

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Kurucz Andrea

**A hemoxigenáz-1 természetes eredetű
induktorainak hatása időskori demencia
és Zucker Diabetic Fatty (ZDF)
patkánymodellekben**

**DEBRECENI EGYETEM
TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2019.**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A hemoxigenáz-1 természetes eredetű
induktorainak hatása időskori demencia
és Zucker Diabetic Fatty (ZDF)
patkánymodellekben**

Dr. Kurucz Andrea

TÉMAVEZETŐ: Dr. Juhász Béla



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2019.**

„Az értelem a tett. Akkor veszíted el az értékedet, ha lemondasz a változtatásról és a tapasztalatról. Hatalmadban áll választani: válassz valamit, és szenteld neki magad. A tettek adnak célt és reményt.”

/Christopher Paolini/

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	1
2. Bevezetés és célkitűzés	3
3. Irodalmi áttekintés	5
3.1. <i>A diabetes mellitus</i>	5
3.1.1. A diabetes mellitus általános jellemzése, prevalenciája	5
3.1.2. A diabetes mellitus csoportosítása	6
3.1.3. A 2-es típusú diabetes mellitus pathogenesis	8
3.1.4. A 2-es típusú diabetes mellitus jelenlegi terápiája	13
3.2. <i>Az Alzheimer-kór</i>	16
3.2.1. Az Alzheimer-kór általános jellemzése, prevalenciája	16
3.2.2. Az amyloid kaszkád hipotézis	18
3.2.3. Az Alzheimer-kór diagnózisa és jelenlegi terápiája	24
3.3. <i>A hemoxigenáz rendszer</i>	25
3.3.1. A hemoxigenáz szervezetben betöltött szerepe	25
3.3.2. A hemoxigenáz gyógyszeres indukciója	27
3.3.3. A testmozgás hatásai	28
4. Anyagok és módszerek	31
4.1. <i>Kísérleti állatok</i>	31
4.2. <i>Kísérleti elrendezés</i>	31
4.3. <i>Okuláris ischaemia/reperfusio</i>	32
4.4. <i>Electroretinographia</i>	33
4.5. <i>Orális glükóz tolerancia teszt</i>	33
4.6. <i>Hemoxigenáz-1 koncentráció mérése</i>	34
4.7. <i>Histologiai vizsgálat</i>	34
4.8. <i>Morris water maze teszt</i>	35
4.9. <i>Kisállat pozitron emissziós tomográfia</i>	36
4.10. <i>Hemoxigenáz-1 aktivitásmérés</i>	37

4.11.	<i>Statisztikai analízis</i>	37
5.	Eredmények	38
5.1.	<i>Éhomi plazma glükózsztint analízis és orális glükóz tolerancia teszt eredmények</i>	38
5.2.	<i>Electroretinographia</i>	39
5.3.	<i>Hemoxigenáz-1 koncentráció</i>	41
5.4.	<i>Kognitív funkciók eredmények</i>	42
5.5.	<i>In vivo pozitron emissziós tomográfia vizsgálattal azonosított agyi eltérések</i>	43
5.6.	<i>Szöveti eredmények</i>	45
5.6.1.	Retina	45
5.6.2.	Hematoxylin-eosin és Kongó vörös festéssel detektálható agyi elváltozások	46
5.6.3.	Immunhisztokémia	49
5.7.	<i>Hemoxigenáz-1 aktivitás</i>	50
6.	Megbeszélés	52
7.	Összefoglalás	60
	<i>Summary</i>	61
8.	Irodalomjegyzék	63
9.	Tárgyszavak	79
10.	Köszönetnyilvánítás	80

1. Rövidítések jegyzéke

A β	amiloid- β
Ach	acetil-kolin
AD	Alzheimer's disease (Alzheimer-kór)
APOE	apolipoprotein E
APP	amyloid prekursor protein
ARF	aged running female (idős futó nőstények)
ARM	aged running male (idős futó hímek)
AS	aged sedentary (idős ülők)
ASF	aged sedentary female (idős inaktív nőstények)
ASM	aged sedentary male (idős inaktív hímek)
BACE-1	β -szekretáz-1
BDNF	brain-derived neurotrophic factor (agyi-eredetű neurotrofikus faktor)
BR	Bilirubin
BVR	biliverdin-reduktáz
CDK5	ciklin-dependens kináz 5
CO	szén-monoxid
DAG	diacil-glicerol
DM	diabetes mellitus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzimkapcsolt immunoszorbens esszé)
ERG	Electroretinographia
FFA	free fatty acid – szabad zsírsav
GCL	ganglion cell layer (ganglion sejtréteg)
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry (gáz kromatográfia – tömeg spektrometria)
GSK3	glikogén-szintáz kináz 3
HO-1	hemoxigenáz-1 enzim
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia)
IFN- γ	interferon- γ
IL-6	interleukin-6
ILM	inner limiting membrane (belső limitáló membrán)
S-1	inzulin receptor szubsztrát-1

I/R	ischaemia/reperfusio
LPS	Lipopoliszacharid
LRP-1	low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (alacsony molekulatömegű lipoprotein receptorhoz kapcsolt fehérje)
MWM	Morris water maze
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NEP	Neprilizin
NFK	neurofibrilláris köteg
NIH	National Institute of Health (Nemzeti Egészségügyi Intézet, USA)
OGTT	orális glükóz tolerancia teszt
PBS	foszfát-puffer
PET	Pozitron Emissziós Tomográfia
PFK	Phosphofruktokináz
PGC-1 α	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma koaktivátor 1-alfa
PIB	Pittsburgh Compound B (Pittsburgh Komponens B)
PKC	protein kináz C
PSEN1, 2	preszenilin 1, 2
RPE	retinal pigment epithel (retinális pigment epitél)
sAPP α	solubilis amyloid prekursor protein
SCSE	sour cherry seed extract (meggy-mag-kivonat)
SEM	standard error of the mean (az átlagérték standard hibája)
SGLT-2	(sodium-glucose linked transporter 2) nátrium-glükóz ko-transzporter 2
SIRT-1	sirtuin-1
SnPP	cink protoporfirin
SOCS	suppressor of cytokine signaling (citokin szignalizációt gátló protein)
STZ	Streptozotocin
SUV	standardized uptake value (standardizált felvett érték)
TNF- α	tumor necrosis factor-alfa
VEGF	vascularis endothelialis növekedési faktor
ZDF	Zucker Diabetic Fat (Zucker diabeteses elhízott) patkánymodell

2. Bevezetés és célkitűzés

A demográfiai viszonyok megváltozása – elsősorban az emelkedő várható élettartam, valamint a fejlett országok növekvő életszínvonala – a társadalom elöregedésével, valamint az időskorral és életmóddal asszociált pathológiás állapotok – mint például a demencia és cukorbetegség – növekvő incidenciájával jár, egyre nagyobb terhet róva ezzel a társadalmakra [1, 2].

A 2-es típusú cukorbetegség, valamint a sporadikus Alzheimer-típusú demencia két gyakori, életmóddal és életkorral összefüggő, az életminőséget jelentősen rontó rendellenesség. Közös jellemzőjük a metabolikus állapottal való szoros kapcsolat, a vascularis rendellenességek, valamint az oxidatív stressz szerepe, melyek együttes következménye kiterjedt sejtpusztulás, ezáltal súlyos mentális és fizikális károsodás [3, 4]. Az utóbbi évek tudományos közleményei a cukorbetegséget az Alzheimer-kór kialakulásának fontos kockázati tényezőjeként említik, mivel az agy rendellenes cukorháztartása, valamint a cukorbetegség következtében kialakult teljes tesetet érintő gyulladás szerepet játszik a neuronok károsodásában, ezáltal kutatásunk két területe szorosan összekapcsolódik [5].

A diabetes mellitus időskorban gyakran kialakuló szövődménye a diabeteses retinopathia [1], valamint a retinális érelzáródás [6], melyekben a magas glükózsztint és a következményesen károsodott mikrocirkulációs kapacitás, valamint az ischaemia/reperfusio (I/R) fontos tényezők. A fitonutriensek – növényekben található egészségjavító vegyületek – táplálkozással történő bevitele jelentősen csökkentheti a komolyabb betegségek kialakulásának kockázatát, valamint javíthatja a terápia hatékonyságát, ezáltal a betegség kimenetelét [7-10], még a szemet ért károsodások esetén is [3]. Kutatócsoportunk tagjai korábban már végeztek kísérletet a flavonoidban gazdag meggy-mag-kivonattal (*Prunus cerasus*) (SCSE), mely manapság egy egyre népszerűbb funkcionális élelmiszer [11]. Analitikai mérések széles skálája szerint, beleértve a gáz-kromatográfia-tömeg-spektrometrát (GC-MS) és nagy teljesítményű folyadékkromatográfiát (HPLC), a SCSE összetevői között számos bioaktív vegyület szerepel, mint a dihidro-p-kumarinsav, ferulasav, kávéssav, cianidin, peonidin, szkvalén, β -tokoferol, γ -szitoszterol és E-vitamin, melyeknek a SCSE protektív, antioxidáns kapacitását köszönheti [12].

Az Alzheimer-kór egy progresszív neurodegeneratív megbetegedés, melynek prevalenciája az életkorral növekszik, és 8-10 év alatt a páciensek teljes kognitív hanyatlását eredményezi. A sporadikus megjelenési forma lényegesen gyakoribb (kb. az esetek 95%-a), mint a familiális

változat, azonban mindkét forma neuropathológiailag nagyfokú extracelluláris amyloid- β felhalmozódással és intraneuronális tau-fehérje kötegek megjelenésével jellemezhető [13]. Az Alzheimer-kór pontos pathomechanizmusa és kiváltó okai a mai napig nem teljesen tisztázottak, azonban az időskorral együtt járó metabolikus változások – mint amilyen az elhízás, inzulinrezisztencia és mozgásszegény életmód – és neuropathológiai elváltozások – mint az idegrendszeri gyulladás, oxidatív stressz, valamint a mikrotubulus asszociált tau fehérje hyperphosphorilatioja és funkcióvesztése –, illetve ezen tényezők által együttesen okozott neuronpusztulás szerepe vitathatatlan [14].

A hemoxigenáz-1 enzim (HO-1), amely HSP-32-ként is ismert, kulcsszerepet játszik az oxidatív stressz által indukált pathológiás folyamatok enyhítésében, többek között cardiovascularis,- tüdő,- neurológiai- és vesebetegségekben [15-18]. Több kutatás is demonstrálta korábban, hogy a HO-1 enzim aktivitásának gyógyszeres vagy természetes hatóanyagok, esetleg rendszeres fizikai aktivitás általi fokozása mérsékelheti az oxidatív stressz által okozott szervi károsodásokat [19-21]. A Debreceni Egyetem kutatóinak korábbi munkái pedig azt bizonyítják, hogy a fitonutriensek terápiás potenciállal bírhatnak a diabeteshez asszociált vascularis károsodások tekintetében: Bak és mtsai [22], majd pedig Czompa és mtsai [23] demonstrálták a SCSE védő hatását I/R által károsított myocardiumban; Juhász és mtsai [7] megerősítették ezt a cardioprotectiv hatást hypercholesterinaemiás nyulakban; Szabó és mtsai [24] bizonyították védő szerepét I/R-s sérülést szenvedett retinában. A kivonatot toxikológiailag is vizsgálták [25], lehetővé téve ezzel a SCSE humán tanulmányokban történő alkalmazását [26, 27]. Ezek az eredmények rendkívül biztatóak, és a SCSE-t jövőbeli gyógyszerfejlesztések és kutatások potenciális jelöltjévé teszik.

Kutatásunkban egyrészt a SCSE glükózsztintre, valamint az állatok retinafunkciójára gyakorolt hatását vizsgáltuk ZDF patkánymodellben, másrészt tanulmányoztuk a rendszeres fizikai aktivitás befolyását az időskorral asszociált Alzheimer-típusú demencia kognitív és neuropathológiai eltéréseire. Mindkét vizsgálat sorozat esetében szeretnénk volna a molekuláris hátteret is felderíteni. Azt volt a hipotézisünk, hogy mindkét betegség esetében az oxidatív stressz ellenes védekezőrendszernek, azon belül is a HO-1 rendszernek lehet kulcsfontosságú szerepe, ezért mértük a HO-1 koncentrációját és aktivitását is.

3. Irodalmi áttekintés

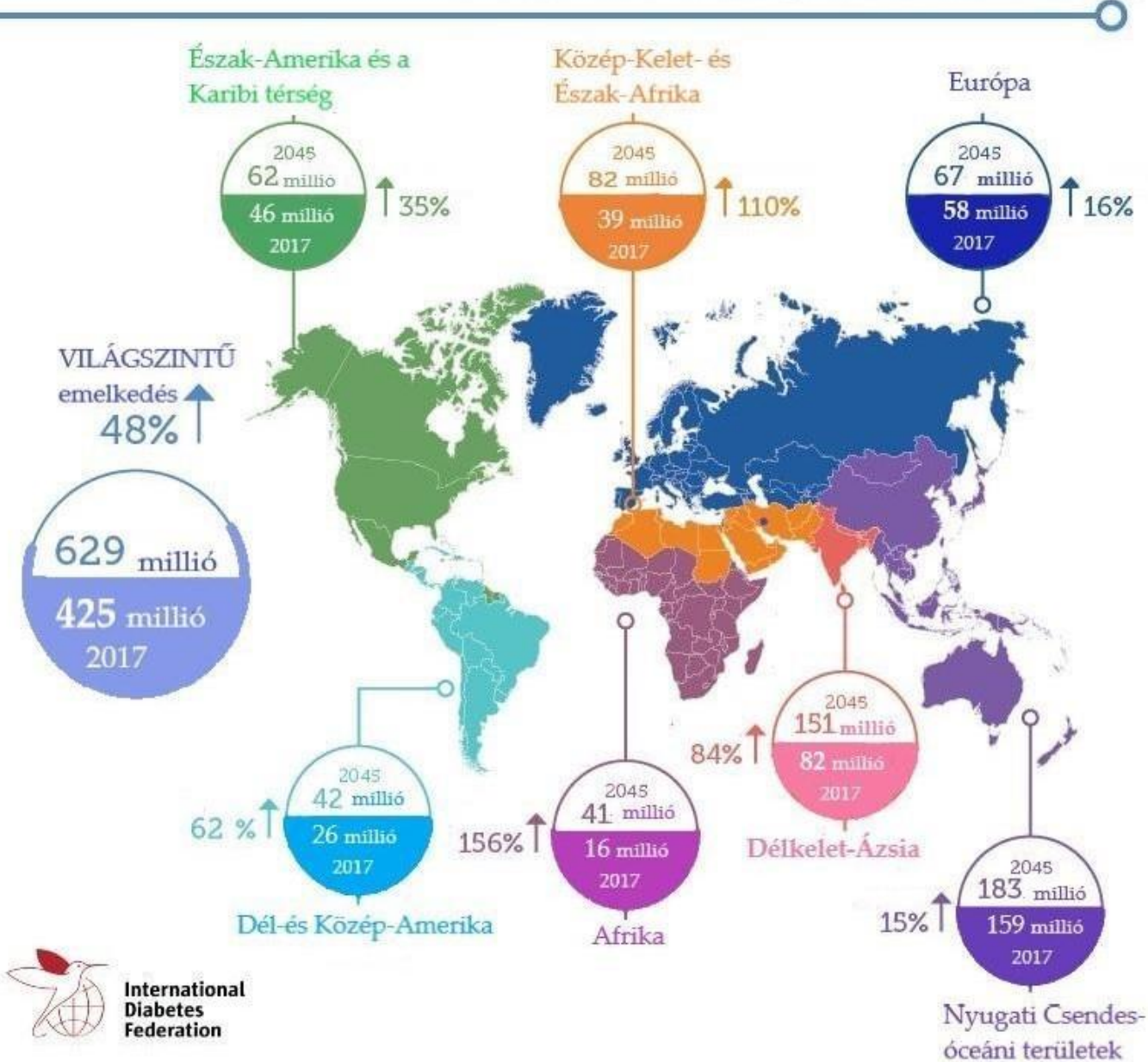
3.1. A diabetes mellitus

3.1.1. A diabetes mellitus általános jellemzése, prevalenciája

A diabetes mellitus az egyik legnagyobb méretű epidémia, amivel a világnak valaha szembe kellett néznie. A betegség rendkívül széles kategóriát jelent, melynek tagjai olyan kórképek, amiket a krónikus hyperglycaemia által okozott pathológiás eltérések és tünetek jellemeznek [28]. Leggyakoribb formái az 1-es, 2-es típus, valamint a gestatio diabetes, de a fentiekén kívül számos ritkábban előforduló variánsa is ismert. A Nemzetközi Diabetes Szövetség szerint a betegség globális prevalenciája 2017-ben 425 millió fő volt, ami 2045-re várhatóan 629 millióra fog emelkedni (1. ábra). Az előfordulás az idős populációban közel megkétszereződött 1980 óta (4,7%-ról 8,5 %-ra) [29]. A WHO 2016-os jelentése szerint 2012-ben 3,7 millió haláleset történt a diabetesnek köszönhetően, melyek 43 %-a a betegek 70 éves kora előtt következett be. A kórképnek számos komplikációja lehet, melyek a test bármely részén előfordulhatnak, és hozzájárulnak a korai halálozáshoz vagy életminőségromláshoz. Ilyen másodlagos pathológiás eltérések a szívinfarktus, stroke, veseelégtelenség, látásvesztés, végtagi érkárosodás és következményes amputáció, valamint a különböző idegrendszeri bántalmak. A DM és komplikációi jelentős terhet rónak a betegeken kívül a társadalmakra is, egyrészt a közvetlen egészségügyi kiadások révén, másrészt a betegség következtében elvesztett munkaerő vagy csökkent termelőképesség révén.

Diabetesben szenvedő emberek száma a világon

2017-ben és 2045-ben (20-75 éves korosztály)

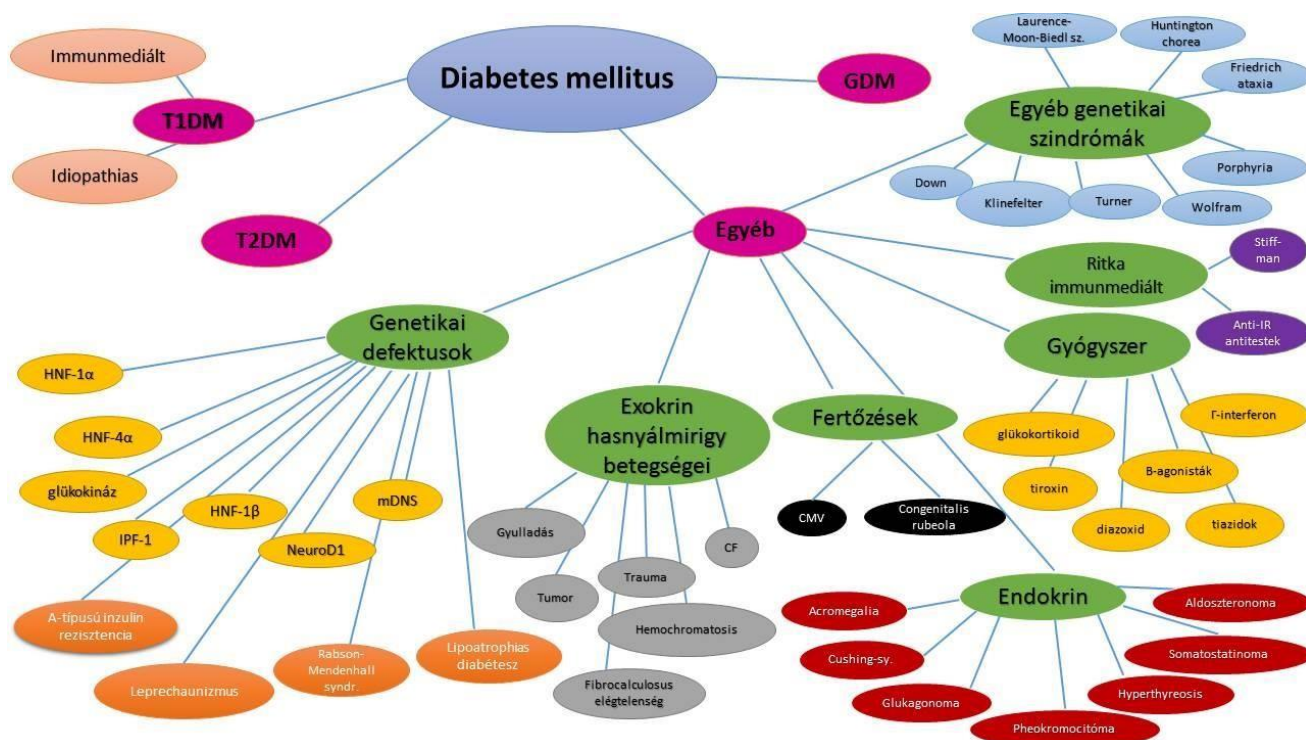


1. ábra. A diabetes mellitus 2017-es globális prevalenciája [29].

3.1.2. A diabetes mellitus csoportosítása

A DM-t hagyományosan 3 csoportba sorolják, az 1-es típus az autoimmun eredetű hasnyálmirigy β -sejt destrukció következtében kialakult inzulinhiány eredménye, a 2-es típus az inzulinrezisztenciával és metabolikus szindróma jeleivel járó állapotok gyűjtőneve, míg a 3-as típus terhesség során alakul ki. Ma már ez a klasszifikáció meghaladott. A diabetes

etiológiai beosztása az elmúlt pár évtizedben egyre szélesebbé vált, mióta rájöttek, hogy több különböző, egymással átfedő mechanizmus vezethet diabeteshez, és hogy ezek a mechanizmusok genetikai és környezeti tényezők befolyása alatt állnak [30].



2. ábra. A diabetes mellitus etiológiája. T1DM: 1-es típusú diabetes mellitus; T2DM: 2-es típusú diabetes mellitus; GDM: gestatio diabetes mellitus; HNF: hepatocita nuclearis faktor; IPF: inzulin promotor faktor; mDNS: mitokondriális DNS; CF: cysticus fibroszis; CMV: citomegalovírus; IR: inzulin receptor [30].

A diabetes lehet a β -sejtek destrukciójának következménye, ami általában autoimmun hatás eredménye, és inzulinhiány jellemzi. Kisebb mértékű inzulinhiány fordul elő a hasnyálmirigy-gyulladás kapcsán kialakuló diabetesben. A monogénes formák (MODY – maturity onset diabetes of the young, fiatalokorúak későn kialakuló diabetes) genetikai defektusainak azonosítása (pl.: HNF-1 α , glükokináz, IPF-1) lehetővé tette egy újabb típusú inzulinhiány felismerését, amelyet vagy az inzulintermelésnek vagy a β -sejtek túlélésének zavart kontrollja okoz, de ezek a betegek mindenképpen elégtelen módon reagálnak az emelkedett plazma glükóz-koncentrációra [31]. A károsodott szabályozás az újszülött kori és mitokondriális eredetű diabetesben is szerepet játszik. Habár a 2-es típusú diabetesben szenvedő betegek rendszerint nagy mennyiségű inzulint termelnek, az inzulinérzékenység- és termelés nincs egyensúlyban, és a fokozott mennyiségű hormon sem tud eleget tenni az elhízás és

inzulinrezisztencia miatt megnövekedett szükségleteknek [32]. A 2. ábra alapján látható, hogy milyen szerteágazó a diabetes mellitus etiológiai csoportosítása, és bár számos oka lehet ennek a patológiás állapotnak, elmondható, hogy valamennyi típus végeredménye a béta sejtek dysfunctioja. A hagyományos etiológiai klasszifikációból jól ismert az 1-es, 2-es és gestatiós diabetes típus, újdonságot az ún. „egyéb” kategória jelent. Számos genetikai defektus vezethet a β -sejtek defektusához (pl.: HNF-1 α , HNF-1 β , IPF, glükokináz), melyeknek következménye elégtelen cukoranyagcsere. A pancreas exokrin működésének károsodása (pl. gyulladás, tumor, haemochromatosis) szintén diabetest eredményez. Különböző fertőzések (pl. CMV), valamint endokrin betegségek (pl.: acromegalia, Cushing-sy, hyperthyreosis) is vezethetnek diabetes kialakulásához. Bizonyos gyógyszerek (pl. tiroxin, glükokortikoidok, β -agonisták), a cukorháztartás felborításán keresztül képesek diabetest provokálni. Ritkább esetekben immunmediált β -sejtkárosodás (pl. anti-IR antitestek termelődése) vagy ritka genetikai szindrómák (pl. Turner-, Klinefelter-, Down-sy) következtében alakul ki cukorbetegség. Az etiológia tisztázása fontos lehet a prognózis megállapítása, illetve a terápia helyes beállítása szempontjából.

3.1.3. A 2-es típusú diabetes mellitus pathogenesisise

Normál glükóz-homeosztázis esetén a 10-12 órás éjszakai éhezés során a teljes plazma glükóztartalom legnagyobb részét inzulin-független szervek hasznosítják, kb. 50%-ot az agy, 25%-ot a máj és gastrointestinalis traktus, a maradék 25%-ot pedig olyan inzulin-függő szervek, mint az izomszövetek veszik fel [33-35]. Ebben az időszakban a plazma glükóz kb. 85%-át a máj, 15%-át pedig a vese szolgáltatja, glikogenolízis és glükoneogenezis segítségével [36]. Étkezés után, az emelkedett glükózsztint serkenti az inzulin kiáramlást a hasnyálmirigyből, amelynek kettős feladata van: (i) a szervek és szövetek (máj, bélrendszer, izomszövet) glükózfelvételének stimulálása és (ii) az endogén glükóztermelés csökkentése. A cukor legnagyobb részét (80-85 %) az izomszövet veszi fel, míg a zsírszövetben csak egy kis része (4-5%) metabolizálódik [37-39]. Habár a zsírszövet a teljes plazma glükóz tartalomnak csak csekély hányadát veszi fel, jelentős szerepe van a glükóz-homeosztázis fenntartásában. Az inzulin potensen gátolja a lipolízist, csökkentve ezzel a plazma szabad zsírsav (FFA) koncentrációját [40]. A csökkent plazma FFA serkenti az izmok glükózfelvételét, és hozzájárul az endogén glükóztermelés gátlásához [41].

2-es típusú diabeteses betegek esetében számos tényező hozzájárul a magas plazma

glükózsztint kialakulásához (3. ábra). Az egyik legfontosabb metabolikus eltérés, hogy az éhezés során működő alap hepatikus glükóztermelés jelentősen fokozott, mely a legfontosabb tényező az éhomi hyperglycaemia kialakításában, és arányos annak mértékével [42-44].

Különböző kutatások igazolták, hogy a diabeteses betegek éhomi plazma inzulin koncentrációja 2-4-szer olyan magas, mint az egészséges emberek inzulinszintje. Mivel normál esetben az inzulin potens gátlószere a hepatikus glükóztermelésnek, de a betegek szervezetében egyértelmű hatáscsökkenés tapasztalható (erre utal az inzulin dózis-hatás görbéjének jobbra tolódása), a diabetes kapcsán máj eredetű inzulin rezisztenciáról kell beszélnünk, amely okozója lehet a fokozott cukortermelésnek [45, 46]. További mechanizmusok, melyek hozzájárulnak az emelkedett glükóztermeléshez: magas glukagon szint [47], emelkedett érzékenység a glukagon iránt [48], a glükoneogenezis prekursorainak (laktát, alanin, glicerol) magas szintje a vérben [49], valamint az emelkedett FFA oxidáció [50].

Számos tanulmány rávilágított a központi idegrendszer, valamint a vese éhomi hyperglycaemiában betöltött fontos szerepére is. Annak ellenére, hogy az agy inzulin-független szerv, a harmadik agykamrában található inzulinreceptorok, és aktiválásuk csökkenti a perifériás glükóztermelést, míg ugyanezen receptorok gátlása vagy csökkent működése megakadályozza a periférián keringő inzulin glükózsztint csökkentő hatását [51]. A vese legfontosabb szerepeként a hyperglycaemia fenntartását említik, amely abból ered, hogy a proximális tubulusba érkező emelkedett cukorterhelés hatására a nátrium-glükóz kótranszporter (SGLT2) rendszer fokozza a visszazívó kapacitását – az SGLT-2 csatornák számának emelésével, illetve működésének serkentésével – [52].

