., Hoffman, R.A., Geller, D.A., Selby, R., Madariaga, J., Simmons, R.L., 1992. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J. Exp. Med.* 176, 261-264.
37. Nussler, A.K., Billiar, T.R., 1993. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.* 54, 171-178.
38. Bredt, D.S., Hwang, P.M., Snyder, S.H., 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768-770.
39. Goureau, O., Hicks, D., Courtois, Y., De Kozak, Y., 1994. Induction and regulation of nitric oxide synthase in retinal Müller glial cell. *J. Neurochem.* 63, 310-317.
40. Goureau, O., Lepoivre, M., Becquet, F., Courtois, Y., 1993b. Differential regulation of inducible nitric oxide synthase by fibroblast growth factors and transforming growth factor beta in bovine retinal pigmented epithelial cells: inverse correlation with cellular proliferation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90, 4276-4280.
41. Kutty, R.K., Kutty, G., Hooks, J.J., Wiggert, B., Nagineni, C.N., 1995. Transforming growth factor-beta inhibits the cytokine-mediated expression of the inducible nitric oxide synthase mRNA in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 386-393.
42. Geyer, O., Almog, J., Lupu-Meiri, M., Lazar, M., Oron, Y., 1995. Nitric oxide synthase inhibitors protect rat retina against ischemic injury. *FEBS Lett.* 374, 399-402.
43. Kashii, S., 1995. The role of nitric oxide in the ischemic retina. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 99, 1361-1376.
44. Piotrovskij, V.K., Kallay, Z., Krejcy, K., Horecky, J., Tmóvec, T., Raberger, G., 1993. N^{G} -Nitro-L-arginine pharmacokinetics in rats after a single intravascular and oral dose: an appearance of secondary concentration time peaks. *Drug Metab. Dispos.* 21, 962-964.

45. Tabrizi-Fard, M.A., Fung, H.-L., 1994. Pharmacokinetics, plasma protein binding and urinary excretion of N^ω-nitro-L-arginine in rats. *Br. J. Pharmacol.* 111, 394-396.
46. Avontour, J.A., Buijk, S.L., Bruining, H.A., 1998. Distribution and metabolism of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in patients with septic shock. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 54, 627-631.
47. Pfeiffer, S., Leopold, E., Schmidt, K., Brunner, F., Mayer, B. 1996. Inhibition of nitric oxide synthesis by N^G- nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, N^G- nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.* 118, 1433-1440.
48. Alkayed, N.J., Harukuni, I., Kimes, A.S., London, E.D., Traystman, R.J., Hurn, P.D., 1997. Gender linked brain injury in experimental stroke. *Stroke* 29, 159-166.
49. Kannel, W.B., Thom, T.J., 1994. The incidence, prevalence and mortality of cardiovascular disease. In: Schlant R.C., Alexander, R.W., (eds.) *The Heart* New York: McGraw-Hill pp. 185-197.
50. Barrett-Connor, E., Bush, T.L., 1991. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 265, 1861-1867.
51. Grodstein, F., Stampfer, M.J., Manson, J.E., 1996. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 335, 453-461.
52. Bäckström T., 1976. Epileptic seizures in women related to plasma estrogen and progesterone during the menstrual cycle. *Acta Neurol. Scand.* 54, 321-347.
53. Landgren, S., Bäckström T., Kalistratov, G., 1978. The effect of progesterone on spontaneous interictal spike evoked by the application of penicillin to the cat's cerebral cortex. *J. Neurol. Sci.* 36, 119-133.
54. Bäckström T., Zetterlund, B., Blom, S., Romano, M., 1984. Effects of intravenous progesterone infusions on the epileptic discharge in women with partial epilepsy. *Acta Neurol. Scand.* 69, 240-248.
55. Roof, R.L., Duvdevani, R., Stein, D.G., 1993. Gender influences outcome of brain injury: progesterone plays a protective role. *Brain Res.* 607, 233-236.
56. Roof, R.L., Duvdevani, R., Heyburn, J.W., Stein, D.G., 1996. Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Exp. Neurol.* 138, 246-251.
57. Wright, D.W., Bauer, M.E., Hoffman, S.W., Stein, D.G., 2001. Serum progesterone levels correlate with decreased cerebral edema after traumatic brain injury in male rats. *Neurotrauma* 18, 901-909.
58. Jiang, N., Chopp, M., Stein, D., Feit, H., 1996. Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res.* 735, 101-107.
59. Alkayed, N.J., Murphy, S.J., Traystman, R.J., Hurn, P.D., 2000. Neuroprotective effect of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke* 31, 161-168.
60. Murphy, S.J., Traystman, R.J., Hurn, P.D., Duckles, S.P., 2000. Progesterone exacerbates

