

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Pelles-Taskó Beáta

Témavezetők:

Dr. Benkő Ilona

Prof. Dr. Juhász Béla



DEBRECENI EGYETEM

TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2026

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

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

Írta: Pelles-Taskó Beáta okleveles táplálkozástudományi szakember

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

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

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Pallag Annamária, PhD
Dr. Deák Ádám, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Vecsernyés Miklós, PhD
tagok: Prof. Dr. Pallag Annamária, PhD
Dr. Deák Ádám, PhD
Dr. Siposné Dr. Fehér Pálma Eszter, PhD
Dr. Csonka Csaba, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2026. július 16. 13óra

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS.....	5
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	7
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	8
Etikai engedélyek.....	8
A pterostilbén hatása retinális iszkémia–reperfúziós modellben	8
Kísérleti állatok és kezelések	8
Retinális iszkémia-reperfúziós modell	9
Elektroretinográfia	9
Western Blot	10
Hisztológiai vizsgálatok.....	11
Statisztikai analízis	12
CCK-1R antagonizmus hatása OLETF–LETO patkánymodellben	12
Kísérleti állatok.....	12
Kísérleti terv	13
CFU-GM kolóniaszám meghatározása	14
CFU-GM progenitor sejtek in vitro kezelése LETO patkányok csontvelő-tenyészeiben.....	15
CCK-1 és CCK-2 receptorok vizsgálata csontvelői sejtekben.....	15
RNS izolálás és reverz transzkripció.....	16
Valós idejű kvantitatív PCR	16
TaqMan assay kiértékelése.....	17
Statisztikai analízis	17
4. EREDMÉNYEK.....	19
A pterostilbén hatása retinális iszkémia–reperfúziós modellben	19
Elektroretinográfia	19
Western Blot	19
Hisztológia.....	19
CCK-1R antagonizmus hatása OLETF–LETO patkánymodellben	20
Hemopoézis vizsgálata CCK-1R hiányos, elhízott OLETF és nem elhízott LETO patkányokban .	20
A proglumid és a lorglumid hatása a csontvelői CFU-GM progenitor sejtekre in vivo	20

A proglumid és a lorglumid in vivo előkezelésének hatása a karboplatin in vitro toxicitására CFU-GM progenitor sejtekben	21
A proglumid és a lorglumid hatása a CFU-GM progenitor sejtek kolóniaképzésére LETO patkányok csontvelő-tenyésztéseiben in vitro.....	22
Kolecisztokinin-receptorok vizsgálata csontvelői sejtekben	22
5. MEGBESZÉLÉS	23
A pterostilbén hatása retinális iszkémia–reperfúziós modellben	23
6. ÖSSZEFOGLALÁS	31
7. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI	32
8. FÜGGELÉK	34
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	36

1. BEVEZETÉS

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

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

Különösen érzékenyek ezekre a folyamatokra azok a sejttypusok és szövetek, amelyek magas anyagcsere-igénnyel rendelkeznek, vagy folyamatos megújulásra kényszerülnek. A központi idegrendszer perifériás részének tekinthető retina, valamint a csontvelőben zajló sejt képzés anatómiailag és funkcionálisan elkülönülő rendszerek, mégis közös vonásuk a károsító környezeti hatásokkal szembeni fokozott sérülékenység. A retinában az oxidatív és gyulladásos terhelés funkcióromláshoz és sejtpusztuláshoz vezethet, míg a csontvelőben a progenitorsejtek érintettsége a vérsejt képzés zavarában és a külső beavatkozásokkal – például citotoxikus kezelésekkel – szembeni fokozott érzékenységekben nyilvánulhat meg.

Az elmúlt évek kísérletes eredményei arra utalnak, hogy ezek a válaszok nem tekinthetők egységesnek vagy lineárisnak. Iszkémiás, metabolikus és citotoxikus hatások gyakran egyidejűleg vannak jelen, és kölcsönhatásuk olyan komplex biológiai válaszokat eredményez, amelyek csak több szempont együttes

figyelembevételével értelmezhetők. A károsodásra adott biológiai válaszok jellege és mértéke így nemcsak a károsító inger természetétől, hanem az adott szövet állapotától és a beavatkozás időzítésétől is függ.