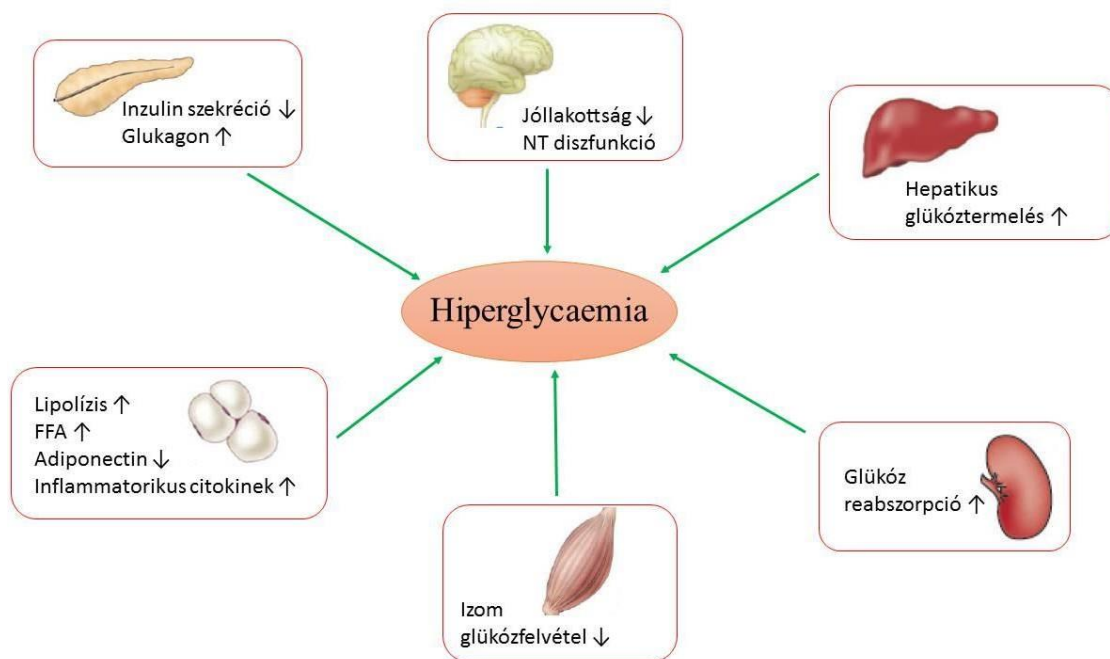
A másik fontos metabolikus eltérés a perifériás szövetek, különösen az izomszövetek inzulinra adott csökkent válasza. Normál körülmények között a plazma inzulinkoncentrációjának emelkedésekor az izmok glükózfelvétele lineárisan emelkedik, azonban 2-es típusú diabetesben a hormon hatása kb. 40 perccel később alakul ki, illetve nem képes olyan mértékben fokozni az izmok glükózfelvételt, mint egészséges egyéneknél, így a fent említett pathológiás eltérés a másik legfontosabb hyperglycaemiáért felelős tényező – a hepatikus glükóz-túlprodukciónak mellett – [34].

Az inzulin szekréció és inzulin érzékenység között dinamikus összefüggés van a betegség során. A betegség kezdetén magas inzulinsztint jellemzi a betegeket, majd a kór progrediálása során a plazma glükózsztint folyamatosan emelkedik, az inzulinsztint pedig fokozatosan

csökken. Ennek oka, hogy a kezdeti perifériás szöveti inzulin rezisztencia miatt megemelkedett glükózsztint kompenzálása céljából a hasnyálmirigy β -sejtjei több inzulint termelnek. Ez az emelkedett mennyiségű inzulin kezdetben képes közel normál szinten tartani a szervek glükóz-toleranciáját, azonban az idő előrehaladtával már nem tudja kompenzálni a hormonhatásban bekövetkezett csökkenést. A folyamat eredményeképpen a β -sejtek egyrészt kimerülnek, másrészt a magas glükózsztint következtében direkt károsodást is szenvednek. A β -sejtek dysfunctioja az egyik legfontosabb pathogenetikai eltérés a 2-es típusú diabetes kialakulásában, melyet számos tanulmány igazolt korábban [53-55].

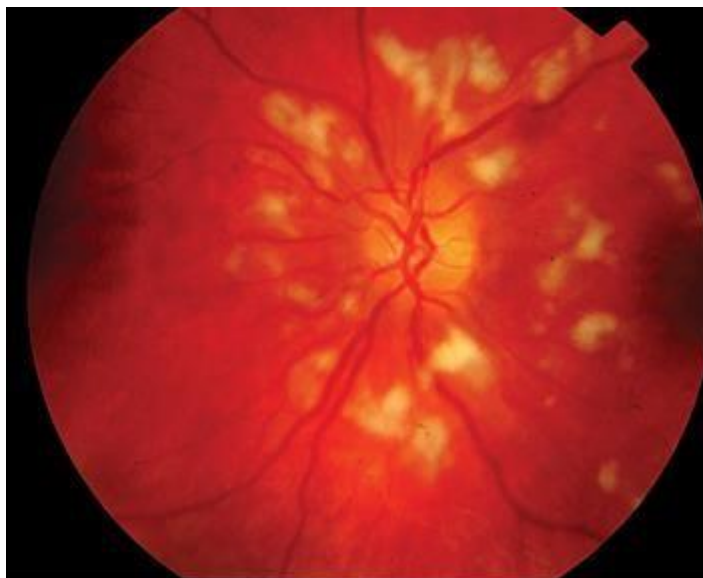
Az is köztudott, hogy a T2DM kialakulásában fontos szerepe van az elhízásnak, mivel a krónikusan magas szabadzsírsav koncentráció a plazmában hepatikus és izomszöveti inzulin rezisztenciát okozhat [56, 57]. Az izmokban és májban található trigliceridek folyamatos átalakulásban vannak, és az intracelluláris FFA metabolitjai (mint pl.: zsírsav eredtű acetyl-coenzim A) gátolják az inzulin hatását (ezt nevezik lipotoxicitásnak) [58]. Az intenzív zsírsavoxidáció mellett, hogy emeli az acetyl-KoA koncentrációját – amely a piruvát dehidrogenáz potens inhibitora –, emeli a NADH/NAD arányt – lelassítva ezzel a Krebs-ciklust –, illetve emeli a citrát intracelluláris koncentrációját, amely erősen gátolja a phosphofruktokináz (PFK) enzimet. A PFK gátlása a glükóz-6-foszfát felhalmozódásával jár, amely gátolja a hexokináz enzimet. A glükóz foszforilálódásának gátlása pedig magas intracelluláris szabad glükózsztintet eredményez, amely hátráltatja a további sejtbe történő felvételt. Az eseményeknek ezt a sorát Randle-ciklusnak nevezik [59]. Ehhez a folyamathoz társul az a patológiás eltérés, melyet először Felber és mtsai írtak le, mégpedig hogy diabeteses egyéneknél az étkezés után megemelkedő inzulin nem képes a zsírsavoxidációt olyan mértékben gátolni, mint egészséges emberekben, ezáltal tovább nő a FFA koncentráció, fokozva az inzulin rezisztenciát [60, 61]. A plazma emelkedett FFA-tartalma növeli az izmokban található diacylglycerol (DAG) mennyiségét, az acetyl-KoA mellett. Mind a hosszú láncú zsírsav acetyl-KoA, mind pedig a DAG képes aktiválni a PKC tétát, amely fokozza az inzulin receptor szubsztrát-1 (IRS-1) molekula szerin foszforilálódását, ezáltal gátolja annak fiziológiás tirozin foszforilálódását, így a funkcióját, hozzájárulva ezzel az inzulinrezisztenciához [62]. A FFA-król bebizonyosodott, hogy szerepük van a máj glükóztermelésének fokozásában is, a piruvát karboxiláz és phosphoenolpiruvát karboxikináz, a glükoneogenezis sebesség meghatározó enzimjeinek aktiválásán keresztül [63]. A zsírszövetből nagy mennyiségű gyulladáscsökkentő citokin is felszabadul (pl.: TNF- α , IL-6), melyek tovább rontják a perifériás inzulin rezisztenciát. A TNF- α serkenti a lipolízist, ezáltal növeli a

plazma FFA koncentrációját, illetve negatívan szabályozza az inzulin szignalizációt [64], az IL-6 pedig a máj inzulin érzékenységét csökkenti a SOCS-3 protein expressziójának fokozása révén [65]. Amíg a FFA és gyulladáshoz vezető mediátorok szintje nő elhízás során, addig a zsírszövetből felszabaduló adiponectin mennyisége csökken. Az adiponectin az AMP kinázon keresztül számos metabolikus folyamatot befolyásol, mint pl.: csökkenti a máj glükoneogenezisét, fokozza az izmok glükózfelvételét és zsírsav oxidációját, valamint gátolja a lipolízist, így összességében inzulin érzékenyítő hatással bír [66, 67].



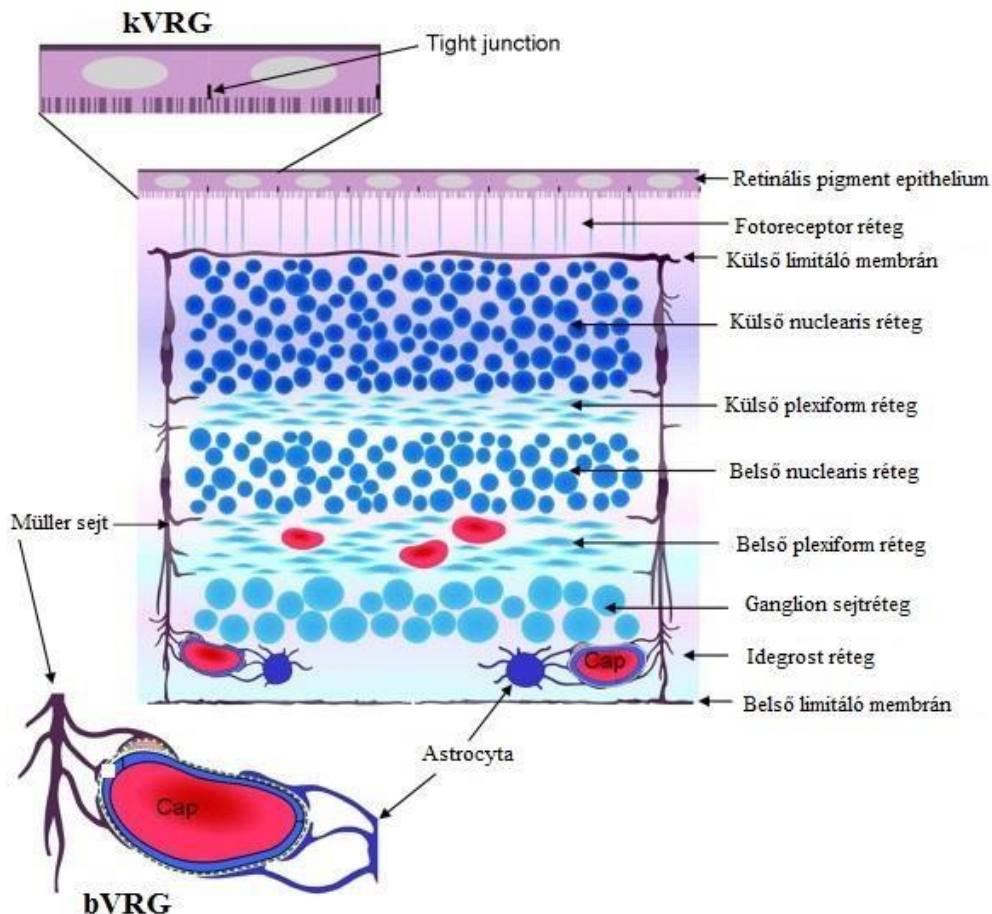
3. ábra. A hyperglycaemiát előidéző tényezők 2-es típusú diabetesben [68].

A diabetes mellitusban jelen lévő magas glükózsztint és a fokozottan glikozilált végtermékek a retinális erek szűkülését és permeabilitásuk növekedését, a bazális membrán megvastagodását, valamint a pericyták apoptózisát okozhatják, ezáltal a retina károsodásához vezethetnek [69, 70]. A diabeteses retinopathia a nyugati világban még mindig a leggyakoribb oka a felnőttkori vakságnak, és egyre gyakoribb a fejlődő országok lakosságának körében is, a növekvő életszínvonalal társuló diabetogén táplálkozásnak köszönhetően [71]. Az állapot diagnózisa a retinális erek státuszának megfigyelésén alapul. Rendszerint az első felismerhető jelek: a microaneurysmák és pontszerű vérzések, melyeket súlyosabbak követnek, mint például a nagyfokú permeabilitásnak köszönhető exsudátumok (plazma lipidek kiáramlása), nagyobb vérzések – úgynevezett „cotton wool spot”-ok –, valamint neovascularisatio [72].



4.ábra. Cotton wool spot-ok a retinán, diabetes következményeként [73].

A ganglionsejtek, illetve az idegrostok rétegének degenerációja szintén jellegzetes pathológiás következmény. A kórállapot kialakulásában nagy szerepe van a retinális ischaemia/reperfusionnak, mely a neurális sejtek károsodását, gyulladásos reakciót és vér-retina gát változásokat eredményez [74, 75]. Celluláris szinten a retinális ischaemia általi károsodás egy önfenntartó destruktív folyamat, mely az oxigén- és tápanyagellátás elégtelensége miatt kezdődik el, és magába foglalja a neuronok depolarizációját, kalcium beáramlást és oxidatív stressz kialakulását, melyek végeredményeként a retina szöveve súlyosan károsodik [76]. A vér-retina gát megváltozása vascularis hyperpermeabilitást és következményes ödémát okozhat, amely látásvesztést eredményezhet [77]. A vér-retina gátnak fontos szerepe van a retina homeosztázisának fenntartásában. Belső és külső komponensekből épül fel (5.ábra). A belsőt a kapillárisok endothelsejtjeinek tight junction-jei képezik, míg a külsőt a retinális pigment epithel hámsejtjeinek tight junction-jei. Astrocyták, Müller sejtek és pericyták járulnak még hozzá a megfelelő működéséhez. Számos pathológiás állapotban (mint pl. a diabeteses retinopathia, ischaemiás centrális véna occlusio vagy respiratorikus megbetegedések és hypoxia) sérül a gát integritása, valamint olyan káros molekulák szabadulnak fel, mint a NO, reaktív oxigén és nitrogén gyökök (ROS, NOS), valamint vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF). Ez a szerkezeti fellazulás és gyulladásos állapot vascularis permeabilitás fokozódással, valamint következményes vasogen oedemával és szövetkárosodással, végül pedig visuscsökkenéssel jár [78].



5.ábra. Vér-retina gát. kVRG: külső vér-retina gát, bVRG: belső vér-retina gát, Cap: capillaris [78].

3.1.4. A 2-es típusú diabetes mellitus jelenlegi terápiája

A betegek terápiájának megválasztásakor figyelembe kell venni, hogy a diabetes pathogenesisének alapját a perifériás szövetek inzulin rezisztenciája képezi, és elsődleges célunk a páciensek megóvása a hosszú távú következményektől. Ezért fontos, hogy az inzulin rezisztencia mérséklésére is koncentráljunk – ne csak a glükózsint csökkentésére –, amelyet legkönnyebben az életmód megváltoztatásával (fogyás, mérsékelt intenzitású sport és egészséges táplálkozás) tudunk elérni [79].

Az inzulin-érzékenység fokozására alkalmazható gyógyszerek a tiazolidindionok (pl.: pioglitazon), melyek a zsírszövet PPAR γ receptorainak aktiválásán keresztül modulálják a zsírsavanyagcserét és zsíreloszlást, ezen kívül javítják az endothelfunkciót, a dyslipidaemiát, illetve mérséklik a diabetesre jellemző gyulladásos környezetet (csökkentik a keringő TNF- α és IL-6 mennyiségét, ugyanakkor emelik az adiponectin szintjét) [80]. A metforminnal

ellentétben csökkent vesefunkciójú betegek is szedhetik. Leggyakoribb mellékhatásuk a súlygyarapodás, amely valószínűsíthetően a zsírsejtek differenciálódásának elősegítésén és triglicerid raktározásuk serkentésén alapul. Az új szerek kapcsán már nem jelentős a pangásos szívelégtelenséget és szívinfarktust okozó hatás – mit a rosiglitazon esetében, melyet Európában ki is vontak a klinikai gyakorlatból –, de a gyógyszerválasztáskor szem előtt kell tartani ezt az eshetőséget is [81].

A metformin egy nagyon effektív antidiabetikus hatóanyag, mely az első vonalbeli terápiás molekulák között szerepel, és a hasnyálmirigytől függetlenül fejt ki hatását. Csökkenti a máj glükóztermelését, a cukor bélből történő felszívódását, és javítja a szervek inzulin-érzékenységét, ezen kívül tanulmányok igazolták, hogy pozitívan befolyásolja a cardiovascularis komplikációkat. Az inzulinérzékenyítőkkal és szekréciófokozókkal ellentétben nem okoz súlygyarapodást, amely előnyben részesíti ezekkel a molekulákkal szemben [82].

Az α -glükózidáz gátlók (pl.: akarbóz) gátolják a cukor bélrendszerben történő metabolizmusát, ezáltal a felszívódását. Kimutatták, hogy lassítják a diabetes előrehaladását, és a késleltetik a cardiovascularis szövődmények kialakulását. Legfontosabb mellékhatásaik a puffadás és hasmenés, melyek csökkenthetik a terápiahűséget [83].

A szulfanil-urea származékok a hasnyálmirigy β -sejtjeinek sejtfelszíni kálium csatornáit zárják be, ezáltal eredményeznek fokozott inzulinszekréciót. A UK Prospective Diabetes Study szerint csökkentik mind a micro-, mind a macrovascularis komplikációk gyakoriságát [84]. Alacsony glükózszint mellett is kifejtik hatásukat, ebből következik, hogy leggyakoribb mellékhatásuk a hypoglycaemia, mely a hosszú hatástartamú glimepirid és glibenklamid esetében jelentősebb, mint a rövid hatástartamú tolbutamid, gliklazid és glipizid alkalmazásakor. Az újonnan bevezetett meglitinidek (nateglinid és repaglinid) a szulfanil-ureákhoz hasonló hatásmechanizmussal bírnak – a nateglinid a szulfanil-urea-1 receptoron azonos helyre kötődve, mint a szulfanil-ureák, a repaglinid pedig egy közeli másik kötőhelyre –, de mindkét hatóanyagra jellemző, hogy a szulfanil-ureáknál kisebb mértékű hypoglycaemiát okoznak [85].

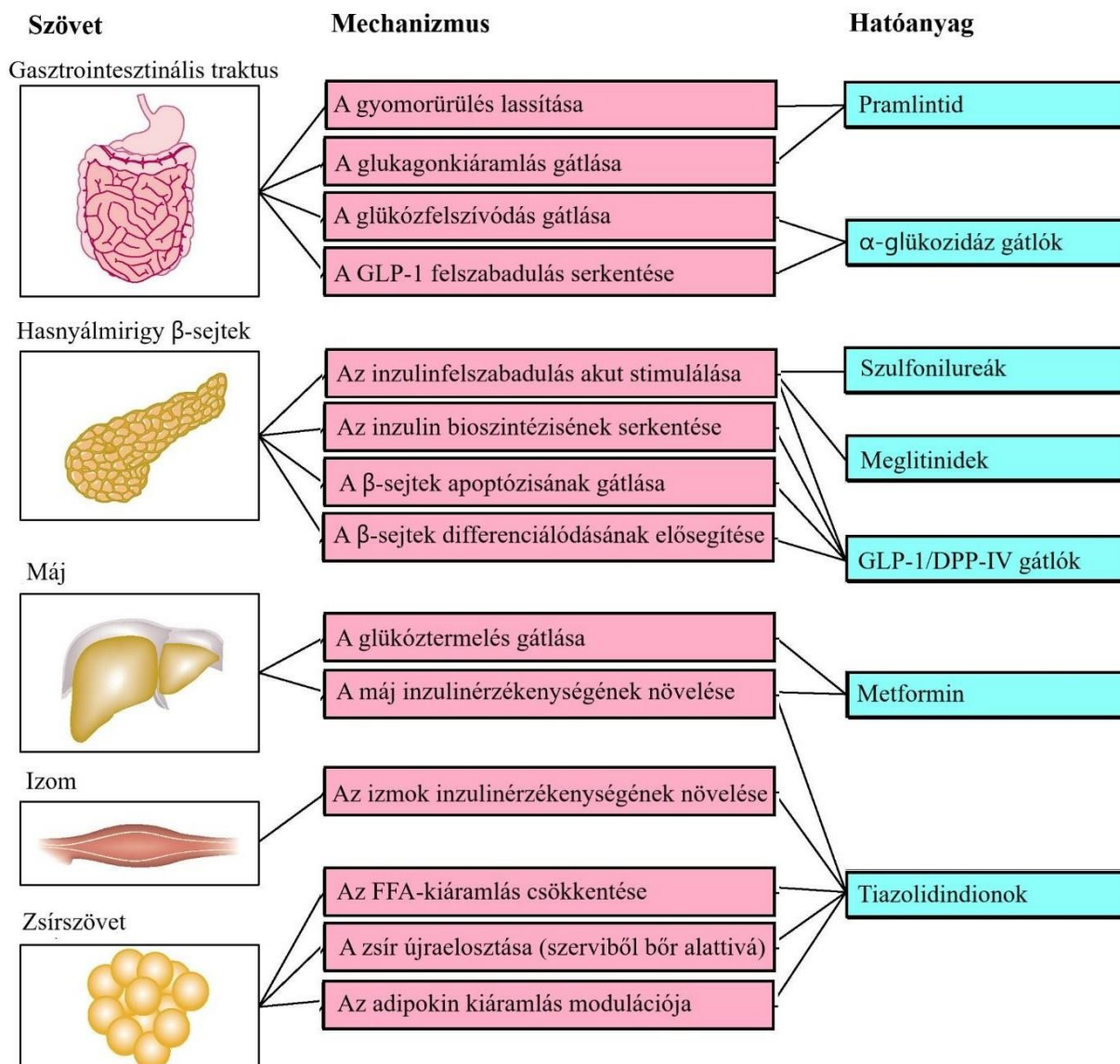
További terápiás lehetőség a vesetubulusokban található SGLT2 receptorok gátlása (pl. empaglifozin vagy dapaglifozin hatóanyagokkal), mely nagyon hatékony glükózszint csökkentő, valamint jótékony cardiovascularis hatásokkal bír, mivel csökkenti a testsúlyt és a vérnyomást. Azon betegek esetében, akiknél a diabetes mellett egyidejűleg cardiovascularis

betegség is fennáll, az SGLT2-gátlók metforminnal kombinálva az elsővonalbeli terápiás lehetőségek közé tartoznak. Leggyakoribb mellékhatásuk a genitourinalis infekciók, melyek kapcsán a személye higiéné és megfelelő antibiotikus terápia fontos. A canaglifozin alkalmazása mellett megemelkedik a végtagtörés és végtagamputáció kockázata, ezért osteoporosisban szenvedő betegek esetében célszerű a másik két hatóanyag valamelyikét választani [86].

Az inzulin exogén pótlása szintén szükségessé válhat, tekintve, hogy a tiazolidindionok és metformin hatásának kifejedéséhez is szükség van inzulinra. Legtöbbször olyan T2DM betegek esetében alkalmazzák, akiknél az oralis terápia nem elégséges a plazma glükózsint megfelelő értéken tartásához. Ezenkívül a kívülről bevitt inzulin hatékony lehet a gyulladós folyamatok mérséklésében, valamint az endothelfunkció helyreállításában is [87].

A T2DM terápiájában a legújabb hatóanyagok az úgynevezett inkretinek. Ide tartoznak a fiziológiás körülmények között a bélrendszerből felszabaduló glukagonszerű peptid-1 (GLP-1) hormon analógjai (pl.: exenatid, liraglutid), melyek potens glükózsint-csökkentő inzulinotróp hatással bírnak, ezen kívül növelik a β -sejtek számát, valamint csökkentik a bélrendszer motilitását. Mindazonáltal a keringésben lévő GLP-1-et a dipeptidil-peptidáz-IV (DPP-IV) nevű enzim szinte azonnal elbontja, ezért ennek az enzimnek a gátlásával (pl.: sitagliptin, vildagliptin) potencírozhatjuk a GLP-1 analógok hatását [88].

A T2DM jelenlegi terápiás eszköztárának összefoglalását a 6. ábra mutatja.



6. ábra. A 2-es típusú diabetes mellitus farmakológiai terápiai lehetőségei a hatás helyének megfelelően. GLP-1: glukagon like peptid-1 (glukagon-szerű peptid-1); DPP-IV: dipeptidil peptidáz-IV.

3.2. Az Alzheimer-kór

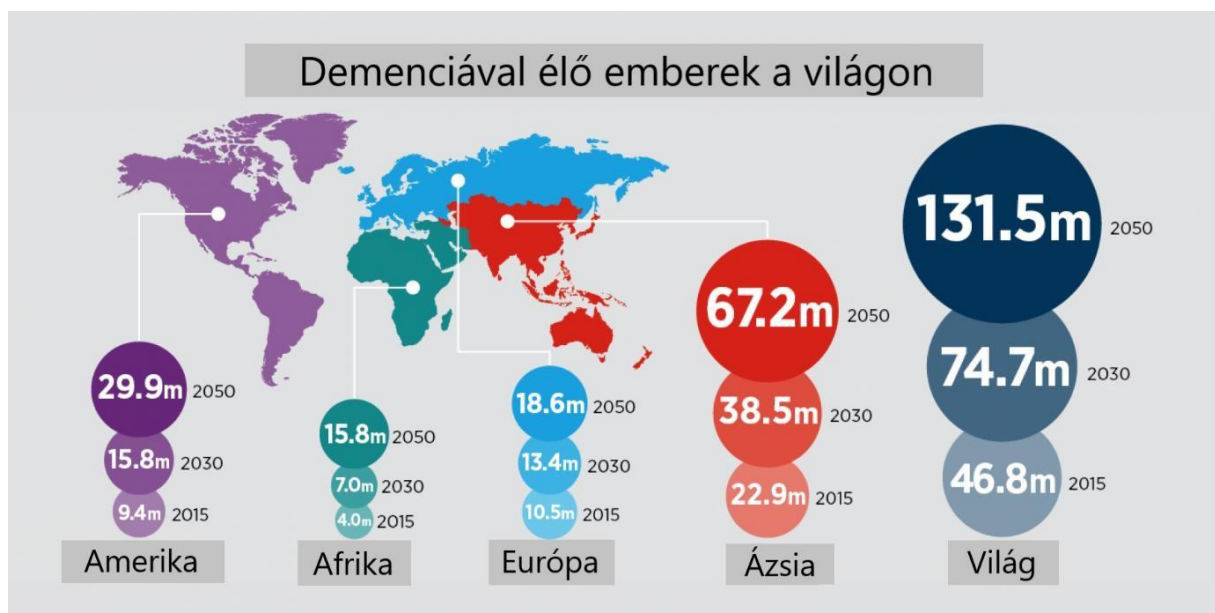
3.2.1. Az Alzheimer-kór általános jellemzése, prevalenciája

Az Alzheimer-kór (AK) egy krónikus, neurodegeneratív betegség, amelyre hosszú (20 év) preklinikai és prodromális stádium és átlagosan 8-10 éves lefolyás jellemző. A betegség a leírójának nevét viseli. Alois Alzheimer (1864-1915) pszichiáter és neuropathológus volt, aki Bajorországban született, és főként Frankfurtban dolgozott. Az ominózus beteggel, az 51 éves Auguste Deterrel (1850-1906) 1901. 11. 25-én találkozott először, akit háziórvosa irányított a neves pszichiáterhez gyenge hosszú távú memória, üldözési mánia, alvászavar és

nyugtalanág miatt. A vizsgálat során Alzheimer megállapította, hogy a hölgy sem térben, sem időben nem orientált, alig emlékszik az életére, és koherencia nélkül beszél. Az első diagnózis arterioscleroticus agykárosodás volt, és gyakori meleg vizes fürdőt javasolt a nyugtalanág, álmatlanság megoldásaként. Majd amikor az asszony 1906. 04. 08-án elhunyt, és Alzheimer szövettanilag megvizsgálta az agyát, akkor figyelt fel a speciális neuropathológiai elváltozásokra. 1911 óta a tankönyvek Alzheimer-kórként említik a „feledékenység betegségét” [89].

Az AK becsült globális prevalenciája 10-30%, éves incidenciája pedig közel 0,5% a 60-65 éves populációban, 1% a 70-75 éves korosztályban, 2% a 75-80 évesek körében, több, mint 3% a 80-85 éveseket tekintve, 85 év felett pedig több, mint 6% [90]. Klinikailag 3 szakaszt különíthetünk el, az enyhe kognitív károsodást (mild cognitive impairment, MCI), a korai Alzheimer-kórt, illetve a késői Alzheimer-kórt. Braak szerint pedig 6 stádiumra osztható a lefolyás, az alapján, hogy a senilis plakkok és neurofibrilláris kötegek az agy mely területeit érintik [91]. A betegek többsége (>95%) asporadikus formában szenved, amelyre jellemző a késői életkorban (80-90 év) történő megjelenés és az amyloid- β fehérje ürítésének elégtelensége, míg a betegek kisebb hányada (<5%) öröklött génmutációkkal rendelkezik, aminek következtében még fiatal korban kialakulnak a kórkép tünetei (~45 év). Manapság lehetőség van az amyloid felhalmozódás kimutatására már a prodromális stádiumban pozitron emissziós tomográfia (PET) és agy-gerincvelői folyadék markerek segítségével, azonban a legpontosabb diagnózist sajnos csak a post-mortem szövettani vizsgálat adhatja. Számos gyógyszer képes valamelyest enyhíteni a betegség tüneteit, de egyik sem képes beavatkozni a pathomechanizmusba, így oki terápiát nem jelentenek [92].

