



**Az adrenerg rendszer szerepe a könnymirigy vezetékrendszer folyadék  
szekréciónjában**

Szarka Dóra

Ph.D. Tézis

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Tóth-Molnár Edit, M.D., Ph.D.

Szegedi Tudományegyetem

Szemészeti Klinika

Szeged

2021.

## AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Szarka D**, Elekes G, Berczeli O, Vizvári E, Szalay L, Ding C, Tálosi L, Tóth-Molnár E.  
Alpha-Adrenergic Agonists Stimulate Fluid Secretion in Lacrimal Gland Ducts.  
Invest Ophthalmol Vis Sci 2020 Dec 1;61(14):3. doi: 10.1167/iops.61.14.3.

Scimago: Q1/D1      **Impact factor: 3,46** (2019)

2. Berczeli O, **Szarka D**, Elekes G, Vizvári E, Szalay L, Almássy J, Tálosi L, Ding C, Tóth-Molnár E.  
The regulatory role of vasoactive intestinal peptide in lacrimal gland ductal fluid secretion: A new piece of the puzzle in tear production.  
Mol Vis. 2020 Dec 6;26:780-788. eCollection

Scimago: Q2      **Impact factor: 2,21** (2019)

# 1. BEVEZETÉS

A komplex felépítésű könnyfilm megfelelő mennyisége és összetétele kritikus az egészséges, ép szemfelszín szempontjából. Külső határfelületét a lipid réteg alkotja, amely a szemhéjakban elhelyezkedő holokrin típusú Meibom-mirigyek által termelt olajos fázis. A mucinok elsősorban a kötőhártya kehelysejtjeiben, kisebb részben a fő és járulékos könnymirigyekben termelődnek. A vizes réteget a fő és járulékos könnymirigyek termelik.

A könnytermelés túlnyomó része az exocrin, tubuloacináris felépítésű könnymirigyben történik, melyet nagyrészt három sejttípus, az acinus, a duktális és a myoepiteliális sejt alkot. Fő tömegét a piramis alakúak, polarizált acinus sejtek képezik (80%). Elektrolitot, vizet, proteint szekretálnak, ez az elsődleges szekrétum. A duktális sejtek a sejttömeg kb. 15%-át teszik ki. Az acinusokat alkotó sejtek funkcióját számtalan vizsgálat tanulmányozta, így ezen sejtekkel kapcsolatban jelentős mennyiségű információ áll rendelkezésre. Bár az acinusok a könnytermelés meghatározó struktúrái, ugyanakkor a duktuszok szekréción funkciója (az acinusok által termelt szekrétum módosítása) is régóta gyanított volt, bár ez -munkánk kezdetéig- kísérletesen nem volt bizonyított.

A duktuszokban történő folyadékszekréció kísérletes bizonyítása a laboratóriumunkban történt videomikroszkópos technikával. A közelmúltig e struktúrák működésének vizsgálatára nem álltak rendelkezésre kísérleti modellek. Az új izolálási metodikával viábilis duktusz szakaszok nyerhetőek, így lehetővé vált a könnymirigy duktális epitélium transzport rendszereinek vizsgálata és a reguláció tanulmányozása.

Ennek a modellnek a felhasználásával kutatócsoportunk több ion transzporter funkcionális aktivitását vizsgálta és azonosította a polarizált duktális sejtekben. Ezek a kísérletek megerősítették a  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  -cserélő, a  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$  cserélő és a  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  kotranszporter 1 (NKCC1) funkcionális jelenlétét a nyúl könnymirigy-ductusz bazolaterális oldalán. A cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) egér könnymirigyben való jelenlétét vizsgálva megállapítottuk, hogy a CFTR protein elsősorban a duktuszok apikális membránjában található meg. A vazoaktív intesztinális peptid receptor 1. típusa (VPAC1) elsősorban a duktális, míg a vazoaktív intesztinális peptid receptor 2. típusa (VPAC2) mind a duktális, mind az acinális sejtek bazolaterális membránján fejeződnek ki. A könnymirigy kutatásban először CFTR KO egértörzsön vizsgálta csoportunk a paraszimpatikus szabályozás hatását a duktális folyamatokra, illetve a CFTR szerepét a paraszimpatikus szekréción működésben. A carbachol- és VIP-indukálta folyadék szekréción kísérletek közvetlen funkcionális bizonyítékot szolgáltattak a paraszimpatikus szabályozás fontosságára.