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

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

1. A pterostilbén retina-védő hatásának vizsgálata egészséges körülmények között, valamint iszkémia–reperfúziós károsodást követően, különös tekintettel a retinális ganglionsejtek túlélésére, a gliális reakciók alakulására, a gyulladásos és stresszhez kapcsolódó jelátviteli folyamatokra, továbbá az elektroretinográfiával mérhető funkcionális változásokra.

2. A vizsgálat célja a kolecisztokinin (CCK) jelátvitel szerepének feltárása a csontvelői granulocita–makrofág progenitorsejtek (CFU-GM) citotoxikus sérülékenységeinek alakulásában. Ennek során elemeztük a CCK-1 receptorhiány és a farmakológiai CCK-antagonizmus hatását, valamint vizsgáltuk ezek kölcsönhatását a karboplatin által kiváltott citotoxikus terheléssel.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Etikai engedélyek

A kísérleti terveket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága vette nyilvántartásba (regisztrációs számok: 13/2022/DEMÁB, 14/2022/DEMÁB), és a Hajdú- Bihar Megyei Kormányhivatal, Agrárügyi Főosztály, Élelmiszerlánc- biztonsági és Állategészségügyi Osztály engedélyezte.

A pterostilbén hatása retinális iszkémia–reperfúziós modellben

Kísérleti állatok és kezelések

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

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

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

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

A pterostilbén szisztémás hatásainak kizárása érdekében az iszkémia–reperfúziós (I/R) sérülést kizárólag a bal szemem hoztuk létre, míg a jobb szemek belső kontrollként szolgáltak (NO IR).

Retinális iszkémia-reperfúziós modell

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

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

A csomó fokozatos meghúzásával a retina vérellátása megszűnt, amely globális retinális iszkiémiát eredményezett. Az iszkémia kialakulását oftalmoszkópos vizsgálattal ellenőriztük; a szemfenék elszápadása a keringés megszűnését jelezte. Az altatás ideje alatt a szemfelszínt karbomeralapú géllal védtük a kiszáradástól (Vidisic, Bausch & Lomb, Berlin, Németország).

Az iszkémiás periódust 60 percen keresztül tartottuk fenn, ezt követően a ligatúrát meglazítottuk és eltávolítottuk, lehetővé téve a retina reperfúzióját. A keringés helyreállítását ismételt szemfenékvizsgálattal erősítettük meg.

Elektroretinográfia

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

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

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

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

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

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

Western Blot

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

A mintákat porrá zúztuk, majd homogenizáló pufferben szuszpendáltuk (25 mM Tris, 25 mM NaCl, 1 mM Na-ortovanadát, 10 mM NaF, 10 mM Na-pirofoszfát, 10 mM okadainsav, 0,5 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 1 mM fenilmetil-szulfonil-fluorid (PMSF), proteáz inhibitor koktél, Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország). Az első centrifugálás (2000 rpm, 10 perc, 4°C) után a felülúszó a citoplazmatikus és mitokondriális fehérjéket tartalmazta, míg a pelletben a nukleáris komponensek maradtak. A pelletet Triton X-100-at tartalmazó pufferben oldottuk, 1 órán át jégen inkubáltuk, majd 14 000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk (4°C). A kapott felülúszó a nukleáris frakciót képezte. A citoszolus frakciót a korábbi felülúszó további centrifugálásával (10 000 rpm, 20 perc, 4°C) nyertük.

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

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

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

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

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

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

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

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

Hisztológiai vizsgálatok

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

A mintákat 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk (10 g paraformaldehid, 50 μ L 10 N NaOH, 25 mL 10 $\times$ PBS, 200 mL desztillált víz; pH 7,4) 24 órán keresztül, 4 °C-on. A fixálást követően a szaruhártyán apró bemetszést végeztünk, majd a szemeket 1 órán át folyó vízben öblítettük, ezt követően 70%-os etanolban tároltuk a feldolgozásig.