A betegekről történő gondoskodás hatalmas költséget és terhet ró a társadalmakra [93]. A WHO 2003-as jelentése szerint az AK nagyobb életminőség-rontó tényező, mint a stroke, cardiovascularis betegségek vagy a rák. A Delphi tanulmány szerint 2001-ben 24,3 millió ember élt világszerte AK-ral, ez a szám pedig 2020-ra 42,3, 2040-re 81,1 millióra fog emelkedni. Ez a jóslat azonban 2015-ben megdőlt, mivel már akkor 46,8 millióan éltek a betegséggel világszerte, az Alzheimer Disease International szerint (7. ábra). Azt azonban hozzá kell tennünk, hogy a fejlődő országokból származó statisztikai adatok megbízhatósága megkérdőjelezhető. A legnagyobb arányban érintett területek Kína, a nyugati csendes óceáni területek, Nyugat-Európa és az USA [94].



7.ábra. Az AK prevalenciája az Alzheimer-kór Nemzetközi Szervezete szerint [94].

3.2.2. Az amyloid kaszkád hipotézis

Az AK pathomechanizmusa a mai napig nem teljesen tisztázott, de az alábbi tényezők szerepe egyértelmű: oldhatatlan amyloid- β ($A\beta$) plakkok az extracelluláris terekben és az erek falában; illetve a mikrotubulus-asszociált fehérje, a tau neurofibrilláris kötegekké törő aggregációja a neuronokban. Az elváltozások először a frontális és temporális cortexet érintik, majd a betegség előrehaladtával – betegenként változó sebességgel – megjelennek a neocortex többi részén is [92].

Az $A\beta$ -fehérje valójában egy peptidcsoportot jelöl, melynek tagjai 38-43 aminosavból állnak, és az amyloid precursor protein (APP) hasításából keletkeznek. Enzimekkel végzett tanulmányok igazolták, hogy az $A\beta$ normális terméke az APP metabolizmusnak, és nagy mennyiségben termelődik a neuronokban, valamint egyéb sejtekben. A fehérje hasítását több különböző enzim képes elvégezni. Amennyiben az α -szekretáz indítja el a folyamatot, úgy a szolubilis fragment, $sAPP\alpha$ keletkezik, amely gátolja az $A\beta$ képződést. A $sAPP\alpha$ fontos szerepet tölt be a neuronális plaszticitásban, szabályozza az idegi őssejt-proliferációt, gátolja a stressz indukálta ciklin-dependens kináz-5 (CDK5) aktivációt, ezen kívül neuroprotektív hatású. Ezzel szemben, ha a β (BACE-1, BACE-2) - szekretáz, következő lépésként pedig a γ -szekretáz hasítja a fehérjét, úgy nagy mennyiségű $A\beta_{40}$ és $A\beta_{42}$ keletkezik. Ezek a peptidok hajlamosak összecsapzódásra, így először még oldható fehérje oligomerek végül

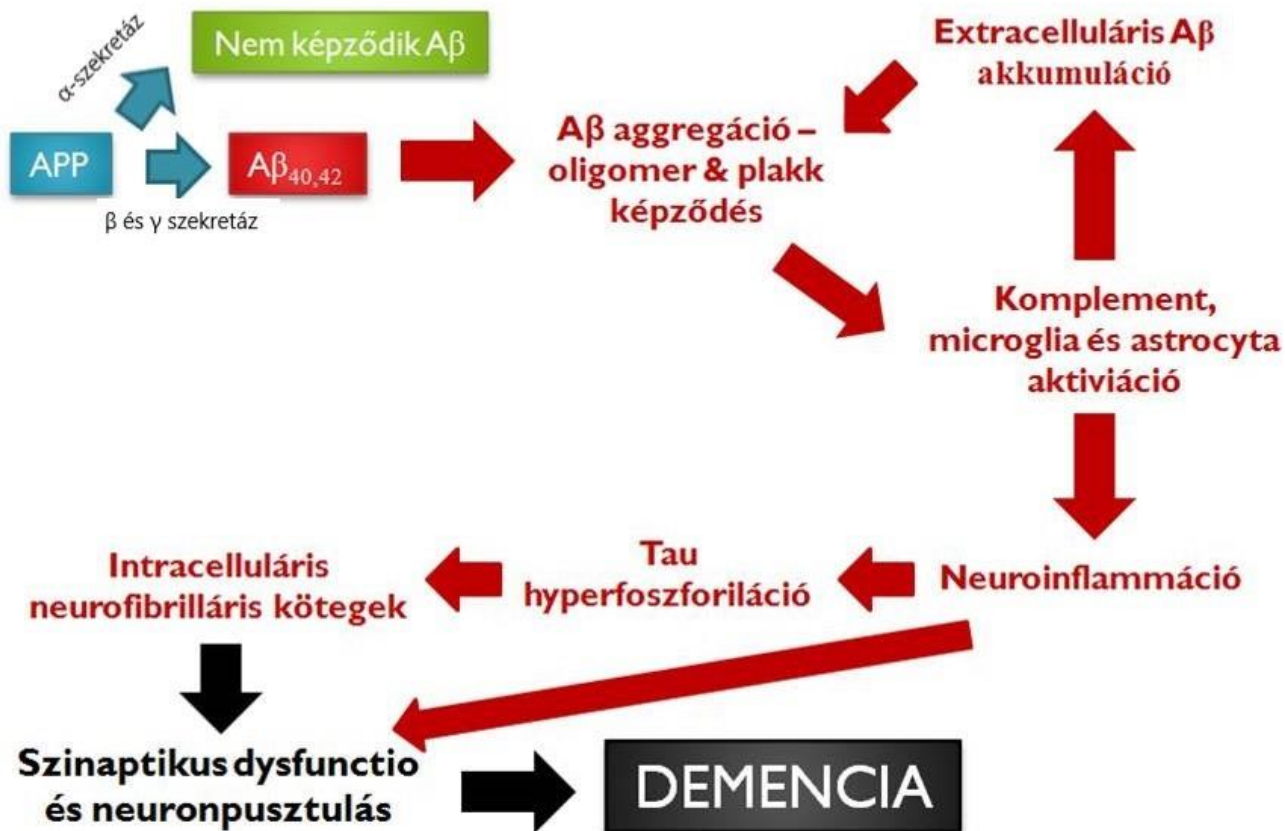
oldhatatlan, ún. senilis plakkok jönnek létre [95]. Több különböző bizonyíték támasztja alá, hogy az A β akkumulációja és a β -lemezes szerkezet kialakulása központi tényező az AK pathogenesisében [96]. A legerősebb bizonyíték a familiares esetek tanulmányozásából származik, amelyek több mint felében az APP génben, illetve annak processzáálásában részt vevő enzimek génjeiben (*PSEN1*, *PSEN2* – a γ -szekretáz alkotóit kódolják) fordul elő mutáció [97]. A legtöbb mutáció az A β túltermelését eredményezi – különösképpen a 42 aminosavból álló A β 42-ét – amely a többi izoformánál jóval hajlamosabb az aggregációra [98]. *In vitro* sejtkultúra és *in vivo* egér modell vizsgálatok kimutatták, hogy ezen gének mutációi emelkedett A β 42/A β 40 arányt eredményeznek [97], illetve azok a betegek, akik ezeket a mutációkat hordozzák emelkedett A β 42/ A β 40 arányt mutatnak a plazmájukban, és fokozott mennyiségű A β 42-termelést a központi idegrendszerben [99]. További bizonyíték az A β szerepére, hogy a Down-szindrómában szenvedő betegek, akiknek 3 db, az *APP* gént tartalmazó 21-es kromoszómája van, fokozott mértékben termelnek A β -t, és 35 éves korukra az Alzheimer-kórra jellegzetes patológiás elváltozásokat mutatnak [100]. Továbbá kiderült, hogy az A β -termelést csökkentő mutáció az *APP* génben jelentős protektív hatással bír a késői kialakulású Alzheimer-kórban.

Stabil izotópos kinetikai vizsgálatok kimutatták, hogy az agy-gerincvelői folyadékban az A β metabolizmusa rendkívül gyors, a fehérje féléletideje 9 óra [101]. Az is kiderült, hogy az A β eltávolításának csökkenése a legenyhébb alzheimer-kóros esetekben is kimutatható. Ennek oka nem teljesen ismert, azt azonban tudni lehet, hogy az APOE, valamint a mikroglia és makrofágok csökkent fehérjelebontó képessége szerepet játszik a fenti eltérésben [102].

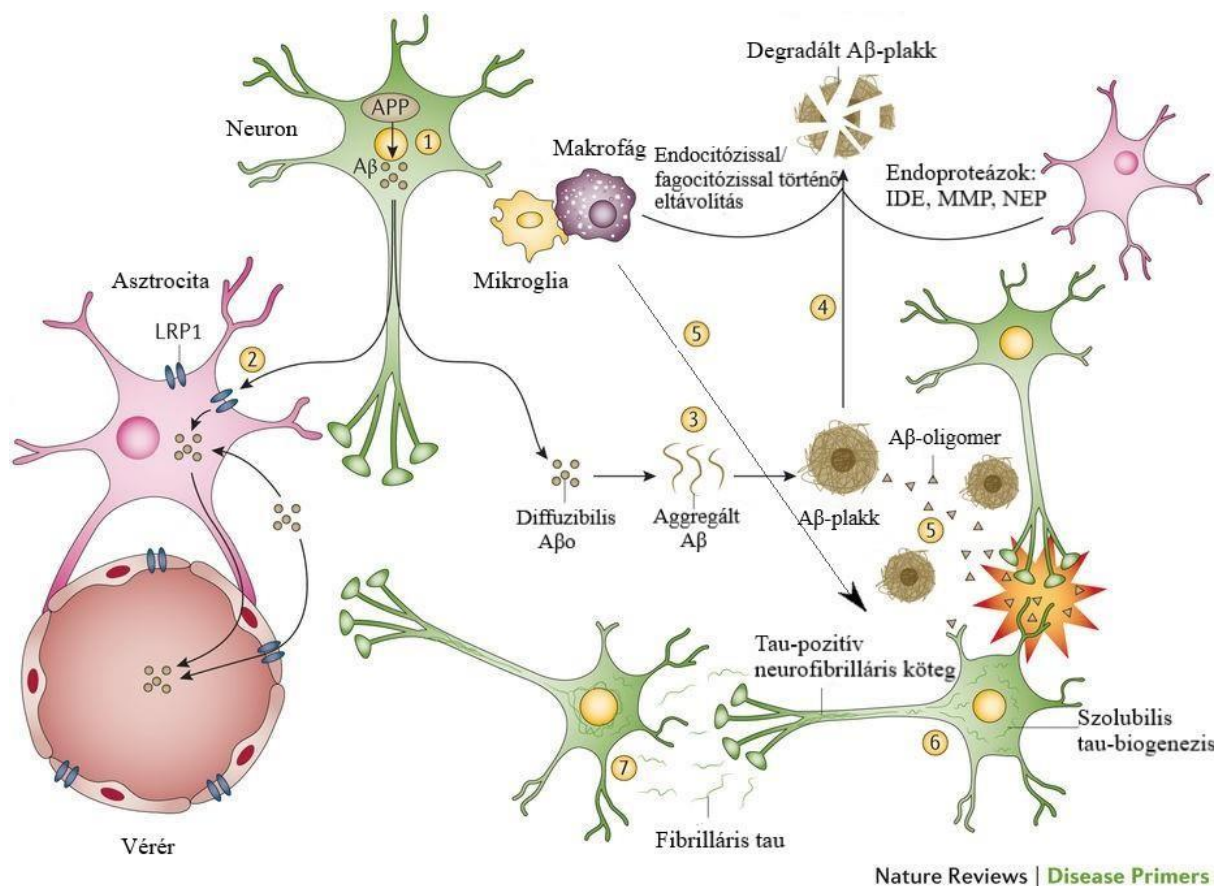
Az APOE a magas denzitású lipoproteinek részeként (HDL) a koleszterin és foszfolipidek idegsejtek közötti transzferében játszik szerepet, illetve a HDL-szerű részecskék receptor-mediált endocytosisát serkenti a receptorok kofaktoraként [103]. A 19-es kromoszómán található génjében bekövetkezett mutáció az egyik leginkább hajlamosító tényező az AK kialakulására [104]. 299 aminosavból áll, 3 humán izoformája ismert (APOE2, APOE3 és APOE4), melyek közül a 3-as izoforma bír a legmagasabb aktivitással és fordul elő legnagyobb mennyiségben (78%), de a 4-es izoforma mutációja hozható összefüggésbe az Alzheimer-kór kialakulásával [105]. A központi idegrendszerben csakis a vér-agy gáton belülről származik, az asztrociták és mikroglia sejtek termelik elsősorban. Bármely aminosavcsere megváltoztathatja az APOE szerkezetét, ezáltal celluláris receptorokhoz, valamint a lipoproteinekhez való kötődését is, és nagy valószínűséggel a termelés és fehérje eltávolítás sebességét is [106]. Az APOE4 allélt teszik felelőssé a sporadikusan kialakuló

Alzheimer-kóros esetek 50%-áért [107], míg az APOE2-ről kiderült, hogy csökkenti a betegség valószínűségét, mivel redukálja a senilis plakkok mennyiségét [108]. Számos tanulmányt végeztek az APOE A β képződésében, aggregációjában és eltávolításában betöltött szerepére vonatkozóan, és az eredmények alapján az A β chaperonjaként funkcionál, ezáltal modulálja az A β kiválasztását és lerakódását, következésképpen kóros formája hozzájárul a plakk-képződéshez [109-111]. Az APOE4 allélek dózis-függő módon befolyásolja az A β depozitumok mennyiségét és az amyloid angiopathia súlyosságát az Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyában. A biológiai mintákban az APOE az A β -hoz kötve található, és összefüggésbe hozható a betegek agyszövetében jelen lévő fibrillaris A β -val [100].

A kórkép pathomechanizmusában rendkívül nagy szerep jut a neuroinflammációnak. Az A β aggregátumok megváltozott saját fehérjékként aktiválják az immunrendszert, ezáltal központi idegrendszeri gyulladáshoz vezetnek [112], ez az úgynevezett amyloid-kaszád-gyulladásos hipotézis. Az immunrendszer aktiválása egyrészt abban nyilvánul meg, hogy az A β , illetve annak N-terminális fragmentje kötődik a C1q-hoz, ezáltal beindítja a komplement rendszert [113], továbbá a mikroglia és asztrocita sejtek által mediált gyulladásos reakció súlyosbítja a komplement rendszer által vezérelt folyamatot [114]. A gyulladás szerepe többrétű. A gyulladásos mediátorok fokozzák a β -szekretáz működését, ami tovább növeli az A β akkumuláció mértékét, így egy öngerjesztő folyamat alakul ki [13]. Másrészt, az A β plakkok direkt és indirekt útvonalakon keresztül protein kinázokat aktiválnak (pl.: GSK3, CDK5), amelyek hozzájárulnak a mikrotubulus-asszociált fehérje, a tau hyperfoszforilálásához, ezt követően az aggregációjához, így fokozva a tau-pozitív neurofibrillaris kötegek kialakulásának valószínűségét [115, 116]. Miután megkezdődött a tau fehérje aggregációja, a folyamat az A β jelenlététől függetlenné, illetőleg megállíthatatlanná válik, és a gyulladás, valamint a neuronális kötegek károsítják a neuronok működését, végül pedig sejtpusztuláshoz, neurodegenerációhoz vezetnek [112]. A pathomechanizmus összefoglalását a 8-9. ábra szemlélteti.



8.ábra. Az Alzheimer-kór patomechanizmusa.



9.ábra. A neuroinflammáció kialakulása. 1. lépés: az APP-ből Aβ keletkezik, és diffúzibilis oligomerekként kikerül az extracelluláris térbe. 2. lépés: az Aβ_o eltávozhat az idegrendszerből az APOE által mediált útvonalon vagy felvehetik az asztrociták az LDL-receptorhoz kapcsolt fehérje (LRP1) segítségével. 3. lépés: az Aβ_o ugyanakkor aggregátumokat is képezhet a sejtek közötti térben. 4. lépés: a macrophagok vagy a microglia a plakkokat endocitózis vagy fagocitózis által lebonthatják, és eltávolíthatják, illetve az asztrocitákból származó endoproteázok (pl.: inzulin-degradáló enzim, IDE; neprilizin, NEP; mátrix metalloproteináz, MMP) megsemmisíthetik. 5. lépés: néhány oldhatatlan oligomer megmenekül a lebontástól és kiürítéstől, és aktiválja az immunrendszert (microglia és macrophagok), ezáltal közvetetten kiváltja a tau-foszforilációt és aggregációt. Közvetlenül is képes erre a lépésre, a CDK-5 és GSK-3 enzimek aktiválásán keresztül. 6. lépés: a neuronokon belüli tau fehérje aggregálódik, neurofibrilláris kötegek képződnek, és károsítják az idegsejt működését. 7. lépés: a fibrilláris tau kikerülhet az idegsejtek közötti térbe, ahonnan más egészséges neuronok felvehetik, és szintén károsodást szenvedhetnek [92].

Manapság egyre több tanulmány bizonyítja, hogy az AK egy metabolikus eredetű megbetegedés, melyben az agy – mely, bár nem inzulin-függő szerv, de érzékeli az inzulinszintet, ezáltal regulálja a glükóz háztartást – csökkent inzulin érzékenysége, elégtelen glükóz,- és energia felhasználása nagy szerepet játszik, és ez oxidatív stresszhez, gyulladáshoz, valamint az inzulin érzékenység további csökkenéséhez vezet [5, 117]. Az inzulin- és IGF-rezisztencia molekuláris és biokémiai következményei az agyban hasonlóak, mint más szövetekben, azonban az inzulin szignalizáció károsodása hátráltatja az energia

termelést, akadályozza a neuronok túlélését, a génexpressziót, plaszticitást és a fehérállomány integritását [118]. Mivel az agy számára a glükóz az energiaforrás, a glükózfelhasználás elégtelensége „éhezést” okoz. Az éhezés következményeként pedig oxidatív stressz, a homeosztázis károsodása és fokozott mértékű sejtpusztulás alakul ki. Az inzulin/IGF szignalizáció több ponton felelős az AK-ban megfigyelt neurodegenerációért: 1) a tau foszforilációjáért felelős kinázok (pl.: GSK-3 β) aktivitása fokozódik; 2) az APP-A β halmozódás nő; 3) oxidatív és endoplazmatikus retikulum (ER) stressz alakul ki; 4) reaktív oxigén és nitrogén gyökök szaporodnak fel, melyek károsítják a DNS-t, RNS-t és a lipideket; 5) mitokondriális dysfunctio fejlődik ki; 6) gyulladáshoz és apoptotikus kaszkád indul be [119, 120]. Ezekon kívül pedig az inzulinrezisztencia csökkenti azon gének átírásának intenzitását, amelyek a kolinerg funkció fenntartásához szükségesek, tovább károsítva ezzel a neuronális plaszticitást, memóriát és kogníciót [118]. Az az elképzelés, hogy az AK egy metabolikus betegség, azon tanulmányokból ered, melyek rávilágítottak, hogy az agyi glükózfelhasználás zavara már a betegség nagyon korai szakaszában jelen van, illetve, hogy rosszabbodik a kór progrediálása során [121-124]. Az agyi inzulin/IGF rezisztencia csökkent inzulin/IGF receptorhoz történő kötődésében, valamint az inzulin/IGF stimulációra adott csökkent mértékű válaszban, illetve az agyban és cerebrospinális folyadékban található megváltozott mértékű inzulin és IGF kifejeződésben nyilvánul meg [125, 126]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a krónikus inzulin jelátviteli elégtelenségnek szerepe lehet az AK-ra jellemző elváltozások kialakulásában. Sőt, az 1-es és 2-es típusú cukorbetegséggel átfedő tünetek és elváltozások miatt az Alzheimer- kórt újabban 3-as típusú cukorbetegségnek nevezik [127].

Az AK pathogenesisének kutatásában számos különböző állatmodellt alkalmaztak. A legalkalmasabb és leggyakrabban vizsgált állatok az egerek és a patkányok. Azonban a hiányos pathogenetikai ismereteinknek köszönhetően minden modellnek vannak hátrányai. Példaként említhetőek a transzgenikus egérmokkell, amelyek egy vagy több AK-ra specifikus génmutációt (pl. APP, PSEN, tau, APOE4 vagy ezek kombinációja) hordoznak, azonban ezek inkább a ritka, familiális forma kutatására alkalmasak. Ezzel szemben az egészséges patkányok, melyek az agykamrájukba adott streptozotocin (STZ) vagy amyloid oligomereket tartalmazó injekció következtében mutatják a neurodegeneráció jeleit, inkább a sporadikus Alzheimer-kór modellezésére használhatóak [14]. Kutatócsoportunk egy olyan modellt választott, amelyben a neurodegeneráció a természetes öregedés folytán jelenik meg – csak a kognitív funkciók tesztekkel és képalkotó vizsgálatokkal igazolható neuropathológiás eltéréseket mutató állatokat használtuk fel a kísérletben – az állatok idős korából (18 hónap –

a humán korszámítás szerint 70-80 éves kornak felel meg) kifolyólag, így elkerülhetővé vált a génmódosítás vagy a különböző vegyszerek (pl. szkopolamin, solubilis amyloid- β , colchicin) általi manipuláció.

3.2.3. Az Alzheimer-kór diagnózisa és jelenlegi terápiája

Az Alzheimer-kórt diagnosztizálni nem egyszerű feladat. A kognitív hanyatlást felmérő tesztek (Mini Mental State Examination, ADAS-Cog) képezik a diagnosztika alapját, azonban sem a kezdeti, prodromális időszakban, sem az előrehaladottabb tüneti stádiumban nem mindig megbízhatóak [128]. A Pittsburgh komponens B (PCB) felfedezése – amely a fluoreszcens amyloid festék, a tioflavin-T radioaktív (szén-11) analógja, és képes átjutni a vér- agy gáton, valamint szelektíven kötődni a fibrilláris A β -hoz – forradalmasította az *in vivo* képalkotó diagnosztika szerepét az AK azonosításában [129], azonban a betegek közel 35%-a nem mutat PCB-pozitivitást [130]. Az abnormális tau aggregáció kimutatására is léteznek már PET-ligandok, amelyeket különböző vizsgálatokban alkalmaznak, és melyek közelebb vihetnek bennünket az amyloid és tau fehérje pathogenesisben megjelenő kapcsolatához [131]. Az agy-gerincvelői folyadék biokémiai vizsgálata szintén a diagnosztika részét képezik. A betegségre legspecifikusabb markerek az A β 42, a p-tau (foszforilált tau) és a t-tau (totál tau), melyek közül a leggyakrabban alkalmazott jelölő anyag a p-tau 181-es treonin aminosavára specifikus [132]. Diagnosztikus szempontból az alacsony A β 42-szint, kombinálva a magas p- tau és t-tau szintekkel a leginkább szenzitív és specifikus a betegségre, ez az úgynevezett „Alzheimer-kór CSF-profil” [133]. A betegség legbiztosabb diagnózisát sajnos csak a post-mortem szövettani vizsgálat adja, mely során az A β és tau patológiát, valamint a neurodegeneráció fokát a klasszikus hematoxylin-eosin, az amyloidra specifikus Kongó vörös festékkel, illetve immunhisztokémiával – specifikus antitestekkel –, azonosítják.

A kogníció javítására két hatóanyagcsoport alkalmazható – a kolinészterázgátlók, illetve az N-metil-D-aszpartát receptor gátlószere, a memantin. Előbbiek az acetilkolin extraszinaptikus metabolizációját gátolják – ezáltal növelik a neurotranszmitter szinaptikus résben töltött idejének mennyiségét –, serkentve ezzel a posztszinaptikus hatását. Ebbe a csoportba tartozik a donepezil, galantamin és rivasztigmin [134]. A memantin az AK-ban megfigyelt abnormális glutamát jelátvitelt hátráltatja az NMDA-receptorok kompetitív gátlásán keresztül [135]. A terápia hatékonyságának felmérését célzó tanulmányok alapján elmondható, hogy a hatóanyagok kombinált alkalmazása nagyobb előrelépést és stabilizálást jelent a betegek állapotában, azonban ezek csak tüneti és ideiglenes megoldások, oki terápiát nem jelentenek,

mivel a háttérben húzódó pathológiás folyamatokra nincs befolyásuk [136].

3.3. A hemoxigenáz rendszer

3.3.1. A hemoxigenáz szervezetben betöltött szerepe

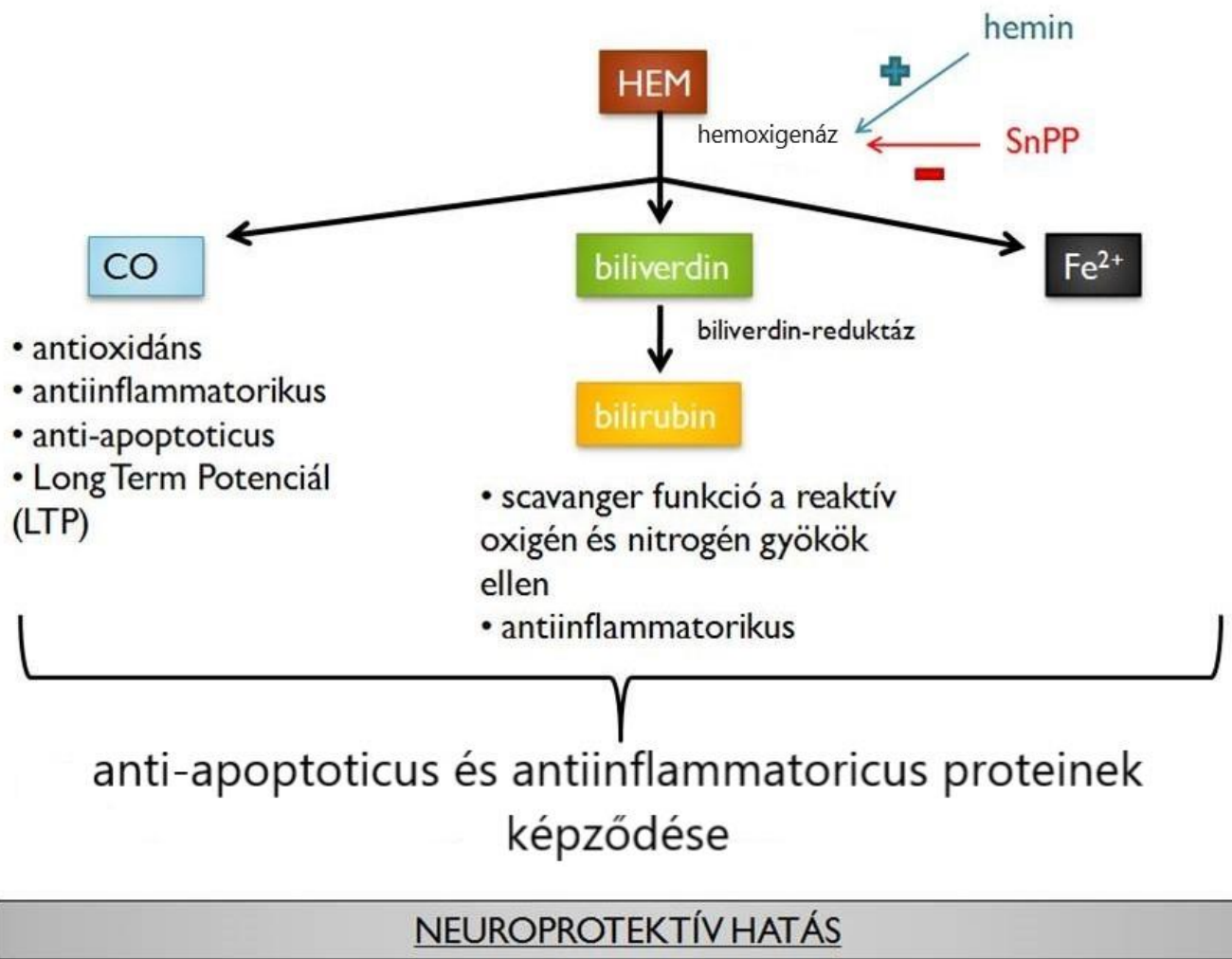
Számos olyan humán betegség ismert, köztük az AK és más neurodegeneratív betegségek, melyekben a pathológiás állapotért és szöveti károsodásért a szabályozatlan vagy nem megfelelő mértékben szabályozott gyulladási folyamatok, illetve az ezek során keletkezett reaktív oxigén gyökök a felelősek [17]. Ez a jelenség, az úgynevezett oxidatív stressz, mely számtalan betegség, hő-, illetve mechanikai sérülés, sugárzás vagy kémiai ágensek okozta károsodás következménye lehet. Amennyiben nem történik megfelelő ellenintézkedés, a reaktív oxigént tartalmazó molekulák károsítják a sejteket, felborítják a homeosztázist, végül sejtpusztuláshoz vezetnek [137].

