

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Ujhelyi Judit Ágnes

**DPP-4 inhibitorok és inhomogén sztatikus mágneses tér,
mint a neuropátiás fájdalom és a gyulladás új kezelési
lehetőségei**

**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2014**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

DPP-4 inhibitorok és inhomogén sztatikus mágneses tér, a neuropátiás fájdalom és a gyulladás új kezelési lehetőségei

Dr. Ujhelyi Judit Ágnes

Témavezető: Dr. Pórszász Róbert



**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2014**

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	1
1. Bevezetés és célkitűzés	2
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. A hasnyálmirigy rövid anatómiai és szövettani jellemzése	4
2.2. Az inzulin bioszintézise, inzulinszekréción szabályozó tényezők	4
2.3. 2-es típusú diabétesz kezelési lehetőségei	6
2.4. 2-es típusú diabétesz szövődményei	9
2.5. Az inhomogén sztatikus mágneses tér	12
3. Anyagok és módszerek	15
3.1. Kísérleti állatok és etikai irányelvek	15
3.2. Sitagliptin és vildagliptin alkalmazása	15
3.3. Allyl-isothiocyanate (AITC, mustárolaj) által kiváltott gyulladásos modell	16
3.4. Fül ödéma mérése	16
3.5. Neutrofil granulocita akkumuláció mérése	17
3.6. Plazmaextravazáció mértékének mérése egér húgyhólyagban	17
3.7. Krónikus arthritis modell	18
3.8. Mechanikai ingerre adott fájdalom reakció mérése	18
3.9. Hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció mérése (Increasing hot plate test)	19
3.10. Sztatikus mágneses tér kezelés	19
3.11. Diabétesz modell	20
3.12. A vér glükóz szintjének meghatározása	21
3.13. Kísérleti csoportok	21
3.14. Statisztika	21
4. Eredmények	22
4.1. AITC által kiváltott gyulladásos modell	22
4.2. Neutrofil granulocita akkumuláció mérése	23
4.3. Plazmaextravazáció mértékének mérése egér húgyhólyagban	24
4.4. Mechanikai ingerre adott fájdalom reakció mérése	25
4.5. Hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció mérése (Increasing hot plate test) CFA-indukálta krónikus arthritisben	26
4.6. Sztatikus mágneses tér hatása a testtömeg változására	27
4.7. Sztatikus mágneses tér hatása a vér glükóz szintjének változására	29
4.8. Sztatikus mágneses tér hatásának mérése increasing hot plate tesztel	31

5. Megbeszélés	34
6. Összefoglalás.....	37
6.1. Összefoglalás.....	37
6.2. Summary	38
7. Irodalomjegyzék.....	39
7.1. Az értekezés elkészítéséhez felhasznált irodalom	39
7.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:	49
8. Tárgyszavak.....	50
9. Köszönetnyilvánítás	51
10. Függelék	52

Rövidítések jegyzéke

ADA	Amerikai Diabetes Társaság
AITC	Allyl-Isothiocyanate
ATP	Adenozin-5'-Trifoszfát
CD1	Cluster of Differentiation 1
CFA	Complete Freund Adjuvant
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP-4	Dipeptidil Peptidáz-4
EASD	Európai Diabetes Társaság
ENG	Elektroneurográfiával
FDA- USFDA	U.S. Food And Drug Administration
GABA	Gamma-Amino-Vajsav Gamma-Aminobutyric Acid
GIP	Glükóz Dependens Inzulinotrop Peptid
GLP-1	Glukagonszerű Peptid-1 (Glukagon-Like Peptid-1)
HTAB	Hexadecyltrimethylammonium-Bromid
IFG	Emelkedett Éhomi Vérglükózsztint (Increased Fasting Glucose)
IGT	Csökkent Glükóztolerancia (Increased Glucose Tolerance)
LPS	Lipopoliszacharid
MRI	Mágnesesrezonancia-Képalkotás (Nuclear Magnetic Resonance)
NMR	Nukleáris Mágneses Rezonancia
PACAP	Agyalapi Mirigy Adenilát-Cikláz-Aktiváló Polipeptid
SCENIHR	Scientific Committee On Emerging And Newly Identified Health Risks
SEM	Standard Error of Mean
SMF	Sztatikus Mágneses Tér
SNRI	Szerotonin-Norepinefrin Reuptake Gátló (Serotonin- Norephedrine-Reuptake-Inhibitor)
STZ	Streptozotocin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

1. Bevezetés és célkitűzés

A diabétesz (diabetes mellitus, cukorbetegség) krónikus anyagcsere betegség, a szervezet glükóz feldolgozási és felhasználási zavara. Az 1-es típusú diabéteszt leginkább inzulin hiány, míg a 2-es típusú diabéteszt bizonyos mértékben csökkent inzulin termelés és inzulin rezisztencia jellemzi, de mindkét állapot emelkedett vér glükóz szinttel jár (Powers, 2012). Két fő típusa -1-es és a 2-es típusú diabétesz- mellett számos egyéb típust is elkülönítenek (pl. MODY, gesztációs diabétesz, stb.).

