

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola
Összehasonlító Neurobiológia Program

**NEURODEGENERÁCIÓS MODELLEK MORFOLÓGIAI ELEMZÉSE PATKÁNY
RETINÁN**

PhD értekezés tézisei

BABAI NORBERT

Témavezető:

Gábrriel Róbert
egyetemi tanár

PÉCS, 2007

Bevezetés

A retina anatómiája

A látott tárgyról visszaverődő fény a retinára a szem fénytörő közegein keresztül jut, majd áthalad a retina sejtrétegein a fotoreceptorokig, ahol megtörténik a fotonok energiájának átalakítása kémiai energiává. Ehhez a speciális funkcióhoz egy sajátos szerkezetű struktúra, a retina szükséges.

A retina legkülső rétege a pigment epithelium. A pigmentrétegtől beljebb helyezkedik el a fényinformációt elektromos jellé átalakító fotoreceptorok rétege. A retina folytonos idegállományának külső határát jelzi a Müller-sejtek végtalpaiból álló nem folytonos réteg, a külső határhártya. A fotoreceptorok sejtestjei a külső magvas réteget alkotják. Az első szinapszis a külső rostos rétegben történik, a fotoreceptorok nyúlványai és a belső magvas rétegben lévő horizontális és bipoláris sejtek kifelé tekintő nyúlványai között. A bipoláris sejtek axonjai, a belső magvas réteg belső sejtoraiban lévő amakrin sejtek belső retina felé tekintő nyúlványai, továbbá a retina dúcsejtjeinek dendritjei hozzák létre azt a nyúlványrendszert, amit belső rostos rétegnek nevezünk.

A ganglionsejtek külön réteget képeznek. A retinában keletkező kódolt információt a ganglionsejtek axonjaiból összeszedődő optikus rostköteg továbbítja felsőbb központok felé. A retinát az üvegtesttől a Müller-sejtek gliatalpaiból létrejövő belső határhártya izolálja el.

A glutamát, mint retinális neurotranszmitter

A retinában a fotoreceptorok, bipoláris sejtek és a ganglion sejtek mutatnak glutamát immunreaktivitást. A fotoreceptorok a glutamát szinaptikus résbe ürítésével jelzik a fotonokról begyűjtött információt a másodrendű neuronok számára. A glutamát transzporterek a Müller-sejtekbe bejuttatják a glutamátot három Na^+ kotranszportja, egy K^+ antiportja és egy OH^- vagy egy HCO_3^- mozgatása mellett.

A glutamát transzporterek a szinaptikus résben alacsony koncentráción tartják a glutamát mennyiségét, így elkerülhető a glutamát-indukálta sejthalál. A Müller-sejtek a glutamátot átalakítják glutaminná és visszajuttatják a környező neuronokhoz. A neuronok képesek glutaminból glutamátot előállítani.

A glutamát receptorok két nagy csoportját, nevezetesen az ionotróp és a metabotróp glutamát receptorokat különítjük el. Az ionotróp glutamát receptorok segítségével Na^+ és Ca^{2+} áramlik be a sejtbe, míg a metabotróp glutamát receptorok G-proteint aktiválnak.

A neuronkárosodás

A neuron-degenerációnak két fő típusa ismert, nevezetesen a nekrozis és az apoptózis. Ez a két sejtpusztulási forma morfológiailag eltér egymástól. A nekrozis súlyos sérülés okozta sejthalál. Kiváltó oka lehet mechanikai sértés, oxigénhiány, toxikus anyag, sugárkárosodás stb. A sejhártya permeabilitásának növekedése miatt a víz és a Ca^{2+} a sejtbe áramlik, ezáltal a sejt és a sejt organellumai megrúgnak, majd szétesnek.

