

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Varga Balázs

**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2014.**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Retinakárosodások farmakológiai kivédése

Dr. Varga Balázs

TÉMAVEZETŐ: Prof. Dr. Tósaki Árpád



**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2014.**

Tartalomjegyzék

Gyakran használt rövidítések jegyzéke	1
1. Bevezetés és célkitűzés	2
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. A szem rövid anatómiája és a retina szövettana	5
2.2. Az elektroretinográfia	10
2.2.1. Az elektroretinogramm felépítése és a látás rövid biokémiája	11
2.3. A mono-nátrium glutamát (MSG)	16
2.3.1. A glutamát receptorai	16
2.3.2. Fiziológiai hatások	19
2.3.3. Patológiai hatások – Glutamát excitotoxicitás	20
2.4. Az iszkémia-reperfúziós károsodás	22
2.4.1. A retina vérellátása és iszkémia-reperfúziós károsodása	22
2.4.2. A hemoxigenáz 1 enzim (HO-1) és szerepe az iszkémiában	24
2.5. A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)	27
2.5.1. Fiziológias hatások	27
2.5.2. Glutamát indukálta retinakárosodás elleni védő hatás	29
2.5.3. A PACAP receptorai	29
2.6. Az alfa melanocyta stimuláló hormon (α -MSH)	30
2.6.1. Fiziológias hatások	30
2.6.2. Antiiszkémiás hatás	31
2.6.3. Melanocortin-receptorok	32
3. Anyagok és módszerek.....	34
3.1. Kísérleti állatok.....	34
3.2. Iszkémia és reperfúzió (I/R)	34
3.3. Elektroretinográfia (ERG)	35
3.4. Szövettani és elektronmikroszkópos mintafeldolgozás	36
3.5. Western blot	38
3.6. Hemoxigenáz aktivitásmérés	39
3.7. Kísérleti protokollok és csoportok.....	39
3.7.1. PACAP-kísérlet	39
3.7.2. MSH-kísérlet 1. fázis	40
3.7.3. MSH-kísérlet 2.fázis	42
3.8. Statisztika.....	43

4. Eredmények	44
4.1. A PACAP-kísérlet eredményei	44
4.1.1. Szövettan	44
4.1.2. Elektroretinográfia	44
4.2. Az MSH-kísérlet I. fázisának eredményei	47
4.2.1. Optimális α -MSH-dózis meghatározása elektroretinográfiával	47
4.2.2. Szövetteni eredmények	49
4.2.3. Elektronmikroszkópos eredmények	49
4.2.4. Western blot Analízis	51
4.3. Az MSH-kísérlet II. fázisának eredményei	52
4.3.1. Elektroretinográfia	52
4.3.2. A hemoxigenáz-aktivitásmérés eredményei	54
5. Megbeszélés	55
6. Összefoglalás	61
7. Irodalom	62
7.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom.....	62
7.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	84
7.3. További közlemények.....	85
8. Tárgyszavak	89
9. Köszönetnyilvánítás	90
10. Függelék	92

Gyakran használt rövidítések jegyzéke

ACTH	adrenocorticotróp hormon
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav
CO	szén-monoxid
EAAT	glutamát transzporter (excitatory amino acid transporter)
EM	elektronmikroszkóp
ERG	Elektroretinográfia
GCL	Ganglionsejtek rétege (ganglion cell layer; stratum ganglionare)
HO	Hemoxigenáz
INL	belső magvas réteg (inner nuclear layer; stratum granulosum internum)
IPL	belső szinaptikus réteg (inner plexiform layer; stratum plexiforme internum)
I/R	Iszkémia-reperfúzió
MC-R	melanocortin receptor
mGluR	metabotróp glutamát receptor
MLE	Membrana limitans externa
MLI	Membrana limitans interna
MSG	Mono-nátrium-glutamát
MSH	Melanocita-stimuláló hormon
NFL	idegrost-réteg (nerve fiber layer; stratum neurofibrarum)
NMDA	N-metil-D-aszpartát
ONL	külső magvas réteg (outer nuclear layer; stratum granulosum externum)
OPL	külső szinaptikus réteg (outer plexiform layer; stratum plexiforme externum)
PAC	PACAP-receptor
PACAP	Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid
PE	pigment epithelium (stratum pigmentosa retinae)
PL	fotoreceptorok rétege (photoreceptor layer; stratum photosensorium retinae)
POMC	pro-opiomelanocortin
SEM	az átlag szórása (standard error of the mean)
SnPP	Ón-protoporfirin IX
VIP	vazoaktív intesztinális peptid
VPAC	VIP és PACAP receptor

1. Bevezetés és célkitűzés

A retina károsodása a szemészeti megbetegedések jelentős hányadában kóroki tényezőként szerepel. Kísérleteinkben hatékony farmakológiai beavatkozások lehetőségeit tanulmányoztuk retinakárosító hatások kivédésére, mint amilyen a glutamát excitotoxicitás és az iszkémia-reperfúzió.

A glutamát és receptorai kulcs fontosságú szerepet játszanak a szem számos neurológiai betegségében valamint patológiai állapotaiban (Sucher és mtsai., 1997; Smythies, 1999). A mono-nátrium-glutamát (MSG) – közvetlenül a szembe juttatva vagy újszülött korban akár még subcutan injekció formájában adva is – a belső retinális rétegek tönkretételéhez vezet (Babai és mtsai., 2005). Hasonlóképpen az iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodást és a szöveti mikrocirkuláció változását is kóroki tényezőként írták le több szemészeti betegségben, mint például retinális érelzáródás (Jonas és mtsai., 2010), glaukóma (Agarwal és mtsai., 2009), diabeteses retinopathia (Curtis és mtsai., 2009) stb. Az I/R-társult megbetegedések pathogenezisének egyre alaposabb megismerése ellenére a klinikai gyakorlat számára jelenleg kevés bizonyított hatékonyságú neuroprotektív kezelés áll rendelkezésre.

A hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid (PACAP) egy endogén neuropeptid, nagyon hatékony neurotróf és neuroprotektív hatásokkal, melyről számos retinális degenerációs modellben bebizonyosodott, hogy retinoprotektív hatású. Hazai kutatócsoportok több bizonyítékot is szolgáltatottak már arra nézve, hogy a PACAP az MSG-indukálta retinális léziókban protektív (Tamas és mtsai., 2004) valamint demonstrálták a PACAP védő hatását a retina neurokémiaileg beazonosított sejtípusain (Atlasz és mtsai., 2008). Habár a fentebb említett adatok bizonyítják, a PACAP retinavédő hatásait, nem ismert, hogy vajon a morfológiai változások összefüggésben vannak-e a funkcionális károsodásokkal. Klinikai szempontból nézve nagyon fontos, hogy fel tudjuk mérni a lehetséges funkcionális javulást exogén PACAP-kezelés hatására. Ezért MSG-indukálta retina-károsodást felhasználva kísérletünk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a PACAP funkcionális retinavédő hatásait elektroretinográfiás méréssel: elsődleges célunk volt a megbízható, reprodukálható méréseket kivitelezni tudó ERG-módszer alkalmazása.

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiban egy, a szervezetben is előforduló peptid hormonnal, az α -melanocita-stimuláló hormonnal (α -MSH) végzett kísérleteket (Vecsernyes és mtsai., 2003). Az α -MSH bizonyítottan megvédi a szívmot az iszkémia/reperfúzió (I/R) - indukálta károsodásoktól (Bazzani és mtsai., 2001; Vecsernyes és mtsai., 2003), valamint

több kísérletben bebizonyosodott az α -MSH I/R elleni védő hatása agy szövetben (Forslin Aronsson és mtsai., 2006), vese szövetben (Chiao és mtsai., 1997), valamint a gasztrointesztinális traktusban is (Zou és mtsai., 2003). Ezek a korábbi eredmények azt sugallják, hogy az α -MSH képes lehet az iszkémia-reperfúziós károsodások – beleértve szemészeti betegségek – megelőzésére illetve kezelésére. Habár a szemészeti I/R indukálta kórképek jelentősen károsítják a retinát és annak funkcióját, az α -MSH retinoprotektív hatására nézve átfogó vizsgálatok mindezidáig nem történtek. Kísérletünk célja volt bemutatni az α -MSH védő hatását I/R-indukálta retinakárosodásban patkány modellen. Céljaink közé tartozott egy optimális kezelési dózis megállapítása elektroretinográfia segítségével, majd vizsgáltuk olyan iszkémia-reperfúziós paraméterek kezelés hatására történő változását, mint a szöveti ödéma, a retina sejtjeinek strukturális degeneratív elváltozása és az iszkémia-reperfúziós károsodásokban bizonyítottan protektív hatású hősokk fehérje (Haines és mtsai., 2012), a hemoxigenáz 1 (HO-1) enzim expressziójának változása. További céljaink közt szerepelt olyan nem-HO-1-függő mechanizmusok létének bizonyítása vagy cáfolása, melyek esetlegesen hozzájárulhatnak az α -MSH citoprotektív hatásához. Kutatócsoportunk feltételezése volt, hogy az α -MSH az evolúció egy korábbi szakaszában fontos szerepet tölthetett be a szervezet védekező mechanizmusában (bőrszínváltó hatás), ennek alapján stressz hatására felszabaduló hormonként is viselkedhet. Ezért vizsgáltuk a posztisztkémiásan alkalmazott α -MSH hatását is.

2. Irodalmi áttekintés

A szemészeti megbetegedések jelentős hányada áll összefüggésben a retina károsodásával. Ezek közé tartozik a retinális érelzáródás, glaukóma, diabeteses retinopathia, macula degeneratio, retinoblastoma, és a retinopathia praematurorum. Egy újabb felmérés szerint az USA-ban a retinális arteriás occlusio évenkénti incidenciája 100 000 lakosra 0.85, míg a tíz évre vetített kumulatív incidencia 1.5% (SzP1, 2014). A 40 évesnél idősebb kaukázusi népességben a glaukóma gyakorisága mintegy 2%-ra tehető (SzP2, 2014). A diabetes mellitus szemészeti szövődményei a betegek közel egyharmadában lépnek fel, és minden tizedik cukorbeteg esetében súlyos látásromláshoz vezetnek. A kórkép jelentőségét kiemeli, hogy hazánkban a diabeteses retinopathia a második leggyakoribb vaksági ok (SzP3, 2014). A macula degeneráció jelentőségét az adja, hogy a fejlett országokban ez a felnőttkori szerzett vakság legfontosabb oka; hazánkban a vaksági statisztikákban vezető helyen szerepel, részaránya 22-25% (SzP4, 2014). A retinoblastoma ritka daganat (incidenciája az élveszületéseket tekintve: 1:18000-1:20000), amely azonban a leggyakoribb gyermekkori malignus intraokuláris tumor (SzP5, 2014). A retinopathia praematurorum különböző stádiumainak kialakulása 1500 gramm születési súly alatt 60%, melyen belül a 750-1000 gramm születési súlycsoportban a retinopathia incidenciája 78%-ra tehető és 750 gramm születési súly alatt pedig eléri a 90%-t (SzP6, 2014). Megemlíthetjük még a retinopathia pigmentosa retinae-t, mely progresszív, örökletes retinadegenerációk heterogén csoportja. Prevalenciája a fejlett országokban 1:3000 és a tudomány jelenlegi állása szerint sajnos gyógyíthatatlan.

Kísérleteinkben állatmodelleken vizsgáltuk a retina károsodását, annak patomechanizmusát illetve olyan hatóanyagokat, amelyek képesek lehetnek kivédeni a retina I/R károsodás miatti funkcióvesztését. Ehhez egy jól működő, retinafunkciót mérni képes rendszerrel dolgoztunk, az elektroretinográfiával. Olyan hatóanyagokat vizsgáltunk, melyekkel hatékonyan kezelhetők lennének szemészeti betegségek (mint például retinális vaszkuláris okklúzió, glaukóma, diabeteses retinopathia stb.) és melyekre mindezidáig kevés bizonyított hatékonyságú neuroprotektív kezelés áll rendelkezésre a klinikai gyakorlat számára.

Munkám elején – a szem rövid anatómiai-szöveti leírását követően – bemutatom mérőrendszerünket, majd az alkalmazott retinakárosító hatásokat, végül a vizsgált protektív hatóanyagokat.

2.1. A szem rövid anatómiája és a retina szövettana

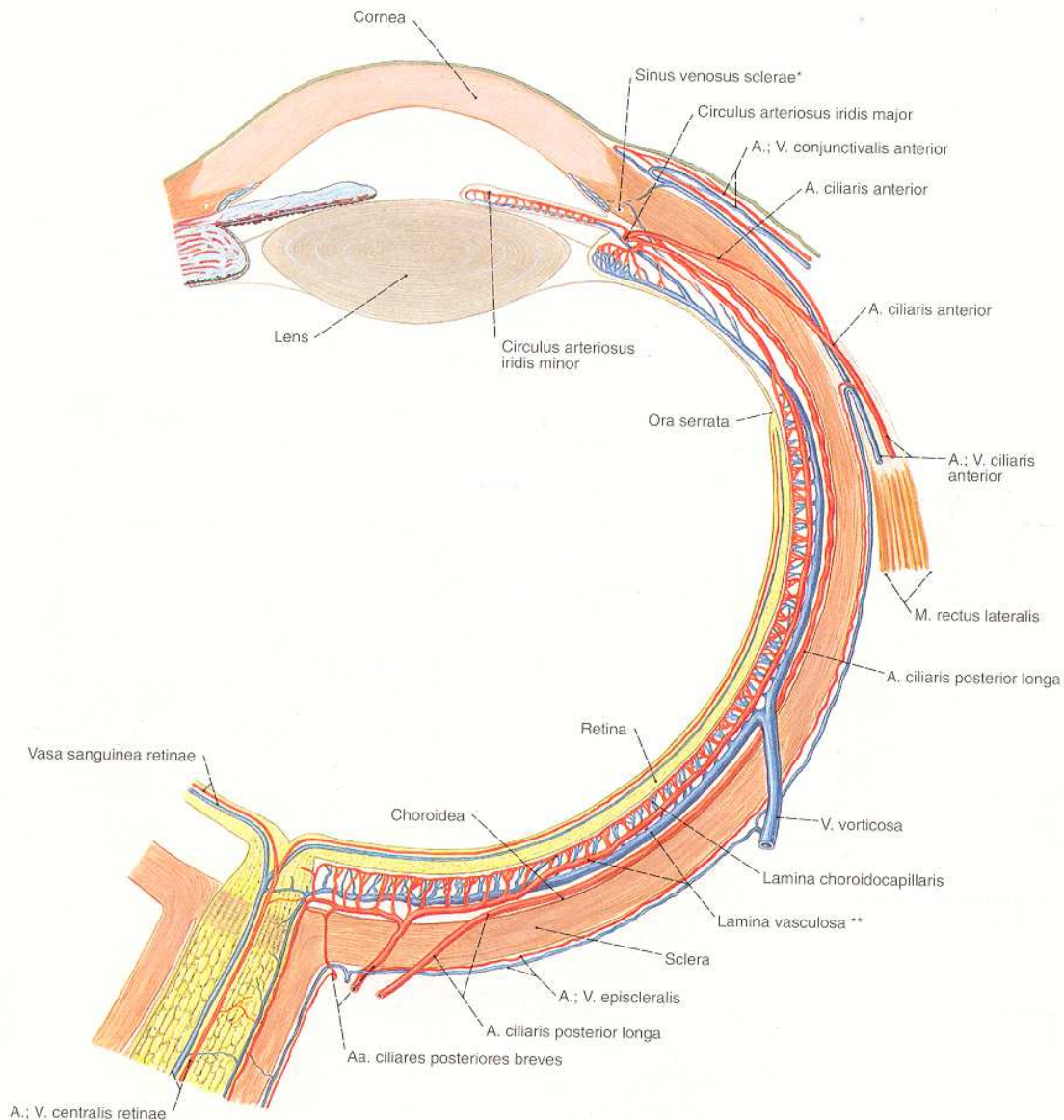
Látószervünk három fő része a szemgolyó (*bulbus oculi*), a látóideg (*nervus et tractus oculi*), és a járulékos szervek (*organa accesoria*). Ezek közül a szemgolyó anatómiai felépítését és szövettanát foglalom össze. (Irodalmi forrásként ebben a fejezetben végig a Röhlich Pál által szerkesztett igen kiváló Szövettan tankönyvre támaszkodom (Röhlich, 2006).

Szemgolyó (*bulbus oculi*) egy átlagosan 24 mm átmérőjű, gömb alakú test, felülről lefelé kis mértékben lapított. Előretekintő felszínéből kissé előreugrik az átlátszó szaruhártya. A szemgolyót három burok (*tunica bulbi*) alkotja, melyeken belül található a szemcsarnokok (*camerae bulbi*), a lencse (*lens*), és az üvegtest (*corpus vitreum*). Fejlődéstanilag a szemgolyó három burka különbözik egymástól: a két külső burok mesenchymális eredetű, míg a fényérzékeny belső burok különlegesen differenciálódott agyszövetnek (*neuroectoderma*) tekinthető. Ez a belső burok a szemfejlődés során az agy telepéből kinövő szemhólyag származéka, amelynek fala azonban betüremkedik kettős falú szemszerleget hozva létre. Fejlődéstanilag jelentőségű, hogy a szemlencse ektodermából fűződik le, tehát ektodermális (de nem neuroectodermális) eredetű.

A külső vagy rostos burok (***tunica fibrosa***) erős, kollagén rostokból felépített gömbhéjszerű burok, melyet a szem tartalmának nyomása tart feszesen (1. ábra). Hátsó része (a szemgolyó hátsó négyötöde) az ínhártya vagy ***sclera*** lemezes felépítésű rostos burok; ez a „szemfehérje”. Elülső része a szaruhártya vagy ***cornea*** a szemgolyóból előredomborodó kb. 12 mm átmérőjű óraüvegszerű gömbhéj szelvény, amely átlátszósága miatt szabad szemmel teljesen különálló szelvénynek tűnik.

A *sclera* egy tömött rostos kötőszövet, melyben nagyszámú melanocita is előfordul; viszonylag kevés ér található benne. A *cornea* gyakorlatilag egy (ektoderma eredetű) epitél és egy (mesenchyma eredetű) endotél réteg között lévő rendkívül szabályos szerkezetű ún. lemezes kötőszövet (szintén mesenchymális eredettel), melyet az előbb említett két rétegtől mindkét oldalán egy-egy határhártya választ el (Bowman- és Descemet-hártya). A *cornea* elülső hámfelszínéne állandóan nedvesen van tartva (könny; pislogás). A *cornea* ereket és pigmentsejteket nem tartalmaz. Tápellátása a *sclera* erei felől és az elülső csarnok felől történik. A corneosclerális határ képletei közül kiemelt fontosságú a csarnokzug és a csarnokvízelvezetésért felelős Schlemm-csatorna.

A középső burok vagy érhártya (*uvea*, ***tunica vasculosa***) egy dús érfonatú hártya, amely a szem belső nedvkeringését és a fényérzékeny ideghártya gyors anyagcseréjű külső



1. ábra: A szem rétegei és vérellátása (Putz és Pabst, 1994)

rétegeinek oxigénellátását és táplálását biztosítja. Részei: a szemgolyó hátsó kétharmadát beborító érhártya (**choroidea**), amely előre felé a sugártestbe (**corpus ciliare**) megy át, majd a szivárványhártyában (**iris**) folytatódik. Szövettanilag mindhárom réteg lényegében eret és simaizmot tartalmazó erősen pigmentált laza kötőszövetes stroma.

A choroidea az érfonatok között található számos pigment szemcsével telt melanocytá miatt sötét, majdnem feketebe hajló vörösesbarna színű. A corpus ciliare a choroidea előrehaladó folytatása, külső felszíne a choroideától alig üt el, előrébb fokozatosan elveszti pigmentáltságát. A choroidea és a corpus ciliare átmenete az *ora serrata*. (Az *ora serrata* kiemelt jelentőségű abból a szempontból, hogy a retina csak itt és a látóideg belépésénél rögzül szorosan a külsőbb rétegekhez, máshol gyakorlatilag csak a

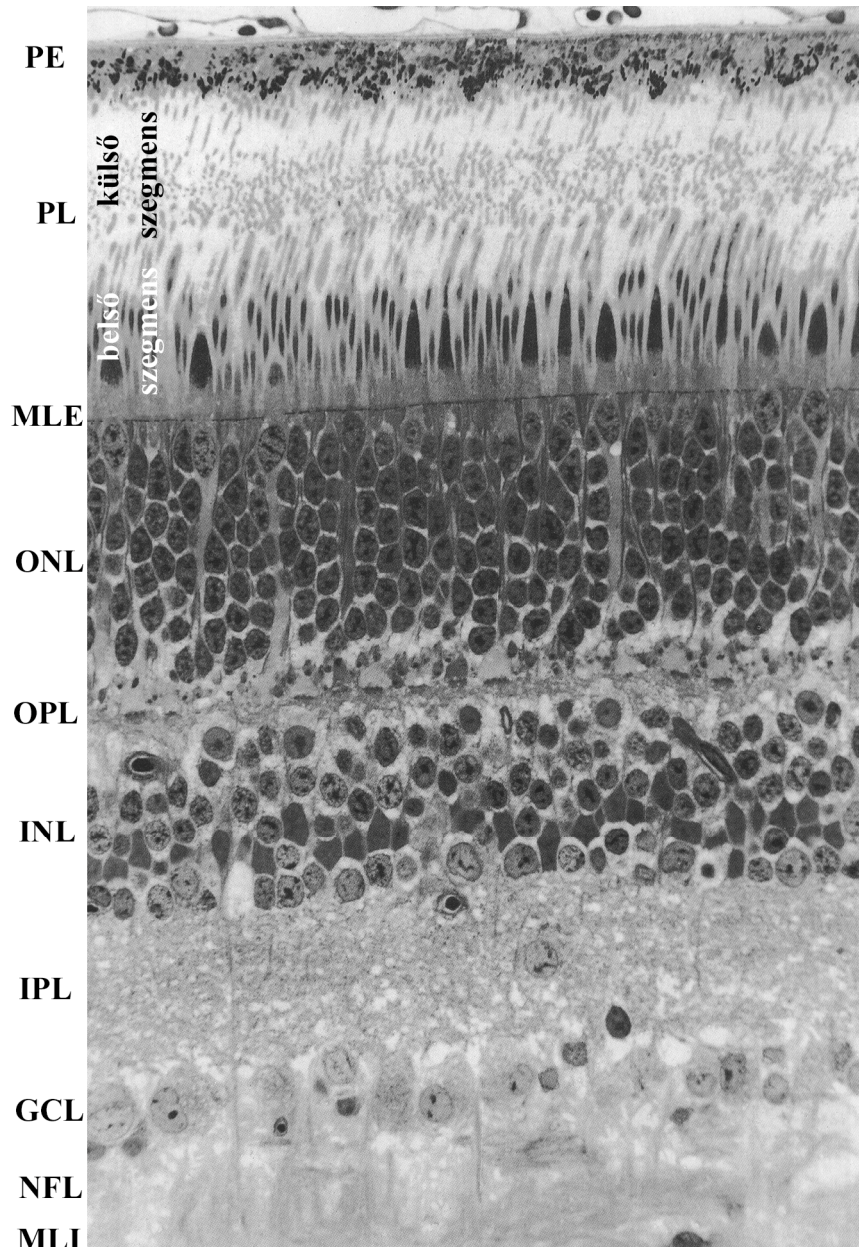
szembelnyomás tartja kifeszítve.) A corpus ciliare belső felszínét mindenhol kétrétegű hám borítja, amely tulajdonképpen a retina folytatása: a hátsó hámréteg, mely a retina pigmenthámjának felel meg, pigmentált, míg a belső hámréteg, amely a retina összes többi rétegének felel meg, nem pigmentált. A corpus ciliare legfontosabb alkotórésze a sugárizom (musculus ciliaris), a szem akkomodációjának aktív szerve. Az iris diaphragmaszerű, lapos gyűrű alakú lemez („lyukas korong”), amely a folyadékkal telt szemcsarnokot két részre osztja. Középen a megvilágítástól függően erősen változó tágasságú kerek nyílás, a pupilla található. Az iris belső felszínén folytatódik a sugártestet is beborító kettős hámréteg (a retina folytatása), de itt már mindkét réteg pigmentált. A két réteg a pupilla szélén fordul át egymásba: fejlődéstanilag ez a szemszerleg pereme, tehát neuroektodermális eredetű. Az iris színét a stroma vértartalma, a stromában lévő melanociták elrendeződése és pigmenttartalma, valamint a stroma vastagsága határozza meg. Zöld vagy barna a szemszín vastag, erősen pigmentált stroma esetén, míg a kékes színű szivárványhártya stromája vékonyabb, benne kevés pigmentsejt található, színét ilyenkor a hátsó felszínét borító kétrétegű pigmenthám áttűnése okozza. Albínók esetén teljes a pigmenthiány, a szemszín vörös a stroma erezettsége miatt.

A belső burok vagy ideghártya (**retina**) fejlődéstanilag és szöveti szerkezet szerint is az elülső agyhólyag önmagába betüremkedett gömbhéjhoz, tehát kettős falú kehelyhez hasonló képződménye. E kettős falú kehely külső rétege egész terjedelmében pigmenthámréteggé alakult át, míg belső rétege a szem hátsó kétharmadában sokrétegű idegszervvé differenciálódott. Az ora serrata mentén a belső réteg szinte átmenet nélkül egy sejtréteggé vékonyodik és továbbfut előre felé a corpus ciliare-ra (itt még nem pigmentált; pars ciliare retinae), majd az irisre (itt már pigmentált; pars iridica retinae), végül a pupilla szélén átfordul a külső pigmenthám-rétegbe.

A retina belső artériái és vénái – az arteria/vena centralis retinae – a látóideg rostjai között lépnek be a szemgolyóba. Ugyanitt, a discus nervi optici területén a retina rendes rétegei hiányoznak (a ganglionsejtek axonjai itt szedődnek össze, hogy aztán nervus opticus-ként kilépjenek a szemgolyóból), tehát e területen látás nincs, ez a Mariotte-féle vakfolt. A discus nervi optici (látóidegfő) közepétől kb 4 mm-re lateralis irányban, mintegy 2 mm átmérőjű területen a retina sárgás elszíneződésű (macula). Ez a terület a retina elvékonyodása folytán bemélyedt, amelynek közepén csaknem színtelen pont, a fovea centralis, az éles látás helye található. Itt kizárólag csapok találhatóak sokkal nagyobb sűrűségben, mint a retinában bárhol. Sőt, ebből a régióból kiszorulnak a csapok sejtmagvai és csak a fotoreceptor részük található itt, továbbá minden csaphoz külön-külön bipoláris

sejt kapcsolódik (konvergencia nélküli kapcsolás) elősegítve az éles látást.

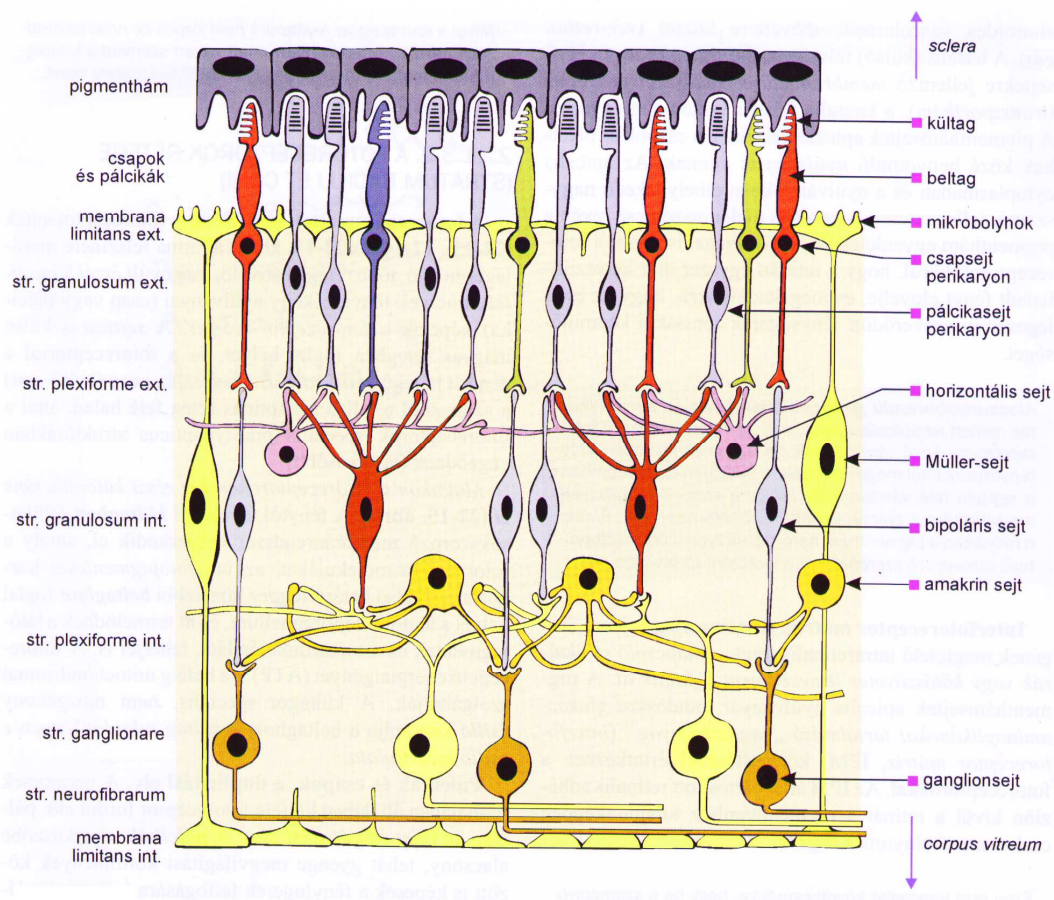
A retinát finom szerkezeti vizsgálatra tíz réteget különböztetünk meg a közönséges festésű szövettani metszet alapján (2. ábra). Ezek kívülről befelé haladva a következők: pigment epithelium (PE; stratum pigmentosa retinae), fotoreceptorok rétege (stratum photosensorium retinae; photoreceptor layer, PL), membrana limitans externa (MLE), külső magvas réteg (stratum granulosum externum; outer nuclear layer, ONL),



2. ábra: A retina rétegei (Röhlich, 2006). A sejtrétegek rövidítéseit lásd a szövegben.

külső fonatos vagy szinaptikus réteg (stratum plexiforme externum; outer plexiform layer, OPL), belső magvas réteg (stratum granulosum internum; inner nuclear layer, INL), belső szinaptikus réteg (stratum plexiforme internum; inner plexiform layer, IPL), ganglionsejtek rétege (stratum ganglionare; ganglion cell layer, GCL), idegrost-réteg (stratum neurofibrarum; nerve fibre layer, NFL), membrana limitans interna (MLI).