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

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

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

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

Statisztikai analízis

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

CCK-1R antagonizmus hatása OLETF–LETO patkánymodellben

Kísérleti állatok

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

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

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

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

Kísérleti terv

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

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

A további kísérletekben LETO patkányokat CCK receptorantagonistákkal kezeltünk, proglumid és lorglumid ekvimoláris dózisaiban, kétféle szinten. Az állatok öt csoportba kerültek ($n = 12/\text{csoport}$): az első csoport fiziológiás sóoldatot (0,9% NaCl) kapott, a második és harmadik csoport 3 vagy 10 mg/kg proglumidot (proglumide sodium, $M_w = 356,39 \text{ g/mol}$; Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország), míg a negyedik és ötödik csoport 4 vagy 13 mg/kg lorglumidot (lorglumide sodium, $M_w = 481,39 \text{ g/mol}$; Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Németország) kapott, napi egyszeri beadással, egymást követő öt napon át. A választott 2-2 dózisszint a proglumid és a lorglumid $8,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/kg}$, illetve $2,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol/kg}$ ekvimoláris mennyiségeinek feleltek meg, így biztosítva a gyógyszerek hatásainak pontos, molekuláris szintű összehasonlítását. A CCK-antagonistákat lassú intravénás bolus formájában adtuk be (3–4 másodperc), miután az állatok farkát 1–2 percre meleg vízbe merítettük a vénák tágítása érdekében. Az injekciók beadása minden nap pontosan azonos időben (9:00 órai kezdettel) történt, állatról állatra haladva, ugyanabban a sorrendben.

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

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

CFU-GM kolóniaszám meghatározása

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

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

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

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

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

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

Annak vizsgálatára, hogy a CCK-receptor-antagonisták hatásai közvetlenül érvényesülnek-e a hemopoetikus progenitorsejteken, (nem elhízott) LETO patkányok csontvelőjéből származó mononukleáris sejteket használtunk. A sejteket a korábban ismertett módszerrel izoláltuk, majd primer lágy-gél kultúrákat hoztunk létre CFU-GM tenyésztés céljából. A tenyészeteket proglumid vagy lorglumid jelenlétében, illetve azok nélkül inkubáltuk. A vegyületek hatását 12 különböző koncentrációban vizsgáltuk, széles, 0,1–15 000 μM koncentrációtartományban.

CCK-1 és CCK-2 receptorok vizsgálata csontvelői sejtekben

A CCK_1 és CCK_2 receptorok jelenlétét LETO és OLETF patkányok femorális csontvelőjéből származó mononukleáris sejtekben vizsgáltuk ($n = 10/\text{csoport}$). Az állatok négy héten keresztül napi egyszer, per os 10 mg/kg proglumidot, illetve vivőanyagot (0,9% NaCl) kaptak.

A csontvelőből származó egysejtes szuszpenziókból a mononukleáris sejt frakciót Ficoll-jodamid gradienscentrifugálással (1077 g/ml) izoláltuk, majd hemocitóméterrel, tripánkéék festés mellett meghatároztuk a sejtszámot és az

életképességet. A megfelelő sejtmennyiség biztosítása érdekében két állat mintáját összevontuk, így csoportonként 5 minta képezte az analízis alapját.

Az életképes, magvas sejteket $5 \times 10^6/\text{ml}$ koncentrációban, 10 ml teljes, módosított McCoy's 5A táptalajban tenyésztettük kolónia-stimuláló faktorok jelenlétében, metilcellulóz hozzáadása nélkül, szuszpenziós tenyésztőflaskában (Greiner Bio-One Ltd., Mosonmagyaróvár, Magyarország). A tenyészeteket 37°C -on, 5% CO_2 -t tartalmazó, 100% relatív páratartalmú légkörben inkubáltuk.

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

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

RNS izolálás és reverz transzkripció

A fent ismertetett kultúrákból származó csontvelői sejteket RNAlater oldatban (Qiagen, Hilden, Németország) tároltuk az RNS-t izolálásig, az mRNS degradációjának megelőzése érdekében. A teljes RNS izolálását RNA Protect Mini Kit segítségével (Qiagen) végeztük, a gyártó protokolljának megfelelően. Az RNS koncentrációját SmartSpec™ Plus spektrofotométerrel (Bio-Rad, Hercules, Egyesült Államok) határoztuk meg. Az egyszálú cDNS szintézisét 2 μg teljes RNS felhasználásával, véletlenszerű primerekkel (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Németország) és SuperScript™ II RNase H⁻ reverz transzkriptázzal (Invitrogen) végeztük, a korábban leírt módszer szerint.