Az apoptózis létrejöhet külső és belső tényezőkkel előidézett, genetikailag meghatározott, programozott sejthalál útján. Ennek során a sejtek zsugorodnak, és a sejtmag periferiáján a kromatin kondenzálódik. A sejt összetöredezik és róla kis részek válnak le, miközben a membránok épek maradnak. A pusztuló sejtek káros anyagai nem ürülnek ki, így a környező sejtek nem károsodnak.

A glutamáterg rendszer szerepe a neurotoxikációban

A glutamát a normál szabályozó hatást kiváltó szintnél alig magasabb koncentrációban már neurotoxikus hatású. A vér-agy gát szabályozza a külsőleg bejuttatott glutamát átjutását az agyba, illetve a retinába, ahol a glutamát receptorokhoz kapcsolódik. Exogén glutamát bevitel esetén a vér-agy gát által nem védett területeken átjutva, az a neuronok degenerációját okozza. Mivel a szinapszisokban az excitációt a preszinaptikus membrán és a szinapszist közrefogó gliasejtek membránján lévő glutamát transzporterek szabályozzák, a megnövekedett glutamát koncentráció több receptor-típus közreműködésével indíthatja be a neuronális degenerációt.

Degenerációs retinamodellek létrehozása

Sokféle retina-degenerációs modell leírását feltehetjük a szakirodalomban, amelyeket két nagy csoportra oszthatunk. Az egyik csoportba tartoznak a genetikai háttérrel rendelkezők, míg a másikba a metabolikus, vagy traumatikus eseményeken alapulóak.

A glutamát receptorok patológiás aktivációja kulcsszerepet játszik számos neurológiai betegség okozta idegrendszeri degenerációban. A szemben számos patológiai körülményt, például ischémiát és a különböző típusú glaukómákat lehet kísérletesen utánózni az extracelluláris glutamát, vagy glutamát-agonisták alkalmazásával. Egyik ilyen alkalmazott anyag a monosodium L-glutamát (MSG), mely nagy dózisban, szubkután injekció formájában adva az egész belső retina pusztulását okozza. Ez a kezelés a belső retina sejtjeinek depolarizálódásához vezet, és megnöveli a Ca^{2+} beáramlását a neuronokba és a sejtek elhalásához vezet.

Hasonlóan, a retina degenerációját idézi elő a szemhez futó erek, vagy a bilaterális arteria carotis communis lekötése (BCCAO). Az elektoretinográfiás és a morfológia tanulmányok is azt mutatják, hogy a BCCAO a retina sérüléséhez vezet.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célul tűztük ki, hogy:

- különböző MSG kezelések alkalmazásával retinaroncsolást idézzünk elő, amelynek fény- és elektronmikroszkóposan megfigyelhető jellemzőit feltárjuk,
- keressünk egy olyan optimális retina-degenerációs modellt, ami reprodukálható és alkalmas a gyógyászatban alkalmazható neuroprotektív anyagok teszteléséhez.

Továbbá meg szeretnénk volna határozni:

- azt az optimális glutamát koncentrációt és adagolást, ami mérhető degeneratív változást okoz a retinában, de azt nem pusztítja el teljesen
- a pusztuló sejtek típusát
 - Ca^{2+} kötő fehérjék
 - glutamát transzporterek
 - tirozin-hidroxiláz (TH)
 - GABA-transzporter elleni antitestek alkalmazásával.
- A retina homeosztázisban bekövetkező kismértékű változása is végzetes lehet a retina sejtjeire nézve. Az egyik létfontosságú tényező a retina vérellátása, ezért további retinadegeneráció létrehozására alkalmas modellként a BCCAO-t használtuk.
- Számos retinabetegséget a retina csökkenő oxigén ellátottsága hozza létre. Kísérletünkben zárt térben azt az oxigénhiányos állapotot kívántuk létrehozni, ami unilaterális arteria carotis communis lekötéssel (UCCAO) kombinálva lehetővé teszi, hogy az oxigénhiányos állapot és a csökkent vérellátás hatását együtt és külön is megvizsgáljuk.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