Becslések szerint a diabétesz a világon mintegy 382 millió embert érint, kb. 46%-uk még nem diagnosztizált eset és számuk a korábban előre jelzett adatokat felülmúlva, évről évre rohamosan emelkedik. Bár általánosságban elmondható, hogy öt betegből négy alacsony vagy közepes életszínvonalú országban él, a világ minden táján előforduló problémakörrel van szó. (Nemzetközi Diabétesz Szövetség, 2013). A betegség terjedése jelentős egészség-gazdasági kihívást jelent, mivel a betegség és a szövődmények kezelésének költségei folyamatosan emelkednek. A betegség XXI. századi kihívásai közé tartozik a 2-es típusú forma késői felismerése mellett az is, hogy a folyamatosan bővülő gyógyszerválaszték ellenére még mindig nem kielégítő a vér glükóz szint csökkentő kezelés eredményessége (Winkler, 2012).

Az összes diabéteszes eset kb. 90%-át 2-es típusú diabétesz teszi ki. Többségében a középkorú vagy idősebb korosztályt érinti, de manapság a gyermek- és a serdülőkorra is egyre gyakrabban jellemző az elhízás miatti előfordulása és a fiatalabb korosztályokban is fokozottan terjed.

A 2-es típusú diabétesz heterogén eredetű megbetegedések csoportja, közös jellemzőjük, hogy az inzulinszekréció nem képes az euglikémia fenntartására. Ezekre a kórképekre egyaránt jellemző a szénhidrát bevitelt követő nagyobb mértékű vér glükóz szint emelkedés (exogén hiperglikémia, csökkent szénhidrát tolerancia) és a szénhidrátbevitel nélkül is fokozott glükoneogenesis (endogén hiperglikémia) is. A β -sejtek megváltozására utal, hogy intravénás glükózterhelésre csökkent szekréciós válasszal reagál a szervezet, azonban glükóztól eltérő stimulusra (pl. egyes aminosavak) a szekréciós válasz megtartott. Sok esetben jellemző továbbá a vérben a normális bazális inzulin koncentrációnál magasabb érték, amit az állandósult hiperglikémia tart fenn. A tartósan magas inzulinszint a szövetek részleges inzulinrezisztenciájához vezet, aminek hátterében a receptor-inzulin komplex fokozott internalizálódása, ezáltal a sejtmembránon az inzulinreceptorok számának csökkenése áll. A β -sejtek mellett zavart szenved az α -sejtekben a glukagonszekréció gátlása

is, így a relatív vagy abszolút glukagontúltermelés is szerepet játszik az anyagcsere-elváltozások kialakulásában. (Fonyó szerk., 2013)

A 2-es típusú diabétesz idült szövődményei a mikroangiopátiák: diabéteszes retinopátia, nefropátia és neuropátia valamint a makroangiopátiás szövődmények (atheroszklerózis). A legelterjedtebb és ebből kifolyólag a legköltésesebb szövődmény a neuropathia diabetica (Peltier és mtsai., 2014). Legjellemzőbb tünetei az érintett terület, többnyire a végtagok zsibbadása, érzéskiesés, fájdalom egyébként ártalmatlan behatásokra is. Az alapbetegség és a szövődmény világméretű elterjedtségének és a folyamatosan bővülő gyógyszerkészlet ellenére sem áll rendelkezésre napjainkban sem kielégítő terápiás lehetőség.

Kutatócsoportunk célul tűzte ki a 2-es típusú diabétesz kezelésében egyébként elterjedt dipeptidil peptidáz-4 (DPP-4) enzim inhibitor vegyületek két jeles képviselőjének, a sitagliptinnek és a vildagliptinnek tesztelését fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatás szempontjából mint új, potenciális terápiás területeket in vivo egér modellek segítségével. Számos korábbi kutatás vizsgálta a gyógyszercsoportot különböző gyulladásos betegségekben (Balakumar és mtsai, 2013), és humán vizsgálatok is alátámasztották a gyulladáscsökkentő hatást (Makdissi és mtsai., 2012). A diabétesz kezelésére használt DPP-4 inhibitorok értékét növeli, hogy a diabétesz gyakori társbetegségei, a diabéteszes neuropátia és az atheroszklerózis hátterében is gyulladásos folyamatok állnak (Chaudhuri és mtsai., 2012).

A neuropátiás fájdalmak csillapításának egy alternatív lehetősége a gyógyszeres terápiák mellett a sztatikus mágneses tér (SMF) alkalmazása. A nukleáris mágneses rezonancia (NMR) módszer orvosi diagnosztikában történt meghonosodása és elterjedése óta a különböző mágneses terek biológiai, élettani hatásainak vizsgálata fokozott tudományos érdeklődésre tett szert. A SMF jól definiált hatása mind a sejtekre, mind az élő szervezetre ma már széles körben elfogadott; állatkísérletes modellben kimutatható volt szignifikáns fájdalomcsillapító hatása is (László és mtsai., 2007). Munkacsoportunk céljai közt szerepelt vizsgálni az inhomogén SMF fájdalomcsillapító képességét diabéteszes neuropátia egér modellen, valamint a kezelés hatását a kísérleti állatok vér glükóz szintjének és testtömegének alakulására.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A hasnyálmirigy rövid anatómiai és szövettani jellemzése