Valós idejű kvantitatív PCR

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

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

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

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

TaqMan assay kiértékelése

A CCK-1R, CCK-2R és a referencia génként alkalmazott 18S rRNS expresszióját valós idejű PCR-rel határoztuk meg. Minden mintát három technikai párhuzamosban, 384 lyukú PCR-lemezen vizsgáltunk. A reagensek szennyeződésének kizárására no template control (NTC) mintákat is alkalmaztunk. A küszöbciklus (Ct) értékek meghatározása az Applied Biosystems SDS 2.1 szoftverrel történt. A relatív génexpresszió számítását a Livak és Schmittgen által leírt $\Delta\Delta Ct$ módszerrel végeztük az értékeket a 18S rRNS referencia génhez normalizálva.

Statisztikai analízis

Az egyes állatokból vagy mintákból származó adatokat használtuk fel a statisztikai elemzéshez. Az eredményeket átlag $\pm$ SD formájában adtuk meg. A csoportok közötti különbségeket Kruskal–Wallis-féle varianciaanalízissel értékeltük, két csoport összehasonlítására Mann–Whitney U-próbát alkalmazva. A különbségeket $P < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$; $P < 0,0001$). Az adatok feldolgozását GraphPad Prism szoftverrel végeztük (8.0.1; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Egyesült Államok).

Az mRNS-expresszió elemzését a Livak és Schmittgen által leírt $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszerrel végeztük. A CCK-1R és CCK-2R transzkriptumszinteket az 18S rRNS

referencia génhez normalizáltuk (ΔCt), majd a ΔCt értékeket a kezetlen LETO és OLETF csoportok megfelelő értékeihez viszonyítottuk ($\Delta\Delta Ct$). A kezetlen kontroll csoportok relatív expressziós értékét 1-nek (100%) tekintettük. A kapott $2^{-\Delta\Delta Ct}$ értékeket átlag $\pm$ SEM formájában adtuk meg, és Kruskal–Wallis varianciaanalízissel, majd Mann–Whitney U-próbával értékeltük. A különbségeket $P < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

A pterostilbén hatása retinális iszkémia–reperfúziós modellben

Elektroretinográfia

Az ERG vizsgálatok során szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők a kísérleti csoportok között. Mind az a-hullám, mind a b-hullám amplitúdója a MUCI IR csoport mutatta a legalacsonyabb értékeket, amelyek szignifikánsan elmaradtak a többi vizsgálati csoportban mért válaszoktól. A b-hullám átlagos amplitúdója szignifikánsan csökkent a MUCI IR csoportban, a MUCI NO IR, valamint a PTER IR csoportokhoz képest. A PTER IR csoportban a b-hullám amplitúdója szignifikánsan magasabb volt a MUCI IR csoporthoz viszonyítva. Az a-hullám és b-hullám válaszok implicit idejének elemzése során nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a különböző kezelési csoportok között.

Western Blot

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

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

Hisztológia

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

csoporthoz viszonyítva. Mindezek alapján a legnagyobb retinaréteg-vastagságot a PTER NO IR csoportban mértük.

CCK-1R antagonizmus hatása OLETF–LETO patkánymodellben

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

Az OLETF patkányok vizsgálata során azt elemeztük, hogy a CCK-1R hiánya befolyásolja-e a hemopoézis folyamatát. A csontvelő működését a teljes sejtszám, a CFU-GM kolóniaképző képesség, valamint a femorális csontvelő CFU-GM tartalmának meghatározásával értékeltük.

Eredményeink alapján az OLETF patkányokban sem a csontvelői sejtszám, sem a CFU-GM kolóniák száma, sem pedig a femurból származó összes CFU-GM tartalom nem mutatott szignifikáns eltérést a vad típusú, azonos genetikai háttérrel rendelkező LETO patkányokhoz viszonyítva. Ugyanakkor az in vitro vizsgálatok során, a karboplatin toxicitásának értékelésekor a CFU-GM sejtek fokozott érzékenysége volt megfigyelhető az OLETF csoportban.