- striatal stroke injury in progesterone-deficient female animals. *Stroke* 31, 1173-1178.
61. Behl, C., Trapp, T., Skutella, T., Holsboer, F., 1997. Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death – a novel role for RU486. *Eur. J. Neurosci.* 9, 912-920.
 62. Olafson, R.P., O'Steen W.K., 1976. Hormonal influences on photoreceptor damage: the pituitary gland and ovaries. *Invest. Ophthalmol.* 10, 869-872.
 63. O'Steen W.K., 1977. Ovarian steroid effects on light-induced retinal photoreceptor damage. *Exp. Eye Res.* 25, 361-369.
 64. Dykens, J.A., Carroll, A.K., Wiley, S., Covey, D.F., Cai, Z.Y., Zhao, L., Wen, R., 2004. Photoreceptor preservation in the S334ter model of retinitis pigmentosa by a novel estradiol analog. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1971-1984.
 65. Wickham, L.A., Gao, J., Toda, I., Rocha, E.M., Ono, M., Sullivan, D.A., 2000. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNA in the eye. *Acta Ophthalmol. Scand.* 78, 146-153.
 66. Lanthier, A., Patwardhan, V.V., 1986. Sex steroids and 5-en-3b-hydroxysteroids in specific regions of the human brain and cranial nerves. *J. Steroid Biochem.* 25, 445-449.
 67. Lanthier, A., Patwardhan, V.V., 1988. *In vitro* steroid metabolism by rat retina. *Brain Res.* 463, 403-406.
 68. Robinson J., Merry, B.J., Lightfoot, M.E., Hall, A.K., 1981. Dynamics of progesterone metabolism in the pseudopregnant rat. *J. Endocrinol.* 90, 359-366.
 69. LaVail, M.M., Gorrin, G.M., Repaci, M.A., 1987. Strain differences in sensitivity to light-induced photoreceptor degeneration in albino mice. *Curr. Eye res.* 6, 825-834.
 70. Lanum, J., 1978. The damaging effects of light on the retina. Empirical findings, theoretical and practical implications. *Surv. Ophthalmol.* 22, 221-249.
 71. Lerman, S., 1980. Photochemical damage. In: Lerman S. ed. *Radiant energy and the eye*. New York: Macmillan, pp. 203-211.
 72. O'Steen, W.K., Anderson, K.V., Shear, C.R., 1974. Photoreceptor degeneration in rats: dependency on age. *Invest. Ophthalmol.* 13, 334-339.
 73. LaVail, M.M., Gorrin, G.M., Repaci, M.A., Yasumura, D. 1987. Light-induced retinal degeneration in albino mice and rats: strain and species differences. *Prog. Clin. Biol. Res.* 247, 439-454.
 74. Bush, R.A., Remé, C.E., Malnoe, A., 1991. Light damage in the rat retina: the effect of dietary deprivation of N-3 fatty acids on acute structural alterations. *Exp. Eye Res.* 53, 741-752.
 75. Remé, C.E., Malnoe, A., Jung, H. H., Wei, Q., Munz, K., 1994. Effect of dietary fish oil on acute light-induced photoreceptor damage in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 78-90.
 76. Barbe, M.F., Tytell, M., Gower, D.J., Welch, W.J., 1988. Hyperthermia protects against