MSG kezelés: A kísérleteket saját tenyésztésű törzsből származó hím és nőstény Wistar patkányokon végeztük, betartva a NIH (National Institute of Health) előírásait. Összesen 45 patkány bőre alá juttattunk a születés utáni első, ötödik és kilencedik, tizenharmadik és tizenhetedik napon (PD 1, PD 5, PD 9, PD 13, PD 17) 2 mg/testtömeg gramm MSG-t. Az állatokat 3 hetes korukban túltarttuk, a szemüket kivettük, és *eye-cup* (szemszerleg) preparátumot készítettünk belőlük. Ezután normál fény- és elektronmikroszkópos szövettani technikát alkalmazva vizsgáltuk az elkészített metszeteket.

Bilaterális arteria carotis communis lekötés (BCCAO): Összesen 18 ivarérett Wistar patkányt felhasználva, altatás közben mindkét oldali arteria carotis communist elköttük egy középvonali bevágást követően. Három hét elteltével az állatok retináját szövettani feldolgozásnak vetettük alá.

Unilaterális arteria carotis communis lekötés (UCCAO) és hipoxia kombinált alkalmazása: Altatott állapotban lévő egy hetes (n=8) Wistar patkány egyik oldali arteria carotis communisát elköttük. A műtét után az állatokat 2 órára hipoxiás kamrába zártuk egyszeri alkalommal, így az egyik szemük hipoxia és UCCAO kezelést kapott, míg a másik szemük csak hipoxiában részesült. Két hét eltelte után retinájukat szövettanilag vizsgáltuk.

Immunitokémiai vizsgálatok: A kezelést kapott állatok szeméből készített *eye-cup* preparátumokat kriosztáttal lemetsztettük, majd a készített metszeteket zselatinos tárgylemezre helyezve, immunjelölést végeztünk a következő antigének elleni antitestekkel: VGLUT-1 (vezikuláris glutamát transzporter), VGLUT-2, VGAT (GABA transzporter), TH (tirozin-hidroxiláz), calretinin, calbindin, parvalbumin.

EREDMÉNYEK

Az ismételt MSG kezelések szabályos, látható változásokat idéztek elő a retina morfológiájában. Egyszeres MSG kezelés nem okozott jelentős mértékű, látható változást fénymikroszkópos szinten, és a rétegek vastagsága hasonló volt a kontroll retinán látotthoz, de látszik, hogy a degeneratív folyamatok már elindultak (megduzzadt sejtek és idegrendszeri elemek, kis lyukak a szövetben, piknotikus sejtmagok). A többszörös (2x-es, 3x-os, 5x-ös) MSG kezeléssel átesett állatok retinájának szövettani képe számos eltérést mutatott a kontrollhoz képest. Szignifikáns mértékű változást tapasztaltunk a külső határmembrán és a belső határmembrán közötti távolság és a belső retina rétegek (belső magvas réteg, belső rostos réteg) vastagságában. A belső rostos réteg nagy része eltűnt, valamint a belső sejt és a ganglion sejtréteg sejtjei összekeveredtek.

A BCCAO látványosan csökkentette a retina rétegeinek vastagságát az áloperált állatokhoz képest. A legkifejezettebb rétegvastagság csökkenés a plexiform rétegekben figyelhető meg, és ennek következtében a külső és a belső határmembránok közötti távolság szignifikánsan kisebbnek mutatkozott, mint a kontroll állatokban.

Az UCCAO és hipoxiás kezelés együttes alkalmazásának hatására a belső magvas réteg, belső és a külső rostos rétegek méretei jelentősen csökkentek, annak ellenére, hogy a külső sejt réteg vastagsága megnőtt. A csak hipoxia kezelésben részesült retina keresztmetszete kismértékben megnövekedett, a belső és a külső sejt rétegek vastagsága megnőtt, viszont a belső és a külső rostos rétegek mérete lecsökkent.

