

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Wachal Zita

**A BGP-15 retinoprotektív hatásának funkcionális
és molekuláris biológiai vizsgálata Goto-Kakizaki
és Zucker Diabetic Fatty (ZDF) diabéteszes
állatmodelleken**

**DEBRECENI EGYETEM
TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2023.**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A BGP-15 retinoprotektív hatásának funkcionális és
molekuláris biológiai vizsgálata Goto-Kakizaki és Zucker
Diabetic Fatty (ZDF) diabéteszes állatmodelleken**

Dr. Wachal Zita

Témavezető: Dr. Varga Balázs



**DEBRECENI EGYETEM
TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2023.**

Tartalomjegyzék

Gyakran használt rövidítések jegyzéke	0
1. Bevezetés és célkitűzés.....	1
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. A szem felépítése.....	4
2.2. A retina finomszerkezete	6
2.3. A látás fizikai- és biokémiai alapjai	9
2.4. Az elektroretinográfia.....	10
2.5. A diabetes mellitus	13
2.5.1. A diabéteszes retinopátia.....	14
2.5.2. A diabetes mellitus gyógyszeres kezelése.....	16
2.6. A BGP-15	19
3. Anyagok és módszerek.....	20
3.1. Kísérleti állatok	20
3.2. Glükózháztartás monitorozása.....	21
3.2.1. Éhomi vércukorszint.....	21
3.2.2. Orális glükóz tolerancia teszt (OGTT).....	22
3.2.3. Hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC).....	22
3.2.4. Számolt mutatók.....	23
3.3. A túlélési görbe kiszámolása és kiértékelése.....	24
3.4. Elektroretinográfia (ERG)	24
3.5. Western blot.....	26
3.7. Kísérleti protokollok és csoportok.....	27
3.7.1. Kísérlet Goto-Kakizaki patkányokkal	27
3.7.2. Kísérlet ZDF-patkányokkal	28
3.8. Statisztika	29
4. Eredmények	30
4.1. A Goto-Kakizaki patkánykísérlet eredményei	30
4.1.1. Testtömeg-gyarapodás.....	30
4.2. A ZDF patkánykísérlet eredményei.....	42
4.2.1. Túlélési analízis eredmények	42
4.2.2. OGTT eredmények	43
4.2.3. ERG eredmények.....	46
4.2.4. Western Blot eredmények	48
5. Megbeszélés	50

6. Összefoglalás - Summary	60
7. Irodalom	61
7.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom.....	61
7.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló és további megjelent közlemények.....	72
8. Tárgyszavak	74
9. Köszönetnyilvánítás.....	75
10. Függelék.....	76

Gyakran használt rövidítések jegyzéke

AGE	Advanced Glycation Endproduct; „fokozott glikációban keletkező végtermékek” – nincs meghonosult magyar megfelelője
ATP	Adenozin-trifoszfát; adenosin tri-phosphate
AUC	area under curve; görbe alatti terület
BGP-15	O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav amidoxim
DR	Diabéteszes Retinopátia
ERG	elektroretinográfia
GI	glükóz infúzió sebessége
GK	Goto-Kakizaki patkány
Goto kontrol	kezeletlen Goto-Kakizaki (beteg) patkánycsoport
HEGC	Hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp
HSP	Heat Shock Protein, hő sokk fehérje
ISCEV	International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, A látás klinikai elektrofiziológiájának nemzetközi társasága (irányelv)
MMP9	mátrix metalloproteináz 9 fehérje
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid redukált állapotban
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált állapotban
NFkB	nukleáris faktor κ B
OGTT	orális glükóztolerancia-teszt
SEM	standard error of the mean; az átlagok standard hibája
SIRT1	sirtuin 1 fehérje
ZDF	Zucker diabetic fatty, Zucker (szerzői név) diabéteszes elhízott patkány
WB	Western Blot (fehérje kifejeződést kielemező módszer)

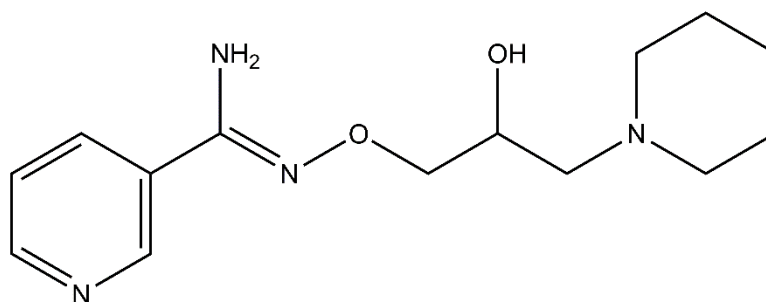
1. Bevezetés és célkitűzés

A diabetes mellitus egy világméretű probléma a fejlődő országokban, mely évről évre egyre több embert érint. A diabéteszes betegek száma az 1980-as 108 milliőről 2014-re 422 millióra emelkedett a 2018-as WHO statisztikák szerint (WHO, 2023). A diabétesz legtöbb krónikus komplikációja a makro- és mikroangiopátiából ered, mint a koronária, cerebrovaszkuláris és periférás érbetegségek, a diabéteszes nefropátia, neuropátia és retinopátia.

A diabetes mellitus gyakori mikrovaszkuláris szövődménye, a diabéteszes retinopátia a vakság egyik vezető oka világszerte (Cheung és mtsai., 2010). A magas vércukorszint a retina ereinek működését teszi tönkre és következményes iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodásokat okoz (Lu és mtsai., 2018). Klinikailag a diabéteszes retinopátia 4 szakaszon keresztül alakul ki, ideértve a preretinopátiát, az enyhe nonproliferatív vagy háttérretinopátiát, a súlyos nonproliferatív vagy preproliferatív retinopátiát és végül a proliferatív retinopátiát (Wong és mtsai., 2016; Lechner és mtsai., 2017). A nonproliferatív retinopátia során diagnosztikus jellemzők a szemfenéki elváltozások: az intraretinális mikroaneurizmák és vérzések, a lipid exszudátumok, a gyapottépes-foltok és az ödémák (Wong és mtsai., 2016). A neovaszkularizáció következtében fellépő proliferatív retinopátia következménye akár látásvesztés is lehet (Wong és mtsai., 2016; Wang és Lo, 2018). A látás romlása funkcionálisan mérhető elektroretinográfia (ERG) segítségével akár laboratóriumi állatok esetén is (Varga és mtsai., 2011; Varga és mtsai., 2013).

Bár a cukorbetegségnek számos genetikai patkánymodellje is létezik, mint például a Zucker diabéteszes zsíros (Zucker diabetic fatty, ZDF), az Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF), a biobreeding (BB), a Wistar Bonn/Kobori (WBN/Kob), a Spontán Diabéteszes Torii (SDT) és a Goto-Kakizaki (GK), nincs "legjobb modell" az embereknél tapasztalt cukorbetegség 100 százalékos utánzására (Olivares és mtsai., 2017; Pandey és Dvorakova, 2020). A ZDF patkány egy eredetileg elhízott/zsíros patkánytörzsben, nevezetesen a Zucker patkányokban fellépő mutáció eredménye, amelynek következtében az elhízott ZDF patkányok glükóz intoleranciát, hiperinzulinémiát és végül 2-es típusú cukorbetegséget mutatnak a mutáció okozta leptinrezisztencia miatt (Al-Awar és mtsai., 2016). A ZDF-en túl az OLETF és a BB is monogén állatmodellek, az előbbi elhízást és II-es típusú cukorbetegséget okozó G-fehérje mutációt tartalmaz, az utóbbi pedig egy I-es típusú diabétesz modell a limfoid immunsejtek autoimmun választ okozó mutációja miatt (Olivares és mtsai., 2017). A GK, a WBN/Kob és az SDT patkányok a poligén diabéteszes

retinopátiás állatmodellek csoportjába tartoznak, mindegyik más-más életszakaszban II-es típusú cukorbetegséget produkál (Olivares és mtsai., 2017). Munkám során először GK patkányokkal végeztünk kísérleteket; ebben a modellben azonban nem alakul ki a klinikai környezetben gyakori elhízás (Akash és mtsai., 2013), ezért munkám második fázisában ZDF állatokon dolgoztunk. A ZDF patkány esetében a II-es típusú cukorbetegség kialakulásának folyamata és számos jellemzője, mint például az elhízás kialakulására való hajlam, megegyezik az emberrel (Rees és Alcolado, 2005; Pandey és Dvorakova, 2020). A 2-es típusú cukorbetegség emberben is hasonló tünetekkel alakul ki, kezdve a glükóz intoleranciától a nyilvánvaló cukorbetegségen át a cukorbetegség súlyos következményeiig, mint amilyen például a diabéteszes retinopátia (Rees és Alcolado, 2005; Heng és mtsai., 2013). A retinopátia patológias folyamata tisztán vizualizálható elektroretinográfia (ERG) alkalmazásával, mely módszer alkalmas egyes kísérleti anyagok betegség-csökkentő hatásainak mérésére is (Varga és mtsai., 2011; Varga és mtsai., 2017).



- 1. ábra:** Az O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav amidoxim, másnéven BGP-15 hidroxámsav-származék kismolekula kémiai képlete (az ábra a ChemDraw Ultra szoftverrel készült, CambridgeSoft, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)

Munkacsoportunk már több kísérletet végzett retinoprotektív molekulákkal cukorbeteg állatokon a retina károsodásának kivédésére. A BGP-15 (1. ábra) egy ígéretes jövőbeli gyógyszerfejlesztési célmolekula (Pető és mtsai., 2020), melyet – mivel kémiaailag rokon a propranolollal – először szív- és érrendszeri célokra fejlesztettek ki, jöhet azóta már számos különböző, diabétesssel és iszkémia-reperfúzióval is összefüggő betegségben próbálták ki, úgy mint szív iszkémia-reperfúzióban (Szabados és mtsai., 2000; Halmosi és mtsai., 2001; Lampé és mtsai., 2020), vesetoxicitásban (Racz és mtsai., 2002), neuropátiában (Bárdos és mtsai., 2003; McQuade és mtsai., 2018), miopátiában (Sorensen és mtsai., 2017), és különösképpen inzulin rezisztencia ellen (Literati-Nagy és mtsai., 2009; Literati-Nagy és mtsai., 2012). Maga a cukorbetegség is összefügg az ischaemia-reperfúziós károsodással: a lokális ischaemia például fokozza a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF)

expresszióját is, ami aztán neovaszkularizációval járó proliferatív retinopátiához vezet (Lechner és mtsai., 2017). Így tehát a cukorbetegség fent említett látáskárosító következményeihez vezető háttéreseményeknek bizonyítottan részét képezik a retina ischemia-reperfúziós sérülései is (Calderon és mtsai., 2017). Ugyanakkor kutatómunkám kezdetén a BGP-15-öt még senki sem vizsgálta diabéteszes retinopátiában, jóllehet a hatásmechanizmusa miatt ilyen megbetegedések kezelésére vagy megelőzésére is potenciális jelölt.

Ezen korábbi eredmények alapján első kísérletünk célja volt felmérni a szisztémás BGP-15 hatásait a glükóz retinakárosító hatásával szembeállítva egy inzulin rezisztens állatmodellen, GK patkányon. Továbbá elektroretinográfia segítségével össze kívántuk hasonlítani a BGP-15 lehetséges retinoprotektív hatását standard anti-diabetikus gyógyszerekkel: metforminnal, glibenklamiddal illetve pioglitazonnal, a fő anti-diabetikum csoportok képviselőivel. Megkíséreltük a kezelések esetén megfigyelt retinoprotekció hatásmechanizmusának felderítését is: meg kívántuk vizsgálni a BGP-15 a sirtuin 1 (SIRT1) és mátrix-metalloproteináz 9 (MMP9) fehérjék expressziójára kifejtett lehetséges hatását.

Potenciális jövőbeni gyógyszerfejlesztési célok megalapozásaként második tanulmányunkat a hosszú távú BGP-kezelés esetleges mellékhatásainak felmérésére végeztük: ennek a kísérletnek az volt a célja, hogy megtudjuk, okoz-e a BGP-15 hosszú időn keresztül vizsgálva korai halálózást, és ha igen, milyen okok miatt. Itt a GK helyett ZDF patkányokat használtunk, hogy elhízásra hajlamos, diabéteszes állatokon tudjunk kísérletezni hosszú távon: ennek jelentős klinikai vonatkozása van, mivel a legtöbb II-es típusú cukorbetegségben szenvedő beteg túlsúlyos (Reinehr, 2005; 2013). Munkám a már többször említett elektroretinográfias mérésen alapszik, ami egy viszonylag könnyen kivitelezhető és jól reprodukálható módszer, amely pontos információt ad az állatok látásáról, a retina funkciójáról. Ebben a második kísérletben az állatok az egy éves periódus alatt teljesen kontrollálatlan (inzulinnal illetve anti-diabetikumokkal nem kezelt) cukorbetegségben szenvedtek és naponta tápszondán keresztül kapták a kezelési anyagot, a BGP-15-öt.

2. Irodalmi áttekintés

Az ideghártya vagy retina károsodása több szemészeti betegségben megjelenik, mint például zöld hályogban (glaucoma), és a cukorbetegség szövődményeként kialakuló látáskárosodásban (retinopathia diabetica). Bár két teljesen különböző etiológiájú betegség, mindkettő akár teljes vaksághoz is vezethet, további hasonlóság a két betegség között, hogy mindkettő kapcsolatban áll az oxidatív stresszel, vagyis az oxigén hiány miatt kialakuló érkárosodás talaján alakulnak ki. Egyes becslések szerint a glaukómával érintett betegek száma 2040-re akár 118 millióra emelkedhet (GlaukómaSzP, 2023), míg a diabéteses szemészeti betegek száma 2045-re akár 160 millióra is nőhet (Teo és mtsai., 2021).

A retina funkcióját állatkísérletekben elektroretinográfiával lehetséges vizsgálni, melynek segítségével ígéretes hatóanyagmolekulák protektív hatását is tesztelhetjük. Bár betegállatmodelleken végzett vizsgálataink a gyógyszerfejlesztés kezdeti, hatóanyagfejlesztési/felfedezési fázisára tehetők, eredményeink hosszú távon akár jövőbeli gyógyszerfejlesztésekhez is alapul szolgálhatnak. Erre azért is van nagy szükség, mivel a klinikusok számára ezekben a betegségekben kevés bizonyítékokon alapuló, oki terápia – tehát a kiváltó okok megszüntetését célzó kezelés – áll rendelkezésre.

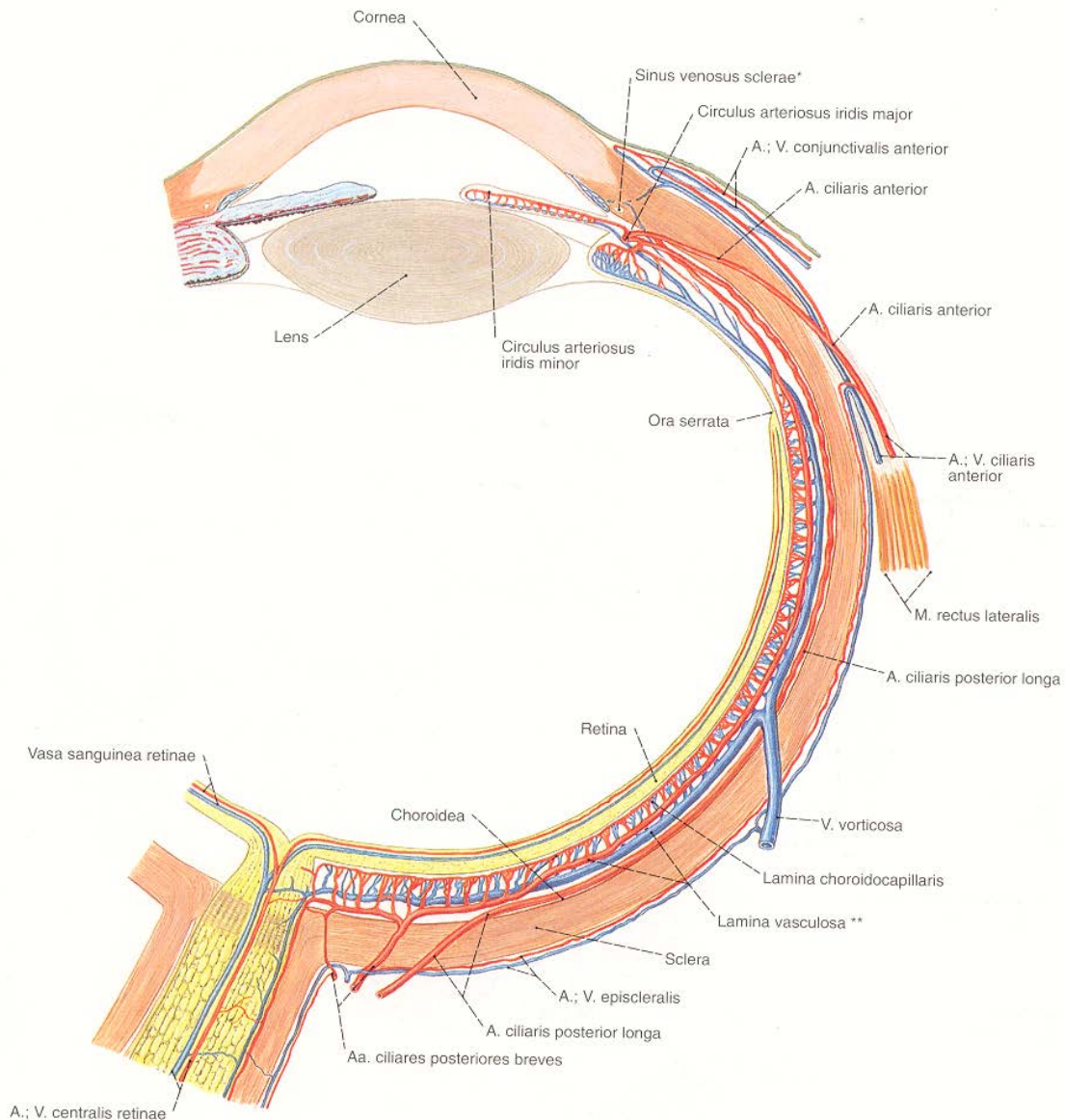
Kísérleteink bemutatás előtt röviden összefoglalom a kutatás szakirodalmi hátterét.

2.1. A szem felépítése

Szemünk a látásra, fény érzékelésre specializálódott szervünk, mely a szemgolyóból, az ingerületet a központi idegrendszerbe továbbító látóidegből és a szem mozgátását végző izmokból, a védő- és könnykészülékekből – közösen járulékos szervekből – áll (Röhlich, 2006).

A szemgolyó felépítését az 2. ábrán keresztül mutatom be. Felépítésében kívülről befelé haladva három réteg vesz részt: a külső vagy rostos burok (**tunica fibrosa**), a középső burok vagy érhártya (**uvea**, tunica vasculosa) és a belső burok vagy ideghártya (**retina**). A rétegeket a belülről kifelé irányuló nyomás, a szem belsejében található csarnokvíz és üvegtest nyomása feszíti ki gömb alakúvá (Kolb, 1995).

A rostos burok (**tunica fibrosa**) két részből áll: elől a gömb alakból kissé kidomborodó, átlátszó része a szaruhártya (**cornea**), ettől hátrafelé – a szemünk fehérje – az úgynevezett ínhártya (**sclera**). A sclera és a cornea belső határán található a Schlemm-csatorna, mely az elülső csarnokzug csarnokvizének elvezetésében jelentős.



2. ábra: Az emberi szem felépítése (Putz és Pabst, 1994)

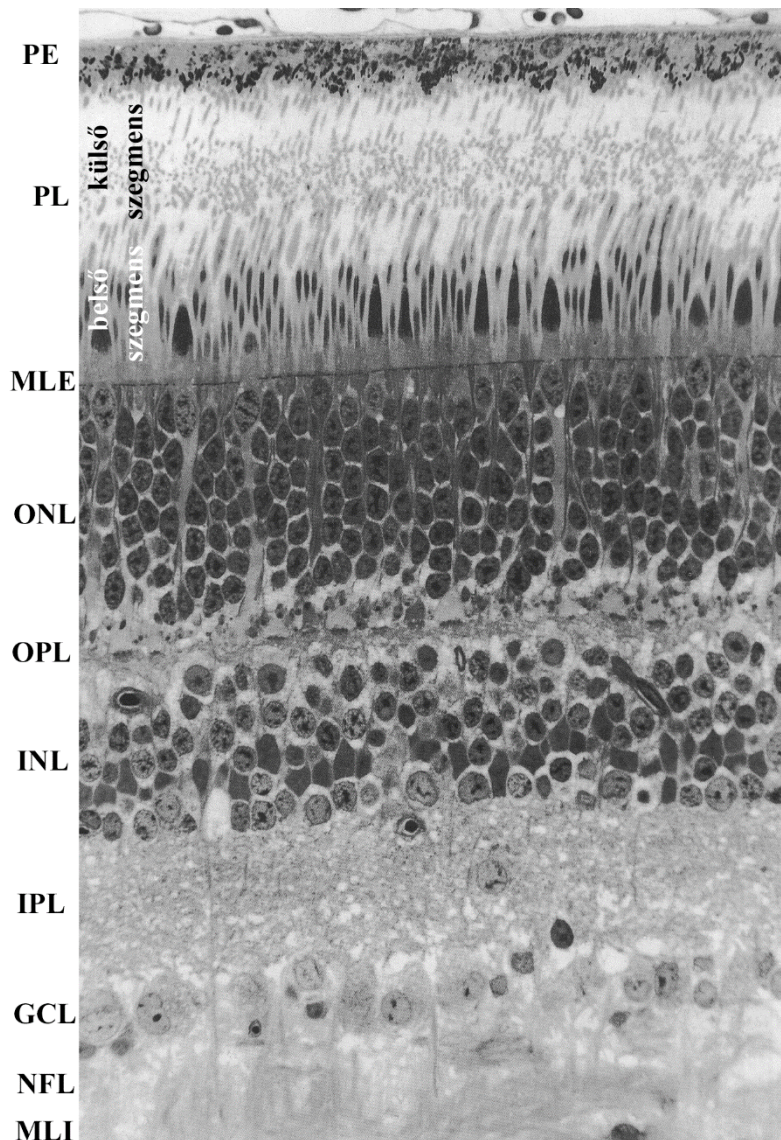
A középső burok, az érhártya (**uvea**) tartalmazza a szem ereit; hátsó része a szűkebb értelemben vett érhártya (**choroidea**), ez elöl az ún. sugártestbe (**corpus ciliare**) majd a szemünk színét adó szivárványhártyába (**iris**) megy át. A szivárványhártya közepén található nyílás a pupilla. A sugártest termeli a csarnokvizet, valamint fontos része a sugárizom (musculus ciliaris), mely a lencsefüggesztő rostokat és ezeken keresztül magát a lencsét feszíti ki ezáltal szabályozva annak domborúságát a közel vagy távollátás függvényében (ezt hívjuk akkomodációnak). Nem ez szabályozza viszont a pupilla tágasságát (és ezáltal a beengedett fény mennyiségét): a szivárványhártyának saját körkörösen elhelyezkedő, pupilla szűkítő és küllőszerűen futó, pupilla tágító simaizmai vannak. A szivárványhártya színét

annak vastagsága, vérteltsége és pigmentáltsága határozza meg, mely a genetikai háttértől függ (Kolb, 1995).

Az ideghártya (**retina**) tulajdonképpen egy fényérzékeny idegszövet, az agyunk kihelyezett része. A magzati fejlődés során egy gömbölyű agyhólyagból alakul ki úgy, mintha egy leengedett gumilabdát a két kezünk között kehely alakúvá préselnénk össze, öklünkkel másik tenyerünkbe nyomva a labda két szemközti oldalát. A külső sejt sorból lett az egy sejtrétegű pigment epithélium, a belső sejtréteg (az ún. *ora serrata* tapadási vonaltól hátrafelé) megvastagodott és több sejtréteggé, sokféle sejté differenciálódott (kívülről befelé haladva): fotoreceptorokká (csapok és pálcikák), bipoláris, Müller-, horizontális, amakrin és ganglion sejtekké. A ganglion sejtek nyúlványai összeszedődnek és közösen képezik a látóideget, mely egy pontban lép ki a szemszerlegből a retina vénáival és artériáival (arteria/vena centralis retinae) együtt. Itt nincsenek fotoreceptorok, ezért is hívják ezt a területet vakfoltnak. Egy másik nevezetes terület a sárgafolt (macula), aminek a közepe az éles látás helye (fovea centralis): itt csak csapok, azoknak is csak a fényérzékő részei találhatóak viszont ezek nagyon nagy sűrűségben. A retina itt vékonyabb mint máshol (fovea = gödör, bemélyedés), a fotoreceptorokhoz érkező fényt semmilyen sejt nem takarja, mely segíti az éles látást. Mint ahogy az is, hogy itt a csapok ingerületét külön-külön bipoláris sejtek vezetik el egyesével, míg a szemben mindenhol máshol több fotoreceptor sejt ingerülete szedődik össze egy-egy bipoláris sejt által (Kolb, 1995).

2.2. A retina finomszerkezete

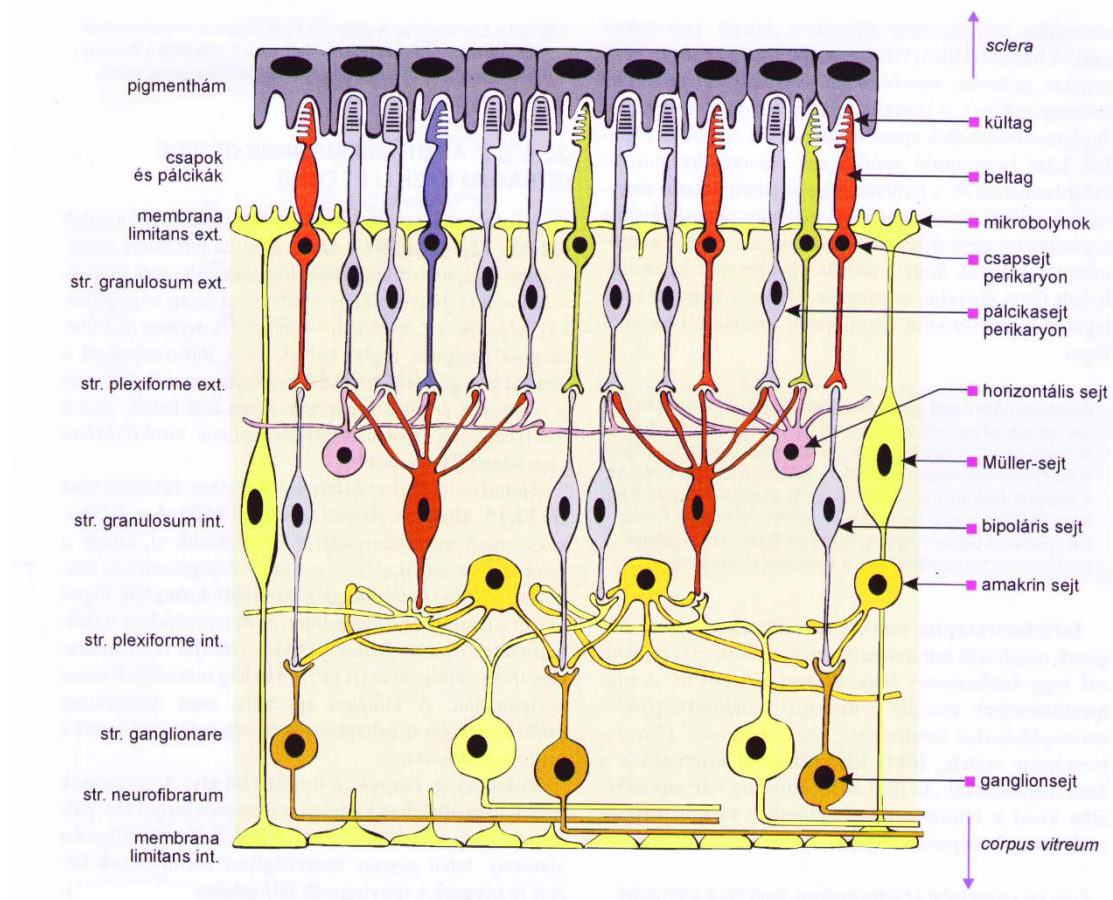
A retinán belül az egyes sejtek fénymikroszkóp alatt elkülöníthető rétegeket alkotnak. Ez a 10 réteg kívülről befelé haladva a következő: pigment epithélium, fotoreceptor réteg, külső határoló membrán, külső sejtmagvas réteg, külső átkapcsolódási/szinaptikus réteg, belső sejtmagvas réteg, belső szinaptikus réteg, ganglion sejtek sejtmagjainak rétege, majd a ganglionok idegrostjainak rétege, végül a belső határoló membrán (3. ábra).



3. ábra: A retina finomszerkezete (Röhlich, 2006). Az angol rövidítések a következők: PE = pigment epithelium; PL = photoreceptor layer, fotoreceptorok rétege; MLE/MLI = membrana limitans externa/interna, külső/belső határoló membrán; ONL/INL = outer/inner nuclear layer, külső/belső sejtmagvas réteg; OPL/IPL = outer/inner plexiform layer, külső/belső szinaptikus réteg; GCL = ganglion cell layer, ganglion sejtek sejtmagjainak rétege; NFL = nerve fiber layer.

A pigment epitéliumot pigmentált sejtek alkotják, melyeknek a funkciója a fény visszaverődésének gátlása, sötét háttérrel biztosítanak az előttük lévő fényérzékeny sejtek, az ún. fotoreceptorok számára. A fotoreceptoroknak két nagy típusa van: a csapok és pálcikák. Míg az érzékenyebb pálcikák az éjszakai (szkotópikus) látásért felelősek, a kevésbé érzékeny csapok a háttérmegvilágítás melletti (fotopikus), vagyis nappali, színes látásért felelnek. A színek piros-, zöld- és kék-érzékeny csapok ingerületeiből tevődnek össze, ezek a különböző

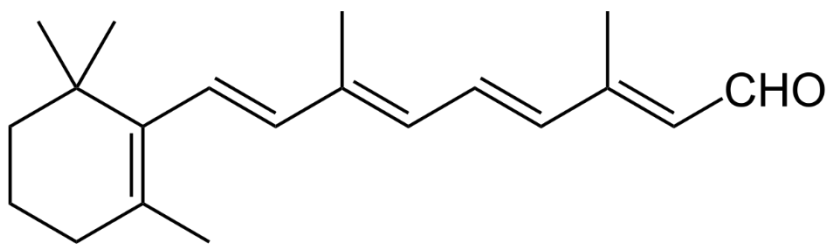
fényelnyelésű csapok tehát a fény különböző hullámhosszait érzékelik. A fotoreceptorok sejtmagjai a külső sejtmagvas rétegben találhatóak. A fotoreceptorok a külső szinaptikus rétegben adják át a fény által gerjesztett ingerületüket a bipoláris neuronoknak (lásd „kapcsolási rajz”, 4.ábra). A bipoláris sejteknek és a retina többi sejtípusának – a horizontális sejteknek, amakrin sejteknek, Müller-sejteknek – a sejtmagjai alkotják a belső sejtmagvas réteget. Az ingerület végül a ganglion sejteket aktiválja a következő, a belső szinaptikus rétegben. Ezután a ganglion sejtek sejtmagjai és azok axon-nyúlványai következnek melyek külön-külön réteget alkotnak. Az ingerületek bonyolult vezetődése, átkapcsolódása tulajdonképpen a két határoló hártya közötti térben zajlanak, mely a speciális támasztó sejtek, a Müller-sejtek nyúlványainak szorosan összekapcsolt végződése alkotnak. Ebből a térből hátrafelé kinyúlnak a fotoreceptorok fényérzékeny nyúlványai: érdekes módon tehát a fénynek a teljes retinán át kell haladnia, mielőtt a fotoreceptorok fényérzékítő részeihez jutna.