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

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

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

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

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

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

A CFU-GM kolóniák számát LETO patkányok csontvelői mononukleáris sejtjeiből létrehozott in vitro tenyészetekben határoztuk meg.

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

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

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

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

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

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

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

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

A dózis–hatás görbe csökkenő szigmoid lefutást mutatott mind proglumid, mind lorglumid esetében. A dózis–hatás elemzés alapján a proglumid IC_{50} értéke 76,82 μM , míg a lorglumid IC_{50} értéke 47,37 μM volt.

Kolecisztokinin-receptorok vizsgálata csontvelői sejtekben

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

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

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

5. MEGBESZÉLÉS

A pterostilbén hatása retinális iszkémia–reperfúziós modellben

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

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

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

A Western blot vizsgálatokban a GFAP expressziójának csökkenése pterostilbén-kezelést követően a reaktív gliaaaktiváció mérséklődésére utal. A GFAP a Müller-sejtek és asztrociták aktivációjának egyik legfontosabb markere, amelynek fokozott expressziója az I/R károsodásra adott jellegzetes válaszként értelmezhető. A gliózis a gliasejtek proliferációjával, hipertrofiájával és funkcionális átrendeződésével jár, és bár kezdetben protektív adaptív mechanizmusként jelenhet meg, tartós fennállása

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

A jelen eredmények illeszkednek a pterostilbennel kapcsolatos korábbi kutatásokhoz, amelyek antioxidáns, gyulladáscsökkentő és neuroprotektív hatásokat írtak le. Ugyanakkor jelen munka kifejezetten a retina I/R károsodás kontextusában igazolja ezen hatásokat. Fontos hangsúlyozni, hogy a vizsgálat több, a károsodás kialakulásában szerepet játszó molekuláris folyamat egyidejű elemzésével átfogóbb képet ad a vegyület hatásmechanizmusáról, mint az egyetlen biomarkerre korlátozódó megközelítés. A gyulladás, az oxidatív stressz és az apoptózis egyidejű mérséklődése arra utal, hogy a pterostilbén több, egymással összefüggő kóros mechanizmust befolyásol. Az eredmények lehetséges klinikai jelentőségét támasztja alá, hogy az I/R mechanizmusa számos retinális kórkép patogenezisében központi szerepet játszik, így többek között a diabéteszes retinopátiában, az időskori makuladegenerációban, a glaukomában és a centrális retinaartéria-elzáródás esetében is. Ugyanakkor hangsúlyozandó, hogy a vizsgálat állatkísérletes modellen alapult, ami az eredmények közvetlen humán alkalmazhatóságát korlátozza.

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

Az értekezés második kísérletében a CCK jelátvitel szerepét vizsgáltuk a csontvelői CFU-GM karboplatin által kiváltott károsodással szembeni sérülékenységének alakulásában, különös tekintettel a granulopoézis szabályozására. A mielotoxicitás a karboplatin egyik dóziskorlátozó mellékhatása, amely jelentősen hozzájárul az onkológiai gyógyszerek szűk terápiás ablakához. A vérképzés valamennyi sejtvonala érintett lehet, ugyanakkor a CFU-GM populáció az egyik legfontosabb célpont, mivel károsodásuk közvetlenül korlátozza a kezelési

protokollokban alkalmazható dózisokat. Elhízott betegekben bizonyos daganattípusok kockázata magasabb, és a betegség kimenetele is kedvezőtlenebb, mint a normál testsúlyúaknál.