Az MSG modellekben jelentősen csökkent az immunjelölések erőssége és a jelölt sejtek száma a VGLUT-1, VGLUT-2, VGAT, calretinin, parvalbumin és TH immunfestés során. A horizontális sejteket calbindin immunreakcióval megjelölve látható, hogy a sejtek száma nem változott, míg méretük megnőtt.

DISZKUSSZIÓ

A glutamát indukálta toxicitás kulcsszerepet játszik számos ismert retina betegségben, mint pl. retinális ischémiában, amikor is egy kaszkád folyamat indul el, ami a retina sejtjeinek elhalásához vezet. Továbbá, a megemelkedett glutamát szint sejtroncsolást okoz a glaucomában szenvedő betegeknek. Eddigi eredményeink összefüggenek azzal a ténnyel, hogy az ionotróp glutamát receptorok nagy része a belső retinában helyezkedik el, következésképp az MSG kezelés a fotoreceptorokat nem befolyásolja, és csak a belső retina degenerálódik. Viszont eléggé meglepő, hogy az 1x-es MSG kezelés hatására a külső rostos rétegben számos degenerációt jelző folyamat elindul, amíg a belső rostos rétegre a kezelés nincs hatással. Csak kismértékű különbség volt a PD1 (amikor is az új sejtek kialakulnak) és a PD5 (ekkor történik a legintenzívebb szinaptogenezis) időpontban kezelt állatok között. Többszörös MSG kezelés hatására nem vártunk ilyen extenzív sérüléseket a külső rostos rétegben, csak kis változást lehetett látni fénymikroszkópos szinten. Érdekes módon a rövid idejű excitotoxikus inzultus hatására a külső és a belső rostos rétegeket egyenlő mértékben érte a károsodás. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a mi esetünkben az állatokat hosszú idővel a kezelés után öltük meg, így elég idő lehetett a strukturális újrarendeződésre. Összességében az 1x-es MSG kezelés csupán néhány apróbb ultrastrukturális változást okozott a szövetekben, ezért nem szolgál jó modellként arra, hogy neuroprotekción tanulmányozzunk a retinán. Legalább 2x-es MSG kezelés szükséges ahhoz, hogy a neuroprotekción tanulmányozására alkalmas, nagymértékű degeneráció létrejöhessen.

A megfelelő koncentrációjú MSG kezelés a sejt intracelluláris Ca^{2+} szintjének megemelésével a sejt halálát okozza. A Ca^{2+} kötő fehérjék a kapacitásuknak megfelelően ezt a megemelkedett szintet pufferelek. Az általunk elvégzett immunjelölések alapján elmondhatjuk, hogy az AII-es amakrin (parvalbumin tartalmú) és a ganglion (calretinin tartalmú), valamint a horizontális sejtek (calbindin tartalmú) egyaránt károsodtak. Az utóbbi sejtestjeinek átmérője megnőtt, ami a glutamát okozta excitotoxicitás kísérő tünete. A dopaminerg sejtek épsége függ az azokat érő, a fény által vezérelt szinaptikus bemenetektől. Mivel az MSG kezelés tönkretette ezeket az inputokat, így a dopaminerg sejtek is károsodtak (TH immunjelölés).

A BCCAO okozta ischémia által kiváltott retina degeneráció kulcsfontosságú faktorai a serkentő neurotranszmitter-ürülés, a glia diszfunkció, az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mennyiségének növekedése, a szabad gyökök felhalmozódása, a nitrogénmonoxid szint megemelkedése és a gyulladáscsökkentő sejtek által ürített toxikus mediátor anyagok megjelenése, pl. a tumor nekrozis faktor és az interleukin-1. Ez a komplex kaszkádfolyamat vezet a különböző sejtpopulációk vagy az egész retina degenerációjához, az ischémiát okozó esemény erősségétől és/vagy idejétől függően. Ennek az eseménysorozatnak következményeként a külső sejt és a külső rostos rétegeket is befolyásolja az ischémiás beavatkozás, összehasonlítva az MSG okozta degenerációval, ahol szinte az egész belső retina megsérül.