A pigmenthámot a pigmentsejtek alkotják, melyek plazmáját pigmentszemcsék (melanin) töltik ki és ujjszerű nyúlványaik beterjednek a csapok és a pálcikák közé fényzáró réteget képezve (3. ábra). A csapok és pálcikák rétegében kettős nyúlványú neuroepithel sejteket találunk, amelyek fotoreceptorokként funkcionálnak. A pálcikák ingerküszöbe alacsony, így gyenge megvilágítási körülmények között is képesek a fényingerek felfogására: ezt hívják scotopicus vagy szkotópiás látásnak. A csapok kevésbé érzékenyek, tehát csak nappali fényben működnek – ez a fotópiás látás, viszont képesek a különböző hullámhosszú fénysugarak megkülönböztetésére (színlátás), valamint a csapok



3. ábra: A retina „kapcsolási rajza” vázlatosan (Röhlich, 2006).

felelősek az éleslátásért is. A membrana limitans externa rétege tulajdonképpen tight junction-ök sorozata a retina glia jellegű speciális támasztó sejtjeinek, a Müller-sejteknek a nyúlványai és a receptorsejtek között. A külső magvas réteg (stratum granulosum externum) a csapok és a pálcikák sejtmagvait foglalja magába. A külső plexiform réteg (stratum plexiforme externum) a retina első szinaptikus rétege, ahol többek között a receptorok fényingerre generált ingerületei vezetődnek át bipoláris neuronokra. A belső magvas réteg (a stratum granulosum internum) számos neurontípus (bipoláris neuronok, Müller-sejtek, horizontális sejtek valamint amakrin sejtek) sejtmagjait és sejttestjeit tartalmazza. A belső szinaptikus réteg (stratum plexiforme internum) a retina második szinaptikus rétege, ahol az ingerület a ganglionsejtekre tevődik át. A ganglionok sejtmagvait a ganglionsejt-réteg (stratum ganglionare), axonjaikat pedig, melyek majd a nervus opticus-t képezik, az idegrostos réteg (stratum neurofibrarum) tartalmazza. A legutolsó réteg a membrana limitans interna, amelynek felépítésében szintén a Müller-féle sejtek vesznek részt: kiszélesedő talpaikból összeálló egységes záróréteg.

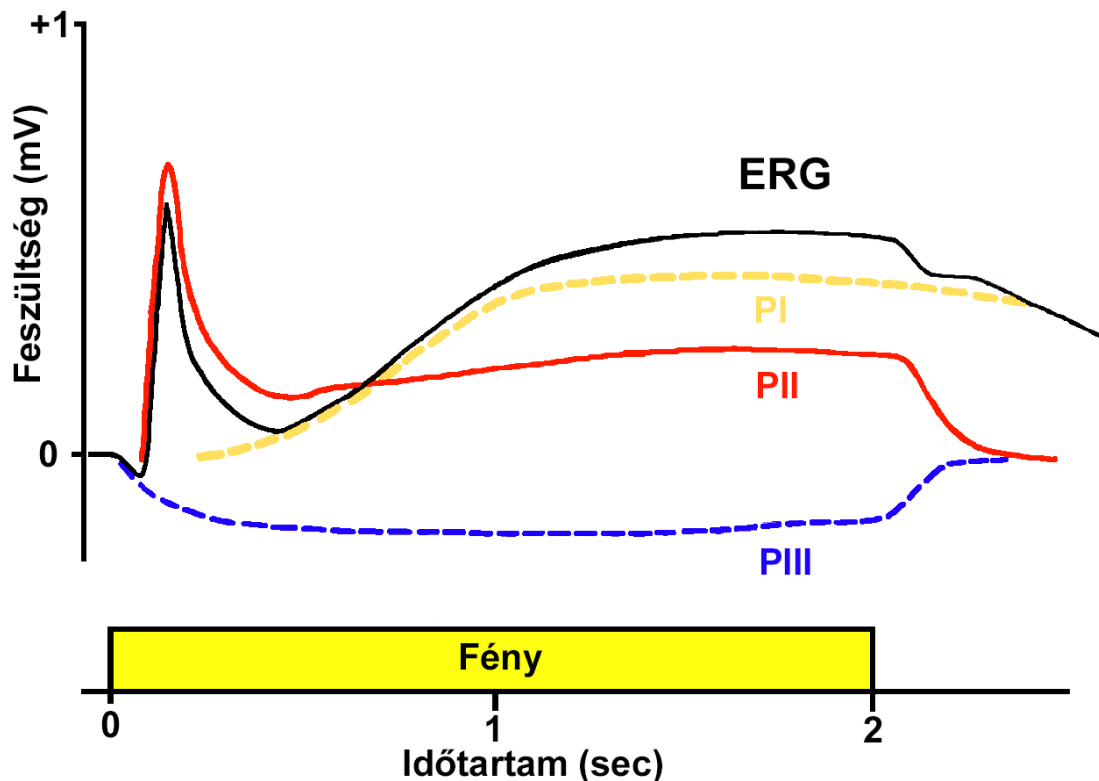
2.2. Az elektroretinográfia

Az elektroretinográfia története egészen az 1800-as évek közepére nyúlik vissza, amikor Holmgren és Dewar (külön-külön) felfedezték, hogy az előzőleg letakart szem a pupillán keresztül megvilágítva elektromos válasszal reagál (Perlman, 1995). Azóta a szemnek ezt a fény-kiváltotta elektromos aktivitását ábrázolni is tudjuk, amelyet ma elektroretinogramnak hívunk, a mérési módszert pedig elektroretinográfiának nevezzük, mely szóösszetétel szó szerinti fordításban a retina elektromosságának rajzolása illetve rajzolata.

Bebizonyosodott ugyanis, hogy a szem elektromos változása tulajdonképpen a retina sejtjeinek ingerületbe kerülésével, vagyis a fény érzékelésével van összefüggésben. Ezt még a 19. század végén kiderítették. De Gotch volt az első, 1903-ban, aki a szem fény felvillanására adott válaszában belül két hullámról tudósított: először egy negatív, majd egy nagyobb amplitúdójú pozitív hullámot volt képes elkülöníteni (Gotch, 1903), melyeket a-hullámnak és b-hullámnak nevezünk. Einthoven és Jolly, majd Piper is foglalkozott az analízissel – ők három részre bontották az ERG-t (Einthoven és Jolly, 1908), bevezetve a c-hullám fogalmát, mely egy a b-hullám után következő lassú, pozitív hullám. Munkájukra azonban a koronát Ragnar Arthur Granit finn/svéd kutató rakta fel, aki 1967-ben Haldan Keffer Hartline és George Wald amerikai kutatókkal megosztva, Nobel-díjat is kapott „a

szemben található fényérzékelő sejtek különböző típusainak és működésüknek leírásáért”.

Granit macskán végzett kísérleteket, és megfigyelte, hogy az altatás mélyítése során az ERG különböző komponensei fokozatosan eltűnnek (Granit, 1933). Ezeket eltűnésük sorrendjében P-I, P-II és P-III hullámoknak nevezte el (4. ábra). Bár a Granit-féle komponens-analízis az évek során némileg változott, továbbra is jó alapot ad az ERG megértéséhez.



4. ábra: Ragnar Granit macska ERG-je és annak három komponense (P-I, P-II, P-III), melyek az anaesthesia mélyülésével fokozatosan tűnnek el (Perlman, 1995).

2.2.1. Az elektroretinogramm felépítése és a látás rövid biokémiája

Granit analízise alapján tudjuk, hogy a negatív a-hullám a negatív P-III komponens bevezető szára, a pozitív b-hullám a P-II és P-III összegződését tükrözi, míg a lassú c-hullám a P-I és P-III összegződése (Granit, 1933). De honnan, milyen sejtekből származtathatók ezek a hullámok illetve milyen extracelluláris ionáramok állnak az ERG hátterében?

Az ERG-n látható **a-hullám** tehát a Granit-féle P-III-as komponens bevezető része. Azóta már felfedezték, hogy a P-III-at két további összetevőre lehet bontani: egy gyors és egy lassú P-III komponensre. Intra-retinális mikroelektrodák segítségével ma már azt is tudjuk, hogy a gyors P-III elektromos hullámok a fotoreceptorok rétegében generálódnak. Ezt az extracelluláris áramot fény- illetve világos-áramnak („light-current”) vagy „receptor komponens”-nek nevezték el, mert a fotoreceptorok külső szegmenseinek fényelnyelésével függ össze. Az a-hullám tehát egyértelműen a fotoreceptorok funkcionális integritásának indikátora (Perlman, 1995). (A lassú P-III hullám komponensét a Müller-gliasejtekkel hozták összefüggésbe (Witkovsky és mtsai., 1975), de mivel az a-hullám a P-III bevezető szára, a lassú komponens nem alkotója az a-hullámnak.)

A látás rövid biokémiája: A „light-current” illetve a fotoreceptorok fényelnyelésének hátterében az opszin nevű fehérjéből és retinalból (A-vitamin/retinol aldehid-származéka), egy kromofór vegyületből felépülő ún. fotopigment, a rodopszin áll. A hét transzmembrán doménnel rendelkező, G-fehérje-kapcsolt opszin kovalensen köti a kromofórt (11-cisz-retinal) a fotoreceptorok bonyolult lipid kettősrétegből felépülő membránrendszerébe ágyazva, a fotoreceptorok fényérzékeny nyúlványainak külső szegmensében (Röhlich, 2006). A retinal fény abszorpciójára megváltoztatja alakját (cisz-transz izomerizáció: a molekula gyakorlatilag kiegyenesedik), mely az opszin és ezzel együtt a hozzá kapcsolt G-fehérje konformációváltozását idézi elő (Fonyó, 2013). Így a transzducin (a G-fehérje neve a fotoreceptorokban) aktiválódik és aktiválja a cGMP-foszfodiészteráz (PDE6) nevű enzimet, melynek következtében az intracelluláris cGMP koncentráció lecsökken és záródnak a cGMP-függő Na^+ -ioncsatornák, melyek az ún. „sötét-áram”-ért (80%-ban) felelős Na^+ -ionok beáramlását teszik lehetővé sötétben (15% Ca^{2+} , 5% Mg^{2+}) (Kolb, 1995b). A fényexpozíció tehát a fotoreceptorokon hiperpolarizációt, gátlást okoz és ezzel glutamát felszabadulás csökkenést. A fotoreceptorok ugyanis sötétben aktívak, ekkor a Na^+ (be)-áram depolarizálja a sejteket és glutamátot szabadít fel. (A sötétben nagy mennyiségben felszabaduló glutamát OFF-bipoláris neuronokat aktivál, ON sejteket gátol, míg fényben a glutamát-hiány miatt ON sejtek depolarizálódnak/aktiválódnak és OFF-sejtek hiperpolarizálódnak/gátlódnak köszönhetően a két bipoláris sejt típuson lévő különböző glutamát-receptor típusoknak: ON-sejteken mGluR6 (G_i jelátvitel: $[\text{cAMP}] \downarrow$), OFF-sejteken AMPA (Na^+ -, K^+ - esetleg Ca^{2+} -ioncsatorna-) receptor található (Kolb, 1995a). A sötétben mérhető Na^+ (be)-árammal egyidőben K^+ -ioncsatornák kifelé engednek a sejtéből K^+ -ot, így növelve az extracelluláris K^+ -koncentrációt. Ezzel szemben fényben tehát a $[\text{K}^+]_{\text{ec}}$ csökken, ez vezet a c-hullám kialakulásához az ERG-n (lásd később). Az a-hullám

létrejöttének háttérében pedig a „sötét-áram” csökkenése illetve a fentiekben úgyszint részletezett ún. „fény-áram” áll (Perlman, 1995).

A **b-hullám** sok kutatás célpontja volt már, minthogy az ERG legfőbb komponense mind klinikai, mind kísérletes szempontból. A b-hullám bizonyítottan a fotoreceptoroktól post-szinaptikusan elhelyezkedő retinális sejtekből ered, ugyanis a fotoreceptorok másodlagos retinális neuronokkal való szinaptikus jelátvitelének blokkolása például glutamáttal (vagy aszpartáttal, kobalt ionokkal, magas magnézium vagy alacsony kalcium tartalmú oldatokkal) megszünteti a b-hullámot. A b-hullám abban az esetben is eltűnik, ha az arteria centralis retinae elzáródása miatt a retina vérellátása akadályozott akár laboratóriumi akár klinikai körülmények között (Perlman, 1995).

Intracelluláris elektródokkal a Müller sejteket azonosították elsőként a b-hullámok keletkezési helyéül (Miller és Dowling, 1970). Az ún. “Müller-sejt hipotézis” szerint a b-hullámok a Müller-sejtek fény-indukálta extracelluláris kálium ion-koncentrációváltozás miatti membránpotenciál változására vezethetők vissza. A kálium koncentráció fény hatására megemelkedik a külső és belső szinaptikus (másnéven plexiform) rétegben, mely nagy valószínűséggel a depolarizáló(dó) retinális idegsejtekből való szivárgás következménye: a külső plexiform rétegben különösen az ON-bipoláris sejtekből, míg a belső szinaptikus rétegben az amakrin és ganglion sejtekből. A kálium koncentráció ezen változása tehát megváltoztatja a Müller-sejtek membránpotenciálját, mely aztán az elektroretinogrammon b-hullámként látható. Azt, hogy az ON-bipoláris sejtek tényleg részt vesznek a b-hullám kialakításában alátámasztják azok a mérések is, amelyek a kizárólag az ON-bipoláris neuronokon található 2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4)-érzékeny glutamát-receptorok (mGluR6) gátlásával szüntették meg a b-hullámot (Gurevich és Slaughter, 1993).

Egyes kutatók, az ún. “push-pull modell” hívei szerint a b-hullámok létrejöttéért az ON-bipoláris sejtek, illetve az őket gátló OFF-bipoláris sejtek a felelősek, a Müller sejtek nélkül (Sieving és mtsai., 1994). Az OFF-bipoláris sejtek felszínén lévő AMPA/Kainát típusú glutamát-receptorok szelektív gátlásával (6,7-dinitroquinoxalin-2,3-dion; DNQX) például a b-hullám felerősödik, feltehetőleg a b-hullám ellen dolgozó áramforrások megszüntetésével. Sőt, egy olyan kísérletről is beszámoltak már, melyet a Müller-sejtek kálium-permeabilitását gátló bárium ionokkal végeztek: a kezelés meg kellett volna szüntesse az ERG b-hullámát, azonban nem ez történt (Lei és Perlman, 1999). Ez a megfigyelés szemben áll a Müller-sejt hipotézissel és alátámasztja a ON-center bipoláris sejt “push-pull modell”-t.

Ez utóbbi modell sem hagyhatja azonban figyelmen kívül azokat az eredményeket, melyeket harmad-rendű neuronok (amakrin és ganglion sejtek) akciós potenciáljának, valamint a negatív visszacsatolásokban (amakrin → bipoláris sejt) részt vevő GABA és glicin-receptoroknak a specifikus blokkolása hozott: a b-hullám amplitúdóját és kinetikáját is befolyásolják ezek a belső retinális sejtek (Dong és Hare, 2002).

Mindezek alapján egyet tudunk biztosan leszögezni, hogy a b-hullámok létrejöttéért biztosan a fotoreceptoroktól post-szinaptikusan elhelyezkedő retinális sejtek tehetők felelőssé, de ez a folyamat igen komplex, és feltehetően az összes retinális sejtréteg részt vesz az alakításában.

A **c-hullám** egyértelműen a pigment epitheliumban generálódik, melyet először Noell (Noell, 1954), majd Steinberg és mtsai mutattak ki (Steinberg és mtsai., 1970). Noell jó-d-acetátot használt, mely a fotoreceptorokat teszi tönkre, illetve átvágta a nervus opticus-t, mely a ganglion sejtek degenerációjához vezet, de egyik beavatkozás sem szüntette meg az ERG c-hullámját. Steinberg és mtsai közvetlenül a pigment epitheliumba helyeztek mérőelektrodot és a fény felvillanásakor ugyanolyan lefutású görbét kaptak, mint a c-hullám. Továbbá, a retinát leválasztva a pigment epitheliumról, az ERG tartalmazta az a-hullámot és a b-hullámot, de a c-hullám eltűnt. A pigment epithelium elektromos tevékenységének a háttérben egy kálium-függő mechanizmus áll. Ha csökken a pigment epithelium és a fotoreceptorok közötti extracelluláris térben a kálium ionok száma, amely a fotoreceptorok normális, fény-indukálta elektromos működésének feltétele, akkor ez a trans-epitheliális nyugalmi potenciál megváltozását vonja maga után; ez a c-hullám. Így tehát a c-hullámok a fotoreceptorok és a pigment epithelium és a kettő közötti kapcsolat funkcionális integritásának vizsgálatára használható. A c-hullám kiváltásához a kiváltó fényimpulzus időtartama relatíve hosszú (általában perces nagyságrendű) kell legyen (Samuels és mtsai., 2012).

Az ERG három fő komponensén túl speciális beállítások mellett (alább *dőlttel szedve*) egyéb, ún. minor komponenseket is azonosíthatunk egy elektroretinogrammon, mint például korai receptor potenciál (ERP), oszcillátoros potenciál (OP), d-hullám, scotopikus küszöb válasz (STR), vagy M-hullám. Ezek jelentősége sokkal kisebb, egyeseket klinikumban is használnak (OP, d-hullám), de van amelyik csak kísérletes szempontból fontos.

Az **ERP**-t csak *igen erős fény-inger* alkalmazásakor láthatjuk, feltehetőleg a fotoreceptorokból ered. Amplitúdója a fotoreceptorokban lévő pigment koncentrációjától

függ és a pigmentmolekulák fotonelnyelésre adott konformációs változását tükrözi, így klinikumban például retinitis pigmentosa utánkövetésére használható, a rodopszinsűrűségét becsülik meg vele (Perlman, 1995).

A kis amplitúdójú, nagy frekvenciájú **oszcillátoros potenciál**-t is *erős fény stimulussal* lehet kiváltani, ilyenkor a b-hullám felszálló szárán látható fűrészfog szerűen, attól elkülöníteni csak digitális szűrőkkel lehet (Asi és Perlman, 1992). Az OP eredetét még nem tudjuk biztosan, de feltehetőleg a belső plexiform rétegben keletkeznek, az amakrin, ganglion és bipoláris sejtek közötti negatív feedback útvonalak nyomán. Az OP nagyon érzékeny már enyhe iszkémiára is, ezért használható a retinális metabolikus szükségletek és a retinális vérellátás közti egyensúly felmérésére: például háttér-diabetéses retinopathiában olykor indikátorként használják (Perlman, 1995).

A **d-hullám** láthatóvá tételéhez *hosszabb fény stimulusok* (>100ms), hogy az ON és OFF fázisok jól elkülönüljenek egymástól, rövidebb időtartam esetén a d-hullám összeolvad a b-hullámmal. A d-hullám az OFF-center bipoláris sejtekből ered: a fotoreceptorok és az OFF bipoláris sejtek közötti kommunikációban résztvevő AMPA/Kainát típusú glutamáterg szinapszisok működésének következménye. A d-hullámot csak akkor használják, amikor a csap ON- és OFF-útvonalakat el kell különíteni, például az ON-sejtekre specifikus problémák azonosításához (Perlman, 1995).

Sötéthez szoktatott ún. *scotopicus állapotban* (ekkor gyakorlatilag csak a pálcikák működnek) *nagyon gyenge fény stimulus* kell a **STR** kiváltásához (Sieving és Nino, 1988). Ez a lassú negatív hullám a Müller-sejtek membránpotenciáljának az extracelluláris kálium koncentrációváltozásokra adott válasza. A Müller-sejtek bárium ionokkal történő telítése, mely gátolja a Müller-sejtek kálium áteresztő képességét, megszünteti a STR-t. Ez a báriumos blokkolás volt az a módszer, ami, mint korábban említettem, megdöntötte a b-hullám keletkezésének “Müller-sejtes hipotézisét”, mivel a b-hullám nem tűnt el; vagyis a “Müller-sejtes hipotézis” nem a b-hullám, hanem a STR létrejöttét magyarázza.

Ugyanez a hipotézis magyarázza viszont a fényhez szoktatott ún. *photopicus állapotban* a fényinger kezdetekor és befejeztekor jelentkező egy-egy negatív hullámot, melyeknek együttes neve **M-hullám** (Frishman és mtsai., 1992). Tehát az M-hullámokat is az extracelluláris kálium ionok koncentrációváltozásával és a Müller-sejtekkel hozzák összefüggésbe, fontos különbség azonban a STR-hez képest, hogy az M-hullám fényes háttérben végzett, photopicus jelenség, mely a csapok működésével függ össze; jóllehet a bárium ionos kísérlet az M-hullámot is szinte teljesen eltünteti az elektroretinogramról. Az a tény, hogy nem teljesen tűnik el a báriumos kezelésre az M-hullám a Müller-sejteken

kívül további, feltehetőleg neuronális befolyásoltságra vall. Érdekes különbség továbbá az is, hogy az M-hullám – valójában tehát M-duplahullám – amplitúdója (és vele együtt az extracelluláris káliumáramok amplitúdója is) csökken a fénystimulus sugarának növelésére: *minél kisebb ponton világítjuk meg a retinát, annál nagyobb az M-hullám és fordítva* (Frishman és mtsai., 1992).

2.3. A mono-nátrium glutamát (MSG)

A mono-nátrium glutamát (monosodium glutamate; MSG) a természetben az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló, nem-esszenciális aminosavnak, a glutamátnak a nátrium-sója (Ádám, 2006).

Az aminosavak közül a glutamát az általános metabolikus szerepen kívül neurotranszmitter funkciót is ellát, a legfontosabb excitátoros transzmitter a központi idegrendszerben. A glutaminsav becslések szerint a központi idegrendszerben az összes szinapszis mintegy 50%-ában, ezen belül az excitátoros szinapszisok 90%-ában működik neurotranszmitterként (Gyires és Füst, 2011).

A neurotranszmitter glutamát nem jut át a vér-agy gáton, szintézise az agyban történik: kisebb részben glutaminból, nagyobb részben a Krebs-ciklus intermedier termékeként keletkezik. Ezután egy specifikus glutamát transzporter segítségével szinaptikus vezikulumokba vevődik fel (aktív transzport) és ezekben tárolódik. Felszabadulása a szinaptikus részbe Ca^{2+} igényes exocitózissal történik. A szinaptikus részből eliminációja preszinaptikus visszavétellel történik glutamát transzportereken keresztül, lebontásában a glutaminná való enzimatisz visszaalakításnak (glutamin-szintetáz) van szerepe (Ádám, 2006).

2.3.1. A glutamát receptorai

A glutamát receptorokat működésük alapján két nagy receptor-családra oszthatjuk: ionotróp (iGluR) és metabotróp glutamát receptorok (mGluR) (Willard és Koochekpour, 2013).

Az **ionotróp** receptorokat további receptor-alcsaládokra oszthatjuk, melyeket szelektív agonista ligandjaik alapján neveztek el α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav (AMPA), kainát és N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptoroknak. Közös jellemzőjük, hogy négy alegységből épülnek fel és ligand-vezérelt kationcsatornaként működnek. Mind a négy alegység további négy, az evolúció során jól

megőrződött alegységből áll. Glutamát vagy más agonista kötődése a ligand-kötő alegységhez konformációváltozást indukál a transzmembrán alegységben, mely így egy pórust képez Na^+ , K^+ és/vagy Ca^{2+} ionok számára. Ha elég sok ionotróp glutamát receptor aktiválódik egyszerre, a beáramló kation-áram akciós potenciált vált ki.

A legkevesebb ismerettel a **kainát** receptorokról rendelkezünk: ezek a receptorok pre- és posztszinaptikusan is előfordulnak; az AMPA és NMDA receptorokhoz képest előfordulásuk a központi idegrendszerben korlátozottabb és funkciójuk kevésbé ismert (Huettner, 2003). Szenzoros ingerületvezetésben betöltött szerepüket epilepsziával hozták összefüggésbe: a kainát epileptiform görcsöket képes okozni (Ben-Ari és Cossart, 2000). Továbbá a kainát receptorok is részt vesznek a szinaptikus plaszticitásban (lásd alább), bár jelentőségük kisebb, mint az AMPA és NMDA-receptoroké.

Az **AMPA** receptorok elsősorban az idegrendszeren belüli gyors, szinaptikus ingerület-továbbításban játszanak szerepet, nagyobb részt posztszinaptikusan helyezkednek el és igen fontos szerepet töltenek be a szinaptikus plaszticitásban (Whitlock és mtsai., 2006), azon belül is a sokat kutatott hosszútávú potencírozásban (Long-Term Potentiation, LTP). A szinaptikus plaszticitás a szinapszisok azon képessége, hogy idővel erősödik (potencírozódik) vagy gyengül (deprimálódik) a jelátvitelük annak függvényében, hogy többet vagy kevesebbet vannak használva (Hughes, 1958). Ez alapján a szinaptikus plaszticitás két fő típusa az ún. szinaptikus potencírozás és az ún. szinaptikus depresszió. Időtartam alapján pedig rövid- vagy hosszútávú szinaptikus plaszticitásról beszélhetünk. A négy csoportot az irodalom angol elnevezésük kezdőbetűi alapján említi (LTP, STP, LTD, STD), melyek – minthogy az emlékeket agyi szinapszisok egymással mérhetetlenül összefonódott hálózatának tekintjük – a tudomány mai állása szerint a tanulás és emlékezés alapját képezik. A hosszú távú potencírozásban az AMPA receptorok mellett meghatározó szerepet töltenek be az NMDA receptorok is.

A kainát és AMPA receptorokkal szemben az **NMDA** receptorok érdekes módon egyszerre ligand- és feszültség-vezérelt ioncsatornák, főleg posztszinaptikusan helyezkednek el és gyakran fordulnak elő párban metabotróp glutamát receptorokkal együtt (Willard és Koochekpour, 2013). Feszültség vezérelt aktivációjuk annak köszönhető, hogy a kationcsatorna pórusukat nyugalmi állapotban egy Mg^{2+} esetleg egy Zn^{2+} ion zárja el, mely depolarizáció hatására lökődik ki helyéről, teret engedve Na^+ és Ca^{2+} ionok be- és K^+ ionok kiáramlásának. Az ioncsatorna kialakulásához ugyanúgy glutamát-kiváltotta konformációváltozás szükséges, mint a többi ionotróp glutamátreceptor esetében, viszont ionáram csak depolarizált állapotban folyik rajtuk keresztül. A korábban már említett

hosszútávú potencírozásban (LTP) éppene azért az NMDA és AMPA receptorok közreműködése is szükséges: az NMDA receptorok csak akkor képesek kinyílni, ha az AMPA (ritkább esetben a kainát) receptorok aktivációja és a következményes Na^+ -beáramlás által kiváltott depolarizáció kilöki a pórusukat elzáró Mg^{2+} iont az extracelluláris térbe. Az NMDA receptorokon keresztül azonban – szemben az AMPA és kainát receptorokkal – Ca^{2+} ionok is képesek beáramlani, amely aztán az AMPA receptorok upregulációját váltja ki, az excitatórikus posztszinaptikus potenciál (EPSP) hosszútávú növekedését eredményezi, mely az LTP alapja. A beáramló Ca^{2+} ionok ezen túlmenően aktiválják a Ca^{2+} /Calmodulin-függő protein kináz (CaMKII) enzimet is, amely foszforilálja az AMPA receptorokat ezzel növelve vezetőképességüket és tovább növelve az EPSP-t.

A teljesség kedvéért megemlíthetjük még a '90-es évek elején felfedezett ún. **delta** glutamát receptorok alcsoportját is (Lomeli és mtsai., 1993). A receptor-alcsoportba két fehérje-alegység tartozik (GluD1 és D2), melyek azonban nem kötik a glutamátot és ligandvezérelt ioncsatorna funkciót sem mutatnak (Schmid és Hollmann, 2008), csupán a többi ionotróp glutamát receptorral erős homológiát mutató aminosav-szekvenciájuk miatt kerültek be az ionotróp glutamát-receptorok családjába. Bár olyan anyagok, mint glicin, D-szerin és Ca^{2+} bekötődnek a „receptor” ligand-kötő doménjére, egyik sem aktiválja az ioncsatorna funkciót, holott a fehérje strukturálisan alkalmas rá, illetve az aminosav-szekvenciában megfigyelt hasonlóság miatt ez elvárható volna. A természetben is előforduló ún. „lurcher” GluD2-pontmutáció viszont azt bizonyítja, hogy a delta receptorok ioncsatorna-funkciója megtartott: a „lurcher” mutáns delta receptor egy folyamatosan nyitott ioncsatorna, melyen keresztül spontán ionáram folyik és melyet érdekes mód ligandok bekötődése zárhat (Wollmuth és mtsai., 2000). Más kísérletekben pedig a ligand-kötő domén kicserélésével értek el sikereket: mind a GluD1, mind a GluD2 alegység funkcionális, ligandvezérelt (pl. glutamát is!) ionotróp csatornát alkot egy kainát-receptor vagy egy AMPA-receptor ligandkötő doménjével (Orth és mtsai., 2013). Mindegyik ilyen kimérában a domén-transzplantáció a donor alegység agonista-profilját is hozta magával, így tehát teljes értékű (glutamát-) receptorra válhat mindkét delta-receptor; nyitott kérdés, hogy ilyen fehérje-kölcsönhatások fiziológiásan előfordulnak-e. De még ha nem is, ismét más kutatások arra is fényt derítettek, hogy a delta receptorok C és N-terminális végeiken akár metabotróp módon is képesek lehetnek jelátvitelre (Torashima és mtsai., 2009), mely szabad teret enged a glutamát delta receptorok létjogosultságának, igaz, nem ionotróp módon, ahogy szerkezetükből adódóan gondolhatnánk, hanem metabotróp módon.