A hemoxigenáz enzim (HO) egy mikroszómális enzim, melyről bebizonyosodott, hogy az oxidatív stressz elleni védőreakció egyik fontos tagja, sejtvédő hatással rendelkezik [138]. A HO-nak három izoformája van. Az indukálható HO-1 – mely a Hsp32-es hő sokkfehérjeként is ismert – gerinces élőlényekben számos stresszor hatására (mint pl. ischaemia, reperfusio, hőhatás, bakteriális lipopoliszacharid, valamint a vörösvértestek pusztulása során felszaporodó hemin fehérje) aktiválódik [139]. A konstitutívan aktív HO-2, leginkább a központi idegrendszerben, de más szövetekben is állandó aktivitással működik [140]. A harmadik a HO-3, amelynek egyelőre nem tisztázott a funkciója. A két ismert izotípus fontos szerepe a hem lebomlása során keletkező bilirubin biliverdin-alfára (BV-alpha), szénmonoxidra (CO) és ferro-vasra [Fe(II)] történő bomlásának katalizálása [138]. A hemoxigenáz-1 génjében, a *HMOX1*-ben, két enhancer régió található (E1 és E2), melyek antioxidáns válasz elemeket (antioxidant responsive elements, ARE) tartalmaznak. Ezek segítségével történhet az oxidatív stressz hatására bekövetkező expresszió-fokozódás [141]. Maines és munkatársai szerint a HO-2 enzim lehet felelős a hem homeosztázis fenntartásáért (úgynevezett „housekeeping” molekula), míg a HO-1 valószínűsíthetően az oxidatív stresszel szembeni védekezés kezdeti és legfontosabb lépéseit irányítja [142].

A HO által katalizált reakcióban a hemből keletkező CO-nak fontos szabályozó szerepe van a

központi idegrendszer működésében. Felelős a hippocampalis „longterm” potenciálok kialakulásáért, ezáltal a memória képződéséért, mivel a NO-hoz hasonlóan képes aktiválni a guanilát cikláz enzimet, melyről köztudott, hogy fontos az emlékek processzálásában. Regulálja a neurotranszmitterek felszabadulását, ami által szerepe van a neuronok egymás közötti kommunikációjának modulálásában [143]. Mindemellett antioxidáns potenciállal bír, mivel gátolja a gyulladás során aktiválódó enzimeket (pl. NADPH, xantin-oxidáz), ezzel párhuzamosan pedig stimulálja az antioxidáns hatású enzimek expresszióját. Sőt, képes csökkenteni az oxidatív stresszfolyamatok által beindított apoptotikus kaszkád intenzitását [4].

A hem degradációja során keletkező biliverdint a biliverdin-reduktáz (BVR) azonnal bilirubinná (BR) alakítja. A bilirubin szintén rendelkezik antioxidáns tulajdonságokkal, mivel semlegesíti a reaktív oxigéngyököket, és javítja a mitokondriumfunkciót [144]. Több különböző tanulmány igazolta, hogy az A β plakkok területén emelkedik a HO-1 enzim expressziója, mely valószínűsíthetően az A β toxicitására adott válaszreakció, és az amyloid fehérjék sejtkárosító, gyulladást generáló hatását hivatott mérsékelni [145]. A HO rendszer sejtvédő mechanizmusait a 10. ábra mutatja.



10.ábra. A HO rendszer jótékony hatásai.

3.3.2. A hemoxigenáz gyógyszeres indukciója

Egyre több tanulmány foglalkozik az oxidatív stressz AK-ban betöltött szerepével. Sultana R. és mtsai 2013-ban részletesen bemutatták az oxidatív folyamatok végbemenetelét és a lipidek, valamint fehérjék szerkezetének és funkciójának megváltozását, amely nagy szerepet játszik a sejtkárosításban és neurodegenerációban. A tanulmány szerint a lipidperoxidáció során oxidatív szabadgyökök termelődnek, és jelennek meg a sejtek membránjaiban. A többszörösen telítetlen zsírsavak könnyen áldozatul esnek a peroxidációnak, melynek eredményeként reaktív elektrofil aldehidek (pl.: 4-hidroxi-2-nonenál, malondialdehid vagy akrolein) keletkeznek. Ezen aldehidek mérésével nyomon követhetjük az oxidatív folyamatok intenzitását. A fehérjék érzékenyek a különböző poszttranszlációs módosításokra, melyeket ezek az aldehidek okoznak azáltal, hogy kovalensen hozzákötődnek a fehérjékhez. Ezt a

folyamatot Michael-addukciónak nevezik. Ezek az adduktok, amennyiben nem kerülnek eltávolításra veszélyt jelentenek a teljes sejthomeosztázisra [146]. Közleményükben azt is említik, hogy a kezdeti stádiumú (MCI) és a kifejezett Alzheimer-kóros betegek agyában is emelkedett mennyiségű, de az aldehidek által módosított HO-1 enzimet azonosítottak. Ismeretes, hogy az antioxidáns enzimek, köztük a HO-1 enzim expressziójának és aktivitásának fokozódása az egyik legkorábbi lépés az oxidatív stresszel járó pathológiás folyamatokban [138]. Az is bizonyított, hogy az enzim szerin-foszforilációja nélkülözhetetlen az aktivációjához, így a plakkok és fibrillumok területén detektált emelkedett mennyiségű enzim, valamint annak intenzív foszforilációja az Alzheimer-típusú pathológiával és oxidatív stresszel szembeni védekezés egyik kulcspontja lehet [147]. Azonban az aldehidek általi adduktképződés jelentősen károsítja az enzim funkcióját. Ezek alapján Sultana R. és mtsai azt a következtetést vonták le, hogy a betegség kialakulása során az agy többek között fokozott HO-1 expresszióval és foszforilációval próbálja kompenzálni az oxidatív stressz káros hatásait, azonban a lipidperoxidáció során kialakuló aldehidek általi enzimmodifikáció gátolja ezt. Így amennyiben külső beavatkozással képesek lennének az enzim funkciójának helyreállítására, aktivitásának fokozására, úgy talán a pathológiás folyamatokat is sikerülhetne megállítani vagy lelassítani [146].

Több más tanulmány is igazolta, hogy a HO-1- nek jelentős szerepe van az oxidatív stressz elleni küzdelemben, és aktivitásának fokozásával csökkenthető a sejtkárosodás mértéke. Bhardwaj és mtsai. heminnel aktiválták a HO-1 enzimet az agykamrába injektált streptozotocinnal (STZ) létrehozott Alzheimer-patkánymodellben. Az STZ egy sejtmeleg, mely a sporadikus AK-hoz hasonló neuropathológiai elváltozásokat idéz elő, és a kórkép modellezéséhez gyakran használt eljárás. A kísérlet során a mesterséges enziminduktor (hemin) segítségével próbálták enyhíteni a neurodegeneratív folyamatokat, míg a hatást az enzim szelektív gátlószerének (cink protoporfirin, SnPP) alkalmazásával igyekeztek igazolni. A hemin kezelés pozitívan befolyásolta a betegség kimenetelét az állatokban, javultak a kognitív funkcióik, és csökkent a kolinerg deficitük. Az SnPP kezelésben is részesülő állatok esetében teljesen elmaradt a várt hatás, az állatok a kontroll (STZ-kezelt) patkányokhoz hasonló mértékű neurodegenerációt és kognitív hanyatlást szenvedtek [21].

Kurauchi Y. és mtsai pedig középagyi sejt kultúra, valamint dopaminerg neurodegeneráció (a substantia nigrába történő lipopoliszacharid (LPS), valamint a striátumba történő 6-hidroxidopamin injektálásával létrehozott) egér modelljének vizsgálatával támasztotta alá a HO-1 neurodegeneráció ellenes hatását. Kísérletükben kávésav-fenil-észterrel (a propolisz

egyik hatóanyagával) igyekeztek indukálni a HO-1 enzimet, mivel korábban bebizonyosodott, hogy a HO-1 a dopaminerg neuronok oxidatív károsodását is csökkenti [148]. Kísérletük eredményei azt sugallták, hogy a kávésav-fenil-észter képes aktiválni a HO-1-et, valamint az agyi-eredetű neurotrofikus faktort (BDNF), ezáltal védelmet nyújt az IFN- γ /LPS által okozott sejtkárosodással szemben a sejt kultúrában, valamint a LPS és 6-hidroxidopamin által kiváltott dopaminerg neurodegenerációval szemben is. A dopaminerg neuronok nem pusztultak el, a HO-1 és BDNF expressziója és aktivitása fokozódott, valamint a macrophag és microglia sejtek aktivitása csökkent. Minden hatása felfüggeszthető volt a HO-1 gátló cink protoporfirinnal és az anti-BDNF antitesttel [149].

3.3.3. A testmozgás hatásai

A rendszeres, önkéntes fizikai aktivitásról régóta feltételezik, hogy csökkenti az AK rizikóját, illetve mérsékli a folyamat intenzitását. Egy 1991-1992-es kanadai kohorsz vizsgálatban 9008 65 év feletti önkéntest választottak ki, melyek közül 4615 jelölt rendelkezett teljesen ép kognícióval a vizsgálat kezdetén, és vállalta az 5 éves utánkövetéses vizsgálatot, valamint rendszeres fizikai aktivitást. Az 1996-1997-es felmérések alapján, a 4615 rendszeresen sportoló résztvevő közül 3894-en megőrizték szellemi épségüket, 436 főnél enyhe kognitív hanyatlást, de nem demenciát tapasztaltak, és csupán 285 főnél alakult ki demencia. A fizikai aktivitást nem végző csoportban az Alzheimer-kór, illetve bármilyen mechanizmusú kognitív hanyatlás gyakorisága kétszer akkora volt, mint a sportolók körében [150].

Moore KM. és mtsai alacsony (15m/perc egyenes futókerékben) és magas intenzitású (30m/perc 10%-os dőlésszögű kerékben), a hét 5 napján, napi 60 percig tartó fizikai aktivitás hatásait vizsgálták génmódosított egér Alzheimer-modellben, és azt a megállapítást tették, hogy a fizikai aktivitás dóziszfüggő módon, szignifikánsan csökkentette a solubilis A β 40 és A β 42 mennyiségét mind a hippocampusban, mind a cortexben. Az amyloid eltávolításban szerepet játszó enzimek szintjét is vizsgálták, és kimutatták, hogy az 5 legfontosabb enzim (neprilizin, IDE, MMP9, LRP, Hsp70) – melyek vagy az amyloid proteolitikus degradációját eredményezik, vagy a vér-agy gáton keresztüli eltávolítást – szintje emelkedett. Legszembetűnőbb a neprilizin expressziójának fokozódása volt, míg a mátrix metalloproteináz-9, valamint az inzulin degradáló enzim (IDE) szintje kisebb mértékben, de azért jelentősen nőtt. Az LRP-1 egy sejt felszíni receptor, és többek között olyan molekulák vér-agy gáton keresztüli eltávolításáért felelős, mint az apolipoprotein-E, α 2-macroglobulin és A β . Eredményeik alapján azt a következtetést vonták le, hogy a rendszeres mozgás növeli az

amyloid kiürítés mértékét, ezáltal járul hozzá a betegség rizikójának csökkentéséhez [151].

Több tanulmány is bebizonyította már, hogy a mozgás fokozza az amyloid kiürülését a központi idegrendszerből, mely neuroprotektív hatású, csökkenti az oxidatív és endoplazmatikus retikulumot ért stresszt, az idegrendszeri gyulladást, javítja az inzulin érzékenységet, a szinaptikus plaszticitást, valamint a kogníciót [152-154]. Koo JH. és mtsai azt igazolták, hogy a rendszeres fizikai aktivitás a SIRT-1 szignalizáció aktiválásán keresztül csökkenti az amyloid terhelést [155]. A SIRT-1 a szirtuin család tagja, melynek fontos szerepe van a homeosztázis fenntartásában a neuron túlélés serkentésén, illetve az inzulin jelátvitel, a glükózetabolizmus és mitokondriális funkció megőrzésén keresztül [156]. A SIRT-1 valószínűsíthetően az APP processzálásán keresztül befolyásolja az A β lerakódást, és csökkent aktivitása összefüggésbe hozható a fokozott A β termeléssel [157], mivel kimutatható, hogy a SIRT-1 indukálja a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma koaktivátor 1-alfa (PGC-1 α) expresszióját. A SIRT-1 és PGC-1 α együtt képesek gátolni az APP hasításában résztvevő BACE-1 enzimet, ezáltal csökkenteni az A β termelődését [158]. A SIRT-1 szintjének csökkenése együtt jár az ADAM-10 expressziójának redukciójával is, amely szintén fokozott A β termeléshez vezet [159]. Koo JH. és mtsai.-nak eredményei azt támasztják alá, hogy a fizikai aktivitás hatására növekedett a SIRT-1 és következményesen az ADAM-10 szintje, illetve a PGC-1 α aktivitása, sőt, csökkent a BACE-1 szintje. A fenti információk tükrében kimondható, hogy a rendszeres fizikai aktivitás több különböző útvonalon keresztül fejt ki jótékony hatását a neurodegeneratív betegségekben.

Egy 2017-es tanulmány rávilágított a fizikai aktivitás és a HO-1 közötti kapcsolatra. A kísérletben az elhízáshoz társuló cardiovascularis betegségek (melyek közül a legkorábban megjelenő a diastolés dysfunctio) modelljében, magas zsír - és cukortartalmú táppal etetett egerekben vizsgálták a rendszeres rekreatív mozgás hatását. Az eredmények azt mutatták, hogy a mozgás megakadályozta a diastolés dysfunctio kialakulását, szignifikánsan csökkentve a bal kamra relaxációs idejét. Az is kiderült, hogy a mozgás hatására csökkent az oxidatív stressz, valamint fibrosis mértéke a szívizomban, amelyek a mozgást nem végző, szintén magas zsír- és cukortartalmú táppal etetett csoportban nagyon jelentősnek bizonyultak. A HO-1 fehérje expressziós vizsgálatok pedig azt mutatták, hogy a fizikai aktivitás hatására jelentősen emelkedett az enzim szintje, mely magyarázhatja a kapott eredményeket [160].

Mindezen eredmények fényében azt a hipotézist tettük, hogy a rendszeres önkéntes fizikai aktivitás által fokozott HO-1 aktivitásnak jótékony hatása lehet az időskori, Alzheimer-típusú demencia kognitív és neuropathológiai eltérései tekintetében. A publikáció megjelenése előtt

ezt az összefüggést még nem vizsgálták.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Kísérleti állatok

A jelen kutatás első fázisában 6 hetes hím Zucker diabeteses elhízott (ZDF-Leprfa/Crl) patkányokat és kontroll társaikat („sovány” típus) vizsgáltunk, melyeket a Charles River Laboratories International-tól (Wilmington, MA, USA) szereztünk be. Minden állat humánus bánásmódban részesült az Oftalmikus és Látás Vizsgálatok során történő Állathasználatról szóló ARVO Nyilatkozatnak és a NIH iránymutatásainak megfelelően. A kutatás második felében pedig 18 hónapos (300-350 g) hím és nőstény Wistar patkányokat, valamint fiatal kontroll (3 hónapos) társaikat vizsgáltunk. Az állatházban az átlaghőmérséklet 22-24 °C között volt, 12-12 órás sötét és világos periódusok váltották egymást. A kutatásban alkalmazott valamennyi protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi – és Állatjóléti Bizottsága, Debrecen, Magyarország engedélyezte (18/2013/DE MÁB). Az állatok Purina 5008 tápot és igény szerinti mennyiségű vizet kaptak a kísérlet teljes időtartama alatt.

4.2. Kísérleti elrendezés

A kutatás első részében az állatokat 3 csoportra osztottuk (n=6 minden csoportban): I. kontroll diabeteses csoport, II. kezelt diabeteses csoport és III. egészséges csoport. A kezelt csoport tagjait orális szondázási technikával kezeltük, napi 30mg/kg SCSE-t kaptak, miközben a kontroll csoport tagjai a vivőanyagot (metil-cellulóz nyák) kapták a szondán keresztül, egy korábbi protokollnak megfelelően [22].

A kutatás második részében pedig 6 csoportot hoztunk létre: I. idős, inaktív életmódot folytató nőstények (ASF, n=8); II. idős, inaktív életmódot folytató hímek (ASM, n=8); III. idős, futó nőstények (ARF, n=8); IV. idős futó hímek (ARM, n=8); V. fiatal (3 hónapos) kontroll nőstények (YCF, n =8) és végül VI. fiatal (3 hónapos) kontroll hímek (YCM, n=8). Az idős futó nőstényeket és hímeket standardizált futókerékkel ellátott ketrecekbe helyeztük, melyben rekreációs mozgást végezhetek 3 hónapon keresztül. Az idős és fiatal kontroll csoport tagjai futókerék nélküli ketrecekbe kerültek. A kísérlet időtartama 3 hónap volt.



11. ábra. Ketreche beépített futókerék km-számlálással, mellyel nyomonkövethető az állatok napi futásának mennyisége.

4.3. Okuláris ischaemia/reperfusio

Az 50 napos első kísérleti rész végén az állatokat általános anesztéziában részesítettük intramuscularis ketamin/xylazin (50/5 mg/kg) injekció segítségével. Az állatok szemeit lokálisan is érzéstelenítettük 0,4%-os oxybuprocain szemcsepp alkalmazásával (Humacain, Teva, Debrecen, Magyarország). Ezt követően minden állat bal szemének retinális artériáját sebészileg lekötöttük, hogy ezzel elzárjuk az adott retina véráramlását a szerzők által korábban kidolgozott protokoll szerint [18, 161]. Egy selyem sebési varróanyag szálát egy polietilén kanülön keresztül óvatosan a szemgolyó mögé vezettünk, körülölelve az optikus ideget, a központi retinális artériát, a ciliáris artériákat és a retrobulbáris kötőszövetet. A varróanyagot húzva, a tubust pedig az optikus ideg felületének nyomva ez a „húzó-típusú” okklúzió retinális artéria elzáródást eredményezett, amelyet a kívánt időtartamig fenn tudunk tartani (1h). Makroszkóposan egy 120-D-s lencsével igazoltuk az ischaemiát. Az ischaemia ideje alatt az állatok szemeit steril gézlappal fedtük le. A cornea kiszáradását karbomer-alapú szem gél segítségével akadályoztuk meg (Vidisc, Bausch&Lomb, Berlin, Németország). Az okkluder ischaemia utáni felengedésével létrehoztuk a reperfusiot, utat engedve a retinális artérián keresztüli újbóli véráramlásnak.

4.4. Electroretinographia

24 órás reperfúziót követően az állatokat előkészítettük az electroretinographiás mérésre, intramuscularis ketamin/xylazin (50/5 mg/kg) injekcióval létrehozott általános anesztéziával. Minden állat pupilláját 0,5%-os ciklopentolát hidroklorid oldattal (Humapent, Teva, Debrecen, Magyarország) tágítottuk ki. Minden méréshez 5 ezüst elektródát használtunk a következőképpen. A corneális felszínen retinális jeleket analizáltunk két mérő elektród segítségével (egy-egy mindkét szemén), melyeket az ínhártya sérülés vagy corneális perforáció elkerülése érdekében inzertáltunk. Referencia elektródokat rögzítettünk az állatok fülcimpájára (minden cimpára egyet), a fő referencia elektróda pedig a glabellán volt található. A hatékony elektronikai kapcsolat és a szemek dehidrációval szembeni védelmét karbomer-alapú szem gél alkalmazásával valósítottuk meg (Vidisc, Bausch&Lomb, Berlin, Németország). Az ERG-méréseket sötétben végeztük, egy sötét-adaptációs periódus (20 perc) után, a Látás Klinikai Elektrofiziológiájának Nemzetközi Szervezetének ajánlásai alapján (ISCEV – International Society for Clinical Electrophysiology of Vision) [162]. A retina stimulációjához a szemeket stroboszkóppal világítottuk meg (20 cd/m^2 , 0,5 Hz) [162]. Az elektromos jelek, tehát a retina fényhullámokra történő válaszai egy erősítőn és egy analóg-digitális átalakító rendszeren haladtak keresztül (Bridge Amp and PowerLab, ADInstruments, Sydney, Ausztrália), megjelentek egy számítógépen, rögzítésre kerültek, majd analizáltuk őket a PowerLab Chart szoftver segítségével (5.2.2., ADInstruments, Sydney, Ausztrália). Az electroretinogramokon az “a” és “b” hullámokat elemeztük. Az “a” hullámok a fotoreceptorok sejtjeinek működéséről, elektromos tevékenységéről adnak információt, míg a “b” hullámok a fotoreceptorok mögötti sejtek, nagyrészt a bipoláris sejtek működését reprezentálják. Az electroretinographiai mérések eredményei azt bizonyítják, hogy a módszer – melyet a szerzők korábban már leírtak – költséghatékony és reprodukálható információkat szolgáltat a retina funkciójáról, és ezek az információk szorosan korrelálnak a retina sejtek életképességével [18, 163].

4.5. Orális glükóz tolerancia teszt

Az első kísérleti periódus ideje alatt kétszer végeztünk orális glükóz tolerancia tesztet (OGTT): először, amikor az állatokat bevontuk a kísérletbe, másodszor pedig az 50 napos kísérleti időtartam végén. A teszt kivitelezése előtt az állatok 12 órán keresztül éheztek. A teszt során először az éhomi glükóz értékeket mértük meg, majd 1 g/ml koncentrációjú vizes

glükóz oldatot készítettünk, melyet – testhőmérsékletre történő felmelegítés után – orális szondázási technikával juttattunk minden állat gyomrába, 3 g/kg dózisban. A glükóz terhelést követően 1 órával újra megmértük az állatok glükózsintjét. A méréseket AccuCheck Active plazma glükózsint mérő segítségével végeztük, melyet előzően a klinikánk központi laboratóriuma kalibrált.

4.6. Hemoxigenáz-1 koncentráció mérése

A kísérletek első részében a szövetek HO-1 koncentrációjára voltunk kíváncsiak, ezért az ERG-mérések után az állatok szemgolyóit eltávolítottuk további analízis céljából. Az eltávolított szemgolyók felét szuszpendáltuk egy homogenizációs pufferben. A 7,4 pH-jú puffer összetétele: 10 mM HEPES (4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinétán-szulfonsav), 32 mM szukróz, 1mM DTT (ditiotreitól), 0,1 mM EDTA, 10 µg/mL szójabab tripszin inhibitor, 10 µg/mL leupeptin és 2 µg/mL aprotinin (Sigma-Aldrich Kft., St. Louis, MO, USA). A homogenizátum 30 perces, 20 000 g-n, 4°C-on történő centrifugálása után megkaptuk a felülúszót. A HO-1 tartalmat enzimkapcsolt immunoszorbens esszé (ELISA) segítségével határoztuk meg a gyártó rendelkezései alapján (Sunred Biotechnology Company, Shanghai, Kína). Az optikai denzitást 450 nm-en mértük (Benchmark Microplate reader; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) és az eredményeket ng/mg fehérje formájában fejeztük ki.

4.7. Histologiai vizsgálat

A kutatás első részében a szövettani vizsgálatokat a következőképpen végeztük: Az állatokból eltávolított második szemgolyónak az üvegtesti részét kivettük, a golyó maradék részét pedig Bouin-oldatban fixáltuk, alkohollal dehidráltuk, paraffinizáltuk, 7 µm vastag sagittális metszeteket készítettünk belőlük, majd hematoxylin-eosinnal (H&E) megfestettük, végül pedig fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk őket. Az átlagos retinavastagságot a belső limitáló membrán és a retinális pigment epitél réteg (ILM-RPE) között mértük, és µm-ben fejeztük ki, minden metszeten manuális skálát alkalmazva. A ganglion sejtrétegben található sejtek számát egységnyi távolságon belül (100 µm) szintén megszámláltuk. A kvantitatív analízishez csoportonként 6 szemet, szemenként pedig 6 metszetet vizsgáltunk.

A kutatás második részében a neurodegeneratív eltéréseket, amyloid pathológiát, valamint ezek esetleges javulását kívántuk igazolni hagyományos H&E, Kongó vörös festéssel, valamint

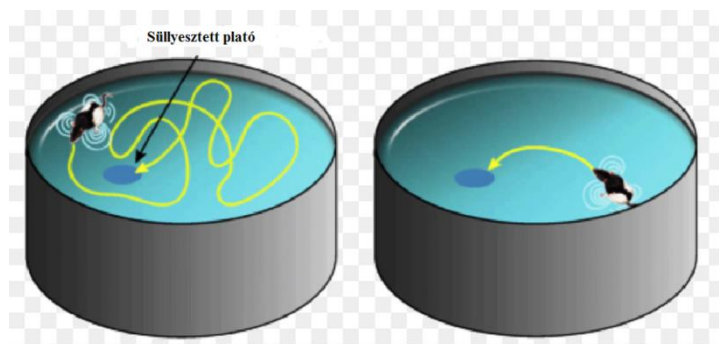
immunhisztokémiai módszerrel, speciális, amyloid fehérjéhez kötődő antitest segítségével. A három hónap elteltével az állatokat mély, általános anesztézia alatt 10 ml 4%-os PBS-sel majd ezt követően 30 ml 4%-os formaldehiddel perfundáltuk (4%-os, foszfát pufferben). Következő lépésként a patkányok agyát eltávolítottuk, a jobb hippocampust, frontális és temporális lebenyeket izoláltuk, és 24 óráig a fent említett fixáló oldatba, majd 72 órára 30 %-os szukróz oldatba helyeztük, végül paraffinba ágyasztuk. A beágyazott mintákból 7 μ m vastag metszeteket készítettünk, és a neurodegeneráció, valamint az A β kimutatás céljából H&E és Kongó vörös festékekkel festettük meg őket. Az így elkészült metszeteket fénymikroszkóppal elemeztük, polarizált fényt alkalmazva a Kongó vörössel festett metszetek analizálásához. A szemi-kvantitatív elemzéshez az esetleges amyloid plakkokat, valamint a Kongó vörössel festődő ereket megszámláltuk. A festődő erek mennyiségét az összes ér számához viszonyítottuk. Ilyen módon egy becsült értéket kaptunk, a 10X-es objektívet használva 10 látótérben megszámlálható erek alapján kalkulálva (100X-os nagyítás). Az így kapott érték (Kongó vörössel festődő erek/összes ér x 100) alapján 4 kategóriába soroltuk a metszeteket: (i) nem látható kóros ér (0%) (-); (ii) alacsony számú kóros ér (1-29%-) (+); (iii) közepesen mennyiségű kóros ér (30-69%-) (++); (iv) számos kóros ér (>70%) (+++).

Az immunhisztokémiai vizsgálatok kivitelezéséhez a metszeteket anti-amyloid β 1-42 antitesttel (Abcam, 1:200) festettük a gyári protokollnak megfelelően, majd fénymikroszkóppal elemeztük. A szemi-kvantitatív A β analízis a fent leírt Kongó vörös festéshez hasonló módon zajlott. Az A β 1-42 pozitív ereket számláltuk meg, és a 10 látómezőn található összes ér mennyiségéhez viszonyítottuk, 10X objektívet alkalmazva. Az eredmények alapján ez esetben is 4 kategóriát határoztunk meg a Kongó vörös festésnél leírtakkal azonos módon.

4.8. Morris water maze teszt

A kutatásunk második részében kíváncsiak voltunk az állatok térbeli memóriájára és kognitív képességeire, melyet Morris Water Maze (MWM) teszt segítségével mértünk fel. Ez a teszt az egyik legmegbízhatóbb, legjobban reprodukálható és leggyakrabban használt, ún. "gold standard" módszer a tanulási és térbeli memória megítélésére rágcsálók esetében [164]. A vizsgálat során egy 150 cm átmérőjű és 50 cm magas medencét egy kisméretű és csendes szobában helyeztünk el, és 30 cm magasságig feltöltöttünk ételfestékkel átlátszatlaná tett, szobahőmérsékletű vízzel. A medencét négy kvadránsra osztottuk, és a négy égtájnak

megfelelően geometriai alakzatokat ragasztottunk a medence falára, tájékozódási pontok gyanánt. Az egyik kvadráns közepére 10 cm átmérőjű, fém talppal rögzíthető, kör alakú pallót helyeztünk, a víz felszíne alá süllyesztve 1 cm-rel, így az az állatok számára láthatatlan volt. A fellépő helyzetét a tanulási időszak és a kísérlet alatt változatlanul hagytuk, így a patkányok memorizálhatták a helyzetét. A MWM tesztet kétszer végeztük el, a 3 hónapos rekreációs mozgás végrehajtása előtt és után, a hatás felmérése érdekében. Mindkét alkalommal három egymást követő napon, napi két próbálkozás erejéig történt a mérés. Az első nap, első próbálkozása volt az ún. betanítás, amikor az állatok megismerkedtek a vízzel, az úszással, a pallóval. Ezt követően éles próbákat hajtottunk végre, amelyek során az óvatos vízbe helyezés után a patkányoknak önállóan kellett megtalálniuk a pallót, ezáltal mentesülhettek az úszás alól. 60 másodperc állt rendelkezésükre, és amennyiben ennyi idő alatt nem találták meg a fellépőt, óvatosan odairányítottuk őket, az etikai szabályoknak megfelelően. A palló megtalálásához szükséges időt minden esetben stopperrel is mértük, illetve elektronikusan regisztráltuk. A napi 2 egymás utáni próbálkozás átlagát kiszámoltuk, és a 3 nap eredményeit egymáshoz viszonyítva állapítottuk meg, hogy képesek-e az állatok a tanulásra. A medencében való tartózkodásuk alatt videó „tracking” rendszerrel regisztráltuk az úszási mintázatot. (EthoVision 2002, Noldus Information Technology, The Netherlands).