A hasnyálmirigy (pancreas) retroperitoneális helyzetű elnyúlt mirigy, endodermális eredetű, a bélcső származéka. Különálló struktúrákhoz kötötteen két mirigyfunkciót egyesít, exokrin és endokrin tevékenységet végez. Exokrin mirigyei emésztőenzimeket termelnek, melyek a duodenumba ürülnek. Endokrin működésű mirigyei anyagcsere folyamatokat befolyásoló hormonokat termelnek, melyeket a véráramba ürítenek. Endokrin működésű sejtjei a mirigy összsúlyának 1-2%-át teszik ki. A hormonokat termelő sejtek szigetszerűen csoportosulnak, ezeket a funkcionálisan integrált „mikroszervecskéket” nevezzük felfedezőjük után Langerhans-szigeteknek. Fény- és elektronmikroszkópos képük alapján négy fő sejtípust különböztetünk meg benne, az α - és δ -sejtek a perifériás részben, a β -sejtek a centrális részben helyezkednek el, míg az γ -sejtek mindenütt megtalálhatók. Az α -sejtek glukagont, a β -sejtek inzulint, a δ -sejtek szomatostatint, míg az γ -sejtek pankreatikus polipeptidet termelnek.

A hasnyálmirigy artériái a kötőszöveti sővényekben haladnak, a centrális sejtek felé útközben ágakat adnak le az α - és δ -sejteknek is, így a β -sejteket ellátó vér előzőleg mindig kapcsolatba kerül az α - és δ -sejtekkel. A vénás elvezetés jellegzetessége, hogy az exokrin végkamrák körül az endokrin mirigyekre jellemző portális keringés jön létre, így a Langerhans-szigetek szekrétumai az exokrin végkamrák működésének szabályozásában is részt vesznek (Röhlich szerk., 1999).

2.2 Az inzulin bioszintézise, inzulinszekréciónak szabályozó tényezők

A Langerhans-szigetek sejtjei közül a β -sejtek termelik a tápanyagforgalom szabályozásának középpontjában álló és gyógyszeres szempontból is kiemelkedő fontosságú inzulin hormont.

A β -sejtek endoplazmatikus retikulumában egy hosszabb prekursor polipeptidlánc, a preproinzulin szintetizálódik és még ott helyben proinzulinná alakul. A 86 aminosavból álló egyláncú proinzulin a Golgi-apparátuson keresztül vesiculákba rendeződik. Itt kihasad belőle 4 bázikus aminosav és egy 30 aminosavból álló lánc, a C-peptid, melynek az endogén inzulin termelés mértékének meghatározásában van szerepe. A megmaradt két rövid (az A-lánc 21, a B-lánc 30 aminosavból áll) polipeptid láncot diszulfidhidak kötik össze, ez a humán inzulin végső szerkezete. Az inzulin a β -sejtekben hexamer formában, két molekula cinkkel raktározódik.

Az inzulinszekréción befolyásoló legrégebben ismert alapvető stimuláns a vérplazma glükózsztíjének emelkedése. A glükóz inzulinszekréción hatását közvetlenül a β -sejteken fejt ki: a GLUT-2 facilitatív glükóz transzporterén keresztül lép be a sejtbe, ahol a glukokináz enzim foszforilálja, majd a folyamat végeredményeképpen emelkedik az intracelluláris ATP-szint. A keletkezett ATP hatására a sejtmembrán ATP-szenzitív K^+ -csatornái záródnak, ennek következtében a sejt depolarizálódik, megnyílnak a sejtmembrán feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornái, megnövekszik a sejtplazma szabad Ca^{2+} -koncentrációja, ami az inzulingranulomok exocitózisához, az inzulin szekréciónához vezet. Ezt a mechanizmust használják ki a sulphonyurea és meglitinidek közé tartozó ún. inzulin szekretogog orális antidiabetikumok. A tápcsatornából felszívódott tápanyagok közül nem csak a glükóz, de egyes aminosavak, így a lizin, az arginin és a leucin is közvetlenül hatnak a β -sejtek inzulin szekréciónára. Ezek az aminosavak nem a GLUT-2 transzporterén keresztül fejtik ki hatásukat, így inzulin elválasztást serkentő hatásuk GLUT-2 defektus esetén is érvényesül.

A tápanyagok közvetlen hatását különböző egyéb mechanizmusok támogatják, így például a nervus vagus útján érkező paraszimpatikus kolinerg ingerület, melyet a szájból érzett édes íz, valamint a táplálékfelvételi rituálé válthat ki (Fonyó szerk., 2013).