4. ábra: A retina sejtjei (Röhlich, 2006).

2.3. A látás fizikai- és biokémiai alapjai

A fény érzékeléséhez és az elektromos jelek létrejöttéhez a fotoreceptorok belsejében végbemenő fizikai- és biokémiai folyamatok szükségesek. A fizikai kémiai része a folyamatnak a retinaldehid, vagy röviden csak **retinal** (5. ábra) működése. Ez a molekula az A-vitaminnak, a retinolnak az aldehyd-származéka. A retinol és a retinal a szervezetünkben képes oda-vissza átalakulni egymásba enzimatis segítéséggel, ezért egyes források – még néhány más hasonlóan retinallá átalakítható vegyülettel együtt – ezeket közösen A-vitaminnak vagy az A-vitamin vitamereinek nevezik (Liden és Eriksson, 2006).



5. ábra: A retinaldehyd, vagy röviden retinal kémiai szerkezete (*all-trans* forma).

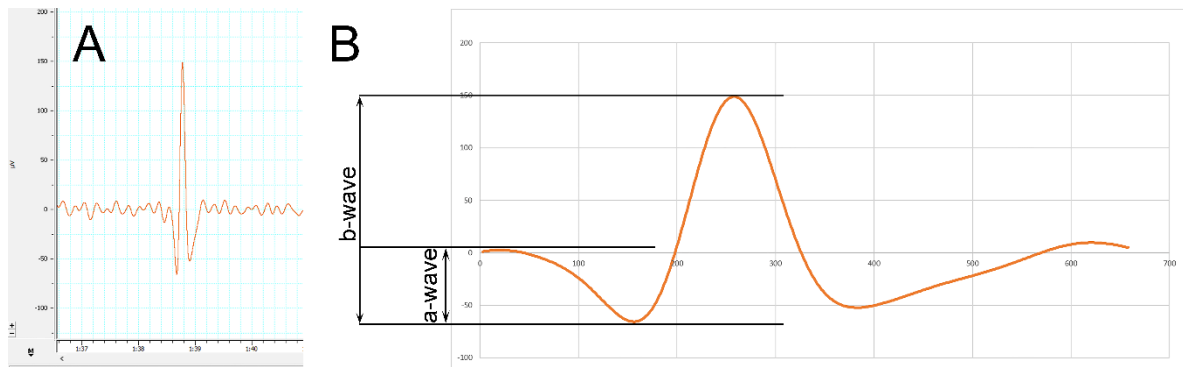
A retinal egy ún. kromofór molekula, amely tükröfordításban színhordozót jelent, zöld színt nyel el, így lila színűnek látszik. Ezen alapszik a Lila Föld Hipotézis, mely szerint a Földön az első élőlények sokkal valószínűbb, hogy a bonyolultabb klorofill helyett retinalt használtak a napfény kémiai energiává történő átalakítására, a fotoszintézisre (DasSarma és Schwieterman, 2021). Az emberi szemben a retinal *11-cis* konfigurációban van jelen, mely egy proton elnyelésére „kiegyenesedik” *all-trans* izomerré. Ez a molekuláris mozdulat aktiválja a hozzá kapcsolódó, **opszin** nevű fehérjét. A retinal és az opszin komplexe a fotopigment, vagy rodopszin (tágabb értelmezésben; ugyanis szűkebb értelmezésben csak a pálcikák (rod) fotopigmentjét hívják így). Az emberi szemben többféle opszin fehérje is található, melyek azonban néhány aminosavban különböznek, ami miatt a belőlük felépülő fotopigmentek a fény más-más hullámhosszára érzékenyek: a csapok kék, zöld vagy vörös, a pálcikák kékeszöld fényt nyelnek el (Terakita, 2005). Az opszin egy ún. 7 transzmembrán doménnel rendelkező fehérje, mely G-fehérjéhez kapcsolódik; az ilyen 7-transzmembrán-domén-fehérjék jellemzően molekuláris receptorok, ám itt a szemben a receptor ligandja – a retinal – folyamatosan kötve van. Az opszin fizikai-kémiai konformációváltozása (az ún. „(photo)bleaching”) aktiválja a G-fehérjét, a **transzducint**; a folyamat inentől biokémiai jelátviteli kaszkád (Fonyó, 2013). A transzducin foszfodiészteráz 6 (PDE6) enzimet aktivál,

amely a cGMP bontásáért felelős. Az így lecsökkent cGMP-szint már nem képes nyitvatartani cGMP-függő Na-csatornákat, vagyis fény hatására hiperpolarizáció következik be a fotoreceptorokon. Sötétben a fotoreceptorokba folyamatosan áramlik befelé a Na⁺ a nyitott cGMP-függő Na-csatornákon keresztül, amit „sötét áram”-nak is neveznek, így a tartósan depolarizált fotoreceptorokból folyamatosan szabadul fel glutamát. A glutamát eltérő receptorainak segítségével egyes sejteket gátol, másokat aktivál: a „sötét áram” által folyamatosan szekretálódó, nagy mennyiségű glutamát ún. OFF-bipoláris sejteket aktivál és ON-bipoláris neuronokat gátol. A fény hatására bekövetkező hiperpolarizáció miatt azonban ez a glutamát-felszabadulás lecsökken, a glutamát hiánya (= a glutamát-receptorok inaktivitása) pedig azt eredményezi, hogy az OFF-bipoláris sejtek gátlódnak (hiperpolarizálódnak), és az ON-bipoláris sejtek aktiválódnak (depolarizálódnak), melyet a szakirodalom „fény-áram”-nak nevez. A fény felvillanására az elektroretinogrammon megjelenő a-hullám a fotoreceptorok „sötét-áram”-jának lecsökkenése miatt negatív irányú feszültségváltozás és ezért jellemzi a fotoreceptorokat. A szintén megvilágításra jelentkező b-hullám ugyanakkor a fény hatására „bekapcsolódó”, „fény-áram”-ot produkáló ON-bipoláris neuronokat jellemzi, emiatt lesz a b-hullám pozitív előjelű, nagy feszültségváltozás (Perlman, 1995).

2.4. Az elektroretinográfia

Az elektroretinográfia a retina elektromos tevékenységének, a fény által kiváltott ingerületek feszültségének rögzítése ún. elektroretinogramok formájában. Az elektroretinográfiát már az 1800-as évek közepén felfedezték, mégis csak 1967-ben Ragnar Arthur Granit finn-svéd kutató azonosította a különböző hullámokat létrehozó sejteket, sejtcsoportokat (Perlman, 1995).

Granit munkája alapján (Granit, 1933) az elektroretinogrammon az ingerlő fényt követően egy kezdeti negatív maximumot, az a-hullámot, majd egy kifejezettebb pozitív maximumot, a b-hullámot különíthetjük el (5. ábra).



6.ábra: Az elektoretinogramm (A) Reprezentatív ERG hullám (tüske), mely kiemelkedik az egyenletes háttérzajból (B) Kinagyított hullám a mérendő a- és b-hullámokkal

Az **a-hullám** a fotoreceptorok fényérzékenységgel, a fény elnyelésével van összefüggésben és a fotoreceptor sejtek állapotáról, működéséről ad információt. Ezt a hullámot részben sajnos elfedi a sokkal nagyobb, erősen pozitív **b-hullám**, amely a retina összes többi sejtjének – tehát a bipoláris, Müller-, amakrin, horizontális és ganglion sejteknek – az elektromos tevékenysége (Miller és Dowling, 1970; Lei és Perlman, 1999; Dong és Hare, 2002). A fotoreceptorokról az ingerület a szinapszisok után ezekre a sejtekre tevődik át („poszt-szinaptikus” sejtek), némelyik feszültség-csökkenéssel, mások feszültség növekedéssel reagálnak erre, ezeknek az összege nyilvánul meg végül egy pozitív maximumban. Erre a következtetésre a szinaptikus jelátvitel blokkolásával jutottak, mely megszünteti a b-hullámot (Gurevich és Slaughter, 1993; Sieving és mtsai., 1994). Továbbá eltűnik a b-hullám a retina vérellátásának hiányában is – pl a szemet ellátó erek lekötésével (Perlman, 1995). A b-hullámok keletkezése tehát igen összetett elektrofiziológiai folyamat.

A teljesség kedvéért szeretném megemlíteni, hogy az elektoretinogrammon az a- és b-hullámokon kívül léteznek még más, speciális körülmények között elkülöníthető részösszetevők is, amelyeknek inkább kísérleti jelentősége van. Az egyik ilyen a kései c-hullám is, mely a pigment epithelium elektromos tevékenységére vezethető vissza, ennek mérésére azonban igen hosszú, percekig tartó fényimpulzus kell (Samuels és mtsai., 2012). A d-hullám az ún. ON- és OFF-bipoláris sejtek működésének elkülönítését teszi lehetővé, mivel az OFF-bipoláris sejtekből származik; szintén hosszan tartó fény szükséges a kiváltásához (Perlman, 1995). A Müller-sejtek működését jelölik az M-hullám, és az ún. szkotopikus küszöb válasz (STR, scotopic treshold response). Előbbi fotopikus háttérmegvilágítás mellett különíthető el, utóbbi szkotopikus fényingernél azonosítható (Sieving és Nino, 1988; Frishman és mtsai., 1992). Erős fényvel válthatók ki a korai receptor

potenciál (ERP, early receptor potential) és az oszcillátoros potenciálok (OP). Az ERP amplitúdója a fotoreceptorok pigment-telítettségével arányosan változik (Perlman, 1995), az OP-é pedig már enyhe oxigénhiányos állapotra (iszkémiára) is csökken (Asi és Perlman, 1992). Ez a klinikumban a cukorbetegség következtében károsodó retinális vérellátás romlásának jelzésére használható akár a látható tünetek megjelenése előtt. A b-hullámon fűrészfogszerűen jelentkező OP feltehetően az amakrin sejtek, bipoláris sejtek és ganglion sejtek működésének következménye, de pontos eredetét máig sem tudjuk biztosan.

2.5. A diabetes mellitus

A diabetes mellitus egy krónikus anyagcsere-rendellenesség, amelyet a kórosan emelkedett vércukorszint jellemez, és amely számos károsodáshoz vezethet, ha nem diagnosztizálják korán illetve nem kezelik megfelelően. A betegségre az inzulin termelése és felhasználása közötti egyensúly felborulása jellemző: ez vagy az inzulintermelés hiányára vagy a sejtek inzulin-receptorainak csökkent érzékenységére vezethető vissza. Az inzulin a hasnyálmirigy β -sejtjei által termelt hormon, amely felelős a sejtek glükózfelvételéért, ezáltal csökkentve a vér glükózsintjét.

A világban 2021-ben nagyjából 537 millió ember szenvedett diabéteszben (20-79 éves korosztályt tekintve), amely szám 2030-ra már akár 643 milliós számot is elérhet. A betegség nagyon gyakori Európában is, becslések szerint 11 felnőttből 1 diabéteszes (Sun és mtsai., 2022). Sajnos Magyarország is erősen érintett: 2021-es adatok szerint a 19 év fölötti korosztályban 14% fölötti a diabétesz előfordulása (KSH, 2023).

A diabetes mellitus **két fő típusa** az 1-es és a 2-es típus. Az **1-es típusú diabétesz** oka, hogy a hasnyálmirigy inzulintermelésért felelős β -sejtjeinek autoimmun pusztulása miatt a szervezet nem képes inzulint termelni. Korábban inzulin függő diabetes mellitusnak vagy fiatalkori diabétesznek is hívták, mivel gyakran már fiatal korban diagnosztizálják, de bármely korcsoportban megjelenhet. A betegek jellemzően sovány alkatúak, szemben a másik típussal.

A **2-es típusú diabétesz** esetén a szervezet érzéketlen a termelt inzulinra. Ezt a formát korábban nem inzulin függő diabetes mellitus-nak is hívták, de ez az elnevezés félrevezető, hiszen a β -sejtek kimerülése után a betegeknek szükségük lehet inzulin adagolására. Bármely életkorban kialakulhat, de gyakrabban fordul elő időseknél és a betegek szinte mindig elhízottak.

A diabetes mindkét típust érintő **tünetei** a következők: polyuria (nagy mennyiségű vizelet ürítése), polydipsia (nagy mennyiségű folyadékbevitel az olthatatlan szomjúság miatt), polyphagia (nagy mennyiségű táplálék bevétele a csillapíthatatlan éhség miatt), emellett fáradékonyság, jó étvágy melletti fogyás, bőrtünetek és a diagnosztikus jelentőségű, a normál (4-6 mmol/l) vércukorszintet tartósan meghaladó plazma glükóz koncentráció. Ma Magyarországon a 7 mmol/l koncentrációt meghaladó éhomi valamint az orális glükóz tolerancia teszt 120. percében mért 11,1 mmol/l-t meghaladó vércukorszint esetén diagnosztizálnak valakit diabéteszesnek (a glikált hemoglobin (HbA1c) értéket nálunk egyelőre csak utánkövetésre használják, de már vannak olyan országok, ahol a $\geq 6,5\%$ érték

guideline-okban diagnosztikus kritériumként szerepel, például álnegatív esetek kizárására).

A tartósan magas vércukorszint a diabetes mellitus súlyos **szövődményei**hez vezet. Ezek a kis és nagyerek károsodásának, az ún. micro- és macroangiopathiának a következtében kialakuló szövődmények akár már néhány hónap után hosszútávú, visszafordíthatatlan károsodást okozhatnak. Ilyenek a szív- és érrendszeri betegségek, polyneuropathia, diabeteses nephropathia és retinopathia (Tulassay, 2023).

2.5.1. A diabéteszes retinopátia

A diabétesz számos komplikációja közül a diabéteszes retinopátia a szerzett vakság vezető oka. Minden harmadik diabéteszes beteg érintett (DR szakmai protokoll, 2023), továbbá megfigyelték, hogy 20 év diabéteszben eltöltött idő után nagyjából az összes 1-es típusú diabéteszes betegnél, a 2-es típusú diabéteszes betegek pedig körülbelül 60%-ánál valamilyen fokú retinopathia kialakul (Yau és mtsai., 2012).

A retinopathia diabetica legalább **4 stádiumra** osztható, de vannak olyan források, amelyek a pre-retinopathia stádiumát nem tárgyalják külön, illetve megint más források a non-proliferatív stádiumot 3 alszakaszra bontják. A magyarországi szakmai protokoll (DR szakmai protokoll, 2023) alapján 4 stádiumot veszek sorra: prae-retinopathia, enyhe non-proliferatív vagy háttér-retinopathia, súlyos non-proliferatív vagy pre-proliferatív retinopathia és proliferatív retinopathia. Míg az előstádiumban, a pre-retinopathia stádiumban látható jelek még nincsenek, később jellegzetes szemfenéki elváltozások jellemzik a betegséget. Ebben a kezdeti szakaszban megváltozik a vérellátás hemodinamikája és a vér-retina gát kezd megbomlani. Ez vezet a következő stádiumban, a non-proliferatív stádiumban látható **szemfenéki elváltozásokhoz**: ödémák, retinális arteriola-kiöblösödések (micro-aneurizmák), intraretinális vérzések, lipidlerakódások (ún. lipoid/kemény exsudátumok) jelennek meg. A súlyos non-proliferatív stádiumban ún. gyapottépeses góccok is kialakulnak a fokozódó vérellátási zavarok, iszkémia miatt, illetve megnő a száma és kiterjedése a már említett szemfenéki elváltozásoknak. A proliferatív retinopathia stádiumában a retinális iszkémia odáig fokozódik, hogy érképző anyagok, pl. vaszkuláris endotheliális növekedési hormon (growth factor, VEGF) szabadul fel, amely új erek képződését (angiogenesis-t) indít be. Ezek a kórosan képződött erek akár az üvegtest felé is benyúlhatnak jelentősen zavarva a látást, továbbá az érfal károsodásai miatt üvegtesti vérzések is jelentkezhetnek. Sőt az abnormálisan képződő erek akár magukkal húzva a retinát retinaleválást is okozhatnak, amely azonnali vaksággal járhat.

A diabéteszes retinopátia laboratóriumi körülmények között történő vizsgálatát nagyban

megnehezíti, hogy nincs igazán jó **modellállat** erre a célra. A patkányoknak (és egereknek) nincs sárgafoltjuk (Huber és mtsai., 2010) (macula lutea, az éles látás helye az emberi retinában), így a diabéteszre jellemző diabéteszes maculáris ödémát nem lehet rajtuk vizsgálni. Ezt még tetézi, hogy a diabéteszes retinopátia jellemző, látható jelei sem jelennek meg a szemfenéki vizsgálatukban, mint az embernél (Toh és mtsai., 2019; Kowluru, 2020): ritkák a vaszkuláris szivárgások, aneurizmák, intraretinális vérzések, lipoid exsudátumok csakúgy, mint az érelzáródásos, iszkémiás károsodások is – illetve nem minden állatnál alakulnak ki következetesen. Az ödémaképződés viszonylag jól követhető, illetve a retinopátia előrehaladtával az állatok felében szürkehályog (cataracta) alakul ki. A patkányokban a diabéteszes retinopátia látható jelei a periciták elvesztése és az ún. acelluláris kapillárisok megjelenése, melyek azonban csak speciális, mikrovaszkuláris szövettannal mutathatók ki. A mikrovaszkuláris elváltozásoknál azonban hamarabb jelentkeznek diabéteszes retinopátiában retinális működészavarok, amelyek elektroretinográfiás (ERG) módszerrel már a szövettani elváltozások megjelenése előtt megfigyelhetők (Aung és mtsai., 2013; Kowluru, 2020).

Molekulárisan a **diabéteszes retinopátia pathomechanizmusában** számos útvonal közrejátszhat, több teória is létezik, hogy az emelkedett vércukorszint hogyan is károsítja a retinát. Ezek közül a legfontosabbak a polyol-útvonal vagy másnéven aldóz-reduktáz útvonal, valamint az Advanced Glycation Endproduct („glikációval továbbfejlesztett végtermékek” – nincs meghonosult magyar megfelelője) képződésével kapcsolatos teóriák, de fontosak még a Protein kináz C aktivációs hipotézis, a periciták elvesztésének különféle elméletei, a microgliális aktiváció hipotézise és a funkcionális hyperemia elvesztésének teóriája is. Több elméletben is közös pont a hypoxia és a következményes iszkémiás károsodás, illetve mindegyik útvonal – természetesen – összefügg a hiperglikémiával.

Polyol-útvonal: A glükóz energiaforrásként szolgál a sejtek számára, ehhez azonban először a hexokináz enzim hatására glükóz-6-foszfáttá kell alakulnia (glikolízis kiindulási anyaga). Diabéteszben a magas vércukorszint telíti a hexokináz enzimet, így a nagy mennyiségű glükóz az aldóz-reduktáz enzim segítségével szorbittá alakul. (Az aldóz-reduktáz kofaktorként NADPH-t igényel, melyet az ilyenkor úgyis (túl-)aktív pentóz-foszfát útvonal biztosít.) Ezt követően a szorbitot a szorbit-dehidrogenáz (SDH) enzim fruktózzá alakítja NADH-termelése közben. A szorbit erősen hidrofil, és jelentős ozmotikus aktivitással rendelkezik, továbbá a sejtmembrán áteresztőképessége szorbitra nézve alacsony, amely következtében intracelluláris/szöveti ödéma jelentkezik, valamint a felhalmozódó szorbit laktáttermeléshez és következményes oxidatív stresszhez vezet. A periciták és a lencse

epithel sejtei is károsodnak, mely a kapillárisok falának meggyengüléséhez és aneurizma-képződéshez, illetőleg szürkehályoghoz (cataracta) vezet. A NADPH elhasználása az antioxidáns glutation-termelés csökkenését okozza, a keletkező nagy mennyiségű NADH-termelés pedig reaktív oxigéngyökök keletkezéséhez vezet, így a két folyamat együtt fokozott oxidatív stresszt és sejtkárosodást jelent (Hashim és Zarina, 2012; Tarr és mtsai., 2013). Amennyiben endoteliális sejtek károsodnak, azok FOXO1 gén aktiváción keresztül angiopoietin elválasztást és VEGF-receptor upregulációt okoznak destabilizálva a pericitákat és a kapillárisokat (Jalgaonkar és mtsai., 2022). A hipoxia/stressz által aktiválódó microglia sejtek számos pro-inflammatorikus citokin szekrécióját indítják el tovább rontva a károsodást (Kinuthia és mtsai., 2020).

AGE-útvonal: a „fokozott glikációban keletkező végtermékek” (AGE) közvetlenül a magas vércukorszint miatt alakulnak ki, ugyanis tartós hiperglikémia során a túlzott mennyiségű glükóz kölcsönhatásba lép a (plazma)fehérjékkel, amelyet fehérje-glikációnak neveznek. Ez a folyamat „előrehaladott glikációs végtermékek” (AGE) képződéséhez vezet, amelyek tulajdonképpen funkciójukban és szerkezetükben (megváltozott konfiguráció, keresztkötések miatt) károsodott fehérjék (Lima és mtsai., 2020; Khalid és mtsai., 2022). Az AGE-k saját receptoraikhoz (RAGE) kötődve, módosítják a sejtek jelátviteli útjait, a génexpressziót, és további gyulladáshoz vezetnek (Khalid és mtsai., 2022). Nevük sokatmondó, az öregedéssel („AGEing”) is kapcsolatba hozták őket (Chaudhuri és mtsai., 2018).

2.5.2. A diabetes mellitus gyógyszeres kezelése

A diabetes mellitus gyógyszeres kezelésében el kell különíteni az 1-es és 2-es típus gyógyszereit egymástól: míg 1-es típusban az inzulin különböző formáit használjuk, a 2-es típusban először anti-diabetikumokkal indítunk, de ha a pancreas inzulintermelése elégtelen (né válik), akkor itt is alkalmazunk inzulinokat.

A humán **inzulint** manapság rekombináns DNS-technológiával, baktériumok vagy élesztőgombák felhasználásával állítják elő (Tibaldi, 2014). Továbbá a humán inzulin aminosav-szekvenciájának megváltoztatásával elérhető, hogy eltérő hatáskezdetű és hatástartamú inzulinanalógokat kapjunk. Az inzulint és analógjait parenterálisan, szubkután injekció formájában adják be, mivel az inzulin polipeptid érzékeny a gyomor-bél traktusban történő emésztésre. Magyarországon gyors hatású, közepes hatástartamú és hosszú hatástartamú inzulinanalógok és a reguláris inzulin vannak forgalomban, illetve ezek keverékei. A gyors hatású inzulinanalógok, mint amilyen a Lispro, Aspart és Glulisine

inzulin, kb 15 percen belül hatnak, de hatástartamuk viszonylag rövid, kb 3 óra. A reguláris inzulin kb 1 óra múlva kezdi el kifejteni hatását és hatástartama 5-8 óra. A közepes hatástartamú „izofán” vagy NPH (neutrális protamin Hagedorn) inzulint korábban bázisinzulinként, ma már inkább gyors inzulinokkal keverve alkalmazzák, hatáskezdeté 1-2 óra, hatástartama akár 14 óránál is több lehet. Az igazán hosszú hatástartamú Detemir, Glargine és Degludec inzulinok, azonban akár 24-42 órán át is képesek hatni, jóllehet felszívódásuk lassú, 1-4 óra. Manapság ezeket alkalmazzák bázis inzulinként és a gyors inzulinokkal egészítik ki a terápiát a főétkezések előtt. Automatizált adagolásra inzulin pumpát alkalmaznak, mely egyes típusoknál monitorozza is a beteg vércukorszintjét (Donnor és Sarkar, 2000).

A 2-es típusú diabétesz gyógyszereit összefoglalóan anti-diabetikumoknak nevezzük, melyekhez tartoznak orális és parenterális úton adagolható hatóanyagok is. Csoportosításuk rendszerint hatástani alapon történik, így megkülönböztetünk ún. inzulinotróp vegyületeket (szulfonil-urea származékok és meglitinid-származékok), nem-inzulinotróp vegyületeket (biguanidok és tiazolidin-dionok), inkretinek hatásának növelése útján ható szereket (DPP-4 gátlók és GLP-1 analógok) és a glükóz felszívódását és kiürítését befolyásoló szereket (alfa-glükózidáz gátlók és SGLT-2 gátlók).

Az anti-diabetikumok közül az elsőként választandó szer a **biguanidokhoz** tartozó metformin. A csoport más képviselőit (buformin, fenformin) kivonták a forgalomból toxikus mellékhatásaik miatt. A biguanidok az orvosi kecskerutafű (*Galega officinalis*) guanidin nevű hatóanyagának származékai. A metformin pontos hatásmechanizmusa máig ismeretlen, multifaktoriális, de az biztos, hogy úgy csökkenti a vércukorszintet, hogy nem fokozza az inzulinelválasztást így nem hipoglikemizál. Csökkenti a glükoneogenezist a májban és növeli a sejtek inzulin-érzékenységét és ezzel glükóz felvételüket (Bailey, 2017).

A **tiazolidindionok** közül is már csak egy szer van forgalomban Európában, a pioglitazon, rokonvegyületeit (roziglitazon, troglitazon, rivoglitazon) toxikus mellékhatások miatt kivonták a forgalomból. A metforminnal ellentétben a pioglitazon hatásmechanizmusa azonban ismert: egy sejtmagban lévő transzkripciós faktort, egy receptorfehérjét serkent, névszerint a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma típusát (PPAR- γ), mely így serkenti a zsír- és inzulinháztartásban jelentős enzimek átírását. Ennek hatására nő az izomsejtek inzulinérzékenysége és ezáltal glükózfelvétele, valamint csökken a máj glükoneogenezise és szabad zsírsavképzése. Serkenti továbbá a zsírsejtek szabad zsírsav-felvételét és ezek felhasználását, így összességében csökken a zsírsejtek zsírsavtartalma, amely a glükózfelvételüket és felhasználásukat serkenti (Liu és Wang, 2015).

A **szulfanil-urea vegyületeknek** a második generációját alkalmazzuk, jelenleg is több „gli-„ névkezdetű szer van még forgalomban, mint a glipizide, gliklazid, glibenklamid, glimepirid stb. A szulfanil-ureák már hipoglikemizáló szerek, mert fokozzák az inzulin szekréciónak, úgy, hogy gátolják az ATP-érzékeny kálium-csatornát a Langerhans-szigetek béta-sejtjein. Fiziológiásan ez a csatorna érzékeli, hogy a béta sejtbe érkezett-e glükóz, ami a glikolízisben ATP-t termel: ha sok az ATP ez a csatorna bezárul és így a béta-sejt depolarizálódik, feszültségfüggő Ca-csatornákat nyitva meg. A kalciumot a bétasejt az inzulinnal telt granulumjainak ürítéséhez használja fel, vagyis glükóz hatására (illetve a szulfanil-ureák blokkoló hatására) inzulin szabadul fel (Mohan és mtsai., 2019).

A **meglitinid-származékok** vagy csak „-glinidek” szintén szekretogóg szerek, inzulinfelszabadulást fokoznak és ezzel hipoglikemizál(hat)nak. Hatásmechanizmusukat tekintve ugyanúgy hatnak, mint a szulfanil-ureák, csak más kötőhelyen keresztül gátolják az ATP-érzékeny K-csatornát. Magyarországon használatuk nem terjedt el (Winkler, 2015).

A terápia legmodernebb szereit az inkretinokkal kapcsolatos szerek. Az inkretinek a táplálékfelvételre felszabaduló intesztinális, metabolikus hormonok, melyek stimulálják a pancreas inzulin termelését: a glükagon-szerű peptid (glucagon-like peptid 1; GLP-1) és a glükózfüggő inzulinotróp polipeptid vagy másnéven gasztrikus inhibitoros peptid (GIP). Mindkettő rövid féléletű anyag, szinte azonnal bontja őket a dipeptidil-peptidáz 4 enzim (DPP-4). A **GLP-1 analógok** közül az exenatid, lixisenatid, liraglutid, semaglutid stb. mind forgalomban van Magyarországon is, leggyakrabban, mint előretöltött injekciós toll, vagy ampulla, de a semaglutidból létezik már tabletták is. Ezek a rekombináns fehérjék DPP-4 rezisztensek a bennük lévő aminosav-cserék miatt, továbbá hosszú felezési idejük a hozzájuk kapcsolt zsírsav-oldalláncok miatt, amelyekkel ki tudnak horgonyozódni albuminhoz (Zheng és mtsai., 2018).

A **DPP-4-gátlók**, vagy csak „-gliptinek”, az inkretinek lebontását akadályozzák meg a bontóenzim gátlásával. Számos hatóanyaguk van forgalomban tablettaként Magyarországon is, mint a vildagliptin, szitagliptin, linagliptin stb.

Az **SGLT-2 gátlók**, vagy „-gliflozinok” (pl. dapagliflozin, empagliflozin), a vese proximális tubulusaiban található glükóz transzporter gátlása révén fejtik ki hatásukat. Ez a transzporter felelős a glükóz reabszorpció körülbelül 90%-áért, így a gátlás a vizelettel való fokozott glükózkiválasztáshoz és ezáltal a vércukorszint csökkenéséhez vezet. Ezenkívül a vizeletben maradó glükóz ozmotikusan is aktív, így enyhe ozmotikus diurézist is előidéz, amely hozzájárulhat a vérnyomás és a testsúly kismértékű csökkenéséhez, ugyanakkor a húgyúti fertőzésveszélyt növeli (Fei és mtsai., 2019).

Az **alfa-glükozidáz gátló** akarbóz a szénhidrátok egyszerű cukrokká, így glükózzá történő bontását gátolja meg, ezáltal csökkentve a glükóz felszívódását és így a vércukorszintet. Cserébe, a bélben maradt szénhidrátok ozmotikus aktivitása miatt ozmotikus hashajtást és flatulenciát okoz (Akmal és Wadhwa, 2023).