A **metabotróp** glutamát-receptor-családot is három alcsaládra oszthatjuk, melyek rendre az mGluR1, 2 és 3 jelzést kapták (Conn és Pin, 1997). Közös jellemzőjük klasszikus felépítésük – 7 transz-membrán doménnal rendelkeznek, és G-fehérjéhez kapcsolódnak. Az alcsaládokon belül 8 különböző glutamát-receptort különítenek el (mGluR₁₋₈).

A főleg posztszinaptikusan elhelyezkedő mGluR1-es és 5-ös típusok (I-es alcsalád) G_q jelátviteli útvonalat aktiválnak, így serkentik a foszfolipáz-C enzim működését, amely foszfo-inozitol-difoszfátból (PIP₂) diacilglicerolt (DAG) és inozitol-trifoszfátot (IP₃) hasít. Ezek az effektor molekulák aztán további ún. downstream target-eket aktiválnak (pl. proteinkináz C), mely végül az intracelluláris Ca²⁺-szint megemelkedéséhez vezet. Ugyanakkor ezek a receptorok Na⁺- és K⁺-csatornákkal is kapcsolatosak, melyeken keresztül serkentő és gátló hatást is képesek kiváltani (Chu és Hablitz, 2000).

A 2-es, 3-as alcsalád receptorai G_i jelátviteli útvonalat aktiválnak, vagyis az adenilát cikláz enzim gátlásával az intracelluláris cAMP szintet csökkentik. Ezek a receptorok főleg preszinaptikusan helyezkednek el, és gátlást közvetítenek mind serkentő mind gátló útvonalakra (Chu és Hablitz, 2000).

A retina a nyolc különböző metabotróp glutamát receptorból hetet tartalmaz különböző sejtrétegekben; az mGluR3 a kivétel, melynek mRNS-e érdekes mód megtalálható ugyan a retina sejtjeiben (bipoláris és ganglionsejtekben), de nem fejeződik ki fehérje formában (Dhingra és Vardi, 2012). Az ionotróp glutamát-receptorok közül midegyik megtalálható a retinában (Boos és mtsai., 1993; Zhou és mtsai., 1993; Cohen és Miller, 1994).

2.3.2. Fiziológiai hatások

A glutamát az idegrendszer egyik legfontosabb serkentő ingerületátvivő anyaga. Legnagyobb mennyiségben az agykéregben, a kisagyban, valamint a memóriáért felelős agyterületekben fordul elő nagy mennyiségben (hippocampus, amygdala, thalamus, limbicus rendszer). Fiziológiai hatásai igen széleskörűek: a glutamát és receptorai olyan különböző funkciókban szerepelnek, mint a tanulás, emlékezet és az ezek alapját képező szinaptikus plaszticitás (legyen az rövid-távú vagy hosszú-távú szinaptikus potenciózás vagy depresszió), továbbá szorongás, fájdalomérzés és látás (Fairman és Amara, 1999; Willard és Koochekpour, 2013). Még az önmagukban receptorális funkciókkal nem bíró delta glutamát receptoroknak is van fiziológiai szerepük: a GluD1 az agy fejlődésében tölthet be fontos szerepet (felnőtt agyban csak kis mennyiségben fordul elő, míg erősen

expresszálódik a késő-embriális és korai posztnatális korban) (Lomeli és mtsai., 1993), valamint a magas frekvenciájú hallásban fontos (Safieddine és Wenthold, 1997) és megtalálható a retinális ganglion- és bipoláris sejtekben is (Jakobs és mtsai., 2007); a GluD2 pedig Purkinje-sejtekben fordul elő és ezek szinaptogeneziséhez, a motoros tanuláshoz és koordinációhoz elengedhetetlen (Yuzaki, 2004).

2.3.3. Patológiai hatások – Glutamát excitotoxicitás

Az glutamát receptorok és hozzájuk kapcsolódó posztszinaptikus jelátvivő alkotóelemek tartós ingerlése egy glutamát excitotoxicitásnak nevezett jelenséghez vezet, mely jelentősen hozzájárul több neurodegeneratív betegséghez és idegrendszeri károsodáshoz, mint amilyen az Alzheimer- (Arias és mtsai., 1998) és a Parkinson-kór (Sonsalla és mtsai., 1998), vagy a sclerosis multiplex is (Werner és mtsai., 2000). A megnövekedett glutamát mennyiség, mely eredhet például abból is, hogy sérült vagy beteg sejtek glutamátot szabadítanak fel, normál jelátviteli mechanizmusoknak köszönhetően további glutamát-felszabadulást és így túlzott mértékű Ca^{2+} -beáramlást okoz, amely aztán kaspáz, proteáz, endonukleáz, foszfolipáz enzimek rendellenes túl-aktiválódásához és következményes idegsejt-elhaláshoz, apoptózishoz vezet (Ribeiro és mtsai., 2010). Ráadásul a megnövekedett kation-áram megváltoztatja az idegsejtek normál membránpotenciálját, mely a glutamát szinaptikus részből történő eltávolításához nélkülözhetetlen glutamát transzporter fehérjék működésének elengedhetetlen feltétele (Dong és mtsai., 2009). A normál körülmények között a szinaptikus részen mindössze milliszekundumokig jelenlévő (Clements és mtsai., 1992) glutamát ebben az esetben tovább ingerli receptorait, mely tovább súlyosbítja a sérülést és/vagy hozzájárul a betegség kialakulásához vagy progressziójához.

Az excitotoxikus sejtkárosodás nem minden esetben a már fentebb említett (túltermelés ill. túlzott felszabadulás miatti) glutamát többlet következménye. A glutamát lebontása illetve eltávolítása a szinaptikus részből ugyanolyan fontos (ha nem fontosabb) szempont a glutamát-kiváltotta retinális excitotoxicitás megelőzésében (Izumi és mtsai., 2002). Ezekben az extracelluláris glutamát koncentráció-homeosztázis fenntartásában kritikus folyamatokban a glutamát transzporter fehérjék (excitatory amino acid transporter-ek; EAAT₁₋₅) és a glutamin-szintetáz enzim vesznek részt (Ishikawa, 2013). Ezen folyamatok down-regulációja excitotoxikus neuronális károsodásokhoz vezet.

A glutamát metabolizmus abnormális működése többek között a mitokondriumok működésére illetve az energia-termelés (ATP) zavaraira vezethető vissza. Mivel a glutaminszintetáz ATP igényes művelet során alakítja glutaminná a glutamátot, ATP-hiányban az extracelluláris glutamát koncentráció megemelkedik (Bringmann és mtsai., 2009). Habár a glutamát transzporterek nem igényelnek közvetlenül ATP-t működésükhöz, Na^+ -függő transzporterek, működésük elengedhetetlen feltétele a Na^+ , K^+ és H^+ ion-grádiens, hogy a koncentráció-grádienssel szemben glutamátot legyenek képesek pumpálni a sejtbe (Nicholls és Attwell, 1990). Mivel ezeket az ion-grádienseket a Na^+/K^+ -ATPáz pumpa tartja fenn, a glutamát transzporterek is függenek az ATP-szinttől (Silver és Erecinska, 1997). Így az ATP-szint csökkenésével mind a glutamát felvétel, mind a glutamát-lebontás jelentősen legátlódik, és ezáltal megnő a glutamát excitotoxicitás rizikója.

Az excitotoxicitás számos szemészeti megbetegedésben is szerepet játszik, mint például a retinális erek elzáródása miatt kialakuló iszkémia, glaukóma és diabéteszes retinopátia (Ishikawa, 2013). Retinális iszkémiában a glutamát transzporter fehérjék funkciója lecsökken (Barnett és mtsai., 2001), és mihelyt az alternatív energia-forrás glikogén raktárak kiürülnek és a glikolízis leáll, a glutamin szintetáz enzim aktivitása is megszűnik (Ishikawa, 2013); valamint az iszkémia közvetlenül is downregulálhatja a glutamin szintetázt (Hlavackova és mtsai., 2010). Kísérletes glaukóma modellben az emelkedett szemelnyomás először gátolja a glutamát transzporterek expresszióját, majd glutamin szintetáz downregulációt vált ki, emellett mitokondrium-károsodást és következményes ATP-depléciót okoz (Ishikawa és mtsai., 2010). Cukorbeteg patkányok retinopátiájában mindkét enzim expressziója lecsökken, valamint a hiperglikémia glutamát felesleget idéz elő, a következményes NMDA-receptor túlaktiválódás pedig VEGF termelést vált ki és károsítja a retinális ganglion sejteket (Ishikawa, 2013).

Megemlíthetők még olyan glutamáthoz köthető megbetegedések is, mint a tumoros sejt-transzformáció, melyet több szövetben (bőr, emlő és prosztatata) is kimutattak (Prickett és Samuels, 2012; Willard és Koochekpour, 2013), vagy a kínai vendéglő szindróma (ahol glutamát fűszerezésű étel fogyasztása után kb. 15-20 perccel az arra érzékeny egyéneknél egy fejfájásból, bőrkipirulásból, zsibbadásból stb. álló tünetegyüttes jelentkezik): ez utóbbi egy máig megfejtetlen, nyitott kérdése a farmakológiának (Geha és mtsai., 2000).

2.4. Az iszkémia-reperfúziós károsodás

Az iszkémia az a patológiai állapot, melyben egy szerv vagy szövet vérellátása akadályozott, aminek következtében az oxigén-igény és -kínálat közötti egyensúly felborul, a sejtek anyagcseréjéhez szükséges oxigén- és tápanyag-ellátás nem megfelelő, mint ahogy a felesleges hulladék-termékek eltávolítása sem. Az iszkémia rohamos ütemben károsítja a metabolikusan aktív szöveteket, de paradox módon, a vérellátás iszkémia utáni helyreállítása is olyan események egész kaszkádját indítja el, melyek potenciálisan tovább rontják az eredeti sérülést: ez a hatás a reperfúziós károsodás (Liao és mtsai., 2013).

Az iszkémia-reperfúziós károsodás egy igen összetett, több tényezős mechanizmus: a szöveti oxidatív stressz protein kinázok egész családjait aktiválja, melyek aztán gyulladásos anyagok génjeinek sejten belüli kifejeződését szabályozó transzkripció faktorokat aktiválnak, ezek helyi gyulladást okoznak, amit csak tovább erősít a leukociták fellépése, ugyanis a szöveti sérülés helyére vándorló neutrofilek gyulladásos előanyagokat, reaktív oxigéngyököket, citokineket választanak ki (Tsuchihashi és mtsai., 2004; Scott és mtsai., 2005). Az iszkémia kiterjedt endoteliális apoptózist is indukál és a szövet/szövetet ellátó erek endotél-sejtjeinek elvesztése a vérellátást tovább akadályozó trombózist eredményez (Shah és mtsai., 1997).

2.4.1. A retina vérellátása és iszkémia-reperfúziós károsodása

Ha egy szövet helyi vérellátása akadozik – például egy lokális elzáródás miatt – a vérellátó rendszer anatómiája, az adott szövet érhálózata jelentősen befolyásolja az iszkémiás végkimenetel súlyosságát. A retina vérellátását két útvonalon kapja (Réthelyi, 2002). A fotoreceptorok, külső retinális rétegek indirekt módon az érhártya vagy choroidea felől, az ún. ciliáris artériákból kapják a tápanyagokat; maga az érhártya egy gazdagon egymásbafonódó, anasztomózos érhálózat. A belső retinális sejteket az arteria centralis retinae ágai látják el, melyek a szemfenéken jellegzetes és teljesen egyedi lefutást mutatnak – ez az alapja a biztonsági rendszerekben alkalmazott retina-szkennerek azonosításának. Az arteria centralis retinae két fő ága az idegrostok rétegében felületesen fut, innen adja le arteriola ágait, melyek aztán tovább ágaznak egy felületesen és egy mélyebben (a belső magvas réteg és a külső plexiform réteg között) elhelyezkedő kapilláris plexust formázva; a retina egésze így van behálózva, kivéve az éles látás helye, a macula, amelyet az erek körbeívelnek, egy sárga, érmentes foltot hagyva ki.

Az arteria centralis retinae két fő ága végág, köztük anasztomózis nincs, így ezek elzáródása esetén az érintett területen a retina belső rétegeinek teljes iszkémiája jön létre; hasonló képpen, magának az arteria centralis retinae-nek (még a dichotóm elágazódása előtti) elzáródása esetén a teljes retina belső rétegeinek iszkémiája alakulhat ki. A retina külső sejtrétegei ezekben az esetekben nem szenvednek iszkémiát, ráadásul a choroidea több ciliáris artériából kapja vérellátását, így egy ciliáris artéria kiesése a choroidea anasztomózisai miatt nem okoz feltétlen végzetes iszkémiát. A külső sejtrétegek iszkémiájának oka gyakrabban choriokapilláris elégtelenség vagy szakadásos retinaleválás. A szem legsúlyosabb iszkémiás károsodását a szem verőér (arteria ophthalmica) elzáródása okozza. Mivel ebből az érből ágazik le gyakorlatilag a szemet ellátó összes artéria (az arteria centralis retinae és a ciliáris artériák is), ennek az érnek az obstrukciója katasztrofális következményekkel járhat.

A retina ereinek elzáródását és következményes iszkémiáját artériás oldalon leggyakrabban ateroszklerózis, trombózis vagy embolizáció, vér dyscrasiák, gyulladás, vénás oldalon ezeken túlmenően emelkedett szembelnyomás okozza (Osborne és mtsai., 2004). Iszkémia kialakulhat diabeteses retinopátiában is, aminek hátterében nem érelzáródás, hanem ún. microangiopátiás károsodások állnak: lamina basalis rendellenesség illetve periciták károsodása/hiánya miatt kialakuló kapilláris szivárgás, ödéma, gyulladás és gliosis (Osborne és mtsai., 2004).

Retinális iszkémiában – az iszkémia általános leírásánál említettekén kívül – a súlyos károsodás hátterében a retinális sejtek energiaháztartásának (ATP-termelésnek) zavara is megemlítendő (Kaskel és mtsai., 1976). Az ATP hiány csökkenti a retinális sejtekre jellemző Na⁺/K⁺-ATPáz pumpa aktivitását, melynek következtében a sejtekbe Na⁺, Cl⁻ és víz áramlik be, ami sejtszinten a sejtalkotók hipo-ozmotikus duzzadását okozza, tönkretéve azok működését, szöveti szinten pedig ödémát (Zeevalk és Nicklas, 1997). Az iszkémia utáni reperfúzió a retinában még súlyosabb károsodást okoz: az iszkémia alatti oxigén- és tápanyag-hiány növeli a retina érzékenységét a gyulladásra illetve oxidatív stresszre, melyet a vérellátás helyreállása idéz elő (Osborne és mtsai., 2004). A retina iszkémiás károsodását tovább rontja, hogy a retina sejtjei közötti kommunikáció ingerületátvivő anyaga a glutamát: a fentebb részletezett glutamát-indukálta excitotoxicitás az iszkémia-reperfúziós retinakárosodás kiváltásának egyik alapvető, lényeges eleme (Osborne és mtsai., 2004).

2.4.2. A hemoxigenáz 1 enzim (HO-1) és szerepe az iszkémiában

Az iszkémia-reperfúziós károsodásokban jelentős szerepet tulajdonítanak az oxidatív stressz-nek, illetve a szabad oxigén-gyököknek. A vasat tartalmazó porfirin vázas prosztetikus csoport, a hem, szabad, nem-kötött állapotában éppen ilyen reaktív oxigén gyökök képződését katalizálja, ezáltal oxidatív stresszt, sejtkárosodást és szöveti sérülést okoz (Vercellotti és mtsai., 1994; Jeney és mtsai., 2002).

Hem molekula minden sejttaggal rendelkező emberi sejtben szintetizálódik (Wagener és mtsai., 2003). A különböző sejtek hem-szükséglete azonban jelentősen különbözik: a legnagyobb mennyiségben a csontvelő és a máj sejtjei szintetizálják, előbbieket a vörösvértestek hemoglobinja miatt, utóbbiak pedig a citokróm P450 enzim-család tagjai miatt, amelyek úgyszint hem prosztetikus csoporttal rendelkező ún. hemoproteinek (Berk és mtsai., 1976). De rajtuk kívül is, a legtöbb emlős sejt tartalmaz ún. szabad/lekötetlen hem pool-t, mely a hemoproteinek bomlásából származó illetve ezek felépítéséhez szükséges hem átmeneti tárolóhelye, fogalmazhatunk úgy, hogy ez egy “pre- ill. poszt-hemoprotein szabad hem pool” (Ryter és Tyrrell, 2000).

A szabad hem prekursor és szabályozó funkciókat tölt be (Ponka, 1999). A hem prosztetikus csoportként szerepel a hemoglobinban, mioglobinban, a citokrómokban, kataláz és peroxidáz enzimekben, valamint a ciklooxigenáz, és nitrogén monoxid szintetáz enzimekben (Maines, 1997). A hem számos gén expresszióját is szabályozza transzkripciófaktor-, mRNS-, fehérjeszintézis- és poszttranszlációs szinten, így a hemoxigenáz-1 enzimét is (Gidari és Levere, 1977). Ezen túlmenően a hem bizonyos sejtek differenciációját és osztódását is szabályozza (Wagener és mtsai., 1999).

Számos pozitív tulajdonsága ellenére azonban, egyre több bizonyíték támasztja alá a szabad hem sejtkárosító hatását. Mivel a hem egy alacsony-molekulatömegű, lipofil vas kelát, könnyen interkalálódik lipid kettősrétegekbe tönkretéve ezáltal sejtek, mitokondriumok, sejttagok membránját és meggyengítve a citoskeleton (Balla és mtsai., 1991; Ryter és Tyrrell, 2000).

A sejtek szabad hem pool-ja megemelkedhet extracelluláris hem-túlterhelés, megnövekedett hem-szintézis, felgyorsult hemoprotein-bontás stb. miatt (Ryter és Tyrrell, 2000), amely szabad oxigén gyökök és következményes oxidatív sérüléshez és sejtkárosodáshoz, ami pedig limfocita aktivációhoz és felhalmozódáshoz vezet (Wagener és mtsai., 2003; Tsuchihashi és mtsai., 2004). Iszkémia-reperfúzió esetén az intracelluláris hem-termelés megnő, oxidatív stressz hatására hem szabadul fel a strukturálisan károsodott

hemoproteinekből (Ryter és Tyrrell, 2000), valamint extracelluláris túlterhelést jelentenek az erekben rekedt vörösvértestek, melyek reperfúzióban eldeformálódnak, aggregálódhatnak tovább gátolva a vérellátást ezáltal iszkémiát okozva, valamint lízisük bekövetkeztével, a felszabaduló kötetlen hem felerősíti az oxidatív folyamatokat, szabadgyökök keletkeznek ezzel hozzájárul az iszkémia-reperfúziós károsodáshoz (Tsuchihashi és mtsai., 2004).

Számos extracelluláris és intracelluláris védekező-mechanizmus létezik a szabad hem által kiváltott oxidatív stressz kivédésére. A hemopexin például egy plazma glikoprotein, amely kivételesen nagy hatékonysággal köti a szabad hemet az érben (Tolosano és Altruda, 2002). Az így megkötött hemet a sejtek aztán felveszik és lebontják (Tsuchihashi és mtsai., 2004). Intracellulárisan a hemet a hemoxigenáz enzimek bontják, melyek azzal, hogy megelőzik a hem szabadgyök-képzését nyilvánvalóan fontos citoprotektív hatást fejtenek ki.

A hem lebontásában sebességmeghatározó lépés a hemoxigenáz (HO) enzim által katalizált folyamat, melyben a hemből szénmonoxid (CO), szabad vas (Fe^{2+}) és biliverdin keletkezik, mely utóbbit a biliverdin reduktáz enzim azonnal továbbalakítja bilirubinná (Maines, 1997). A hemoxigenáznak három izoformája létezik: az indukálható HO-1, a konstitutívan expresszált HO-2 és az ezekkel rokon, de kevésbé ismert HO-3 (Tsuchihashi és mtsai., 2004; Deshane és mtsai., 2005). A HO-3-at egyelőre csak patkányokban azonosították (McCoubrey és mtsai., 1997), kis jelentőségű, fiziológias szerepe nem tisztázott, feltehetően csupán egy pszeudogén (Hayashi és mtsai., 2004). A HO-2 elsősorban az agyban, a herék szövetében, az endotél szövetben, májban és a belekben fordul elő, a sejtek mitokondriumaiban helyezkedik el és a sejtműködés fiziológias szabályozójaként funkcionál (Wagener és mtsai., 1999). A HO-1 ubikviter, minden szövetben indukálható a kifejeződése és a sejtek endoplazmatikus retikulumaiban található (Deshane és mtsai., 2005). A HO-1 expresszió alap helyzetben relatíve alacsony, kivéve a lépet, ahol állandó magas koncentrációban van jelen (Tsuchihashi és mtsai., 2004). A HO-1 upregulációja az egyik legfontosabb citoprotektív mechanizmus, mely a sejteket érő különféle stresszhelyzetekben aktiválódik. A HO-1 expressziója sokkal több stimulus által indukálható, mint bármilyen más eddig leírt enzimé: a HO-1-aktivitás indukálódik többek között hem, iszkémia, gyulladás, hipoxia, hiperoxia, nitrogén monoxid, kadmium, növekedési faktorok, oxidált LDL, sugárzás stb. hatására (Choi és Alam, 1996; Maines, 1997). Ebből egyértelműen kitűnik a HO-1 és az iszkémia kapcsolata: az iszkémia/hipoxia közvetlenül is, valamint az iszkémia következtében kialakuló fokozott hem-terhelés,

következményes steril-gyulladás stb. által indirekt módon is képes fokozni a HO-1 termelődését illetve aktivitását. Nincs még egy olyan enzim, melyet ennyi különböző faktor/behatás indukálna, mint a HO-1-et. Ez a folyamat kulcs fontosságú szerepet játszik az antioxidáns/oxidáns homeosztázis fenntartásában sejtkárosodás esetén: a HO-1 – reakciótermékein keresztül – számos biológiai hatás kiváltására képes, úgymint anti-oxidáns, anti-inflammatórikus, pro- és anti-apoptotikus hatás, ezzel számos kritikus biológiai folyamatot befolyásolva, mint például az iszkémia-reperfúziós károsodást (Dong és mtsai., 2000; Otterbein és mtsai., 2003; Deshane és mtsai., 2005).

A HO-1 jótékony hatásának hátterében egyrészt a potenciálisan citotoxikus szabad hem lebontása, valamint az ebben a folyamatban képződő reakciótermékek állnak: mind a biliverdinről/bilirubinról, mind a CO-ról kiderült, hogy iszkémia-reperfúziós károsodásokban protektívek.

Az exogén, kis mennyiségű CO iszkémia-reperfúzióban többek között szívben, tüdőben, vesében és bélben bizonyult védő hatásúnak (Fujita és mtsai., 2001; Nakao és mtsai., 2003; Nakao és mtsai., 2005); a CO többek között cGMP és MAPK útvonalakon keresztül hatva anti-apoptotikus, anti-inflammatórikus és anti-proliferatív hatású (Ryter és Otterbein, 2004).

A biliverdin és a bilirubin erős antioxidánsok (Tomaro és Batlle, 2002; Kapitulnik, 2004), exogén bilirubin – alacsony koncentrációban – iszkémia-reperfúzióban védő hatásúnak bizonyult többek között szívben, májban és vesében (Clark és mtsai., 2000; Kato és mtsai., 2003; Adin és mtsai., 2005). Jóllehet nagy mennyiségben az albuminhoz nem kötött, szabad, nem-konjugált bilirubin neurotoxikus (kernicterus, bilirubin-enkefalopátia), fiziológiás plazma-koncentrációkban jótékony hatású (Kapitulnik, 2004).

A HO reakcióban felszabaduló vas azonban bizonyítottan szabadgyökképző hatású: Fenton-reakció útján membrán- illetve szövet-károsodást képes okozni (Kapitulnik, 2004). Szerencsére azonban a szabad vas koncentráció növekedése a nagy affinitású vas-kötő ferritin gyors expressziójához vezet, valamint maga a HO-1 enzim fokozza egy, a vasat az endoplazmatikus retikulum lefűződéseibe, ún. mikroszómákban pumpáló Fe-ATPáz efflux pumpa kifejeződését (Baranano és mtsai., 2000). A mikroszómákból aztán a vas exocitózis útján visszakerülhet a vérplazmába, ahol cirkuláló vas-kelátor fehérjék (transzferrin, apoferrin) azonnal megkötik, hogy aztán a máj eltávolítsa a vasat a keringésből. Így tehát a HO-1 tkp. elősegítheti az intracelluláris forrásból származó vas eltávolítását a szisztémás vérkeringésbe (Katori és mtsai., 2002). Jóllehet a szabad hem és a szabad vas mindketten pro-oxidáns anyagok, a hem bontása során felszabaduló vas kevésbé valószínű, hogy

felhalmozódik a membránokban, több útvonal is rendelkezésre áll a redisztribúciójára és semlegesítésére (Katori és mtsai., 2002).

Bár a HO-1 iszkémia ellenes hatásának hátterében álló mechanizmusok nem teljesen tisztázottak, úgy tűnik a hem-bontásból származó termékek, a CO, a biliverdin és a vas-indukálta ferritin tehetők felelőssé a HO-1 aktiváció jótékony hatásaiért (Wagener és mtsai., 1999).

2.5. A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

Az 1989-ben bárány hipofízisben (angolul pituitary) felfedezett adenilát-cikláz enzimet aktiváló polipeptid, a PACAP a szervezetben két izoformában van jelen: egy 38 aminosavból álló hosszabb (Miyata és mtsai., 1989) és egy a működéshez feltétlenül szükséges 27 aminosavból álló rövidebb változatban (Miyata és mtsai., 1990). A peptid elsődleges szerkezete igen megőrzött: az emlősökben, sőt még a kétélűekben és a halakban is gyakorlatilag azonos (Dejda és mtsai., 2005). A PACAP38 előfordulása a szövetekben gyakoribb, mint a PACAP27-é (Vaudry és mtsai., 2009).

Előfordulását tekintve, nem kizárólagosan a hipofízisben, hanem szerte a központi idegrendszerben valamint a perifériákon is megtalálható, mint például a mellékvesékben, légzőrendszer idegvégződéseiben, az emésztőrendszerben, a nemiszervekben stb. is (Dejda és mtsai., 2005). Legnagyobb mennyiségben a herék szövetében, azon belül a hímvarsejtekben fordul elő; itt minden más ismert peptidnél magasabb koncentrációban van jelen a PACAP (Vaudry és mtsai., 2009).

2.5.1. Fiziológiás hatások

A PACAP pleiotróp hatásairól számtalan cikk számolt már be: a PACAP hormonként, neurohormonként, neurotranszmitterként és tróf-faktorként funkcionál számos szövetben.

A központi idegrendszerben a PACAP több fontos szereppel is bír: csökkenti a táplálék- de növeli a folyadékfelvételt, részt vesz az alvás szabályozásában, a fájdalomérzet és az érzelmek kialakításában stb. (Vaudry és mtsai., 2009).

A PACAP-nak szabályozó szerepet tulajdonítanak a hipotalamuszban. Egyrészt neurotranszmitterek felszabadulását befolyásolja az összes hipotalamikus ún. tróp-sejtben (gonadotróp, somatotróp, laktotróp, kortikotróp, tireotróp) (Vaudry és mtsai., 2009). A PACAP stimulálja a melanotróp, POMC-tartalmú sejtekben az α -MSH termelést ill.

elválasztást is (Koch és Lutz-Bucher, 1992; Mounien és mtsai., 2006; Kidane és mtsai., 2007). Több cikk szerint is a PACAP táplálék-felvételre gyakorolt hatását valójában a következményesen felszabadult α -MSH fejtí ki, sőt nemcsak a POMC és α -MSH kifejeződését upregulálja, de még az α -MSH MC4-R (ún. melanocortin 4-es típusú) receptorát is (Mounien és mtsai., 2006; 2009).

Továbbá részt vesz a cirkadián ritmus-szabályozásban is: a PACAP és receptorai a 24 órás ciklus alatt a retinohipotalamikus pályán belül különböző mértékben expresszálódnak, így feltehetőleg fontos szerepet játszanak a biológiai óra fény-sötét-napciklushoz való állításában, valamint a melatonin-szintézisben is (Gillette és Mitchell, 2002).

A retina-hipofízis/hipotalamusz- illetve a PACAP- α -MSH-kapcsolatot erősíti az a felfedezés is, miszerint a színváltásra képes állatok, mint például a *Xenopus laevis* (karmos béka), bőrszínének háttérszínhez való adaptációjában fontos szerepe van a PACAP hatására felszabadult α -MSH -nak: a PACAP által stimulálható, PACAP-receptorral is rendelkező melanotróp sejtek α -MSH-n keresztül hormonálisan kontrollálják a bőr színváltását (Kidane és mtsai., 2007; Kidane és mtsai., 2008).