További fokozó hormonális mechanizmus a bélben a tápanyagok hatására felszabaduló gasztrointesztinális hormonok, az inkretinek hatása. Ezek közül elsőként a glükóz dependens inzulinotrop peptid (GIP) szerepét ismerték fel a 70-es években. A GIP egy 42 aminosavból álló fehérje, többnyire a vékonybél K-sejtjei termelik, de megtalálható a központi idegrendszerben is, ahol a sejtek túlélésében játszik szerepet (Nyberg és mtsai., 2005). Bélben történő felszabadulásának fő ingere a táplálékfelvétel, a bélbe kerülő szénhidrát közvetlenül stimulálja szekréciónát, szintje percek alatt megemelkedik. Habár a GIP glükóz függő inzulin szekréciónat serkentő hatása kimutatható volt, bélnedvből eltávolítva annak inkretin hatása (inzulin szekréciónat és β -sejt proliferációnat serkentő, β -sejt apoptózist gátló hatás) megmaradt, ez további hasonló hatású peptidek jelenlétére utalt (Ebert és mtsai., 1983). A proglukagon gén klónozása és szerkezeti felderítése vezetett a második inkretin hatású peptid, a glukagonszerű peptid-1 (glukagon-like peptid-1, GLP-1) felfedezéséhez (Drucker és mtsai., 1987, Kreyman és mtsai., 1987). A GLP-1-t a GIP-től eltérően enteroendokrin L-sejtek állítják elő a vékonybél distalis szakaszában illetve a vastagbélben. Szintje táplálékfelvételt követően a GIP-hez hasonlóan percek alatt megemelkedik, ebből következik, hogy szekréciónat idegi és/vagy endokrin faktorok is segítik még jóval azelőtt, hogy a tápanyagok közvetlenül hatni tudnának az L-sejtekre. Mind a GIP, mind a GLP-1 tartalmaz kettős pozíciónban alanint, így szerkezetük lehetővé teszi, hogy a dipeptidil-peptidáz-4 (DPP-

4) enzim szubsztrátjai legyenek. Így a felszabaduló inkretinek nagyon gyorsan, néhány perc alatt bomlanak, ráadásul mindkét peptid gyorsan ürül a keringésből a veséken keresztül is (Drucker, 2006).

Az inzulinszekréciót gátló mechanizmus a hasnyálmirigy δ -sejtjei által elválasztott szomatosztatin hatása. Ennek lokális, parakrin gátló hatása mind az α -sejtek glukagon szekrécióján, mind a β -sejtek inzulin szekrécióján érvényesül. A szomatosztatin állandó gátló tónusával és inzulin illetve glukagon hatására erőteljesebb elválasztásával véd a túlzott inzulin és glukagon hatástól, csillapítja az ingadozások amplitúdóját.

A β -sejteket gátló további mechanizmus stressz hatására indul be: a szimpatikus izgalom, az adrenalin és a noradrenalin a β -sejtek α -receptorain hatva gátló hatású, ezzel megakadályozva vészhelyzet esetén a vér glükóz szintjének csökkenését (Fonyó szerk., 2013).

2.3. 2-es típusú diabétesz kezelési lehetőségei

A 2-es típusú diabétesz orális antidiabetikus kezelését akkor kell elkezdeni, ha az intenzív életmódkezelés (orvosi táplálkozási terápia és fizikai aktivitás) 6-8 hét elteltével sem biztosítja a kívánt glikémiás kontrollt. Ilyen esetben elsőként –akut anyagcsere kisiklás (éhomiai vércukor $>13,9$ mmol/l, random vércukor ismételt $>16,7$ mmol/l, HbA_{1c} $>10,0\%$, ketonuria és/vagy cukorbetegségre jellemző karakterisztikus tünetek fennállása) kivételével– az Amerikai- (ADA) és az Európai Diabetes Társaság (EASD) 2008 végén megújított közös ajánlása metformin kiegészítő adását javasolja. Akut anyagcsere kisiklás fennállása esetén inzulin alkalmazandó, majd ha az anyagcserehelyzet rendezésre került, megfontolható egyéb terápia választása (Szi 1).

Az orális antidiabetikumok hatásjelleg alapján két nagy csoportra oszthatók: inzulinotróp és nem inzulinotróp vegyületek.

A nem inzulinotróp vagy antihyperglikemizáló vegyületek közös jellemzője, hogy monoterápiában nem hipoglikemizálnak, az inzulintermelést nem befolyásolják. Ide tartozik a szénhidrátok felszívódását gátló akarbóz, mely az alfa-glukozidáz enzim működését, így a szénhidrátok bontását akadályozza. Inzulinotrop hatású szerek a biguanid származékok is. Ebbe a csoportba tartozik a már említett, elsőként választandó orális antidiabetikum, a metformin. A metformin az inzulin-receptor kötődést segíti elő főként a vázizomsejteken és a májsejteken. A májban fokozza a glükózfelhasználást és gátolja a glikoneogenezist. Csökkenti a glükóz bélből való felszívódását, ez és az étvágycsökkentő hatás együttesen okoznak következményes testsúlycsökkenést, ami a jellemzően elhízott betegekben az inzulinérzékenység növekedéséhez vezet. A biguanidok közé tartozik a buformin is, mely bár

még forgalomban van, de új kezelésként való alkalmazása nem javasolt. Szoros értelemben vett inzulin-érzékenyítők a tiazolidindionok. Egyaránt csökkentik a plazma glükóz- lipid- és inzulinszintjét, mivel fokozzák az izom- és zsírszövet glükóz felvételét és felhasználását, csökkentik a zsírsavszintézist és a májban csökkentik a glikogenolízist, mindezt anélkül, hogy az inzulinszekréciót serkentnék. A csoport forgalomban lévő képviselője a pioglitazon, miután a roziglitazont az Európai Unióban mellékhatása miatt kivonták a forgalomból. A csoport legújabb tagja, a rivoglitazon jelenleg klinikai 3-as fázis stádiumban van.