A retina oxigénellátása két különálló érrendszerből származik. A choroidea látja el oxigénnel a külső retinát, míg a belső retina oxigénellátását az ún. retinális cirkuláció biztosítja. A két érrendszer keringése eltérő. Ugyan kísérleteinkben az arteria carotis communis lekötésével csökkentettük a fotoreceptorok, a külső sejt és a

külső rostos rétegek vérellátását, ezáltal oxigénellátását is, viszont a belső retina sokkal érzékenyebb az oxigénhiányos állapotokra, így az egész retina károsodott.

Összességében megállapítható, hogy mindhárom általunk alkalmazott modell további neuroprotektív vizsgálatok végzésére alkalmas. További kutatásokat kívánunk folytatni a degenerációt elszenvedő sejtek típusára és a károsodás mechanizmusára vonatkozóan.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

Disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények

1. **Babai, N.**, Atlasz, T., Tamás, A., Reglődi, D., Tóth, G., Kiss, P., Gábrriel, R. (2006): Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 1070: 149-55.
2. Kiss, P., Tamás, A., Lubics, A., Lengvári, I., Szalai, M., Hauser, D., Horváth, ZS., Rácz, B., Gábrriel, R., **Babai, N.**, Tóth, G., Reglődi, D. (2006): Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 1070: 365-70.
3. Rácz, B., Reglődi, D., Kiss, P., **Babai, N.**, Atlasz, T., Gábrriel, R., Lubics, A., Gallyas, FJr., Gasz, B., Tóth, G., Hegyi, O., Tamás, A. (2006): In vivo neuroprotection by PACAP in excitotoxic retinal injury: review of effects on retinal morphology and apoptotic signal transduction. *Int. J. Neuroprot. Neurodeg.*, 2: 80-85.
4. **Babai, N.**, Atlasz, T., Tamás, A., Reglődi, D., Tóth, G., Kiss, P., Gábrriel, R. (2005): Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retinal degeneration. *Neurotox. Res.* 8: 227-233.

Disszertáció alapjául szolgáló konferencia előadások és poszterek

1. Kiss, P., Atlasz, T., **Babai, N.**, Tamás, A., Schäffer, D., Lubics, A., Reglődi, D., Tóth, G., Hegyi, O., Gábrriel, R. (2006): Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) protects rat retina against hypoxic/ischemic injury. 23rd Conf. Europ. Comp. Endocrinologists (CECE), Manchester, UK, poster abstract.
2. **Babai, N.**, Atlasz, T., Schäffer, D., Reglődi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Gábrriel, R. (2006): Evaluation of different neurodegeneration models in the rodent retina. 5th Forum Europ. Neurosci. (FENS), Vienna, Austria, A111.3, poster abstract.
3. **Babai, N.**, Atlasz, T., Schäffer, D., Reglődi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Gábrriel, R. (2006): Comparison of three different neurodegeneration models in the rat retina: monosodium-glutamate (MSG), hypoxic insult combined with unilateral carotis occlusion and bilateral carotis occlusion. *Int. Brain Res. Org (IBRO) Workshop, Budapest, Hungary, Vol. 59(S1)1-72*, poster abstract.
4. **Babai, N.**, Atlasz, T., Tamás, A., Reglődi, D., Gábrriel, R. (2005): Degree of damage compensation by various PACAP treatment regimes in monosodium glutamate-induced retinal degeneration. VII. Internat. Symp. on VIP, PACAP and Related Peptides, Rouen, France, poster abstract.
5. **Babai, N.**, Schäffer, D., Gábrriel, R. (2005): Photoreceptor distribution in retina of the spadefoot toad. IX. MITT Conf. Hungary, Pécs Clin.Neurosci./Ideggy. Szemle., 58: 1-112, poster abstract.