12. ábra. Morris water maze teszt sematikus ábrája. Az állatnak a süllyesztett platót kell megtalálnia (nyíl). Az első medencében egy demens állat mozgása látszik, míg a második medencében egy tanulékony állat mozgása, aki a 3. nap végére célirányosan úszik a plató felé.

4.9. Kisállat pozitron emissziós tomográfia

Az időskorral asszociált neurodegeneratív eltérések és a specifikus amyloid pathológia analizálásához *in vivo* PET vizsgálatot végeztünk. A kísérleti állatok laterális farokvénáján keresztül $10 \pm 0,2$ MBq C^{11} - Pittsburgh compound B-t (PIB) juttattunk a keringési

rendszerükbe. A PIB egy speciális radiofarmakon, amely szelektíven kötődik az A β depozitumokhoz, ezáltal az agyban lerakódott kóros fehérje mennyisége és pozíciója *in vivo* vizsgálható. 30 perccel a farmakon beadása után általános anesztéziában részesítettük az állatokat (3 %-os izoflurán), kisállatok altatásához használható speciális eszköz segítségével. A következő 15 percen egy kisállat PET szkener alkalmazásával (MiniPET –II.) statikus single-frame PET vizsgálatot végeztünk [165]. A PIB A β -hoz történő szelektív kötődésének köszönhetően a mért jelintenzitás korrelál a kóros fehérje depozitumok mennyiségével, amit a SUV érték fejez ki.

4.10. Hemoxigenáz-1 aktivitásmérés

A kutatás második részében az állatok agyi hemoxigenáz-1 enzim aktivitására voltunk kíváncsiak, melynek meghatározását a Tenhunen és mtsai által kidolgozott módszer alapján végeztük, amely a biliverdin-bilirubin átalakulás mérésén alapul [166]. Az állatokat mély általános anesztéziában részesítettük, majd az eltávolított agyak bal féltékéből izoláltuk a frontalis és a temporalis kérget, valamint a hippocampust, majd ezeket a területeket homogenizáltuk (Ultraturrax T25; 13,500/s; 2 \times 20 s) a következő homogenizációs pufferben: 10mM N - [2-hidroxietyl] piperazin - N' - [2-etánszulfonsav] (HEPES), 32 mM szukróz, 1 mM ditiotritol (DTT), 0.1 mM EDTA, 10 μ g/ml szójabab tripszin inhibitor, 10 μ g/ml leupeptin, és 2 μ g/ml aprotinin; pH 7.4. Ezt az elegyet 30 percig centrifugáltuk, 4 °C-on, 20.000 g-n, majd összegyűjtöttük a keletkező felülúszót. Minden reakciós elegynek 1,5 ml volt a végső űrtartalma: 2 mM glükóz-6-foszfát, 0.14 U/ml glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, 15 μ M hem és 150 μ M β -nikotinamid-adenin-foszfát (NADPH). 120 μ g/ml patkány máj citoszolt használtunk biliverdin-reduktáz forrásként, és hozzáadtunk 2 mM MgCl₂-ot, 100 mM kálium-foszfát puffert és 150 μ l-t a felülúszóból, majd 60 percig, 37 °C-on, sötétben inkubáltuk. A 60 perc elteltével a minták jégre helyezésével állítottuk meg a reakciót. A keletkezett bilirubin mennyiségét a 460 nm és 530 nm-en mért optikai sűrűségek alapján kalkuláltuk. Az 1 egységnyi HO-1 aktivitást az 1 mg fehérjéből óránként keletkező bilirubin mennyisége (nmol) alapján határoztuk meg.

4.11. Statisztikai analízis

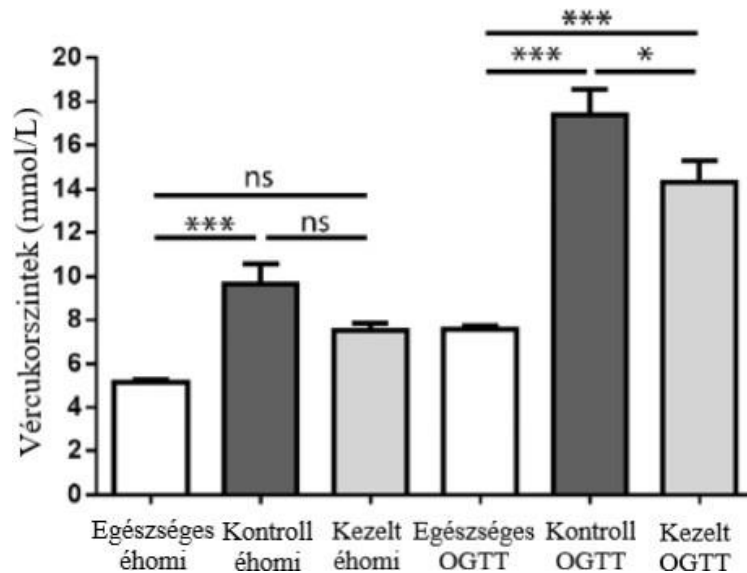
A D'Agostino & Pearson omnibusz normalitás teszt alapján kapott Gaussi értékek egyirányú

variancia analízisét végeztük Tukey vagy Neuman-Keuls poszt-tesztel a kutatás első fázisában. A kutatás második fázisában két adat egyeztetését párosítatlan (Student-féle) t-próbával végeztük. Kettőnél több adatscsoport összehasonlításához egyirányú ANOVA-t alkalmaztunk (Geisser-Greenhouse korrelációval) Tukey post-tesztel. A non-parametrikus eloszlású adatokat Kruskal-Wallis tesztel és Dunns poszt-tesztel értékeltük. Az eredményeket az átlagok standard hibájával ábrázoltuk (SEM).

5. Eredmények

5.1. Éhomi glükózsztint analízis és orális glükóz tolerancia teszt eredmények

A 11. ábra mutatja a három csoport tagjainak éhomi, valamint OGTT során mért glükózsztintjét. Az éhomi és OGTT során mért glükózsztintek az egészséges csoportban (5,137 mmol/L és 7,571 mmol/L) nem különböztek jelentősen egymástól, csakúgy, mint a másik két kísérleti csoportban sem. A beteg kontroll (ZDF) állatok éhomi glükózsztintje (9,626 mmol/L) viszont szignifikánsan különbözött az egészséges csoport tagjainak megfelelő értékétől, és láthatóan eltért a kezelt patkányok éhomi értékétől is, habár ez a különbség nem volt szignifikáns. A kezelt csoport éhomi glükózsztintje (7,510 mmol/L) nem különbözött jelentősen az egészséges állatok értékétől sem. Az OGTT során mért glükózsztintek tekintetében mindkét diabeteses csoport jelentős különbséget mutatott az egészséges állatokhoz képest: a kontrol csoport átlagértéke 17,41 mmol/L volt, míg a kezelt patkányok átlagértéke 14,330 mmol/L volt. A kezelt és kezeletlen csoport közötti különbség szintén szignifikáns volt ($p < 0,05$).



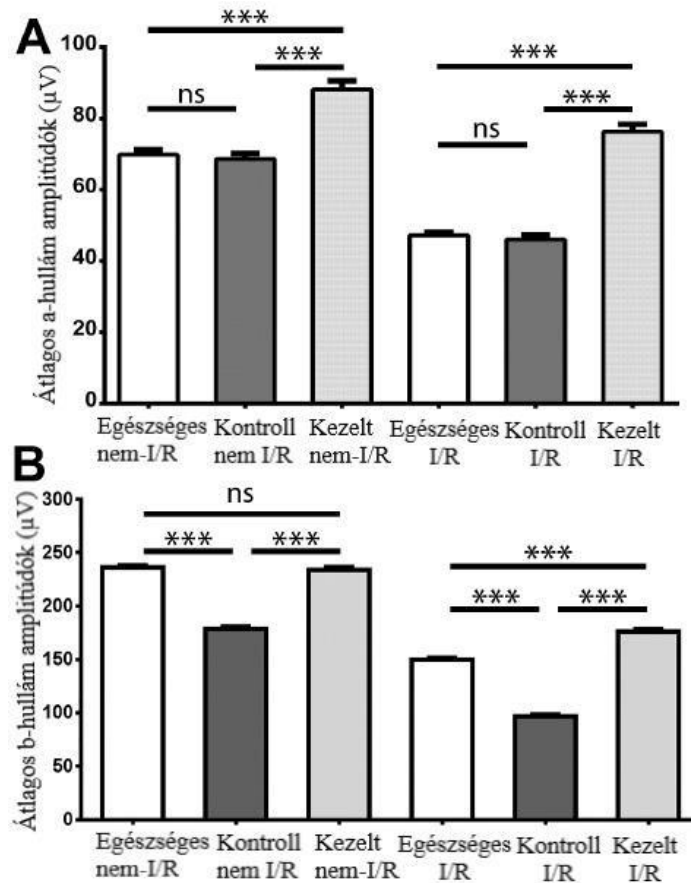
13.ábra. A különböző csoportok plazma glükózsintjei az OGTT előtt (éhomi) és után (társszerzővel közös eredmények). Az adatok a csoportok átlagértékei \pm SEM mmol/L-ben kifejezve. ns=nem szignifikáns különbség; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

5.2. Electroretinographia

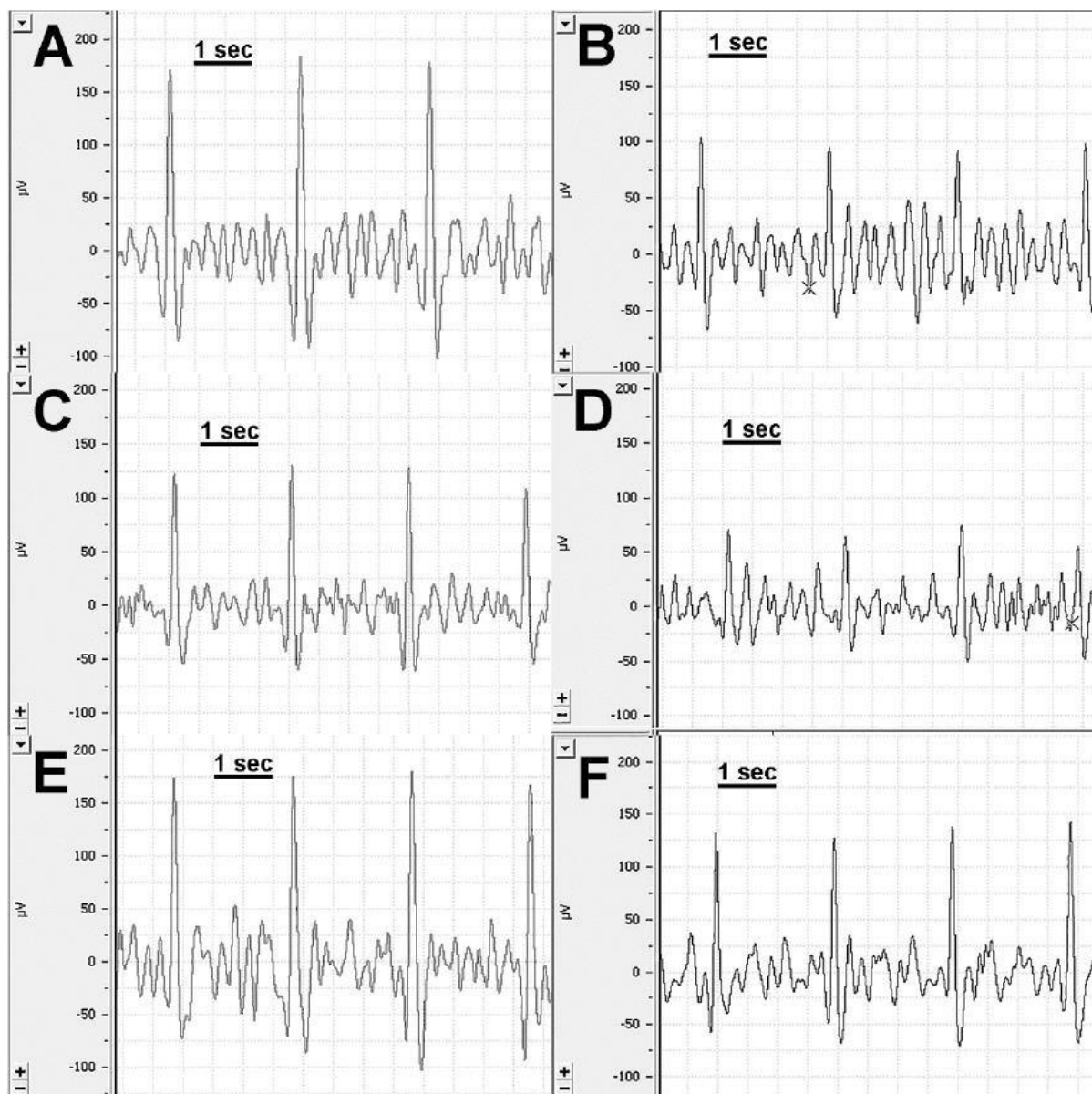
A kísérlet első fázisában történt ERG-mérések eredményeit a 12. ábra szemlélteti, melyen a három csoport állatai esetén mért a- és b-hullámok átlagos amplitúdója (12A, illetve 12B ábra) látható. A 13. ábrán minden csoportból egy-egy reprezentatív electroretinogram látható. A nem-I/R adatokat összehasonlítva észlelhető, hogy a SCSE-kezelés szignifikánsan növelte az a- és b-hullámok amplitúdóját a kontroll csoporthoz viszonyítva (88,11 μ V vs. 68,61 μ V az a-hullámokat nézve, és 233,9 μ V vs. 178,7 μ V a b-hullámokat tekintve; $p < 0,001$ mindkét esetben); sőt, a kezelt csoport átlagos b-hullám amplitúdója nem különbözött jelentősen az egészséges állatok ezen értékétől (233,9 μ V vs. 236,2 μ V). Az a- hullámok esetén, az előbb említett összehasonlítás szignifikáns eltérést eredményezett a kezelt és egészséges nem-I/R értékek között, a kezelt csoport értéke magasabb (88,11 μ V vs. 69,85 μ V) volt.

Ami az I/R értékeket illeti, megállapítható, hogy szignifikáns különbség mutatkozik a kontroll csoport és az egészséges csoport b-hullám amplitúdói között (96,83 μ V vs. 149,9 μ V; kontroll vs. egészséges; $p < 0,001$), míg az SCSE-kezelés jelentősen emelte ezt az értéket (176,2 μ V; $p < 0,001$ vs. kontroll). Kiemelendő, hogy a kezelt csoport I/R b-hullám amplitúdója szintén jelentősen jobbnak bizonyult, mint az egészséges állatok I/R b-hullám nagysága (kezelt vs. egészséges; $p < 0,001$). Hasonlóan, a meggy-mag-kivonat hatására a kezelt csoportban jobb a-

hullám eredményeket mértünk az I/R után, mint akár a kontroll, akár az egészséges csoportban (76,28 μV vs. 47,15 μV vagy 45,98 μV kezelt vs. egészséges vagy kontroll; $p < 0,001$ mindkét összehasonlításban).



14.ábra. ERG eredmények (társszerzővel közös eredmények). (A) Átlagos a-hullám amplitúdók; (B) átlagos b-hullám amplitúdók; Fényhullámok által előidézett átlag retinális a- és b-hullám amplitúdók, melyeket nem-I/R, valamint I/R körülmények között is regisztráltunk. Az adatok az átlagértékek \pm SEM mikro- voltban (μV) kifejezeve. ns=nem szignifikáns; *** $p < 0,001$.



15.ábra. Reprezentatív electroretinogramok az egyes kísérleti csoportokból.

5.3. Hemoxigenáz-1 koncentráció

A különböző csoportok szemszöveiben történt hemoxigenáz-1 koncentráció mérések – melyeket a kísérlet első részében végeztünk – eredményeit a 14. ábra mutatja. Mint ahogy az látható az ábrán, az enzim szöveti koncentrációja statisztikailag megegyezett az egészséges és a kontroll csoportban, mind ischaemia előtt, mind pedig ischaemia után (1,170 vs. 1,115 a nem- I/R állapotban és 1,717 vs. 1,469 I/R állapotban). A nem-I/R állapotú szemek esetében jelentős expresszió fokozódás figyelhető meg a SCSE-kezelt csoportban, akár az egészséges, akár a kontroll állatokhoz hasonlítjuk őket (2,963; $p < 0,05$ vs. kontroll és $p < 0,001$ vs.

egészséges). Az ischaemiás állapotban megfigyelhető protein koncentráció emelkedés az oka annak, hogy az egészséges és kezelt csoport eredményei között csökkent a különbség, mindazonáltal a kezelt patkányok átlagos koncentráció értékei még mindig jelentősen magasabbak voltak, mint az egészséges állatok értékei (2,934; $p < 0,05$ vs. egészséges/kontroll).

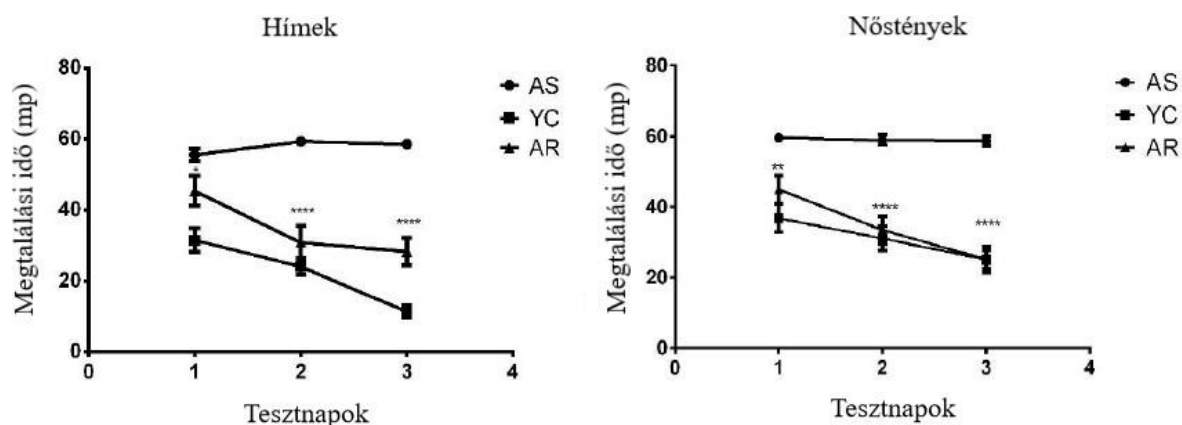


16.ábra. A HO-1 koncentráció mérésének eredményei (társszerzővel közös eredmények). (A) Nem-I/R állapotban lévő szemek; (B) I/R-n keresztül ment szemek. A mérések alapján becsülhető a különböző csoportba tartozó patkányokból eltávolított szemek hemoxigenáz-1 enzim koncentrációja (ng) a totál protein mennyiséghez (mg) viszonyítva. Az adatok átlagértékek \pm SEM ng/mg-ban kifejezve; ns=nem szignifikáns különbség; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

5.4. Kognitív funkciók eredmények

A kísérlet második felében a 3 hónappal korábbi mozgás kognitív képességekre kifejtett hatását kívántuk felmérni a MWM teszt segítségével. Az eredményeket a 15. ábra mutatja. A plató eléréséhez szükséges „megtalálási időt” regisztráltuk. Az idős, inaktív életmódot

folytató csoport tagjainak (nemtől függetlenül) szignifikánsan több időbe telt a fellépő megtalálása, mint a fiatal kontroll, valamint az idős, rendszeresen mozgó csoport tagjainak, és teljesítményükben nem mutatkozott javulás a teszt 3 napja alatt sem ($p < 0.001$). Ezzel szemben a rendszeresen mozgó idős, valamint a fiatal állatok is napról-napra jobban teljesítettek. A teljesítmény-különbséget az idős hím, illetve nőstény csoportok teljesítményének átlagai közötti különbség szemlélteti: 1. nap: 10.15 mp, $p = 0.038$ (idős inaktív hímek vs. idős futó hímek); 14.60, $p < 0.01$ (idős inaktív nőstények vs. idős futó nőstények); 2. nap: 28.45, $p < 0.001$ (idős inaktív hímek vs. idős futó hímek); 25.45, $p < 0.001$ (idős inaktív nőstények vs. idős futó nőstények); 3. nap: 30.25, $p < 0.001$ (idős inaktív hímek vs. idős futó hímek), 33.55, $p < 0.001$ (idős inaktív nőstények vs. idős futó nőstények).



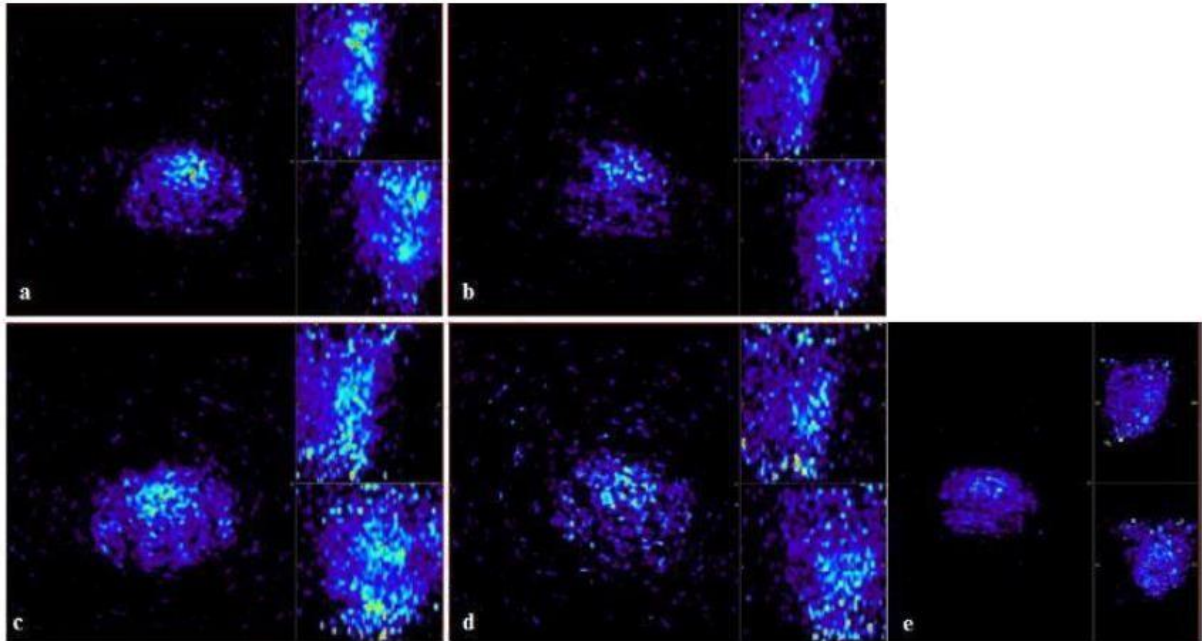
17.ábra. A rekreációs mozgás hatása a különböző csoportok MWM teszt során nyújtott teljesítményére. AS: idős inaktív állatok; YC: fiatal kontroll állatok; AR: idős futó állatok. Az adatok átlagértékek \pm SEM; **** $p < 0,0001$ az idős inaktív állatok eredményeihez viszonyítva.

5.5. *In vivo* pozitron emissziós tomográfia vizsgálattal azonosított agyi eltérések

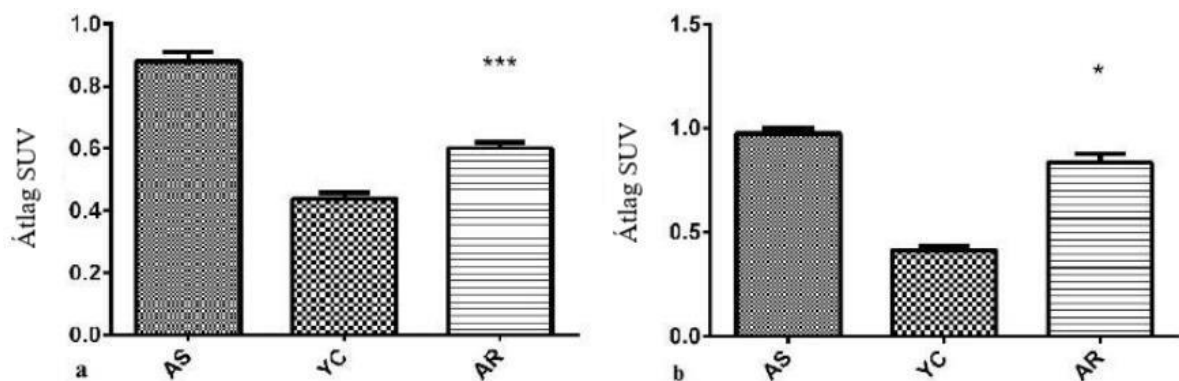
A PET vizsgálatot a kísérlet második fázisában minden csoporton elvégeztük, az eredményeket a 16. ábra reprezentálja, a statisztikai elemzés a 17. ábrán látható. Az idős, inaktív életmódot folytató patkányok agyában szignifikánsan intenzívebb PIB retenciót tapasztaltunk, mint a fiatal kontroll állatokéban. A PIB felhalmozódás, vagyis a SUV átlaga a következőképpen alakult. Idős nőstények: 0.87 ± 0.029 vs. fiatal kontroll nőstények: $0.43 \pm$

0.02; idős hímek: 0.97 ± 0.024 vs. fiatal kontroll hímek: 0.41 ± 0.01 ($p < 0.001$ mindkét nem esetében). Az idős, futó állatok adatainak elemzése azt mutatta, hogy a rendszeres testmozgás hatására a PIB retenció mértéke jelentősen csökkent ($p = 0.0119$ a hímek és $p < 0.001$ a nőstények esetében).

A fenti adatok alapján nembeli különbségeket is megállapíthatunk, miszerint az idős, futó hímek agyában fokozottabb volt a PIB retenció, mint a nőstényeknél, ez azonban nem korrelál az állatok MWM teszten nyújtott teljesítményével, ahol egyformán jól szerepeltek.



18.ábra. PET felvételek (egy coronalis és két horizontális metszet minden egyes képen). (a, c.) idős, inaktív nőstények (ASF) és hímek (ASM); (b, d) idős, futó nőstények (ARF) és hímek (ARM); (e) fiatal kontroll állat (társszerzővel közös eredmények).

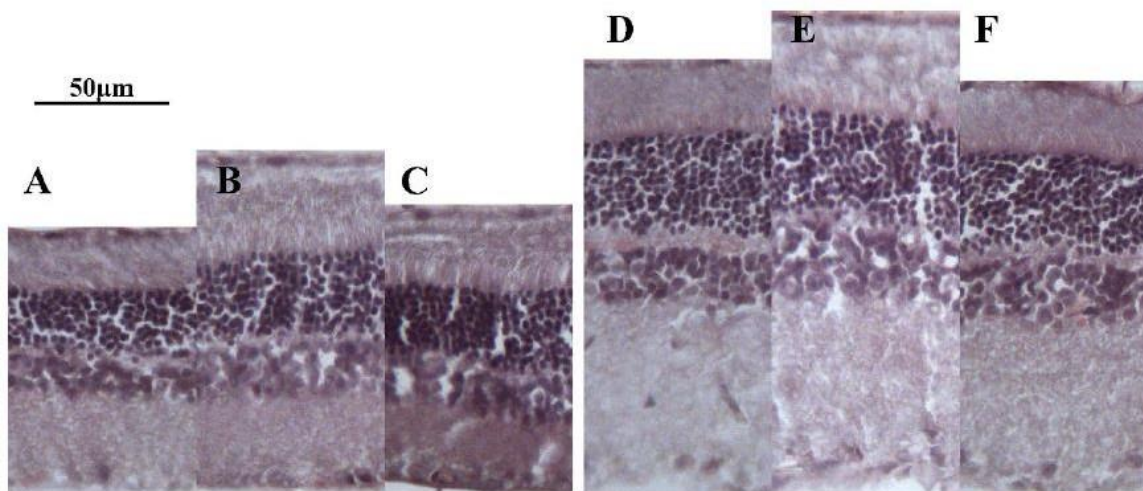


19.ábra. A PIB retenció statisztikai értékelése. (a) nőstények; (b) hímek. Az adatok átlagértékek \pm SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ az idős, inaktív állatok értékeihez viszonyítva.