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

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

Vizsgáltuk az OLETF patkányok hematopoézisét, amelyekben genetikai eredetű CCK-1R-hiány áll fenn, valamint a vad LETO patkányokét is, amely törzsből az OLETF patkányok származnak. Az OLETF patkányokat az obezitás és a nem-inzulin-dependens diabétesz mellitusz jól jellemzett állatmodelljeként hozták létre. Korábbi kísérleteinkben a karboplatin csontvelő-toxicitása fokozott volt in vivo db/db egerekben, amelyek az obezitással társult diabétesz mellitusz modelljeként szolgálnak. Az OLETF patkányokban körülbelül 18 hetes korban alakul ki diabétesz mellitusz, ezért a diabétesz mellitusz hatásainak kizárására kísérleteinkben 8 hetes, normál éhomi vércukorszinttel rendelkező állatokat használtunk. Ugyanakkor az inzulinrezisztencia teljes kizárása ebben az életkorban sem volt lehetséges, mivel az állatok ekkorra már túlsúlyosak voltak. Bár a hematopoézis kezdetben megőrzöttnek tűnt az obez OLETF patkányokban, CFU-GM progenitoraik érzékenysége szignifikánsan nagyobb volt a karboplatin toxicitására, mint a LETO patkányoké. Az inzulinrezisztencia önmagában is csökkenti a karboplatin-toxicitással szembeni

érzékenységi küszöböt. Ezért a további kísérletekben vad típusú, nem obez LETO patkányokat alkalmaztunk annak vizsgálatára, hogy fiziológiás körülmények között hogyan befolyásolják a CCK-antagonisták a CCK-receptorokon keresztül a granulopoézist.

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

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

Mindkét CCK-receptor szerepet játszik a hasnyálmirigy-daganatok karcinogenezisében, ugyanakkor a rendelkezésre álló klinikai adatok alapján a CCK-1 receptor specifikusabb jelentősége valószínűsíthető, mivel egy rendkívül szelektív CCK-2R-antagonista (Z-360) nem bizonyult hatékonynak áttétes hasnyálmirigy-karcinómában egy II. fázisú klinikai vizsgálat során. Mind a proglumid, mind a lorglumid hatékonynak bizonyult in vivo állatkísérletes modellekben a hasnyálmirigy -karcinóma ellen. A devazepid, amely a lorglumidtól és a proglumidtól eltérő kémiai szerkezetű, CCK-1R-szelektív antagonista, szintén

szignifikánsan csökkentette a hasnyálmirigy-daganatos sejtek invazivitását egérmodellekben, ami a CCK-1 receptor közvetített, specifikus hatásmechanizmusra utal.

Tehát megállapítható, hogy az állatkísérletekben antitumor hatékonyságot mutató dózistartományok átfedést mutattak azokkal a dózisokkal, amelyek saját kísérleteinkben a normál csontvelői CFU-GM progenitor sejtek proliferációjának gátlását eredményezték. A lorglumid 10 mg/kg parenterális adagolás mellett gátolta a hasnyálmirigy-karcinogenezist patkányokban, míg a proglumid pancreas- és hepatokarcinómával szemben mutatott hatékonyságot 0,1 mg/ml koncentrációban az ivóvízben, ami egérmodellben megközelítőleg 30 mg/kg orális dózissal felelt meg. Ezenfelül a CCK-antagonistákkal végzett előkezelés fokozta a CFU-GM progenitor sejtek karboplatinmal szembeni érzékenységet. A platinaalapú gyógyszerek a daganattellenes kezelések egyik alapvető pillérét képezik, és a kemoterápiában részesülő betegek mintegy fele részesül ilyen típusú kezelésben. A karboplatin a platinaszármazékok között kedvezőbb nem-hematológiai toxicitási profillal rendelkezik, mivel a nefro- és neurotoxicitás mértéke mérsékeltebb, mint más platina-vegyületek esetében. Paklitaxellel kombinálva a karboplatint számos szolid tumor kezelésében alkalmazzák, így például petefészek-, endometrium-, nem kissejtes tüdő- és méhnyak-daganatokban. Valamint hatékonynak bizonyult előrehaladott pancreas adenokarcinómák és hepatocelluláris karcinómák terápiájában is.