A **diabéteszes retinopátia terápiaja** az alapbetegség, a diabétesz kezelésén alapszik, de kiegészül egyrészt a műtéti megoldásokkal, mint a lézeres fotokoaguláció retinaleválás esetén, vagy a vitrektómia a vitreumba betörő, újonnan képződött erek esetén, továbbá specifikus farmakonokkal: perifériás értágítókkal, mint a Ca-dobezilát vagy a pentoxifillin, trombocita aggregáció gátlókkal, mint az acetil-szalicilsav vagy a ticlopidin, valamint intravitrealisan alkalmazott szteroid gyulladásgátlókkal, mint a triamcinolon vagy a fluocinolon acetonid. Modernebb megközelítésű (– de erre az indikációra még inkább kísérleti fázisban lévő –) biológiai hatóanyagok az anti-VEGF aflibercept fúziós protein, vagy a monoklonális antitest ranibizumab és bevacizumab. Egy kifejezetten specifikus, jövőbeli terápia lehet az aldóz-reduktáz enzim szelektív gátlása; a jelenleg még kísérleti fázisban lévő hatóanyag neve fidarestat (Obrosova és mtsai., 2003).

2.6. A BGP-15

A BGP-15 (O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav-amidoxim) egy viszonylag új gyógyszerjelölt, magyar fejlesztésű molekula, melyről az első nemzetközi, tudományos publikáció 2000-ben jelent meg (Szabados és mtsai., 2000). A propranolollal szerkezeti rokonságban lévő molekulát először szívizom-iszkémia kivédésére kezdték el kifejleszteni (Szabados és mtsai., 2000; Halmosi és mtsai., 2001). Minthogy a cukorbetegség is összefügg az iszkémia-reperfúziós károsodással, ezért a BGP-15-öt diabetikus kardiomiopátiában a mi munkacsoportunk is kipróbálta és megállapította, hogy a szer képes késleltetni a diasztolés diszfunkció kialakulását GK patkányokban (Bombicz és mtsai., 2019). Hasonlóképpen az ischaemia-reperfúziós károsodással és a gyulladással összefüggő más betegségek is bekerültek a BGP-vel kapcsolatos kutatások fókuszába: ez a kis molekulájú hidroximinsav-származék hatásosnak bizonyult nephro- (Racz és mtsai., 2002), neuro- (Bárdos és mtsai., 2003), valamint myopathiában (Sorensen és mtsai., 2017) is. A különböző szervekben illetve a különböző megbetegedésekben természetesen a BGP eltérően hatott, de hatásának néhány általános aspektusa megegyezett – mint például, hogy hősokkfehérjékre induktorként hat, gátolja a szuperoxid és más reaktív oxigénradikálok (ROS) szintézisét, gátolja a poli-(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP) és növeli a

mitokondriumok számát (Henstridge és mtsai., 2014; Sumegi és mtsai., 2017). Vázizom- és szívizomhatásait is kiemelték: több vizsgálatban is javította az izomösszehúzóerő erejét és a kontraktilitást (Gehrig és mtsai., 2012; Sapra és mtsai., 2014; Salah és mtsai., 2016; Nascimento és mtsai., 2018).

Korábban tehát a BGP-15-ről bebizonyították, hogy indukálja a 72 kDa-os hőszokk fehérjét (HSP72) (Henstridge és mtsai., 2014). Ez a citoszolikus fehérje a HSP60/70 család tagjaként felelős például a mátrix metalloproteináz 9 (MMP9) mitokondriumba történő transzportjáért (Mishra és Kowluru, 2017). Diabéteszben azonban – szabályozatlan transzkripciós faktorok (NF-kappaB, PARP1 stb.) túlzott transzaktivációja miatt – a feleslegben lévő, mitokondriumba transzportált MMP9 mitokondriális károsodásokhoz vezethet (Kowluru és mtsai., 2014a). Az említett transzkripciós faktorok szabályozása többek között a sirtuin 1 (SIRT1), egy nukleáris deacetiláz enzim feladata (Kowluru és mtsai., 2014a; Mishra és Kowluru, 2017). Ezt az enzimet kapcsolatba hozták már diabéteszrel is: habár a SIRT1 fiziológiásan serkenti a sejtek túlélését, diabéteszes retinopátiában gátolva van, ezáltal az acetiláció-deacetiláció egyensúlya felborul (Rajamohan és mtsai., 2009; Mishra és Kowluru, 2017). A deacetiláció hiánya növeli a különböző transzkripciós faktorok (NF-kappaB, PARP1 stb) kötődését az MMP9 promóter régiójához, ami transzaktivációhoz és végeredményben mitokondriális károsodáshoz vezet (Kowluru és mtsai., 2014a) feltehetően a diabéteszes retinában is. A retinális sejtek mitokondriális károsodása és a következményes sejthalál a vizuális funkciók károsodásához vezethet, amely egy jellemző tünete a diabéteszes retinopátiának (Kowluru és Mishra, 2018). Hogy a BGP-15 a HSP72 mellett a SIRT1 vagy MMP9 oldaláról is beavatkozik-e ebbe a folyamatba és ezzel a diabéteszes retinopátia patogenezisébe az még felfedezésre várt.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok

Első kísérletünkben vizsgálatunkhoz a hím Goto-Kakizaki és Wistar patkányokat (10 hetesek; 250–300 g) a Charles River Laboratories International Inc.-től (Wilmington, MA, USA) szereztük be. A Goto-Kakizaki (GK) modell – a Charles River leírása alapján – egy nem elhízott Wistar altörzs, amelyben 2-es típusú cukorbetegség alakul ki; kontrollja a Wistar patkány (Crl: WI). Az állatokat ketrecben tartottuk és az állatkutatásra vonatkozó nemzetközi

előírásoknak megfelelően (ARVO (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) és az NIH (National Institute of Health) irányelvei) gondoztuk. A vizsgálat során használt összes módszert a Debreceni Egyetem Intézményi Állatetikai Bizottsága hagyta jóvá (18/2013/DE MÁB). Az állatoknak szabad hozzáférése volt a vízhez, és *ad libitum* szabványos rágcsáló táppal etettük őket.

Második kísérletünkhöz nyolc hetes hím ZDF patkányokat (fa/fa) és kontrolljaikat, hím ún. sovány (lean) patkányokat (-/-) vásároltunk a Charles River Laboratories International, Inc.-től (Wilmington, MA, Egyesült Államok). Az állatok elhelyezése és gondozása ebben az esetben is a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága által elfogadott szabályok alapján történt, összhangban a nemzetközi előírásokkal (ARVO és az NIH irányelveivel), továbbá minden módszertani protokollt is ugyanez a bizottság hagyott jóvá. Az állatok itt is szabadon hozzáférhettek a vízhez és a rágcsálótáphoz, ami viszont ebben az esetben a ZDF patkányokhoz javasolt, Purina 5008 takarmány volt.

3.2. Glükózháztartás monitorozása

Első kísérletünkben éhomi vércukorszint-elemzést a kezelési időszak kezdetén, majd a 3., 8., 11. hét elején és közvetlenül a vizsgálat befejezése előtt („végpont”) végeztünk. Továbbá Orális glükóztolerancia-tesztet (OGTT) is végeztünk az összes fent említett időpontban, kivéve a végpontban. Ennek a kísérlet végén ugyanis minden állatot alávetettünk egy hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC) mérésnek, hogy felmérjük inzulinérzékenységüket vagy inzulinrezisztenciájukat.

Második kísérletünkben szintén végeztünk OGTT-t: egy 1 hónapos akklimatizáció után (alapértékek), majd a gyomorszondázási periódus kezdetén (kezdő értékek), majd pedig 1, 6 és 12 hónapnyi gavage után végeztük el.

Az említett módszerek mindegyikét egy éjszakán át tartó éheztetést követően hajtottuk végre.

3.2.1 Éhomi vércukorszint

Az éhgyomri vércukorszint-analízishez a vért farokvénából vettük, majd a vércukorszintet Accu-Check glükométerrel (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) mértük meg.

3.2.2 Orális glükóz tolerancia teszt (OGTT)

Az OGTT mérésekhez az állatoknak 2 g/kg glükózt (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország) adtunk gyomorszondán keresztül, majd farokból vett vércukorszintjét mértük 15, 30, 60, 90 és 120 perc múlva a fentebb említett glükométerrel. Kiindulási értéként éhgyomri vércukorszintet használtunk (OGTT 0 perces időpont). Az OGTT eredményeinek értékelése során a következő egyenletet használtuk a görbe alatti terület (area under curve, AUC) kiszámításához, ahol „n” a mérési időpontok száma:

$$AUC = \left(\frac{c_1 + c_2}{2}\right) * (t_2 - t_1) + \dots + \left(\frac{c_{n-1} + c_n}{2}\right) * (t_n - t_{n-1})$$

3.2.3. Hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC)

Az első kísérlet végén az éhgyomri glükózmérést követően az állatokat ketamin/xilazin keverékkel (100/10 mg/ttkg; ketamin: Calypsol, Richter Gedeon Ltd., Budapest, Magyarország; xilazin: Nerfasin, Le Vet BV, Oudewater, Hollandia) érzéstelenítettük majd HEGC protokollt hajtottunk rajtuk végre egy korábban már használt módszernek megfelelően (Literati-Nagy és mtsai., 2014), az alábbiak szerint. Először műtéti úton feltártuk a légcsövet és behelyeztünk egy kanült. Ezután két nyaki vénát kanüláltunk be glükózoldat (20%) és inzulin (6 mIU/perc (milli nemzetközi egység percenként); Humulin R, Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA) beadásához, illetve egy nyaki artériát vérvételi célból. A vércukorszintet Accu-Check glükométerrel mértük 10 percenként vett vérmintákból. Az euglikémiát a glükóz infúzió (GI) sebességének beállításával fenntartottuk. Akkor értük el az egyensúlyi állapotú (steady-state) GI-t – és tekintettük a kísérletet befejezettnek –, amikor a vércukorszint legalább 20 percig stabilizálódott. A plazma inzulin méréséhez vérmintákat vettünk a nyaki artériából a HEGC protokoll elején és végén. Az inzulin mérését a vérminták plazmájából végeztük, amelyeket 2 percig 4 ° C -on és 10 000 g -n centrifugáltunk (5415R Centrifuga, Eppendorf GmbH, Hamburg, Németország). A HEGC protokoll után minden állat életét kíméletesen kioltottuk a ketamin/xilazin kombinációs érzéstelenítő túladagolásával. Ezt követően az állatok szemét eltávolítottuk további mikrobiológiai elemzés céljából.

3.2.4 Számolt mutatók

A HEGC protokoll előtti és alatti közvetlen mérések eredményeiből - azaz testtömeg (body weight, BW), éhomi (fasting) plazma glükóz (FPG), éhomi (fasting) plazma inzulin (FPI), glükóz infúzió sebessége (GI), inzulin infúzió sebessége (II), egyensúlyi (steady-state) plazma glükóz (SSPG), egyensúlyi (steady-state) plazma inzulin (SSPI) - különböző indexeket számítottunk ki (Kiss és mtsai., 2019), amelyek képletei a következők:

GIR = glükóz infúziós sebesség (nem tévesztendő össze a glükóz infúzió sebességével) (GI)

$$GIR = \frac{GI (\mu l/min)}{BW (g)} * 220$$

A használt korrekciós tényező (220) a glükóz infúzió koncentrációjának köszönhető, amely 20% volt (220 g glükóz 1000 ml vízben; Glucose TEVA 20% Solution, Teva Ltd., Debrecen, Magyarország), így a GIR végső mértékegysége a következő lesz: mg/perc/kg.

ISI = inzulinérzékenységi (sensitivity) index; mértékegysége: (mg L)/(min kg mIU)

$$ISI = \frac{GIR (mg/min/kg)}{SSPI (mIU/l)}$$

MCRI = Metabolikus Clearance Ráta Inzulinra; mértékegység: mL/min

$$MCRI = \frac{II (mIU/min)}{SSPI (\mu IU/ml) - FPI(\mu IU/ml)} * 1000$$

A korrekciós tényezőt (1000) a milli nemzetközi egység (international unit, IU) mikro IU értékekké történő átalakítása miatt használtuk.

QUICKI = Kvantitatív inzulinérzékenység-ellenőrző mutató (QUantitative Insulin sensitivity Check Index) (mértékegység nélkül)

$$QUICKI = \frac{1}{\log FPI(\mu IU/ml) + (\log FPG(mg/dl) * 18)}$$

A korrekciós tényezőt ($\times 18$) a mmol/l mg/dl-ré való átváltás miatt használtuk.

Az inzulinrezisztencia (HOMA-IR) kiszámításához homeosztatikus értékelési modellt (homeostatic model of assessment, HOMA) használtunk Matthews és mtsai. (Matthews és mtsai., 1985) alapján.

$$HOMA - IR = \frac{FPI(\mu IU/ml) * FPG(mmol/l)}{22,5}$$

Mivel a $\mu IU/ml = mIU/l$, a HOMA-IR végső egysége a következő lesz: $(mIU \times mmol)/l^2$.

A hasnyálmirigy β -sejtek funkciójának értékeléséhez HOMA-B számítási módszert alkalmaztunk, amely ugyanazon cikken alapul (Matthews és mtsai., 1985).

$$HOMA - B = \frac{20 * FPI(\mu IU/ml)}{FPG(mmol/l) - 3,5}$$

Mivel a $\mu IU/ml = mIU/l$, a HOMA-IR végső mértékegysége a következő lesz: mIU/mmol

3.3. A túlélési görbe kiszámolása és kiértékelése

Második vizsgálatunk hosszú lefutása alatt (52 hét, azaz 1 év) néhány állat elhullása volt megfigyelhető, ezeket feljegyeztük. Az adatokat ezután átvittük GraphPad Prism statisztikai elemző programba (7.0-s verzió, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Egyesült Államok) hogy Kaplan–Meier túlélési görbéket hozzunk létre. A görbéket ezután Mantel–Cox teszttel és Gehan–Breslow–Wilcoxon teszttel elemeztük.

3.4. Elektroretinográfia (ERG)

Mindkét kísérletünk végén elektroretinográfias mérést hajtottunk végre: első kísérletünkben a HEGC előtt egy nappal, második kísérletünkben pedig közvetlenül az utolsó OGTT után.

Az állatokat ketamin/xilazin kombinációjával (100/10 mg/kg) elaltattuk, hogy elektroretinográfiás mérést végezzünk a következők szerint. Mindkét szem pupilláját egy-egy csepp ciklopentoláttal kitágítottuk (Humapent, Teva Kft., Debrecen, Magyarország), majd rövid szemfenéki vizsgálatra került sor kézi ophthalmoszkóppal (Heine Mini 2000 Ophthalmoscope, HEINE Optotechnik GmbH and Co. KG, Gilching, Németország) a diabéteszes retinopátia megerősítésére a szakirodalom alapján (Kowluru és mtsai., 2016; Mishra és mtsai., 2016; Szabó és mtsai., 2017). Az ERG méréshez öt tüelektródát használtunk, hogy a fény által generált áramokat egy analóg-digitális átalakítóval (Bridge Amp és PowerLab, ADInstruments, Sydney, Ausztrália) összekapcsolt erősítőbe vezessük, és a hullámformákat a PowerLab Chart szoftver (5.2.2-es verzió, ADInstruments, Sydney, Ausztrália) segítségével számítógépen is láthatóvá tesszük. Két mérőelektródát behelyeztünk enyhén a szaruhártya felszínébe (anélkül, hogy perforáltuk volna azt), két referenciaelektródát az állat fülcimpájába szúrunk, míg az általános földelő elektródát az állat középvonalában rögzítettük, az orrnyereg bőrébe szúrva. Karbomer alapú szemgél (Vidisic, BauschandLomb, Berlin, Németország) alkalmaztuk a szem kiszáradása ellen és kontaktgélként.

Az International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) irányelvei alapján az elektroretinográfiás méréseket 20 perces sötét adaptáció után végeztük (McCulloch és mtsai., 2015). A scotopiás retinogramot sötétben rögzítettük úgy, hogy az állatok szemét stroboszkóppal (20 cd/m², 0,5 Hz) megvilágítottuk, hogy vegyes pácika és csap választ váltsunk ki. A felvett elektroretinogramok határozott, egyértelműen azonosítható elektromos válaszcsúcsokat mutatnak, amelyek kiemelkednek a háttérzajból, következésképpen a stroboszkóp fényingere után és azzal egy ritmusban (azaz ugyanazzal a 0,5 Hz-es frekvenciával) jelentkeznek. Mint ilyenek, az egyes tüskék erősen pozitív csúcsai a b-hullámok maximális értékei, amelyeket az a-hullámok karakterisztikus negatív csúcsai előznek meg, ahogy az más standard ERG-rendszerekben is látható (Varga és mtsai., 2013). A b-hullámok amplitúdóit a megelőző negatív maximumtól a pozitív maximumig, míg az a-hullámokét a negatív maximum és az azt megelőző pozitív maximum között mértük (5. ábra). Az egyes állatok mindkét szemének elektromos aktivitását 10 felvillanó fénystimulust követően mértük, hogy minden csoporthoz egy közös felvétel-halmazt (pool-t) hozzunk létre, amelyekből aztán statisztikai elemzéseket végeztünk a „Statisztikai elemzés” részben részletezett módon. Az ugyanezzel a mérőrendszerrel rögzített korábbi eredményeink biztosítják, hogy az alkalmazott kísérleti módszer reprodukálható és megbízható adatokat szolgáltat a retina működéséről, és összefüggésben áll a retina integritásával (Varga és mtsai.,

2011; Varga és mtsai., 2013; Varga és mtsai., 2017).

3.5. Western blot

Mindkét kísérletet a szem molekuláris biológiai elemzésével zártuk. Az állatok életét kíméletesen kioltottuk az érzéstelenítő keverék túladagolásával, majd szemeiket kimetszettük és lefagyasztottuk. A teljes szemmintákat késes homogenizátorral (IKA-WERKE ULTRA-TURRAX diszpergátor, Staufen, Németország) homogenizáló pufferben jégen homogenizáltuk. A homogenizáló puffer a következőket tartalmazta: 25 mM Tris, 25 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, proteáz inhibitor koktél és desztillált víz (minden összetevőt a Sigma-Aldrich-Merck KGaA-tól vásároltunk, Darmstadt, Németország). 10 000 fordulat/perc sebességgel, 20 percig, 4°C-on végzett centrifugálást követően a citoszolikus fehérjéket a felülúszóval együtt leszívtuk, hogy a felülúszó citoszolfrakciót elválasszuk a pellettől. A pelletet 1 órán át tovább inkubáltuk Triton X-100 tenzidet is tartalmazó homogenizáló pufferrel (szintén a Sigma-Aldrich-Merck KGaA-tól, Darmstadt, Németország), majd a felülúszó nukleáris frakciót centrifugálással választottuk el (14 000 ford./perc, 10 perc, 4°C), és a sejtmag fehérjéket a felülúszóval együtt leszívtuk. Az egyes frakciók felülúszóinak egy kis részéből spektrofotométerrel (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország) megmértük a teljes fehérjekoncentrációt, mely után a felülúszók maradék többi részét Laemmli mintapuffer (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország) hozzáadásával és 5 perc forralással készítettük elő SDS-poliakrilamid gélelektroforézisre. A fehérjéket 100–120 percig 4 mA-en futtatva 12%-os gélen választottuk el (Hoefler miniVe PAGE SE300 függőleges elektroforetikus és elektrotranszfer egység, Hoefler Inc., Holliston, MA, Egyesült Államok). A fehérjéket ezután nitrocellulóz membránra (GE Healthcare, Darmstadt, Németország) transzferáltuk elektroforetikusán a fent említett eszköz (Hoefler miniVE SE300) blot moduljával. 3%-os BSA-oldattal (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország) blokkoltuk a nitrocellulóz membrán szabadon maradt kötőfelszínét, majd ezt követően a fehérjéket egy éjszakán át primer antitestekkel inkubáltuk. Első kísérletünkben a következő primer antitestekkel inkubáltunk: anti-SIRT1 egér monoklonális antitesttel (mely a SIRT1-et (~110 kDa) ismeri fel, Cat#ab110304, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság); anti-MMP9 nyúl poliklonális antitesttel (mely az MMP9-et (~92 kDa) ismeri fel, Cat#ab38898, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság); anti-HistoneH3 rekombináns, monoklonális nyúl antitesttel (mely a hiszton H3-at (~17 kDa) ismeri fel, Cat#701517 ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA); és anti-béta-aktin

egér monoklonális antitesttel (mely a béta-aktint (~42 kDa) ismeri fel, Cat#A5316, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország). Második kísérletünkben pedig a következő primer antitesteket használtuk: anti- β -aktin (Cat#A5316, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország); anti-Histone H3 (kat. szám: 701517, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok); anti-HSP70 (SAB4200714, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország); és anti-nukleáris faktor κ B (ab 16502, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság). Másnap a membránok desztillált vízzel történő mosása után, a keresett fehérjék megjelenítéséhez torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesteket használtunk: egér elleni antitestet (Cat#A4416) és nyúl elleni antitestet (Cat#A0545; mindkettő a Sigma-Aldrich-Merck KGaA-tól, Darmstadt, Németország). A kimutatáshoz WesternBright™ fokozott érzékenységű kemilumineszcens szubsztrátot (Advansta Inc., Menlo Park, CA, Egyesült Államok) és LI-COR C-DiGit® blot szkennert (LI-COR Inc., Lincoln, NE, Egyesült Államok) használtunk. Csoportonként három blot elemzését ImageJ szoftverrel (1.51-es verzió, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Egyesült Államok) végeztük. Az eredményeket úgy kaptuk, hogy a blotokat a háttérre normalizáltuk, és egy háztartási fehérjére (béta-aktin vagy hiszton H3) standardizáltuk.

3.7. Kísérleti protokollok és csoportok

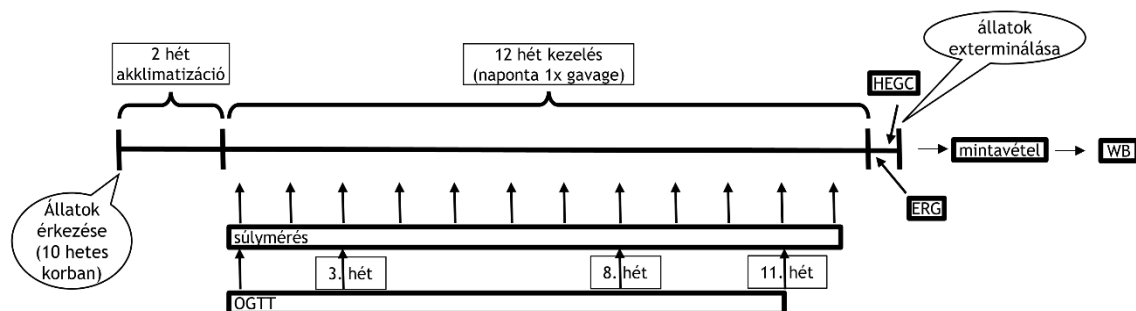
3.7.1. Kísérlet Goto-Kakizaki patkányokkal

Első kísérletünk célja volt összehasonlítani a BGP-15 feltételezett retinoprotektív hatását humán-gyógyászatban hagyományosan alkalmazott anti-diabetikumokkal Goto-Kakizaki patkány modellen.

Két hetes akklimatizáció után (12 hetes korukban) az állatokat véletlenszerűen a következő csoportokra osztottuk (minden csoportban $n = 6$): Goto kontrollcsoport (kezeletlen, beteg), Wistar kontrollcsoport (kezeletlen, egészséges) és négy kezelt beteg csoport, amelyekben GK patkányok voltak: BGP-15, metformin, glibenklamid és pioglitazon. A kezeléseket naponta rozsdamentes acél gyomorszondán keresztül gavage-olva, a következő dózisokban adtuk: BGP-15 10 mg/kg, metformin 100 mg/kg, glibenklamid 5 mg/kg és pioglitazon 10 mg/kg. Minden kezelési anyagot a Sigma-Aldrich-Merck KGaA cégtől (Darmstadt, Németország) szereztünk be. A két kontrollcsoport oldószert kapott gavage-olva. Az adagok korábbi kutatások alapján lettek kiválasztva (Mohammad és Kowluru, 2012; Literati-Nagy és mtsai., 2014; Adil és mtsai., 2017; Elattar és mtsai., 2017;

Holdsworth és mtsai., 2017). Az állatok súlyát a vizsgálat 12 hete alatt heti rendszerességgel mértük.

Ezekon az állatokon (a napi gavage-on kívül) a következő kísérleteket végeztük el időrendben: éhomi vércukorszint mérés, OGTT, ERG, HEGC, WB (7. ábra).



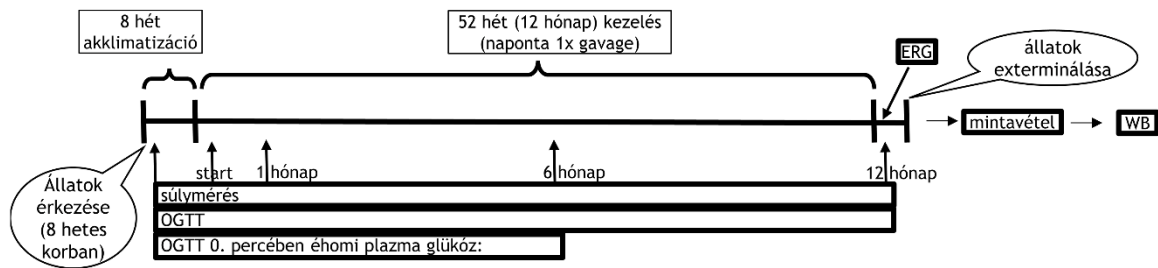
7. ábra: Kísérleti protokoll a Goto-Kakizaki patkányos kísérletben

3.7.2. Kísérlet ZDF-patkányokkal

A második kísérletünk célja a BGP-15 hosszú távú alkalmazásának kipróbálása, az esetleges mellékhatások megfigyelése, valamint a kísérleti anyag kipróbálása egy elhízott, II. típusú cukorbetegségben szenvedő állatmodellen, ZDF patkányokon.

A ZDF állatokat véletlenszerűen két csoportba osztottuk: ZDF kontrollcsoportba (ZDF) és BGP-15-kezelt csoportba (BGP). A sovány állatokból egy harmadik csoportot alakítottuk ki (lean). N=10 minden csoportban. 16 hetes koruktól kezdve minden állatot naponta szájon át gavage-oltunk (orogasztrikus tápszondán keresztül) a vizsgálat teljes ideje alatt, amely 52 hétig (1 évig) tartott. A kezelt csoport 10 mg/kg BGP-15-öt kapott metil-cellulóz nyákban, míg a sovány és ZDF csoportba tartozó állatokat csak vivőanyaggal kezeltük. Az adagot elsőként kivitelezett kísérletünkre alapoztuk. A BGP-15-öt a Sigma-Aldrich-Merck KGaA-tól szereztük be (Darmstadt, Németország).

Ezekon az állatokon a következő kísérleteket végeztük el időrendben: túlélési görbe analízis, éhomi vércukorszint mérés, OGTT, ERG, WB (8. ábra).



8.ábra: Kísérleti protokoll a ZDF patkányos kísérletben

3.8. Statisztika

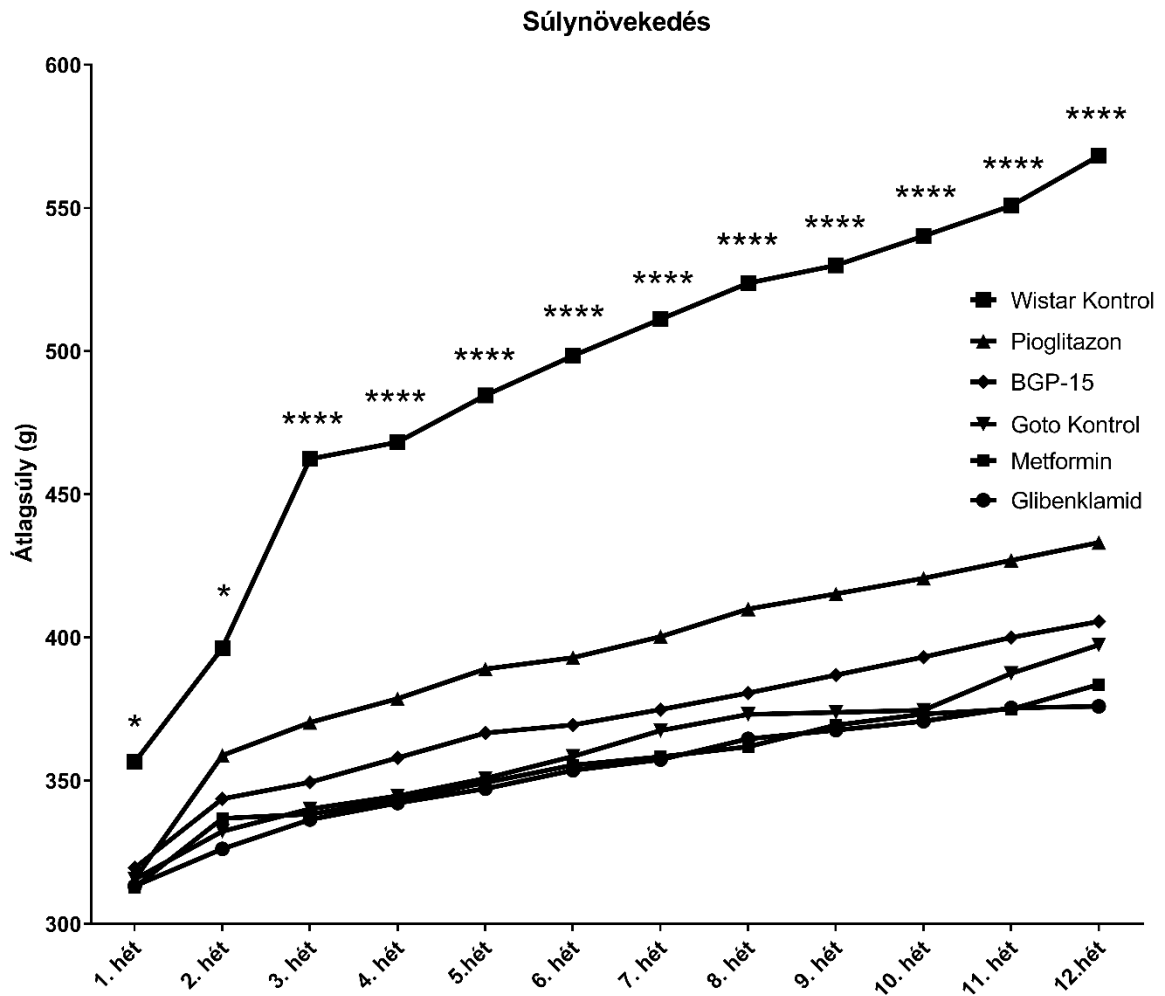
A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism szoftvert (7.0-s verzió, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Egyesült Államok) használtunk. A Gauss-eloszlást Shapiro-Wilk normalitástesztel értékeltük. A normál eloszlású adatokat egyutas varianciaanalízissel (ANOVA), míg a nem normál eloszlású adatokat nem-parametrikus Kruskal–Wallis tesztel analizáltuk. A csoportértékek különböző időpontokban történő elemzése esetén kétutas varianciaanalízist alkalmaztunk. Az összehasonlítást akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a valószínűségi értékek 0,05-nél kisebbek voltak ($p < 0.05$). A szignifikancia szintjét a következőképpen jeleztük: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; és **** $p < 0,0001$. Az összes adatot átlag \pm az átlag standard hibája (SEM) formátumban adtuk meg.