- light damage in the rat retina. *Science* 241: 1817-1820.
77. Rapp, L.M., Williams, T.P., 1980. A parametric study of retinal light damage in albino and in pigmented rats. In: Williams T.P., Baker, B.N., eds. *The effects of constant light on visual processes*. New York: Plenum Press, pp. 135-159.
 78. Lavail, M.M., 1980. Eye pigmentation and constant light damage in the rat retina. In: Williams T.P., Baker, B.N., eds. *The effects of constant light on visual processes*. New York: Plenum Press, pp. 357-387.
 79. Organisciak, D.T., Darrow R.M., Barsalou, L., Kutty, R.K., Wiggert, B., 2000. Circadian-dependent retinal light damage in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3694-3701.
 80. O'Steen, W.K., 1980. Hormonal influences on retinal photodamage. In: Williams T.P., Baker, B.N., eds. *The effects of constant light on visual processes*. New York: Plenum Press, pp. 29-49.
 81. O'Steen, W.K., Donnelly, J.E., 1982. Antagonist effects of adrenalectomy and ether/surgical stress on light-induced photoreceptor damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22, 1-7.
 82. Penn, J.S., Thum, L.A., Naash, M.I., 1989. Photoreceptor physiology in the rat is governed by the light environment. *Eyp. Eye Res.* 49, 205-215.
 83. Penn, J.S., Anderson, R.E., 1987. Effect of light history on rod outer-segment membran composition in the rat. *Exp. Eye Res.* 44, 767-778.
 84. Gao, H., Hollyfield, J.G., 1996. Basic fibroblast growth factor: increased gene expression in inherited and light-induced photoreceptor degeneration. *Exp. Eye Res.* 62, 181-189.
 85. Wen, R., Song, Y., Cheng, T., Matthes, M.T., Yasumura T., LaVail, M.M., Steinberg, R.H., 1995. Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. *J. Neurosci.* 15, 7377-7385.
 86. Cao, W., Li, F., Steinberg, L.H., LaVail, M.M., 2001. Development of normal and injury-induced gene expression of aFGF, bFGF, CNTF, BDNF, GFAP and IGF-I in the rat retina. *Exp. Eye Res.* 72, 591-604.
 87. Kutty, R.K., Kutty, G., Wiggert, B., Chader, G.J., Darrow, R.M., Organisciak, D.T., 1995. Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intense visible light: suppression by the dimethylthiourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1177-1181.
 88. Tytell, M., Barbe, M.F., Brown, I.R., 1994. Induction of heat shock (stress) protein 70 and its mRNA in the normal and light-damaged rat retina after whole body hyperthermia. *J. Neurosci. Res.* 38, 19-31.
 89. Chen, L., Wu, W., Dentchev, T., Zeng, Y., Wang, J., Tsui, I., Tobias, J.W., Bennett, J., Baldwin, D., Dunaief, J.L., 2004. Light induced changes in mouse retinal gene expression. *Exp. Eye Res.* 79, 239-247.
 90. Faktorovich, E.G., Steinberg, R.H., Yasumura, D., Matthes, M.T., LaVail, M.M., 1990.

- Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347, 83-86.
91. Faktorovich, E.G., Steinberg, R.H., Yasumura, D., Matthes, M.T., LaVail, M.M., 1992. Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J. Neurosci.* 12, 3554-3567.
 92. LaVail, M.M., Unoki, K., Yasumura, D., Matthes, M.T., Yancopoulos, G.D., Steinberg, R.H., 1992. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11249-11253.
 93. Cao, W., Tombran-Tink, J., Elias, R., Sezate, S., Mrazek, D., McGinnis, J.F., 2001. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1646-1652.
 94. LaVail, M.M., Yasumura, D., Matthes, M.T., Lau-Villacorta C., Unoki, K., Sung, C.H., Steinberg, R.H., 1998. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 592-602.
 95. Penn, J.S., Naash, M.I., Anderson, R.E., 1987. Effect of light history on retinal antioxidants and light damage susceptibility in the rat. *Exp. Eye Res.* 44, 779-788.
 96. Huang, H., Li, F., Alvarez, L.A., Ash, J.D., Anderson, R.E., 2004. Downregulation of ATP synthase subunit-6, cytochrome c oxidase-III, and NADH dehydrogenase-3 by bright cyclic light in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2489-2496.
 97. Penn, J.S., Anderson, R.E., 1992. Effects of light history on the rat retina. In: Osborne, N.N., Chader, G., eds. *Progress in retinal research*. Vol. 11. New York: Pergamon Press. pp. 75-98.
 98. Penn, J.S., Tolman, B.L., Thum, L.A., Koutz, C.A., 1992. Effect of light history on the rat retina: timecourse of morphological adaptation and readaptation. *Neurochem. Res.* 17, 91-99.
 99. Penn, J.S., Williams, T.P., 1986. Photostasis: regulation of daily photoncatch by rat retinas in response to various cyclic illuminances. *Exp. Eye Res.* 43, 915-928.
 100. Anderson, R.E., Maude, M.B., Alvarez, M.A., Acland, G., Aguirre, G.D., 1999a. Inherited retinal degenerations. Role of polyunsaturated fatty acids. In: Christen, I., Doly, M., Droy-Lefaix M.T., eds. *Vision, genome et cerveau. Seminaires Ophthalmologiques d'IPSEN*, Vol. 10. Paris: Irvin, pp. 57-65.
 101. Anderson, R.E., Maude, M.B., Alvarez, M.A., Acland, G., Aguirre, G.D., 1999b. A hypothesis to explain the reduced blood levels of docosahexaenoic acid in inherited retinal degenerations caused by mutations in genes encoding retina-specific proteins. *Lipids* 34, S235-237.
 102. Li, F., Cao, W., Anderson, R. E., 2003. Alleviation of constant-light-induced photoreceptor degeneration by adaptation of adult albino rat to bright cyclic light. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4968-4975.
 103. Liu, C., Peng, M., Laties, A.M., Wen, R., 1998. Preconditioning with bright light evokes a

- protective response against light damage in rat retina. *J. Neurosci.* 18, 1337-1344.
104. Grimm, C., Wenzel, A., Groszer, M., Mayser, H., Seeliger, M., Samardzija, M., Bauer, C., Gassmann, M., Remé, C.E., 2002. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat. Med.* 8, 718-724.
 105. de Oliveira, C.F., Nathan, L.P., Metze, K., Moreno, H. Jr., de Luca, I.M., Sucupira, M., Zatz, R., Zappellini, A., Antunes, E., de Nucci, G., 1999. Effect of Ca^{2+} channel blockers on arterial hypertension and heart ischemic lesions induced by chronic blockade of nitric oxide in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 373, 195-200.
 106. Hodge, G., Ye, V.Z., Duggan, K.A., 2002. Salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthase inhibition is associated with loss of regulation of angiotensin II in the rat. *Exp. Physiol.* 87, 1-8.
 107. Pentel, P.R., Wanankul, W., Scarlett, W., Keyler, D.E., 1996. Nitric oxide contributes to desipramine-induced hypotension in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 15, 320-328.
 108. Lau, D., McGee, L.H., Zhou, S., Rendahl, K.G., Manning, W.C., Escobedo, J.A., Flannery, J.G., 2000. Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3622-3633.
 109. Green, E.S., Rendahl, K.G., Zhou, S., Ladner, M., Srivastava, R., Manning, W.C., Flannery, J.G., 2001. Two animal models of retinal degeneration are rescued by recombinant adeno-associated virus-mediated production of FGF-5 and FGF-18. *Mol. Ther.* 3, 507-515.
 110. Liang, F.Q., Aleman, T.S., Dejneka, N.S., Dudas, L., Fisher, K.J., Maguire, A.M., Jacobson, S.G., Bennett, J., 2001. Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol. Ther.* 4, 461-472.
 111. Liu, X., Garriga, P., Khorana, H.G., 1996. Structure and function in rhodopsin: correct folding and misfolding in two point mutants in the intradiscal domain of rhodopsin identified in retinitis pigmentosa. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93, 4554-4559.
 112. Green, E.S., Menz, M.D., LaVail, M.M., Flannery, J.G., 2000. Characterization of rhodopsin mis-sorting and constitutive activation in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 1546-1553.
 113. Naash, M.L., Peachey, N.S., Li, Z.Y., Gryczan, C.C., Goto, Y., Blanks, J., Milam, A.H., Ripps, H., 1996. Light-induced acceleration of photoreceptor degeneration in transgenic mice expressing mutant rhodopsin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 775-782.
 114. Ranchon, I., LaVail, M.M., Kotake, Y., Anderson, R.E., 2003. Free radical trap phenyl-*N*-tert-butyl nitron protects against light damage but does not rescue P23H and S334ter rhodopsin transgenic rats from inherited retinal degeneration. *J. Neurosci.* 23, 6050-6057.
 115. Yu, X., Rajala, R.V., McGinnis, J.F., 2004. Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17β -estradiol-mediated neuroprotection. *J. Biol.*