A PACAP neurotróf illetve neuroprotektív hatásairól is sok cikk számolt be: az agyszövet fejlődésében elengedhetetlen a sejtek osztódásához, differenciálódásához (Vaudry és mtsai., 2009), továbbá védő hatást képes kifejteni többek között Parkinson-kórban (Reglodi és mtsai., 2004; Reglodi és mtsai., 2006), iszkémiás agy- és retinakárosodásban (Reglodi és mtsai., 2002; Atlasz és mtsai., 2007) illetve glutamát okozta retinális excitotoxikus károsodásban is (Tamas és mtsai., 2004; Atlasz és mtsai., 2009).

A periférákon a PACAP simaizomrelaxációt vált ki, így értágító, hörgőtágító és bél-motilitás-serkentő hatású, a hasnyálmirigyben inzulin-elválasztást, az egész gasztrointesztinális traktusban pedig emésztőnedv-termelést serkent (Dejda és mtsai., 2005; Vaudry és mtsai., 2009). A pajzsmirigyben serkenti a tiroxin-termelést; a herékben elősegíti a sperma-érést, részt vehet az erekcióban, nőkben javítja a fertilitást; a mellékvese fejlődéséhez és differenciálódásához is hozzájárul, valamint elősegíti a mellékvese hormon-elválasztását; hatással van a légző- valamint a szív- és érrendszerre; az immunrendszer sejtjeit is befolyásolja, immunmodulátor hatású; valamint még a csontrendszerre is van hatása (Vaudry és mtsai., 2009).

2.5.2. Glutamát indukálta retinakárosodás elleni védő hatás

A PACAP képes a magas koncentrációjú glutamát citotoxikus hatásaitól megvédeni a neuronokat (Morio és mtsai., 1996). Sőt, a glutamát excitotoxikus dózisban még jelentősen növeli is a PACAP mRNS-ének expresszióját (Shintani és mtsai., 2005).

A PACAP csökkenti a glutamát-indukálta neurotoxicitást retinális neuron-sejttenyészetben (Shoge és mtsai., 1999). Pécsi kollaborációs partner-kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint a PACAP képes kivédeni a glutamát excitotoxicitást retinában *in vivo* is (Babai és mtsai., 2005; Atlasz és mtsai., 2008). Újszülöttkori mono-nátrium-glutamát (MSG) okozta károsodás ellen is hatásos kezelést jelent a PACAP (Atlasz és mtsai., 2009; Kiss és mtsai., 2011), amely ráadásul saját receptorának (PAC_1) expresszióját is fokozza (Szabadfi és mtsai., 2012).

A PACAP a glutamát-indukálta károsodás elleni védő hatását feltehetően cAMP mediálta útvonalon keresztül fejt ki (Morio és mtsai., 1996), és arról is beszámoltak már, hogy a PACAP közvetlenül, intracelluláris másodlagos messengerek nélkül is képes modulálni glutamát NMDA-receptorokat (Liu és Madsen, 1997; 1998).

2.5.3. A PACAP receptorai

A humán PACAP27 szekvenciája 68%-ban megegyezik a vazóaktív intesztinális peptidével (VIP) így a PACAP is a VIP-szekretin-GHRH-glükagon fehérje-szuperfamilia tagja (Sherwood és mtsai., 2000; Vaudry és mtsai., 2009).

A PACAP három fő receptortípuson fejt ki hatását. Ezeket egymástól a PACAP és VIP iránti érzékenység alapján lehet elkülöníteni: a PAC_1 receptorhoz, melynek legalább 8 különböző variánsa létezik, a PACAP kb. három nagyságrenddel nagyobb ($K_d \approx 0,5nM$) affinitással kötődik, mint a VIP ($K_d > 500nM$), míg a VPAC receptor, melynek két altípusa ismert a $VPAC_1$ és $VPAC_2$, nem-szelektív, a két peptid közel azonos affinitással kötődik hozzá ($K_d \approx 1nM$) (Dejda és mtsai., 2005).

A PAC_1 receptor elsősorban a központi idegrendszerben, míg a VPAC receptorok elsősorban a perifériákon elterjedtek (Vaudry és mtsai., 2009). Ezek alapján nem meglepő, hogy a szem szöveteiben is igen elterjedt a szelektív PAC_1 receptor. Az érhártya főleg nem-szelektív VPAC receptorokat tartalmaz (~80%-ban); a choroidea és a retinális pigment epithelium ~60%-ban, míg a retina ~85%-ban PACAP-szelektív PAC_1 típusú receptorokat tartalmaz (Nilsson és mtsai., 1994; D'Agata és Cavallaro, 1998).

Mindhárom PACAP receptortípus G-fehérjével kapcsolt hét transzmembrán doménnel rendelkező (7-TM) receptor. A fő jelátviteli útvonaluk az adenilát-cikláz enzim aktivációja (G_s), melynek következtében a cAMP szintje a sejtekben megnő (Dejda és mtsai., 2005); továbbá minden receptortípus aktiválhatja a foszfolipáz D (PLD) útvonalat is (McCulloch és mtsai., 2000). (Ezek alól kivételt képez a PAC₁ ún. TM4 variánsa.) A PAC₁ (kivéve a TM4 variáns) és VPAC₁ receptorok foszfolipáz C (PLC) útvonalat (G_q) is aktiválnak (Arimura, 1998).

A retinában jelenlévő receptorok funkcionális analízise kiderítette, hogy a PAC₁-típusú receptorok adenilát-ciklázhoz és foszfolipáz C-hez vannak pozitívan kapcsolva (G_s és G_q jelátvitel is), míg a VPAC-receptorok csak adenilát-ciklázhoz kapcsolódnak (csak G_s jelátvitel) (D'Agata és Cavallaro, 1998).

2.6. Az alfa melanocita stimuláló hormon (α -MSH)

Az alfa-melanocita stimuláló hormon (α -MSH) a melanokortinok családjába tartozó, a szervezetben fiziológiásan is jelen lévő endogén peptid hormon. A 13 aminosavból álló peptid az ACTH proteolitikus hasítási terméke, amely viszont a proopiomelanocortin (POMC) prekursor molekulából hasítódik le az ún. melanotróp sejtekben, a hipofízis középső lebenyében. A POMC molekulából származtathatók, az endogén opioid béta-endorfin, a lipotropinok, az ACTH valamint a melanokortinok: a béta-, gamma- és az alfa-MSH is (Eipper és Mains, 1980).

2.6.1. Fiziológias hatások

Az α -MSH legalapvetőbb élettani funkciója a melanociták illetve a bennük folyó melanogenesis serkentése, mellyel a bőr pigmentációját fokozza. Ezt a funkciót emlősökben és alacsonyabb-rendű gerincesekben is bizonyították már, de emberben – jól lehet itt is a bőr sötétedését okozza (Levine és mtsai., 1991) – ennek fiziológiai jelentősége bizonytalan. Ugyanakkor fontos megjegyezni az α -MSH melanocitákra gyakorolt egyéb hatásait: a melanin-termelés fokozásán túl a melanociták alakját, dendriticását, valamint osztódását is stimulálja, és védi őket az oxidatív károsodásoktól, melyre különösen érzékenyek (Thody, 1999).

Az α -MSH protektív hatása más sejteken is érvényesül oxidatív károsodásban: keratinocitákban, melanoma-sejtekben valamint retinális pigment epitheliumban is igazolták (Haycock és mtsai., 2000; Cheng és mtsai., 2014).

Anti-inflammatorikus hatásáról is beszámoltak már az irodalomban: az α -MSH csökkenti a pro-inflammatorikus citokinek és nem-citokin mediátorok termelését, serkenti a citokin-gátló IL-10 termelését, gátolja az intercelluláris adhéziós molekulák expresszióját, valamint módosítja a limfociták aktivitását és osztódását (Brzoska és mtsai., 2008).

Az α -MSH az étvágy szabályozásában is részt vesz, gátolja a táplálék felvételt (Vergoni és mtsai., 1986) a hipotalamusz jóllakottságközpontjában; MC3-R és MC4-R receptor-deficiens egerek kórosan elhízottak (Gantz és Fong, 2003). A jól ismert anorexigén leptin hatásának a háttérében is α -MSH-hatást feltételeznek, jóllehet az α -MSH leptin-független úton is képes csökkenteni az étvágyat és a táplálékfelvételt (Shimizu és mtsai., 2007).

Az α -MSH szexuális viselkedést befolyásoló hatásáról is több publikáció számolt már be: cerebroventrikulárisan beinjektálva az α -MSH pénisz erekciót okoz hím patkányokban (Argiolas és mtsai., 2000) és számos más laboratóriumi állatban, mint például kutyákban, macskákban, egerekben és nyulakban (Argiolas és Melis, 2013), sőt ezt a hatást embereken is igazolták különböző melanokortin-receptoragonisták *subcutan* és intranazális adagolásakor (Wessells és mtsai., 1998; 2000; Diamond és mtsai., 2004). A hatás háttérében itt is feltehetőleg az MC3-R és MC4-R melanokortin-receptorok állnak (Gantz és Fong, 2003).

2.6.2. Antiiszkémiás hatás

Az α -MSH iszkémia-reperfúziós károsodás elleni védő hatásáról számos publikáció található az irodalomban, melyek különböző szervekben/szövetekben számoltak be hasonló pozitív eredményekről.

Kísérletes agyi iszkémiában például az α -MSH szignifikánsan csökkenti a TNF- α és más pro-inflammatorikus citokin szintjét (Huang és Tatro, 2002; Forslin Aronsson és mtsai., 2006), valamint védő hatásához hozzájárul maghőmérséklet-csökkentő hatása is (Spulber és mtsai., 2005). Kiemelendő, hogy az iszkémiát indukáló behatás után, tehát poszt-iszkémiásan adagolt α -MSH protektív hatásáról is beszámoltak már agyi iszkémiában (Giuliani és mtsai., 2007).

Az α -MSH bizonyítottan kardioprotektív szívizom-iszkémiában is: kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint az α -MSH az összes tesztelt dózisban (40-400 μ g/ttkg) csökkentette az infarktusz terület kiterjedését izolált dolgozó szív modellen, valamint szignifikánsan javította a koronária átáramlást, aorta kiáramlást, valamint a

balkamrai nyomást 200 µg/ttkg-os dózisban (Vecsernyes és mtsai., 2003). Előremutató kutatások szerint az α -MSH a szíven MC3-R típusú receptorán fejti ki előnyös hatásait (Guarini és mtsai., 2002; Mioni és mtsai., 2003).

Több más szervben is védő hatásúnak bizonyult az α -MSH iszkémiában, mint például mezenteriális iszkémiában (Hassoun és mtsai., 2002), illetve vese-iszkémiában is (Chiao és mtsai., 1997); ezeken a szöveteken szintén igazolódott az α -MSH posztisztkémias hatásossága (Chiao és mtsai., 1997; Zou és mtsai., 2003).

2.6.3. Melanocortin-receptorok

A melanocortin-receptoroknak öt különböző típusa létezik, melyek G-fehérje kapcsolt metabotróp receptorok és adenilát cikláz aktivitást fokozó (tehát cAMP-szint növelő), G_s jelátviteli útvonalon valamint intracelluláris Ca^{2+} -szintet növelő G_q -útvonalon (PLC-útvonal) szignalizálnak (Kojima és mtsai., 1985).

Az MC1-R a klasszikus melanocita stimuláló hormon receptor, mely elsősorban a melanocitákon és más bőrsejt típusokon fejeződik ki (Chhajlani, 1996). Az MC2-R az ACTH specifikus receptora, az MSH hormonok egyáltalán nem hatnak rajta (Gantz és Fong, 2003). A mellékvese-kéregben fejeződik ki elsősorban, ahol az ACTH hatásait közvetíti, valamint érdekes módon zsírsejtek felszínén is kimutatták, ahol fiziológias funkciója egyelőre tisztázatlan: egereken lipolitikus hatást közvetít, de ez emberben nem annyira kifejezett (Wikberg, 1999). Az MC3-R a központi idegrendszer számos területén is, és a perifériákon (gasztrointesztinális traktus, placenta stb.) is expresszálódik (Chhajlani, 1996), míg az MC4-R főleg a központi idegrendszerben, az MC5-R pedig főleg a perifériákon fordul elő (Gantz és Fong, 2003).

A szemben az összes melanocortin receptor expresszálódik, melyek közül az MC4-R fordul elő a legnagyobb mennyiségben. A retinában a melanocortin-receptorok eloszlása sejtrétegenként változik: retinális ganglion sejtekben például a 3-as és 4-es, míg a belső sejtmagvas rétegben (INL) 3-as, 4-es és 5-ös receptortípus is előfordul (Lindqvist és mtsai., 2003). Az MC5-R receptorok aranyhalak retinájában is bizonyítottan megtalálható (Cerdá-Reverter és mtsai., 2003), egerekben kísérletes autoimmun uveitisben az α -MSH pozitív hatásának kiváltásához is ezek a receptorok szükségesek (Lee és mtsai., 2009).

Az α -MSH és a melanocortin receptorok feltehetőleg elengedhetetlenek a szem embrionális fejlődéséhez is: időbeli és térbeli eloszlásuk a csirkék egyedfejlődése során változik. A csirkék embrionális életében a retinális pigment epithél sejtek α -MSH-t

termelnek, míg ezt a funkciót a színlátásért felelős csap-sejtek veszik át posztnatálisan. Az α -MSH feltehetőleg parakrin módon hat a choriodea és a retina sejtjeire, ahol MC1-R, MC4-R és MC5-R receptorok expresszálódnak (Teshigawara és mtsai., 2001).

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez Wistar és Sprague Dawley típusú patkányokat használtunk fel. A Wistar patkányok esetében az állatok tartására és velük való kísérleti munkára a Pécsi Tudományegyetem, míg a Sprague Dawley patkányok esetében a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság irányelveit tartottuk szem előtt, a vonatkozó Európai Unió előírásokkal összhangban.

Az újszülött Wistar patkányok 12 órás fény-sötét ciklusban voltak tartva, a táplálékhoz (standard rágcsáló táp) és vízhez szabad hozzáférésük volt. A 300-350g súlyú Sprague Dawley patkányokat a Charles River Laboratories Magyarország Kft-től rendeltük; az élelemhez (standard rágcsáló táp) és a vízhez szintén szabad hozzáférésük volt.

3.2. Iszkémia és reperfúzió (I/R)

Ketamin/xilazin-al (50/5mg/ttkg) történő általános érzéstelenítést követően a patkányok egyik szemét ellátó arteria centralis retinae sebészileg lekötésre került, egy korábbi cikkekben alkalmazott protokoll szerint (Szabo és mtsai., 1991; Szabo és mtsai., 2004): a szemhéjat varratokkal visszahúztuk, az állatok szemébe oxybuprokain tartalmú szemcseppet (Humacain, TEVA) cseppentettünk helyi érzéstelenítés céljából, majd egy külön erre a célra készített elszorítót (egy polietilén kanülön keresztül vezetett sebészeti varrófonál-hurok) alkalmaztunk az arteria centralis retinae lekötéséhez. A hurkot a szegolyó mögé helyeztük, lazán a nervus opticus, az arteria centralis retinae, a ciliáris artériák és a retrobulbáris kötőszövet köré. A hurok megfeszítésével és a kanül nervus opticus felszíne felé történő nyomásával az iszkémia kiváltható volt és a kívánt ideig volt fenntartható (elektroretinográfiás vizsgálat előtt az iszkémia 30 perc, míg szövettani, molekuláris biológiai, elektronmikroszkópos vizsgálatok előtt 90 perc). A hurok folyamatos feszesen tartását egy, a sebészeti varróanyagot húzó érfogó biztosította a lekötés ideje alatt. Egy 120 D-s lencsével makroszkóposan ellenőriztük az iszkémiás állapotot. Az iszkémia ideje alatt a szem kiszáradás elleni védelmét egy karbomer-alapú szemgél (Vidisic, Bausch&Lomb) biztosította. A retina szövetének reperfúziója az elszorító iszkémia utáni felengedésével, így a vér arteria centralis retinae-n keresztüli visszaáramlásával valósult meg. Postoperatív fájdalomcsillapításra Algopyrin A.U.V. injekciót (metamisolum

natricum 500,0 mg/ 1,0 ml) alkalmaztunk, fertőzések megelőzésére neomycin (Oculogutta Neomycini, FoNo VII) tartalmú szemcseppet használtunk. Az állatok felébredéséig szemük kiszáradás elleni védelmét ismét karbomer alapú szemgél biztosította (Vidisic, Bausch & Lomb) A reperfúziós periódus az állatok következő napon történő – egyes esetekben elektroretinográfiás mérés utáni – extermínációjáig tartott. A szövettani, molekuláris biológiai, elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a szemeket mindezek kivitelezése után kimetszettük.

3.3. Elektroretinográfia (ERG)

Ketamin/xilazin-al (50/5 mg/ttkg) történő általános érzéstelenítést követően az állatok mindkét szemébe pupillatágító ciklopentolát hidrokloridot (0,5 %; Humapent, TEVA) és fenilefrin hidrokloridot (10 %; Neosynephrin-HCL, Ursapharm) cseppentettünk. A kombinált altatóoldat összetétele a következő volt (egy fecskendőbe felszívva; 50/5 mg/ttkg): Ketamin (Calypsol 50 mg/ml 10 ml-es ampullákban; Richter Gedeon Gyógyszergyár Nyrt; Magyarország) és Xylazin (CP-Xylazin 2 % injekció A.U.V., 50 ml, CP-Pharma, Németország). Az elektroretinogramm rögzítéséhez minden mérésnél öt ezüst elektródot használtunk: két mérő, két referencia és egy általános föld elektródot. Miután a pupilla teljesen kitágult, az állatok mindkét szeme corneájának felszínére, a cornea legszélén óvatosan beszúrtunk egy-egy mérő ezüst tűelektródot felületesen úgy, hogy az a kötőszövetet ne érje és még véletlenül se perforáljuk vele a corneát. A két mérő elektród ily módon történt behelyezése után a két referencia elektródot a fülcimpákba helyeztük el, míg az általános föld elektródot az állat középvonalában a glabella területére szúrtuk be. A klinikai gyakorlatban az elektroretinográfiát éppen non-invazív volta miatt dicsérik, ugyanakkor a mi esetünkben, minthogy az állatok szemét extermínálás után további molekuláris-biológiai vizsgálatok miatt kísérleti mintának kivesszük, ez nem volt szempont. Továbbá a hagyományos kontaktlencse elektródokkal szemben, az ezüst tű elektródok elektromos kontaktusa és jeltovábbítása sokkal jobbnak bizonyult. A szem kiszáradás elleni védelmét karbomer szemgél (Vidisic, Bausch & Lomb) biztosította. Az elektródok behelyezése után egy rövid sötét adaptációs periódus következett (20 perc), mely után az állatok szemét egy külön erre a célra készített stroboszkóppal világítottuk meg (20 cd/m²; 0,5 Hz). A felvillanó fényre adott retinális elektromos jeleket az elektródokkal vezettük el és egy elektroretinográfiára alkalmas készülékkel rögzítettük, mely egy erősítőből és egy analog-digital átalakítóból áll (Bridge Amp és PowerLab,

ADInstruments), majd egy számítógép monitorán megjelenítve PowerLab Chart szoftverrel (5.2.2. Verziószám, ADInstruments) értékeltük ki. A mérés befejeztével az állatokat ketamin/xylazin kombinációjával túlaltattuk, majd a szemüket további molekuláris biológiai vizsgálati felhasználásra kimetszettük.

A kapott elektroretinogramokon egy állandó, mérsékelt háttérzaj és ebből kiemelkedő, jól azonosítható, határozott tüskék láthatók melyek egy negatív csúcsot követő pozitív maximumból állnak és egy újabb negatív csúcson keresztül csillapodnak le. Az erősen pozitív csúcsok a b-hullámok maximumai, melyeket egy-egy negatív csúcs előz meg (az a-hullámok negatív maximumai). Ezek az elektromos tevékenységek (tüskék) mindig következetesen fény stimulus után jelentkeznek ugyanabban a ritmusban mint a fény felvillanása, tehát a stroboszkópon beállított frekvenciában (0,5Hz). A regisztrátumokon a legintenzívebb elektromos aktivitás, amely ilyen erősen pozitív csúcsot hoz létre, az jellemzően a b-hullám. Ugyanakkor az a-hullámokat és az ERG más minor összetevőit nem minden esetben lehet tisztán azonosítani: például a lehetséges a-hullámok amplitúdója ugyanolyan a skálán mozog, mint a minden felvételünkön jelenlevő háttérzaj, mely egyes esetekben ellehetetlenítette az a-hullámok egyértelmű azonosítását és kiértékelését. Mindazonáltal a mi kísérletünkben, nem volt szükség arra, hogy olyan apró részleteket mérni tudjunk, mint c-hullámok vagy oszcillátoros potenciálok, csupán a retina fő elektromos tevékenységében bekövetkező változásokat kívántuk mérni, melyek szorosan összefüggenek a retina funkciójával. A b-hullámok tényleges amplitúdóját a tüske magasan pozitív csúcsa és az azt megelőző negatív maximum között mértük. A csúcsok kiválasztása számítógépesen történt: egy ún. macro-t írtunk a kiértékelő programon belül, mely aztán a megadott kritériumoknak megfelelően kijelölte b-hullámokat és rögzítette azok adatait. Ez lehetővé tette, hogy egy-egy állat esetében akár több száz csúcsot is képesek legyünk kielemezni. Az ERG méréseink eredményei – melyet a szóbanforgó rendszerrel rögzítettünk – bebizonyították, hogy az itt leírt módszer költség-hatékony, valamint reprodukálható, a retinális sejtek túlélésével szorosan korreláló adatokat szolgáltat a retinfunkcióról.

3.4. Szövetteni és elektronmikroszkópos mintafeldolgozás

Az MSH-val végzett kísérletünkben a retina szövetének fixálásához először – az állatok túlaltatását követően – az aortán keresztül kanüláltuk az állatok szívét, majd sebészi bemetszést ejtettünk a jobb kamrán, hogy onnan a vér szabadon távozhasson. Az állatok

érrendszeréből a vért 0,9 %-os fiziológias só oldattal mostuk ki (perfundáltuk). A folyamat maximum 20 másodpercig tartott, egy esetleges idegszöveti ödémaképződés megelőzése illetve minimalizálása érdekében. Ezt követően a NaCl-perfúzió felfüggesztése nélkül 100 ml fixáló oldatot (Bouin-oldat) alkalmaztunk (transcardiálisan fixálás). A Bouin-oldat összetétele a következő: ecetsav (5 %), formaldehid (9 %), pikrinsav (0,9 %) víz (85,1 %); (Bouin's solution; Sigma-Aldrich, Magyarország). Ezután a bulbusokat kimetszettük, majd ketté vágtuk az ora serrata mentén coronalis sectio-t alkalmazva. A vitreum eltávolítása után a szegmolyót fixáló oldatba helyeztük, ezt követően felszálló koncentrációjú etanol-oldatot (dehidráció), végül paraffin oldatot alkalmaztunk.

A bulbusok egy részéből 7 µm-es sagittális szeleteket metszettünk, amelyeket hematoxylin-eosinnal festettük meg és fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk. Korábbi cikkek alapján az I/R-indukálta szöveti ödéma legjobban a retina belső rétegeiben ismerhető fel és dokumentálható (Shakib és Ashton, 1966; Juarez és mtsai., 1986). A belső retinális rétegek (INL+IPL) vastagságát sagittális metszetekben a látóidegfő (vakfolt) közelében mértük és microméterben fejeztük ki manuálisan mérve a tárgylemezeken lévő microméteres beosztás segítségével.

A fixált bulbusok egy másik csoportjából 60 µm-es sagittális szeleteket metszettünk, és elektronmikroszkópos (EM) vizsgálatra készítettük elő. A szöveti lipideket osmium-tetroxiddal (OsO_4) fixáltuk. (A szöveti fehérjék fixálása már korábban megtörtént a Bouin-oldat formaldehid-komponensének köszönhetően.) Az osmiumozott mintákat víztelenítés (felszálló koncentrációjú etanol-oldatsor) után araldit-epoxi gyantába ágyasztuk („aralditos csónakba szedtük”) és 2 napig 56 ° C-on termosztáltuk a polimerizáció teljes végbemenetelésére elősegítésére. Ezután a mintákból ultra-mikrotommal ultravékony metszeteket készítettünk, majd EM alatt vizsgáltuk a sejteken belüli, morfológiai elváltozásokat.

A PACAP-pal végzett kísérletünkben az állatok túlaltatását követően szemeiket kimetszettük és azonnal jéghideg PBS-oldatban felboncoltuk, majd 0,1 M-os PBS-el kihígított 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk. A szöveteket Durcupan ACM gyantában (Fluka, Svájc) ágyasztuk, 2 µm-es metszeteket készítettünk és toluidin-kékkel (Sigma, Magyarország) megfestettük. A metszeteket ezután Depex médiumba ágyasztuk és egy Nikon Eclipse 80i (Tokyo, Japán) mikroszkóppal vizsgáltuk. A méréseket a fotókról az NIH Image 1.55-ös verziószámú programjával végeztük. Legalább három állatból 6

szövetblokk készült és a látóidegfőtől (vakfolt) 1-2mm-re lévő retinális területeken végeztük el a méréseket (n = 2-5 mérés minden szöveti blokkra nézve). Kizártuk a vizsgálatból azokat a metszeteket, amelyeknél a GCL réteg többsejtsorosnak látszott. A következő paramétereket mértük: (1) a retina-teljes átmérője a külső limitáló membrántól a belső limitáló membránig, (2) az egyes retinális rétegek vastagsága és (3) a sejtek száma/100 µm hosszú GCL rétegben.

3.5. Western blot

A kísérleti folyamatban korábban lefagyasztott enukleált bulbusokat homogenizáló pufferben homogenizáltuk, melynek összetétele a következő volt: Tris (25 mM); NaCl (25 mM); Na-ortovanadát (1 mM); NaF (10 mM); Na-pirofoszfát (10 mM); Okadán sav (10 nM); EDTA (0,5 mM); PMSF (1 mM); protease inhibitor cocktail; desztillált víz. A desztillált víz kivételével, melyet tanszékünkön állítottunk elő, a homogenizáló puffer összes többi összetevőjét a Sigma-Aldrich magyarországi képviselőjétől rendeltük. Az izolátumból, azonos tömegű fehérje mintákat (50 µg), valamint előfestett protein standardokat (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, Németország) frakcionáltunk 12 %-os (akrilamid - bisz-akrilamid arányú) Tris-SDS-poliakrilamid gél elektroforézis segítségével. Ezután következett a Western blot eljárás: a szétválasztott fehérjéket elektroforetikusán transzferáltuk egy nitrocellulóz membránra (Whatman Protran Nitrocellulóz Membrán; Whatman, Egyesült Királyság) egy transzfer-készülék segítségével (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad Laboratories Ltd.). A blot-ok blokkolása (1,5 h) TBS-T-vel készített 5 %-os (m/V %) zsírszegény tejpor szuszpenziójával történt. A TBS-T összetétele a következő volt: 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol sósavval alkotott sója (Tris-HCl) (50 mM), pH7,4, NaCl (150 mM), Tween®-20 (0,05% V/V). Ezt követően éjszakán át tartó inkubálás következett 4 °C-on HO-1 ellenes primer antitestekkel (Sigma-Aldrich) TBS-T-ben 1:1000 hígításban alkalmazva. Másnap rövid mosási folyamat után a blot-okat 1 órán át torma-peroxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk (1:2000 hígítás, TBS-T-ben, 5 m/V% zsírszegény tejjel). Egy újabb rövid mosást követően a blot-okat ún. enhanced chemiluminescence reagenssel (a HRP kemilumineszens szubsztrátjával) kezeltük (Millipore, Billerica, MA). A detektálás autoradiográfiás módszerrel történt Röntgen-film segítségével (Agfa-Gevaert N.V., Belgium). A filmeket beszkeneltük és Scion Image szoftver segítségével értékeltük ki

(Scion Corporation, Torrance, CA). Kontrollként GAPDH fehérjét használtunk (Sigma-Aldrich, Magyarország).

3.6. Hemoxigenáz aktivitásmérés

A hemoxigenáz enzim aktivitásának mérését a következő protokoll alapján végeztük: az eltávolított szemgolyókat homogenizáltuk egy homogenizáló oldatban, melynek összetétele a következő: (4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav) HEPES (10 mM); szukróz (32 mM); (ditiotreitol) DTT (1 mM); (etilén-diamin-tetraecetsav) EDTA (0.1 mM); szójabab tripszin inhibitor (10 µg/ml); Leupeptin (10 µg/ml); Aprotinin (2 µg/ml); pH 7,4. A homogenizáló oldat összetevőit a Sigma-Aldrich magyarországi képviselőjétől rendeltük. A homogenizátum 4 ° C-on, 20,000 g-vel 30 percig tartó centrifugálásával elkülönített felülúszót begyűjtöttük. A hemoxigenáz (HO) aktivitásmérést minden így kapott felülúszó-mintából elvégeztük egy korábban leközölt módszer szerint (Tenhunen és mtsai., 1968). Röviden, a HO-aktivitást a bilirubin egy reakcióelegyben való képződésének spektrofotometriás mérése alapján számoltuk ki. A reakció elegy összetétele a következő: a felülúszó egy alikvot-ja, glükóz-6-foszfát (2 mM); glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (0.14 U/ml); hem (15 µM); NADPH (150 µM), patkány máj citoszol biliverdin-reduktáz forrásként (120 µg/ml); MgCl₂ (2 mM), és KH₂PO₄ (100 mM). Hatvan perc sötétben történő inkubáció után a reakciót megállítottuk azzal, hogy a mintákat jégbe rakva lehűtöttük. A bilirubin képződést a 460 és 530 nm-en mért optikai denzitások különbségét alapul véve számítottuk ki. Az egy óra alatt egy milligramm fehérjéből képződött bilirubin mennyiségét (nanomolokban kifejezve) egy egység HO-aktivitásnak definiáltuk. Az azonos szövettípusból származó két különböző minta aktivitás mérési eredményei közötti különbség a HO-1 izoforma aktivitás-változásának tulajdonítható, mivel az enzim más izoformái (HO-2, HO-3) nem indukálható, konstitutív formák.