4. Eredmények

4.1. A Goto-Kakizaki patkánykísérlet eredményei

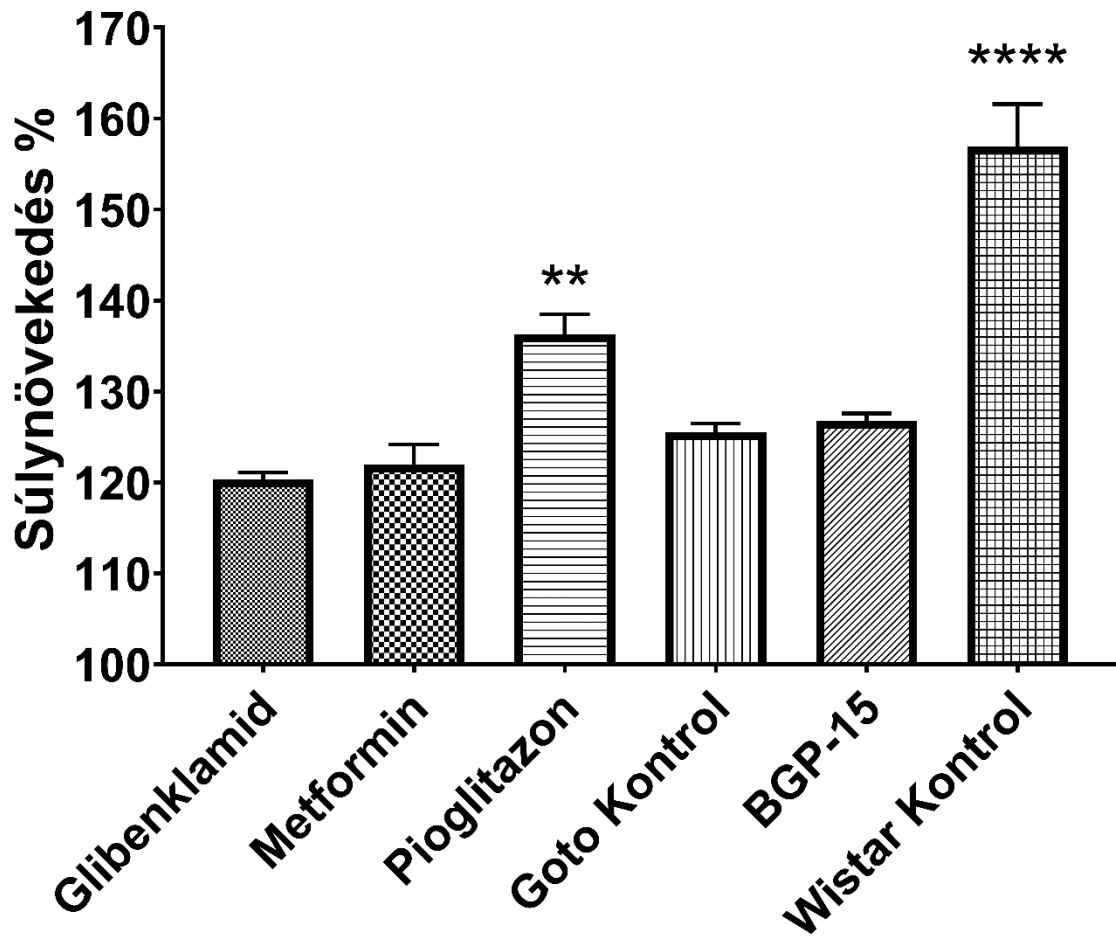
4.1.1. Testtömeg-gyarapodás

A kísérlet 12 hete alatt az állatok súlyát hetente mértük. Többé-kevésbe egyenletes testúlygyarapodás volt megfigyelhető mindegyik csoportban (9. ábra). A csoportok kezdeti és végponti súlyai \pm az átlagok standard hibája (\pm SEM) a következők voltak: Glibenklamid $313.3 \pm 4.074 - 376.0 \pm 5.671$ g, Metformin $312.8 \pm 5.655 - 383.6 \pm 12.268$ g, Goto kontrol $315.6 \pm 4.070 - 397.4 \pm 6.266$ g, BGP-15 $319.6 \pm 5.566 - 405.6 \pm 9.024$ g, Pioglitazon $315.6 \pm 3.658 - 433.2 \pm 10.398$ g, Wistar kontrol $356.5 \pm 3.989 - 568.2 \pm 18.552$ g; minden csoportban az első heti (kezdeti) és 12. heti (végponti) súlyok szignifikánsan különböztek egymástól ($p < 0.0001$). A pioglitazon-csoport kezdeti súly százalékában kifejezett testtömeggyarapodása \pm SEM ($136.3 \pm 2.207\%$) szignifikánsan magasabbnak bizonyult a többi betegcsoporténál ($120.3 \pm 0.788\%$, $121.9 \pm 2.228\%$, $125.5 \pm 0.940\%$ és $126.8 \pm 0.769\%$, Glibeklamid, Metformin, Goto kontrol és BGP-15 csoportok az említés sorrendjében). Az egészséges wistar patkányok adata ($156.9 \pm 4.667\%$) kimagaslott az összes többi csoporté közül ($p < 0.0001$), ahogy a 10. ábrán is látszik.



9. ábra: Az állatok súlyának növekedése a kísérlet 12 hete alatt. Az adatok csoportátlagok. A jobb láthatóság érdekében az egyes adatpontok SEM értékei nincsenek feltüntetve. n=6 állat csoportonként. * = $p < 0.05$ minden más csoporthoz viszonyítva; **** = $p < 0.0001$ minden más csoporthoz viszonyítva. A statisztikai kiértékelés GraphPad Prism szoftverrel készült: egy-utas varianciánálízis (ANOVA) teszttel.

Súlynövekedés a kezdeti súly %-ában



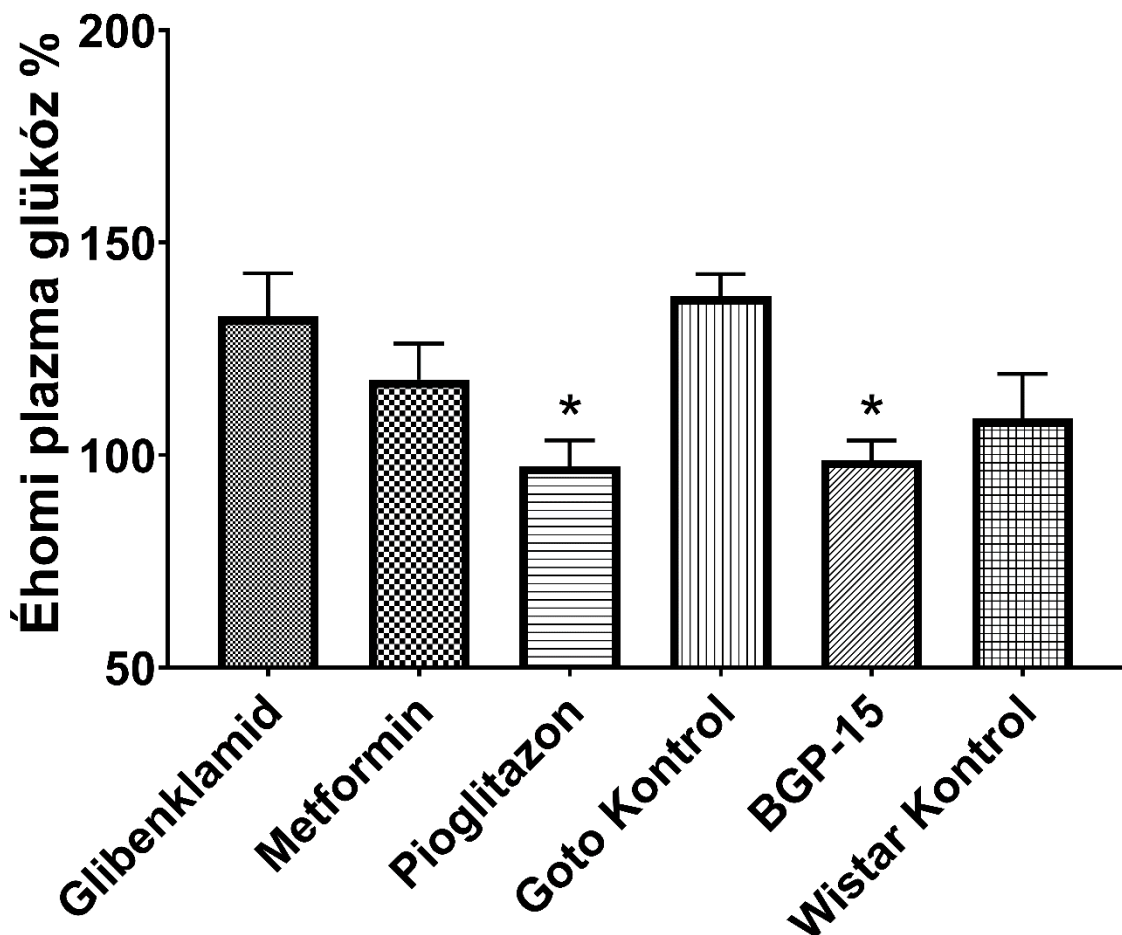
10. ábra: Az állatcsoportok súlygyarapodása százalékosan: az állatok átlagos súlya minden csoportban a kísérlet végén a kezdeti átlagsúlyuk százalékában kifejezve. Az ábrázolt adatok csoportátlagok \pm SEM; $n=6$ állat minden csoportban. ** = $p<0.01$ minden más csoportot viszonyítva; **** = $p<0.0001$ minden más csoporthoz viszonyítva. A statisztikai kiértékelés GraphPad Prism szoftverrel készült: az adatokat eloszlásuk Shapiro-Wilk normalitás teszttel történő meghatározása után vagy egy-utas varianciánálízis (ANOVA) teszttel vagy nem-parametrikus Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk.

4.1.2. Éhomi vércukorszintek eredmények

A kísérlet alatt minden beteg, GK csoport éhomi vércukorszintje egy 8-9-mmol/L-es átlag körül mozgott – minden szignifikáns különbség nélkül bármely két csoportot összehasonlítva – míg a Wistar értékek egy szignifikánsan alacsonyabb szinten, átlagosan 5-6 mmol/L körül

voltak (9.2 ± 0.589 mmol/L, 9.4 ± 0.526 mmol/L, 8.2 ± 0.171 mmol/L, 9.2 ± 1.059 mmol/L és 9.4 ± 0.692 mmol/L vs. 5.2 ± 0.178 mmol/L rendre Glibenklamid, Metformin, Pioglitazon, Goto kontrol és BGP-15 vs Wistar kontrol összehasonlításban; $p < 0.05$). A 11. ábrán a kísérlet végpontjában mért éhomi vércukorszintek a kezdeti értékek százalékában vannak ábrázolva. A BGP-15, a Pioglitazon és Wistar csoportok éhomi vércukor értékei nem változtak, a végponti értékek rendre így alakultak: $98.87 \pm 4.532\%$; $97.35 \pm 6.116\%$ és $108.6 \pm 10.550\%$, melyekből a két első csoport statisztikailag szignifikánsan különbözött a Goto kontrol csoporttól ($137.4 \pm 5.219\%$). A Glibenklamid és Metformin-csoport értékei a következők voltak: $132.6 \pm 10.15\%$ és $117.8 \pm 8.421\%$.

Végponti Éhomi Plazma Glükóz a kezdeti érték %-ában

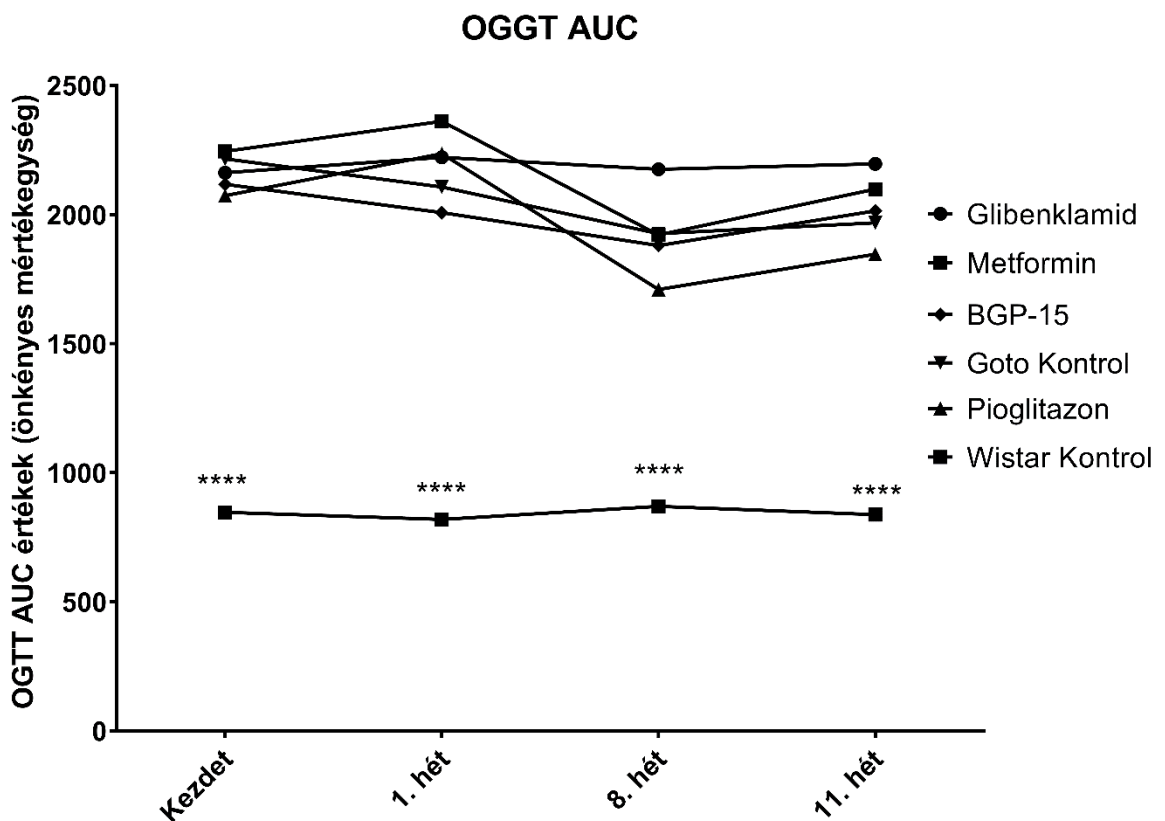


11. ábra: Végponti éhomi vércukorszintek a kezdeti értékek százalékában kifejezve. Az ábrázolt adatok csoportátlagok \pm SEM; $n=6$ állat minden csoportban. * = $p < 0.05$ a Goto kontrol csoporthoz viszonyítva. A statisztikai kiértékelés GraphPad Prism

szoftverrel készült: az adatokat eloszlásuk Shapiro-Wilk normalitás tesztel történő meghatározása után vagy egy-utas varianciánálízis (ANOVA) tesztel vagy nem-parametrikus Kruskal-Wallis tesztel vizsgáltuk.

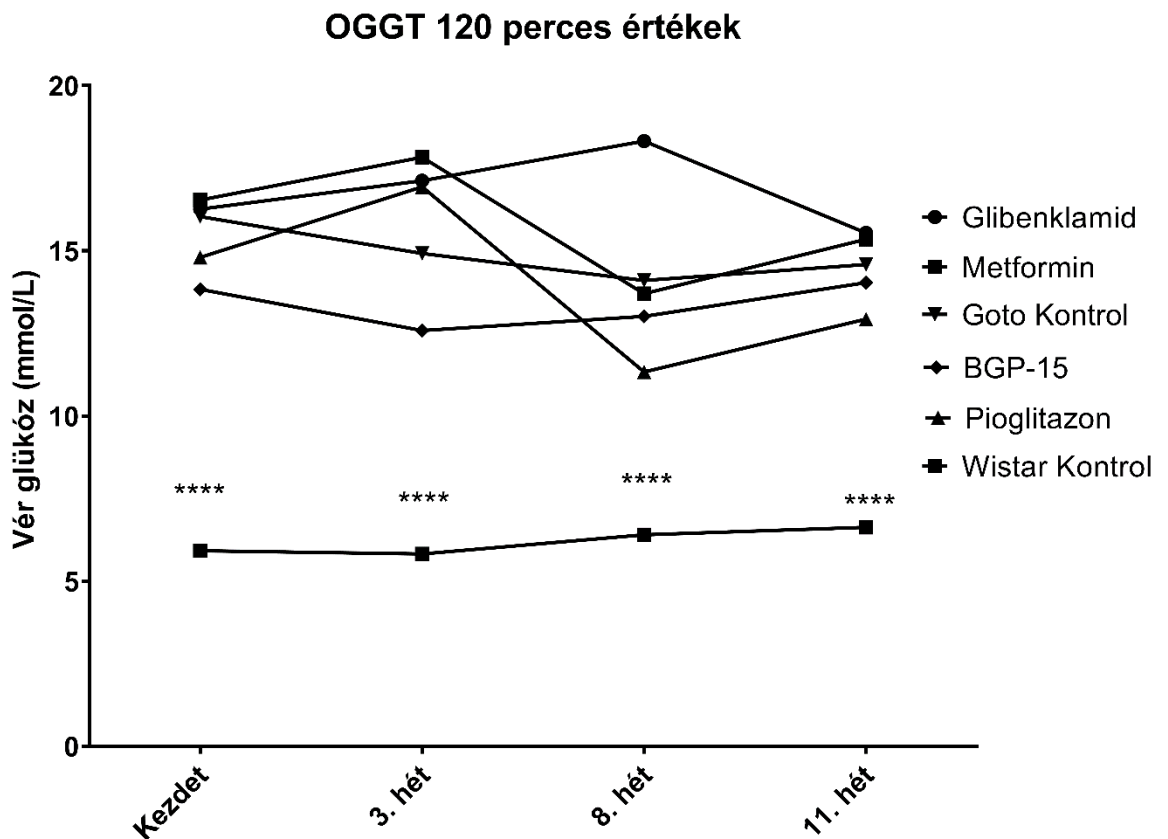
4.1.3. Orális glükóztolerancia teszt eredmények

Sem az orális glükóztolerancia teszt (OGTT) folyamán a vércukorszintek görbe alatti területei (area under curve, AUC), sem a 120 perces OGTT értékek nem mutattak különbségeket a kezelt csoportok és a kezeletlen Goto kontrol csoport összehasonlításakor (12. és 13. ábra). Másfelől viszont, ahogy az várható is volt, még a 120 perces OGTT értékek sem mutatták jelét a cukorbetegségnek az egészséges Wistar patkányok esetén (13. ábra), mint ahogyan már az éhomi vércukorszintek esetén sem: a kísérlet egésze alatt az egészséges Wistar csoport 120 perces OGTT értékei 7.8 mmol/L alatt maradtak (5.92 ± 0.073 , 5.82 ± 0.183 , 6.40 ± 0.148 and 6.63 ± 0.551 mmol/L \pm SEM rendre a kísérlet kezdetén majd a 3., 8. és 11. héten)



12. ábra: Az orális glükóztolerancia teszt (OGTT) alatt mért vércukorszintek görbe alatti területe (area under curve, AUC). Az adatok csoportátlagok. A jobb láthatóság

érdekében az adatpontok SEM értékei nincsenek ábrázolva. n=6 állat minden csoportban. **** = $p < 0.0001$ minden más csoporthoz viszonyítva. A statisztikai kiértékelés GraphPad Prism szoftverrel készült: két-utas varianciánálízis (ANOVA) teszttel.

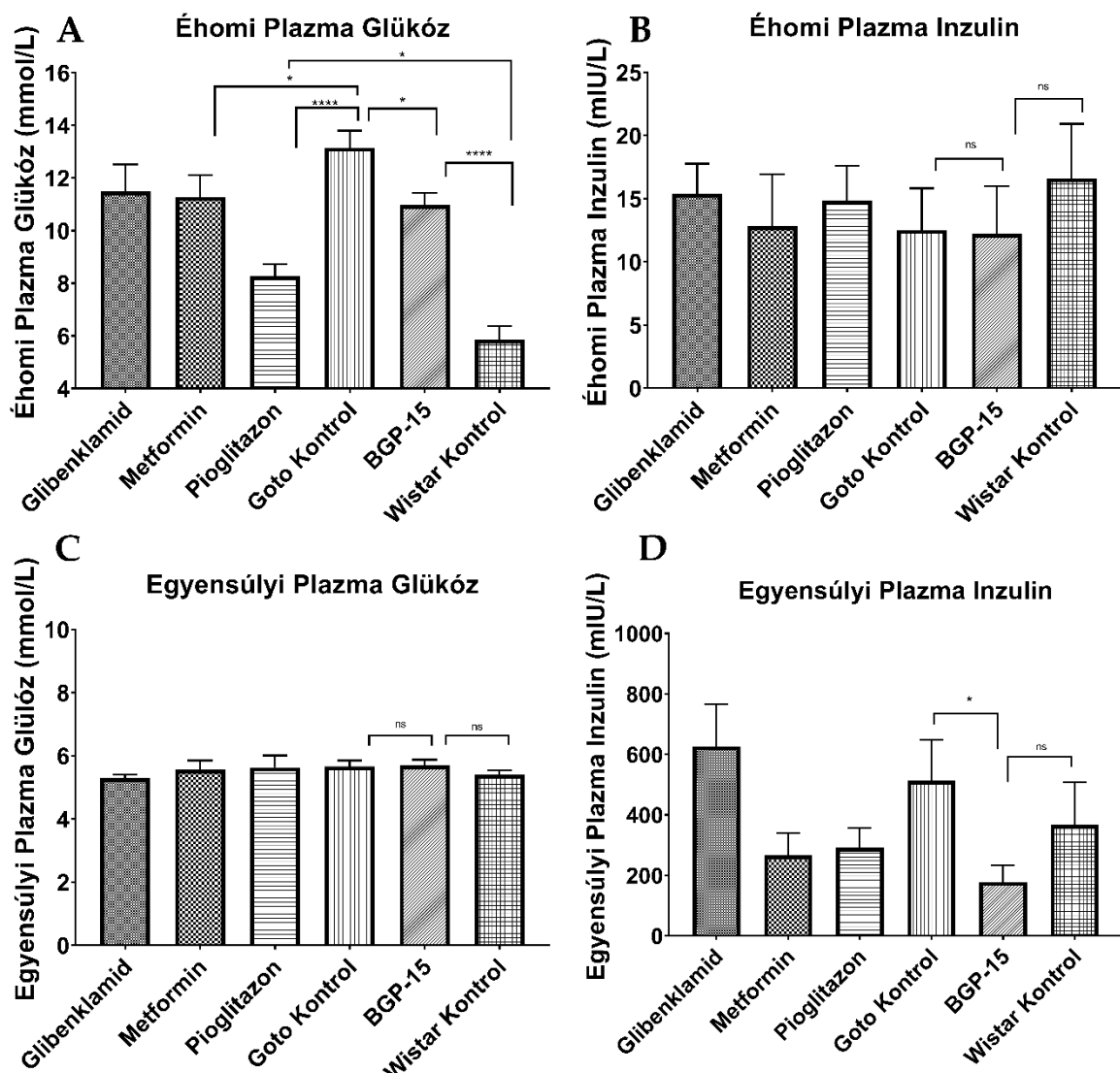


13. ábra: A különböző állatcsoportok vércukor értékei az OGTT mérések végén (120 perccel a cukorterhelés után). Az adatok csoportátlagok. A jobb láthatóság érdekében az adatpontok SEM értékei nincsenek ábrázolva. n=6 állat minden csoportban. **** = $p < 0.0001$ minden más csoporthoz viszonyítva. A statisztikai kiértékelés GraphPad Prism szoftverrel készült: két-utas varianciánálízis (ANOVA) teszttel.

4.1.4. Hiperinzulinémiás euglikémiás clamp (HEGC) eredmények

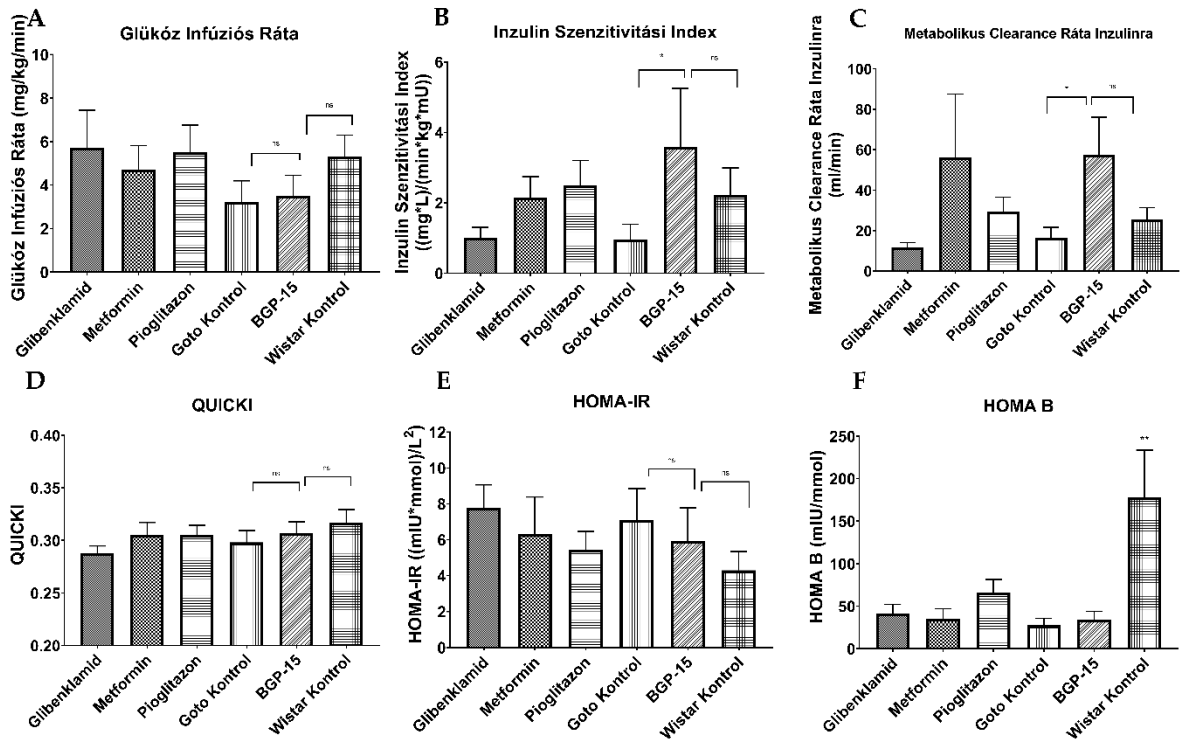
Ahogy a 14. ábrán is látszik szignifikáns különbségek voltak a plazma inzulin szintek között a hiperinzulinémiás euglikémiás clamp (HEGC) módszer végén: míg az egészséges Wistar patkányok 366.6 ± 141.3 mU/L átlag \pm SEM értéket prezentáltak, addig a BGP-15-kezelt Goto-Kakizaki patkányoké 178.3 ± 54.71 mU/L-nak bizonyult, ami szignifikánsan különbözött a Goto kontrol csoport 513.0 ± 135.9 mU/L értékétől (* = $p < 0.05$). A

Glibenklamid nem tudta enyhíteni az inzulin-rezisztenciát, ami a relatíve magas inzulin szintekből is látszott (626.3 ± 140.7 mU/L) a HEGC protokoll végén, ezzel szemben mind a Metformin, mind a Pioglitazon inzulin-érzékenyítő hatást mutatott (értékeik rendre 266.6 ± 72.93 és 291.5 ± 65.46 mU/L). Ha megnézzük a direkt éhomi plazma glükóz értékeket (14A ábra), szembetűnő, hogy nemcsak a Metformin (11.28 ± 0.822 ; $p < 0.05$ vs. Goto kontrol (13.15 ± 0.650 mmol/L)) és a pioglitazon (8.27 ± 0.463 mmol/L; $p < 0.0001$ vs. Goto kontrol), hanem a BGP-15 is (10.97 ± 0.460 mmol/L) képes volt szignifikánsan csökkenteni a vércukrot ($p < 0.05$ vs. Goto kontrol), jóllehet ez a csökkenés nem volt olyan kifejezett, mint a pioglitazon esetében. Ugyanakkor, még a pioglitazon sem volt képes elérni az egészséges állatok szintjét ($p < 0.05$ a pioglitazon vs Wistar kontrol (5.86 ± 0.506 mmol/L) összehasonlításban). A glibenklamid-kezelt csoport éhomi plazma glükóz szintje \pm SEM 11.5 ± 1.016 volt. Nem voltak szignifikáns különbségek a csoportok között a éhomi plazma inzulin és a steady state vércukorszintek esetén.



14. ábra: Plazma glükóz és inzulin értékek a hiperinzulinémiás euglikémiás clamp (HEGC) módszer kezdetén és végén. (A) Éhomi plazma glükóz értékek a HEGC protokoll kezdetén; (B) Éhomi plazma inzulin értékek a HEGC protokoll kezdetén; (C) steady state plazma glükóz értékek a HEGC protokoll végén; (D) steady state plazma inzulin értékek a HEGC protokoll végén. Az ábrázolt adatok csoportátlagok \pm SEM; n=6 állat minden csoportban. * = $p < 0.05$; **** = $p < 0.0001$; ns = nem-szignifikáns. A statisztikai kiértékelés GraphPad Prism szoftverrel készült: az adatokat eloszlásuk Shapiro-Wilk normalitás teszttel történő meghatározása után vagy egy-utas varianciánálízis (ANOVA) teszttel vagy nem-parametrikus Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk.

A direkt HEGC adatok további vizsgálata különböző származtatott mennyiségeket is szolgáltatott számunkra (15. ábra), mint a glükóz infúziós ráta (GIR), inzulin szenzitivitási index (ISI), metabolikus clearance ráta inzulinra (MCRI), kvantitatív inzulin szenzitivitási ellenőrzési index (quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI)), inzulin rezisztenciára számolt ún. HOMA index (homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)), illetve B-sejt funkcióra számolt HOMA index (homeostasis model assessment of B-cell function (HOMA-B)). Ahogyan az ISI és MCRI grafikonokból látszik a BGP-15 értékei \pm SEM (egyenként 3.596 ± 1.656 és 57.57 ± 18.500) szignifikánsan különböztek a Goto kontrol értékektől \pm SEM (rendre 0.956 ± 0.432 és 16.57 ± 5.095), ugyanakkor az egészséges kontroll értékekhez hasonlítva nem volt különbség (2.22 ± 0.776 és 25.67 ± 5.650 , respectively), sőt enyhén (de statisztikailag nem-szignifikánsan) még magasabb értékek is látszódtak. A többi diagram esetén a különbségek nem érték a statisztikai szignifikancia szintjét (az ésszerű összehasonlításokat illetően).