Az inzulinotróp vagy hipoglikemizáló gyógyszerek közös tulajdonsága, hogy az inzulin elválasztását serkentik, ezzel magyarázható esetleges hipoglikémiát okozó hatásuk, melynek kockázata gondos adagolással minimálisra csökkenthető. Ezek a szerek az étkezés utáni, a bazális inzulin elválasztást vagy mindkettőt képesek befolyásolni különböző hatásmechanizmusok útján. A szulfanil-karbamidok között megkülönböztetünk első és második generációs vegyületeket, az első generációs szereket, mint a tolbutamid vagy chlopropamid ma már nem használják. A második generációs szerek közé tartoznak a glibenclamid, gliclazid, glimepirid, glipizid és gliquidon. Hatásukat a β -sejtek ATP-függő K^+ -csatornához kötődve fejtik ki, bezárva azokat, így depolarizálva a sejtet, ami a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák nyitásához és gyors inzulinkirámláshoz vezet. Az inzulin szintézisét azonban nem befolyásolják, tehát hatásuk kifejtéséhez szükséges bizonyos mennyiségű inzulin megléte a β -sejtekben. A betegek egy része, kb 10-15%-a, főként a 40 év alatti korosztály azonban nem reagál a kezelésre, már a kezdetektől meglévő, vagy a kezelés során fokozatosan kialakuló hatástalanság tapasztalható. Étkezési vér glükóz szabályozók vagy prandiális glükózregulátorok a meglitinid származékok: nateglinid és repaglinid. Ezeket a vegyületeket a szulfanil-urea származékokból fejlesztették, közvetlenül a β -sejtekre hatva fokozzák különösen a posztprandiális inzulin elválasztást (Fürst szerk. 2006). Az inzulinhatás fokozott érvényesülését más úton támogató szerek az inkretin-hatást fokozó, dipeptidil-peptidáz-4 (DPP-4) enzim antagonistái, a gliptinek, mely család tagjainak száma fokozatosan nő, jelenleg 8 féle gliptin vált gyógyszerre vagy közel van a gyógyszerre váláshoz (abc sorrendben: alogliptin, anagliptin, gemigliptin, linagliptin, saxagliptin, sitagliptin, teneligliptin, vildagliptin). A táplálékfelvételt követően bélből felszabaduló inkretin hormonok (GIP és GLP-1) lebontását végző enzim gátlásának következtében a hormonok mennyisége megemelkedik, inzulinszekréciót és β -sejt proliferációt serkentő hatásuk hosszabbtávú. A DPP-4, a szervezetben cirkuláló formája mellett számos szervben, sejten expresszált formában is megtalálható, mint a CD26 sejtfelszíni antigén. Kimutatták bélhám sejteken, vesében, májban, tüdőben, pajzsmirigyben, nyirokcsomóban, lépen, prosztatán,

adipocitákon, aktivált limfocitákon és monocitákon is (Gorrell, 2005). Az enzim fő működése, hogy a fehérjét az N-terminus felőli második aminosavnál rendkívül gyorsan hasítja, különösen alanint és prolint preferálva ebben a pozícióban (Mentlein, 1999). A DPP-4-nek az inkretin hormonok mellett számos egyéb potenciális szubsztrátja van: neuropeptid Y, peptid YY, gastrin-releasing polipeptid, agyalapi mirigy adenilát-cikláz-aktiváló polipeptid (PACAP), inzulinszerű növekedési faktor-1, P anyag és különböző kemokinek. Ezeknek köszönhető, hogy a DPP-4 nem csak a glükóz homeosztázis szabályozásában vesz részt, de a vérnyomás, a neurogén gyulladás és az immunrendszer szabályozó folyamataiba is bekapcsolódik (Ahrén, 2007). A legintenzívebben vizsgált gliptin vegyületek a sitagliptin és a vildagliptin. Mindkettőre jellemző, hogy kompetitív módon, reverzibilisen gátolják a keringő DPP-4 enzimet (Villhauer és mtsai., 2003, Kim és mtsai., 2005). Mind a sitagliptin, mind a vildagliptin orálisan aktív, gyorsan abszorbeálódó molekulák. Már a bevételt követően 30 perccel szinte 100%-os DPP-4 gátlás jelentkezett, amely 16 óra elteltével még mindig 80% fölött volt, ez lehetővé teszi a szerek napi egyszeri alkalmazását gyógyszerként (Ahrén és mtsai., 2004, Herman és mtsai., 2006). A máj nem vesz részt számottevően a vegyületek szervezetből történő eliminálásában, a veséknek azonban annál nagyobb jelentősége igazolódott (Bergman és mtsai., 2006). Ennek következményeként javasolta az FDA a renális státusz felmérését sitagliptin adását megelőzően, esetlegesen csökkentett dózis felírása céljából.