Könnymirigyét szimpatikus, paraszimpatikus és szenzoros idegek hálózzák be, a szekréció szabályozása azonban jelenleg még nem kellően tisztázott. Kiemelten igaz ez az adrenerg rendszerre, amelynek a mirigy működésében betöltött funkciója kevésbé ismert, a dukális szekrécióban vitt szerepe pedig ismeretlen. A könnyelválasztás mechanizmusának és regulációjának vizsgálata, ezen keresztül pedig a száraz szem betegség patomechanizmusának feltárása új, specifikus terápiás lehetőségek kidolgozásához nyithatja meg az utat. A könnymirigy vezetékrendszer működésének részletesebb megismerése is hozzájárulhat a könnytermelés fiziológias és patológias folyamatainak megértéséhez, ezáltal elősegítheti a száraz szem betegségben szenvedők célzott terápiájának kifejlesztését.

Az utóbbi évek vizsgálati eredményeinek tükrében megdőlni látszik az a korábbi hipotézis, hogy az adrenerg rendszernek elsősorban a mirigy vérátáramlásának szabályozásában van szerepe. Korábbi irodalmi adatok azt mutatják, hogy a nitrogén-monoxid/ciklikus guanozin-monofoszfát (NO/cGMP) útvonal szerepet játszik az acinus sejtek phenylephrine indukált fehérje szekréciójában patkány könnymirigy esetében. Ezekben a kísérletekben az adrenerg stimuláció acináris sejtekre vagy egész könnymirigy darabokra gyakorolt hatását vizsgálták. Az adrenerg stimuláció hatása, valamint a folyamat háttérben álló intracelluláris mechanizmusok a könnymirigy duktuszok esetében teljesen ismeretlenek. Ugyanakkor az eddigi adatok azt sugallják, hogy az  $\alpha$ -adrenerg hatásnak jelentős direkt szerepe lehet a könnymirigy dukális szekréció esetében is.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Alapvető célunk volt annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy adrenerg stimuláció indukál-e folyadékszekréciót egér könnyimirigy duktusz szegmentumokban. Ebből a célból az  $\alpha_1$ -adrenerg agonista fenilefrin (10  $\mu\text{M}$ ,  $\beta$ -antagonista [1  $\mu\text{M}$ ] propranolol jelenlétében), a  $\beta$ -adrenerg agonista izoprenalin (100  $\mu\text{M}$ ,  $\alpha$ -antagonista [10  $\mu\text{M}$ ] fentolamin jelenlétében), valamint a norepinefrin (10  $\mu\text{M}$ ) hatását vizsgáltuk videómikroszkópos módszerrel. Ez az utóbbi képes stimulálni mind az  $\alpha$ -, mind a  $\beta$ -receptorokat.
2. Az  $\alpha_1$  adrenerg agonista fenilefrin meglehetősen nagy folyadékszekréciót indukált izolált egér könnyimirigy duktusz szegmensekben, azonban még nem feltérképezett, hogy az  $\alpha_1$  adrenerg agonisták milyen szignál-transzdukciós útvonalon keresztül aktiválják a könnyimirigy duktuszok folyadékszekrécióját. Korábbi irodalmi adatok azt mutatják, hogy a NO/cGMP útvonal szerepet játszik az acinus sejtek fenilefrin-indukált fehérje szekréciójában patkány könnyimirigy esetében, ezért további célul tűztük ki a fenilefrin-indukált duktális folyadékszekréció intracelluláris szignáltranszdukciós útvonalainak felderítését.