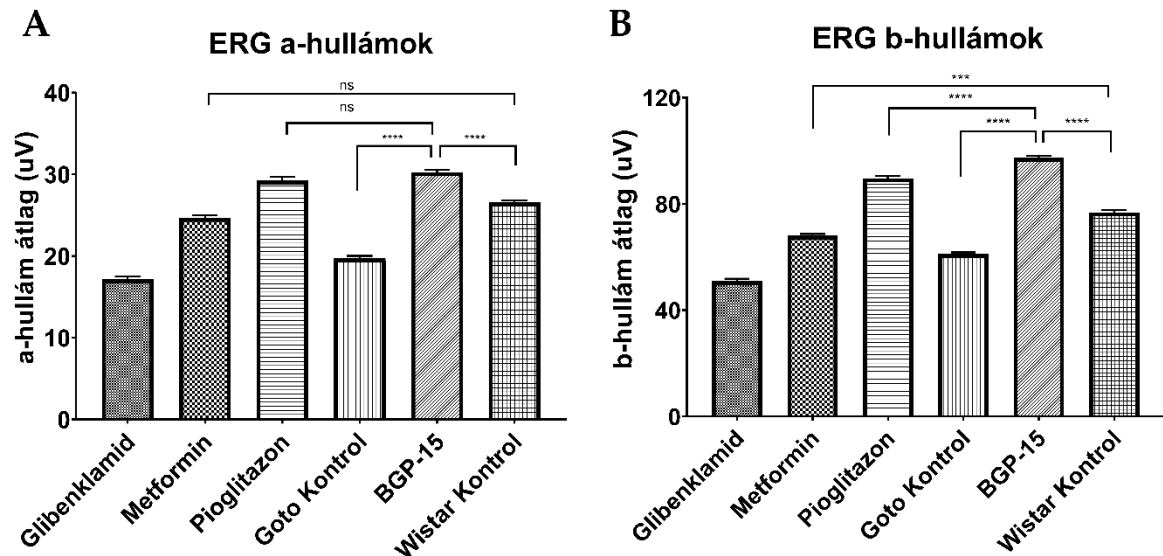


15. ábra: További, a HEGC protokollon alapuló, származtatott mutatók. A: glükóz infúziós ráta (GIR); B: inzulin szenzitivitási index (ISI); C: metabolikus clearance ráta inzulinra (MCRI); D: kvantitatív inzulin szenzitivitási ellenőrzési index (quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI)); E: inzulin rezisztenciára számolt ún. HOMA index (homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)); F: B-sejt funkcióra számolt HOMA (index homeostasis model assessment of B-cell function (HOMA-B)) Az ábrázolt adatok csoportátlagok \pm SEM; n=6 állat minden csoportban. * = $p < 0.05$; ns = nem-szignifikáns. A statisztikai kiértékelés GraphPad Prism szoftverrel készült: az adatokat eloszlásuk Shapiro-Wilk normalitás tesztel történő meghatározása után vagy egy-utas varianciánálízis (ANOVA) tesztel vagy nem-parametrikus Kruskal-Wallis tesztel vizsgáltuk.

4.1.5. Elektroretinográfia eredmények

Az ERG mérések alapján a csoport trendek mind az a- mind a b-hullámok esetén nagyon hasonlóak (vesd össze 16. A és B ábrát). A BGP magasabb a- és b-hullámamplitúdókat produkált (rendre $30.25 \pm 0.342 \mu\text{V}$ és $97.39 \pm 0.708 \mu\text{V}$), mint amelyeket a Goto kontrol csoportnál megfigyelhettünk (rendre $19.7 \pm 0.315 \mu\text{V}$ és $61.11 \pm 0.672 \mu\text{V}$). Sőt, a BGP-értékek statisztikailag még szignifikánsan magasabbak is voltak az egészséges Wistar értékeknél (az a- és b-hullámamplitúdók rendre $26.54 \pm 0.267 \mu\text{V}$ és $76.83 \pm 0.767 \mu\text{V}$). A

BGP-kezelés az a- és b-hullám amplitúdókra gyakorolt ezen hatása hasonlóan vagy jobbnak is bizonyult, mint a metformin- és a pioglitazon-kezelésé (metformin átlag a- és b-hullámai rendre: $24.66 \pm 0.316 \mu\text{V}$ és $68.09 \pm 0.628 \mu\text{V}$; pioglitazon átlag a- és b-hullámai rendre: $29.25 \pm 0.426 \mu\text{V}$ és $89.68 \pm 0.862 \mu\text{V}$). Az előbb említett három kezelés hasonló vagy magasabb amplitúdókat produkált, mint az egészséges Wistar állatok.



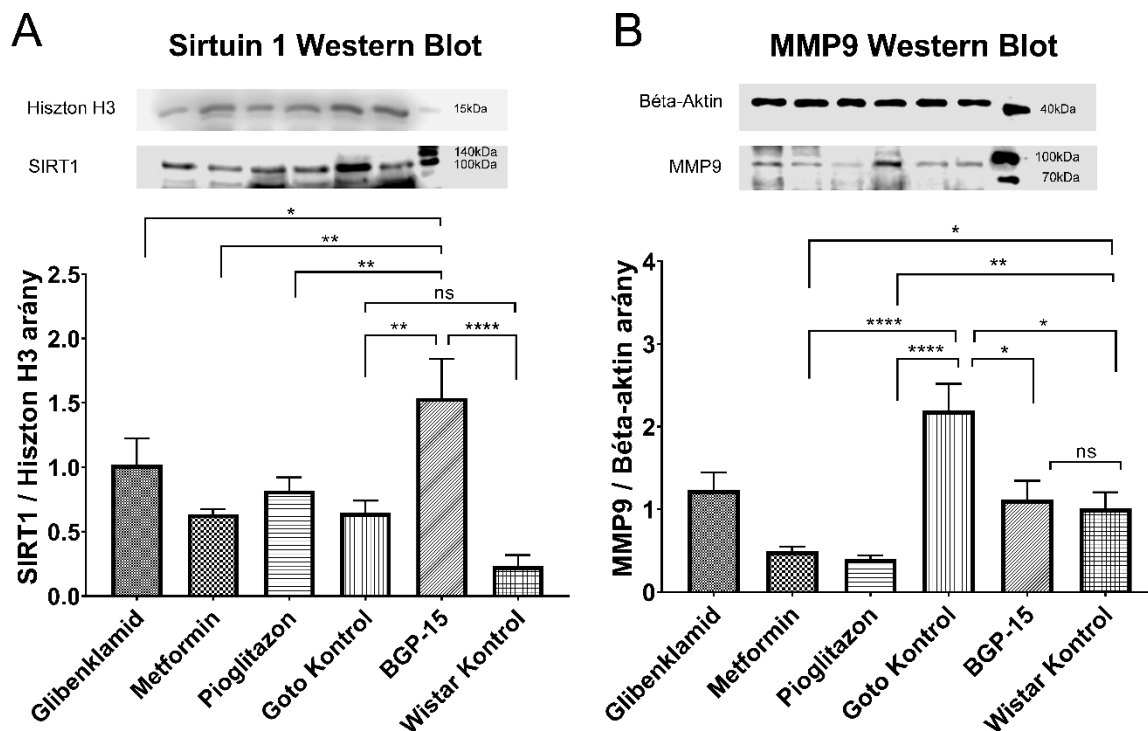
16. ábra: Elektroretinográfiás (ERG) eredmények. (A) a-hullámok csoportátlagai; (B) b-hullámok csoportátlagai. Az ábrázolt adatok csoportátlagok \pm SEM; $n=6$ állat minden csoportban. Mindkét ábrarészleten a külön nem jelölt összehasonlítások közötti különbség szignifikáns ****= $p<0.0001$. *** = $p<0.001$; ns = nem-szignifikáns. A statisztikai kiértékelés GraphPad Prism szoftverrel készült: az adatokat eloszlásuk Shapiro-Wilk normalitás teszttel történő meghatározása után vagy egy-utas varianciánálisis (ANOVA) teszttel vagy nem-parametrikus Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk.

4.1.6. Western Blot Eredmények

Sirtuin 1 és mátrix metalloproteináz 9 ellenes elsődleges antitesteket alkalmaztunk az izolált, sodium-dodecilszulfátos poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) szétválasztott fehérjéken a nitrocellulóz membránra való elektroforetikus transzferálást követően. Ahogy a 17. ábrán látszik szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők az előbb említett két fehérje esetén a BGP-kezelt csoportban.

A SIRT1 expressziót (17. A ábra) a BGP-kezelés serkentette: a BGP-15-kezelt csoport standardizált-normalizált pixelsűrűsége szignifikánsan nagyobbak bizonyult mind a Goto kontrol, mind a Wistar kontrol csoportokénál (1.539 ± 0.301 vs 0.6463 ± 0.094 és 0.2346 ± 0.083 , $p < 0.01$ és $p < 0.0001$, az említés sorrendjében). Statisztikailag nem volt szignifikáns különbség a Goto kontrol és Wistar kontrol csoportok között. A BGP-15 érték magasabbnak bizonyult az összes többi csoporténál is (1.020 ± 0.205 , 0.6371 ± 0.040 és 0.8204 ± 0.1015 rendre: glibenklamid-, metformin- és pioglitazon-csoport; $p < 0.05$, $p < 0.01$ és $p < 0.01$ vs BGP). A glibenklamid- és pioglitazon-csoportokban a SIRT1 szint szignifikánsan nagyobbak mutatkozott a Wistar kontrol csoporténál ($p < 0.05$ mindkét összehasonlításban; az ábrán nincs feltüntetve).

Az MMP9 expresszió (17. B ábra) szignifikánsan emelkedettebb volt a diabéteszes Goto kontrol csoportban az egészséges Wistar kontrolhoz viszonyítva (2.716 ± 0.402 vs 1.167 ± 0.229 $p < 0.01$). Ezt az emelkedést csökkentette mindegyik kezelés (BGP-15, metformin, pioglitazon; 1.1210 ± 0.225 , 1.466 ± 0.257 , 0.7875 ± 0.093 és 0.4484 ± 0.047 , sorrendben). Az MMP9 csökkenése a BGP-15 kezelés következtében szignifikánsnak bizonyult a Goto kontrollhoz hasonlítva azt ($p < 0.01$), olyannyira, hogy a BGP átlag értéke hasonló volt a Wistar kontrol csoportéhoz: ez utóbbi két csoport között nem is volt szignifikáns különbség. A glibenklamid képes volt kivitelezni, amit a BGP: értéke szignifikánsan különbözött a Goto kontrollétól ($p < 0.05$), de a Wistar csoportétól nem (ezen összehasonlítások az ábrán nincsenek feltüntetve). A Metformin és a pioglitazon még hatékonyabbak voltak ($p < 0.001$ a metformin vs Goto kontrol és $p < 0.001$ a pioglitazon vs Goto kontrol összehasonlításokban).



17. ábra: Western Blot eredmények. (A) A sirtuin 1 (SIRT1) fehérje expressziója a kísérlet különböző csoportjaiban. (B) A mátrix metalloproteináz 9 (MMP9) expressziója a különböző csoportokban. A detektált fehérjék: Histone H3 (~17kDa), SIRT1 (~120kDa), beta-actin (~42kDa), MMP9 (~92kDa). Az ábrázolt adatok csoportátlagok \pm SEM; n=6 állat minden csoportban. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$; ns = nem-szignifikáns. A statisztikai kiértékelés GraphPad Prism szoftverrel készült: az adatokat eloszlásuk Shapiro-Wilk normalitás teszttel történő meghatározása után vagy egy-utas varianciánálízis (ANOVA) teszttel vagy nem-parametrikus Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk.

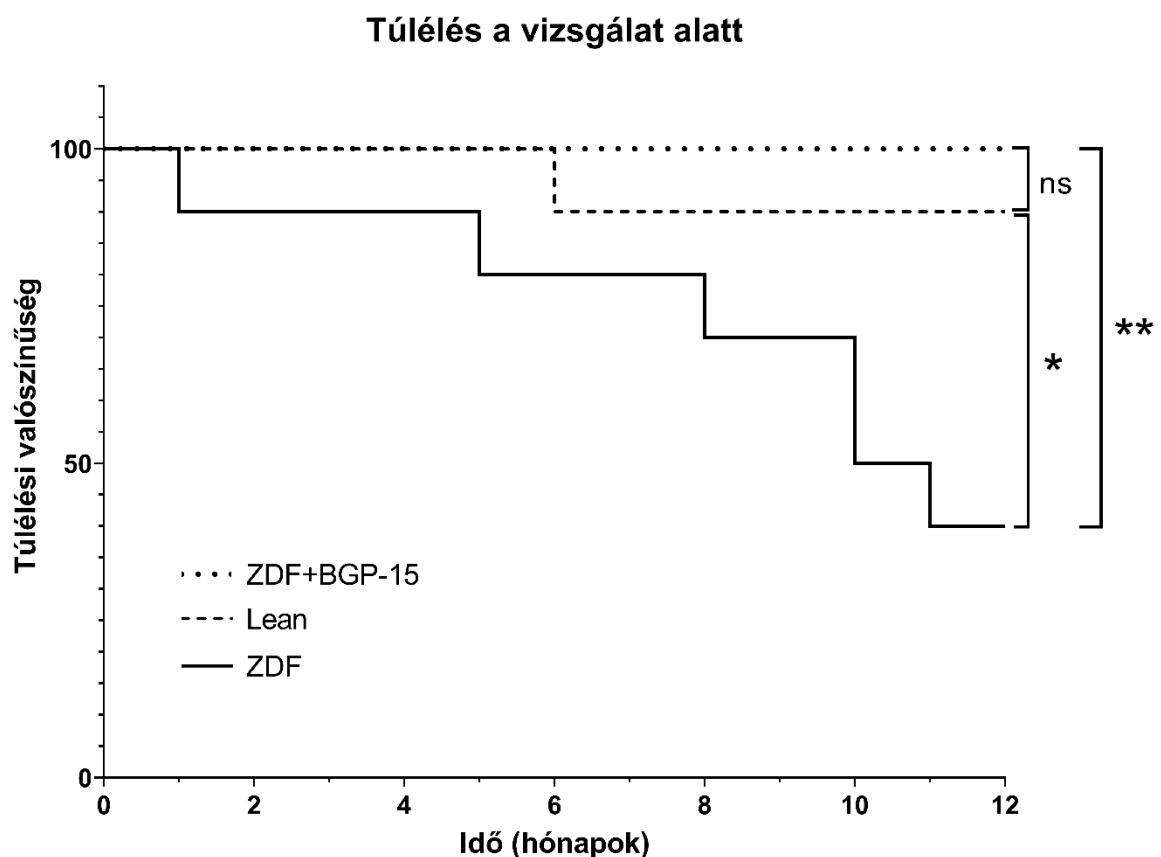
Az MMP9 antitest gyártójának specifikációi szerint az antitest az MMP9 más formáit is detektálhatja, mivel “a[z MMP9] prekursorának processzálása különböző 64, 67 és 82kDa-os aktív formákat eredményez” (Abcam). Valóban észlelhetők voltak más, alacsonyabb molekulásúlyú jelölődések is a bloton és ezeket is kiértékeljük; azonban az egyes csoportok jelei között nem voltak statisztikailag szignifikáns eltérések (ezek az adatok nincsenek feltüntetve).

4.2. A ZDF patkánykísérlet eredményei

4.2.1. Túlélési analízis eredmények

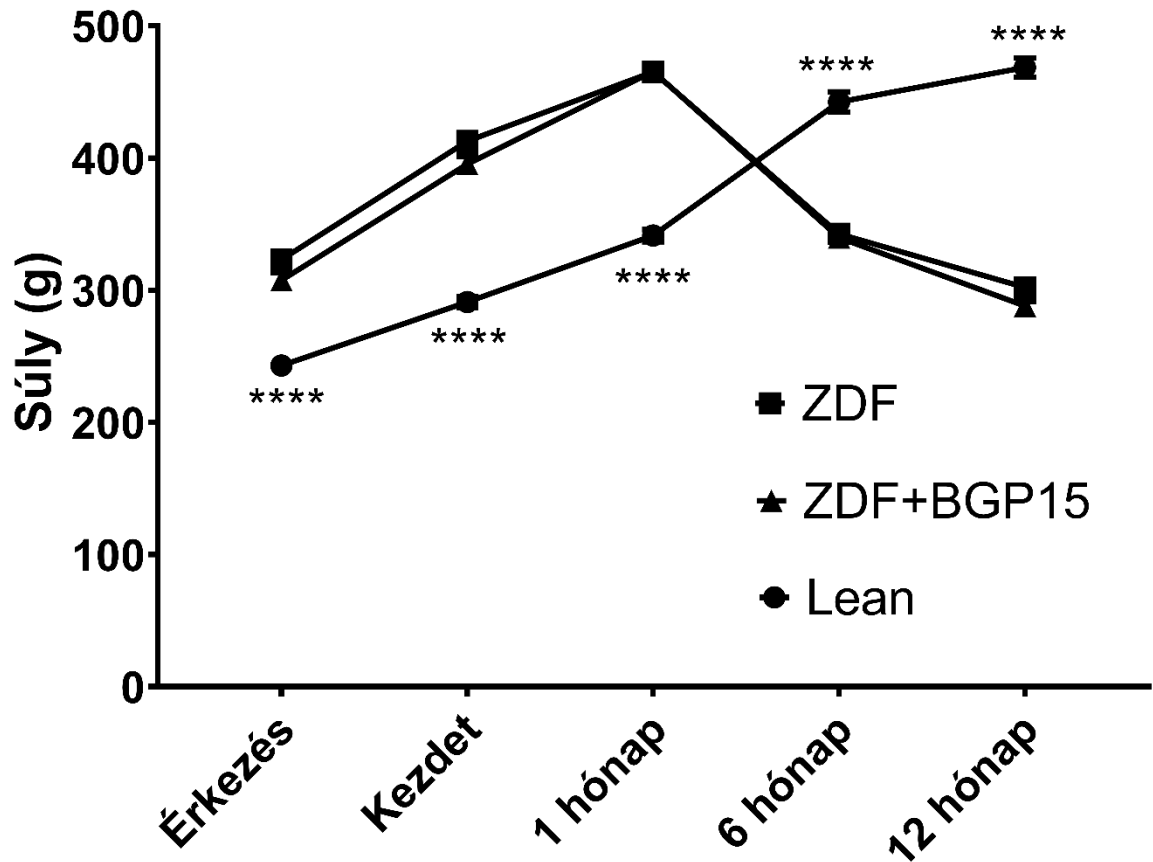
A BGP-vel kezelt állatok túlélésére vonatkozó elemzési eredmények a 18. ábrán láthatók. A kezelés 12 hónapja alatt a BGP-vel kezelt csoport állatainak 100%-a túlélte a cukorbetegség károsító hatásait, összehasonlítva a nem kezelt ZDF-csoporttal ahol az állatok 60%-a elpusztult, ami szignifikáns különbségnek bizonyult ezen csoportok Kaplan–Meier túlélési görbéi között (** $p < 0,01$). A sovány csoportban az egészséges kontroll állatok 90%-a élve érte el a vizsgálat végét, ami szignifikánsan eltért a nem kezelt ZDF csoport 40%-os értékétől (* $p < 0,05$). A Mantel–Cox és Gehan–Breslow–Wilcoxon tesztek alapján nem volt szignifikáns különbség a BGP és a lean csoportok között.

A súly nem változott eltérően a kezelt és a kezeletlen ZDF-csoportok között, bár mindkettő szignifikánsan eltért a sovány értékektől a teljes vizsgálat során (19. ábra).



18. ábra: Az állatok Kaplan-Meier túlélési görbéje a második kísérlet folyamán

Súlyváltozás a vizsgálat alatt

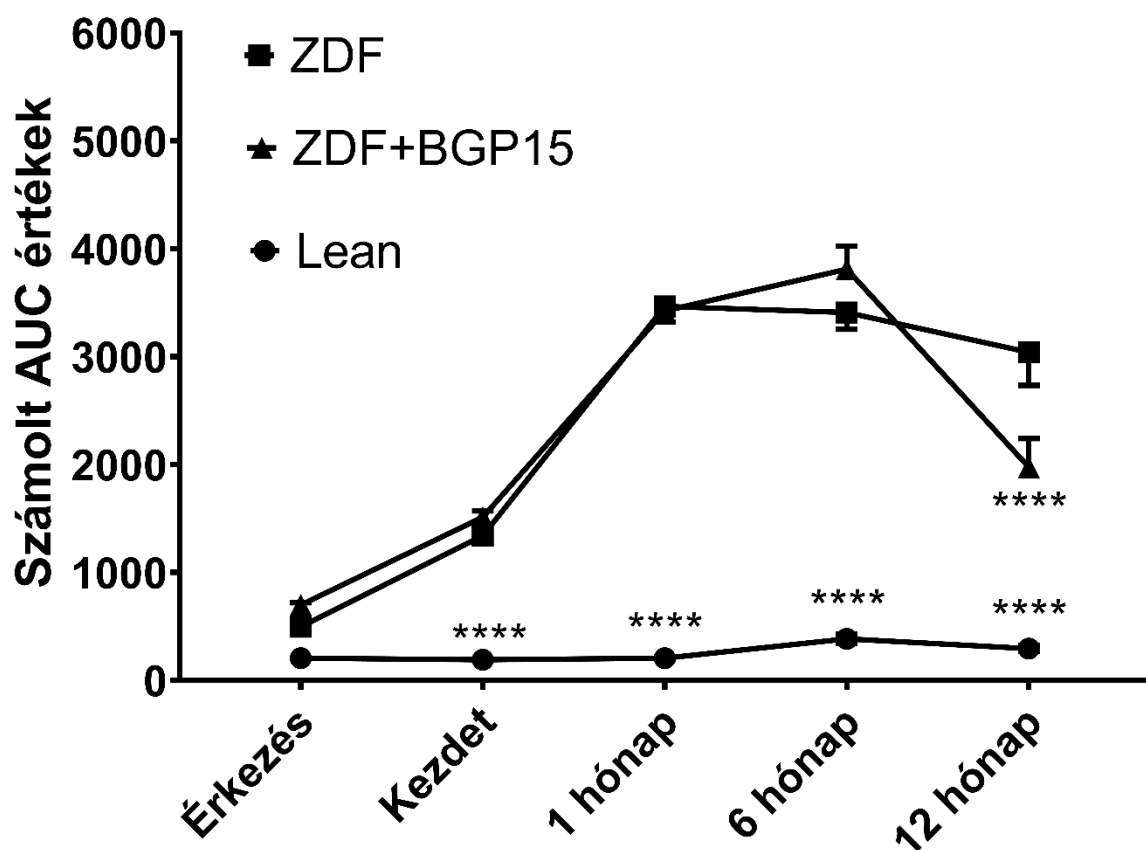


19. ábra: Súlyváltozások a második kísérlet folyamán

4.2.2. OGTT eredmények

Az OGTT mérések alapján (20. ábra) a görbe alatti terület (area under curve, AUC) értékei hasonlóak voltak minden csoportban. A kezelési időszak kezdetén azonban a beteg állatmodellek már szignifikánsan különböztek az egészséges kontroll (sovány) állatoktól ($1338,873 \pm 53,008$ és $1511,077 \pm 56,820$ vs. $190,211 \pm 5,892$ a ZDF és ZDF + BGP-15 vs. sovány csoportokra nézve, $p < 0,0001$ mindkét összehasonlításnál). Ez a különbség a vizsgálat teljes ideje alatt megmaradt. Nem volt azonban szignifikáns különbség a két beteg csoport között sem ebben az időpontban, sem az 1 hónapos vagy a 6 hónapos időpontokban. Nem így a 12 hónapos időpontban, ahol a BGP-vel kezelt csoport AUC értéke szignifikánsan különbözött a kezeletlen ZDF csoporthoz viszonyítva ($1976,027 \pm 264,024$ vs. $3040,019 \pm 308,145$, $p < 0,0001$).

OGTT AUC

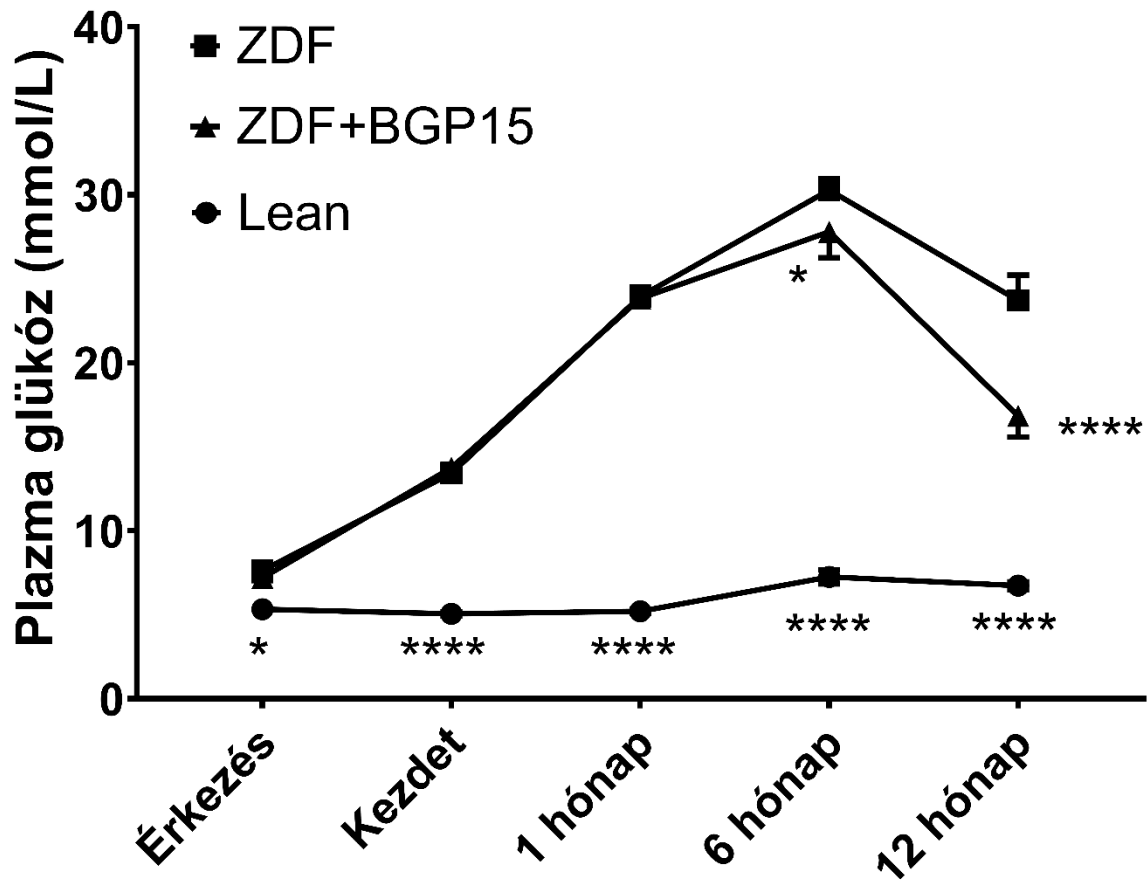


20. ábra: Az OGTT AUC értékei

Ha az OGTT 120 perces értékeit nézzük (21. ábra), akkor a kétutas ANOVA statisztikai analízis szignifikáns különbséget adott közvetlenül a kiindulási időpontban ($7,630 \pm 0,142$ vs. $5,330 \pm 0,078$, a ZDF vs. sovány összehasonlításban, $p < 0,05$), amely – hasonlóan az AUC-hoz – az egész vizsgálat során megmaradt: a sovány csoport átlagértékei $7,5$ mmol/l alatt voltak minden időpontban ($5,330 \pm 0,078$, $5,050 \pm 0,110$, $5,200 \pm 0,116$, $7,244 \pm 0,116$, $7,244 \pm 3,2$ és $7,244 \pm 6,07$ mmol/L rendre a kiindulási, kezdeti, 1 hónapos, 6 hónapos és 12 hónapos időpontokban). A beteg csoportok magasabb értékeket mutattak az egész vizsgálat során; azonban szignifikáns különbség mutatkozott a kezelt és a nem kezelt betegcsoportok között a 6 hónapos és a 12 hónapos időpontokban ($30\,275 \pm 0,689$ vs. $27,8 \pm 1\,548$, ZDF vs. ZDF + BGP15, $p < 0,05$ a 6 hónapos időpontban, és $23,7 \pm 1,522$ vs. $16,84 \pm 1,264$, ZDF vs. ZDF + BGP15 esetén, $p < 0,0001$ a 12 hónapos időpontban).

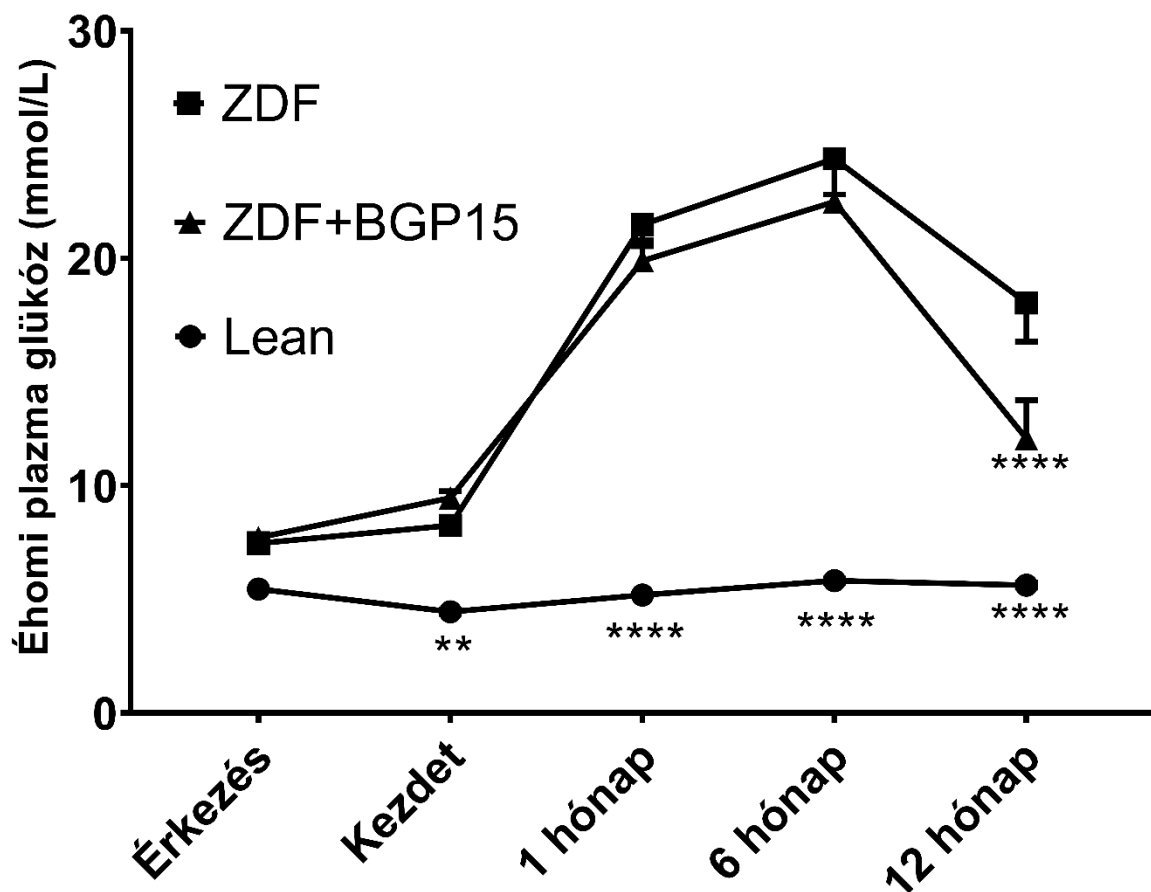
Az éhgyomri vércukorértékek (OGTT kiindulási értékek) ugyanazt a tendenciát mutatták, mint a 120 perces értékek (22. ábra).