Az inkretin-hatás fokozásával hatnak az inkretin mimetikumok is, a csoport első tagja az exenatid. Mivel peptid természetű vegyületről van szó, injekció formájában alkalmazható, hatására fokozódik a glükóz-függő inzulinszekréció mértéke, valamint csökkenti a glukagon kiválasztást és a gyomor ürülését is lassítja.

Az új irányelvek az életmód terápia és az orális antidiabetikus kezelés sikertelensége (HbA_{1c} >7%) esetén akár már a sikertelen metformin-monoterápiát követően alternatív választási lehetőségnek tekintik az inzulin bázisinzulin formájában történő bevezetését. Ennek oka a β -sejtek kímélete valamint, hogy a jó anyagcsere állapot rövid időn belül beállítható vele, így megelőzhetők a szövődmények. Orális antidiabetikus kezelés mellé bázisinzulinként a hosszú hatású inzulinanalógokat használják (glargine, detemir). Az inzulinadagolás egyéni mérlegelést követően számos egyéb terápiás formában (konvencionális, bifázisos, szemiintenzív, intenzív) adható, melyek részletes ismertetésétől eltekintünk (Szi 1).

2.4. 2-es típusú diabétesz szövődményei

A diabéteszes idült szövődmények közül diabétesz-specifikusnak minősülnek a mikroangiopátia különböző típusai: retino-, nephro-, és neuropathia diabetica, míg a makroangiopátiás szövődmények az ateroszklerózis különböző klinikai formáit jelentik.

Az ateroszklerózis klinikai kórformái között kiemelt jelentőségűek a koronáriák érintettségén alapuló megbetegedések, a cerebrovasculáris szövődmények és az alsó végtagi artériás keringési zavar következményei. Az ateroszklerózis kórfejlődéséből adódóan az egyik érterületen mutatkozó kórképek észlelése esetén joggal feltételezhető, s ezért vizsgálendő a szervezet egyéb érterületeinek érintettsége is. A kardiovaszkuláris kockázat már a diabétesz előállapotaiban, csökkent glükóztolerancia (IGT) és emelkedett éhomi vérglükózszint (increased fasting glucose, IFG) esetén is fokozott.

A diabéteszes retinopátia kialakulásában a diabétesz-tartamnak és az anyagcsere helyzetnek van döntő szerepe. Bár előfordulása a jobb terápiás lehetőségeknek köszönhetően folyamatosan csökkent, számos országban vezető oka az újonnan kialakuló vaksági eseteknek. 1-es típusú cukorbetegségben a proliferatív retinopátia, míg 2-es típusú cukorbetegségben a macula oedema incidenciája nagyobb. 2-es típusú diabéteszben szenvedő betegekben már a betegség diagnosztizálásakor jelen lehet a szövődmény enyhébb formában, ennek oka a kór lappangó fejlődése. Kórlefolyását befolyásoló tényezők a tartós hiperglikémia, hipertónia, szérum lipid eltérések és a terhesség.

A neuropathia diabetica-t fokozatosan növekvő mikroalbuminúria, emelkedő vérnyomás és csökkenő glomerulus filtrációs ráta jellemzi. A szövődmény kialakulásában és előrehaladtában jelentős szerepe van a tartós hiperglikémiának, a megváltozott haemodinamikai viszonyoknak, ezek mellett részben oki tényezőként említhetők a genetikai tényezők és a dohányzás is. Hosszan elhúzódó kórfolyamat, mely kielégítő kezelés hiányában végstádiumú veseelégtelenségbe torkollhat. A mikroalbuminúria nem csak a makroalbuminúria szempontjából, de a kardiovaszkuláris megbetegedések tekintetében is prediktív tényezőnek minősül. A mikroalbuminúria az általános vaszkuláris (endothel) károsodás jeleként értékelhető (Szi 1).

A diabéteszes neuropátianak morfológiai jele nincs, ám számos, a beteg életét megkeserítő panaszt okoz, így paresztéziákat, érzéskiesést, gyöki fájdalmakat, nyelési nehézséget, vizelési és székelési problémákat, ortostaticus hypotensiot, erekcióképtelenséget (Szende szerk. 1999). Újonnan felismert 2-es típusú diabéteszben már a betegség megállapításakor találkozhat a szakember neuropátia okozta tünetekkel vagy a szövődményre