### **3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

#### **3.1 Kísérleti állatok**

A kísérletekhez FVB/N egereket használtunk. Az állatok 12-16 hetesek voltak, súlyuk 18-22 g. Mindkét nemet 1: 1 arányban alkalmaztuk az összes kísérlethez. Az egereket intraperitoneálisan ketaminnal (80 mg/kg) és xilazinnal (10 mg/kg) narkotizálták, és pentobarbitál túladagolással (100 mg/kg) eutanizálták, majd az exorbitális könnymirigyeket eltávolítottuk. Az összes állatkísérletet az ARVO Állatok Szemészeti Kutatásban történő felhasználásáról szóló irányelveinek betartásával végeztük. Az Európai Parlament 2010/63 / EU irányelvének megfelelő vizsgálati protokollt a Szegei Tudományegyetem Állattenyésztési Kutatóintézetének etikai bizottsága jóváhagyta.

#### **3.2 Viabilis ductusz szegmentek izolálása**

Az eltávolított könnymirigyet DMEM/F-12 tároló oldatba helyeztük 4 °C-on. Ezt követte a szövet enzimátikus emésztése kollagenáz tartalmú DMEM/F-12+BSA izoláló oldattal, 6-7 perces inkubációs idővel (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>). Az emésztést követően 3x-i mosás következett DMEM/F-12 + BSA oldattal. Ezt követően a szövetet 30 percig pihentettük 4 °C-on. A mechanikus mikrodisszekcióval izolált intra-, és interlobuláris ductuszokat „overnight” inkubáltuk (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>). Tenyésztő oldatként FBS és glutamin tartalmú McCoy médiumot használtunk.

#### **3.3 Duktális szekréció vizsgálata videómikroszkópiával**

Az inkubáció során izolált ductusz szakaszok két vége leforr. Miután a szekretált folyadék a zárt intraluminális térbe kerül, a ductusz térfogata nő. A volumen változás videomikroszkópos módszerrel detektálható, kiértékelő szoftver (Scion Image; Scion Corporation, Frederick, MD, USA) segítségével pedig kvantitálható. A kinyert adatokból meghatározható a szekréciós ráta, amely a luminális oldali endothel sejtmembrán felület 1 mm<sup>2</sup>-re által 1 perc alatt szekretált folyadék mennyiségéről ad információt.

#### **3.4 Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szint [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mérése**

A ductuszokat Ca<sup>2+</sup>-szenzitív (FURA-2AM) festékkel inkubáltuk, majd Olympus IX71 típusú mikroszkóp és 40X-os nagyítású olaj-immersiós lencse segítségével tettük láthatóvá. Az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mérésénél az excitáció 380 nm-es és 340 nm-es fényel történt, a 380/340 - es emissziós arányt 510 nm-en detektáltuk.

### **3.5 Statisztikai analízis**

A dukális folyadékszekréció mennyiségének meghatározásához vegyes ANOVA modellt használtunk. Az L-NAME, ODQ és a BMY-7378 gátló hatásának vizsgálatához az adatokat a luminális térfogat (LV) százalékos változásaként fejeztük ki (a kiindulási LV-t 1,0-nek tekintettük). Az adatok elemzéséhez SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, Kalifornia, USA) statisztikai szoftvert használtunk. A 0.05-nél kisebb p értéket tekintettük szignifikánsnak.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 Különböző adrenerg agonista hatásának vizsgálata izolált könnymirigy duktuszok folyadék szekréciójára

#### 4.1.1 Noradrenalin

Az izolált duktusz szegmenseket videómikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Adrenerg agonista noradrenalin, különböző koncentrációkban (5, 10 vagy 20  $\mu\text{M}$ ) stimuláltuk a könnymirigy duktuszokat és tanulmányoztuk a szekréciós választ, illetve a dózis-válasz összefüggést. A noradrenalin mind az  $\alpha$ -, mind a  $\beta$ -adrenerg receptorokat stimulálja. A noradrenalin alkalmazása dózisfüggő, gyors folyadék szekréciós választ váltott ki. A leghatékonyabb koncentráció a 10  $\mu\text{M}$  bizonyult.

#### 4.1.2 Fenilefrin

Az  $\alpha_1$ -adrenerg agonista fenilefrin (10  $\mu\text{M}$ ) ( $\beta$ -antagonista [1  $\mu\text{M}$ ] propranolol jelenlétében) jelentős fluid szekréciót váltott ki. Noradrenalin (10  $\mu\text{M}$ ) hatására is jelentős fluid szekréciót detektáltunk. A fenilefrin és a noradrenalin-indukált duktális folyadék szekréció között nem volt kimutatható szignifikáns különbség ( $p = 0,42$ ), a szekréció kinetikája is hasonlóan mutatkozott. Az alkalmazott koncentrációk közül (5, 10 vagy 20  $\mu\text{M}$ ) a 10  $\mu\text{M}$  mutatkozott a leghatékonyabbnak.