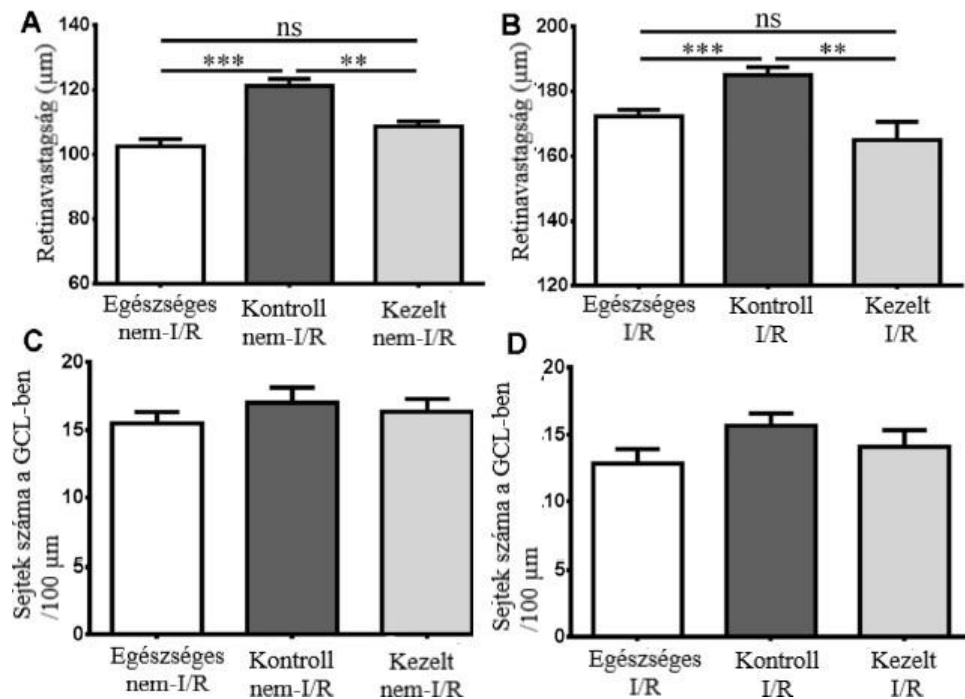
5.6. Szöveti eredmények

5.6.1. Retina

A kutatásunk első felében, a különböző csoportokból származó szemszöveteken elvégzett vizsgálat reprezentatív képeit a 18. ábra, kvantitatív eredményeit a 19. ábra szemlélteti. Ahogy az látható az ábrán, a kontroll csoport nem-I/R állapotú retinái jelentősen vastagabbak, mint az egészséges állatok retinái (121,3 μm vs. 102,4 μm , $p < 0,001$) – ez nagy valószínűséggel oedema képződésre utal –, míg a kezelt patkányok retinájának vastagsága (108,7 μm) nem különbözött jelentősen az egészséges patkányokétól, azonban szignifikánsan eltért a kontroll csoport nem-I/R értékétől ($p < 0,01$). Hasonló összefüggés állapítható meg az I/R után mért értékek alapján (172,3 μm vs. 185,0 μm vs. 165,0 μm). Az egységnyi távolságon belül (100 μm) található átlagos ganglion sejtszámot tekintve nem mutatkozott szignifikáns különbség az egyes csoportok között, sem ischaemia előtt (15,50 vs. 17,00 vs. 16,33, megfelelően), sem az ischaemia/reperfusio után (12,83 vs. 13,67 vs. 11,35).



20.ábra. Reprezentatív képek az egyes csoportok retinájának szövettani metszeteiről. A) egészséges, nem- I/R; B) kontroll , nem-I/R; C) kezelt, nem-I/R; D) egészséges, I/R; E) kontroll, I/R; F) kezelt, I/R.

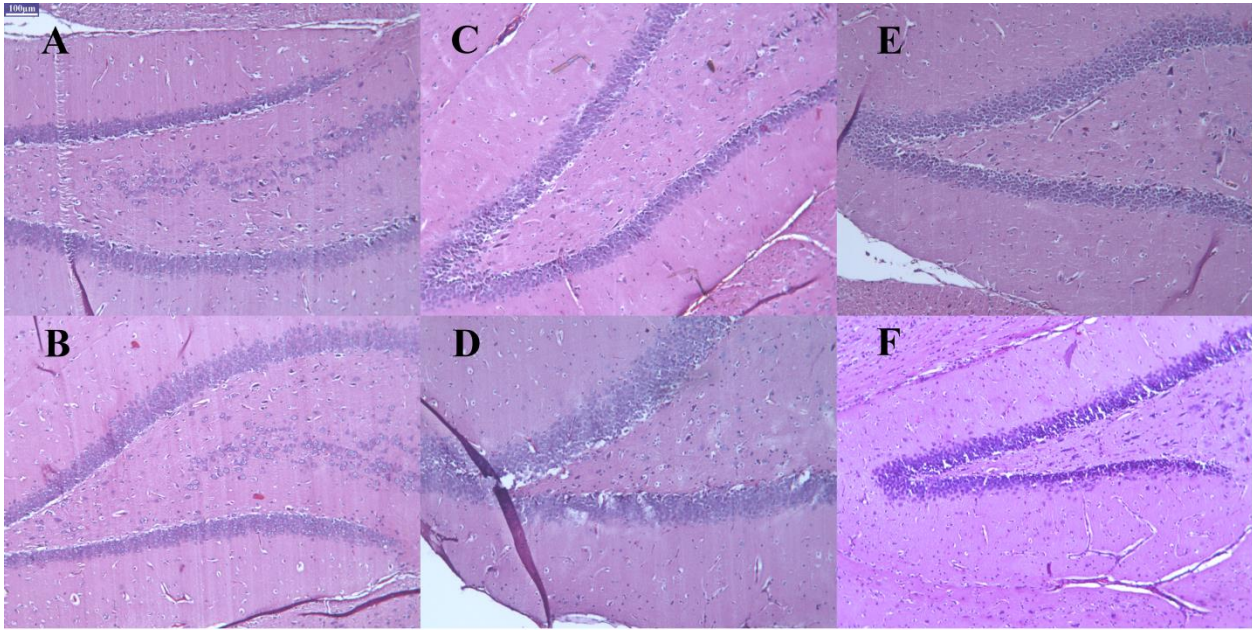


21.ábra. Szövettan eredmények. (A) a különböző csoportok retinavastagsága az I/R előtti állapotban; (B) a különböző csoportok retinavastagsága az I/R utáni állapotban; (C) sejtek száma a ganglion sejtrétegben egységnyi távolságon (100 µm) belül I/R előtti állapotban (D) sejtek száma a ganglion sejtrétegben egységnyi távolságon (100 µm) belül I/R utáni állapotban. Az adatok csoporton belüli átlagértékek ± SEM; ns=nem szignifikáns különbség; ** p<0,01; *** p<0,001. A C és D részben nem látható szignifikáns különbség.

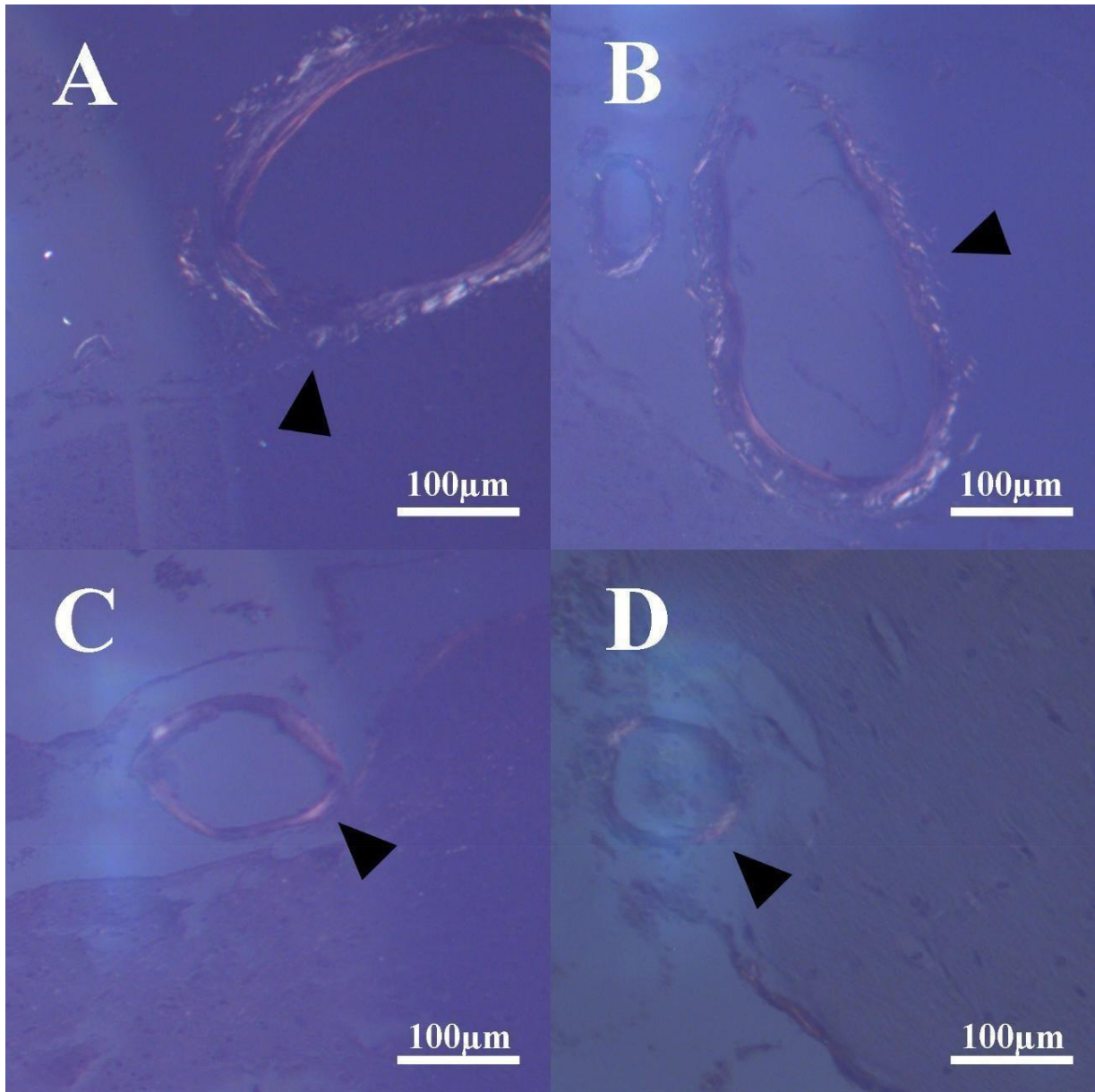
5.6.2. Hematoxylin-eosin és Kongó vörös festéssel detektálható agyi elváltozások

A kísérleti állatok agyszövetéből készült sagittális metszetek H&E és Kongó vörössel történő megfestésével jelentős neurodegeneratív elváltozásokat azonosítottunk az AS csoportban, melyek teljesen hiányoztak a fiatal kontroll állatoknál. Ezek az elváltozások magukban foglalták a piramis réteg eltéréseit, neuronvesztést, valamint súlyos pericelluláris oedemát a gyrus dentatus területén. A 3 hónapos rekreációs mozgást végző állatok esetében is megfigyeltünk hasonló pathológiás jeleket, azonban lényegesen kisebb mértékben. A H&E festés eredményeit a 20. ábra mutatja. Az Aβ pathológia kimutatására Kongó vörös festést használtunk. Amyloid plakkokat nem tudtunk azonosítani, de fokozott mértékű amyloid angiopathia mutatkozott az idős, inaktív életmódot folytató csoportokban, az elváltozást a 21. ábra szemlélteti. A Kongó vörössel festődő erek aránya, valamint a festődés intenzitása szignifikánsan magasabb volt a mozgást nem végző állatok esetében ($32.4 \pm 2.237\%$ hímekben és $27 \pm 0.89\%$ nőstényekben), mint a futó csoportokban ($13.60 \pm 0.77\%$ hímekben és $13.60 \pm 0.77\%$ nőstényekben).

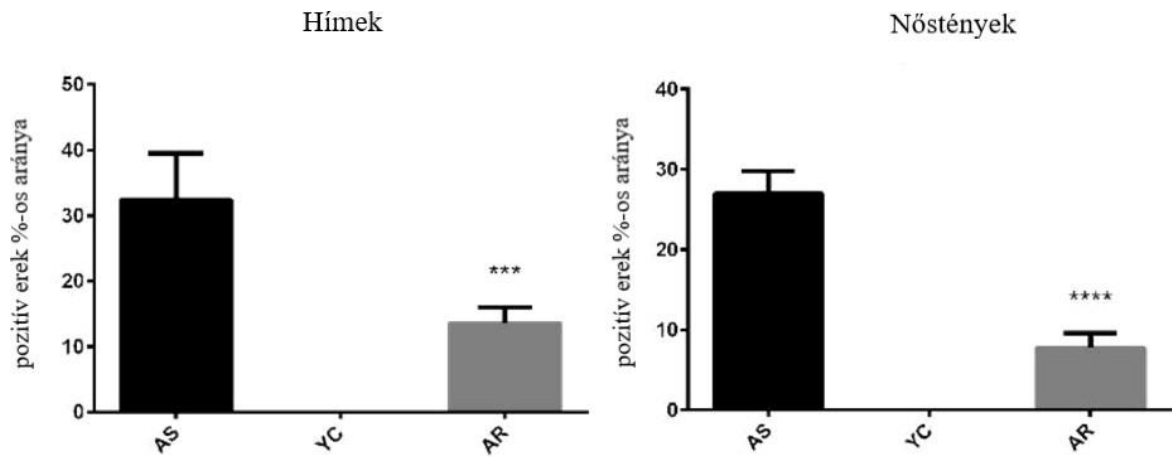
és $7.8 \pm 0.57\%$ nőstényekben) ($p < 0.001$ mindkét esetben, 22. ábra).



22.ábra. Hematoxylin-eosinnal festett metszetek (100X-os nagyítás). A-B) Fiatal kontroll hím és nőstény állatból származó hippocampus – a neuronok elhelyezkedése szabályos; C-D) Idős, nem futó hím és nőstény állatból származó hippocampus – a neuronok elhelyezkedése felbomlott, nagyfokú oedemaképződés, illetve sejtpusztulás figyelhető meg E-F) Idős, futó hím és nőstény állatból származó hippocampus – a neuronok egymáshoz viszonyított elhelyezkedése rendezettebb, csökkent az oedemaképződés mértéke.



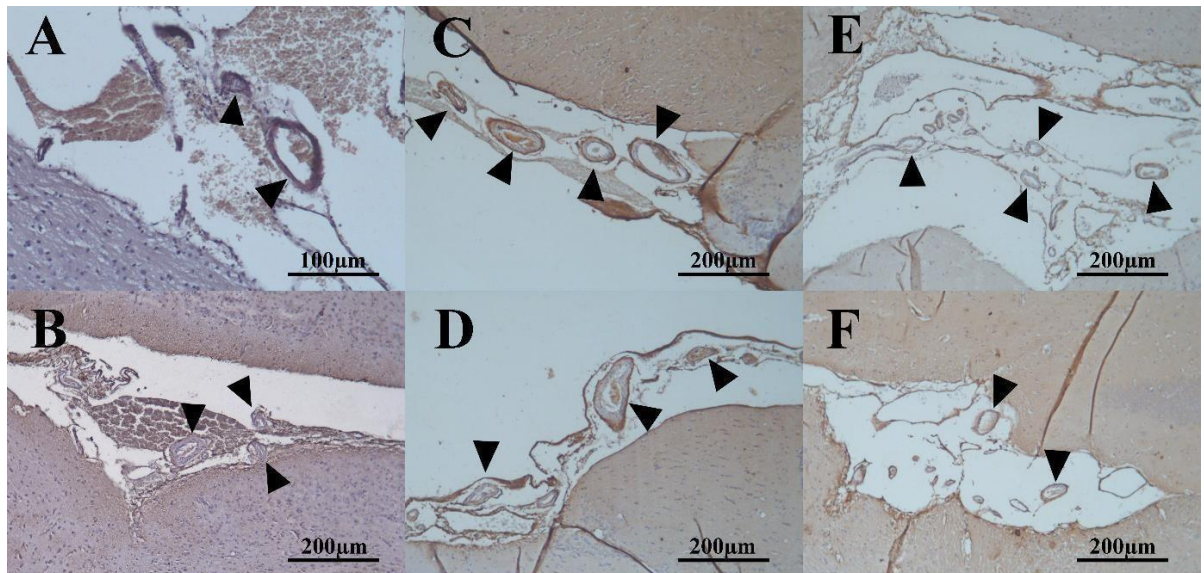
23.ábra. Kongó vörös festéssel azonosított amyloid angiopathia (100X-os nagyítás). A-B) Idős, inaktív hím és nőstény agyából készült metszet polarizált fény alatt. A fekete nyílhegyek által jelölt világos területek képviselik az érfalban található amyloid-típusú depozitumokat; C-D) Idős, futó hím és nőstény agyából készült metszet polarizált fény alatt. Kevesebb amyloid-típusú felhalmozódás látható az érfalban.



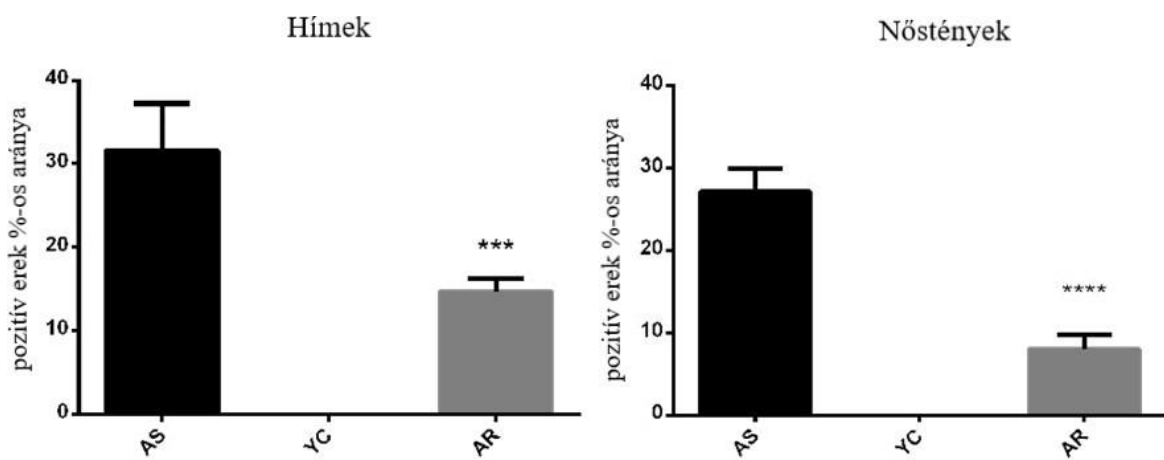
24.ábra. Cerebralis amyloid angiopathia statisztikai analízise. Az adatok csoportonkénti átlagértékek \pm SEM; AS (aging sedentary): idős, ülő; YC (young control): fiatal kontroll; AR (aging running): idős, futó; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ az idős, inaktív csoporthoz viszonyítva.

5.6.3. Immunhisztokémia

Az időskorral asszociált cerebralis amyloid angiopathia immunhisztokémiai jelöléssel is detektálható volt, melyet a 23. ábra reprezentál. A Kongó vörös festéshez hasonló csoportok közötti eltéréseket tapasztaltunk. A rekreációs mozgást végző idős állatok agyában lényegesen kisebb volt az anti-A β antitest pozitív erek aránya ($14.70 \pm 0.47\%$ hímekben és $8 \pm 0.55\%$ nőstényekben), mint az idős, inaktív patkányok esetén ($31.6 \pm 1,78\%$ hímekben és $27,1 \pm 0.9\%$ nőstényekben). A különbség nemtől függetlenül szignifikáns volt (24. ábra).



25.ábra. Immunhisztokémiával kimutatott amyloid angiopathia. A barna szín felel meg az amyloid-típusú depozitumoknak az érfalban, a nyílhegyek jelzik az érintett ereket. A-B) Szöveti metszetek fiatal kontroll hím és nőstény patkány agyából; C-D; idős, inaktív híméből és nőstényéből származó metszetek; E-F) Idős, futó hím és nőstény szöveti metszetei.

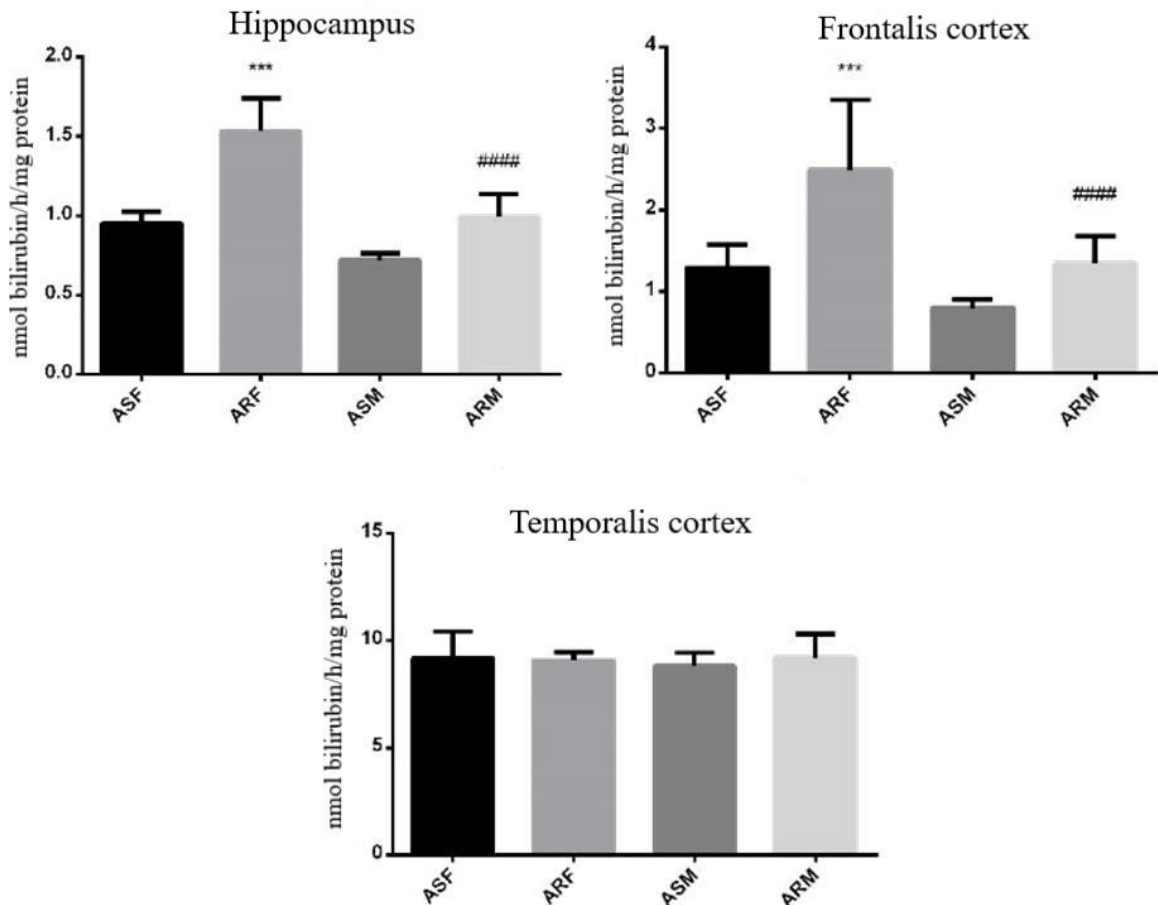


26.ábra. Az immunhisztokémiai vizsgálat statisztikai elemzése. Az adatok csoportonkénti átlagértékek \pm SEM; AS (aging sedentary): idős, ülő; YC (young control): fiatal kontroll, AR (aging running): idős, futó; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.7. Hemoxigenáz-1 aktivitás

A HO-1 aktivitásvizsgálat eredményeit a 25. ábra szemlélteti. Az idős, nem futó nőstények

(1.3 ± 0.08 és 0.95 ± 0.02 nmol/h/mg fehérje) és hímek (0.8 ± 0.03 és 0.72 ± 0.04 nmol/h/mg protein) frontális és temporalis agykérgi területein, valamint a hippocampusukban alacsony enzimaktivitást mértünk. Mindazonáltal a rendszeres fizikai aktivitás szignifikánsan magasabb HO-1 aktivitást eredményezett a futó idős patkányok azonos agyterületein mind a nőtények (2.49 ± 0.08 , $p < 0,001$ és 1.53 ± 0.06 nmol/h/mg protein, $p < 0,001$), mind a hímek (1.35 ± 0.1 , $p < 0,001$ és 0.99 ± 0.04 nmol/h/mg protein $p < 0,001$) vonatkozásában.



27.ábra. Frontális kéreg, temporalis kéreg, valamint hippocampus területi HO-1 aktivitás az idős csoportok szerint ábrázolva. ASF (aging sedentary females): idős, inaktív nőtények; ARF (aging running females): idős, futó nőtények; ASM (aging sedentary males): idős, inaktív hímek; ARM (aging running males): idős, futó hímek; *** $p < 0,001$; ##### $p < 0,001$ (társszerzővel közöseredmények).

6. Megbeszélés

A PhD munkám során a táplálkozás és rekreatív testmozgás életkorral és életmóddal összefüggő kórállapotokra gyakorolt hatását vizsgáltam a DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet kutatócsoportjának keretein belül. A kutatás első részében, a flavonoidban gazdag *Prunus cerasus* (meggy) kivonat ZDF patkányok (2-es típusú diabetes modell) glükózsintjére, retinafunkciójára és HO-1 koncentrációjára gyakorolt hatását igyekeztünk felmérni. Az electroretinographia segítségével a diabeteshez kapcsolt retinafunkció-változást, az I/R sérülés hatásait, illetve ezek kombinációját, SCSE kezelés mellett vagy anélkül detektáltuk. Továbbá kvantitatív vizsgálatokat is végeztünk a különböző csoportok retina szövetében, úgymint HO-1 enzim koncentrációváltozása, a retina vastagságának mérése és a ganglionáris sejtréteg egységnyi távolságra jutó sejteinek megszámolása.

A 2-es típusú diabetes mellitus egy metabolikus rendellenesség, melyet károsodott szénhidrát anyagcsere, csökkent mértékű inzulin szekréció és az inzulin receptort expresszáló sejtek csökkent inzulin érzékenysége jellemez. Közismert, hogy ezen betegek körében rendkívül gyakori a retina károsodása. Az életkorhoz kötött maculadegeneráció után a diabeteses retinopathia a második vezető oka a felnőttkori vakságnak Magyarországon [167].

Az OGTT méréseink alapján, a meggy-kivonat egy kismértékű, de szignifikáns plazma glükózsint csökkentő hatást produkált: a diabeteses állatok glükózsintje magasabb volt, mint az egészséges állatoké, azonban a kezelt csoport orális glükózterhelést követő értékei javultak a beteg kontroll csoporthoz képest. Ez az eredmény azzal magyarázható, hogy jóval azelőtt, hogy a valós (éhomi) hyperglycaemia – ezáltal a klinikai diabetes – megjelenik a betegek esetében, glükóztolerancia fejlődik ki az inzulin rezisztencia talaján, amely állapotot – a 2-es típusú diabetes kifejlődését tekintve – a legjelentősebb klinikai előjelzőnek tartják [168].

Számos tanulmány igazolta korábban, hogy a gyümölcsökben, zöldségekben, gyógynövényekben található növényi hatóanyagoknak számos jótékony hatása van az egészségre, mint pl.: daganatos, illetve cardiovascularis megbetegedések vagy éppen az elhízás megelőzése [169]. Lauchin és mtsai. nemrégiben publikálták eredményeiket, melyek szerint a különböző meggy- és cseresznyefélék (pl.: sárga cseresznye, édes cseresznye, meggy) szignifikánsan képesek csökkenteni a plazma glükóz szintjét, ezáltal jótékonyan befolyásolhatják a diabeteses állapot kimenetelét [170]. Kutatásunk adatai új eredményekkel

járulnak hozzá ehhez a feltevéshez, miszerint a meggymagból készült kivonat antidiabetikus hatású lehet, valamint csökkentheti a diabetes szövődésének valószínűségét vagy súlyosságát.

Az electroretinographiás vizsgálatok eredményei betekintést engednek a diabetes mellitus retinafunkciót károsító hatásába (összehasonlítva a diabeteses és egészséges állatok nem-I/R-s eredményeit), és lehetővé teszi az I/R-s állapotú és a normál állapotú retinák funkciójának összehasonlítását a különböző csoportokban. Jelen tanulmányunknak egyik fontos eredménye, a fotoreceptorok, illetve a fotoreceptorok mögötti retinális sejtek (tehát a belső nukleáris sejtréteg sejtjei) elektrofiziológiai funkciójában bekövetkezett javulás kimutatása, amint az a meggymag-kivonattal kezelt, illetve kontroll állatok nem-I/R-s állapotú electroretinogramjainak összehasonlításából látható. A magas glükózsztint ellenére a kezelt csoport nem-I/R állapotú retinafunkciója közel egyenlő volt az egészséges kontroll csoportéval, ami szintén nagy felfedezés. Ez azt jelenti, hogy a meggymag-kivonat képes volt megelőzni a T2DM által okozott retinális funkciókárosodást, legalább a funkcionális szinten: a kezelésnek köszönhetően a hyperglycaemia nem tudta károsítani sem a fotoreceptorok, sem a postreceptorális útvonal sejtjeinek működését. Korábbi kutatók igazoltak hasonló retinoprotektív hatást rezveratrol kezelés [171], illetve GLP-1 analógokkal (pl.: exenatid, liraglutid) történő kezelés során [172, 173].