3.7. Kísérleti protokollok és csoportok

3.7.1. PACAP-kísérlet

A PACAP-pal végzett kísérlet célja az volt, hogy megvizsgáljuk a PACAP funkcionális retinavédő hatásait egy tanszékünkün beállított, jól működő, reprodukálható méréseket biztosító elektroretinográfiás módszerrel.

Az újszülött Wistar patkányok közül a kezelt csoportban lévők (n=16) három alkalommal (az 1., 5. és 9. postnatális napon) subcutan 2 mg/g MSG-t kaptak 100 µl

fiziológiás sóoldatban. Az MSG-kezelésekkel egy napon az állatok fele egyik szemébe intravitrealisan 100 pmol PACAP38-at is kapott 5 µl fizsóban oldva egy Hamilton tű segítségével. Az állatok azonos mennyiségű vivőanyagot kaptak a másik oldali szemükbe. A dózisokat és az időbeosztást egy korábbi kísérletből vettük át (Babai és mtsai., 2005). A kontroll állatok semmilyen kezelést nem kaptak (n = 5).

Az ERG-vizsgálatokat 2 hónappal a fentebb leírt kezelések után végeztük el, a fentebb leírt módszer szerint. Az ERG-vizsgálatok kivitelezése után az állatokat túlaltattuk és a szemeiket szövettani vizsgálatokra készítettük elő, melyeket a fentebb leírt módon végeztük.

3.7.2. MSH-kísérlet 1. fázis

Az α -MSH-val végzett kísérlet I. fázisában célunk az α -MSH I/R-indukálta retinakárosodás elleni védő hatásának felmérése, továbbá elektroretinográfia segítségével egy optimális kezelési dózis megállapítása volt.

Az MSH I. fázisban az állatokat véletlenszerűen két kezelési csoportra osztottuk: I-a és I-b csoport (n=30 mindkét csoportban) (1. Táblázat).

A	I-a Csoport				
	Subcutan kezelés 12 órával iszkémia előtt n=6	0.9% NaCl oldat n=6	50µg/kg n=6	250µg/kg n=6	500µg/kg n=6
30 perc iszkémia és 24 óra reperfúzió az egyik szemem					
Elektroretinográfia					

B	I-b Csoport	
	Subcutan kezelés 12 órával iszkémia előtt n=15	0.9% NaCl oldat n=15
90 perc iszkémia és 24 óra reperfúzió az egyik szemem		
Szövettan VAGY	Elektron- mikroszkópia VAGY	Western Blot

1. Táblázat: Az MSH-kísérlet I. fázisának felépítése

Az I-a csoport egy dózis-hatás vizsgálati csoportként szolgált és öt alcsoportot foglalt magába: egy kontroll csoportot és négy kezelési csoportot (n = 6 mindegyik alcsoportban). Tizenkét órával iszkémia kiváltása előtt a vivőanyag-kezelt kontroll csoport *subcutan* fiziológiás só oldatot kapott, míg a többi négy csoport rendre a következőket kapta *subcutan*: 50, 250, 500 és 1000 µg/kg α-MSH (Sigma-Aldrich). Az itt leírt kísérlethez használt α-MSH fiziológiás sóoldatban oldva, oldat formájában volt alkalmazva.

Az I-b csoport, melyet az α-MSH hatásának felmérésére használtunk, két alcsoportot foglalt magába (n=15 mindkét alcsoportban). Tizenkét órával iszkémia kiváltása előtt a vivőanyag-kezelt kontroll csoport *subcutan* fiziológiás oldatot kapott, míg a másik alcsoport 500 µg/kg α-MSH-t, mely az I-a csoportban elektroretinográfiásan meghatározott dózis volt.

Az I-a csoportbeli állatok egyik szeme 30 perc iszkémiának lett kitéve a fentebb leírt módszer szerint, melyet 24 órás reperfúziós periódus, majd a korábban részletezett módon kivitelezett ERG mérés követett, mely után az állatokat túlaltatással extermináltuk. Az I-b csoportba tartozó állatok egyik szeme 90 perc iszkémiának lett kitéve, melyet ugyanúgy egy 24 órás reperfúzió követett, mint az I-a csoport esetén. Ezután az állatok túlaltatásos exterminációját követően az állatok szemeit eltávolítottuk.

Az előbb említett iszkémiás időtartamok kiválasztásának egy korábbi megfigyelés volt az alapja, hogy a retinális ödéma, mely ezen vizsgálatnak is egyik meghatározó eleme volt, mindössze 30 perc iszkémiát követően nem jelentkezik, viszont határozottan kialakul 90 perces iszkémia alatt patkány szemén (Szabo és mtsai., 1991). Ugyanakkor, a 90 perc iszkémia szinte teljes vakságot okoz, amely az ERG méréseket praktikusán ellehetetleníti. Így a kísérleti elrendezésünk az MSH-kísérlet I. fázisában két fő állatcsoportot foglalt (I-a és I-b) magába, melyek között a fő különbség a reperfúziót megelőző iszkémiás periódus hossza.

Az I-b csoportból begyűjtött szem mintákat további három csoportra osztottuk (n = 5 mindegyik csoportban). A minták egy csoportján szövettani vizsgálatot végeztünk hematoxillin-eozin festést és fénymikroszkópot alkalmazva, a második csoportot ozmiumozást követően elektronmikroszkóposan vizsgáltuk meg, míg a harmadik mintacsoportot Western blot analízisnek vetettük alá. Mindhárom módszert a fentebb leírtak szerint végeztük.

3.7.3. MSH-kísérlet 2.fázis

Az α -MSH-kísérlet II. fázisában célunk a posztisztkémiásan beadott α -MSH hatásának vizsgálata, valamint olyan nem-HO-1-függő hatásútvonalak létének bizonyítása vagy cáfolása volt, melyek esetlegesen hozzájárulhatnak az α -MSH citoprotektív hatásához.

Az MSH-kísérlet II. fázisában az állatokat véletlenszerűen négy kezelési csoportra osztottuk (n = 5 mindegyik csoportban) (2. Táblázat).

II. Csoport				
Intraperitoneális kezelés 5, 3 majd 1 nappal iszkémia előtt	0,9% NaCl oldat n=5	0,9% NaCl oldat n=5	50 μ mol/kg SnPP n=5	50 μ mol/kg SnPP n=5
30 perc iszkémia az egyik szemem				
Subcutan kezelés a reperfúzió kezdetén	0,9% NaCl oldat	500 μ g/kg α -MSH	500 μ g/kg α -MSH	0,9% NaCl oldat
24 óra reperfúzió				
Elektroretinográfia, majd				
Hemoxigenáz aktivitásmérés				

2. Táblázat: Az MSH-kísérlet II. fázisának felépítése

Az első, az ún. kontroll csoport állatai 5, 3 és 1 nappal az iszkémia kiváltása előtt *intraperitonealis* úton az SnPP vivőanyagával (alább részletezve) lettek kezelve, majd a posztisztkémiás reperfúzió kezdetén *subcutan* (az α -MSH vivőanyagát, vagyis) fiziológiás sóoldatot kaptak.

A második, ún. MSH csoport állatai 5, 3 és 1 nappal az iszkémia kiváltása előtt *intraperitonealis* úton az SnPP vivőanyagával (alább részletezve) lettek kezelve, majd a posztisztkémiás reperfúzió kezdetén *subcutan* 500 μ g/kg α -MSH-t kaptak. Az itt leírt kísérlethez használt α -MSH fiziológiás sóoldatban oldva, oldat formájában volt alkalmazva.

A harmadik, ún. SnPP+MSH csoport állatai 5, 3 és 1 nappal az iszkémia kiváltása előtt *intraperitonealis* úton 50 μ mol/kg SnPP-t, majd a posztisztkémiás reperfúzió kezdetén *subcutan* 500 μ g/kg α -MSH-t kaptak. Az SnPP (Sn(IV) Protoporphyrin IX dichloride; Frontier Scientific Inc., Logan, Utah) a HO-1 hatékony gátlószere (Drummond és Kappas, 1981). Az SnPP 0,1 N nátrium-hidroxid oldatban lett feloldva, majd az oldat kémhatása

(pH 7,4-re) sósavval, koncentrációja fiziológiás sóoldattal lett beállítva. Az SnPP oldat használat előtt 1 órával, fénytől védve, frissen lett elkészítve.

A negyedik, ún. SnPP csoport állatai 5, 3 és 1 nappal az iszkémia kiváltása előtt *intraperitonealis* úton 50 $\mu\text{mol/kg}$ SnPP-t, majd a posztiszkémiás reperfúzió kezdetén *subcutan* (az α -MSH vivőanyagát, vagyis) fiziológiás sóoldatot kaptak.

Mind a négy csoport állatainak egyik szeme 30 perc iszkémiának lett kitéve a fentebb leírt módszer szerint, melyet 24 órás reperfúziós periódus, majd a korábban részletezett módon kivitelezett ERG mérés követett, mely után az állatok túlaltatásos exterminációját követően az állatok szemei eltávolításra kerültek.

A begyűjtött szem mintákat a fentebb részletezett módszer szerint hemoxigenáz aktivitásmérésnek vetettük alá.

3.8. Statisztika

Az adatokat D'Agostino és Person omnibus típusú normalitásvizsgálatnak vetettük alá. Az adatok Gauss-eloszlása esetén egyszempontú variancia-analízist (one-way ANOVA) hajtottunk végre Tukey posztteszttel. Nem parametrikus eloszlás esetén az adatokat Kruskal-Wallis teszttel és Dunn's poszt-teszttel elemeztük ki.

A 9., 13. és 14. ábrán az eredmények százalékban vannak megadva az átlag szórását is feltüntetve (az ábrákon SEM-nek jelölve, de valójában SEM %). A SEM % úgyszint százalékként lett kiszámítva a következő képlet alapján: $\text{SEM \%} = (\text{SEM}/\text{R}) * (\text{R \%})$, ahol R az egyes eredményértékek átlaga (nem százalék), SEM az átlag szórása (standard error of the mean) az egyes eredményértékekből kiszámolva, és R % pedig az R százalékokban kifejezve. (Az adott ábrák feliratában meg van határozva, hogy mihez viszonyított százalék.)

4. Eredmények

4.1. A PACAP-kísérlet eredményei

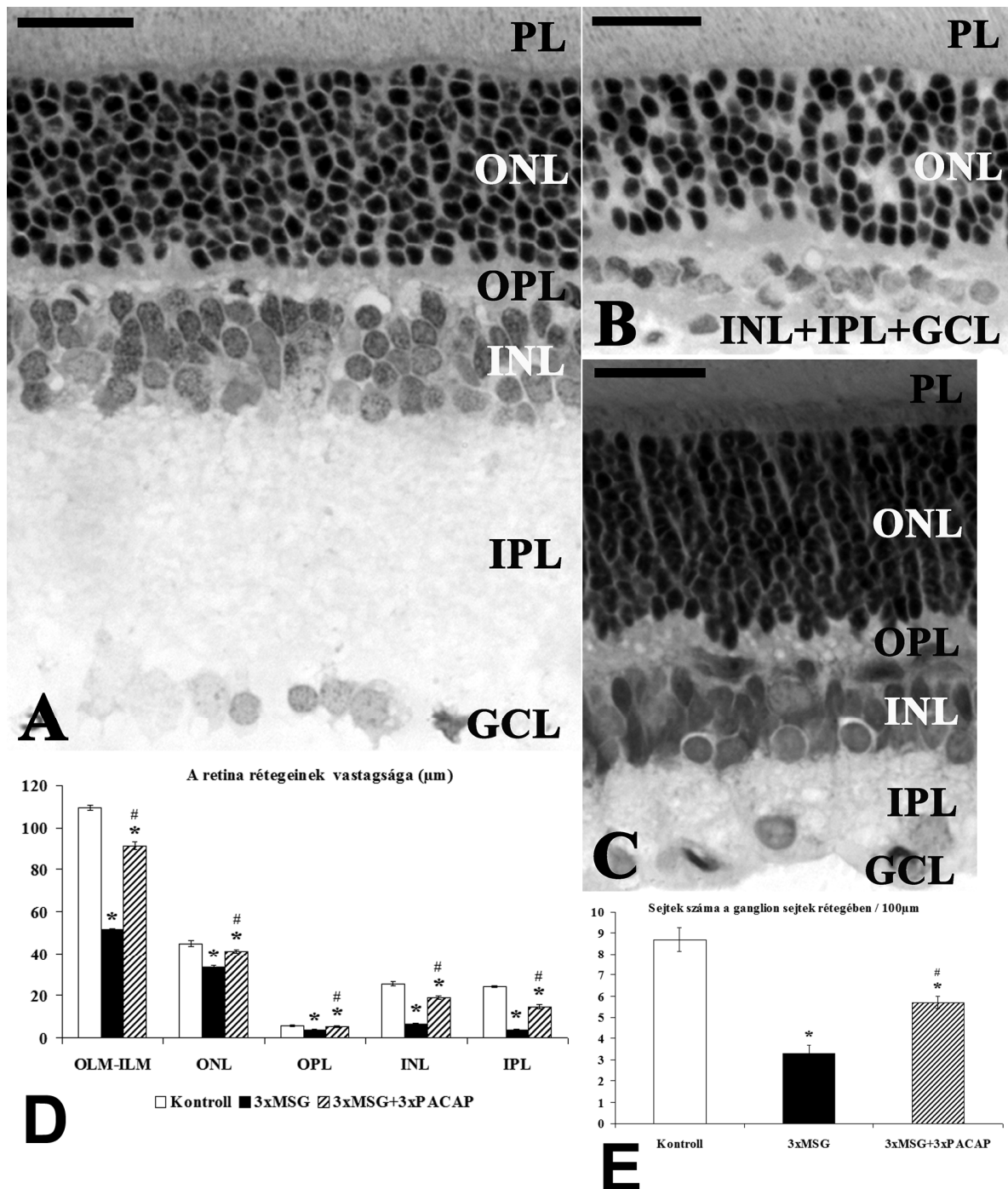
4.1.1. Szövettan

A kontroll metszeteken standard szövettani technikákat alkalmazva az emlős retina jellegzetes rétegei jól látszóttak: fotoreceptorok rétege (stratum photosensorium retinae; photoreceptor layer, PL), külső magvas réteg (stratum granulosum externum; outer nuclear layer, ONL), külső fonatos vagy szinaptikus réteg (stratum plexiforme externum; outer plexiform layer, OPL), belső magvas réteg (stratum granulosum internum; inner nuclear layer, INL), belső szinaptikus réteg (stratum plexiforme internum; inner plexiform layer, IPL) valamint a ganglionsejtek rétege (stratum ganglionare; ganglion cell layer, GCL; 5a. ábra). A kontroll állatokhoz viszonyítva a háromszori MSG kezelésnek kitett patkányok retinájának teljes vastagsága szignifikánsan lecsökkent, és a teljes belső retina szignifikáns károkat szenvedett. A IPL szinte teljes eltűnése mellett az INL és GCL rétegek összeolvadását figyelhettük meg metszeteken (5b. ábra). A degeneráció számos jele – sejtest-alakú üres helyek – is megfigyelhető volt a magvas rétegekben (ONL és INL). A belső és külső membrana limitans közötti távolság a normál retinákban mérhető 47 %-ára esett (5d. ábra). Minden retinális réteg jelentősen csökkent (ONL = 75 %, OPL = 66 %, INL = 26 %, IPL = 15 %; 4d. ábra). A ganglion sejtek rétegében a 100 μm -re eső sejtszám körülbelül 38 %-ra csökkent (5e. ábra).

Korábbi megfigyelésekkel megegyezően (Babai és mtsai., 2005) eredményeink szerint az MSG-indukálta súlyos retinadegeneráció (5b. ábra) enyhíthető háromszori PACAP-kezeléssel (5c. ábra). A PACAP háromszori intravitrealis injekciója szignifikáns javulást okozott a retinális rétegekben (ONL = 89 %, OPL = 95 %, INL = 74 %, IPL = 60 %; 5d. ábra). Az IPL látható maradt, az INL és GCL mindenütt jól elkülönült (5c. ábra). A GCL-ben a sejtszám szignifikánsan magasabbnak (65 %) bizonyult, mint a csak MSG-kezelt retinákban (5e. ábra).

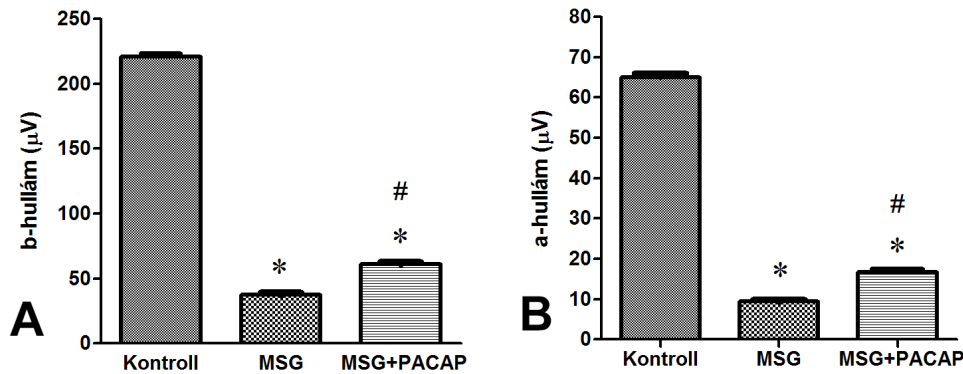
4.1.2. Elektroretinográfia

A szkotopikus b-hullám a mezőpotenciál mutatója, amely elsősorban a pálcika-bipoláris sejtekből származik fényfelvillanásra adott válaszként. A 6. ábrán kontroll, MSG-kezelt és MSG+PACAP-kezelt állatok szkotopikus b-hulláma látható. A b-hullámok amplitúdóját mértük: a kezelés nélküli kontroll állatok b-hulláma $220,9 \pm 19,5 \mu\text{V}$ -nak



5. ábra: Reprezentatív szövettani fotók, rétegvastagságok és ganglionsejt-számok. A: kontroll retina. B: 3xMSG kezelés retinakárosodást okozott. C: A 3xPACAP kezelés csökkentette a 3xMSG kezelés által kiváltott károsodást. Lépték = 20 µm. D: A retinavastagság (OLM-ILM) és az egyes rétegek vastagságának változása a kezelési csoportokban. E: A sejtek darabszáma/100 µm a GCL-ben. *= $p < 0,05$ vs kontroll. # = $p < 0,05$ MSG vs. MSG+PACAP. A rétegek rövidítését lásd a szövegben.

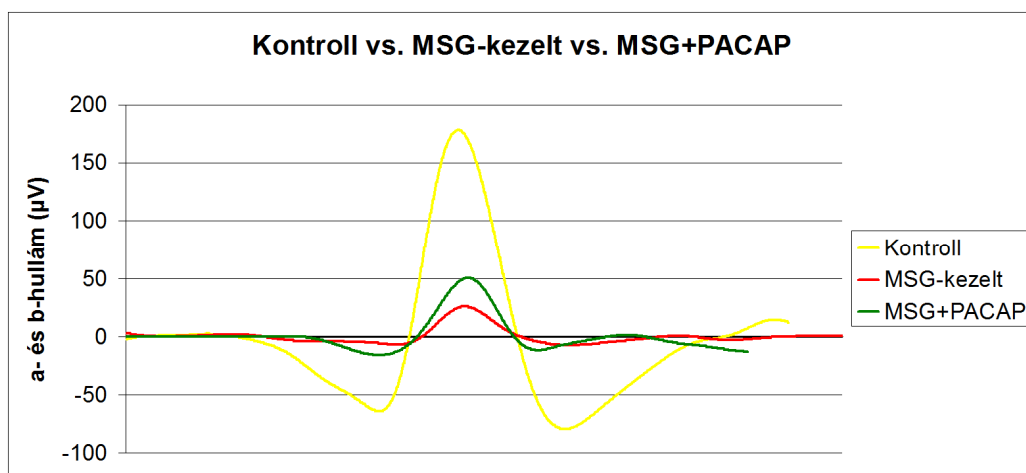
bizonyult, míg MSG-kezelés hatására ez az érték $37,76 \pm 8,3 \mu\text{V}$ -ra csökkent le. Az intravitreális PACAP-kezelés protektív hatású volt MSG-indukálta károsodás ellen és a b-hullámok amplitúdója $60,9 \pm 12,0 \mu\text{V}$ -ra emelkedett (6A. ábra).



6. ábra: Az a- és b-hullámok ERG amplitúdóinak átlagértéke (\pm SEM) a különböző kezelési csoportokban. *= $p < 0,05$ vs. kontroll; # = $p < 0,05$ vs. MSG

Annak érdekében, hogy közvetlenül is jellemezhessük a pálcika fotoreceptorok működését, az elektroretinogram szkotopikus a-hullámát is mértük, mely szinte kizárólagosan a pálcika fotoreceptorokból ered. A 6B. ábra egy erős fényfelvillanásra adott választ, a maximális szkotopikus választ mutatja. A kontroll állatok szemének a-hullám amplitúdó értékei ($65,0 \pm 6,0 \mu\text{V}$) MSG-kezelés hatására $9,4 \pm 3,0 \mu\text{V}$ -ra csökkentek.

A PACAP protektív hatása az a-hullámok amplitúdójának $16,8 \pm 6,0 \mu\text{V}$ -ra történt növekedésében jelentkezett. Jellegzetes ERG hullámformák láthatók a 7. ábrán kontroll,



7. ábra: A különböző kezelési csoportok reprezentatív ERG görbéi

MSG-kezelt és MSG+PACAP-kezelt retinákból. Az ERG hullámok legyengültek MSG-kezelés hatására, mely így az a- és b-hullámok amplitúdójának változásában is jelentkezett. A PACAP-kezelés enyhítette az MSG-indukált funkcionális változásokat, mely az MSG-kezelt és az MSG+PACAP-kezelt retinák között enyhe, de szignifikáns különbségként jelentkezett. A fotopikus a- és b-hullámok tekintetében nem volt statisztikailag szignifikáns különbség az MSG- és PACAP-kezelt csoportok között (fel nem tüntetett adatok).

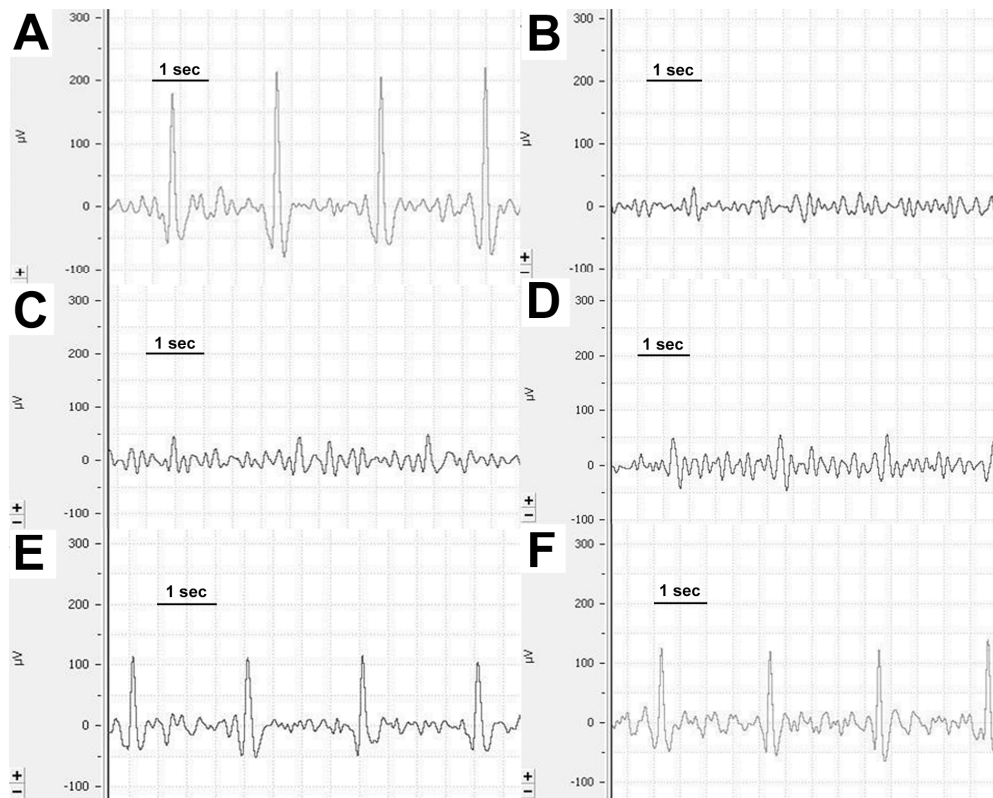
4.2. Az MSH-kísérlet I. fázisának eredményei

4.2.1. Optimális α -MSH-dózis meghatározása elektroretinográfiával

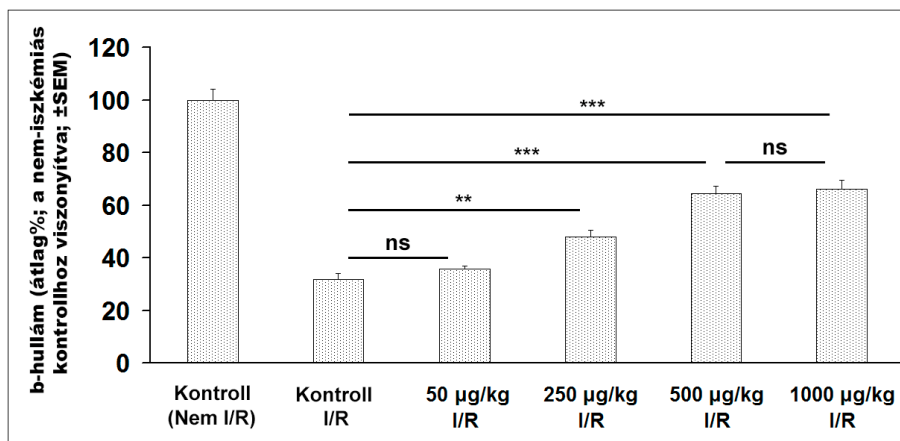
Az 8. ábra az I.fázisban megfigyelt ERG tüskék időbeni lefutását és tényleges feszültségértékeit mutatja, míg az összes iszkémiás b-hullám átlagértékeit a nem-iszkémiás kontrollhoz viszonyítva, százalékokban kifejezve a 9. ábrán láthatjuk. A nem-iszkémiás értékek között szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető (fel nem tüntetett adatok). A szkotopikus a-hullámokat, valamint a fotopikus a- és b-hullámokat az MSH-val végzett kísérletsorozatban nem vizsgáltuk, ez egy következő kísérlet témáját képezheti.

Az ERG b-hullámok mérésével megállapíthatóan az I/R-károsodás a retina funkcióját 31,64 %-ra csökkentette a kontroll állatok nem-iszkémiás szeméhez viszonyítva (9. ábra). Az α -MSH-kezelés a retinafunkciót az állatok I/R-károsodott szemében dózisfüggően akár a nem-iszkémiás kontroll 66,18 %-ára is feljavította, mely szignifikáns eredményt az 1000 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ α -MSH-val kezelt állatok I/R-károsodott szemén mértük ($p < 0,001$ vs. kontroll I/R). Az iszkémia-reperfúziós retinakárosodás olyan súlyosnak bizonyult, hogy az α -MSH-kezelés nem volt képes teljesen helyreállítani a szövet működését a normál szintre. Továbbá a szöveti működést jelző funkcionális paraméterek dózisfüggő javulása tetőzött 1000 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ -os dózisonál, melyen túl vélhetően elhanyagolható további javulás volna megfigyelhető.

A jelen kísérlet alapján meghatározott optimális, hatékony dózis 500 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ α -MSH lett. Az ERG b-hullámokon az α -MSH-kezelés mérhető hatásai már olyan kis dózisban is megfigyelhetők voltak, mint 50 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ (a nem-iszkémiás kontroll értékek 35,64 %-a), jóllehet a javulás mértéke statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ezen dózis esetén, csak magasabb dózisok esetén, mint például 250 (48,00 %, $p < 0,001$ vs. kontroll I/R) és 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -os dózisonál (64,36 %, $p < 0,001$ vs. kontroll I/R). Az 1000 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ -os dózissal való kezelés szignifikáns protektív hatást közvetített, de mivel az 500 és



8. ábra: Elektroretinogramok. A: nem-iszkémiás kontroll; B: kontroll I/R; C: 50 µg/kg α-MSH I/R; D: 250 µg/kg α-MSH I/R; E: 500 µg/kg α-MSH I/R; F: 1000 µg/kg α-MSH I/R.