Korábbi tanulmányok alapján tudjuk, hogy a könnymirigy acinus sejtjeiben jelen lévő  $\alpha$ -adrenerg receptor altípus az  $\alpha_{1D}$ , ezért megvizsgáltuk, hogy a fenilefrin-indukált folyadék szekréció eger könnymirigy duktusz szegmentekben  $\alpha_{1D}$ -receptoron keresztül valósul-e meg. Az  $\alpha_{1D}$ -adrenerg receptor gátló BMY-7378 hatását vizsgáltuk a fenilefrin stimulált duktális folyadékszékrecióra.

Az izolált duktuszokat 30 percig inkubáltuk a BMY-7378 különböző koncentrációival (1, 10, 100 és 200  $\mu\text{M}$ ), majd fenilefrint (10  $\mu\text{M}$ ) adtunk az  $\alpha_{1D}$  receptor antagonistát tartalmazó perfuzátumhoz. BMY 7378 blokkolta a fenilefrin-indukálta folyadékszékreciót, bizonyítva az  $\alpha_{1D}$ -adrenerg receptorok szerepét a megfigyelt szekréciós válaszban. A leghatékonyabb koncentráció 100  $\mu\text{M}$  volt.



### **4.1.3 Izoprenalin**

A  $\beta$ -adrenerg agonista izoprenalin (100  $\mu$ M) ( $\alpha$ -antagonista [10  $\mu$ M] fentolamin jelenlétében) nem váltott ki detektálható szekretoros választ. Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak 50, 100 vagy 200  $\mu$ M.

## **4.2 A fenilefrin által kiváltott duktális folyadék szekréció hátterében álló intracelluláris mechanizmusok vizsgálata**

Korábbi irodalmi adatok azt támasztják alá, hogy a NO/cGMP útvonal szerepet játszik az acinus sejtek fenilefrin-indukált fehérje szekréciójában patkány könnymirigy esetében. A következő kísérletsorozatban az NO/cGMP rendszernek a fenilefrin-indukált duktális folyadékszekrécióban betöltött potenciális szerepét vizsgáltuk.

### **4.2.1 Az L-NAME, endoteliális nitrogén-oxid-szintáz (eNOS) gátló hatása a fenilefrin által kiváltott duktális folyadék szekréciójára**

A könnymirigy duktuszokat 30 percig előinkubáltuk az eNOS-gátló L-NAME oldat különböző koncentrációival (100 $\mu$ M, 1 mM, 10 mM ), majd videomikroszkóp alatt vizsgáltuk a fenilefrint (10  $\mu$ M), illetve eNOS-gátlót tartalmazó oldat által kiváltott szekréciós hatást. A fenilefrin által kiváltott duktális folyadék szekréciót az L-NAME ugyan dózisfüggő módon csökkentette, azonban még a leghatékonyabb koncentráció (10 mM) alkalmazásával sem értünk el maximális gátló hatást ( $p = 0,023$ ).

### **4.2.2 A guanilil-cikláz inhibitor (ODQ) hatása a phenylephrine által kiváltott duktális folyadék szekréciójára**

A NO/cGMP út szerepének vizsgálatához a duktuszokat 30 percig előinkubáltuk különböző dózisú guanilil-cikláz inhibitor ODQ-val (0,1, 1, 10 vagy 100  $\mu$ M), majd videomikroszkóp alatt vizsgáltuk a fenilefrint (10  $\mu$ M) és ODQ-t tartalmazó oldat hatását. A guanilil-cikláz ODQ-val történő gátlása dózisfüggő módon csökkentette a fenilefrin által indukált folyadék szekréciót. A maximális gátlás 100  $\mu$ M ODQ koncentráció mellett következett be. Az ODQ hatása hasonló volt ahhoz, amelyet az L-NAME az előző kísérletekben produkált: csökkentette, de nem gátolta teljesen a fenilefrin által kiváltott duktális folyadék szekrécióját ( $p=0.0008$ ).