utaló vizsgálati eltéréssel. Becslések szerint kb. a betegek 1/3-a szenved valamilyen, a neuropátia okozta panasztól. Ez a leggyakrabban előforduló szövődmény típus mind 1-es, mind 2-es típusú diabéteszben (Attal és mtsai., 2010, Bril és mtsai., 2011, Pambianco és mtsai., 2006, Adler és mtsai., 2003, Fong és mtsai., 2004), ezáltal a legköltésesebb diabéteszhez kapcsolódó társbetegség, mely a növekvő hatékony gyógyszerválaszték ellenére még mindig alulértékelt jelentőségű és elégtelenül kezelt. A fájdalmas diabéteszes neuropátia a fájdalommal nem járó diabéteszes neuropátiával ellentétben jelentős negatív hatással van a beteg életminőségére fizikai és mentális szempontból egyaránt (Van Acker K és mtsai., 2009). A diabéteszes neuropátia leggyakrabban előforduló altípusa a diabéteszes érző-motoros polineuropátia, ami a végtagokat érintő szimmetrikus, a kezeken és a lábakon „kesztyűszerűen” illetve „harisnyyszerűen” jelentkező zsibbadás, érzéskiesés és szűrő fájdalom. A polineuropátiát jellemző további manifesztációk az allodínia (fájdalmas érzet ártalmatlan ingerre) és a hiperalgécia (fokozott érzékenység fájdalmas behatásokra) (Peltier és mtsai., 2014). A tünetek alapján a betegség könnyen felismerhető, a beteg alapos kikérdezése alapján a diagnózis gyanítható. A kór megállapításához a vibrációérzés (mélyérzés, pallesthesia) csökkenését 128 Hz-es Rydel-Seiffer-féle kalibrált hangvilla segítségével vizsgálják. További egyszerű vizsgálati módszer a 10 g súlyú Semmes-Weinstein-féle monofilamentum, mellyel a talp felületén a protektív érzés könnyen vizsgálható. Az autonóm neuropátia a kardiovaszkuláris reflex tesztekkel vizsgálható legkönnyebben (SzI 1). Ezek mellett a neuropátia elektroneurográfiával (ENG) igazolható, mellyel az elektromos jelek továbbításán keresztül az idegek működése vizsgálható (idegvezetési vizsgálat). Az ENG egy megbízható módszer az állapot követésére, amennyiben hozzáértő szakember végzi és értékeli a vizsgálatot (Arezzo JC és mtsai., 2002). Az idegi elváltozások vizsgálatára lehetőséget adó módszer a teljes ideg biopszia, tipikusan a lábikra-ideg (nervus suralis) eltávolításával. Ez a módszer az eljárás invazivitása és károsító hatása miatt –(fennmaradó laterális fájdalom) a diagnosztikában nem használatos. Kutatási vizsgálatokban is ritkán használják, mivel az eljárás nem ismételtető meg azonos helyen, ez pedig a végpont hasznosságát erőteljesen csökkenti. A lábikra-ideg egyébként általában abnormális képet mutat: kevesebb mielinhüvelyes rost, az axonok duzzanata, szórványos demielinizáció, mindezt még a polineuropátia tüneteinek kifejlődése előtt vagy minimális tünetek mellett (Malik és mtsai., 2005. Thrainsdottir és mtsai., 2009). Epidermális bőrbíopsziával vizsgálható a kis, mielinhüvellyel nem rendelkező C-rostok érintettsége. A bőrbíopsziát előnyösebb csupasz, szőrrel nem borított területről venni (tenyér, talp), mivel ott megfelelő a disztális mielinhüvellyel rendelkező rostok relatív mennyisége azok érintettségének vizsgálatához

(McArthur és mtsai., 1998, Myers és mtsai., 2013/1). A bőrbíopszia módszerével lényegesen nagyobb mielinizált rost érintettséget találtak 1-es típusú diabéteszes betegekben mint azonos súlyosságú neuropátiával rendelkező 2-es típusú diabéteszes betegekben, ez pedig a betegség a diabétesz két típusában eltérő mechanizmusát és lefolyását erősíti meg (Myers és mtsai., 2013/2). Már évekkel ezelőtt megfigyelték, hogy a fokozott glükóz kontroll különböző adatokat eredményez az 1-es és a 2-es típusú diabéteszes betegekben. A hiperglikémia intenzívebb kezelése a diabéteszes neuropátia sokkal ritkább előfordulását eredményezte 1-es típusú diabéteszes betegek körében, míg a fokozott vér-glükóz kontroll minimális hatással volt a neuropátia megjelenésére a 2-es típusú betegek esetében (Callaghan és mtsai., 2012/1). Az eredmények alátámasztani látszanak azt a tényt, miszerint az 1-es és a 2-es típusú diabéteszhez társuló neuropátia két különböző betegség, valószínűleg eltérő mechanizmusú idegkárosodással (Callaghan és mtsai., 2012/2, Peltier és mtsai., 2014). A neuropathia diabetica kezelésére jelenleg nem áll rendelkezésre olyan gyógyszer, amely bizonyítottan stabilizálja vagy visszafordítja a panaszok háttérben álló patomorfológiai elváltozásokat: a mielinhüvely pusztulását vagy az axondegenerációt (SzI 1). A kezelésben többnyire a megelőzésen és a tüneti kezelésen van a hangsúly. A háttérben álló diabétesz karbantartása rendkívül fontos tényező a szövődmény kialakulásának megakadályozásában és a betegség progressziójában. Több vizsgálat megerősítette, hogy a neuropátia kialakulásában jelentős kockázati tényező a dohányzás (Tsfaye és mtsai., 2005) és az egyidejű alkoholfogyasztás valószínűleg szintén emeli a neuropátia megjelenésének rizikóját (Adler és mtsai., 1997). A betegség gyógyszeres kezelésére használható szerek 3 nagy csoportba sorolhatók: antiepileptikumok, antidepresszánsok és nem specifikus fájdalomcsillapítók, ide értve az ópioid fájdalomcsillapítókat is. Az epilepszia elleni szerek közül bizonyítottan hatékony gyógyszerek a fájdalmas neuropátia kezelésében a gabapentin és a pregabalin. Mindkettő GABA- analóg molekula. Hatásukat hasonló mechanizmuson keresztül fejtik ki, a gerincvelő hátsó szarvában található Ca^{2+} -csatornák $\alpha_2\delta$ alegységéhez kötődve gátolják a neurotranszmitter felszabadulását (Sills, 2006). A legtöbb antiepileptikum vizsgálata során csekély előnyt mutatott neuropátiában való alkalmazásra (Peltier és mtsai., 2014). A magyar szakmai irányelvek szerint a fájdalmas neuropátia kezelésére kísérletet érdemes tenni carbamazepin, phenytoin vagy natrium-valproát adásával is (SzI 1). A depresszió kezelésére használatos szerek közül a triciklikus antidepresszánsok bizonyultak hatékonyak, ám ezeknek súlyos mellékhatásaik lehetnek. Újabb molekulák a szerotonin-norepinefrin reuptake gátló (SNRI) duloxetin és venlafaxin, melyek ugyancsak fájdalmas neuropátia kezelésében lehetnek a beteg hasznára (Pergolizzi és mtsai., 2013, Rowbotham és mtsai., 2004). Az ópioid