OGTT 120-perces értékek



21. ábra: OGTT 120 perces értékek

Az éhomi plazma glükóz változása a vizsgálat alatt



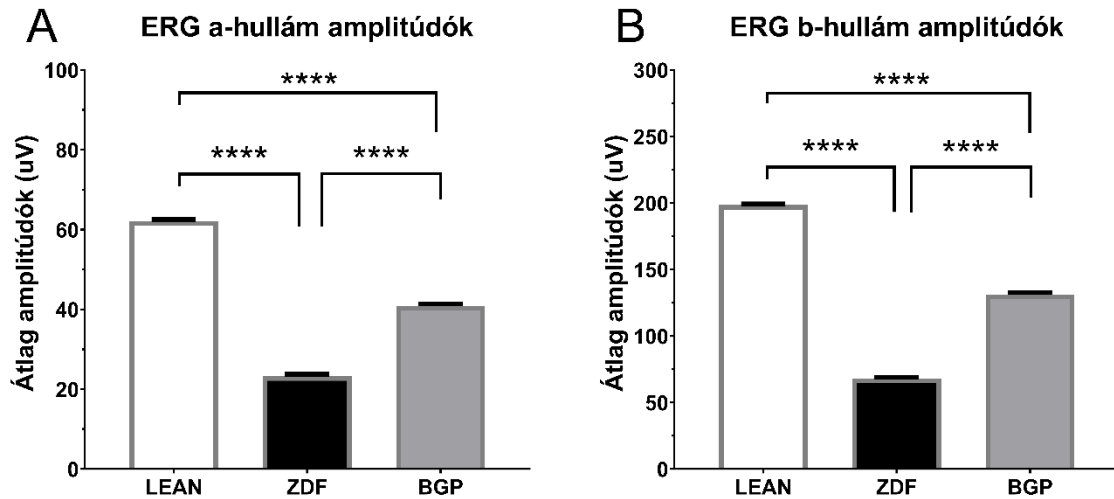
22. ábra: Éhomi vércukorszintek a második kísérlet folyamán

4.2.3. ERG eredmények

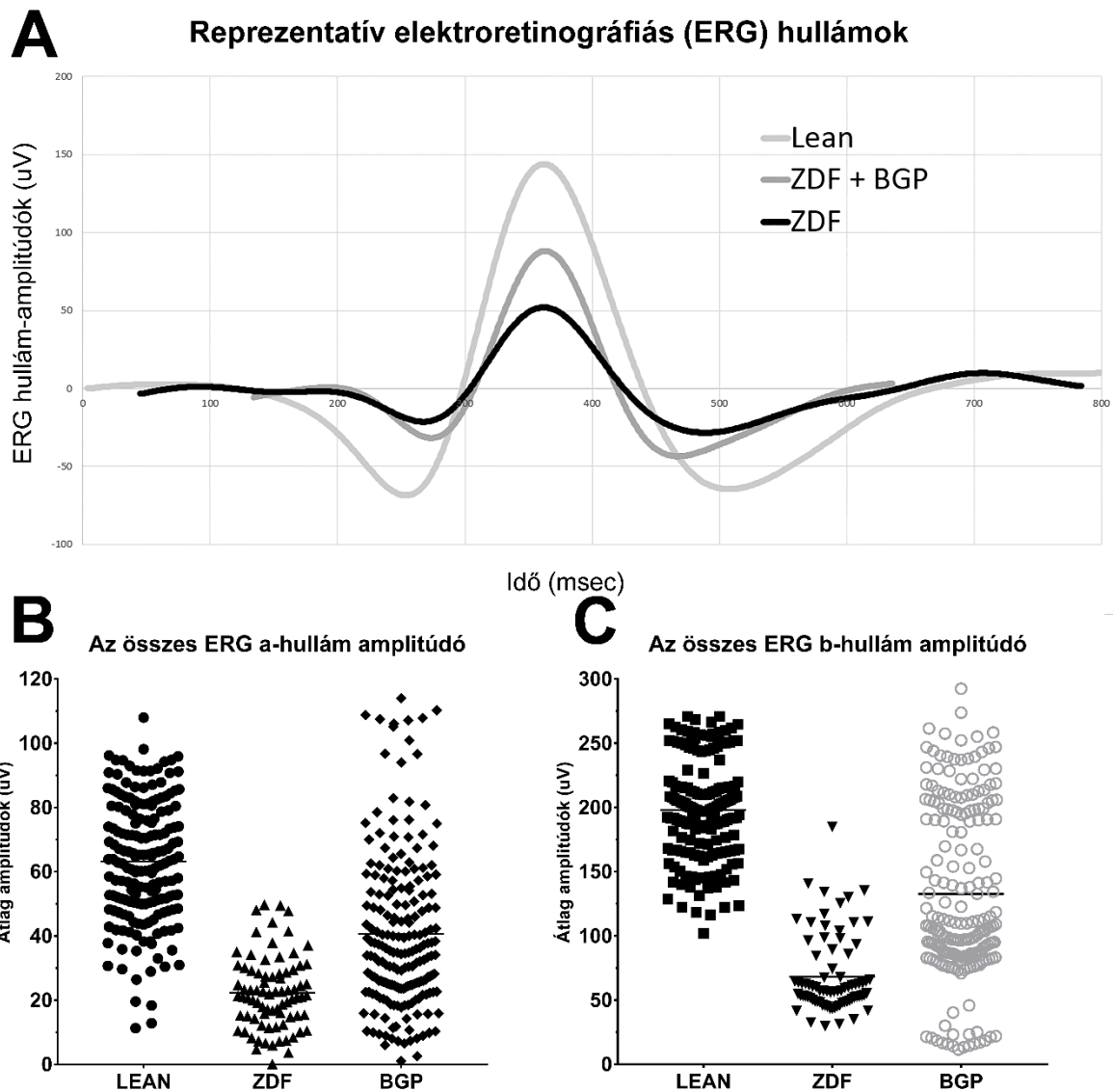
Az elektroretinográfiai eredményeket az 23. A és B ábrák mutatják rendre az a-hullámokra, illetve a b-hullámokra. Az ERG mérések szerint mind az a-, mind a b-hullámok átlagos amplitúdója minden csoportban szignifikánsan eltérőnek bizonyult. A tendenciák az a-hullámok és a b-hullámok esetében megegyeztek: a kezeletlen ZDF állatok szignifikánsan alacsonyabb amplitúdót produkáltak, mint az egészséges (sovány) állatok (az a-hullámok esetében ez $23,32 \pm 0,4277$ vs. $62,09 \pm 0,4621$, a ZDF és a sovány csoportokra nézve, a b-hullámok esetében ez $68,07 \pm 0,9519$ vs. $198,4 \pm 0,7796$ volt a ZDF és a sovány csoportokra nézve; $p < 0,0001$ mindkét összehasonlításban), míg a BGP-vel kezelt ZDF állatok

szignifikánsan magasabb amplitúdót produkáltak mint a kezeletlen ZDF csoport ($40,88 \pm 0,5149$ az a-hullámok és $131,3 \pm 1,408$ a b-hullámok esetén a BGP-vel kezelt ZDF állatoknál; mindkét összehasonlításban a megfelelő kezeletlen ZDF-értékekkel $p < 0,0001$).

A reprezentatív hullámformák és az összes rögzített ERG amplitúdóérték a 24. ábrán láthatóak.



23. ábra: ERG eredmények a második kísérletben



24. ábra: Reprezentatív ERG görbék és a kielemezett amplitúdó-értékek

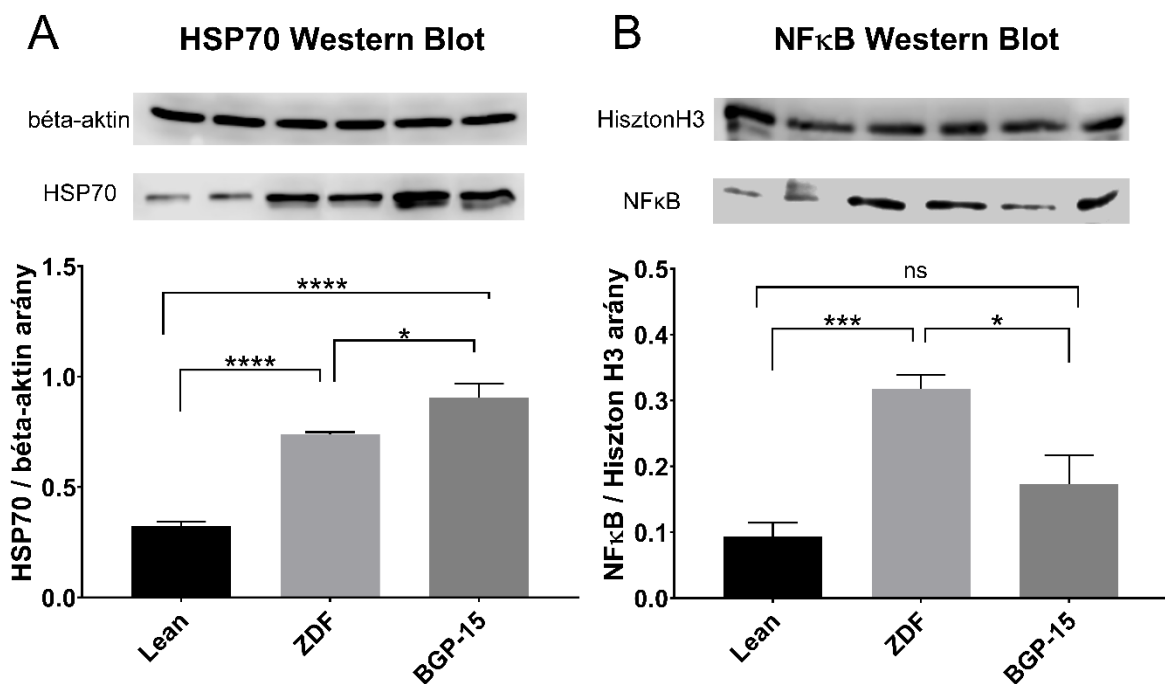
4.2.4. Western Blot eredmények

Western blot mérések szerint szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők a hősokk-fehérje 70 (HSP70) és a nukleáris faktor kappa B (NFkB) expressziós szintjei között a különböző állatcsoportokban (rendre 25A. és B. ábra).

A HSP70 értékek esetén e fehérje fokozott expressziója figyelhető meg az egészséges (sovány) állatokhoz képest mind a kezeletlen, mind a BGP-vel kezelt ZDF állatokban ($0,7402 \pm 0,0087$ és $0,9059 \pm 0,0621$ vs. $0,3250 \pm 0,0184$ a ZDF és BGP vs sovány csoportokra nézve, illetve $p < 0,0001$ mindkét összehasonlításban). A BGP-15 kezelés tovább növelte a HSP70

expresszióját, ami szintén szignifikánsnak bizonyult a kezeltlen ZDF csoport átlagértékéhez képest ($p < 0,05$).

Hasonlóképpen, az NF κ B expressziója mindkét diabéteszes állatcsoportban emelkedett; ez a különbség azonban csak a ZDF vs. sovány összehasonlítás esetén volt szignifikáns ($0,318 \pm 0,0211$ vs. $0,0933 \pm 0,0210$, $p < 0,001$), a BGP vs. sovány összehasonlításban nem ($0,1735 \pm 0,0435$ vs. $0,033$ vs. $0,09$). A BGP-kezelés szignifikánsan csökkentette az NF κ B expressziót a kezeltlen ZDF csoporthoz képest ($p < 0,05$).



23. ábra: Western Blot eredmények a második kísérletben

5. Megbeszélés

A cukorbetegség szemet érintő szövődményei gyakran a legsúlyosabb szemészeti következményekkel járnak, mint például a látás romlása vagy akár elvesztése. Ahogy a diabetes mellitus incidenciája emelkedik, úgy nő a diabéteszes retinopátia prevalenciája is. A diabéteszes retinopátia jelentőségét tovább hangsúlyozza, hogy ez a vakság egyik leggyakoribb oka a világon (Li és mtsai., 2020). Ezért elsődleges fontosságú olyan új farmakológiai szerek felfedezése, amelyek képesek ellensúlyozni, vagy legalább enyhíteni vagy késleltetni a cukorbetegség károsító hatásait. Bár a szigorú glikémiás kontroll csökkentheti és elodázhhatja a szövődményeket (Fullerton és mtsai., 2014), sajnos még a jelenlegi antidiabetikus gyógyszerek sem képesek hatékonyan megakadályozni a retinakárosodás kialakulását: megfelelő kezelés ellenére is a diabéteszes retinopátia hosszú, cukorbetegségben töltött idő után kialakul (Hautala és mtsai., 2014), amit tovább súlyosbít az életkor (Li és mtsai., 2020) és a társbetegségek, mint például a hiperlipidémia (Kowluru és mtsai., 2016).

Munkacsoportunk kutatása a különböző hatóanyagok komplex farmakodinámiás szűrésére irányul beteg állatmodellekben, melynek célja, hogy új, feltörekvő gyógyszerjelölteket találjunk a későbbi humán gyógyszerfejlesztéshez. Kutatómunkánk egyik aspektusa a cukorbetegség szemmel összefüggő szövődményeinek vizsgálata elektroretinográfiás mérésekkel, szem előtt tartva a lehetséges humán transzlációs lehetőségeket. Éppen ezért első kísérletünkben fel kívántuk mérni a BGP-15, egy hidroxámsav-származék lehetséges retinoprotektív hatásait diabéteszes körülmények között és össze akartuk hasonlítani jól ismert antidiabetikumokkal, mint a glibenklamid, a metformin és a pioglitazon. Ugyanakkor kulcsfontosságú volt egy hosszú távú diabéteszes kísérlet megtervezése is, hogy a legjobban modellezzük a cukorbetegségben eltöltött hosszú időt. Második kísérletünkben hosszú távon kívántuk megfigyelni a BGP hatásait.

A Goto-Kakizaki (GK) patkány egy spontán diabéteszes, nem elhízott állatmodell a II-es típusú diabétesz és következményeinek, mint például a retinopátia kutatására. Így, első kísérletünkben, a GK patkányok sokkal kevésbé kifejezett testsúly-gyarapodást produkáltak egészséges kontrol Wistar társaikhoz képest, utóbbiak súlya szignifikánsan megnőtt a kísérlet ideje alatt (9. és 10. ábra). Szignifikáns különbségek voltak azonban az egyes GK-csoportok között: a pioglitazon, habár széleskörben használt antidiabetikum, úgy tűnt hajlamossá teszi az állatokat az elhízásra. A szakirodalom ismeretében ez eléggé ellentmondásos, hiszen a pioglitazon egyre inkább elfogadott nem-alkoholos zsírmáj kezelésében mind diabéteszes,

mind nem-diabéteszes betegeknél (Dhir és Cusi, 2018), jóllehet más források is megemlítik a hízást, mint gyógyszer mellékhatást (Squire és mtsai., 1975; DeFronzo és mtsai., 2019). Kísérletünkben a BGP-csoport nem különbözött szignifikánsan testsúly-gyarapodás tekintetében a többi GK csoporttól.

Az első kísérletünkben a vércukor szintek (11. ábra) mérése – amely bármely diabéteszes vizsgálat szokásos része – új információkkal nem szolgált az alkalmazott hatóanyagokról. Némi fluktuáció megfigyelhető volt ugyan, de a szakirodalomnak illetve az állatmodell forgalmazójának (Charles River) adatai szerint ez normális volt (Akash és mtsai., 2013; Kuwabara és mtsai., 2017). Habár a kísérlet egész ideje alatt a BGP-kezelt állatok vércukorszintjének változása szignifikánsan alacsony volt, a BGP nem tudott olyan alacsony végponti éhomi vércukorszintet elérni, mint például a pioglitazon, ugyanakkor összevethető volt a metforminével, ami II-es típusú cukorbetegség esetén elsőként választandó kezelés (Qaseem és mtsai., 2017).

Hasonlóképpen első kísérletünk OGTT eredményei (12. és 13. ábra) is megerősítették a használt állatmodellünket – mivelhogy a World Health Organization (WHO) szerint bármely 120-perces OGTT eredmény, ami 11,1 mmol/liter vércukor feletti, az diabétesz mellitust jelent (WHO, 2023). Ugyanakkor először mutattuk be, hogy a BGP-15 OGTT-re kifejtett hatása összevethető jól ismert antidiabetikumokkal. Utóbbiak eredményei egybevágóak mások munkájával: hasonló mérések találhatók a szakirodalomban metformin, pioglitazon és gliklazid, egy másik szulfanilurea, vonatkozásában csak II-es típusú diabéteszes emberi betegeken (Ceriello és mtsai., 2005).

A HEGC protokoll alatt (14. és 15. ábra), a plazma inzulin szintek esetén a BGP-15 szignifikánsan alacsony értéket tudott elérni a Goto kontrollhoz viszonyítva: minél kevesebb inzulin kell egy 5.5mmol/L körüli állandó plazma glükóz szint fenntartásához, annál kevésbé inzulin-rezisztens egy állat (Muniyappa és mtsai., 2008). Ez teljesen egybevág a származtatott idexekkel is, mint amilyen például az inzulin szenzitivitási index. Eredményeink először demonstrálják, hogy egy 12 hetes BGP-15 kezelés képes javítani az inzulin érzékenységet spontán diabéteszes patkányokban olyan ismert antidiabetikumokkal összevethető mértékben, mint a glibenklamid, metformin és a pioglitazon. Utóbbi hatóanyagok eredményei hasonlóan a tudományos irodalomban fellelhetőkhöz (Jiang és Zhang, 2005; Colca és mtsai., 2014).

Egy fontos újdonság első kísérletünkben annak bemutatása, hogy a BGP-15 képes ellensúlyozni a II-es típusú diabétesz retinális funkciót károsító hatásait spontán diabéteszes GK patkányokban (16. ábra), mely hatás összevethető a pioglitazon és metformin kezeléssel.

Összehasonlításként a tudományos szakirodalommal: elektroretinográfiás kísérleteket végeztek már korábban zsírdús táppal előidézett diabéteszes egér modellen, jóllehet azok a kutatók nem tudtak a metformin-kezelés által kiváltott retinoprotektív hatást igazolni (Kim és mtsai., 2017). Más volt a helyzet viszont a pioglitazonnál, amiről beigazolódott, hogy megelőzi a gliasejt-apoptózist glaukómás patkány modellen, melyben az iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodást magas intraokuláris nyomással váltották ki: itt a pioglitazon enyhítette az I/R okozta ERG és VEP (vizuális kiváltott (evoked) potenciál) hullámok csökkenését (Zhang és mtsai., 2013). A glibenklamidot iszkémiás prekondicionálással együtt próbálták ki, mely módszerről ismert, hogy csökkenti az iszkémiás károsodásokat a retinában: abban a kísérletben a glibenklamid jelentős mértékben hatékonyabb volt a prekondicionálást megelőzően alkalmazva intraokulárisan (Li és mtsai., 2000). Hasonlóképpen, első kísérletünkben minden kezelést még azelőtt alkalmaztunk, mielőtt kialakult volna a diabéteszes iszkémia – a diabétesz mikrocirkulációt károsító hatása, mely a diabéteszes retinopátia szinte minden diagnosztikus tünetéért felelős (Marques és mtsai., 2019; Wang és mtsai., 2019). Az ilyen megelőző intézkedések egy jövőbeni BGP-15 kezeléssel – e retinoprotektív gyógyszer cukorbetegségre hajlamos betegeknek történő beadásával – ellensúlyozhatják a diabéteszes retinopátia miatti diabéteszes látászavarok kialakulását.

Első kísérletünkben a BGP-15 és a pioglitazon képes volt magasabb elektroretinográfiás hullámokat generálni, mint az egészséges Wistar patkányok, ami egy meglepő eredmény, de nem lehetetlen. A kisebb ERG hullámok egy lehetséges oka a mélyebb általános anesztézia (Iliescu és mtsai., 2018), ami az egészséges Wistarok esetén előfordulhatott: a nagyobb testtömegük miatt a Wistarok nagyobb mennyiségű általános érzéstelenítőt kaptak (ketamin/xylazin 100/10mg/ttkg), és azt figyeltük meg, hogy – feltehetően a nagyobb zsírmennyiségük miatt – ezek az állatok lassabban ébredtek fel az altatásból, mint a GK patkányok. Ezen túlmenően van egy kevés esély arra is, hogy a BGP-15 és a pioglitazon esetleg érzékenyíti a retinát a fényre egy ismeretlen mechanizmussal. Ez további, jövőbeli kísérleti lehetőségeket vet föl.

A BGP-15 retinoprotektív hatásának mechanizmusa első kísérletünk western blot eredményei alapján körvonalazódni kezdett (17. ábra): a BGP képes megváltoztatni a sirtuin 1 és a mátrix metalloproteináz 9 enzimek expresszióját ezzel enyhítve a diabéteszes retinopátia tüneteit. Ez a két fehérje egy közös útvonalhoz kapcsolódik korábbi tudományos kutatások alapján: a SIRT1 deacetilál és ezáltal gátol olyan fehérje komplexeket – melyek pl. a poli-ADP-ribóz-polimeráz 1-et (PARP1), a kappa B nukleáris faktort (nfkB) és az aktivátor

protein 1-et (AP1) foglalják magukba – melyek többek között az MMP9 transzkripcióját iniciálnák a retinában (Kowluru, 2010). Viszont diabéteszben a SIRT1 expressziója és aktivitása is gátlódik, így a gátlás gátlása miatt az előbb említett transzkripciós faktorok serkentik az MMP9 szintézisét (Kowluru és mtsai., 2014a; Mishra és Kowluru, 2017). Ez túlzott transzaktivációhoz és az MMP9 következményes felhalmozódásához vezet még a mitokondriumban is károsítva a mitokondriális membránt, mely következtében citokróm c szabadul ki a citoszólba és apoptózis aktiválódik (Kowluru és mtsai., 2011).

Első kísérletünkben a Wistar állatok SIRT1 szintje szokatlanul alacsony, látszólag még a Goto kontrol csoportnál is alacsonyabb, jóllehet a különbség nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. Más tudományos cikkek szerint, a kalóriakorlátozás növeli a SIRT1 koncentrációt (Roggerio és mtsai., 2018), míg ezzel ellentétben a túlsúly és az obezitás SIRT1 down-regulációval jár (Kurylowicz és mtsai., 2016; Alshahrani és mtsai., 2019), ez lehetett az oka a mi kísérletünkben a szokásosnál alacsonyabb SIRT1 expresszióknak a Wistar patkányok esetén, melyek jelentős testsúlygyarapodást produkáltak a kísérlet ideje alatt.

Első kísérletünk eredményei szerint a BGP-15 ellensúlyozhatja a fentebb említett mitokondriális károsodáshoz vezető eseményeket, mivel képes jelentősen növelni a SIRT1 expressziót, még olyan anti-diabetikumoknál is jobban, mint a glibenklamid, a pioglitazon vagy a metformin. A tudományos szakirodalommal való könnyebb összehasonlíthatóság érdekében: korábbi eredmények szerint a metformin képes emelni a SIRT1 szintjét a retinában (Zheng és mtsai., 2012). A glibenklamid esetén viszont legjobb tudomásunk szerint ez az első alkalom, hogy SIRT1-emelő hatást demonstrálnak a szemben, jóllehet erre más, nem-retinális szöveteken végzett tanulmányokból következtetni lehetett (Knight és mtsai., 2011). Első kísérletünkben a pioglitazon – vese- (Chen és mtsai., 2015; Zhang és mtsai., 2016) és máj-eredményekkel (Peng és mtsai., 2017) egybevágóan – diabéteszes szemben is a SIRT1 expresszió emelkedését produkálta, amely szintén új eredmény.

Ezzel együtt, elsőként bizonyítottuk, hogy a BGP-15 képes lecsökkenteni az MMP9 expresszióját az egészséges kontrol szintjére. Korábban a glibenklamidról már kimutatták, hogy csökkenti az MMP9 szintet, de csak metasztatikus emlő daganatban (Rong és mtsai., 2013) és agyban (King és mtsai., 2018). A glibenklamid diabéteszes szemben kifejtett, MMP9-csökkentő hatásával kapcsolatos eredményünk újdonság. A metformin bizonyítottan csökkenti az MMP9 szintézist számos különböző betegségben, például inzulinrezisztens cukorbetegségben (Sharma és mtsai., 2013), mellrákban (Jang és mtsai., 2014), gerincvelősérülésben (Zhang és mtsai., 2017) stb., de eddig egyetlen tudományos cikk sem bizonyította ezt a hatást diabéteszes állatok szemében, mint mi első kísérletünkben. Ugyanez

vonatkozik a pioglitazonra is: kimutatták, hogy a pioglitazon csökkenti az MMP9 szintjét egér peritoneális makrofágokban (Chang és mtsai., 2010), tüdő (Hetzl és mtsai., 2003) és emlőrák (Papi és mtsai., 2014) sejtekben, valamint az ateroszklerotikus nyúlmodell szérumában (Xu és mtsai., 2018). A tudományos szakirodalomban azonban még nincs említés arról, hogy a szer csökkenti az MMP9 expresszióját a szemben. Így a BGP-15 hatékonyságának bizonyítása mellett új tényeket állapítottunk meg három jól ismert cukorbetegség elleni szerről, amelyekre a korábbi eredményekből ugyan következtetni lehetett, de amelyeket még senki nem írt le diabéteszes szemben.

Egy másik kutatócsoport legutóbbi, a BGP-15-ről szóló cikke (Sarnyai és mtsai., 2020) arra a következtetésre jutott, hogy a BGP védi a mitokondriumokat, ami teljes mértékben összhangban van az itt bemutatott eredményeinkkel. Bár a fent említett cikkben a BGP-t az acetaminofen által kiváltott hepatotoxicitásban alkalmazták és a hatásmechanizmus útvonala (a JNK aktiváció megelőzése és az autofágia markerek csökkentése) is eltér a miénktől, de lehetséges, hogy összefüggés van az eredményeink között a következők szerint.

Cukorbetegség esetén a szubklinikai ischaemia feltételezhetően fontos szerepet játszik a retina neurodegenerációjában, ráadásul ez a neurodegeneráció jelen van teljesen kialakult diabéteszes retinopátia nélkül is, sőt még a jó anyagcserekontrollal rendelkező, jól karbantartott betegekénél is (Garcia-Martin és mtsai., 2019). Az oxidatív stressz önmagában képes aktiválni a c-Jun amino-terminális kináz (JNK) mitogén-aktivált fehérje (MAP) kináz útvonalat, amely – a mitokondriális külső (outer) membrán permabilizáció (MOMP) fokozásával (Chipuk és mtsai., 2006) és mitokondriális permeabilitási átmeneti pórusainak (MPTP) kialakulásával (Green és mtsai., 2014) – a mitokondriális membrán károsodásához vezet, amely proapoptotikus mediátorokat és talán MMP9-et enged ki. Ez utóbbi enzimnek nagy jelentősége van a diabéteszes retinopátia kialakulásában, a retinális mitokondriumok károsodása (Kowluru és Abbas, 2003) és az oxidatív stressz pedig egyaránt bizonyítottan jelen vannak a diabéteszes retinában (Kanwar és mtsai., 2007), így a két útnak kereszteznie kell egymást.

Valójában az MMP9 lehet a kapcsolat: míg a cukorbetegségben az MMP9 túlzottan expresszálódik a SIRT1-hiány miatt (Kowluru és mtsai., 2014a; Mishra és Kowluru, 2017), vannak olyan eredmények is, amelyek megerősítik az MMP9 aktiválását a diabéteszes retinában egy ú.n. extracelluláris szignál-szabályozott kináz (ERK) MAP kináz útvonal által (Kowluru és mtsai., 2011; Mohammad és Kowluru, 2012). Így a felhalmozott és aktivált MMP9 károsítja a mitokondriális membránt (Kowluru, 2010), ami ugyanaz az eredmény, mint a JNK MAP kináz útvonal esetében, amelyet a BGP-15 képes gátolni. Azonban

kísérleteinkben az MMP9 aktivitását nem mértük, ami a vizsgálatok egyik hiányossága. További kísérletekre van szükség a BGP és az ERK MAP kináz útvonal közötti lehetséges kölcsönhatások felméréséhez is, hogy a szer képes-e gátolni az MMP9-aktivációt.

Mindent egybevetve, ha értékelni akarjuk az első kísérletünk összes eredményét, arra a következtetésre juthatunk, hogy a BGP-15, a pioglitazon és a metformin nem ugyanazt a hatásmechanizmust használja. Bár a pioglitazon hatása a SIRT1 növelésében csak egy nem szignifikáns tendencia, a metformin pedig egyáltalán nem növeli azt, ezzel szemben mindkét anyag sokkal erősebb MMP9-csökkentő hatást mutatott, mint a BGP-15. Mindazonáltal, bár a metformin csökkenti az MMP9 szintjét, funkcionálisan még így is rosszabbul teljesített, mint a pioglitazon és a BGP-15. Az, hogy első vizsgálatunkban a metformin nem volt képes a GK állatok vércukorszintjének erőteljes csökkentésére kapcsolatban állhat a funkcióban mutatott kisebb hatékonyságával, bár az ERG mérések alapján még így is növelte a retina funkcióját, és jónak bizonyult az MMP9 csökkentésében is. A BGP-15 esetében a vércukorszint-csökkentés valószínűleg nem járul hozzá funkcionális hatásához, bár a glükózcsökkentő hatása összevethető volt a metforminéval. Nyilvánvaló, hogy ezek a szerek különböző módon vesznek részt a különböző hatásmechanizmusokban, így különböző utakon keresztül hathatnak: a glibenklamid a fent említett összehasonlítások egyikében sem volt kiemelkedő; a metformin volt a legjobb az MMP9 csökkentésében, és kissé jó volt a funkció növelésében és a vércukorszint csökkentésében, de nem változtatta meg a SIRT1 szintet; a pioglitazonról kimutattuk, hogy legjobb az MMP9- és a vércukorszint-csökkentésben, valamint a retina működésének javításában, de a SIRT1 növelésében nem; első kísérletünkben a BGP-15 bizonyult a legjobbnak a SIRT1 növelésében és a retinális funkció javításában, továbbá jó volt a vércukorszint és az MMP9 csökkentésében.