9. ábra: A különböző kezelési csoportok ERG b-hullámainak átlag-amplitúdói a nem-iszkémiás kontroll csoport százalékában kifejezve + SEM. A vízszintes vonalak összehasonlítást jelölnek. Az összehasonlítások szignifikanciája: ns = nem szignifikáns, * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

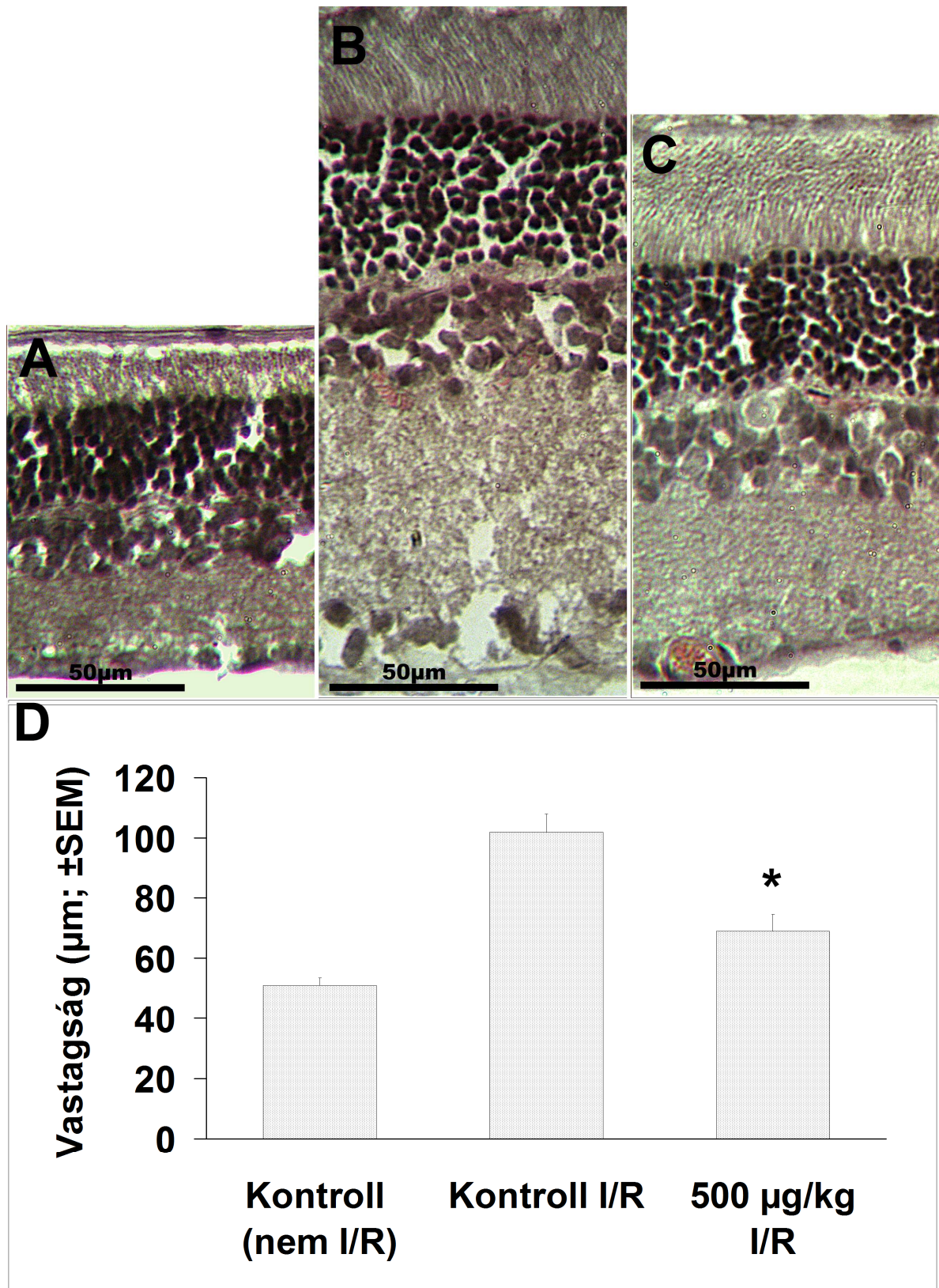
1000 µg/ttkg-os kezelések eredményei között nem volt statisztikailag szignifikáns javulás megfigyelhető (64,36 % vs. 66,18 %), az 500 µg/ttkg-os dózist elégségesnek és feltehetően optimálisnak ítéltük meg az I/R-kiváltotta retinális károsodás kivédésére.

4.2.2. Szövettani eredmények

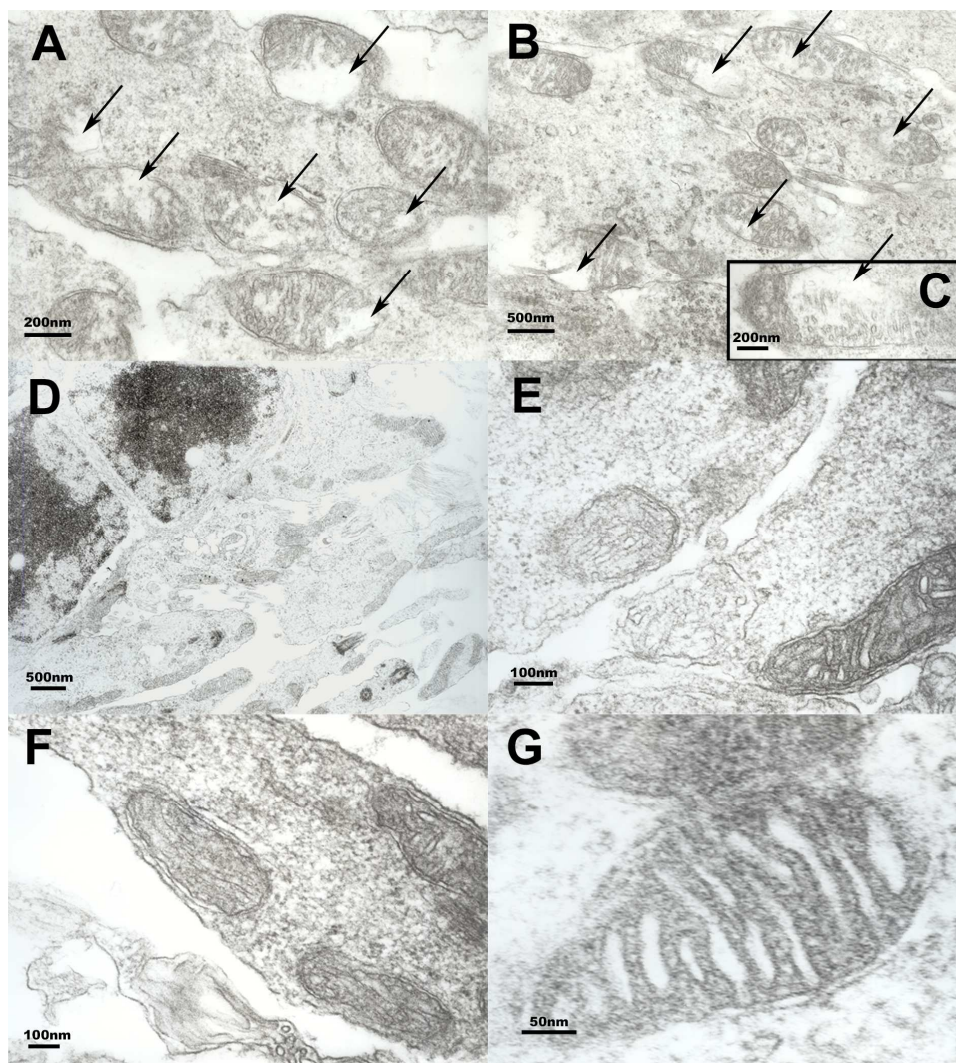
A 10-es ábra jól illusztrálja, hogy a retina rétegei megvastagodtak az I/R-indukálta intersticiális ödéma képződés miatt, mely hatás jól látható a 10A. ábra – nem-iszkémiás kontroll retina metszet, ahol nincs nyoma szöveti károsodásnak – 10B. ábrával – I/R-károsodott retinaszövet α -MSH-val nem kezelt patkányokból – való összehasonlításával. Az 500 µg/ttkg-os α -MSH kezelés hatásai a 10C. ábrán látható, mely a hormon azon képességét mutatja, hogy az I/R-indukált károsodás kialakulását gátolja, elsődlegesen a retinális ödémát és a következményes vastagodást. Az I/R károsodás és az α -MSH retinális vastagodásra gyakorolt relatív hatásait mutatja a 10D. ábra. A kontroll és a kezelt nem-I/R értékek között szignifikáns különbségek nem voltak megfigyelhetők (fel nem tüntetett adatok).

4.2.3. Elektronmikroszkópos eredmények

A retinális sejtek mitokondriumanak I/R-kiváltotta károsodása jól kivehető volt (11. ábra). A 11A-C ábrák kontroll állatokból származó I/R-károsodott retinaszövet sejtjeinek mitokondriumait mutatja. Ezek a képek a mitokondriumok belső vakuolumok képződése miatti szétesését mutatják. Ezzel szemben az 500 µg/ttkg-os α -MSH-val kezelt állatokból származó I/R-károsodott retina sejtjeinek mitokondriumai érintetlenek maradtak (11D-G ábra). A külső retinális rétegek sejtjeiben iszkémia-reperfúziót követően a retinális pigment sejtek és a fotoreceptorok elektronmikroszkópos ultrastruktúrájában morfológiai elváltozások kevésbé voltak jellemzők (fel nem tüntetett adatok). A kontroll és kezelt nem-I/R ultrastruktúrák között szignifikáns különbségek nem voltak megfigyelhetők (fel nem tüntetett adatok).



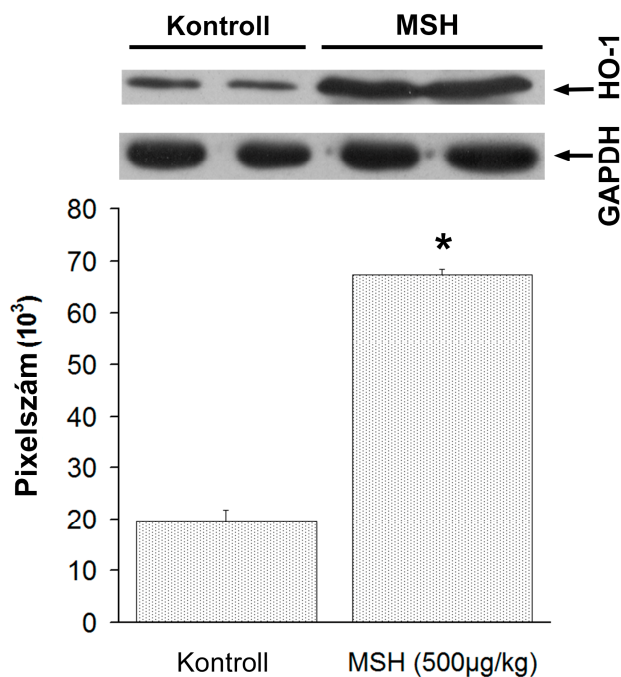
10. ábra: Reprezentatív szövettani fotók és rétegvastagságok. A: nem iszkémiás kontroll; B: I/R kontroll; C: I/R 500 µg/kg α-MSH; D: Az INL-IPL vastagságának változása a kezelési csoportokban, Átlag + SEM, * p<0,05 vs Kontroll I/R



11. ábra: Elektronmikroszkópos felvételek. Mitokondriumok kezeletlen (A, B és C) és 500 µg/kg α-MSH-kezelt (D, E, F és G) állatok I/R károsodott belső retinális sejtjeiben; nyilak: vakuolumok a károsodott mitokondriumokban.

4.2.4. Western blot Analízis

A hemoxigenáz 1 enzim expresszióját a szem szöveteiből végzett Western blot analízis volt hivatott feltárni, mely szerint az 500 µg/ttkg-os α-MSH-val kezelt állatokból származó I/R-károsodott szemből szignifikánsan nagyobb HO-1 fehérje mennyiség volt jelen, mint a vivőanyag kezelt patkányokból származóakban ($p < 0,05$). Ezen kísérletek eredményei a 12-es ábrán láthatóak. A kontroll és kezelt nem-I/R értékek között nem voltak szignifikáns különbségek (fel nem tüntetett adatok).



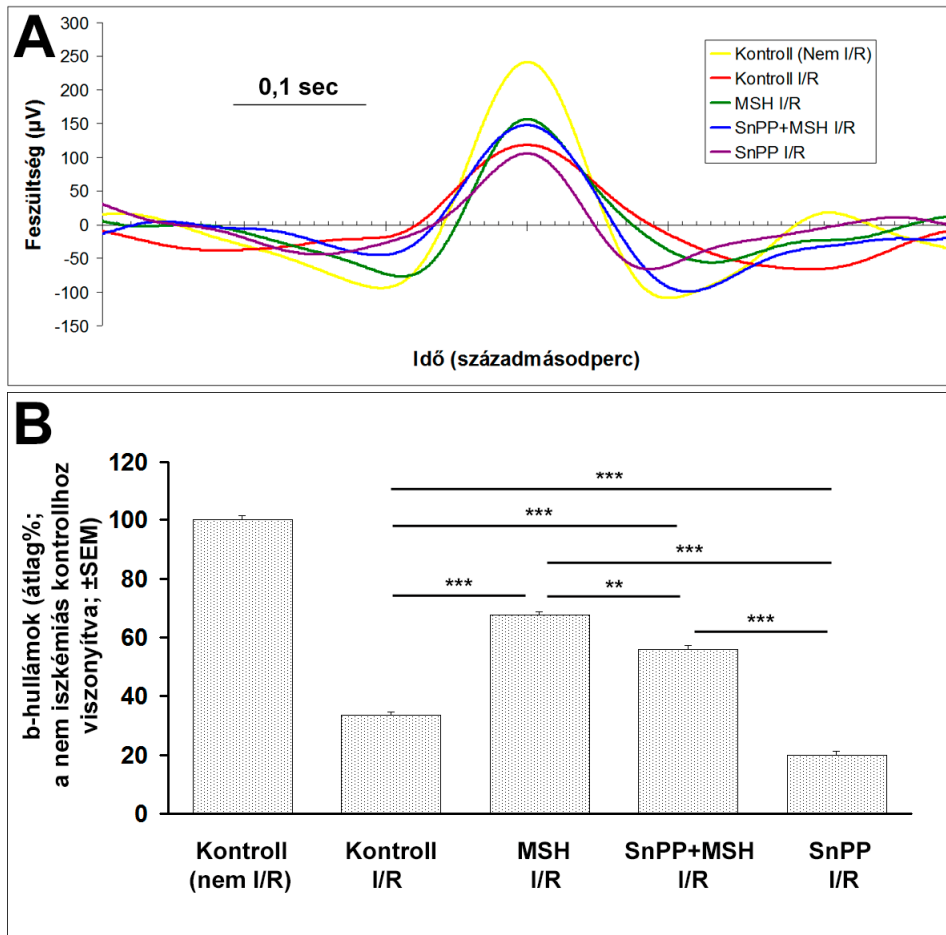
12. ábra: Western Blot eredmények. Pixelszámok + SEM * $p < 0,05$

A négy minta 2-2 párhuzamos mérést jelent. "Loading" kontrollként GAPDH fehérjét használtunk.

4.3. Az MSH-kísérlet II. fázisának eredményei

4.3.1. Elektroretinográfia

Az MSH II. fázis ERG-vizsgálatainak kimenetele a 13. ábrán látható. A 13A ábrán mind a négy kezelési csoport egy-egy reprezentatív iszkémiás ERG tüskéje van feltüntetve a II. fázis kísérletekben megfigyelt ERG-tüskék tényleges feszültség szintjei és az időbeni lefutásának bemutatása mellett. Az ERG-eredményekből az egyes kezelések retinális integritásra való hatásában három fő irányvonal látható: a 13. ábra adatai azt mutatják, hogy a nem-iszkémiás retinákban felvett hullámformákhoz képest (nem-iszkémiás kontroll), az I/R-károsodás és az SnPP-kiváltotta HO-1 gátlás csökkentette a hullámok amplitúdóját és megváltoztatta a hullámformák karakterisztikáját oly módon, amely a csökkent retina-funkció jelzője. Ezzel szemben az 500 µg/ttkg-os α -MSH-kezelés a retinális válaszokat a javuló retinális funkció irányába tolta el. Az SnPP-kezelés az α -MSH-val együtt adva csökkentette, de nem szüntette meg teljesen az α -MSH protektív hatását.



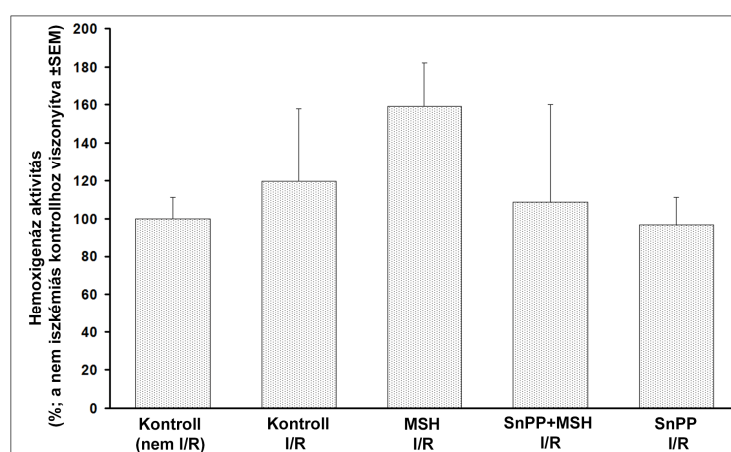
13. ábra: Reprezentatív ERG hullámformák µV-ban (A) és a különböző kezelési csoportok ERG b-hullámainak átlag-amplitúdói a nem-iszkémiás kontroll csoport százalékában kifejezve + SEM (B). A vízszintes vonalak összehasonlítást jelölnek. Az összehasonlítások szignifikanciája: ns = nem szignifikáns, * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

A retinális I/R-károsodás és a poszt-iszkémiás kezelés hatásai még szembevetőbbek a 13B ábrán, ahol az ERG eredmények oszlopdigramként vannak feltüntetve. Látható, hogy a b-hullámok nem-iszkémiás kontrollhoz viszonyított százalékos átlaga (vagyis a poszt-iszkémiás kezelés hatása) a nem-iszkémiás kontroll 67,69 %-ának adódott a 500 µg/ttkg-os α-MSH-val kezelt állatok esetében (p<0,001 vs. kontroll I/R). Ez az érték kissé magasabb is az I. fázisban mérténél, ami 64,36 % volt (p<0,001 vs. kontroll I/R; lásd 9. ábra). A vivőanyag-kezelt patkányok I/R-károsodott retináiban a b-hullámok nem-iszkémiás kontrollhoz viszonyított százalékos átlaga 33,44 %-nak bizonyult. A 9. és a 13B ábra a I/R-károsodott retinákban mért b-hullámok százalékos arányának könnyű

összehasonlítását teszi lehetővé az I-es és a II-es fázis vivőanyag kezelt és 500 µg/ttkg-os α-MSH-kezelt csoportjai között. Az SnPP-kezelt I/R-károsodott állatcsoport b-hullámainak nem-iszkémiás kontrollhoz viszonyított százalékos aránya 19,76 %-nak bizonyult ($p < 0,001$ vs. kontroll I/R). A kettős kezelés (SnPP+MSH) szignifikánsan csökkentette a b-hullám-százalékokat a csak MSH-val kezeléshez képest (55,77 % vs. 67,69 %; $p < 0,01$). Ugyanakkor az SnPP+MSH-kezelt I/R retinák százaléka szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a csak SnPP-kezelés esetében (55,77 % vs 19,76 %; $p < 0,001$). A kontroll és kezelt nem iszkémiás értékek között nem volt szignifikáns különbség (fel nem tüntetett adatok).

4.3.2. A hemoxigenáz-aktivitásmérés eredményei

A II. fázisban a patkányok szem szöveteiből kivitelezett hemoxigenáz aktivitásmérés eredményei a 14. ábrán láthatóak. A szöveti hemoxigenáz aktivitás I/R hatására szignifikánsan megemelkedett (a nem-iszkémiás kontroll 119,56 %-ára), és 500 µg/ttkg-os α-MSH-kezelés hatására tovább emelkedett (159,42 %). Utóbbi hatást megszüntette az α-MSH-val együtt adott HO-1 gátló SnPP (108,77 %). Ugyanakkor kis különbség volt megfigyelhető az SnPP+MSH- és a csak SnPP-kezelt csoportok között (108,77 vs 96,60 %, az említés sorrendjében). Mindazonáltal a hemoxigenáz aktivitásmérés olyan nagyfokú szórást mutat, mely az adatok statisztikai kiértékelését ellehetetleníti. A kontroll és a kezelt nem-I/R értékek között nem volt szignifikáns különbség (fel nem tüntetett adatok).



14. ábra: A nem-iszkémiás kontrollhoz viszonyított hemoxigenáz aktivitásmérési eredmények +SEM

5. Megbeszélés

Számos szemészeti betegség hátterében az iszkémiás retinakárosodás áll. Munkacsoportunk ezért célul tűzte ki maga elé, hogy a retina funkciójának mérésére egy megbízható, reprodukálható elektrofiziológiai módszert alkalmazzon, az elektroretinográfiát. Az ERG eredmények összhangban állnak az állatok retinájának tényleges állapotával, retinális károsodás esetén a retina mérhető, csökkent funkciója pedig korrelál a retina szövettani károsodásával.

Felvetődött, hogy a szövettanilag már bizonyítottan retinakárosító nátrium-glutamát (MSG), vajon funkcionális romlást is okoz-e, valamint, hogy az ezt a károsodást strukturálisan kivédeni képes, retinoprotektív PACAP a retina funkcióját is javítja-e. Kísérletünkben bizonyítottuk, hogy az intravitreális PACAP-kezelés szignifikáns funkcionális javulást váltott ki MSG-indukált retinakárosodásban (6. és 7. ábra). Számos kísérletben vizsgáltak már lehetséges retinoprotektív stratégiákat mind morfológiai, mind funkcionális szempontból. A károsodás mértéke és a morfológiai retina védelem gyakran összhangban van a funkcionális javulással (Tanito és mtsai., 2007; Jehle és mtsai., 2008; Soudry és mtsai., 2009). A fibroblaszt növekedési faktorról például bebizonyosodott, hogy serkenti a morfológiai és a hozzátartozó ERG javulást is retinakárosodásban (Chen és mtsai., 1998). Mindazonáltal, a funkcionális mérések nem mindig követik a szövettani eredményeket legyen akár szó humán vizsgálatról vagy állatkísérletekről (Sun és mtsai., 2007; North és mtsai., 2010). Még paradox hatások is ismertek az irodalomból, mint például a ciliáris neurotróp faktor esetében, amely bár csökkenti az ERG-hullámokat, mégis elősegíti a fotoreceptorok túlélését (Wen és mtsai., 2006). Kísérleteink eredményei azt bizonyítják, hogy a PACAP-kezelés igen jelentős morfológiai változásokhoz vezet az MSG-kezelt patkányok retinájában (5. ábra). A funkcionális kimenetel – bár kisebb mértékben – úgyszint szignifikánsan javult PACAP-kezelés után (6. és 7. ábra).

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a szkotopikus hullámokban MSG-kezelés hatására történt változásokat a PACAP részben ellensúlyozta: a PACAP-által okozott javulás mind az a-, mind a b-hullámokon megfigyelhető volt, amelyek rendre a fotoreceptorok és a belső retinális sejtek működését jellemzik (6. és 7. ábra). A glutamát serkentő szinaptikus transzmissziót közvetít a fotoreceptorok és bipoláris sejtek, valamint a bipoláris és ganglion sejtek között (Ehinger és mtsai., 1988). Az MSG-kezelés nagyon súlyos károsodásokat okozott a belső retinában valamint a fotoreceptor-réteget is károsította. A glutamát excitotoxicitást, melyet a magas glutamát koncentráció vált ki,

vélhetően mind közvetlen, mind közvetett mechanizmusok okozzák a glutamát receptorsűrűségtől függően (Sarantis és mtsai., 1988; Hare és Owen, 1992; Muller és mtsai., 1992; Hamassaki-Britto és mtsai., 1993; Brandstatter és mtsai., 1998). Számos kísérlet mutatta már be a glutamát receptorok eloszlását a retinában, melyek alapján a belső retinális sejtekben magas koncentrációban fordulnak elő (Brandstatter és mtsai., 1998). Ez megmagyarázhatja a belső retina magas sérülékenységét, melyet mi is tapasztaltunk. Korábbi tanulmányokban, ahol a patkányok retináit újszülöttkori MSG kezelés után 3 hónapos korukban szövettanilag elemezték, a súlyos belső retinális károsodás látszólag érintetlen fotoreceptor-réteggel jelentkezett (Tamas és mtsai., 2004; Babai és mtsai., 2005). Jelen kísérlet elektroretinográfiás méréseinek tanulsága szerint azonban fotoreceptor réteg funkcionálisan károsodott, melyet az a-hullámok csökkenése jelzett: a fotoreceptorok jeltovábbításának hosszútávú károsodásával a fotoreceptorok maguk is károsodnak.

A PACAP-kezelés enyhíteni tudta az MSG-indukálta változásokat mind morfológiai (5. ábra), mind funkcionális szinten (6. és 7. ábra). A PACAP különböző a retinára és a retinális útvonalakra gyakorolt hatásai ismertek (Babai és mtsai., 2005; 2006; Atlasz és mtsai., 2007; 2008; 2009). A PACAP minden belső retinális sejtréteget megvédett egy korábbi, a PAC1 receptor retinán belüli eloszlását tárgyaló cikkel összhangban (Seki és mtsai., 2000). Habár a funkcionális javulás enyhébb volt, mint a morfológiai, jelen megfigyeléseink klinikai szempontból fontosak, mivel elsőként mutatják be, hogy a PACAP képes javítani a retina működését excitotoxikus sérülés esetén. Továbbá kísérletes szempontból is előremutatóak az eredmények: a funkcionális változás összecseng a morfológiai, szövettani változásokkal.

Munkacsoportunk egy korábbi cikke alapján (Vecsernyes és mtsai., 2003) a melanocita-stimuláló hormon alfa-típusa (α -MSH) képes a szívizom iszkémia-reperfúziós károsodását csökkenteni. Felvetődött, hogy vajon a sok más szövetben – agy (Forslin Aronsson és mtsai., 2006), vese (Chiao és mtsai., 1997), bőr (Kokot és mtsai., 2009), emésztő rendszer (Zou és mtsai., 2003) – is leírt I/R elleni védelem megvalósul-e a szem szövetében is szisztémásan adagolva a hormont.

Az MSH-kísérlet I. fázisában az α -MSH azon hatását vizsgáltuk, hogy képes-e védelmet nyújtani I/R-indukálta retinakárosodással szemben. Ezekben a vizsgálatokban az α -MSH szignifikánsan megőrizte a I/R-nek kitett szem funkcióit. Erre bizonyítékot az ERG-vizsgálat szolgáltatott, mely bemutatta, hogy az I/R-károsodott retina b-hullámainak amplitúdója α -MSH-dózisfüggően emelkedett (8. és 9. ábra). Ezzel bizonyítást nyert, hogy

az α -MSH védelmet biztosít a retinának I/R-károsodással szemben. Az előbb említett eredmények összefüggésben állnak más szerzők cikkeivel a hatás háttérében álló HO-1 upreguláció tekintetében is: egy 2013-as cikk, mely egy növényi polifenolos vegyületnek, a rezveratrolnak a magas szemelnyomás miatt kialakuló retinális iszkémia elleni védő hatásáról számol be, az ERG b-hullám amplitúdóját növelő hatás háttérében HO-1 upregulációt nevez meg, mint jelentős hatásmechanizmust (Liu és mtsai., 2013). Mi szintén azt tapasztaltuk, hogy a HO-1 expresszió α -MSH hatására szignifikánsan megemelkedett (12. ábra), vagyis ez a folyamat az α -MSH hatásmechanizmusának is része lehet. A HO-1 expresszió növekedése α -MSH hatására – melyet mi most retinában igazoltunk – más szövetekben is bizonyított (Zou és mtsai., 2003; Lam és mtsai., 2005; Kokot és mtsai., 2009).

A HO-1 expressziója sérült szövetben egy igen megőrzött, magasan konzervált adaptív válasz, mely számos szövetben és élőlényben megfigyelhető (Haines és mtsai., 2012). Munkacsoportunk korábbi munkájában ezen enzim terápiás lehetőségeit próbálta kihasználni és bemutatta, hogy a HO-1 upregulációja egy serkentő anyag által igen erős terápiás hatást képes *in vivo* kiváltani (Bak és mtsai., 2006; 2011), mely a HO-1-et upreguláló hatóanyagok lehetséges klinikai felhasználását még jobban alátámasztja.

A HO-1 expressziója stresszorok széles skálájára megnövekszik, mint például oxidatív és gyulladós bántalmak miatt (Haines és mtsai., 2012) csakúgy, mint olyan metabolikus és hemodinámiás faktorok következtében, mint a magas vércukorszint (Mahmoud és mtsai., 2013). Ugyanakkor a legtöbb esetben a HO-1 patofiziológiás aktivációja csak átmeneti vagy csekély HO-1 aktivitás-növekedést eredményez, mely nem éri el azt a küszöbszintet, ami szükséges volna a HO-jelátvitelrendszer további downstream összetevőinek olyan szintű aktiválására, hogy az a súlyos gyulladós kórképek szignifikáns remisszióját eredményezze (Mahmoud és mtsai., 2013). Azok a kezelési stratégiák, melyek a HO-1-et kifejezetten retinopátiák és más betegségek megelőzésére vagy kezelésére kívánják alkalmazni, várhatóan egyre növekvő mértékben vesznek igénybe olyan gyógyszeres hatóanyagokat, melyek képesek ezen enzim expresszióját és aktivitását növelni. Munkacsoportunk korábban már bemutatta, hogy például a meggy-mag kivonat is képes ilyen módon megvédeni a retinát az I/R károsodástól *in vivo* a HO-1 aktiválásán keresztül (Szabo és mtsai., 2004). Jelen vizsgálat Western blot eredményei pedig úgyszintén szignifikánsan megnövekedett HO-1 expressziót mutattak az 500 μ g/ttkg α -MSH-val kezelt patkányok I/R károsodott szemének retinaszövetében a vivőanyagkezelt állatok I/R-t elszenvedett szemének enzimexpressziójához képest (12. ábra), mely arra

enged következtetni, hogy az α -MSH alkalmazása jelentősen felerősíthet egy vele egyidejűleg zajló patofiziológiai HO-1 upregulációt, vagyis kezelési stratégia lehet.