Chem. 13086-13094.

116. Wiegand, R.D., Koutz, C.A., Chen, H., Anderson, R.E., 1995. Effect of dietary fat and environmental lighting on the phospholipid molecular species of rat photoreceptor membranes. *Exp. Eye Res.* 60, 291-306.
117. Schremser, J.L., Williams, T.P., 1995a. Rod outer segment (ROS) renewal as a mechanism for adaptation to a new intensity environment. I. Rhodopsin levels and ROS length. *Exp. Eye Res.* 61, 17-23.
118. Schremser, J.L., Williams, T.P., 1995b. Rod outer segment (ROS) renewal as a mechanism for adaptation to a new intensity environment. II. Rhodopsin synthesis and packing density. *Exp. Eye Res.* 61, 25-32.
119. Li, F., Cao, W., Anderson, R.E., 2001. Protection of photoreceptor cells in adult rats from light-induced degeneration by adaptation to bright cyclic light. *Exp. Eye Res.* 73, 569-577.
120. Heird, W.C., Prager, T.C., Anderson, R.E., 1997. Docosahexaenoic acid and the development and function of the infant retina. *Curr. Opin. Lipidol.* 8, 12-16.
121. Williams, C., Birch, E.E., Emmett, P.M., Northstone, K., 2001. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood Study Team. Stereoacuity at age 3.5 y in children born full-term is associated with prenatal and postnatal dietary factors: a report from a population-based cohort study. *Am.J. Clin. Nutr.* 73, 316-322.
122. Wheeler, T.G., Benolken, R.M., Anderson, R.E., 1975. Visual membranes: specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination. *Science* 188, 1312-1324.
123. Weisinger, H.S., Vingrys, A.J., Sinclair, A.J., 1996. The effect of docosahexaenoic acid on the electroretinogram of the guinea pig. *Lipids* 31, 65-70.
124. Jeffrey, B.G., Mitchell, D.C., Gibson, R.A., Neuringer, M., 2002. n-3 fatty acid deficiency alters recovery of the rod photoresponse in rhesus monkeys. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2806-2814.
125. Tinoco, J., 1982. Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals. *Prog. Lipid Res.* 21, 1-45.
126. Stinson, A.M., Wiegand, R.D., Anderson, R.E., 1991. Recycling of docosahexaenoic acid in rat retinas during n-3 fatty acid deficiency. *J. Lipid Res.* 32, 2009-2017.
127. Aguirre, G.D., Acland, G.M., Maude, M.B., Anderson, R.E., 1997. Diets enriched in docosahexaenoic acid fail to correct progressive rod-cone degeneration (prcd) phenotype. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 2387-2407.
128. Anderson, R.E., Maude, M.B., Bok, D., 2001a. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segment membranes of mice with rds/peripherin and P216L peripherin mutations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1715-1720.