Számtalan szemészeti rendellenesség összefüggésbe hozható a retina I/R sérülésével, köztük a diabeteses retinopathia is [76]. A jelen tanulmányban alkalmazott egyszerű I/R provokációs eljárással betekintést nyertünk a T2DM retinakárosító következményeibe. Az I/R ideje alatt készült electroretinogramokat vizsgálva azt a következtetést vonhatjuk le, hogy bár a beteg kontroll csoport retinafunkciója lényegesen rosszabb, mint az egészséges állatoké, a meggymag-kivonat szignifikáns javulást eredményezett a diabeteses patkányok retinafunkciójában. Ezenkívül, a meggymag-kivonattal kezelt csoport tagjai jelentősen jobb retinális teljesítményt mutattak, mint az egészséges állatok. Ez az új eredmény azt a feltételezést támasztja alá, hogy a meggymag-kivonat képes lehet az I/R által okozott retinakárosodás funkcionális szinten történő megelőzésére, még diabeteses állapotban is. Szabó és mtsai. korábban már publikáltak érdekes eredményeket a meggymag-kivonat I/R ellenes hatásával kapcsolatban nem diabeteses patkánymodellekben [24] [24], valamint az α -MSH és PACAP kezelés hasonló hatásait illetően [18, 163]. További lehetőségeket olvashatunk a tudományos szakirodalomban a diabetesben bekövetkező I/R-s retinakárosodás kezelésére vagy megelőzésére vonatkozóan, mint pl. a GLP-1 analóg, exenatid kezelés

hatásait [74].

A hemoxigenáz-1 enzim fontos szerepet játszhat a meggymag-kivonat diabetesben megjelenő retinavédő hatásában, amint az a HO-1 koncentrációmérésekből megállapítható. Az emelkedett glükózértékek stresszfaktorként jelenhetnek meg a retina számára, mivel ennek a jól ismert stresszfehérjének a mennyisége – ha nem is szignifikánsan, de azért jól láthatóan – megemelkedik a beteg csoportban az egészséges, alacsony glükózsztű állatokhoz viszonyítva. A meggymag-kivonattal történő kezelés tovább emelte ennek a védő enzimnek a szintjét, ami hozzájárulhat a kivonat glükózsztű-csökkentő hatásához. A meggymag-kezelést követően korábban is hasonlóan emelkedett enzimszintek mutatkoztak a nem diabeteses patkányok más szöveteiben is [7, 27], illetve a retinában szintén [24]. Ennek a kutatásnak az új felfedezése, hogy a meggymag-kivonat HO-1 enzimszint emelő hatása diabeteses körülmények között is érvényesül.

Az I/R károsítja a retinát [18], illetve más szöveteket is [16]. A kutatásunk alapján a hemoxigenáz-1 szintje megemelkedhet ilyen típusú károsodás esetén. A diabeteses állatokban (kontroll I/R csoport) azonban a diabetes és az I/R hatásai összeadódnak, ami összefüggésbe hozható a hemoxigenáz-1 koncentrációjának csökkenésével. A magas glükózsztű káros hatásainak ellenére a meggymag-kezelés magasabb enzimszintet eredményezett, mint az egészséges csoportban mért értékek, ami új eredménynek számít, és ami az oka lehet a kivonat I/R ellenes védőhatásának. Tudomásunk szerint ez a tanulmány az első, ami a meggymag-kivonat diabeteses állapotban megmutatózó, HO-1 túltermeléshez kapcsolt retinoprotektív hatására világít rá. A gyógynövények körében jelenlévő hasonló hatásmechanizmusról már hallhattunk korábban: a kékáfonya antocianinjainak retinoprotektív hatásai szintén az Nrf2/hemoxigenáz-1 útvonalon keresztül alakulnak ki [2]. Saját, illetve más szerzők korábbi eredményei alapján elmondható, hogy a hemoxigenáz-1 egy igen erős protektív ágens az I/R károsodásokkal szemben [13, 19, 33], amely tényt jelen kutatásunk is alátámasztja. Mindazonáltal szükséges lenne további lehetséges mechanizmusokat is megvizsgálni, hogy elősegítsük a meggymag-kivonat pontos hatásának mélyebb megértését. A jövőbeli kutatások magukban foglalhatják a hypoxia- indukált faktor 1 α (HIF1- α), HIF2- α vagy különböző hősokkfehérjék, mint a Hsp60 vagy 90 esetleges szerepének vizsgálatát.

A meggymag-kivonat képes volt ellensúlyozni a T2DM oedema indukáló hatását, mint ahogy az a kezelt, nem I/R-s és beteg kontroll, nem I/R retinavastagságok összehasonlítása alapján látható. Az I/R sérülés szintén okozhat oedemát [161], melyet a meggymag-kezelés képes volt kompenzálni, az I/R sérülést szenvedett retinák összehasonlítása alapján. Ezek az új

eredmények nem egyedülállóak a gyógynövények között: hasonló protektív hatásokról számoltak be a *Lycium barbarum* [174, 175], a ginzénoidok [176] vagy a *Flos puerariae* [177] kezelések kapcsán is.

Eredményeink alapján a ganglion sejtek száma nem változott szignifikánsan. Ennek oka valószínűsíthetően az ischaemia és a mintavétel között eltelt relatíve rövid időintervallum: az I/R folyamata retinális oedemával indul, melyet strukturális degeneratív elváltozások követnek – mint a következményes sejthalál, pl.: a ganglion sejtek számának csökkenése –, amelyek kifejlődéséhez több idő szükséges [161].

Mindent összegezve, az általunk bemutatott adatok alapján a meggymag-kivonat képes lehet a magas glükózsztint káros hatásának kivédésére, és a retina I/R-s sérülésektől való megóvására diabeteses körülmények között. Habár ez a kivonat nem az elsődlegesen választandó a glükózsztint csökkentésére, számos más hatóanyag áll rendelkezésünkre erre a célra, és egy ágensnek lehet potens retinoprotektív hatása diabeteses retinopathia esetén annak ellenére, hogy a glükózsztint érdemben nem befolyásolja [173]. Az ilyen szinergista hatású szerek formulációja – legyen akár növényi eredetű, akár nem – eredményezheti azt, hogy végül képesek lehetünk megoldani egy olyan kezelhetetlennek hitt állapotot, mint a diabeteses retinopathia. Ebből a szempontból kutatásunk klinikai szempontból is releváns információkat tár fel. A meggymag-kivonaton alapuló jövőbeli terápiás hatóanyagok kifejlesztése gyógyszerészeti jelentőséggel is bírhat.

Kutatásunk második felében a rekreatív testmozgás szerepét, illetve ennek lehetséges molekuláris hátterét vizsgáltuk időskori, Alzheimer-típusú demencia modellben. Az AK egy krónikus neurodegeneratív betegség, amely a leggyakoribb oka az idős populációban megjelenő demenciának. Klinikailag a kognitív képességek – mint a memória, kommunikáció, ítéletalkotás és gondolkodás – fokozatos elvesztése jellemzi. A betegség további jellemzői a hangulatváltozások, személyiségbeli eltérések és progresszíven kóros viselkedés. A betegség késői stádiumában az érintett betegek saját maguk ellátására is képtelenné válhatnak [178]. A háttérben húzódó pathomechanizmus magában foglalja az amyloid- β oligomerek felhalmozódását és senilis plakkokká történő aggregációját, mely az érintett sejtek metabolizmusát károsítja, központi idegrendszeri gyulladást okozva. Ezek a folyamatok a tau fehérje – mely normál körülmények között a mikrotubulusok stabilizálásáért felelős – hyperfoszforilálódásához vezetnek, ami következményes szinaptikus dysfunctiot és sejthalált okoz [13].

Számos állatmodellt fejlesztettek ki a humán AK vizsgálatára, köztük a sejtmeleggel (pl. STZ-vel) kezelt rágszálómodellt, valamint különböző génmódosított állatokat (pl. APP(swe)/PS1(e9d)1 transzgenikus egér törzsek, Tg2576 egérmodell) [179, 180], hogy lehetővé váljon új megelőző és terápiás hatóanyagok felfedezése. Mindazonáltal, ezen modellek megfelelő alkalmazása a pathogenesis tiszta, egyértelmű ismeretének hiánya miatt korlátozott [14]. Jelen kutatásunkban a demencia „idős” patkánymodelljét használtuk. Ismeretes, hogy korábban is alkalmazták már az „idős” patkánymodellt a humán Alzheimer-kór vizsgálatához. Például Saponov és mtsai. kimutatták, hogy a 8-OH-DPAT (egy szerotonin 5HT_{1A}) receptor antagonistá vegyület galantaminnal történő krónikus kombinált adminisztrációja jelentős antidepresszáns és anxiolitikus hatást eredményezett az AK „idős” patkánymodelljében [181]. Gocmez és mtsai szintén ezt a modellt használták a központi idegrendszeri gyulladás és reaktív oxigénradikálok szerepének körvonalazására a betegség pathogenesisében, illetve a rezveratrol gyulladáscsökkentő és kognitív funkciókat megőrző hatásának vizsgálatára [182].

Jelen kutatásunk egyik legfőbb eredménye az a megfigyelés volt, hogy az idősödő állatok a demencia típusos jeleit mutatják. Ezt a következtetést a térbeli memória és tanulás felmérésére alkalmas teszt (MWM teszt), a PET vizsgálat képeinek elemzése, illetve az agyszövet szövettani vizsgálatának eredményei alapján vontuk le. Megfigyelhető volt, hogy az idős patkányok (mind a hímek, mind a nőstények) szignifikánsan gyengébben teljesítettek a Morris water maze teszt során, mint fiatal kontroll társaik. A PET vizsgálattal jelentősen nagyobb mennyiségű amyloid- β felhalmozódást azonosítottunk az idős állatok agyában, mint a fiatalokéban, illetve az agyszövetek szövettani vizsgálata új betekintést engedett a neurodegeneratív eltérések kiterjedésébe és súlyosságába, melyek tekintetében szintén jelentős különbség mutatkozott a fiatal állatok javára. Ezen eltérések magukban foglalták a piramis sejtréteg szerkezeti felbomlását, neuronvesztést, a gyrus dentatus területén kialakuló súlyos pericelluláris oedemát, csakúgy, mint a cerebrális amyloid angiopathiát (CAA). Munkánk azt is bizonyítja, hogy az időskorral párhuzamosan az egyik legfontosabb stresszre aktiválódó sejtvédő enzim – a hemoxigenáz-1 – aktivitása csökken a frontális, parietális cortex, valamint a hippocampus területén, mely régiók a legintenzívebben érintettek a neurodegeneratív elváltozások által.

A fenti eredményekkel ellentétben – a radioliganddal jelölt PIB szignifikáns mértékű retenciójának ellenére – nem sikerült amyloid-plakkokat azonosítani az állatok agyának szövettani vizsgálata során. Erre az anomáliára egy lehetséges magyarázat, hogy a PIB nem

tud különbséget tenni a sejten kívül kialakuló plakkok és az erek falában felhalmozódó amyloid- β aggregátumok között, melyeket szövettani vizsgálattal sikerült azonosítani. Ez az elképzelés mindazonáltal spekulatív, és további kutatások tárgyát képezi.

Az önkéntes fizikai aktivitás enyhítette az idős patkányok kognitív hanyatlását. Az idős, futó (AR) állatok szignifikánsan kevesebb időt igényeltek a Morris water maze teszt során a palló megtalálásához, mint idős, inaktív (AS) társaik – nemtől függetlenül –, mivel képesek voltak az egymást követő napok során megjegyezni annak helyzetét, és a geometriai ábrák alapján tájékozódni a medencében. Ezt az eredményt számos, nemrég megjelent publikáció is alátámasztja. Yosefi és mtsai. demonstrálták, hogy 4 hétig tartó futókerékben végzett mozgás javította az agykamrába injektált STZ-vel kezelt, ezáltal demenssé vált patkányok tanulási és térbeli memória képességét [183]. Hoveida és mtsai. szintén igazolták, hogy a 60 napig tartó futókerekes mozgás enyhítette a Meynert nucleus kétoldali károsodásából eredő kognitív hanyatlást, amely az AK egy másik modelljét képviseli [184].

Vizsgálataink azt mutatják, hogy a rekreációs mozgás szignifikánsan csökkentette az idős, futó patkányok agyában felhalmozódó PIB mennyiségét, az idős, inaktív állatokkal összehasonlítva. Ez az adat arra utal, hogy a futó állatok alacsonyabb mennyiségű oldhatatlan amyloid- β fehérjét halmoztak fel a cortexükben, mint az ülők.

A napi rendszerességű önkéntes futás az idős állatok agyában megjelenő neuropathológiai eltérésekre is pozitívan hatott. A piramis sejtek rétegének szerkezeti felbomlása, a neuronvesztés, a gyrus dentatusban megfigyelt súlyos pericelluláris oedema, valamint a Kongó vörös festéssel és immunhisztokémiai vizsgálattal kimutatott cerebrális amyloid angiopathia (CAA) szignifikánsan csökkent a fizikai aktivitásnak köszönhetően. A neurodegeneráció csökkentésének, illetve a szinaptikus funkció, valamint neuronális integritás helyreállításának jelenségét korábban más szerzők is összefüggésbe hozták a rendszeres testmozgással. Lin és mtsai arról számoltak be, hogy a rendszeres fizikai aktivitás helyreállította a hippocampushoz és amygdalához kapcsolódó memóriát és dendritikus arborizációt, az oedema és neuronvesztés súlyosságának mérséklésével párhuzamosan [185]. Továbbá, Li Li és mtsai demonstrálták, hogy az enyhe mozgás javította a kognitív funkciókat, csökkentette a neuronális apoptózist, és növelte a szinapszisok számát egy D-galaktóz által indukált „idős” egérmodellben [186].

Az oxidatív stresszt, mitokondriális dysfunctiot, valamint az intenzív gyulladási folyamatok együttesét számos kutató az AK egyik fő pathogenetikai okozójaként nevezte meg [187-

189]. A közelmúltban megjelent publikációk szerint pedig a HO-1 működése az egyik legfontosabb fiziológiai tényező az AK-ral asszociált oxidatív stressz elleni védekezésben [190, 191]. A HO-1 termelődése és biológiai aktiválása külső és belső hatások széles köre által befolyásolt, többek között az oxidatív stressz, ischaemia, hősokk, bakteriális lipopoliszacharid, valamint a hem jelenléte, ami az enzim egyik legfontosabb szubsztrátja. A HO-1 a sebesség-meghatározó makromolekula a hem katabolizmusában, valamint fontos szerepet játszik a sejtlégzés, differenciáció, energiatermelés és oxidatív biotranszformáció szabályozásában is [17].

Ezen okok miatt a HO-1 természetes vagy farmakológiai indukciója rendkívül ígéretes eszköz lehet számos krónikus betegség, köztük az AK megelőzésében vagy terápiajában [53, 54]. Több, nem régiben megjelent tanulmány támogatja ezt az elképzelést. Például Bhardwaj és mtsai kimutatták, hogy az enzim hemin általi farmakológiai indukciója csökkentette az oxidatív stresszt, és helyreállította a kognitív funkciókat az agykamrába injektált STZ-vel létrehozott AK modellben [192]. Kutatócsoportunk részben azért végezte ezeket a kísérleteket, hogy rávilágítson a HO-1 enzimen alapuló stratégiák jövőbeli potenciáljára az AK által támasztott kihívások leküzdésében. Szignifikáns enzimaktivitás emelkedést demonstráltunk az idős futó állatok frontális cortexében és hippocampusában. A kognitív hanyatlás, a képalkotóval detektált elváltozások, valamint a neuropathológiai eltérések enyhítésével együtt ez az eredmény azt sugallja, hogy az időskorral asszociált, Alzheimer-típusú demencia súlyossága csökkenthető a fiziológiásan is jelenlévő HO-1 aktivitás serkentésével, olyan eredményekkel, melyek magukban foglalják az oxidatív stressz és AK tünetek súlyosságának redukálását.

Régóta ismert, hogy a rendszeres fizikai aktivitásnak számos jótékony hatása van az egészségre nézve. Tanulmányok igazolták, hogy pozitívan befolyásolja a cardiovascularis funkciókat [193], a kognitív képességeket [194], az inzulin rezisztenciát és a metabolikus szindróma tüneteit [195], valamint csökkenti a neuropszichiátriai zavarok, köztük a depresszió súlyosságát [196]. Di Loreto és mtsai. demonstrálták, hogy a rendszeresen végzett önkéntes testmozgás hatékonyan serkentette az időskorral asszociált amyloidogenesis-szel szembeni neuroprotektív folyamatokat, és segített megőrizni a szinaptikus funkciót [197]. Ehhez kapcsolódóan Maesako és mtsai. kimutatták, hogy a hosszú ideig fenntartott önkéntes mozgás részben ellensúlyozta a magas zsírtartalmú táplálkozás által okozott kognitív hanyatlást APP-t túlexpresszázó transzgenikus egerekben. Érdekes módon ez a hatás nem az amyloid termelődés direkt csökkenésén alapult, hanem az amyloid- β -t metabolizáló neprilizin

enzim aktivitásának fokozásán [198]. A jelen kutatás a fent említett eredményeket egy vázként alkalmazta HO-1 induktorok kifejlesztéséhez, a krónikus betegségek egyik legfőbb megelőző és terápiás stratégiájaként. Mindezekon túl, a kutatás elvégzésének idejében ez volt az első törekvés a fizikai aktivitás és HO-1 kapcsolatának demencia modellben történő vizsgálatára. Az eredmények azt mutatják, hogy a HO-1 enzim aktivitása szignifikánsan emelkedett a mozgás hatására idős, kognitív hanyatlást mutató patkányokban, ezáltal lehetőséget rejt az AK és kapcsolódó betegségek jövőbeni gyógyításához.

7. Összefoglalás

Kutatásunk célja az időskorral és életmóddal asszociált pathológiás állapotok, mint a demencia és a 2-es típusú cukorbetegség vizsgálata, valamint ezen kórállapotok természetes módon történő enyhítése volt. Ismert, hogy mindkét betegségben nagy szerepet játszik az oxidatív stressz, ezért a két kísérlet közös pontjaként az egyik legfontosabb antioxidáns védekező rendszer, a HO-1 rendszer működését analizáltuk. Azt a hipotézist tettük, hogy ez az enzimszisztéma lehet felelős a tünetek enyhüléséért mindkét esetben.

A kísérletek során egyrészt a meggy-mag-kivonat (SCSE) glükózsztintre, valamint retinafunkcióra gyakorolt hatását vizsgáltuk ZDF patkánymodellben ischaemia/reperfusio körülmények között vagy anélkül, másrészt a rendszeres fizikai aktivitás befolyását az Alzheimer-típusú demencia kognitív és neuropathológiai eltéréseire. Igyekeztünk a lehetséges molekuláris mechanizmusokat is felderíteni.

Kísérleteink első részében a kezelés hatásait glükózsztint mérésével, orális glükóz tolerancia teszttel (OGTT), electroretinographiával (ERG), szövettani analízissel és HO-1 koncentráció mérésével igazoltuk. Eredményeink azt sugallják, hogy a SCSE retinoprotektív tulajdonságú, sőt, a diabetesben gyakran előforduló I/R-s retinakárosodással szemben is védelmet nyújt. A SCSE-nek glükózsztint-csökkentő hatása is van, mivel szignifikáns mértékben csökkentette a T2DM állatok orális cukorterhelés utáni plazma glükóz szintjét. Az ismert stresszfehérje, a hemoxigenáz-1 szintje a T2DM állatokban emelkedett, és ez az emelkedés fokozódott a SCSE-vel történő kezelés során, mely alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az enzimnek szerepe lehet a SCSE retina-védő és glükózsztint-csökkentő hatásának közvetítésében mind az I/R nélküli állapotban, mind pedig I/R-s körülmények között. A HO-1 szintjének T2DM-ben való emelkedése, valamint az emelkedés fokozódása meggy-mag-kivonat kezelés hatására az eddigi irodalmi adatok alapján új eredménynek tekinthető.

Kísérleteink második felében pedig a rekreációs testmozgás kognitív képességekre és neurodegeneratív eltérésekre gyakorolt hatását Morris water maze teszttel, *in vivo* PET vizsgálattal, szövettani analízissel, valamint HO-1 aktivitásméréssel igazoltuk. A MWM teszt alapján kijelenthető, hogy a rendszeres, önkéntes fizikai aktivitás javította az idős állatok kognitív képességeit. A PET vizsgálat során jóval csekélyebb mértékű PIB-retenciót detektáltunk az idős, futó állatok agyában, mint az idős, inaktív társaikéban, ami csökkent mértékű amyloid- β felhalmozódásra utal. Szövettani vizsgálatokkal szintén igazolható volt a rekreatív testmozgás neurodegenerációra kifejtett pozitív hatása, úgymint a csökkent

intenzitású strukturális elváltozások, illetve a redukált mértékű amyloid angiopathia. A neurodegeneráció testmozgás általi ilyen mértékű javítása irodalmi adatok alapján új eredménynek tekinthető. Fokozott HO-1 aktivitást mértünk az állatok hippocampusában és frontális cortexében, ami arra enged következtetni, hogy a rendszeres testmozgás, a neurodegenerációt javító hatását az antioxidáns tulajdonságú HO-1 enzim aktivitásának fokozása révén éri el. Kutatásunk eredményei azt sugallják, hogy a hemoxigenáz-1 enzim természetes eredetű (pl.: növényi hatóanyagok és rendszeres fizikai aktivitás) aktivációjának fontos szerepe lehet az életkorral és életmóddal összefüggő betegségek enyhítésében, mely felfedezés szintén új eredménynek számít.

Summary

The aim of our study was to investigate age- and lifestyle-related disorders, like type 2 diabetes mellitus and dementia, and to naturally, by induction of heme oxygenase-1 (HO-1), alleviate symptoms of these diseases. During the experiments we examined on the one hand, the effects of sour cherry seed extract (SCSE) on blood sugar levels and retinal function in a Zucker Diabetic Fatty rat model with or without ischemia/reperfusion, and on the other hand, the effects of regular voluntary (recreational) physical exercise on the cognitive and neuropathological alterations of Alzheimer-type dementia.

Our results prove that the SCSE has a protective effect on the retina of diabetic rats: according to ERG measurements, SCSE treatment mitigated the retinal function-damaging effect of diabetes, and proved to be protective in the diabetic eye against ischemia-reperfusion injuries of the retina. Outcomes suggest that the protective effects of SCSE may occur through several pathways, including HO-1 dependent mechanisms. The increased concentration of HO-1 in T2DM and further increase as a result of SCSE-treatment is a novel finding. The observation that SCSE treatment decreases blood glucose is also novel.

In the second part of our experiments spatial memory was investigated using the Morris Water Maze Test, while pathological alterations were assessed using positron emission tomography (PET) imaging and histopathological examinations (H&E, Congo red staining), respectively, and HO-1 enzyme activity assays were also conducted. The outcomes suggest that voluntary physical exercise mitigates impaired spatial memory and neuropathological changes exhibited by the aging sedentary group, via elevated HO-1 activity, contributing to the antioxidant capacity in the aging brain that can be regarded as a novel finding.

These findings offer the possibility of involving natural (either from herbal origin or regular physical activity) inducers of HO-1 enzyme, one of the most important factors in the defense against oxidative stress in future therapeutic strategies against chronic metabolic or degenerative conditions like diabetes mellitus or Alzheimer-type dementia, which is also a novel finding.

8. Irodalomjegyzék

1. Curtis, T.M., T.A. Gardiner, and A.W. Stitt, *Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis?* Eye (Lond), 2009. **23**(7): p. 1496-508.
2. Song, Y., L. Huang, and J. Yu, *Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling.* J Neuroimmunol, 2016. **301**: p. 1-6.
3. Bonda, D.J., et al., *Novel therapeutics for Alzheimer's disease: an update.* Curr Opin Drug Discov Devel, 2010. **13**(2): p. 235-46.
4. Butterfield, D.A., A.M. Swomley, and R. Sultana, *Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression.* Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(8): p. 823-35.
5. de la Monte, S.M., *Type 3 diabetes is sporadic Alzheimers disease: mini-review.* Eur Neuropsychopharmacol, 2014. **24**(12): p. 1954-60.
6. Jonas, J., et al., *Retinal vein occlusions.* Dev Ophthalmol, 2010. **47**: p. 111-35.
7. Juhasz, B., et al., *Cardioprotective effects of sour cherry seed extract (SCSE) on the hypercholesterolemic rabbit heart.* Curr Pharm Des, 2013. **19**(39): p. 6896-905.
8. Bombicz, M., et al., *Anti-Atherogenic Properties of Allium ursinum Liophylisate: Impact on Lipoprotein Homeostasis and Cardiac Biomarkers in Hypercholesterolemic Rabbits.* Int J Mol Sci, 2016. **17**(8).
9. Bombicz, M., et al., *A Novel Therapeutic Approach in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: Allium ursinum Liophylisate Alleviates Symptoms Comparably to Sildenafil.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
10. Feher, P., et al., *Efficacy of Pre- and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended Silybum marianum against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig and on HaCaT Keratinocytes.* Molecules, 2016. **21**(10).
11. Bak, I., et al., *Evaluation of systemic and dermal toxicity and dermal photoprotection by sour cherry kernels.* Phytother Res, 2011. **25**(11): p. 1714-20.
12. Bak, I., et al., *Isolation and analysis of bioactive constituents of sour cherry (Prunus cerasus) seed kernel: an emerging functional food.* J Med Food, 2010. **13**(4): p. 905-10.
13. Morales, I., et al., *Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches.* Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 112.

14. Benedikz, E., E. Kloskowska, and B. Winblad, *The rat as an animal model of Alzheimer's disease*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(6): p. 1034-42.
15. Csonka, C., et al., *Heme oxygenase and cardiac function in ischemic/reperfused rat hearts*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(1-2): p. 119-26.
16. Juhasz, B., et al., *Postischemic cardiac recovery in heme oxygenase-1 transgenic ischemic/reperfused mouse myocardium*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(9): p. 1973-82.
17. Haines, D.D., et al., *Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders*. Acta Physiol (Oxf), 2012. **204**(4): p. 487-501.
18. Varga, B., et al., *Protective effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) on the recovery of ischemia/reperfusion (I/R)-induced retinal damage in a rat model*. J Mol Neurosci, 2013. **50**(3): p. 558-70.
19. Ren, C., et al., *The effect of moderate-intensity exercise on the expression of HO-1 mRNA and activity of HO in cardiac and vascular smooth muscle of spontaneously hypertensive rats*. Can J Physiol Pharmacol, 2016. **94**(4): p. 448-54.
20. Alam, M.B., M.K. Ju, and S.H. Lee, *DNA Protecting Activities of Nymphaea nouchali (Burm. f) Flower Extract Attenuate t-BHP-Induced Oxidative Stress Cell Death through Nrf2-Mediated Induction of Heme Oxygenase-1 Expression by Activating MAP-Kinases*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(10).
21. Bhardwaj, M., et al., *Pharmacological induction of hemeoxygenase-1 activity attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced neurocognitive deficit and oxidative stress in rats*. Eur J Pharmacol, 2016. **772**: p. 43-50.
22. Bak, I., et al., *Cardioprotective mechanisms of Prunus cerasus (sour cherry) seed extract against ischemia-reperfusion-induced damage in isolated rat hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H1329-36.
23. Czompa, A., et al., *Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: the role of heme oxygenase-1*. J Cardiovasc Pharmacol, 2014. **64**(5): p. 412-9.
24. Szabo, M.E., et al., *Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(10): p. 3727-32.
25. Salimi, A., et al., *Toxicity evaluation of microemulsion (nano size) of sour cherry kernel extract for the oral bioavailability enhancement*. Jundishapur J Nat Pharm Prod, 2014. **9**(1): p. 16-23.
26. Csiki, Z., et al., *Orally delivered sour cherry seed extract (SCSE) affects cardiovascular and hematological parameters in humans*. Phytother Res, 2015. **29**(3): p. 444-9.
27. Mahmoud, F., et al., *Sour cherry (Prunus cerasus) seed extract increases heme oxygenase-1 expression and decreases proinflammatory signaling in peripheral blood human leukocytes from rheumatoid arthritis patients*. Int Immunopharmacol, 2014. **20**(1): p. 188-96.

28. Zimmet, P., et al., *Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies*. Nat Rev Endocrinol, 2016. **12**(10): p. 616-22.
29. Carracher, A.M., P.H. Marathe, and K.L. Close, *International Diabetes Federation 2017. J Diabetes*, 2018. **10**(5): p. 353-356.
30. Tuomi, T., et al., *The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity*. Lancet, 2014. **383**(9922): p. 1084-94.
31. Murphy, R., S. Ellard, and A.T. Hattersley, *Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008. **4**(4): p. 200-13.
32. Lyssenko, V., et al., *Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2008. **359**(21): p. 2220-32.
33. Grill, V., *A comparison of brain glucose metabolism in diabetes as measured by positron emission tomography or by arteriovenous techniques*. Ann Med, 1990. **22**(3): p. 171-6.
34. DeFronzo, R.A., et al., *Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1985. **76**(1): p. 149-55.
35. DeFronzo, R.A., *Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM*. Diabetes, 1988. **37**(6): p. 667-87.
36. Ekberg, K., et al., *Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting*. Diabetes, 1999. **48**(2): p. 292-8.
37. Mari, A., et al., *Glucose absorption and production following oral glucose: comparison of compartmental and arteriovenous-difference methods*. Metabolism, 1994. **43**(11): p. 1419-25.
38. Katz, L.D., et al., *Splanchnic and peripheral disposal of oral glucose in man*. Diabetes, 1983. **32**(7): p. 675-9.
39. Jansson, P.A., et al., *Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men*. J Clin Invest, 1994. **93**(1): p. 240-6.
40. Groop, L.C., et al., *Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance*. J Clin Invest, 1989. **84**(1): p. 205-13.
41. Bergman, R.N., *Non-esterified fatty acids and the liver: why is insulin secreted into the portal vein?* Diabetologia, 2000. **43**(7): p. 946-52.
42. DeFronzo, R.A., E. Ferrannini, and D.C. Simonson, *Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake*. Metabolism, 1989. **38**(4): p. 387-95.