A retina szövettani vizsgálata során kiderült, hogy az α -MSH-kezelt állatok szignifikánsan csökkent mértékű ödémát mutattak I/R sérülés következtében (10. ábra). Ez a megállapítás a HO-1 retinális ödéma elleni védelemben betöltött szerepe szempontjából is jelentős. A kapott eredmények hozzájárulnak új, retinális ödémát csökkentő stratégiák kifejlesztéséhez szemészeti rendellenességekben.

Kísérletsorozatunk elektronmikroszkópiai igazolását adta annak, hogy az α -MSH a belső retinális sejtekben az I/R-indukálta mitokondriális károsodásokat csökkenti a sejtalkotók szintjén, mely szintén egy új eredmény (11. ábra).

Az α -MSH tehát egy hatékony retinoprotektív szer lehet iszkémiás retinakárosodásban. Felmerült azonban a kérdés, hogy vajon a HO-1 enzim mennyire fontos, esetleg kizárólagos szerepet játszik-e az α -MSH hatásában.

Azt is meg kívántuk vizsgálni, hogy az α -MSH-nak van-e posztisztkémiás hatása, mellyel munkacsoportunk egy feltevésére is, ha nem is közvetlenül, de legalább indirekt módon választ kívántunk adni: hipotézisünk az volt, hogy az evolúció egy korábbi szakaszában az α -MSH esetleg stressz hatására felszabaduló, ún. stressz-hormonként viselkedhetett. Az állatvilágban ma is megfigyelhető a rejtőzködő szín használata, melynek egészen különleges formája – például a kaméleon esetében – a bőr színének változtatása. A bőrszín stresszre való gyors változtatása nemcsak kaméleonok, de polipok, szépiák, békák, halak esetében is ismert (Stuart-Fox és mtsai., 2008). Definíció szerint stressznek nevezünk minden olyan hatást, amelynek következtében a hipotalamuszban CRH szabadul fel (Magyar és Petrányi, 1977), ennek következtében pedig a proopiomelanocortin prekuzort enzimek hasítják, mely útvonalon képződhet α -MSH is. A melanocita stimuláló hormon alfa – nevéből adódóan – a bőr pigmentációjában fontos szerepet vállaló melanocitákat serkenti, mely összefüggésben áll a bőr színének változtatásával (Camargo és mtsai., 1999), mint védekező magatartással. Vagyis abból a két tényállásból, hogy stresszre egyes állatok színváltozással reagálnak valamint, hogy a színváltozáshoz α -MSH kell, logikailag az következik, hogy stressz hatására α -MSH kell felszabaduljon. Így joggal merülhet fel a kérdés, hogy vajon az α -MSH-nak szerepe lehet-e másfajta protektív, stresszre adott válaszban. Tovább követve ezt a logikai szálát, az iszkémia-reperfúziós károsodás egy stressz hatás, mely ellen az α -MSH előkezelés formájában protektív hatásúnak bizonyult az I. fázis kísérletei szerint. Ezek alapján felvetődött, hogy utókezelés formájában (mintha stresszt követően szabadult volna fel a szervezetben) vajon protektív-e az α -MSH?

Az MSH-kísérlet II. fázisában végzett elektroretinográfiás mérések eredményei azt mutatták, hogy a hullámformák amplitúdója, mely az egészséges retinafunkció függvénye, iszkémia-reperfúziós károsodások hatására csökkent, míg posztiszkémiás α -MSH kezelés hatására megnövekedett (13. ábra). Ebből az a következtetés vonható le, hogy az α -MSH iszkémia után adagolva is képes a retina funkciót javítani, vagyis képes az iszkémiás esemény bekövetkezése után is kifejtteni retinoprotektív hatását. Az irodalomban más szövetekkel kapcsolatban is írtak már le hasonló, posztiszkémiás α -MSH-hatást: agyi, mezenteriális valamint vese-iszkémiában is ismert ez a jelenség (Chiao és mtsai., 1997; Zou és mtsai., 2003; Giuliani és mtsai., 2007), viszont retina-iszkémiában mi írtuk le a jelenséget először.

Másik fontos eredményünk, hogy a HO-1 gátló SnPP-vel és α -MSH-val egyszerre kezelt patkányok retinája csökkent ERG hullám-amplitúdót mutatott, mely azt jelenti, hogy az α -MSH hatásában szerepet kell játszania HO-1 mediált szignáltranszdukciós útvonalnak. Az SnPP-kezelés azonban nem szüntette meg teljesen az α -MSH hatását, ami viszont arra enged következtetni, hogy az α -MSH hatásmechanizmusában nem csak a HO-1 játszik szerepet. A HO-1 aktivitás korrelált az ERG hullámformák amplitúdójával: a HO-1 aktivitás az α -MSH adagolással összefüggve emelkedett, míg az SnPP kezelés hatására az α -MSH HO-1 aktivitásnövelő hatása csökkent, de nem szűnt meg. Így ismét ugyanarra a következtetésre juthatunk: a HO-1 aktivitás összefügg az α -MSH terápiás hatásával, de nem kizárólagos komponense annak.

A hemoxigenáz aktivitásmérés nagyfokú szórása technikai okokra is visszavezethető. Az adatok statisztikai kiértékelését ellehetetlenítő szórás azért lehetett magas, mert míg az első kísérleti fázisban 90 perc iszkémiát alkalmaztunk a hemoxigenáz fehérje kifejeződése utáni detektálásra, addig az MSH-kísérlet második fázisában csak 30 percet. Ez az időintervallum, bár elegendő elektroretinográfiás kísérletek elvégzéséhez, a hemoxigenáz enzim upregulációjához és következményes expressziójához feltehetően nem elégséges, illetve a mi modellünkben kevésnek bizonyult. Állatetikai megfontolásokból azonban, az Európai Unió szakmai irányelveket és előírásokat követve az állatok létszámának csökkentését tartottuk szem előtt, azonban – mint az tehát a jelen kísérletünk során bebizonyosodott – az igazán megbízható eredményekhez külön állatok kellettek volna az ERG vizsgálat kivitelezéséhez és külön állatok a hemoxigenáz aktivitás vizsgálatokhoz, utóbbiak esetében 90 perces iszkémiás protokollt alkalmazva. Az aktivitásmérés eredményeinek tisztázása egy jövőbeni kutatás témája lehet.

Az α -MSH adagolása, a retina I/R-károsodásának csökkentése és a HO-1 részvétele közötti egyértelmű kölcsönös összefüggés tehát azt mutatja, hogy az α -MSH az I/R elleni védelmet legalább részben egy HO-1-függő útvonalon keresztül fejt ki. Eredményeink nem zárják ki más, mindezidáig nem azonosított, a hemoxigenáz enzimtől független mechanizmusok részleges közreműködését. Ennek a lehetőségnek a felderítése jövőbeni kutatások témáját képezi majd. A vizsgálódásoknak irányvonalat más kutatók munkája is adhat, akik bemutatták, hogy az α -MSH-nak anti-citokin aktivitása is van, továbbá gátolja a proinflammatorikus fehérjék kifejeződését, csökkenti a lázat, és modulálja a neuroimmun-aktivitást (Macaluso és mtsai., 1994; Delgado és mtsai., 1998). Jelen tanulmány elsőként mutatja be az α -MSH hatásosságát I/R-indukálta retinakárosodásban mind az iszkémiás inzultus előtt adva, mind pedig posztiszkémiásan. A hormon azon képessége, hogy egy iszkémiás periódus után adagolva is képes megvédeni a retinát, megerősíti azon feltevésünket, hogy az α -MSH expressziója egy jelentős fiziológiai ellensúly, óvintézkedés stresszorok széles spektrum ellen, mely feltehetőleg a gerincesek korai evolúciójában alakult ki és konzerválódott, mint fontos túlélési adottság, jelleg. Az a megfigyelés, hogy a posztiszkémiásan adott α -MSH azonos nagyságrendű protektív hatást vált ki, mint iszkémia előtt adva, biztató a lehetséges farmakoterápiás alkalmazása tekintetében.

6. Összefoglalás

A kutatómunkában célul tűztük ki a retinafunkció mérésére szolgáló elektoretinográfia alkalmazását. Ezzel a módszerrel sikerrel igazoltuk, hogy a PACAP MSG-indukálta retinopátia ellenes, morfológiai védő hatásának háttérében funkcionális javulás is fennáll. Ez megalapozhatja a PACAP jövőbeni gyógyászati felhasználását excitotoxikus retinakárosodásban. Az α -MSH-val végzett kísérleteink eredményei pedig igazolják azt a feltevést, hogy az α -MSH enyhíti az iszkémia/reperfúzió-indukálta retinális károsodás súlyosságát funkcionális, szöveti és sejtes szinten, valamint bizonyítékot szolgáltatnak a hormon hatásmechanizmusában a HO-1 jelentős, de nem kizárólagos részvételéről. Figyelemre méltó az α -MSH azon tulajdonsága, hogy képes visszaállítani a retinaszövet funkcióját az iszkémiás periódust követően, posztiszkémiásan alkalmazva, mely arra enged következtetni, hogy az α -MSH potenciálisan széleskörűen felhasználható lehet az I/R-mediálta patológiai állapotokban akár megelőzésként, akár kezelésként alkalmazva.

A purpose of the experimental work was to utilize electroretinography, a retinal function measurement. With the help of this method we successfully demonstrated that in the background of the morphological effect of PACAP against MSG-induced retinopathy functional amelioration also exists. This may establish a rationale for possible future use of PACAP as a therapeutic agent in excitotoxic retinal damage. The results of our experiments carried out with α -MSH justify the presumption that α -MSH ameliorates the severity of ischemia/reperfusion-induced retinal damage functionally as well as on tissue and cellular level, and provide evidence on the remarkable but not exclusive participation of HO-1 in the action mechanism of the hormone. Remarkable is the property of α -MSH to be able to restore retinal function after an ischemic period, i.e., post-ischemically applied, which leads to the conclusion that α -MSH can potentially be used in a wide range of I/R-mediated pathological conditions applied either as prevention or as treatment.

7. Irodalom

7.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom

Ádám V. (szerk.): Orvosi biokémia (2006), Medicina Könyvkiadó, ISBN: 963242767x

Adin C. A., Croker B. P. és Agarwal A. (2005) Protective effects of exogenous bilirubin on ischemia-reperfusion injury in the isolated, perfused rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 288, F778-784.

Agarwal R., Gupta S. K., Agarwal P., Saxena R. és Agrawal S. S. (2009) Current concepts in the pathophysiology of glaucoma. *Indian J Ophthalmol.* 57, 257-266.

Argiolas A. és Melis M. R. (2013) Neuropeptides and central control of sexual behaviour from the past to the present: a review. *Prog Neurobiol.* 108, 80-107.

Argiolas A., Melis M. R., Murgia S. és Schioth H. B. (2000) ACTH- and alpha-MSH-induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors. *Brain Res Bull.* 51, 425-431.

Arias C., Becerra-Garcia F. és Tapia R. (1998) Glutamic acid and Alzheimer's disease. *Neurobiology (Bp).* 6, 33-43.

Arimura A. (1998) Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol.* 48, 301-331.

Asi H. és Perlman I. (1992) Relationships between the electroretinogram a-wave, b-wave and oscillatory potentials and their application to clinical diagnosis. *Doc Ophthalmol.* 79, 125-139.

Atlasz T., Babai N., Kiss P., Reglodi D., Tamas A., Szabadfi K., Toth G., Hegyi O., Lubics

A. és Gabriel R. (2007) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *Gen Comp Endocrinol.* 153, 108-114.

Atlasz T., Szabadfi K., Kiss P., Babai N., Koszegi Z., Tamas A., Reglodi D. és Gabriel R. (2008) PACAP-mediated neuroprotection of neurochemically identified cell types in MSG-induced retinal degeneration. *J Mol Neurosci.* 36, 97-104.

Atlasz T., Szabadfi K., Reglodi D., Kiss P., Tamas A., Toth G., Molnar A., Szabo K. és Gabriel R. (2009) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its fragments on retinal degeneration induced by neonatal monosodium glutamate treatment. *Ann N Y Acad Sci.* 1163, 348-352.

Babai N., Atlasz T., Tamas A., Reglodi D., Toth G., Kiss P. és Gabriel R. (2005) Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retinal degeneration. *Neurotox Res.* 8, 227-233.

Babai N., Atlasz T., Tamas A., Reglodi D., Toth G., Kiss P. és Gabriel R. (2006) Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Ann N Y Acad Sci.* 1070, 149-155.

Bak I., Czompa A., Csepanyi E., Juhasz B., Kalantari H., Najm K., Aghel N., Varga B., Haines D. D. és Tosaki A. (2011) Evaluation of systemic and dermal toxicity and dermal photoprotection by sour cherry kernels. *Phytother Res.* 25, 1714-1720.

Bak I., Lekli I., Juhasz B., Nagy N., Varga E., Varadi J., Gesztelyi R., Szabo G., Szendrei L., Bacskay I., Vecsernyes M., Antal M., Fesus L., Boucher F., de Leiris J. és Tosaki A. (2006) Cardioprotective mechanisms of *Prunus cerasus* (sour cherry) seed extract against ischemia-reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291, H1329-1336.

Balla G., Jacob H. S., Eaton J. W., Belcher J. D. és Vercellotti G. M. (1991) Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb.* 11, 1700-1711.

Baranano D. E., Wolosker H., Bae B. I., Barrow R. K., Snyder S. H. és Ferris C. D. (2000) A mammalian iron ATPase induced by iron. *J Biol Chem.* 275, 15166-15173.

Barnett N. L., Pow D. V. és Bull N. D. (2001) Differential perturbation of neuronal and glial glutamate transport systems in retinal ischaemia. *Neurochem Int.* 39, 291-299.

Bazzani C., Guarini S., Botticelli A. R., Zaffe D., Tomasi A., Bini A., Cainazzo M. M., Ferrazza G., Mioni C. és Bertolini A. (2001) Protective effect of melanocortin peptides in rat myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 297, 1082-1087.

Ben-Ari Y. és Cossart R. (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci.* 23, 580-587.

Berk P. D., Blaschke T. F., Scharschmidt B. F., Waggoner J. G. és Berlin N. I. (1976) A new approach to quantitation of the various sources of bilirubin in man. *J Lab Clin Med.* 87, 767-780.

Boos R., Schneider H. és Wassle H. (1993) Voltage- and transmitter-gated currents of all-amacrine cells in a slice preparation of the rat retina. *J Neurosci.* 13, 2874-2888.

Brandstatter J. H., Koulen P. és Wassle H. (1998) Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res.* 38, 1385-1397.

Bringmann A., Pannicke T., Biedermann B., Francke M., Iandiev I., Grosche J., Wiedemann P., Albrecht J. és Reichenbach A. (2009) Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int.* 54, 143-160.

Brzoska T., Luger T. A., Maaser C., Abels C. és Bohm M. (2008) Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocr Rev.* 29, 581-602.

Camargo C. R., Visconti M. A. és Castrucci A. M. (1999) Physiological color change in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J Exp Zool.* 283, 160-169.

Cerda-Reverter J. M., Ling M. K., Schioth H. B. és Peter R. E. (2003) Molecular cloning, characterization and brain mapping of the melanocortin 5 receptor in the goldfish. *J Neurochem.* 87, 1354-1367.

Chen Q., Olney J. W., Lukasiewicz P. D., Almli T. és Romano C. (1998) Fenamates protect neurons against ischemic and excitotoxic injury in chick embryo retina. *Neurosci Lett.* 242, 163-166.

Cheng L. B., Cheng L., Bi H. E., Zhang Z. Q., Yao J., Zhou X. Z. és Jiang Q. (2014) Alpha-melanocyte stimulating hormone protects retinal pigment epithelium cells from oxidative stress through activation of melanocortin 1 receptor-Akt-mTOR signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 443, 447-452.

Chhajlani V. (1996) Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem Mol Biol Int.* 38, 73-80.

Chiao H., Kohda Y., McLeroy P., Craig L., Housini I. és Star R. A. (1997) Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against renal injury after ischemia in mice and rats. *J Clin Invest.* 99, 1165-1172.

Choi A. M. és Alam J. (1996) Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 15, 9-19.

Chu Z. és Hablitz J. J. (2000) Quisqualate induces an inward current via mGluR activation in neocortical pyramidal neurons. *Brain Res.* 879, 88-92.

Clark J. E., Foresti R., Sarathchandra P., Kaur H., Green C. J. és Motterlini R. (2000) Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278, H643-651.

Clements J. D., Lester R. A., Tong G., Jahr C. E. és Westbrook G. L. (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science.* 258, 1498-1501.

Cohen E. D. és Miller R. F. (1994) The role of NMDA and non-NMDA excitatory amino

acid receptors in the functional organization of primate retinal ganglion cells. *Vis Neurosci.* 11, 317-332.

Conn P. J. és Pin J. P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37, 205-237.

Curtis T. M., Gardiner T. A. és Stitt A. W. (2009) Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis? *Eye (Lond).* 23, 1496-1508.

D'Agata V. és Cavallaro S. (1998) Functional and molecular expression of PACAP/VIP receptors in the rat retina. *Brain Res Mol Brain Res.* 54, 161-164.

Dejda A., Sokolowska P. és Nowak J. Z. (2005) Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol Rep.* 57, 307-320.

Delgado R., Carlin A., Airaghi L., Demitri M. T., Meda L., Galimberti D., Baron P., Lipton J. M. és Catania A. (1998) Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J Leukoc Biol.* 63, 740-745.

Deshane J., Wright M. és Agarwal A. (2005) Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochim Pol.* 52, 273-284.

Dhingra A. és Vardi N. (2012) "mGlu Receptors in the Retina" - *WIREs Membrane Transport and Signaling.* Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal. 1, 641-653.

Diamond L. E., Earle D. C., Rosen R. C., Willett M. S. és Molinoff P. B. (2004) Double-blind, placebo-controlled evaluation of the safety, pharmacokinetic properties and pharmacodynamic effects of intranasal PT-141, a melanocortin receptor agonist, in healthy males and patients with mild-to-moderate erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 16, 51-59.

Dong C. J. és Hare W. A. (2002) GABA_C feedback pathway modulates the amplitude and kinetics of ERG b-wave in a mammalian retina in vivo. *Vision Res.* 42, 1081-1087.

Dong X. X., Wang Y. és Qin Z. H. (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 30,

379-387.

Dong Z., Lavrovsky Y., Venkatachalam M. A. és Roy A. K. (2000) Heme oxygenase-1 in tissue pathology: the Yin and Yang. *Am J Pathol.* 156, 1485-1488.

Drummond G. S. és Kappas A. (1981) Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78, 6466-6470.

Ehinger B., Ottersen O. P., Storm-Mathisen J. és Dowling J. E. (1988) Bipolar cells in the turtle retina are strongly immunoreactive for glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 8321-8325.

Einthoven W. és Jolly W. A. (1908) The form and magnitude of the electrical response of the eye to stimulation by light at various intensities. *Q J Exp Physiol.* 1, 373-416.

Eipper B. A. és Mains R. E. (1980) Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr Rev.* 1, 1-27.

Fairman W. A. és Amara S. G. (1999) Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. *Am J Physiol.* 277, F481-486.

Fonyó A. (szerk.): Az orvosi élettan tankönyve (2013), Medicina Kiadó, ISBN: 9789632264646

Forslin Aronsson S., Spulber S., Popescu L. M., Winblad B., Post C., Oprica M. és Schultzberg M. (2006) alpha-Melanocyte-stimulating hormone is neuroprotective in rat global cerebral ischemia. *Neuropeptides.* 40, 65-75.

Frishman L. J., Yamamoto F., Bogucka J. és Steinberg R. H. (1992) Light-evoked changes in $[K^+]_o$ in proximal portion of light-adapted cat retina. *J Neurophysiol.* 67, 1201-1212.

Fujita T., Toda K., Karimova A., Yan S. F., Naka Y., Yet S. F. és Pinsky D. J. (2001) Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat Med.* 7, 598-604.

Gantz I. és Fong T. M. (2003) The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284, E468-474.

Geha R. S., Beiser A., Ren C., Patterson R., Greenberger P. A., Grammer L. C., Ditto A. M., Harris K. E., Shaughnessy M. A., Yarnold P. R., Corren J. és Saxon A. (2000) Review of alleged reaction to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study. *J Nutr.* 130, 1058S-1062S.

Gidari A. S. és Levere R. D. (1977) Enzymatic formation and cellular regulation of heme synthesis. *Semin Hematol.* 14, 145-168.

Gillette M. U. és Mitchell J. W. (2002) Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res.* 309, 99-107.

Giuliani D., Ottani A., Mioni C., Bazzani C., Galantucci M., Minutoli L., Bitto A., Zaffe D., Botticelli A. R., Squadrito F. és Guarini S. (2007) Neuroprotection in focal cerebral ischemia owing to delayed treatment with melanocortins. *Eur J Pharmacol.* 570, 57-65.

Gotch F. (1903) The time relations of the photo-electric changes in the eyeball of the frog. *J Physiol.* 29, 388-410.

Granit R. (1933) The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J Physiol.* 77, 207-239.

Guarini S., Schioth H. B., Mioni C., Cainazzo M., Ferrazza G., Giuliani D., Wikberg J. E., Bertolini A. és Bazzani C. (2002) MC(3) receptors are involved in the protective effect of melanocortins in myocardial ischemia/reperfusion-induced arrhythmias. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 366, 177-182.

Gurevich L. és Slaughter M. M. (1993) Comparison of the waveforms of the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res.* 33, 2431-2435.

Gyires K. és Fürst Z. (szerk.): *A farmakológia alapjai* (2011), Medicina Könyvkiadó, ISBN: 9789632263423

Haines D. D., Lekli I., Teissier P., Bak I. és Tosaki A. (2012) Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders. *Acta Physiol (Oxf)*. 204, 487-501.

Hamassaki-Britto D. E., Hermans-Borgmeyer I., Heinemann S. és Hughes T. E. (1993) Expression of glutamate receptor genes in the mammalian retina: the localization of GluR1 through GluR7 mRNAs. *J Neurosci*. 13, 1888-1898.

Hare W. A. és Owen W. G. (1992) Effects of 2-amino-4-phosphonobutyric acid on cells in the distal layers of the tiger salamander's retina. *J Physiol*. 445, 741-757.

Hassoun H. T., Zou L., Moore F. A., Kozar R. A., Weisbrodt N. W. és Kone B. C. (2002) Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 282, G1059-1068.

Hayashi S., Omata Y., Sakamoto H., Higashimoto Y., Hara T., Sagara Y. és Noguchi M. (2004) Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*. 336, 241-250.

Haycock J. W., Rowe S. J., Cartledge S., Wyatt A., Ghanem G., Morandini R., Rennie I. G. és MacNeil S. (2000) Alpha-melanocyte-stimulating hormone reduces impact of proinflammatory cytokine and peroxide-generated oxidative stress on keratinocyte and melanoma cell lines. *J Biol Chem*. 275, 15629-15636.

Hlavackova M., Kozichova K., Neckar J., Kolar F., Musters R. J., Novak F. és Novakova O. (2010) Up-regulation and redistribution of protein kinase C-delta in chronically hypoxic heart. *Mol Cell Biochem*. 345, 271-282.

Huang Q. és Tatro J. B. (2002) Alpha-melanocyte stimulating hormone suppresses intracerebral tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta gene expression following transient cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett*. 334, 186-190.

Huettner J. E. (2003) Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol*. 70, 387-407.

Hughes J. R. (1958) Post-tetanic potentiation. *Physiol Rev.* 38, 91-113.

Ishikawa M. (2013) Abnormalities in Glutamate Metabolism and Excitotoxicity in the Retinal Diseases. *Scientifica (Cairo)*. 2013, 528940.

Ishikawa M., Yoshitomi T., Zorumski C. F. és Izumi Y. (2010) Effects of acutely elevated hydrostatic pressure in a rat ex vivo retinal preparation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51, 6414-6423.

Izumi Y., Shimamoto K., Benz A. M., Hammerman S. B., Olney J. W. és Zorumski C. F. (2002) Glutamate transporters and retinal excitotoxicity. *Glia.* 39, 58-68.

Jakobs T. C., Ben Y. és Masland R. H. (2007) Expression of mRNA for glutamate receptor subunits distinguishes the major classes of retinal neurons, but is less specific for individual cell types. *Mol Vis.* 13, 933-948.

Jehle T., Wingert K., Dimitriu C., Meschede W., Lasseck J., Bach M. és Lagreze W. A. (2008) Quantification of ischemic damage in the rat retina: a comparative study using evoked potentials, electroretinography, and histology. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 1056-1064.

Jeney V., Balla J., Yachie A., Varga Z., Vercellotti G. M., Eaton J. W. és Balla G. (2002) Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood.* 100, 879-887.

Jonas J., Paques M., Mones J. és Glacet-Bernard A. (2010) Retinal vein occlusions. *Dev Ophthalmol.* 47, 111-135.

Juarez C. P., Tso M. O., van Heuven W. A., Hayreh M. S. és Hayreh S. S. (1986) Experimental retinal vascular occlusion. III. An ultrastructural study of simultaneous occlusion of central retinal vein and artery. *Int Ophthalmol.* 9, 89-101.

Kapitulnik J. (2004) Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol Pharmacol.* 66, 773-779.

Kaskel D., Valenzuela H., Hockwin O. és Muntau M. (1976) Enzymologic and histologic

investigations in normal and pressure-ischemic retina of rabbits. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol. 200, 71-78.

Kato Y., Shimazu M., Kondo M., Uchida K., Kumamoto Y., Wakabayashi G., Kitajima M. és Suematsu M. (2003) Bilirubin rinse: A simple protectant against the rat liver graft injury mimicking heme oxygenase-1 preconditioning. Hepatology. 38, 364-373.

Katori M., Anselmo D. M., Busuttill R. W. és Kupiec-Weglinski J. W. (2002) A novel strategy against ischemia and reperfusion injury: cytoprotection with heme oxygenase system. Transpl Immunol. 9, 227-233.

Kidane A. H., Crujisen P. M., Ortiz-Bazan M. A., Vaudry H., Leprince J., Kuijpers-Kwant F. J., Roubos E. W. és Jenks B. G. (2007) Actions of PACAP and VIP on melanotrope cells of *Xenopus laevis*. Peptides. 28, 1790-1796.

Kidane A. H., Roubos E. W. és Jenks B. G. (2008) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates brain-derived neurotrophic factor exon IV expression through the VPAC1 receptor in the amphibian melanotrope cell. Endocrinology. 149, 4177-4182.

Kiss P., Atlasz T., Szabadfi K., Horvath G., Griecs M., Farkas J., Matkovits A., Toth G., Lubics A., Tamas A., Gabriel R. és Reglodi D. (2011) Comparison between PACAP- and enriched environment-induced retinal protection in MSG-treated newborn rats. Neurosci Lett. 487, 400-405.

Koch B. és Lutz-Bucher B. (1992) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates cyclic AMP formation as well as peptide output of cultured pituitary melanotrophs and AtT-20 corticotrophs. Regul Pept. 38, 45-53.

Kojima I., Kojima K. és Rasmussen H. (1985) Role of calcium and cAMP in the action of adrenocorticotropin on aldosterone secretion. J Biol Chem. 260, 4248-4256.

Kokot A., Sindrilaru A., Schiller M., Sunderkotter C., Kerkhoff C., Eckes B., Scharffetter-Kochanek K., Luger T. A. és Bohm M. (2009) alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses bleomycin-induced collagen synthesis and reduces tissue fibrosis in a mouse model of scleroderma: melanocortin peptides as a novel treatment strategy for scleroderma?

Arthritis Rheum. 60, 592-603.

Kolb H. (1995a) Outer Plexiform Layer. Hozzáférés dátuma: 2014.02.21, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21413381

Kolb H. (1995b) Photoreceptors. Hozzáférés dátuma: 2014.02.21, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21413383

Lam C. W., Getting S. J. és Perretti M. (2005) In vitro and in vivo induction of heme oxygenase 1 in mouse macrophages following melanocortin receptor activation. *J Immunol.* 174, 2297-2304.

Lee D. J., Biro D. J. és Taylor A. W. (2009) Injection of an alpha-melanocyte stimulating hormone expression plasmid is effective in suppressing experimental autoimmune uveitis. *Int Immunopharmacol.* 9, 1079-1086.

Lei B. és Perlman I. (1999) The contributions of voltage- and time-dependent potassium conductances to the electroretinogram in rabbits. *Vis Neurosci.* 16, 743-754.

Levine N., Sheftel S. N., Eytan T., Dorr R. T., Hadley M. E., Weinrach J. C., Ertl G. A., Toth K., McGee D. L. és Hruby V. J. (1991) Induction of skin tanning by subcutaneous administration of a potent synthetic melanotropin. *JAMA.* 266, 2730-2736.

Liao Y. F., Zhu W., Li D. P. és Zhu X. (2013) Heme oxygenase-1 and gut ischemia/reperfusion injury: A short review. *World J Gastroenterol.* 19, 3555-3561.

Lindqvist N., Napankangas U., Lindblom J. és Hallbook F. (2003) Proopiomelanocortin and melanocortin receptors in the adult rat retino-tectal system and their regulation after optic nerve transection. *Eur J Pharmacol.* 482, 85-94.

Liu G. J. és Madsen B. W. (1998) Modulatory action of PACAP27 on NMDA receptor channel activity in cultured chick cortical neurons. *Brain Res.* 791, 290-294.