Egyéb tudományos közlemények

1. Olah, Z., Josvay, K., Pecze, L., Letoha, T., **Babai, N.**, Budai, D., Otvos, F., Szalma, S., Vizler, C. (2007): Anti-calmodulins and tricyclic adjuvants in pain therapy block the TRPV1 channel. *PLoS ONE.*, 20; 2: e545.
2. Atlasz, T., **Babai, N.**, Reglődi, D., Kiss, P., Tamás, A., Bari, F., Domoki, F., Gábrriel, R. (2007): Diazoxide is protective in the rat retina against ischemic injury induced by bilateral carotid occlusion and glutamate-induced degeneration *Neurotox. Res.*, 12: 1-8.

3. Atlasz, T., Kőszegi, Zs., **Babai, N.**, Tamás, A., Reglődi, D., Kovács, P., Hernádi, I., Gábrriel, R. (2006): Microiontophoretically applied PACAP blocks excitatory effects of kainic acid in vivo. *Ann. Ny. Acad. Sci.*, 1070: 143-8.
4. Atlasz, T., **Babai, N.**, Reglődi, D., Kiss, P., Tamás, A., Szabadfi, K., Tóth, G., Hegyi, O., Gábrriel, R. (2006): Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *Gen. Comp. Endocrin.*, 153: 108-14.
5. Atlasz, T., Kellenyi, L., Kovács, P., **Babai, N.**, Thuroczy, G., Hejmel, L., Hernadi, I. (2006): The application of surface plethysmography for heart rate variability analysis after GSM radiofrequency exposure. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 69: 233-6.
6. Kőszegi, Zs., Kovacs, P., Wilhelm, M., Atlasz, T., **Babai, N.**, Kallai, V., Hernadi, I. (2006): Microiontophoretic investigation of the effects of mast cells on neurons in the rat brain in vivo. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 69: 227-3.

Egyéb konferencia előadások és posztterek

1. **Babai, N.**, Atlasz, T., Kiss, P., Gábrriel, R., Bari, F., Domoki, F., Fekete, É., Zorilla, E.P., Reglődi, D. (2007): Különböző neuroprotektív anyagok hatásai retina degenerációs modellekben. X. MITT Konf., Szeged, legjobb poszter díj, poster abstract.
2. **Babai, N.**, Atlasz, T., Kiss, P., Gábrriel, R., Bari, F., Domoki, F., Reglődi, D. (2007): Comparison of diazoxide and PACAP as neuroprotective compounds on different retina degeneration models: histological and immunocytochemical investigations: III. Neurotox. Soc. Meet., Pucon, Chile, poster abstract.
3. Szabadfi, K., Atlasz, T., Csupor, D., Kőszegi, Zs., Kovács, P., **Babai, N.**, Hohmann, J., Hernádi, I. (2006): In vivo electrophysiological effects of aconitum alkaloids in the mammalian brain. MÉT LXX. Conf., Hungary, Szeged, poster abstract.
4. Atlasz, T., Kovács, P., Kellényi, L., Thuróczy, Gy., Ajtay, Z., Hejmel, L., **Babai, N.**, Hernádi, I. (2005): The effects of GSM mobile phones on heart rate and heart rate variability in young adults. 8th Symp. Instrum. Analysis, Austria, Graz, poster abstract.
5. Atlasz, T., **Babai, N.**, Uzsoki, B, Kovács, P., Hernádi, I. (2003): A yohimbin specifikus preszinaptikus alfa-2A/D noradrenerg receptor antagonistaként hat: elektrofiziológiai és magatartási bizonyítékok. IX. MITT Konf., Balatonfüred, Clin.Neurosci./Ideggy. Szemle 56, poster abstract.
6. Kovács, P., **Babai, N.**, Hernádi, I. (2002): NA-ergic receptors mediate the action of lithium on prerontal neurons of the rat. IBRO-MIT Symp., Hungary, Debrecen, Acta Physiol. Hung. 89, poster abstract.