### **4.2.3 Fenilefrin által indukált $\text{Ca}^{2+}$ szignál az izolált könnyemirigy duktusz szakaszokban**

Míg az  $\alpha_{1D}$  receptor blokkolása teljesen megszüntette a fenilefrin által kiváltott duktális folyadék szekrécióját, az eNOS vagy a guanilil-cikláz gátlása jelentősen csökkentette, de nem tudta teljesen blokkolni. E jelenség hátterében feltételeztük, hogy az  $\alpha_{1D}$  adrenerg receptor aktivás során bekövetkezett  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedés hozzájárulhatott a duktuszok folyadék szekréciójához. Ennek az elméletnek a vizsgálatához a következő kísérletsorozatban az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  változását mértük a fenilefrin stimulációra adott válaszként. Ezekben a kísérletekben az alkalmazott fenilefrin koncentráció 10  $\mu\text{M}$  volt, hasonlóan a folyadék szekréciós kísérleteihez.

Az  $\alpha_1$ -adrenerg receptorok fenilefrinnel történő stimulálása a duktális sejtek  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintjének kis mértékű, de statisztikailag szignifikáns növekedését eredményezte ( $p = 0,012$ ). Ennek a növekedésnek a mértéke kisebb volt, mint a carbachol stimuláció során megfigyelt  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedés.

### **4.2.4 Az L-NAME és a $\text{Ca}^{2+}$ -kelátor BAPTA-AM együttes alkalmazásának hatása a fenilefrin által kiváltott duktális folyadék szekrécióra**

A BMY-7378-al ellentétben az eNOS inhibitor L-NAME jelentősen csökkentette, de nem teljesen blokkolta a fenilefrin által kiváltott duktális folyadék szekréciót. Az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  változás potenciális szerepének tisztázására sejtp permeábilis  $\text{Ca}^{2+}$  kelátort alkalmaztunk (BAPTA-AM). Az izolált duktusz szakaszokat 20-30 percig inkubáltuk BAPTA-AM (10  $\mu\text{M}$ ), illetve L-NAME (10 mM) oldatban. A vizsgálathoz használt perfúziós oldat a fenilefrin és az L-NAME (10 mM) mellett tartalmazta a  $\text{Ca}^{2+}$  kelátort is (10  $\mu\text{M}$ ). Együttes alkalmazásuk teljesen blokkolta a fenilefrin által indukált folyadék szekréciót.

### **4.2.5 Az ODQ és a $\text{Ca}^{2+}$ -kelátor BAPTA-AM együttes alkalmazásának hatása a fenilefrin által kiváltott duktális folyadék szekrécióra**

A fenilefrin által stimulált szekréciót ODQ és intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -kelátor BAPTA-AM együttes jelenlétében is tanulmányoztuk. Az izolált duktuszokat ODQ-val (100  $\mu\text{M}$ ) és BAPTA-AM-al (10  $\mu\text{M}$ ) inkubáltuk. A vizsgálathoz használt perfúziós oldat fenilefrin és az ODQ (100  $\mu\text{M}$ ) mellett tartalmazta a  $\text{Ca}^{2+}$  kelátort (10  $\mu\text{M}$ ) is. Együttes alkalmazásuk blokkolta a fenilefrin által indukált folyadék szekréciót: a lumen térfogat változása az alapértékhez képest nem szignifikáns.

## 5. MEGBESZÉLÉS

A könnyelválasztás az autonóm idegrendszer szabályozása alatt áll. A paraszimpatikus és szimpatikus idegrostok pozitív és negatív reguláló hatással kontrollálják a szekréción. Laboratóriumunk feltárta a paraszimpatikus stimuláció szerepét a dukális folyadék szekréción szabályozásában, korábbi tanulmányaink igazolták a carbachol és a VIP szekréción hatását izolált könnymirigy duktuszokon.