Második kísérletünk egyik legfontosabb eredménye a BGP-vel kezelt állatok túlélése a 12 hónap alatt (18. ábra). Kevés olyan vizsgálat született, amely hosszú ideig, például 9 hónapig operált ZDF patkányokkal a diabéteszes retinopátiával kapcsolatos egyéb cikkekben, de ezekben perifériás vérparamétereket mértek vagy szövettani elemzéseket végeztek (Mishra és mtsai., 2016; Szabó és mtsai., 2017). A kardiovaszkuláris funkciót (Ferenczyova és mtsai., 2020) és a központi idegrendszer fehérje változásait (Nam és mtsai., 2018), valamint az endothel diszfunkciót (Vessières és mtsai., 2013) elemezték már 12 hónapos ZDF állatokon, ill. veseműködést vizsgáltak már 12 hónapos ZDFxSHHF hibrid patkányokon (Tofovic és mtsai., 2000), de tudomásunk szerint olyan cikk nincs, amely olyan cukorbeteg ZDF patkányok retinafunkciójáról tartalmazna információkat amelyek egy egész

éven, tehát 52 héten át voltak diabetesesek. Hasonlóképpen, az eddig publikált leghosszabb BGP-kezelés 12 hét (3 hónap) volt izomdisztrófia modell esetén (Gehrig és mtsai., 2012), illetve első kísérletünkben GK patkányokon. Legjobb tudomásunk szerint ilyen hosszú BGP-kezelésről második kísérletünket megelőzően nem publikáltak. Nem példa nélküli, hogy egy gyógyszeres kezelés meghosszabbíthatja a túlélést egy beteg állatmodellben (Li és mtsai., 2019); jóllehet második kísérletünkéből született az első olyan publikáció, amely egy ilyen hatékony, hosszú távú BGP-kezelés eredményeit tartalmazza egy 52 hétig fenntartott II-es típusú diabetészes állatmodellben, ZDF patkányokban.

OGTT eredményeink alapján a BGP nem valószínű, hogy a fent említett prevenciót a glükóz homeosztázis rendezésével fejti ki; bár második kísérletünkben mutattunk ki néhány szignifikáns különbséget (20., 21. ábra), ehelyett a hatás az oxidatív stresszel lehet valamilyen összefüggésben. A cukorbetegség, még a II-es típusú cukorbetegség is, magasabb mortalitási kockázattal jár (Coles és mtsai., 2021), valószínűleg a kísérő oxidatív stressz miatt (Rosales-Corral és mtsai., 2015), amely bizonyítottan az egyik oka a cukorbetegség makro- és mikrocirkulációs szövődményeinek (Madonna és mtsai., 2017; Frisbee és mtsai., 2018). Bár jelenleg kevés információnk van a BGP-15 pontos hatásmechanizmusáról, nagyon beszédes az az eredmény, hogy a cukorbetegségben eltöltött 12 hónap alatt egyetlen BGP-vel kezelt állat sem pusztult el.

A retina működése elektromos jeleket produkál, amelyek cukorbetegségben a mikrokeringési problémák miatt gyengülnek (Danis és Yang, 1993; Varga és mtsai., 2017). Így a BGP-15 második kísérletünk elektroretinográfiái eredményeiben (23. ábra) látható hatása összefüggésbe hozható az ilyen mikrokeringési szövődmények csökkenésével. Kísérletünk figyelemreméltó újdonsága, hogy a BGP-15 képes ellensúlyozni a hosszú távú cukorbetegség ZDF patkányok retinájának működésére gyakorolt káros hatását. Ilyen retinaprotekció cukorbetegségben általában neuropeptidok, trofikus faktorok, antioxidánsok, vagy gyulladásgátló hatású szerek esetében tapasztalható (Varga és mtsai., 2011; Varga és mtsai., 2013; Varga és mtsai., 2017; Tomita és mtsai., 2020). Bár a BGP nem neuropeptid, és nem is trofikus faktor, bizonyos antioxidáns vagy gyulladáscsökkentő tulajdonságokat fejthet ki a retinán, amint azt korábban nem retinális sejt vonalakon le is írták már (Sumegi és mtsai., 2017). A BGP hatásainak háttérében különböző effektormolekulákról számoltak már be, ideértve például a HSP70-et rekeszizom-sejtekben (Smuder és mtsai., 2019), a hiszton-deacetilázokat egér endoteliális fibroblaszt sejtekben (Budzyński és mtsai., 2017), a RAC-alfa szerin/treonin-protein kinázt (ATK) szívizomsejtekben (Sarszegi és mtsai., 2012), vagy a Sirtuin 1-et (SIRT1) teljes szem homogenizátum szemsejtjeiben (első kísérletünk).

Másrészt a BGP-15 gátolja a poli-ADP-ribóz-polimeráz 1-et (PARP1) a szívizomban (Szabados és mtsai., 2000) és a c-Jun N-terminális kináz (JNK) útvonalat (Chung és mtsai., 2008), illetve csökkenti az MMP9 expresszióját (első kísérletünk). Ezek a molekuláris célpontok gyulladási és ischaemiás kaszkádok részei, és diabéteszes szemekben is előfordulnak, amelyek alapján második kísérletünkben a HSP70 és az NFkB szerepét vizsgáltuk a BGP funkcionális retinoprotektív hatásában.

Kísérleti eredményeink először mutatják be, hogy a BGP-15 képes növelni a HSP70 expresszióját ZDF patkányok szemében. A hetven kDa-os hőszokk fehérjék (HSP70) mindenütt jelenlévő chaperon molekulák, amely támogatják számos fehérje megfelelő "folding"-ját (feltekeredését; harmadlagos és negyedleges térszerkezetének kialakulását), gátolják aggregációját, és szükség esetén segítik eltávolítását (Rosenzweig és mtsai., 2019). A HSP70 fehérjék bizonyítottan védő szerepet játszanak számos központi idegrendszeri betegségben, amelyekben az aberráns vagy hibás feltekeredett fehérjék aggregációja neuronhalállal végződő gyulladási folyamatokat indít el (Turturici és mtsai., 2011; Calsolaro és Edison, 2016). Ennek a neuroprotektív hatásnak köszönhetően felmerült bennünk a HSP70 esetleges védő szerepe szembetegségekben is. A BGP-15-tel már korábban is kimutatott kapcsolat alapján második kísérletünkben elemeztük a HSP70-et, hogy találunk-e szignifikáns növekedést az expressziójában (25A. ábra), amely, úgy gondoljuk, hozzájárulhat a kezelés funkcionális retinoprotektív hatásához.

Az előrehaladott glikációs végtermékek (AGE; advanced glycation endproducts) és a következményes fokozott oxidatív stressz és alacsony szintű gyulladás szintén a cukorbetegség vaszkuláris szövődményeinek hátterében áll. A HSP70 pedig képes gátolni ezeket a gyulladási folyamatokat az NFkB megkötésével, ezáltal csökkentve az NFkB-indukált iNOS expressziót és így csökkentve a reaktív oxigénradikálok (ROS) és peroxinitrit képződését (Bellini és mtsai., 2017). Ezen túl a HSP70 gátolja az NFkB és a tumor nekrosis faktor alfa (TNF α) aktivációját és transzlokációját is (Chung és mtsai., 2008). Ez volt az oka annak, hogy ez a nukleáris faktor is vizsgálatunk célpontjává vált. Második kísérletünkben kapott Western blot eredményeink szerint a BGP-15 képes csökkenteni az NFkB expresszióját ZDF patkányok diabéteszes szemében, ami egy új eredmény. Ez összhangban van korábbi, SIRT1-gyel kapcsolatos megállapításainkkal (első kísérletünk): a SIRT1 fiziológiásan inaktiválja az NFkB-t és a PARP1-et; azonban cukorbetegségben a SIRT1 expressziója lecsökken, ami a diabéteszes szemben káros gének túlzott transzaktiválásához vezet, mint amilyen az MMP9, amely enzimről ismert, hogy részt vesz diabéteszes retinopátiában a mitokondriális károsodások kialakulásában (Kowluru és mtsai., 2014a).

Korábban kimutatták, hogy az NFkB-függő gyulladás az endoteliális inzulinrezisztencia fontos kiváltó oka, és ennek a fehérjének a gátlása javítja az inzulin transzdukciós kaskádját, és meghosszabbítja az egerek élettartamát (Paneni és mtsai., 2013). A mi kísérleteinkhez hasonlóan karotinoidokról bizonyították már, hogy jótékony hatást gyakorolnak a diabéteszes retinopátia kialakulására azáltal, hogy hatékonyan csökkentik az NFkB szintet streptozocin-kiváltotta diabéteszes patkánymodell szemében (Kowluru és mtsai., 2014b).

Meglehetősen általános megközelítés, hogy a HSP70 expressziója celluláris stresszben indukálódik, mely helyett a legfrissebb cikkek külön tanulmányozzák az extra- és intracelluláris HSP70-et (eHSP72 és iHSP72). Az előbbi a 70kDa-os hőszokkfehérje-család gyulladást elősegítő, utóbbi pedig gyulladásgátló indukálható formája (Hirsch és Heck, 2022). Így az összkép összetettebb, és mivel a HSP70 és az NFkB hatnak egymásra, amint azt az előző bekezdésekben említettük, ezek egybevont tárgyalására van szükség. Cukorbetegségben, bár az iHSP72 szintje csökken, az eHSP72 szintje nő (Calderwood és mtsai., 2016; Hirsch és Heck, 2022). Hipotézisünk az, hogy ezeknek a változásoknak az összegződése második kísérletünkben a diabéteszes ZDF állatok össz-HSP70 szintjének emelkedéseként jelenik meg. Mások bebizonyították, hogy a cukorbetegségben eltöltött hosszabb idő jobban megemeli az eHSP72-t, mint a rövidebb idő (Nakhjavani és mtsai., 2010), és hogy az iHSP72 szint cukorbetegségben – kezelés nélkül – csökken (Kurucz és mtsai., 2002; Di Naso és mtsai., 2015), továbbá az is ismert, hogy az iHSP72 gyulladáscsökkentő hatását főként az NFkB-gátlás közvetíti (Jones és mtsai., 2011). Így feltehetően ezek az okai annak, hogy második, hosszú kísérletünkben az össz-HSP70 szint is magas (az egészséges csoporthoz képest), valamint az NFkB szint is szintén magas a kezeletlen ZDF csoportban. Hipotézisünk az, hogy közvetve bebizonyítottuk, hogy a HSP70 ezen magas szintje a megnövekedett eHSP72-nek köszönhető, amit megerősít a magas NFkB eredményünk, az össz-HSP szint feltételezhetően magas e/i arányát mutatva. Emiatt néhány tanulmány egy ún. H-index (e/i arány) bevezetését is javasolta (Hirsch és Heck, 2022). A BGP-vel kezelt állatok szintén cukorbeteg, ZDF patkányok, így feltehetően ugyanolyan magas eHSP70-szinttel rendelkeznek, egy különbséggel. Itt még magasabb össz-HSP70 szintet látunk, sőt, ezzel párhuzamosan csökkent NFkB szint is megfigyelhető, és amint már említettük, az iHSP72 gyulladáscsökkentő hatását igazoltan elsősorban az NFkB-gátlás közvetíti (Jones és mtsai., 2011). Mivel az NFkB szintek szignifikánsan csökkentek, ugyanakkor a teljes HSP70 szint emelkedett a BGP-vel kezelt csoportunkban a kezeletlen ZDF állatokhoz képest, úgy gondoljuk, hogy ez az össz-HSP70 növekedés feltehetően az NFkB-csökkentő, protektív iHSP72 szint növekedésének köszönhető. Második hipotézisünk

tehát az, hogy közvetve bebizonyítottuk, hogy a BGP-15 megemeli a jótékony hatású iHSP72 szintjét, ami aztán az e/i arányt az iHSP72 felé tolja el, mivel képes volt csökkenteni az NFkB szintjét, ami az iHSP72-re jellemző. Második kísérletünkben ezen két, egymást erősítő hipotézisünk felállítását az tette lehetővé, hogy a fehérjéket nem elkülönített retinából, hanem teljes szemgolyómintákból izoláltuk, amint azt más tanulmányokban is látni (Jiang és mtsai., 2010; Wang és mtsai., 2010; Varga és mtsai., 2017). Egyrészt a teljes szemgolyó ereket is tartalmaz – ami az eHSP72 ésszerű és fő lelőhelye (Mahmoud és mtsai., 2018), mivel a vér is extracelluláris –, másrészt a diabéteszes retinopátiára jellemző fokozott érpermeabilitás tovább növeli az eHSP intersticiális megjelenését teljes szem homogenizátumban, hozzájárulva a magas össz-HSP70 szinthez a kísérletünk kezeletlen ZDF csoportjában. Ezenkívül a vaszkuláris permeabilitás a hiperglikémia és gyulladás miatti NFkB aktiváció következménye is (Romeo és mtsai., 2002). Második kísérletünkben pedig, ahol a BGP kezelés csökkentette az NFkB szintjét, feltehetően az érpermeabilitást is csökkentette, így az eHSP72 hozzájárulása a mért össz-HSP70 szinthez vélhetően szintén csökkent, tovább erősítve azt a hipotézisünket, hogy a teljes HSP70 növekedése a kezelt állatokban a jótékony iHSP72 szint növekedésének a következménye. Vizsgálatunk korlátja, hogy nem mértük külön az eHSP72-t és az iHSP72-t, ami azt jelenti, hogy pontos arányuk nem határozható meg. Így nem zárható ki, hogy a BGP-15 az iHSP növelése mellett az eHSP-t is csökkenthette, mely esetben az e/i arány még előnyösebbé válhatott a BGP által. Ezért a jövőben az átfogóbb megértés elősegítése érdekében szükségesnek tartjuk a retina izolálását az iHSP72 méréshez és az eHSP72 vérből történő külön mérését, hogy tovább erősítsük hipotézisünket, miszerint a BGP-15 képes eltolni az eHSP72/iHSP72 arányát előnyös módon, az iHSP72 javára.

6. Összefoglalás - Summary

A kutatómunkában célul tűztük ki a retinafunkció mérésére szolgáló elektroretinográfia alkalmazását. Ezzel a módszerrel első kísérletünkben sikerrel igazoltuk, hogy a mitokondrium-védő SIRT1 expresszió emelésével és egyidejűleg a mitokondrium-károsító MMP9 expressziójának csökkentésével a diabéteszes szemben a BGP-15 képes ellensúlyozni a cukorbetegség retinafunkció-károsító hatását.

Második kísérletünk végső következtetéseként pedig levonható, hogy a BGP-15 nemcsak hogy nem káros hosszú távon, hanem képes csökkenteni a cukorbetegség súlyos következményeit és egyben a mortalitást is. Újabb és újabb molekuláris célpontjainak azonosításával közelebb kerülünk e speciális szer hatásmechanizmusának megértéséhez: az NFkB expressziójának gátlása és a HSP70 megnövekedett szintje a szemben egyaránt hozzájárul funkcionális retinoprotektív hatásához. Összefoglalva, a BGP-15, ez a feltörekvő hidroximsav-származék kiváló jelölt a jövőbeni antidiabetikus gyógyszerfejlesztéshez, mint potenciális gyógyszer a cukorbetegség káros következményei, például a diabéteszes retinopátia ellen, mivel képes ellensúlyozni a retina cukorbetegségben eltöltött hosszú idő miatti funkcionális károsodását.

A purpose of the experimental work was to utilize electroretinography, a retinal function measurement. With the help of this method we successfully demonstrated that by increasing the expression of mitochondria-protecting SIRT1 and simultaneously reducing the expression of mitochondria-damaging MMP9, BGP-15 is able to counteract the damaging effect of diabetes on retinal function.

And as the final conclusion of our second experiment, we can conclude that BGP-15 is not only not harmful in the long term, but can also reduce the serious consequences of diabetes and the mortality related with it. By identifying more and more of its molecular targets, we are getting closer to understanding the mechanism of action of this special agent: the inhibition of NFkB expression and the increased level of HSP70 in the eye both contribute to its functional retinoprotective effect. In conclusion, BGP-15, this emerging hydroxy acid derivative, is an excellent candidate for future antidiabetic drug development as a potential drug against the adverse consequences of diabetes, such as diabetic retinopathy, due to its ability to counteract the functional damage of the retina due to prolonged exposure to diabetes.

7. Irodalom

7.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom

- Adil M., Mansoori M. N., Singh D., Kandhare A. D. és Sharma M. (2017) Pioglitazone-induced bone loss in diabetic rats and its amelioration by berberine: A portrait of molecular crosstalk. *Biomed Pharmacother.* 94, 1010-1019.
- Akash M. S., Rehman K. és Chen S. (2013) Goto-Kakizaki rats: its suitability as non-obese diabetic animal model for spontaneous type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev.* 9(5), 387-396.
- Akmal M. és Wadhwa R. (2023) Alpha Glucosidase Inhibitors, in StatPearls Publishing(szerk.), Treasure Island (FL), PMID: 32496728
- Al-Awar A., Kupai K., Veszeka M., Szucs G., Attieh Z., Murlasits Z., Török S., Pósa A. és Varga C. (2016) Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *Journal of Diabetes Research.* 2016 Online Article Number: 9051426
- Alshahrani A., AlDubayee M., Zahra M., Alsebayel F. M., Alammari N., Alsudairy F., Almajed M. és Aljada A. (2019) Differential Expression of Human N-Alpha-Acetyltransferase 40 (hNAA40), Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) and Sirtuin-1 (SIRT-1) Pathway in Obesity and T2DM: Modulation by Metformin and Macronutrient Intake. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 12, 2765-2774.
- 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(2), 125-139.
- Aung M. H., Kim M. K., Olson D. E., Thule P. M. és Pardue M. T. (2013) Early visual deficits in streptozotocin-induced diabetic long evans rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54(2), 1370-1377.
- Bailey C. J. (2017) Metformin: historical overview. *Diabetologia.* 60(9), 1566-1576.
- Bárdos G., Móricz K., Jaszlits L., Rabloczky G., Tory K., Rác I., Bernáth S., Sümegi B., Farkas B., Literáti-Nagy B. és Literáti-Nagy P. (2003) BGP-15, a hydroximic acid derivative, protects against cisplatin- or taxol-induced peripheral neuropathy in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 190(1), 9-16.
- Bellini S., Barutta F., Mastrocola R., Imperatore L., Bruno G. és Gruden G. (2017) Heat Shock Proteins in Vascular Diabetic Complications: Review and Future Perspective. *International Journal of Molecular Sciences.* 18(12) Online Article Number: 2709
- Bombicz M., Priksz D., Gesztelyi R., Kiss R., Hollos N., Varga B., Nemeth J., Toth A., Papp Z., Szilvassy Z. és Juhasz B. (2019) The drug candidate BGP-15 delays the onset of diastolic dysfunction in the Goto-Kakizaki rat model of diabetic cardiomyopathy. *Molecules.* 24(3) Online Article Number: 586
- Budzyński M. A., Crul T., Himanen S. V., Toth N., Otvos F., Sistonen L. és Vigh L. (2017) Chaperone co-inducer BGP-15 inhibits histone deacetylases and enhances the heat shock response through increased chromatin accessibility. *Cell Stress and Chaperones.* 22(5), 717-728.
- Calderon G. D., Juarez O. H., Hernandez G. E., Punzo S. M. és De La Cruz Z. D. (2017) Oxidative stress and diabetic retinopathy: Development and treatment. *Eye (Basingstoke).* 31(8), 1122-1130.
- Calderwood S. K., Gong J. és Murshid A. (2016) Extracellular HSPs: The complicated roles of extracellular HSPs in immunity. *Frontiers in Immunology.* 7(APR) Online Article

Number: 159

- Calsolaro V. és Edison P. (2016) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers Dement.* 12(6), 719-732.
- Ceriello A., Johns D., Widel M., Eckland D. J., Gilmore K. J. és Tan M. H. (2005) Comparison of effect of pioglitazone with metformin or sulfonylurea (monotherapy and combination therapy) on postload glycemia and composite insulin sensitivity index during an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 28(2), 266-272.
- Chang K., Francis S. A., Aikawa E., Figueiredo J. L., Kohler R. H., McCarthy J. R., Weissleder R., Plutzky J. és Jaffer F. A. (2010) Pioglitazone suppresses inflammation in vivo in murine carotid atherosclerosis: novel detection by dual-target fluorescence molecular imaging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(10), 1933-1939.
- Chaudhuri J., Bains Y., Guha S., Kahn A., Hall D., Bose N., Gugliucci A. és Kapahi P. (2018) The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. *Cell Metab.* 28(3), 337-352.
- Chen W., Chang B., Zhang Y., Yang P. és Liu L. (2015) [Rhein promotes the expression of SIRT1 in kidney tissues of type 2 diabetic rat]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 31(5), 615-619.
- Cheung N., Mitchell P. és Wong T. Y. (2010) Diabetic retinopathy. *The Lancet.* 376(9735), 124-136.
- Chipuk J. E., Bouchier-Hayes L. és Green D. R. (2006) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* 13(8), 1396-1402.
- Chung J., Nguyen A. K., Henstridge D. C., Holmes A. G., Chan M. H. S., Mesa J. L., Lancaster G. I., Southgate R. J., Bruce C. R., Duffy S. J., Horvath I., Mestrlil R., Watt M. J., Hooper P. L., Kingwell B. A., Vigh L., Hevener A. és Febbraio M. A. (2008) HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 105(5), 1739-1744.
- Colca J. R., Tanis S. P., McDonald W. G. és Kletzien R. F. (2014) Insulin sensitizers in 2013: new insights for the development of novel therapeutic agents to treat metabolic diseases. *Expert Opin Investig Drugs.* 23(1), 1-7.
- Coles B., Zaccardi F., Ling S., Davies M. J., Samani N. J. és Khunti K. (2021) Cardiovascular events and mortality in people with and without type 2 diabetes: An observational study in a contemporary multi-ethnic population. *Journal of Diabetes Investigation.* 12(7), 1175-1182.
- Danis R. P. és Yang Y. (1993) Microvascular retinopathy in the Zucker diabetic fatty rat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 34(7), 2367-2371.
- DasSarma S. és Schwieterman E. W. (2021) Early evolution of purple retinal pigments on Earth and implications for exoplanet biosignatures. *International Journal of Astrobiology.* 20(3), 241-250.
- DeFronzo R. A., Inzucchi S., Abdul-Ghani M. és Nissen S. E. (2019) Pioglitazone: The forgotten, cost-effective cardioprotective drug for type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 16(2), 133-143.
- Dhir G. és Cusi K. (2018) Glucagon like peptide-1 receptor agonists for the management of obesity and non-alcoholic fatty liver disease: a novel therapeutic option. *J Investig Med.* 66(1), 7-10.
- Di Naso F. C., Porto R. R., Fillmann H. S., Maggioni L., Padoin A. V., Ramos R. J., Mottin C. C., Bittencourt A., Marroni N. A. és de Bittencourt P. I., Jr. (2015) Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. *Obesity (Silver Spring).* 23(1), 120-129.

- 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(9), 1081-1087.
- Donnor T. és Sarkar S. (2000) Insulin- Pharmacology, Therapeutic Regimens and Principles of Intensive Insulin Therapy, in *Endotext*, Feingold K. R., Anawalt B., Blackman M. R., Boyce A., Chrousos G., Corpas E., de Herder W. W., Dhatariya K., Dungan K., Hofland J., Kalra S., Kaltsas G., Kapoor N., Koch C., Kopp P., Korbonits M., Kovacs C. S., Kuohung W., Laferrere B., Levy M., McGee E. A., McLachlan R., New M., Purnell J., Sahay R., Shah A. S., Singer F., Sperling M. A., Stratakis C. A., Trence D. L. és Wilson D. P. (szerk.), South Dartmouth (MA), PMID: 25905175
- DR szakmai protokoll. A szemészeti szövödmények terápiája diabetes mellitusban Szakmai Protokoll. Hozzáférés dátuma: 2023.05.29., <http://www.kozlonyok.hu/kozlonyok/kozlonyok/6/pdf/2009/21.pdf>
- Elattar S., Estaphan S., Mohamed E. A., Elzainy A. és Naguib M. (2017) The protective effect of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin d3 and metformin on liver in type 2 diabetic rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 173, 235-244.
- Fei Y., Tsoi M. F. és Cheung B. M. Y. (2019) Cardiovascular outcomes in trials of new antidiabetic drug classes: a network meta-analysis. *Cardiovasc Diabetol.* 18(1), 112.
- Ferenczyova K., Kalocayova B., Kindernay L., Jelemensky M., Balis P., Berenyiova A., Zemancikova A., Farkasova V., Sykora M., Tothova L., Jasenovec T., Radosinska J., Torok J., Cacanyiova S., Barancik M. és Bartekova M. (2020) Quercetin exerts age-dependent beneficial effects on blood pressure and vascular function, but is inefficient in preventing myocardial ischemia-reperfusion injury in zucker diabetic fatty rats. *Molecules.* 25(1) Online Article Number: 187
- Fonyó A. (szerk.): Az orvosi élettan tankönyve (2013), Medicina Kiadó, ISBN: 9789632264646
- Frisbee J. C., Lewis M. T., Kasper J. D., Chantler P. D. és Wiseman R. W. (2018) Type 2 diabetes mellitus in the Goto-Kakizaki rat impairs microvascular function and contributes to premature skeletal muscle fatigue. *Journal of Applied Physiology.* 126(3), 626-637.
- 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(5), 1201-1212.
- Fullerton B., Jeitler K., Seitz M., Horvath K., Berghold A. és Siebenhofer A. (2014) Intensive glucose control versus conventional glucose control for type 1 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2017(12) Online Article Number: Cd009122
- Garcia-Martin E., Cipres M., Melchor I., Gil-Arribas L., Vilades E., Polo V., Rodrigo M. J. és Satue M. (2019) Neurodegeneration in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus without Diabetic Retinopathy. *J Ophthalmol.* 2019, 1825819.
- Gehrig S. M., Van Der Poel C., Sayer T. A., Schertzer J. D., Henstridge D. C., Church J. E., Lamon S., Russell A. P., Davies K. E., Febbraio M. A. és Lynch G. S. (2012) Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature.* 484(7394), 394-398.
- GlaukómaSzP. A glaucoma és kezelése Szakmai Protokoll. Hozzáférés dátuma: 2023.05.29., https://ftsz.pte.hu/docs/protokollok/SZEM- a_glaucoma_es_kezelese.pdf
- 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(3), 207-239.
- Green D. R., Galluzzi L. és Kroemer G. (2014) Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science.* 345(6203), 1250256.
- 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(17), 2431-2435.

- Halmosi R., Berente Z., Osz E., Toth K., Literati-Nagy P. és Sumegi B. (2001) Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced oxidative cell damage and mitochondrial metabolism in langendorff heart perfusion system. *Molecular Pharmacology*. 59(6), 1497-1505.
- Hashim Z. és Zarina S. (2012) Osmotic stress induced oxidative damage: possible mechanism of cataract formation in diabetes. *J Diabetes Complications*. 26(4), 275-279.
- Hautala N., Hannula V., Palosaari T., Ebeling T. és Falck A. (2014) Prevalence of diabetic retinopathy in young adults with type 1 diabetes since childhood: the Oulu cohort study of diabetic retinopathy. *Acta ophthalmologica*. 92(8), 749-752.
- Heng L. Z., Comyn O., Peto T., Tadros C., Ng E., Sivaprasad S. és Hykin P. G. (2013) Diabetic retinopathy: Pathogenesis, clinical grading, management and future developments. *Diabetic Medicine*. 30(6), 640-650.
- Henstridge D. C., Bruce C. R., Drew B. G., Tory K., Kolonics A., Estevez E., Chung J., Watson N., Gardner T., Lee-Young R. S., Connor T., Watt M. J., Carpenter K., Hargreaves M., McGee S. L., Hevener A. L. és Febbraio M. A. (2014) Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. *Diabetes*. 63(6), 1881-1894.
- Hetzel M., Walcher D., Grub M., Bach H., Hombach V. és Marx N. (2003) Inhibition of MMP-9 expression by PPARgamma activators in human bronchial epithelial cells. *Thorax*. 58(9), 778-783.
- Hirsch G. E. és Heck T. G. (2022) Inflammation, oxidative stress and altered heat shock response in type 2 diabetes: the basis for new pharmacological and non-pharmacological interventions. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 128(2), 411-425.
- Holdsworth C. T., Ferguson S. K., Colburn T. D., Fees A. J., Craig J. C., Hirai D. M., Poole D. C. és Musch T. I. (2017) Vascular K(ATP) channels mitigate severe muscle O(2) delivery-utilization mismatch during contractions in chronic heart failure rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 238, 33-40.
- Huber G., Heynen S., Imsand C., vom Hagen F., Muehlfriedel R., Tanimoto N., Feng Y., Hammes H. P., Grimm C., Peichl L., Seeliger M. W. és Beck S. C. (2010) Novel rodent models for macular research. *PLoS One*. 5(10), e13403.
- Iliescu D. A., Ciubotaru A., Ghita M. A., Paun A. M., Ion T. és Zagrean L. (2018) Electrophysiologic evaluation of the visual pathway at different depths of sevoflurane anesthesia in diabetic rats. *Rom J Ophthalmol*. 62(1), 34-41.
- Jalgaonkar M. P., Parmar U. M., Kulkarni Y. A. és Oza M. J. (2022) SIRT1-FOXOs activity regulates diabetic complications. *Pharmacol Res*. 175, 106014.
- Jang S. Y., Kim A., Kim J. K., Kim C., Cho Y. H., Kim J. H., Kim C. H. és Lee J. Y. (2014) Metformin inhibits tumor cell migration via down-regulation of MMP9 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Anticancer Res*. 34(8), 4127-4134.
- Jiang G. és Zhang B. B. (2005) Modulation of insulin signalling by insulin sensitizers. *Biochem Soc Trans*. 33(Pt 2), 358-361.
- Jiang Y., Walker R. J., Kern T. S. és Steinle J. J. (2010) Application of isoproterenol inhibits diabetic-like changes in the rat retina. *Experimental Eye Research*. 91(2), 171-179.
- Jones Q., Voegeli T. S., Li G., Chen Y. és Currie R. W. (2011) Heat shock proteins protect against ischemia and inflammation through multiple mechanisms. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 10(4), 247-259.
- Kanwar M., Chan P. S., Kern T. S. és Kowluru R. A. (2007) Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48(8), 3805-3811.
- Khalid M., Petroianu G. és Adem A. (2022) Advanced Glycation End Products and Diabetes Mellitus: Mechanisms and Perspectives. *Biomolecules*. 12(4)

- Kim A. J., Chang J. Y., Shi L., Chang R. C., Ko M. L. és Ko G. Y. (2017) The Effects of Metformin on Obesity-Induced Dysfunctional Retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 58(1), 106-118.
- King Z. A., Sheth K. N., Kimberly W. T. és Simard J. M. (2018) Profile of intravenous glyburide for the prevention of cerebral edema following large hemispheric infarction: evidence to date. *Drug Des Devel Ther.* 12, 2539-2552.
- Kinuthia U. M., Wolf A. és Langmann T. (2020) Microglia and Inflammatory Responses in Diabetic Retinopathy. *Front Immunol.* 11, 564077.
- Kiss R., Pesti-Asboth G., Szarvas M. M., Stundl L., Cziaky Z., Hegedus C., Kovacs D., Badale A., Mathe E., Szilvassy Z. és Remenyik J. (2019) Diosgenin and Its Fenugreek Based Biological Matrix Affect Insulin Resistance and Anabolic Hormones in a Rat Based Insulin Resistance Model. *Biomed Res Int.* 2019, 7213913.
- Knight C. M., Gutierrez-Juarez R., Lam T. K., Arrieta-Cruz I., Huang L., Schwartz G., Barzilai N. és Rossetti L. (2011) Mediobasal hypothalamic SIRT1 is essential for resveratrol's effects on insulin action in rats. *Diabetes.* 60(11), 2691-2700.
- Kolb H. (1995) Simple Anatomy of the Retina, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, Kolb H., Fernandez E. és Nelson R. (szerk.), Salt Lake City (UT), PMID: 21413391
- Kowluru R. A. (2020) Retinopathy in a Diet-Induced Type 2 Diabetic Rat Model and Role of Epigenetic Modifications. *Diabetes.* 69(4), 689-698.
- Kowluru R. A. (2010) Role of matrix metalloproteinase-9 in the development of diabetic retinopathy and its regulation by H-Ras. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(8), 4320-4326.
- Kowluru R. A. és Abbas S. N. (2003) Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(12), 5327-5334.
- Kowluru R. A. és Mishra M. (2018) Therapeutic targets for altering mitochondrial dysfunction associated with diabetic retinopathy. *Expert Opin Ther Targets.* 22(3), 233-245.
- Kowluru R. A., Mishra M., Kowluru A. és Kumar B. (2016) Hyperlipidemia and the development of diabetic retinopathy: Comparison between type 1 and type 2 animal models. *Metabolism: Clinical and Experimental.* 65(10), 1570-1581.
- Kowluru R. A., Mohammad G., dos Santos J. M. és Zhong Q. (2011) Abrogation of MMP-9 gene protects against the development of retinopathy in diabetic mice by preventing mitochondrial damage. *Diabetes.* 60(11), 3023-3033.
- Kowluru R. A., Santos J. M. és Zhong Q. (2014a) Sirt1, a negative regulator of matrix metalloproteinase-9 in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55(9), 5653-5660.
- Kowluru R. A., Zhong Q., Santos J. M., Thandampallayam M., Putt D. és Gierhart D. L. (2014b) Beneficial effects of the nutritional supplements on the development of diabetic retinopathy. *Nutrition and Metabolism.* 11(1) Online Article Number: 8
- KSH. A háziorvosi és a házi gyermekorvosi szolgálathoz bejelentkezettek egyes betegségei. Hozzáférés dátuma: 02 May 2023, https://www.ksh.hu/stadat_files/ege/hu/ege0024.html?fbclid=IwAR2IbOeduNj2IkWBUCcZdBMBdBKYjkV0WFyUkIVKIWbyZIRwKvACB47ugJA
- Kurucz I., Morva Á., Vaag A., Eriksson K. F., Huang X., Groop L. és Koranyi L. (2002) Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes.* 51(4), 1102-1109.
- Kurylowicz A., Owczarz M., Polosak J., Jonas M. I., Lisik W., Jonas M., Chmura A. és Puzianowska-Kuznicka M. (2016) SIRT1 and SIRT7 expression in adipose tissues of obese and normal-weight individuals is regulated by microRNAs but not by methylation status. *Int J Obes (Lond).* 40(11), 1635-1642.