Liu G. J. és Madsen B. W. (1997) PACAP38 modulates activity of NMDA receptors in cultured chick cortical neurons. *J Neurophysiol.* 78, 2231-2234.

Liu X. Q., Wu B. J., Pan W. H., Zhang X. M., Liu J. H., Chen M. M., Chao F. P. és Chao H. M. (2013) Resveratrol mitigates rat retinal ischemic injury: the roles of matrix metalloproteinase-9, inducible nitric oxide, and heme oxygenase-1. *J Ocul Pharmacol Ther.* 29, 33-40.

Lomeli H., Sprengel R., Laurie D. J., Kohr G., Herb A., Seeburg P. H. és Wisden W. (1993) The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett.* 315, 318-322.

Macaluso A., McCoy D., Ceriani G., Watanabe T., Biltz J., Catania A. és Lipton J. M. (1994) Antiinflammatory influences of alpha-MSH molecules: central neurogenic and peripheral actions. *J Neurosci.* 14, 2377-2382.

Magyar I. és Petrányi G. (szerk.): *A belgyógyászat alapvonalai I-II-III* (1977), Medicina Könyvkiadó, ISBN: 963-240-078-X

Mahmoud F. F., Al-Awadhi R., Haines D. D., Dashti A., Dashti H., Al-Ozairi E., Bak I. és Tosaki A. (2013) Sour cherry seed kernel extract increases heme oxygenase-1 expression and decreases representation of CD3⁺ TNF-alpha⁺ and CD3⁺IL-8⁺ subpopulations in peripheral blood leukocyte cultures from type 2 diabetes patients. *Phytother Res.* 27, 767-774.

Maines M. D. (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37, 517-554.

McCoubrey W. K., Jr., Huang T. J. és Maines M. D. (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem.* 247, 725-732.

McCulloch D. A., Lutz E. M., Johnson M. S., MacKenzie C. J. és Mitchell R. (2000) Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 921, 175-185.

Miller R. F. és Dowling J. E. (1970) Intracellular responses of the Muller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *J Neurophysiol.* 33, 323-341.

Mioni C., Giuliani D., Cainazzo M. M., Leone S., Bazzani C., Grieco P., Novellino E., Tomasi A., Bertolini A. és Guarini S. (2003) Further evidence that melanocortins prevent myocardial reperfusion injury by activating melanocortin MC3 receptors. *Eur J Pharmacol.* 477, 227-234.

Miyata A., Arimura A., Dahl R. R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M. D. és Coy D. H. (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 164, 567-574.

Miyata A., Jiang L., Dahl R. D., Kitada C., Kubo K., Fujino M., Minamino N. és Arimura A. (1990) Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun.* 170, 643-648.

Morio H., Tatsuno I., Hirai A., Tamura Y. és Saito Y. (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Res.* 741, 82-88.

Mounien L., Bizet P., Boutelet I., Gourcerol G., Fournier A., Vaudry H. és Jegou S. (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide directly modulates the activity of proopiomelanocortin neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroscience.* 143, 155-163.

Mounien L., Do Rego J. C., Bizet P., Boutelet I., Gourcerol G., Fournier A., Brabet P., Costentin J., Vaudry H. és Jegou S. (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits food intake in mice through activation of the hypothalamic melanocortin system. *Neuropsychopharmacology.* 34, 424-435.

Muller F., Greferath U., Wassle H., Wisden W. és Seeburg P. (1992) Glutamate receptor expression in the rat retina. *Neurosci Lett.* 138, 179-182.

Nakao A., Kimizuka K., Stolz D. B., Neto J. S., Kaizu T., Choi A. M., Uchiyama T.,

Zuckerbraun B. S., Nalesnik M. A., Otterbein L. E. és Murase N. (2003) Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol.* 163, 1587-1598.

Nakao A., Neto J. S., Kanno S., Stolz D. B., Kimizuka K., Liu F., Bach F. H., Billiar T. R., Choi A. M., Otterbein L. E. és Murase N. (2005) Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant.* 5, 282-291.

Nicholls D. és Attwell D. (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci.* 11, 462-468.

Nilsson S. F., De Neef P., Robberecht P. és Christophe J. (1994) Characterization of ocular receptors for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and their coupling to adenylate cyclase. *Exp Eye Res.* 58, 459-467.

Noell W. K. (1954) The origin of the electroretinogram. *Am J Ophthalmol.* 38, 78-90.

North R. V., Jones A. L., Drasdo N., Wild J. M. és Morgan J. E. (2010) Electrophysiological evidence of early functional damage in glaucoma and ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51, 1216-1222.

Orth A., Tapken D. és Hollmann M. (2013) The delta subfamily of glutamate receptors: characterization of receptor chimeras and mutants. *Eur J Neurosci.* 37, 1620-1630.

Osborne N. N., Casson R. J., Wood J. P., Chidlow G., Graham M. és Melena J. (2004) Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 23, 91-147.

Otterbein L. E., Soares M. P., Yamashita K. és Bach F. H. (2003) Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 24, 449-455.

Perlman I. (1995) The Electroretinogram: ERG. Hozzáfértés dátuma: 2014.02.21, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21413407

Ponka P. (1999) Cell biology of heme. *Am J Med Sci.* 318, 241-256.

Prickett T. D. és Samuels Y. (2012) Molecular pathways: dysregulated glutamatergic signaling pathways in cancer. *Clin Cancer Res.* 18, 4240-4246.

Putz R. és Pabst R. (szerk.): *Sobotta - Az ember anatómiájának atlasza (1994)*, Semmelweis Kiadó, ISBN: 9638154276

Reglodi D., Lubics A., Kiss P., Lengvari I., Gaszner B., Toth G., Hegyi O. és Tamas A. (2006) Effect of PACAP in 6-OHDA-induced injury of the substantia nigra in intact young and ovariectomized female rats. *Neuropeptides.* 40, 265-274.

Reglodi D., Lubics A., Tamas A., Szalontay L. és Lengvari I. (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 151, 303-312.

Reglodi D., Tamas A., Somogyvari-Vigh A., Szanto Z., Kertes E., Lenard L., Arimura A. és Lengvari I. (2002) Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides.* 23, 2227-2234.

Réthelyi M. (szerk.): *Funkcionális Anatómia I-II-III (2002)*, Medicina Könyvkiadó, ISBN: 9632425642

Ribeiro F. M., Paquet M., Cregan S. P. és Ferguson S. S. (2010) Group I metabotropic glutamate receptor signalling and its implication in neurological disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 9, 574-595.

Röhlich P. (szerk.): *Szövettan (2006)*, Semmelweis Kiadó, ISBN: 9639656461

Ryter S. W. és Otterbein L. E. (2004) Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays.* 26, 270-280.

Ryter S. W. és Tyrrell R. M. (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 28, 289-309.

Safieddine S. és Wenthold R. J. (1997) The glutamate receptor subunit delta1 is highly expressed in hair cells of the auditory and vestibular systems. *J Neurosci.* 17, 7523-7531.

Samuels I. S., Lee C. A., Petrash J. M., Peachey N. S. és Kern T. S. (2012) Exclusion of aldose reductase as a mediator of ERG deficits in a mouse model of diabetic eye disease. *Vis Neurosci.* 29, 267-274.

Sarantis M., Everett K. és Attwell D. (1988) A presynaptic action of glutamate at the cone output synapse. *Nature.* 332, 451-453.

Schmid S. M. és Hollmann M. (2008) To gate or not to gate: are the delta subunits in the glutamate receptor family functional ion channels? *Mol Neurobiol.* 37, 126-141.

Scott J. R., Gray D. K., Bihari A., Badhwar A., Zhang X., Shan P., Lee P. J., Chakrabarti S., Harris K. A. és Potter R. F. (2005) Heme oxygenase modulates small intestine leukocyte adhesion following hindlimb ischemia/reperfusion by regulating the expression of intercellular adhesion molecule-1. *Crit Care Med.* 33, 2563-2570.

Seki T., Izumi S., Shioda S., Zhou C. J., Arimura A. és Koide R. (2000) Gene expression for PACAP receptor mRNA in the rat retina by in situ hybridization and in situ RT-PCR. *Ann N Y Acad Sci.* 921, 366-369.

Shah K. A., Shurey S. és Green C. J. (1997) Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury: a morphological study. *Transplantation.* 64, 1393-1397.

Shakib M. és Ashton N. (1966) II. Ultrastructural changes in focal retinal ischaemia. *Br J Ophthalmol.* 50, 325-384.

Sherwood N. M., Krueckl S. L. és McRory J. E. (2000) The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev.* 21, 619-670.

Shimizu H., Inoue K. és Mori M. (2007) The leptin-dependent and -independent melanocortin signaling system: regulation of feeding and energy expenditure. *J Endocrinol.* 193, 1-9.

Shintani N., Suetake S., Hashimoto H., Koga K., Kasai A., Kawaguchi C., Morita Y., Hirose M., Sakai Y., Tomimoto S., Matsuda T. és Baba A. (2005) Neuroprotective action of endogenous PACAP in cultured rat cortical neurons. *Regul Pept.* 126, 123-128.

Shoge K., Mishima H. K., Saitoh T., Ishihara K., Tamura Y., Shiomi H. és Sasa M. (1999) Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res.* 839, 66-73.

Sieving P. A., Murayama K. és Naarendorp F. (1994) Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave. *Vis Neurosci.* 11, 519-532.

Sieving P. A. és Nino C. (1988) Scotopic threshold response (STR) of the human electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 29, 1608-1614.

Silver I. A. és Erecinska M. (1997) Energetic demands of the Na⁺/K⁺ ATPase in mammalian astrocytes. *Glia.* 21, 35-45.

Smythies J. (1999) The neurotoxicity of glutamate, dopamine, iron and reactive oxygen species: functional interrelationships in health and disease: a review-discussion. *Neurotox Res.* 1, 27-39.

Sonsalla P. K., Albers D. S. és Zeevalk G. D. (1998) Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids.* 14, 69-74.

Soudry S., Zemel E., Loewenstein A. és Perlman I. (2009) The developing mammalian retina is partially protected from gentamicin toxicity. *Exp Eye Res.* 88, 1152-1160.

Spulber S., Moldovan M., Oprica M., Aronsson A. F., Post C., Winblad B. és Schultzberg M. (2005) Alpha-MSH decreases core and brain temperature during global cerebral ischemia in rats. *Neuroreport.* 16, 69-72.

Steinberg R. H., Schmidt R. és Brown K. T. (1970) Intracellular responses to light from cat pigment epithelium: origin of the electroretinogram c-wave. *Nature.* 227, 728-730.

Stuart-Fox D., Moussalli A. és Whiting M. J. (2008) Predator-specific camouflage in chameleons. *Biol Lett.* 4, 326-329.

Sucher N. J., Lipton S. A. és Dreyer E. B. (1997) Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res.* 37, 3483-3493.

Sun D., Bui B. V., Vingrys A. J. és Kalloniatis M. (2007) Alterations in photoreceptor-bipolar cell signaling following ischemia/reperfusion in the rat retina. *J Comp Neurol.* 505, 131-146.

Szabadi K., Atlasz T., Kiss P., Reglodi D., Szabo A., Kovacs K., Szalontai B., Setalo G., Jr., Banki E., Csanaky K., Tamas A. és Gabriel R. (2012) Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell Tissue Res.* 348, 37-46.

Szabo M. E., Droy-Lefaix M. T., Doly M., Carre C. és Braquet P. (1991) Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32, 1471-1478.

Szabo M. E., Gallyas E., Bak I., Rakotovo A., Boucher F., de Leiris J., Nagy N., Varga E. és Tosaki A. (2004) Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45, 3727-3732.

SzP1: Szemfenéki artériás elzáródások Szakmai Protokoll, Hozzáférés dátuma: 2014.02.21, <<http://www.pharmindex-online.hu/diagnosztika-es-terapia/terapias-iranyelvek/szemfeneki-arterias-elzarodasok-2846.html>>

SzP2: A glaucoma és kezelése Szakmai Protokoll, Hozzáférés dátuma: 2014.02.21, <<http://www.pharmindex-online.hu/diagnosztika-es-terapia/terapias-iranyelvek/a-glaucoma-es-kezelese-2880.html>>

SzP3: A szemészeti szövődmények terápiája diabetes mellitusban Szakmai Protokoll, Hozzáférés dátuma: 2014.02.21, <<http://www.pharmindex-online.hu/diagnosztika-es-terapia/terapias-iranyelvek/a-szemeszeti-szovodmenyek-terapiaja-diabetes-mellitusban-2883.html>>

SzP4: Az időskori makula degeneráció kezelése Szakmai Protokoll, Hozzáférés dátuma: 2014.02.21, <<http://www.pharmindex-online.hu/diagnosztika-es-terapia/terapias-iranyelvek/az-idoskori-makula-degeneracio-kezelese-2903.html>>

SzP5: A retinoblasztóma kezelése Szakmai Protokoll, Hozzáférés dátuma: 2014.02.21, <<http://www.pharmindex-online.hu/diagnosztika-es-terapia/terapias-iranyelvek/a-retinoblasztoma-kezelese-3099.html>>

SzP6: Retinopathia prematurorum (ROP) Szakmai Protokoll, Hozzáférés dátuma: 2014.02.21, <<http://www.pharmindex-online.hu/diagnosztika-es-terapia/terapias-iranyelvek/retinopathia-prematurorum-rop-2644.html>>

Tamas A., Gabriel R., Racz B., Denes V., Kiss P., Lubics A., Lengvari I. és Reglodi D. (2004) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neurosci Lett.* 372, 110-113.

Tanito M., Kaidzu S. és Anderson R. E. (2007) Delayed loss of cone and remaining rod photoreceptor cells due to impairment of choroidal circulation after acute light exposure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48, 1864-1872.

Tenhunen R., Marver H. S. és Schmid R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 61, 748-755.

Teshigawara K., Takahashi S., Boswell T., Li Q., Tanaka S. és Takeuchi S. (2001) Identification of avian alpha-melanocyte-stimulating hormone in the eye: temporal and spatial regulation of expression in the developing chicken. *J Endocrinol.* 168, 527-537.

Thody A. J. (1999) alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. *Ann N Y Acad Sci.* 885, 217-229.

Tolosano E. és Altruda F. (2002) Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol.* 21, 297-306.

Tomaro M. L. és Batlle A. M. (2002) Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol.* 34, 216-220.

Torashima T., Iizuka A., Horiuchi H., Mitsumura K., Yamasaki M., Koyama C., Takayama K., Iino M., Watanabe M. és Hirai H. (2009) Rescue of abnormal phenotypes in delta2 glutamate receptor-deficient mice by the extracellular N-terminal and intracellular C-terminal domains of the delta2 glutamate receptor. *Eur J Neurosci.* 30, 355-365.

Tsuchihashi S., Fondevila C. és Kupiec-Weglinski J. W. (2004) Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury. *Ann Transplant.* 9, 84-87.

Vaudry D., Falluel-Morel A., Bourgault S., Basille M., Burel D., Wurtz O., Fournier A., Chow B. K., Hashimoto H., Galas L. és Vaudry H. (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev.* 61, 283-357.

Vecsernyes M., Juhasz B., Der P., Kocsan R., Feher P., Bacskay I., Kovacs P. és Tosaki A. (2003) The administration of alpha-melanocyte-stimulating hormone protects the ischemic/reperfused myocardium. *Eur J Pharmacol.* 470, 177-183.

Vercellotti G. M., Balla G., Balla J., Nath K., Eaton J. W. és Jacob H. S. (1994) Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 22, 207-213.

Vergoni A. V., Poggioli R. és Bertolini A. (1986) Corticotropin inhibits food intake in rats. *Neuropeptides.* 7, 153-158.

Wagener F. A., da Silva J. L., Farley T., de Witte T., Kappas A. és Abraham N. G. (1999) Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 291, 416-423.

Wagener F. A., Volk H. D., Willis D., Abraham N. G., Soares M. P., Adema G. J. és Figdor C. G. (2003) Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev.* 55, 551-571.

Wen R., Song Y., Kjellstrom S., Tanikawa A., Liu Y., Li Y., Zhao L., Bush R. A., Laties A. M. és Sieving P. A. (2006) Regulation of rod phototransduction machinery by ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci.* 26, 13523-13530.

Werner P., Pitt D. és Raine C. S. (2000) Glutamate excitotoxicity--a mechanism for axonal damage and oligodendrocyte death in Multiple Sclerosis? *J Neural Transm Suppl.* 375-385.

Wessells H., Fuciarelli K., Hansen J., Hadley M. E., Hruby V. J., Dorr R. és Levine N. (1998) Synthetic melanotropic peptide initiates erections in men with psychogenic erectile dysfunction: double-blind, placebo controlled crossover study. *J Urol.* 160, 389-393.

Wessells H., Gralnek D., Dorr R., Hruby V. J., Hadley M. E. és Levine N. (2000) Effect of an alpha-melanocyte stimulating hormone analog on penile erection and sexual desire in men with organic erectile dysfunction. *Urology.* 56, 641-646.

Whitlock J. R., Heynen A. J., Shuler M. G. és Bear M. F. (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science.* 313, 1093-1097.

Wikberg J. E. (1999) Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur J Pharmacol.* 375, 295-310.

Willard S. S. és Koochekpour S. (2013) Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci.* 9, 948-959.

Witkovsky P., Dudek F. E. és Ripps H. (1975) Slow PIII component of the carp electroretinogram. *J Gen Physiol.* 65, 119-134.

Wollmuth L. P., Kuner T., Jatzke C., Seeburg P. H., Heintz N. és Zuo J. (2000) The Lurcher mutation identifies delta 2 as an AMPA/kainate receptor-like channel that is potentiated by Ca(2+). *J Neurosci.* 20, 5973-5980.

Yuzaki M. (2004) The delta2 glutamate receptor: a key molecule controlling synaptic plasticity and structure in Purkinje cells. *Cerebellum.* 3, 89-93.

Zeevalk G. D. és Nicklas W. J. (1997) Activity at the GABA transporter contributes to acute cellular swelling produced by metabolic impairment in retina. *Vision Res.* 37, 3463-3470.

Zhou Z. J., Fain G. L. és Dowling J. E. (1993) The excitatory and inhibitory amino acid

receptors on horizontal cells isolated from the white perch retina. *J Neurophysiol.* 70, 8-19.

Zou L., Sato N., Attuwaybi B. O. és Kone B. C. (2003) Delayed administration of alpha-melanocyte-stimulating hormone or combined therapy with BAY 11-7085 protects against gut ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 20, 469-475.

Iktatószám: DEENKÉTK/43/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Varga Balázs

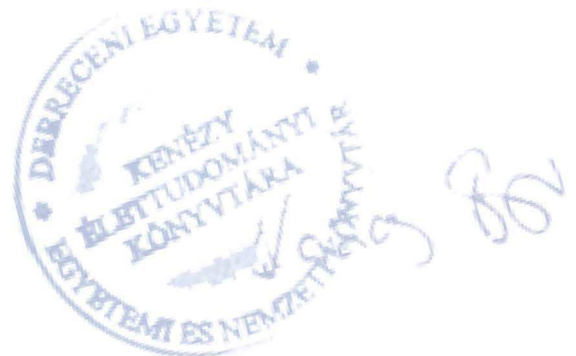
Neptun kód: TU35Q0

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10037794

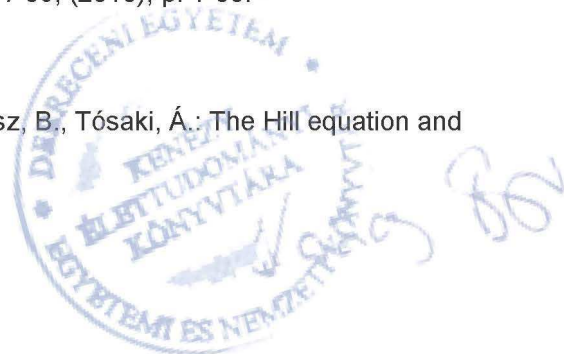
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Varga, B.**, Gesztelyi, R., Bombicz, M., Haines, D., Szabó, A.M., Kemény-Beke, Á., Antal, M., Vecsernyés, M., Juhász, B., Tósaki, Á.: Protective Effect of Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone (α -MSH) on the Recovery of Ischemia/Reperfusion (I/R)-Induced Retinal Damage in A Rat Model.
J. Mol. Neurosci. 50 (3), 558-570, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-013-9998-3>
IF:2.891 (2012)
2. **Varga, B.**, Szabadfi, K., Kiss, P., Fábíán, E., Tamás, A., Griecs, M., Gabriel, R., Reglődi, D., Kemény-Beke, Á., Pamer, Z., Biró, Z., Tósaki, Á., Atlasz, T., Juhász, B.: PACAP improves functional outcome in excitotoxic retinal lesion: An electroretinographic study.
J. Mol. Neurosci. 43 (1), 44-50, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-010-9406-1>
IF:2.504

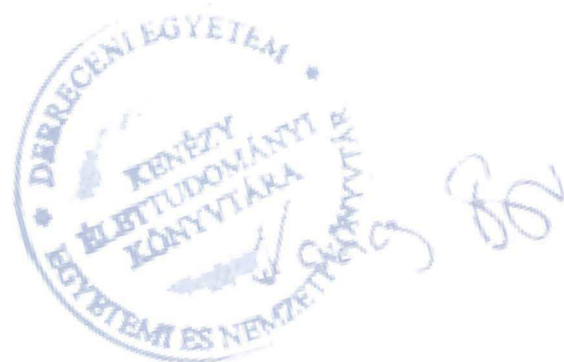


További Közlemények

3. Juhász, B., Kertész, A., Balla, J., Balla, G., Szabó, Z., Bombicz, M., Priksz, D., Gesztelyi, R., **Varga, B.**, Haines, D.D., Tósaki, Á.: Cardioprotective Effects of Sour Cherry Seed Extract (SCSE) on the Hypercholesterolemic Rabbit Heart.
Curr. Pharm. Design. 19 (39), 6896-6905, 2013.
IF:3.311 (2012)
4. Kalantari, H., Galehdari, H., Zaree, Z., Gesztelyi, R., **Varga, B.**, Haines, D., Bombicz, M., Tósaki, Á., Juhász, B.: Toxicological and mutagenic analysis of *Artemisia dracunculus* (tarragon) extract.
Food Chem. Toxicol. 51, 26-32, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.052>
IF:3.01 (2012)
5. Kertész, A., Bombicz, M., Priksz, D., Balla, J., Balla, G., Gesztelyi, R., **Varga, B.**, Haines, D.D., Tósaki, Á., Juhász, B.: Adverse Impact of Diet-Induced Hypercholesterolemia on Cardiovascular Tissue Homeostasis in a Rabbit Model: Time-Dependent Changes in Cardiac Parameters.
Int. J. Mol. Sci. 14 (9), 19086-19108, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140919086>
IF:2.464 (2012)
6. Kiss, Z., Pak, K., Zsuga, J., Juhász, B., **Varga, B.**, Szentmiklósi, J.A., Haines, D.D., Tósaki, Á., Gesztelyi, R.: The guinea pig atrial A1 adenosine receptor reserve for the direct negative inotropic effect of adenosine.
Gen. Physiol. Biophys. 32 (3), 325-335, 2013.
DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2013041
IF:0.852 (2012)
7. Pak, K., Papp, C., Galajda, Z., Szerafin, T., **Varga, B.**, Juhász, B., Haines, D., Szentmiklósi, J.A., Tósaki, Á., Gesztelyi, R.: Approximation of A1 adenosine receptor reserve appertaining to the direct negative inotropic effect of adenosine in hyperthyroid guinea pig left atria.
Gen. Physiol. Biophys. Epub ahead of print, (2013), p. 1-30, (2013), p. 1-30. -
IF:0.852 (2012)
8. Gesztelyi, R., Zsuga, J., Kemény-Beke, Á., **Varga, B.**, Juhász, B., Tósaki, Á.: The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology.
Arch. Hist. Exact Sci. 66 (4), 427-438, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00407-012-0098-5>
IF:0.514



9. Bak, I., Czompa, A., Csépanyi, E., Juhász, B., Kalantari, H., Najm, K., Aghel, N., **Varga, B.**, Haines, D.D., Tósaki, Á.: Evaluation of systemic and dermal toxicity and dermal photoprotection by sour cherry kernels.
Phytother. Res. 25 (11), 1714-1720, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3580>
IF:2.086
10. Haines, D.D., **Varga, B.**, Bak, I., Juhász, B., Mahmoud, F.F., Kalantari, H., Gesztelyi, R., Lekli, I., Czompa, A., Tósaki, Á.: Summative interaction between astaxanthin, Ginkgo biloba extract (EGb761) and vitamin C in Suppression of respiratory inflammation: A comparison with ibuprofen.
Phytother. Res. 25 (1), 128-136, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3160>
IF:2.086
11. Juhász, B., **Varga, B.**, Czompa, A., Bak, I., Lekli, I., Gesztelyi, R., Zsuga, J., Kemény-Beke, Á., Antal, M., Szendrei, L., Tósaki, Á.: Postischemic cardiac recovery in heme oxygenase-1 transgenic ischemic/reperfused mouse myocardium.
J. Cell. Mol. Med. 15 (9), 1973-1982, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01153.x>
IF:4.125
12. Juhász, B., Das, D.K., Kertész, A., Juhász, Á., Gesztelyi, R., **Varga, B.**: Reduction of blood cholesterol and ischemic injury in the hypercholesteromic rabbits with modified resvaratrol, logevinex.
Mol. Cell. Biochem. 348 (1-2), 199-203, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0615-2>
IF:2.057
13. Kalantari, H., Jalali, M., Jalali, A., Salimi, A., Alhalvachi, F., **Varga, B.**, Juhász, B., Jakab, A., Kemény-Beke, Á., Gesztelyi, R., Tósaki, Á., Zsuga, J.: Protective effect of Cassia fistula fruit extract on bromobenzene-induced nephrotoxicity in mice.
Hum. Exp. Toxicol. 30 (10), 1710-1715, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/09603271110396532>
IF:1.772



14. Bak, I., Lekli, I., Juhász, B., Varga, E., **Varga, B.**, Gesztelyi, R., Szendrei, L., Tósaki, Á.: Isolation and Analysis of Bioactive Constituents of Sour Cherry (*Prunus cerasus*) Seed Kernel: An Emerging Functional Food.

J. Med. Food. 13 (4), 905-910, 2010.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2009.0188>

IF:1.461

15. Juhász, B., **Varga, B.**, Gesztelyi, R., Kemény-Beke, Á., Zsuga, J., Tósaki, Á.: Resveratrol: A multifunctional cytoprotective molecule.

Curr. Pharm. Biotechnol. 11 (8), 810-818, 2010.

DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138920110793262079>

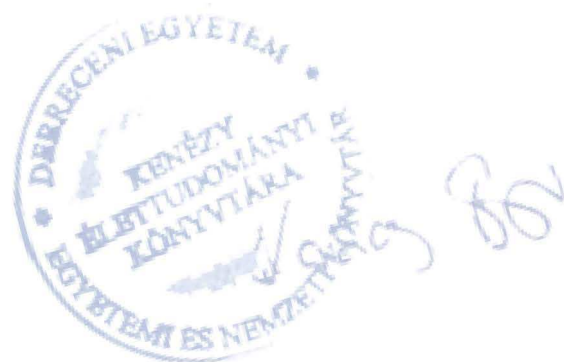
IF:3.455

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 33.44

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5.395

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.03.04



8. Tárgyszavak

Magyar tárgyszavak: retina, α -MSH, PACAP, glutamát, excitotoxicitás, iszkémia-reperfúzió, elektroretinográfia (ERG), hisztológia, elektronmikroszkópia, Western blot, hemoxigenáz 1 (HO-1), HO-aktivitásmérés

Angol tárgyszavak: retina, α -MSH, PACAP, glutamate, excitotoxicity, ischemia-reperfusion, electroretinography (ERG), histology, electronmicroscopy, Western blot, hemoxygenase 1 (HO-1), HO-activity measurement

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Tósaki Árpád egyetemi tanárnak (DE GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék), hogy lehetővé tette munkám elvégzését az általa vezetett tanszéken.

Köszönöm Dr. Juhász Béla egyetemi adjunktusnak (DE GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék), hogy kísérletes munkámat mindvégig követte és mindig iránymutatást adott, mikor kellett.

Köszönöm Dr. Gesztelyi Rudolf egyetemi adjunktusnak (DE GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék), hogy mindig volt egy szabad perce rám, ha valami szakmai – kiváltképp, ha statisztikai – kérdésem merült fel.

Köszönöm Dr. Atlasz Tamás és Dr. Szabadfi Krisztina (PTE TTK, Testnevelés- és Sporttudományi Intézet) kooperációs együttműködését, továbbá köszönettel tartozom minden velük kapcsolatban álló tanszék munkatársainak, akik elősegítették kollaborációs munkánkat és közös cikkünk megjelenését.

Köszönettel tartozom Dr. Antal Miklós professzor úrnak és Kis Grétának (DE ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Tanszék) az elektronmikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm Dr. Pósa Anikónak és Dr. Varga Csabának (SZTE TTIK, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék) hemoxigenáz aktivitás-mérésben nyújtott segítségüket.

Köszönetemet fejezem ki a tanszékünkön dolgozó munkatársaimnak, különösképpen dr. Bombicz Mariannak és dr. Priksz Dánielnek.

Köszönöm családomnak, feleségemnek, Adriennek, kislányaimnak, Panninak és Alíznek, valamint szüleimnek, öcsémnek és nagyszüleimnek szerető támogatásukat!

Köszönöm barátaimnak a velük kikapcsolódással, feltöltődéssel eltöltött időt!

A kutatás a Richter Gedeon Talentum Alapítvány támogatásával valamint az OTKA 104017, OTKA 78223, TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 kereteiből valósult meg. A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszecenytiv.gov.hu
06 40 638 638



10. Fűggelék