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

Saját eredményeink alapján a CCK-1R-szelektív lorglumiddal végzett előkezelés a CFU-GM progenitor sejtek érzékenységét nagyobb mértékben fokozta, és a karboplatin myelotoxikus hatását kifejezettebben erősítette, mint a nem-szelektív proglumid. A proglumid, mint nem szelektív CCK-receptor-antagonista, szeptikus állapotban csökkentette a neutrofilek és makrofágok fertőzéses gócba történő migrációját. A CCK-2 receptor jelenlétét humán perifériás vér mononukleáris sejteiben, valamint perifériás vérből származó polimorfonukleáris leukocitákon is igazolták. Patkány tüdő intersticiális makrofágjaiban mind a CCK-1R, mind a CCK-2R expresszióját kimutatták, és lipopoliszacharid-stimuláció hatására ezen receptorok génexpressziója fokozódott. Peritoneális makrofágokban ezzel szemben kizárólag CCK-1R volt detektálható, míg a CCK-2R jelenléte nem volt kimutatható,

és a CCK-1R génexpressziója lipopoliszacharid hatására szignifikánsan emelkedett. A CCK gyulladáscsökkentő és immunmoduláló hatásai túlnyomórészt a CCK-1 receptor közvetítésével érvényesülnek, beleértve az iNOS expresszió csökkentését, az NF- κ B-jelátviteli út vonal aktivitásának mérséklését, valamint a fagocitózis és a makrofágok által közvetített szöveti infiltráció gátlását, amelyek potenciálisan kedvező hatással bírhatnak szeptikus állapotokban. Ezzel szemben a devazepid, egy CCK-1R-szelektív antagonist, képes volt ezen immunmoduláló hatások egy részének gátlására. Azonban a HL-60 promielocitás leukémiás sejtvonalban kimutatták a CCK-2R jelenlétét. Ugyanakkor jelenleg nem állnak rendelkezésre egyértelmű adatok arra vonatkozóan, hogy ezek a receptorok normál hematopoetikus sejtekben is megtalálhatók-e. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a normál CFU-GM progenitor sejtekben nemcsak a CCK-2R, hanem a CCK-1R is expresszálódik, és potenciálisan védő szerepet tölthet be. Mindkét receptort kimutattuk a LETO patkányok CFU-GM-ben gazdag csontvelőjében. A proglumid 10 mg/kg dózisé, négy héten át alkalmazott orális kezelése mindkét receptor expresszióját csökkentette. Az OLETF patkányokban, ahol genetikai okból a CCK-1R funkcionálisan hiányzik, kizárólag a CCK-2R volt kimutatható. A LETO patkányok CFU-GM sejtjeiben mindkét CCK-receptort detektáltuk, és a CCK-antagonistákkal végzett kísérleteink arra utaltak, hogy az obez OLETF patkányokban fennálló CCK-1R-hiány legalább részben hozzájárulhat a csontvelői progenitor sejtek karboplatinnal szembeni fokozott érzékenységehez. Érdemes megemlíteni, hogy az anorexigén hatású inzulin és leptin is szerepet játszik a limfo- és mielopoézis fenntartásában, és korábbi vizsgálatainkban az inzulin granulopoézist védő hatását is igazoltuk.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a CCK szintén védő szerepet tölthet be a granulopoézisben. A jelen vizsgálat adatai összességében arra utalnak, hogy a CCK-1 receptorok szerepet játszanak a granulopoézis szabályozásában. Az a tény, hogy a leptin- vagy CCK-agonistákkal végzett terápiás próbálkozások nem bizonyultak hatékonynak az obezításban jelentkező étvágyfokozódás csökkentésében, arra utal, hogy az inzulinrezisztencia mellett más citokinekkal szembeni csökkent érzékenység kialakulása is feltételezhető. Ezt támasztják alá Desai és mtsai. eredményei is, akik kimutatták, hogy a CCK-1 válaszkészsége populáción belül változó, és obez betegekben csökkent a normál súlyú betegekhez képest. Korábban kimutattuk, hogy az inzulinrezisztencia a csontvelői progenitor sejtek működését is érinti, és hogy a rosiglitazon, egy inzulinérzékenyítő szer, védőhatással bír a 5-fluorouracil által kiváltott mielotoxicitással szemben. Legutóbbi eredményeink összhangban állnak Miyamoto és munkatársai megfigyeléseivel,