129. Anderson, R.E., Sieving, P.A., Maude, M.B., Naash, M.I., 2001b. Mice with G90D rhodopsin mutations have lower DHA in rod outer segment membranes than control mice.
In: Anderson, R.E., LaVail, M.M., Hollyfield, J.G., eds. New insights into retinal degenerative diseases. New York: Plenum Press, pp. 235-245.
130. Anderson, R.E., Maude, M.B., McClellan M., Matthes, M.T., Yasumura, D., LaVail, M.M., 2002. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segments of rats with P23H and S334ter rhodopsin mutations. *Mol. Vis.* 8, 351-358.
131. Bicknell, I.R., Darrow, R., Barsalou, L., Fliesler, S.J., Organisciak, D.T., 2002. Alterations in retinal rod outer segment fatty acids and light-damage susceptibility in P23H rats. *Mol. Vis.* 8, 333-340.
132. Martin, R.E., Ranchon-Cole, I., Brush, R.S., Williamson, C.R., Hopkins, S.A., Li, F., Anderson, R.E. 2004. P23H és S334ter opsin mutations: Increasing photoreceptor outer segment n-3 fatty acid contents does not affect the course of retinal degeneration. *Mol. Vis.* 10,199-207.
133. Kanski, J.J., *Clinical Ophthalmology*, Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford, 1989.

10. Közlemények, prezentációk jegyzéke

Az értekezéshez felhasznált közlemények

1. Káldi, I., Dittmar, M., Pierce, P., Anderson, R. E.: L-NAME protects against acute light damage in albino rats, but not against retinal degeneration in P23H and S334ter transgenic rats. *Experimental Eye Research* 2003, 76 (4): 453-461. IF: 2.180
2. Káldi, I., Martin, R.E., Huang, H., Brush, R.S., Morrison, K.A., Anderson, R.E.: Bright cyclic rearing protects albino mouse retina against acute light-induced apoptosis. *Molecular Vision* 2003, 9: 337-344. IF: 2.722
3. Káldi, I., Berta, A.: Progesterone administration fails to protect albino male rats against photostress-induced retinal degeneration. *European Journal of Ophtalmology* 2004, 14(4): 306-314. IF: 0.483

Egyéb közlemények

1. Káldi I., Török M.: Káprázás okozta látáscsökkenés progrediens és incipiens cataractás betegeken. *Szemészet* 1995. 132: 197-199. IF: -
2. Nagy, E.V., Tóth, J., Káldi, I., Damjanovich, J., Mezôsi, E., Lenkey, A., Tóth, L., Szabó, J., Karányi, Z., Leövey, A.: Graves' ophthalmopathy: eye muscle involvement in patients with diplopia. *European Journal of Endocrinology* 2000. 142 (6): 591-597. IF: 2.133

Kumulatív impakt faktor: 7.518

Nemzetközi idézettség: 16

Prezentációk

1. Káldi, I., Török, M. Glare induced visual decrease in patients with incipient and progredient cataract (*poszter*) *Xth Congress European Society of Ophthalmology Milano, Italy June 25-29, 1995.*
2. Halász, B., Káldi, I. Ocul-Info szemészeti betegnyilvántartó rendszer (*előadás*) *Magyar Szemorvostársaság Nagygyűlése Pécs, 1997.*
3. Káldi, I., Török, M. Glaukomás látótérkiesés progressziójának megítélése Humphrey Field Analyser-730 automata periméterrel (*előadás*) *Magyar Szemorvostársaság Nagygyűlése Kaposvár, 1998.*
4. Ranchon, I., Káldi, I., Anderson, R.E. P23H and S334ter rhodopsin transgenic rats are differently susceptible to cyclic or continuous light. Effect of PBN on the degeneration induced by the mutation or light (*poszter*) *Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Miami, Fl., USA, 2002.*
5. Káldi, I. Anderson, R.E. Az L-NAME albínó patkányokban védelmet nyújt acut fénykárosodással szemben, de nem protectív a P23H és S334ter transzgén patkányokban kialakuló retina degeneratio ellen (*előadás*) *A Magyar Szabadgyök Kutató Társaság Ülése, Nagykôrös, 2003.*

11. Az értekezéshez használt közlemények különlenyomatai