A paraszimpatikus beidegzés általánosan elfogadott, meghatározó szerepe mellett egyre több kísérletes bizonyíték áll rendelkezésre a szimpatikus idegrendszer könnymirigy működésére gyakorolt közvetlen hatásáról. Ugyanakkor ezek az eredmények acinus sejteken, egész könnymirigyen vagy mirigydarabokon végzett vizsgálatokból származnak.

Dolgozatomban bemutatásra került az adrenerg stimuláció szerepe a könnymirigy dukális folyadék szekréción szabályozásában. A noradrenalin, a szervezetben fiziológiásan előforduló adrenerg neurotranszmitter alkalmazása gyors és robusztus folyadék szekréción váltott ki az izolált duktusz szegmensekben. Figyelembe véve a megfigyelt intenzív választ, a szimpatikus stimulációnak funkcionálisabb jelentősége lehet, mint azt korábban hittük. A noradrenalin mind az  $\alpha$ , mind a  $\beta$  adrenerg receptorokat stimulálja, így kísérleteink során tovább vizsgáltuk a megfigyelt szekréción válasz farmakológiai hátterét. Az  $\alpha$ -adrenerg receptorok fenilefrinnel történő stimulálása a  $\beta$ -adrenerg blokkoló propranolol jelenlétében erőteljes dukális folyadék szekréción eredményezett, hasonlóan a noradrenalin alkalmazása során megfigyeltékhez. Ezzel szemben a  $\beta$ -adrenerg receptorok izoprenalinnal történő aktiválása  $\alpha$ -adrenerg antagonistá fentolamin jelenlétében nem váltott ki folyadék szekréción. Eredményeink igazolni látszanak az  $\alpha$ -adrenerg rendszernek a könnymirigy dukális folyadék szekréciónjában betöltött jelentős szerepét

Az  $\alpha_1$ -adrenerg receptorok három altípusát különböztetjük meg az  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  és  $\alpha_{1D}$  altípusokat. A könnymirigy szövete egyaránt tartalmaz  $\alpha_{1B}$ - és  $\alpha_{1D}$ -adrenerg receptorokat. Az  $\alpha_{1D}$  a domináns e két altípus közül, míg  $\alpha_{1A}$ -adrenerg receptorok nem találhatóak a könnymirigyben. Az  $\alpha_{1D}$ -adrenerg receptorok sejtfunkciónban betöltött szerepéről korlátozott ismereteink vannak, a receptor szubtípus szerepe és funkciónja a könnymirigy dukális epitél sejtek esetében nem ismert. Kísérleteink során a BMY-7378 szelektív  $\alpha_{1D}$  receptor blokkoló teljesen megszüntette a fenilefrin által kiváltott dukális folyadék szekréción. Saját kísérleteink azt mutatják, hogy az egér könnymirigy duktuszok folyadék szekréciónjában az  $\alpha$ -adrenerg hatásnak jelentős direkt szerepe lehet. Ez a hatás  $\alpha_{1D}$  receptorokon keresztül iniciálódik. Az  $\alpha_{1D}$ -adrenerg rendszer által stimulált dukális folyadék szekréción háttérben álló intracelluláris

mechanizmusok tisztázása érdekében kísérleteinkben az NO/cGMP útvonal szerepét vizsgáltuk. Az eNOS inhibitor L-NAME és a guanilil-cikláz inhibitor ODQ egyaránt csökkentette, de nem tudta teljesen blokkolni a fenilefrin által kiváltott dukális folyadék szekréciót. Ez az eredmény eltért a Hodges és mtsai által patkány könnymirigy acinus sejtek esetében talált eredményektől, ahol az L-NAME vagy az ODQ alkalmazása a fenilefrin által kiváltott fehérje szekréció teljes blokkolását eredményezte. Bár eredményeink igazolták, hogy a  $\alpha_1$ -adrenerg agonisták az NO/cGMP útvonalat használják, a részleges blokkolás hátterében egy további NO/cGMP útvonaltól független mechanizmus jelenlétét feltételeztük. Mivel az  $\alpha$ -adrenerg stimuláció általában a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitelhez kapcsolódik, a fenilefrin intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szintre gyakorolt hatását vizsgálták. A stimuláció az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint kismértékű emelkedését eredményezte. A megfigyelt  $\text{Ca}^{2+}$  szignalizáció szerepének meghatározásához további kísérletsorozatot végeztünk el, melyben  $\text{Ca}^{2+}$  kelátképző BAPTA-AM-t alkalmaztunk. BAPTA-AM jelenlétében az L-NAME, illetve az ODQ teljesen blokkolta a fenilefrin által kiváltott dukális folyadék szekréciót, rámutatva az NO/cGMP útvonal-független  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli mechanizmus szerepére.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Összegzésként elmondható, hogy eredményeink számos új információval szolgálnak a könnyimirigy duktális rendszerének adrenerg szabályozásával kapcsolatban. Eredmények azt támasztják alá, hogy a szimpatikus regulációnak közvetlen szerepe van a könnyimirigy duktális folyadék szekréciójának szabályozásában.