43. DeFronzo, R.A., D. Simonson, and E. Ferrannini, *Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of type 2 (non-insulin-dependent) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 1982. **23**(4): p. 313-9.
44. Golay, A., et al., *Metabolic basis of obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus*. *Diabetes Metab Rev*, 1988. **4**(8): p. 727-47.
45. Firth, R., P. Bell, and R. Rizza, *Insulin action in non-insulin-dependent diabetes mellitus: the relationship between hepatic and extrahepatic insulin resistance and obesity*. *Metabolism*, 1987. **36**(11): p. 1091-5.
46. Campbell, P.J., L.J. Mandarino, and J.E. Gerich, *Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *Metabolism*, 1988. **37**(1): p. 15-21.
47. Baron, A.D., et al., *Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics*. *Diabetes*, 1987. **36**(3): p. 274-83.
48. Matsuda, M., et al., *Glucagon dose-response curve for hepatic glucose production and glucose disposal in type 2 diabetic patients and normal individuals*. *Metabolism*, 2002. **51**(9): p. 1111-9.
49. Consoli, A., et al., *Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM*. *Diabetes*, 1989. **38**(5): p. 550-7.
50. Foley, J.E., *Rationale and application of fatty acid oxidation inhibitors in treatment of diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 1992. **15**(6): p. 773-84.
51. Obici, S., et al., *Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production*. *Nat Med*, 2002. **8**(12): p. 1376-82.
52. Rahmoune, H., et al., *Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes*. *Diabetes*, 2005. **54**(12): p. 3427-34.
53. Weyer, C., et al., *The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(6): p. 787-94.
54. Reaven, G.M., C.B. Hollenbeck, and Y.D. Chen, *Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance*. *Diabetologia*, 1989. **32**(1): p. 52-5.
55. Tripathy, D., et al., *Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance: lessons from the Botnia Study*. *Diabetes*, 2000. **49**(6): p. 975-80.
56. Reaven, G.M., *Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988*. *Nutrition*, 1997. **13**(1): p. 65; discussion 64, 66.
57. Thiebaud, D., et al., *Effect of long chain triglyceride infusion on glucose metabolism in man*. *Metabolism*, 1982. **31**(11): p. 1128-36.

58. McGarry, J.D., *Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 7-18.
59. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet, 1963. **1**(7285): p. 785-9.
60. Golay, A., et al., *Study on lipid metabolism in obesity diabetes*. Metabolism, 1984. **33**(2): p. 111-6.
61. Felber, J.P., et al., *Glucose storage and oxidation in different degrees of human obesity measured by continuous indirect calorimetry*. Diabetologia, 1981. **20**(1): p. 39-44.
62. De Fea, K. and R.A. Roth, *Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612*. Biochemistry, 1997. **36**(42): p. 12939-47.
63. Exton, J.H., J.G. Corbin, and C.R. Park, *Control of gluconeogenesis in liver. IV. Differential effects of fatty acids and glucagon on ketogenesis and gluconeogenesis in the perfused rat liver*. J Biol Chem, 1969. **244**(15): p. 4095-102.
64. Hotamisligil, G.S., *Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24 Suppl 4**: p. S23-7.
65. Senn, J.J., et al., *Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13740-6.
66. Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
67. Tomas, E., et al., *Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16309-13.
68. Cersosimo, E., et al., *Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
69. Yamagishi, S., et al., *Advanced glycation end products-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(3): p. 973-8.
70. *Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group*. Ophthalmology, 1991. **98**(5 Suppl): p. 823-33.
71. Kassebaum, N.J., et al., *Global, regional, and national levels and causes of maternal mortality during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2014. **384**(9947): p. 980-1004.
72. *Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of*

- the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Ophthalmology, 1991. 98(5 Suppl): p. 786-806.*
73. Schmidt, D., *The mystery of cotton-wool spots - a review of recent and historical descriptions.* Eur J Med Res, 2008. **13**(6): p. 231-66.
 74. Goncalves, A., et al., *Protective Effect of a GLP-1 Analog on Ischemia-Reperfusion Induced Blood-Retinal Barrier Breakdown and Inflammation.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016. **57**(6): p. 2584-92.
 75. Zheng, L., et al., *Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(1): p. 361-7.
 76. Osborne, N.N., et al., *Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies.* Prog Retin Eye Res, 2004. **23**(1): p. 91-147.
 77. Cunha-Vaz, J., J.R. Faria de Abreu, and A.J. Campos, *Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes.* Br J Ophthalmol, 1975. **59**(11): p. 649-56.
 78. Kaur, C., W.S. Foulds, and E.A. Ling, *Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management.* Prog Retin Eye Res, 2008. **27**(6): p. 622-47.
 79. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin.* N Engl J Med, 2002. **346**(6): p. 393-403.
 80. Mascitelli, L. and F. Pezzetta, *Thiazolidinediones.* N Engl J Med, 2005. **352**(2): p. 205-7; author reply 205-7.
 81. Nesto, R.W., et al., *Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. October 7, 2003.* Circulation, 2003. **108**(23): p. 2941-8.
 82. Bailey, C.J. and R.C. Turner, *Metformin.* N Engl J Med, 1996. **334**(9): p. 574-9.
 83. Chiasson, J.L., et al., *The STOP-NIDDM Trial: an international study on the efficacy of an alpha-glucosidase inhibitor to prevent type 2 diabetes in a population with impaired glucose tolerance: rationale, design, and preliminary screening data. Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus.* Diabetes Care, 1998. **21**(10): p. 1720-5.
 84. *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group.* Lancet, 1998. **352**(9131): p. 837-53.
 85. Rendell, M., *The role of sulphonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus.* Drugs, 2004. **64**(12): p. 1339-58.
 86. d'Emden, M., et al., *SGLT2 inhibitors with cardiovascular benefits: Transforming clinical care in Type 2 diabetes mellitus.* Diabetes Res Clin Pract, 2018. **136**: p. 23-31.

87. Dandona, P., et al., *Insulin as an anti-inflammatory and antiatherosclerotic hormone*. Clin Cornerstone, 2003. **Suppl 4**: p. S13-20.
88. Deacon, C.F., *Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1*. Diabetes, 2004. **53**(9): p. 2181-9.
89. Toodayan, N., *Professor Alois Alzheimer (1864-1915): Lest we forget*. J Clin Neurosci, 2016. **31**: p. 47-55.
90. Mayeux, R. and Y. Stern, *Epidemiology of Alzheimer disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8).
91. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. Acta Neuropathol, 1991. **82**(4): p. 239-59.
92. Masters, C.L., et al., *Alzheimer's disease*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15056.
93. Ballard, C., et al., *Alzheimer's disease*. Lancet, 2011. **377**(9770): p. 1019-31.
94. Ferri, C.P., et al., *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*. Lancet, 2005. **366**(9503): p. 2112-7.
95. Zhang, Y.W., et al., *APP processing in Alzheimer's disease*. Mol Brain, 2011. **4**: p. 3.
96. Holtzman, D.M., et al., *Abeta immunization and anti-Abeta antibodies: potential therapies for the prevention and treatment of Alzheimer's disease*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(12): p. 1603-13.
97. Scheuner, D., et al., *Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease*. Nat Med, 1996. **2**(8): p. 864-70.
98. Golde, T.E., C.B. Eckman, and S.G. Younkin, *Biochemical detection of Abeta isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1502**(1): p. 172-87.
99. Gomez-Isla, T., et al., *The impact of different presenilin 1 and presenilin 2 mutations on amyloid deposition, neurofibrillary changes and neuronal loss in the familial Alzheimer's disease brain: evidence for other phenotype-modifying factors*. Brain, 1999. **122** (Pt 9): p. 1709-19.
100. Wisniewski, T., J. Ghiso, and B. Frangione, *Biology of A beta amyloid in Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis, 1997. **4**(5): p. 313-28.
101. Bateman, R.J., et al., *Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo*. Nat Med, 2006. **12**(7): p. 856-61.
102. Mawuenyega, K.G., et al., *Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease*. Science, 2010. **330**(6012): p. 1774.

103. Liao, F., H. Yoon, and J. Kim, *Apolipoprotein E metabolism and functions in brain and its role in Alzheimer's disease*. *Curr Opin Lipidol*, 2017. **28**(1): p. 60-67.
104. Namba, Y., et al., *Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease*. *Brain Res*, 1991. **541**(1): p. 163-6.
105. Saunders, A.M., et al., *Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease*. *Neurology*, 1993. **43**(8): p. 1467-72.
106. Huang, Y., et al., *Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease*. *J Mol Neurosci*, 2004. **23**(3): p. 189-204.
107. Ashford, J.W., *APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology*. *J Mol Neurosci*, 2004. **23**(3): p. 157-65.
108. Corder, E.H., et al., *Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease*. *Nat Genet*, 1994. **7**(2): p. 180-4.
109. Deane, R., et al., *apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(12): p. 4002-13.
110. Holtzman, D.M., *Role of apoe/Abeta interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy*. *J Mol Neurosci*, 2001. **17**(2): p. 147-55.
111. Shibata, M., et al., *Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(12): p. 1489-99.
112. McGeer, P.L. and E.G. McGeer, *The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy*. *Acta Neuropathol*, 2013. **126**(4): p. 479-97.
113. Rogers, J., et al., *Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(21): p. 10016-20.
114. Selkoe, D.J. and J. Hardy, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years*. *EMBO Mol Med*, 2016. **8**(6): p. 595-608.
115. Lopes, J.P., C.R. Oliveira, and P. Agostinho, *Neurodegeneration in an Abeta-induced model of Alzheimer's disease: the role of Cdk5*. *Aging Cell*, 2010. **9**(1): p. 64-77.
116. Maqbool, M., M. Mobashir, and N. Hoda, *Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease*. *Eur J Med Chem*, 2016. **107**: p. 63-81.
117. Baker, L.D., et al., *Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes*. *Arch Neurol*, 2011. **68**(1): p. 51-7.
118. de la Monte, S.M., *Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-*

- related neurodegeneration in Alzheimer's disease.* Drugs, 2012. **72**(1): p. 49-66.
119. de la Monte, S.M., et al., *Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis.* Curr Opin Investig Drugs, 2009. **10**(10): p. 1049-60.
 120. de la Monte, S.M., et al., *Dysfunctional pro-ceramide, ER stress, and insulin/IGF signaling networks with progression of Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2012. **30 Suppl 2**: p. S217-29.
 121. Caselli, R.J., et al., *Correlating cerebral hypometabolism with future memory decline in subsequent converters to amnesic pre-mild cognitive impairment.* Arch Neurol, 2008. **65**(9): p. 1231-6.
 122. Hoyer, S., *Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications.* Adv Exp Med Biol, 2004. **541**: p. 135-52.
 123. Mosconi, L., et al., *FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease.* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2009. **36**(5): p. 811-22.
 124. Hoyer, S., R. Nitsch, and K. Oesterreich, *Predominant abnormality in cerebral glucose utilization in late-onset dementia of the Alzheimer type: a cross-sectional comparison against advanced late-onset and incipient early-onset cases.* J Neural Transm Park Dis Dement Sect, 1991. **3**(1): p. 1-14.
 125. Rivera, E.J., et al., *Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine.* J Alzheimers Dis, 2005. **8**(3): p. 247-68.
 126. Talbot, K., et al., *Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline.* J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1316-38.
 127. Steen, E., et al., *Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes?* J Alzheimers Dis, 2005. **7**(1): p. 63-80.
 128. Knopman, D.S., et al., *Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology.* Neurology, 2001. **56**(9): p. 1143-53.
 129. Klunk, W.E., et al., *Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B.* Ann Neurol, 2004. **55**(3): p. 306-19.
 130. Salloway, S., et al., *Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease.* N Engl J Med, 2014. **370**(4): p. 322-33.
 131. Villemagne, V.L., et al., *Tau imaging: early progress and future directions.* Lancet Neurol,

2015. **14**(1): p. 114-24.
132. Blennow, K., et al., *Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease*. Nat Rev Neurol, 2010. **6**(3): p. 131-44.
133. Maddalena, A., et al., *Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to beta-amyloid peptide42*. Arch Neurol, 2003. **60**(9): p. 1202-6.
134. Noetzli, M. and C.B. Eap, *Pharmacodynamic, pharmacokinetic and pharmacogenetic aspects of drugs used in the treatment of Alzheimer's disease*. Clin Pharmacokinet, 2013. **52**(4): p. 225-41.
135. Parsons, C.G., et al., *Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease*. Neurotox Res, 2013. **24**(3): p. 358-69.
136. Rountree, S.D., et al., *Effectiveness of antidementia drugs in delaying Alzheimer's disease progression*. Alzheimers Dement, 2013. **9**(3): p. 338-45.
137. Devasagayam, T.P., et al., *Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects*. J Assoc Physicians India, 2004. **52**: p. 794-804.
138. Poon, H.F., et al., *Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004. **59**(5): p. 478-93.
139. Kikuchi, G., T. Yoshida, and M. Noguchi, *Heme oxygenase and heme degradation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 558-67.
140. Kinobe, R.T., R.A. Dercho, and K. Nakatsu, *Inhibitors of the heme oxygenase - carbon monoxide system: on the doorstep of the clinic?* Can J Physiol Pharmacol, 2008. **86**(9): p. 577-99.
141. Reichard, J.F., G.T. Motz, and A. Puga, *Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(21): p. 7074-86.
142. Maines, M.D., *The heme oxygenase system: update 2005*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(11-12): p. 1761-6.
143. Cutajar, M.C. and T.M. Edwards, *Evidence for the role of endogenous carbon monoxide in memory processing*. J Cogn Neurosci, 2007. **19**(4): p. 557-62.
144. Kapitulnik, J. and M.D. Maines, *Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(3): p. 129-37.
145. Hettiarachchi, N., et al., *Heme oxygenase-1 protects against Alzheimer's amyloid-beta(1-42)-induced toxicity via carbon monoxide production*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1569.
146. Sultana, R., M. Perluigi, and D.A. Butterfield, *Lipid peroxidation triggers*

- neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain*. Free Radic Biol Med, 2013. **62**: p. 157-169.
147. Barone, E., et al., *Heme oxygenase-1 posttranslational modifications in the brain of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(11-12): p. 2292-301.
 148. Kurauchi, Y., et al., *Nitric oxide-cyclic GMP signaling pathway limits inflammatory degeneration of midbrain dopaminergic neurons: cell type-specific regulation of heme oxygenase-1 expression*. Neuroscience, 2009. **158**(2): p. 856-66.
 149. Kurauchi, Y., et al., *Caffeic acid phenethyl ester protects nigral dopaminergic neurons via dual mechanisms involving haem oxygenase-1 and brain-derived neurotrophic factor*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(3): p. 1151-68.
 150. Laurin, D., et al., *Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons*. Arch Neurol, 2001. **58**(3): p. 498-504.
 151. Moore, K.M., et al., *A spectrum of exercise training reduces soluble Abeta in a dose-dependent manner in a mouse model of Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis, 2016. **85**: p. 218-224.
 152. Revilla, S., et al., *Physical exercise improves synaptic dysfunction and recovers the loss of survival factors in 3xTg-AD mouse brain*. Neuropharmacology, 2014. **81**: p. 55-63.
 153. Um, H.S., et al., *Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. Neurosci Res, 2011. **69**(2): p. 161-73.
 154. Kang, E.B., et al., *Treadmill exercise represses neuronal cell death and inflammation during Abeta-induced ER stress by regulating unfolded protein response in aged presenilin 2 mutant mice*. Apoptosis, 2013. **18**(11): p. 1332-1347.
 155. Koo, J.H., et al., *Treadmill exercise decreases amyloid-beta burden possibly via activation of SIRT1 signaling in a mouse model of Alzheimer's disease*. Exp Neurol, 2017. **288**: p. 142-152.
 156. Lagouge, M., et al., *Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1109-22.
 157. Julien, C., et al., *Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 2009. **68**(1): p. 48-58.
 158. Wang, R., et al., *Metabolic stress modulates Alzheimer's beta-secretase gene transcription via SIRT1-PPARGgamma-PGC-1 in neurons*. Cell Metab, 2013. **17**(5): p. 685-94.
 159. Kumar, R., et al., *Sirtuin1: a promising serum protein marker for early detection of Alzheimer's disease*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61560.
 160. Bostick, B., et al., *Daily exercise prevents diastolic dysfunction and oxidative stress in a female mouse model of western diet induced obesity by maintaining cardiac heme*

- oxygenase-1 levels*. Metabolism, 2017. **66**: p. 14-22.
161. Szabo, M.E., et al., *Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. **32**(5): p. 1471-8.
 162. McCulloch, D.L., et al., *ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update)*. Doc Ophthalmol, 2015. **130**(1): p. 1-12.
 163. Varga, B., et al., *PACAP improves functional outcome in excitotoxic retinal lesion: an electroretinographic study*. J Mol Neurosci, 2011. **43**(1): p. 44-50.
 164. D'Hooge, R. and P.P. De Deyn, *Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory*. Brain Res Brain Res Rev, 2001. **36**(1): p. 60-90.
 165. Lajtos, I., et al., *Performance evaluation and optimization of the MiniPET-II scanner*. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment, 2013. **707**: p. 26-34.
 166. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **61**(2): p. 748-55.
 167. Csoz, E., et al., *Diabetic retinopathy: Proteomic approaches to help the differential diagnosis and to understand the underlying molecular mechanisms*. J Proteomics, 2017. **150**: p. 351-358.
 168. Literati-Nagy, B., et al., *Improvement of insulin sensitivity by a novel drug candidate, BGP-15, in different animal studies*. Metab Syndr Relat Disord, 2014. **12**(2): p. 125-31.
 169. Ferretti, G., et al., *Cherry antioxidants: from farm to table*. Molecules, 2010. **15**(10): p. 6993-7005.
 170. Lachin, T., *Effect of antioxidant extract from cherries on diabetes*. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov, 2014. **8**(1): p. 67-74.
 171. Zeng, K., et al., *Resveratrol Prevents Retinal Dysfunction by Regulating Glutamate Transporters, Glutamine Synthetase Expression and Activity in Diabetic Retina*. Neurochem Res, 2016. **41**(5): p. 1050-64.
 172. Fan, Y., et al., *Exendin-4 protects retinal cells from early diabetes in Goto-Kakizaki rats by increasing the Bcl-2/Bax and Bcl-xL/Bax ratios and reducing reactive gliosis*. Mol Vis, 2014. **20**: p. 1557-68.
 173. Hernandez, C., et al., *Topical Administration of GLP-1 Receptor Agonists Prevents Retinal Neurodegeneration in Experimental Diabetes*. Diabetes, 2016. **65**(1): p. 172-87.
 174. Li, S.Y., et al., *Lycium barbarum polysaccharides reduce neuronal damage, blood-retinal barrier disruption and oxidative stress in retinal ischemia/reperfusion injury*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16380.

175. Mi, X.S., et al., *Protection of retinal ganglion cells and retinal vasculature by Lycium barbarum polysaccharides in a mouse model of acute ocular hypertension*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e45469.
176. Chen, H., et al., *The protective effects of ginsenoside Rg1 against hypertension target-organ damage in spontaneously hypertensive rats*. BMC Complement Altern Med, 2012. **12**: p. 53.
177. Li, D., et al., *Protective effects of total flavonoids from Flos Puerariae on retinal neuronal damage in diabetic mice*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 1999-2010.
178. Backman, L., et al., *Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer's disease*. J Intern Med, 2004. **256**(3): p. 195-204.
179. Varhelyi, Z.P., et al., *Adiponectin Receptors Are Less Sensitive to Stress in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 199.
180. Nobili, A., et al., *Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14727.
181. Sapronov, N.S., O. Fedotova Iu, and N.A. Losev, [*Optimizing effect of the combined administration of 8-OH-DPAT and galantamine on depression--anxiety behavior in old rats with dementia of Alzheimer's type*]. Eksp Klin Farmakol, 2006. **69**(3): p. 10-3.
182. Gocmez, S.S., et al., *Protective effects of resveratrol on aging-induced cognitive impairment in rats*. Neurobiol Learn Mem, 2016. **131**: p. 131-6.
183. Yosefi, M., et al., *Treadmill running improves spatial learning and memory in the rats with intracerebroventricular injection of streptozotocin*. J Res Med Sci, 2011. **16**(10): p. 1386-7.
184. Hoveida, R., et al., *Treadmill running improves spatial memory in an animal model of Alzheimer's disease*. Behav Brain Res, 2011. **216**(1): p. 270-4.
185. Lin, T.W., et al., *Running exercise delays neurodegeneration in amygdala and hippocampus of Alzheimer's disease (APP/PS1) transgenic mice*. Neurobiol Learn Mem, 2015. **118**: p. 189-97.
186. Li, L., et al., *Moderate exercise prevents neurodegeneration in D-galactose-induced aging mice*. Neural Regen Res, 2016. **11**(5): p. 807-15.
187. Bonda, D.J., et al., *Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention*. Neuropharmacology, 2010. **59**(4-5): p. 290-4.
188. Barone, E., et al., *Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: a novel mechanism of action*. Pharmacol Res, 2011. **63**(3): p. 172-80.
189. Butterfield, D.A. and R. Sultana, *Methionine-35 of abeta(1-42): importance for oxidative stress in Alzheimer disease*. J Amino Acids, 2011. **2011**: p. 198430.
190. Verdile, G., et al., *Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between*

- Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 105828.
191. Serini, S. and G. Calviello, *Reduction of Oxidative/Nitrosative Stress in Brain and its Involvement in the Neuroprotective Effect of n-3 PUFA in Alzheimer's Disease*. Curr Alzheimer Res, 2016. **13**(2): p. 123-34.
 192. Nemeth, Z., et al., *Heme oxygenase-1 in macrophages controls prostate cancer progression*. Oncotarget, 2015. **6**(32): p. 33675-88.
 193. Sherwood, A., et al., *Effects of exercise and stress management training on nighttime blood pressure dipping in patients with coronary heart disease: A randomized, controlled trial*. Am Heart J, 2017. **183**: p. 85-90.
 194. Santos-Lozano, A., et al., *Physical Activity and Alzheimer Disease: A Protective Association*. Mayo Clin Proc, 2016. **91**(8): p. 999-1020.
 195. Ross, R. and J.P. Despres, *Abdominal obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: contribution of physical activity/exercise*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17 Suppl 3**: p. S1-2.
 196. Pelletier, L., et al., *Self-management of mood and/or anxiety disorders through physical activity/exercise*. Health Promot Chronic Dis Prev Can, 2017. **37**(5): p. 149-159.
 197. Di Loreto, S., et al., *Regular and moderate exercise initiated in middle age prevents age-related amyloidogenesis and preserves synaptic and neuroprotective signaling in mouse brain cortex*. Exp Gerontol, 2014. **57**: p. 57-65.
 198. Maesako, M., et al., *Exercise is more effective than diet control in preventing high fat diet-induced beta-amyloid deposition and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice*. J Biol Chem, 2012. **287**(27): p. 23024-33.



Nyilvántartási szám: DEENK/329/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kurucz Andrea
Neptun kód: AJC6HD
Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kurucz, A.**, Bombicz, M., Kiss, R., Priksz, D., Varga, B., Hortobágyi, T., Trencsényi, G., Szabó, R., Pósa, A., Gesztelyi, R., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Heme oxygenase-1 activity as a correlate to exercise-mediated amelioration of cognitive decline and neuropathological alterations in an aging rat model of dementia.
Biomed Res. Int. 2018, 1-13, 2018.
IF: 2.583 (2017)
2. Varga, B., Priksz, D., Lampé, N., Bombicz, M., **Kurucz, A.**, Szabó, A. M., Pósa, A., Szabó, R., Kemény-Beke, Á., Gálné Remenyik, J., Gesztelyi, R., Juhász, B.: 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), [1-12], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22101782>
IF: 3.098

További közlemények

3. Kiss, R., Szabó, K., Gesztelyi, R., Somodi, S., Kovács, P., Szabó, Z., Németh, J., Priksz, D., **Kurucz, A.**, Juhász, B., Szilvássy, Z.: Insulin-Sensitizer Effects of Fenugreek Seeds in Parallel with Changes in Plasma MCH Levels in Healthy Volunteers.
Int. J. Mol. Sci. 19 (3), 771-, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030771>
IF: 3.687 (2017)
4. Priksz, D., Bombicz, M., Varga, B., **Kurucz, A.**, Gesztelyi, R., Balla, J., Tóth, A., Papp, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Upregulation of Myocardial and Vascular Phosphodiesterase 9A in A Model of Atherosclerotic Cardiovascular Disease.
Int. J. Mol. Sci. 19 (10), 1-18, 2018.
IF: 3.687 (2017)





5. Bombicz, M., Priksz, D., Varga, B., **Kurucz, A.**, Kertész, A. B., Takács, Á., Pósa, A., Kiss, R., Szilvássy, Z., Juhász, B.: A Novel Therapeutic Approach in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: allium ursinum Liophylisate Alleviates Symptoms Comparably to Sildenafil.
Int. J. Mol. Sci. 18 (7), 1-19, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18071436>
IF: 3.687
6. Murnyák, B., Bodoki, L., Nagy-Vincze, M., Griger, Z., Csonka, T., Szepesi, R., **Kurucz, A.**, Dankó, K., Hortobágyi, T.: Inclusion body myositis: pathomechanism and lessons from genetics.
Open Med. 10, 188-193, 2015.
7. Bodoki, L., Nagy-Vincze, M., Griger, Z., Csonka, T., Murnyák, B., **Kurucz, A.**, Dankó, K., Hortobágyi, T.: Inclusion body myositis - a case based clinicopathological update.
Cent. Eur. J. Med. 9 (1), 80-85, 2014.
IF: 0.153
8. Csonka, T., Murnyák, B., Szepesi, R., **Kurucz, A.**, Klekner, Á., Hortobágyi, T.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) and p53 labelling index correlates with tumour grade in meningiomas.
Folia Neuropathol. 52 (2), 111-120, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5114/fn.2014.43782>
IF: 1.568

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,463

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,681**

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

Debrecen, 2018.10.15.



9. Tárgyszavak

Magyar tárgyszavak: Prunus cerasus, meggy, ischaemia-reperfusio, retina, electroretinographia, ZDF patkány, hemoxigenáz-1, Alzheimer-típusú demencia, amyloid angiopathia, rekreációs mozgás, pozitron emissziós tomográfia (PET).

Angol tárgyszavak: Prunus cerasus; sour cherry; ischemia-reperfusion; retina; electroretinography; ZDF rat, heme oxygenase-1, Alzheimer's-type dementia, amyloid angiopathy, voluntary exercise, positron emission tomography (PET).

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Szilvássy Zoltán, rektor és intézetvezető úrnak (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet), hogy lehetővé tette számomra a kutatás elvégzését az általa vezetett intézetben.

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Juhász Béla egyetemi docens úrnak (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet) a sok segítségért, illetve jó szóért, amikor elakadtam akár a munkában, akár az életben.

Köszönöm a munkacsoportom tagjainak, Dr. Kozma Mariannak, Dr. Varga Balázsnak és Dr. Priksz Dánielnek (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet) a jó tanácsokat, konferenciaélményeket, illetve hiányosságaim baráti hangvételű korrigálását.

Köszönettel tartozom Dr. Gesztelyi Rudolf egyetemi adjunktusnak (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet) a statisztika útvesztőiben nyújtott iránymutatásáért.

Köszönöm Kiss Henriettának és Nagy Katalinnak (DE KK Neurológiai Klinika) a szövettani eljárásoknál nyújtott segítséget, valamint Oláh Krisztinának (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet) a közreműködést a kognitív funkciók teszteknél.

Köszönöm Dr. Pósa Anikónak és munkacsoportjának (SZTE TTIK, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék) a hemoxigenáz aktivitás-mérésnél nyújtott segítségüket.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Lampé Nórának és Szabó Katalinnak, szobatársaimnak és egyben barátaimnak, hogy sosem engedték, hogy túl hosszú időre beletemetkezzek a munkába.

Köszönöm édesanyámnak, Zsarnoszki Annának és testvéremnek, Dr. Kurucz Ádámnak, hogy az egyetemi és PhD évek alatt szerető támogatást nyújtottak.

Hálával tartozom kedvesemnek, Dr. Rácz Kálmánnak, hogy az örömteli és nehéz helyzetekben egyaránt mellettem állt.

Köszönöm barátaimnak a sok biztatást, valamint a kikapcsolódást, feltöltődést, amit biztosítottak számomra.

A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00062; UNKP-UNKP-16-4; illetve a Nemzeti Agykutató Program KTIA_13_NAP-A-II/7 keretein belül valósult meg.