amelyek szerint a CCK védő szerepet játszik a granulopoézisben a CCK-1 receptor közvetítésével, a normál csontvelő-eredetű makrofágok képződése során. A CCK-antagonisták alkalmazása befolyásolta a granulopoézist, és érzékenyebbé tette a CFU-GM sejteket a karboplatin toxicitásával szemben, feltehetően azért, hogy gátolta aolecisztokinin CCK-1 receptoron keresztül érvényesülő védőhatását, amely a funkcionálisan releváns, specifikusolecisztokinin-receptor. Összhangban a korábbi publikációkkal, amelyek aolecisztokinin immunmoduláló hatásait írták le az érett makrofágokon, vizsgálataink igazolták, hogy ezek a szabályozó funkciók a csontvelői progenitor sejtek szintjén is érvényesülnek.

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

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

6. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

7. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

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

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

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

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

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

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

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

Proglumid és lorglumid előkezelés fokozza a CFU-GM progenitor sejtek karboplatinnal szembeni érzékenységet, ami dóziszfüggő módon csökkent kolóniaképző képességben nyilvánul meg.

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

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

8. FÜGGELÉK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/263/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Pelles-Taskó Beáta

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

MTMT azonosító: 10105317

A PhD értekezés alapján szolgáló közlemények

1. **Pelles-Taskó, B.**, Varga, A., Géresi, K., Juhász, B., Szilvássy, Z., Benkő, I.: CCK-1R-selective and non-selective cholecystokinin antagonists, lorglumide, and proglumide increased toxicity of carboplatin to granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM) of bone marrow of rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 399 (1), 129-141, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-025-04391-6>
IF: 3.1 (2024)
2. **Pelles-Taskó, B.**, Szekeres, R., Takács, B., Szilágyi, A., Ujvárosy, D., Bombicz, M., Priks, D., Varga, B., Gesztelyi, R., Szabó, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: From Nature to Treatment: The Impact of Pterostilbene on Mitigating Retinal Ischemia-Reperfusion Damage by Reducing Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Life (Basel)*. 14 (9), 1-13, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life14091148>
IF: 3.4

További közlemények

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





4. Leiter, I., Lelesz, B., Hegedűs, C., Németh, J., **Pelles-Taskó, B.**, Ujlaki, G., Bhattoa, H. P., Felszeghy, E. N., Lengyel, S., Páll, D., Balla, G., Szilvássy, Z., Juhász, B., Kiss, R.: Plasma Melanin-Concentrating Hormone in Childhood Obesity and Its Association with Metabolic Parameters: a Clinical Observational Study.
Diabetes Metab. Syndr. Obes. "Accepted by Publisher", 2026.
IF: 3 (2024)
5. Szekeres, R., Priksz, D., Bombicz, M., **Pelles-Taskó, B.**, Szilágyi, A., Bernát, B., Pósa, A., Varga, B., Gesztelyi, R., Somodi, S., Szabó, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Exercise Types: Physical Activity Mitigates Cardiac Aging and Enhances Mitochondrial Function via PKG-STAT3-OPA1 Axis.
Aging Dis. 16 (5), 3040-3054, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2024.0959>
IF: 6.9 (2024)
6. Takács, B., Szilágyi, A., Priksz, D., Bombicz, M., Szabó, A. M., **Pelles-Taskó, B.**, Rusznayk, Á., Haimhoffer, Á., Gesztelyi, R., Szilvássy, Z., Juhász, B., Varga, B.: Electroretinographical Analysis of the Effect of BGP-15 in Eyedrops for Compensating Global Ischemia-Reperfusion in the Eyes of Sprague Dawley Rats.
Biomedicines. 12 (3), 1-16, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines12030637>
IF: 3.9
7. Szekeres, R., Priksz, D., Kiss, R., Romanescu, D. D., Bombicz, M., Varga, B., Gesztelyi, R., Szilágyi, A., Takács, B., Tarjányi, V., **Pelles-Taskó, B.**, Forgács, I. N., Gálné Remenyik, J., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Therapeutic Aspects of Prunus cerasus Extract in a Rabbit Model of Atherosclerosis-Associated Diastolic Dysfunction.
Int. J. Mol. Sci. 24 (17), 1-19, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241713253>
IF: 4.9

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 29,1

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
6,5

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

Debrecen, 2026.05.08.



9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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