Az alfa-adrenerg stimuláció jelentős folyadék szekréciót indukált az izolált egér duktusz szakaszokon, míg béta adrenerg hatásra nem keletkezett detektálható szekréciós effektus. Ez az eredmény arra utal, A fenilefrin-indukált folyadék szekréció egér könnyimirigy duktusz szegmentekben  $\alpha_{1D}$ -receptor keresztül valósul meg. A BMY 7378 blokkolta a fenilefrin-indukálta folyadékszékreciót, az eNOS és a guanilil-cikláz inhibitor csökkentette, de nem teljesen blokkolta azt, igazolva ezzel az NO/cGMP útvonal döntő, de nem egyedüli szerepét a jelátvitelben. Kísérleteink rávilágítottak egy, a NO/cGMP útvonaltól független  $Ca^{2+}$  jelátviteli mechanizmusra is a duktális folyadék szekréció esetében.

Az értekezésben a könnyimirigy duktuszok funkciójával kapcsolatban igazolt új eredmények a következők:

- 1. Eredményeink igazolták a szimpatikus idegrendszer szerepét a duktális folyadék szekréció szabályozásában**
- 2. Az  $\alpha$ -adrenerg stimuláció rapid folyadék szekréciós választ váltott ki az izolált egér könnyimirigy duktusz szegmensekben**
- 3. A  $\beta$ -adrenerg receptorok aktiválása nem eredményezett kimutatható szekréciós hatást**
- 4. A szelektív  $\alpha_{1D}$  receptor blokkoló BMY-7378 (100  $\mu$ M) teljesen megszüntette a fenilefrin által kiváltott duktális folyadék szekréciót, bizonyítva az  $\alpha_{1D}$ -adrenerg receptorok szerepét a megfigyelt szekréciós válaszban**
- 5. Az e-NOS inhibitor L-NAME (10 mM) és a guanilil-cikláz inhibitor ODQ (100  $\mu$ M) csökkentette, de nem teljesen szüntette meg a fenilefrin-indukált folyadék szekréciót, amely az NO/cGMP útvonal jelentős, de nem kizárólagos szerepét igazolta**
- 6. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint fenilefrin-indukált emelkedésének kisebb, de szignifikáns szerepe van az  $\alpha$ -adrenerg stimuláció duktális folyadékszékrecióra gyakorolt hatásában.**

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Tóth-Molnár Editnek** a Szemészeti Klinika tanszékvezetőjének a támogatásáért és iránymutatásáért. Rengeteget tanultam Tőled mind szakmailag, mind emberileg!

Hálás vagyok **Prof. dr. Varró Andrásnak**, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet korábbi tanszékvezetőjének, **Prof. dr. Hegyi Péternek** és **Dr. Venglovecz Viktóriának**, akik lehetőséget biztosítottak kutatómunkám elvégzéséhez a laboratóriumukban.

Továbbá szeretném megköszönni kollégáimnak és barátaimnak, **Elekes Grétának**, **Dr. Berczeli Orsolyának**, **Dr. Vizvári Eszternek** és a Gasztroenterológiai Multidiszciplináris Kutatócsoport tagjainak a közös emlékeket.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak különösen **dr. Szarka Ádámnak**, **Smaniotta Nikoletta Noéminek** a türelmükért és a tanulmányaim során nyújtott támogatásukért. Köszönöm, hogy mellettem álltok!