- Kuwabara W. M. T., Panveloski-Costa A. C., Yokota C. N. F., Pereira J. N. B., Filho J. M., Torres R. P., Hirabara S. M., Curi R. és Alba-Loureiro T. C. (2017) Comparison of Goto-Kakizaki rats and high fat diet-induced obese rats: Are they reliable models to study Type 2 Diabetes mellitus? *PLoS One*. *12*(12), e0189622.
- Lampé N., Priksz D., Erdei T., Bombicz M., Kiss R., Varga B., Zsuga J., Szerafin T., Csanádi Z., Balla G., Balla J., Szilvássy Z., Gesztelyi R. és Juhász B. (2020) Negative inotropic effect of BGP-15 on the human right atrial myocardium. *Journal of Clinical Medicine*. *9*(5) Online Article Number: 1434
- Lechner J., O'Leary O. E. és Stitt A. W. (2017) The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Research*. *139*, 7-14.
- Lei B. és Perlman I. (1999) The contributions of voltage- and time-dependent potassium conductances to the electroretinogram in rabbits. *Vis Neurosci*. *16*(4), 743-754.
- Li B., Yang C., Rosenbaum D. M. és Roth S. (2000) Signal transduction mechanisms involved in ischemic preconditioning in the rat retina in vivo. *Exp Eye Res*. *70*(6), 755-765.
- Li F., Lu R., Zhao T., Zhang X., Wang S. és Xing G. (2019) Comparing the protective effects of three sulfur compounds against acrylonitrile-induced acute toxicity in CYP2E1-induced rats. *Toxicology and Industrial Health*. *35*(5), 387-397.
- Li J. Q., Welchowski T., Schmid M., Letow J., Wolpers C., Pascual-Camps I., Holz F. G. és Finger R. P. (2020) Prevalence, incidence and future projection of diabetic eye disease in Europe: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Epidemiology*. *35*(1), 11-23.
- Liden M. és Eriksson U. (2006) Understanding retinol metabolism: structure and function of retinol dehydrogenases. *J Biol Chem*. *281*(19), 13001-13004.
- Lima T. F. O., Costa M. C., Figueiredo I. D., Inacio M. D., Rodrigues M. R., Assis R. P., Baviera A. M. és Brunetti I. L. (2020) Curcumin, Alone or in Combination with Aminoguanidine, Increases Antioxidant Defenses and Glycation Product Detoxification in Streptozotocin-Diabetic Rats: A Therapeutic Strategy to Mitigate Glycoxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. *2020*, 1036360.
- Literati-Nagy B., Kulcsar E., Literati-Nagy Z., Buday B., Peterfai E., Horvath T., Tory K., Kolonics A., Fleming A., Mandl J. és Koranyi L. (2009) Improvement of insulin sensitivity by a novel drug, BGP-15, in insulin-resistant patients: a proof of concept randomized double-blind clinical trial. *Horm Metab Res*. *41*(5), 374-380.
- Literati-Nagy B., Tory K., Peitl B., Bajza A., Koranyi L., Literati-Nagy Z., Hooper P. L., Vigh L. és Szilvassy Z. (2014) Improvement of insulin sensitivity by a novel drug candidate, BGP-15, in different animal studies. *Metab Syndr Relat Disord*. *12*(2), 125-131.
- Literati-Nagy Z., Tory K., Literati-Nagy B., Kolonics A., Torok Z., Gombos I., Balogh G., Vigh L., Jr., Horvath I., Mandl J., Sumegi B., Hooper P. L. és Vigh L. (2012) The HSP co-inducer BGP-15 can prevent the metabolic side effects of the atypical antipsychotics. *Cell Stress Chaperones*. *17*(4), 517-521.
- Liu J. és Wang L. N. (2015) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists for preventing recurrent stroke and other vascular events in patients with stroke or transient ischaemic attack. *Cochrane Database Syst Rev*. (10), CD010693.
- Lu L., Jiang Y., Jaganathan R. és Hao Y. (2018) Current Advances in Pharmacotherapy and Technology for Diabetic Retinopathy: A Systematic Review. *J Ophthalmol*. *2018*, 1694187.
- Madonna R., Balistreri C. R., Geng Y. J. és De Caterina R. (2017) Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. *Vascular Pharmacology*. *90*, 1-7.

- Mahmoud F. F., Haines D., Dashti A. A., El-Shazly S. és Al-Najjar F. (2018) Correlation between heat shock proteins, adiponectin, and T lymphocyte cytokine expression in type 2 diabetics. *Cell Stress and Chaperones*. 23(5), 955-965.
- Marques I. P., Alves D., Santos T., Mendes L., Santos A. R., Lobo C., Durbin M. és Cunha-Vaz J. (2019) Multimodal Imaging of the Initial Stages of Diabetic Retinopathy: Different Disease Pathways in Different Patients. *Diabetes*. 68(3), 648-653.
- Matthews D. R., Hosker J. P., Rudenski A. S., Naylor B. A., Treacher D. F. és Turner R. C. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28(7), 412-419.
- McCulloch D. L., Marmor M. F., Brigell M. G., Hamilton R., Holder G. E., Tzekov R. és Bach M. (2015) ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Doc Ophthalmol*. 130(1), 1-12.
- McQuade R. M., Stojanovska V., Stavely R., Timpani C., Petersen A. C., Abalo R., Bornstein J. C., Rybalka E. és Nurgali K. (2018) Oxaliplatin-induced enteric neuronal loss and intestinal dysfunction is prevented by co-treatment with BGP-15. *Br J Pharmacol*. 175(4), 656-677.
- 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(3), 323-341.
- Mishra M. és Kowluru R. A. (2017) Role of PARP-1 as a novel transcriptional regulator of MMP-9 in diabetic retinopathy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1863(7), 1761-1769.
- Mishra M., Lillvis J., Seyoum B. és Kowluru R. A. (2016) Peripheral blood mitochondrial DNA damage as a potential noninvasive biomarker of diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 57(10), 4035-4044. Online Article Number: 13
- Mohammad G. és Kowluru R. A. (2012) Diabetic retinopathy and signaling mechanism for activation of matrix metalloproteinase-9. *J Cell Physiol*. 227(3), 1052-1061.
- Mohan V., Cooper M. E., Matthews D. R. és Khunti K. (2019) The Standard of Care in Type 2 Diabetes: Re-evaluating the Treatment Paradigm. *Diabetes Ther*. 10(Suppl 1), 1-13.
- Muniyappa R., Lee S., Chen H. és Quon M. J. (2008) Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 294(1), E15-26.
- Nakhjavani M., Morteza A., Khajeali L., Esteghamati A., Khalilzadeh O., Asgarani F. és Outeiro T. F. (2010) Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. *Cell Stress and Chaperones*. 15(6), 959-964.
- Nam S. M., Kwon H. J., Kim W., Kim J. W., Hahn K. R., Jung H. Y., Kim D. W., Yoo D. Y., Seong J. K., Hwang I. K. és Yoon Y. S. (2018) Changes of myelin basic protein in the hippocampus of an animal model of type 2 diabetes. *Lab. Anim. Res*. 34(4), 176-184.
- Nascimento T. L., Silva M. T. és Miyabara E. H. (2018) BGP-15 improves contractile function of regenerating soleus muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 39(1-2), 25-34.
- Obrosova I. G., Minchenko A. G., Vasupuram R., White L., Abatan O. I., Kumagai A. K., Frank R. N. és Stevens M. J. (2003) Aldose reductase inhibitor fidarestat prevents retinal oxidative stress and vascular endothelial growth factor overexpression in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes*. 52(3), 864-871.
- Olivares A. M., Althoff K., Chen G. F., Wu S., Morrisson M. A., DeAngelis M. M. és Haider N. (2017) Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Current Diabetes Reports*. 17(10) Online Article Number: 93
- Pandey S. és Dvorakova M. C. (2020) Future perspective of diabetic animal models. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders - Drug Targets*. 20(1), 25-38.

- Paneni F., Costantino S., Volpe M., Lüscher T. F. és Cosentino F. (2013) Epigenetic signatures and vascular risk in type 2 diabetes: A clinical perspective. *Atherosclerosis*. 230(2), 191-197.
- Papi A., De Carolis S., Bertoni S., Storci G., Sceberas V., Santini D., Ceccarelli C., Taffurelli M., Orlandi M. és Bonafe M. (2014) PPARgamma and RXR ligands disrupt the inflammatory cross-talk in the hypoxic breast cancer stem cells niche. *J Cell Physiol*. 229(11), 1595-1606.
- Peng J., Li Q., Li K., Zhu L., Lin X., Lin X., Shen Q., Li G. és Xie X. (2017) Quercetin Improves Glucose and Lipid Metabolism of Diabetic Rats: Involvement of Akt Signaling and SIRT1. *J Diabetes Res*. 2017, 3417306.
- Perlman I. (1995) The Electroretinogram: ERG. Hozzáférés dátuma: 2023.05.29, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21413407
- Pető Á., Kósa D., Fehér P., Ujhelyi Z., Sinka D., Vecsernyés M., Szilvássy Z., Juhász B., Csanádi Z., Vígh L. és Bácskay I. (2020) Pharmacological overview of the BGP-15 chemical agent as a new drug candidate for the treatment of symptoms of metabolic syndrome. *Molecules*. 25(2) Online Article Number: 429
- Putz R. és Pabst R. (szerk.): Sobotta - Az ember anatómiájának atlasza (1994), Semmelweis Kiadó, ISBN: 9638154276
- Qaseem A., Barry M. J., Humphrey L. L., Forcica M. A., Clinical Guidelines Committee of the American College of P., Fitterman N., Horwitch C., Kansagara D., McLean R. M. és Wilt T. J. (2017) Oral Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Practice Guideline Update From the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 166(4), 279-290.
- Racz I., Tory K., Gallyas Jr F., Berente Z., Osz E., Jaszlits L., Bernath S., Sumegi B., Rabloczky G. és Literati-Nagy P. (2002) BGP-15 - A novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor - Protects against nephrotoxicity of cisplatin without compromising its antitumor activity. *Biochemical Pharmacology*. 63(6), 1099-1111.
- Rajamohan S. B., Pillai V. B., Gupta M., Sundaresan N. R., Birukov K. G., Samant S., Hottiger M. O. és Gupta M. P. (2009) SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Mol Cell Biol*. 29(15), 4116-4129.
- Rees D. A. és Alcolado J. C. (2005) Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*. 22(4), 359-370.
- Reinehr T. (2005) Clinical presentation of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *International Journal of Obesity*. 29, S105-S110.
- Reinehr T. (2013) Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *World J Diabetes*. 4(6), 270-281.
- Roggerio A., Strunz C. M. C., Pacanaro A. P., Leal D. P., Takada J. Y., Avakian S. D. és Mansur A. P. (2018) Gene Expression of Sirtuin-1 and Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End Products in Healthy and Slightly Overweight Subjects after Caloric Restriction and Resveratrol Administration. *Nutrients*. 10(7), 937.
- Romeo G., Liu W. H., Asnaghi V., Kern T. S. és Lorenzi M. (2002) Activation of nuclear factor- κ B induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes*. 51(7), 2241-2248.
- Rong Z., Li L., Fei F., Luo L. és Qu Y. (2013) Combined treatment of glibenclamide and CoCl₂ decreases MMP9 expression and inhibits growth in highly metastatic breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 32(1), 32.
- Rosales-Corral S., Tan D. X., Manchester L. és Reiter R. J. (2015) Diabetes and alzheimer disease, two overlapping pathologies with the same background: Oxidative stress.

- Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2015 Online Article Number: 985845
- Rosenzweig R., Nillegoda N. B., Mayer M. P. és Bukau B. (2019) The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 20(11), 665-680.
- Röhlich P. (szerk.): Szövektan (2006), Semmelweis Kiadó, ISBN: 9639656461
- Salah H., Li M., Cacciani N., Gastaldello S., Ogilvie H., Akkad H., Namuduri A. V., Morbidoni V., Artemenko K. A., Balogh G., Martinez-Redondo V., Jannig P., Hedstrom Y., Dworkin B., Bergquist J., Ruas J., Vigh L., Salviati L. és Larsson L. (2016) The chaperone co-inducer BGP-15 alleviates ventilation-induced diaphragm dysfunction. *Sci Transl Med*. 8(350), 350ra103.
- 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(6), 267-274.
- Sapra G., Tham Y. K., Cemerlang N., Matsumoto A., Kiriazis H., Bernardo B. C., Henstridge D. C., Ooi J. Y., Pretorius L., Boey E. J., Lim L., Sadoshima J., Meikle P. J., Mellet N. A., Woodcock E. A., Marasco S., Ueyama T., Du X. J., Febbraio M. A. és McMullen J. R. (2014) The small-molecule BGP-15 protects against heart failure and atrial fibrillation in mice. *Nat Commun*. 5, 5705.
- Sarnyai F., Szekeczes T., Csala M., Sumegi B., Szarka A., Schaff Z. és Mandl J. (2020) BGP-15 Protects Mitochondria in Acute, Acetaminophen Overdose Induced Liver Injury. *Pathol Oncol Res*. 26(3), 1797-1803.
- Sarszegi Z., Bogнар E., Gaszner B., Kónyi A., Gallyas Jr F., Sumegi B. és Berente Z. (2012) BGP-15, a PARP-inhibitor, prevents imatinib-induced cardiotoxicity by activating Akt and suppressing JNK and p38 MAP kinases. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 365(1-2), 129-137.
- Sharma A. K., Raikwar S. K., Kurmi M. K. és Srinivasan B. P. (2013) Gemfibrozil and its combination with metformin on pleiotropic effect on IL-10 and adiponectin and anti-atherogenic treatment in insulin resistant type 2 diabetes mellitus rats. *Inflammopharmacology*. 21(2), 137-145.
- 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(3), 519-532.
- Sieving P. A. és Nino C. (1988) Scotopic threshold response (STR) of the human electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 29(11), 1608-1614.
- Smuder A. J., Morton A. B., Hall S. E., Wiggs M. P., Ahn B., Wawrzyniak N. R., Sollanek K. J., Min K., Kwon O. S., Nelson W. B. és Powers S. K. (2019) Effects of exercise preconditioning and HSP72 on diaphragm muscle function during mechanical ventilation. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 10(4), 767-781.
- Sorensen J. C., Petersen A. C., Timpani C. A., Campelj D. G., Cook J., Trewin A. J., Stojanovska V., Stewart M., Hayes A. és Rybalka E. (2017) BGP-15 protects against oxaliplatin-induced skeletal myopathy and mitochondrial reactive oxygen species production in mice. *Frontiers in Pharmacology*. 8(APR) Online Article Number: 137
- Squire L. R., Slater P. C. és Chace P. M. (1975) Retrograde amnesia: temporal gradient in very long term memory following electroconvulsive therapy. *Science*. 187(4171), 77-79.
- Sumegi K., Fekete K., Antus C., Debreceni B., Hocsak E., Gallyas F., Jr., Sumegi B. és Szabo A. (2017) BGP-15 protects against oxidative stress- or lipopolysaccharide-induced mitochondrial destabilization and reduces mitochondrial production of reactive oxygen species. *PLoS ONE*. 12(1) Online Article Number: e0169372
- Sun H., Saedi P., Karuranga S., Pinkepank M., Ogurtsova K., Duncan B. B., Stein C., Basit A., Chan J. C. N., Mbanya J. C., Pavkov M. E., Ramachandaran A., Wild S. H., James

- S., Herman W. H., Zhang P., Bommer C., Kuo S., Boyko E. J. és Magliano D. J. (2022) IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 183, 109119.
- Szabados E., Literati-Nagy P., Farkas B. és Sumegi B. (2000) BGP-15, a nicotinic amidoxime derivate protecting heart from ischemia reperfusion injury through modulation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemical Pharmacology.* 59(8), 937-945.
- Szabó K., Énzsöly A., Dékány B., Szabó A., Hajdú R. I., Radovits T., Mátyás C., Oláh A., Laurik L. K., Somfai G. M., Merkely B., Szél Á. és Lukáts Á. (2017) Histological evaluation of diabetic neurodegeneration in the retina of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats. *Scientific Reports.* 7(1) Online Article Number: 8891
- Tarr J. M., Kaul K., Chopra M., Kohner E. M. és Chibber R. (2013) Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol.* 2013, 343560.
- Teo Z. L., Tham Y. C., Yu M., Chee M. L., Rim T. H., Cheung N., Bikbov M. M., Wang Y. X., Tang Y., Lu Y., Wong I. Y., Ting D. S. W., Tan G. S. W., Jonas J. B., Sabanayagam C., Wong T. Y. és Cheng C. Y. (2021) Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology.* 128(11), 1580-1591.
- Terakita A. (2005) The opsins. *Genome Biol.* 6(3), 213.
- Tibaldi J. M. (2014) Evolution of insulin: from human to analog. *Am J Med.* 127(10 Suppl), S25-38.
- Tofovic S. P., Kusaka H., Kost Jr C. K. és Bastacky S. (2000) Renal function and structure in diabetic, hypertensive, obese ZDFxSHHF- hybrid rats. *Renal Failure.* 22(4), 387-406.
- Toh H., Smolentsev A., Bozadjian R. V., Keeley P. W., Lockwood M. D., Sadjadi R., Clegg D. O., Blodi B. A., Coffey P. J., Reese B. E. és Thomson J. A. (2019) Vascular changes in diabetic retinopathy-a longitudinal study in the Nile rat. *Lab Invest.* 99(10), 1547-1560.
- Tomita Y., Lee D., Tsubota K. és Kurihara T. (2020) PPAR α agonist oral therapy in diabetic retinopathy. *Biomedicines.* 8(10), 1-18. Online Article Number: 433
- Tulassay Z. (2023) A belgyógyászat alapjai, Medicina Könyvkiadó, Budapest, ISBN: 978 963 226 853 8
- Turturici G., Sconzo G. és Geraci F. (2011) Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochem Res Int.* 2011, 618127.
- Varga B., Gesztelyi R., Bombicz M., Haines D., Szabo A. M., Kemeny-Beke A., Antal M., Vecsernyes M., Juhasz B. és Tosaki A. (2013) Protective effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) on the recovery of ischemia/reperfusion (I/R)-induced retinal damage in a rat model. *Journal of Molecular Neuroscience.* 50(3), 558-570.
- Varga B., Priksz D., Lampé N., Bombicz M., Kurucz A., Szabó A. M., Pósa A., Szabó R., Kemény-Beke Á., Remenyik J., Gesztelyi R. és Juhász B. (2017) Protective effect of prunus cerasus (sour cherry) seed extract on the recovery of ischemia/reperfusion-induced retinal damage in zucker diabetic fatty rat. *Molecules.* 22(10) Online Article Number: 1782
- Varga B., Szabadfi K., Kiss P., Fabian E., Tamas A., Griecs M., Gabriel R., Reglodi D., Kemeny-Beke A., Pamer Z., Biro Z., Tosaki A., Atlasz T. és Juhasz B. (2011) PACAP improves functional outcome in excitotoxic retinal lesion: An electroretinographic study. *Journal of Molecular Neuroscience.* 43(1), 44-50.
- Vessières E., Guihot A. L., Toutain B., Maquigneau M., Fassot C., Loufrani L. és Henrion D. (2013) COX-2-Derived Prostanoids and Oxidative Stress Additionally Reduce Endothelium-Mediated Relaxation in Old Type 2 Diabetic Rats. *PLoS ONE.* 8(7) Online Article Number: e68217
- Wang B., Camino A., Pi S., Guo Y., Wang J., Huang D., Hwang T. S. és Jia Y. (2019) Three-

- dimensional structural and angiographic evaluation of foveal ischemia in diabetic retinopathy: method and validation. *Biomed Opt Express*. 10(7), 3522-3532.
- Wang Q., Pfister F., Dorn-Beineke A., Vom Hagen F., Lin J., Feng Y. és Hammes H. P. (2010) Low-dose erythropoietin inhibits oxidative stress and early vascular changes in the experimental diabetic retina. *Diabetologia*. 53(6), 1227-1238.
- Wang W. és Lo A. C. Y. (2018) Diabetic retinopathy: Pathophysiology and treatments. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(6) Online Article Number: 1816
- WHO. Diabetes Fact Sheet. Hozzáférés dátuma: 02 May 2023, <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- Winkler G. (2015) [Sulfonylureas in today's blood glucose lowering therapy. New data on advantages and potential barriers of an "old" antidiabetic group]. *Orv Hetil*. 156(13), 511-515.
- Wong T. Y., Cheung C. M. G., Larsen M., Sharma S. és Simó R. (2016) Diabetic retinopathy. *Nature Reviews Disease Primers*. 2 Online Article Number: 16012
- Xu J., Nie M., Li J., Xu Z., Zhang M., Yan Y., Feng T., Zhao X. és Zhao Q. (2018) Effect of pioglitazone on inflammation and calcification in atherosclerotic rabbits : An (18)F-FDG-PET/CT in vivo imaging study. *Herz*. 43(8), 733-740.
- Yau J. W., Rogers S. L., Kawasaki R., Lamoureux E. L., Kowalski J. W., Bek T., Chen S. J., Dekker J. M., Fletcher A., Grauslund J., Haffner S., Hamman R. F., Ikram M. K., Kayama T., Klein B. E., Klein R., Krishnaiah S., Mayurasakorn K., O'Hare J. P., Orchard T. J., Porta M., Rema M., Roy M. S., Sharma T., Shaw J., Taylor H., Tielsch J. M., Varma R., Wang J. J., Wang N., West S., Xu L., Yasuda M., Zhang X., Mitchell P., Wong T. Y. és Meta-Analysis for Eye Disease Study G. (2012) Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 35(3), 556-564.
- Zhang D., Tang Q., Zheng G., Wang C., Zhou Y., Wu Y., Xuan J., Tian N., Wang X., Wu Y., Xu H. és Zhang X. (2017) Metformin ameliorates BSCB disruption by inhibiting neutrophil infiltration and MMP-9 expression but not direct TJ proteins expression regulation. *J Cell Mol Med*. 21(12), 3322-3336.
- Zhang J., Zhang Y., Xiao F., Liu Y., Wang J., Gao H., Rong S., Yao Y., Li J. és Xu G. (2016) The peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone prevents NF-kappaB activation in cisplatin nephrotoxicity through the reduction of p65 acetylation via the AMPK-SIRT1/p300 pathway. *Biochem Pharmacol*. 101, 100-111.
- Zhang X. Y., Xiao Y. Q., Zhang Y. és Ye W. (2013) Protective effect of pioglitazone on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54(6), 3912-3921.
- Zheng S. L., Roddick A. J., Aghar-Jaffar R., Shun-Shin M. J., Francis D., Oliver N. és Meeran K. (2018) Association Between Use of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors, Glucagon-like Peptide 1 Agonists, and Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors With All-Cause Mortality in Patients With Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 319(15), 1580-1591.
- Zheng Z., Chen H., Li J., Li T., Zheng B., Zheng Y., Jin H., He Y., Gu Q. és Xu X. (2012) Sirtuin 1-mediated cellular metabolic memory of high glucose via the LKB1/AMPK/ROS pathway and therapeutic effects of metformin. *Diabetes*. 61(1), 217-228.

7.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló és további megjelent közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/123/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Wachal Zita

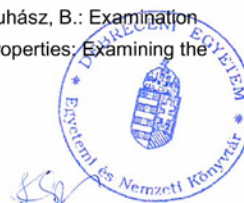
Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Táplálkozástudományi Doktori Program

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Wachal, Z.**, Szilágyi, A. T., Takács, B., Szabó, A. M., Priksz, D., Bombicz, M., Szilvássy, J., Juhász, B., Szilvássy, Z., Varga, B.: Improved Survival and Retinal Function of Aging ZDF Rats in Long-Term, Uncontrolled Diabetes by BGP-15 Treatment. *Front. Pharmacol.* 12, 1-11, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.650207>
IF: 5.988
2. **Wachal, Z.**, Bombicz, M., Priksz, D., Hegedűs, C., Kovács, D. K., Szabó, A. M., Kiss, R., Németh, J., Juhász, B., Szilvássy, Z., Varga, B.: Retinoprotection by BGP-15, a Hydroxamic Acid Derivative, in a Type II Diabetic Rat Model Compared to Glibenclamide, Metformin, and Pioglitazone. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (6), 1-19, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21062124>
IF: 5.924

További közlemények

3. Blaga, Z., Czine, P., Takács, B., Szilágyi, A. T., Szekeres, R., **Wachal, Z.**, Hegedűs, C., Buchholcz, G., Varga, B., Priksz, D., Bombicz, M., Szabó, A. M., Kiss, R., Gesztelyi, R., Romanescu, D. D., Szabó, Z., Szűcs, M., Balogh, P., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Examination of Preferences for COVID-19 Vaccines in Hungary Based on Their Properties: Examining the Impact of Pandemic Awareness with a Hybrid Choice Approach. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 20 (2), 1-16, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph20021270>
IF: 4.614 (2021)





4. Gesztelyi, R., Kiss, Z. M., **Wachal, Z.**, Juhász, B., Bombicz, M., Csépanyi, E., Pák, K., Zsuga, J., Papp, C., Galajda, Z., Branzaniuc, K., Pórszász, R., Szentmiklósi, J. A., Tósaki, Á.: The surmountable effect of FSCPX, an irreversible A1 adenosine receptor antagonist, on the negative inotropic action of A1 adenosine receptor full agonists in isolated guinea pig left atria.
Arch. Pharm. Res. 36 (3), 293-305, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-013-0056-z>
IF: 1.751

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,277

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,912**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.04.24.



8. Tárgyszavak

Magyar tárgyszavak: retina, diabetes mellitus, diabéteszes retinopátia, iszkémia-reperfúzió, Goto-Kakizaki (GK) patkány, Zucker Diabetic Fatty (ZDF) patkány, BGP-15, glibenklamid, metformin, pioglitazon, elektroretinográfia (ERG), OGTT, HEGC, Western blot

Angol tárgyszavak: retina, diabetes mellitus, diabetic retinopathy, ischemia-reperfusion, Goto-Kakizaki (GK) rat, Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat, BGP-15, glibenclamide, metformin, pioglitazone, electroretinography (ERG), OGTT, HEGC, Western blot

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Szilvássy Zoltánnak (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet), hogy lehetővé tette munkám elvégzését az általa vezetett intézetben.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Varga Balázs egyetemi adjunktusnak (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet), hogy kísérletes munkámat végigvezette, továbbá, hogy mindvégig támogatott és biztatott és így új lendülettel és lelkesedéssel tudtam tovább folytatni. A PhD-képzésem alatt és disszertációm írása közben is mindig jókor és jó időben iránymutatást adott, amikor kellett.

Köszönetemet fejezem ki a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden munkatársának, különösképpen Szegváriné Erdős Andreának és Oláh Krisztinának.

Köszönöm családomnak, férjemnek, Bécinek, aki végig mellettem volt, támogatott és bármiben számíthattam rá, kislányaimnak, Zizinek, Jazinak és Hannának, valamint édesanyámnak a kitartó türelmüket és szerető támogatásukat!

Köszönöm barátaimnak a velük kikapcsolódással, feltöltődéssel eltöltött időt!

A kutatás a GINOP-2.3.4-15-2020-00008 Komplex Egészségipari Multidiszciplináris Kompetencia Központ kialakítása a Debreceni Egyetemen új innovatív termékek és technológiák fejlesztése érdekében c. pályázat keretében valósult meg. A kutatást támogatták továbbá a GINOP-2.3.4-15-2016-00002, GINOP-2.3.2-15-2016-00043, TKP2020-IKA-04,TKP2020-NKA-04, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, valamint az NKFIH-1150-6/2019 azonosító számú pályázati projektek.

10. Fűggelék