fájdalomcsillapítók ismert hatásukat placebo-kontrollált vizsgálatokban is bizonyították, ám alkalmazásukat hátráltatja a hozzászokás veszélye, a terápia folytatásának elutasítása és a visszaélés lehetősége (Spallone és mtsai., 2012). Oki terápiás lehetőségként tartják számon az α -liponsav adását, melynek hatása antioxidáns tulajdonságaiból és glutathion-szint csökkentő képességéből eredhet (Vallianou és mtsai., 2009). A polineuropátia egyes kóros paramétereit javítja a szintén oki terápiaként alkalmazott hexóz út inhibitor benfotiamin is, ami B-vitamin-kombinációban érhető el a piacon (SzI 1). A fájdalmas diabéteszes neuropátia helyi kezelésében kevés sikerre számíthatunk, bár a capsaicint tartalmazó kenőcs hatékonynak bizonyult, sok beteg nem viseli el az alkalmazás kezdetén fellépő induló fájdalmat (Webster és mtsai., 2012). Lidocaint tartalmazó kenőccsel vagy tapasszal csak jól körülhatárolt terület kezelhető, diffúz fájdalom enyhítésében kevésbé hatásos. A nem gyógyszeres kezelések közül a torna jótékony hatását vizsgálatok is igazolták, ezt a bőrbíopszia eredményei is alátámasztották (Kluding és mtsai., 2012). Egyéb nem gyógyszeres kezelések (transzkután elektromos idegstimuláció, elektromágneses stimuláció, gerincvelő stimuláció, alacsony energiájú lézerterápia, masszázs, akupunktúra) is a vizsgálódások tárgyát képezik, mindezülig azonban nem sikerült e módszerek egyértelmű hatékonyságát megfelelő klinikai vizsgálatokkal alátámasztani.

2.5. Az inhomogén sztatikus mágneses tér

A mágneses terek biológiai és élettani hatásainak vizsgálata fokozott tudományos érdeklődésre tett szert a nukleáris mágneses rezonancia (NMR) módszer orvosi diagnosztikában történő meghonosodása és elterjedése óta, mágnesesrezonancia-képalkotás (MRI) formájában. Bár az MRI-t jelenleg diagnosztikai célokra használják, állatkísérletes mérések bizonyították, hogy az MR erős, homogén SMF-e (3 T) rendelkezik fájdalomcsillapító hatással (László és mtsai., 2008). Élettani hatás az erősen homogén mágneses téren túl nagyon erősen inhomogén mágneses térrel érhető el. Számos kutatás célozta a SMF hatásának kimutatását rendkívül különböző eredményeket adva. Pittler és mtsai (2007) készítettek egy meta-analízist, mely során olyan humán vizsgálatokat vetettek össze, szám szerint 29-et, melyekben a SMF hatását placebo kontrollal és gyengébb SMF kontrollal is összehasonlították. Megállapításaik szerint nincs elfogadható bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a SMF használható lenne fájdalomcsillapításra, ezért nem javasolható, mint hatékony terápia. Egy reflektáló összefoglalás (Colbert és mtsai., 2008) megkérdőjelezi a levont következtetések helytállóságát, kritizálva azt, hogy az összehasonlított vizsgálatokban nemcsak hogy nem voltak azonosak az adagolási paraméterek, de gyakran nem is voltak a

pontos körülmények megadva, akár a mágnesek fizikai jellemzői sem. A szerzők írásukban javasolnak 10 olyan sarokpontot (pl. a mágneses tér erőssége, target szövet, target szövet távolsága a mágneztől stb.), melyeket minden humán vizsgálat esetében szükséges lenne megadni azért, hogy azok eredményei később összevethetőek, így a hatékonyság vagy hatástalanság kimutatására alkalmasak legyenek. Hangsúlyozzák továbbá, hogy szükséges lenne a SMF dozimetria optimalizálására átfogó fázis 1 vizsgálatot lefolytatni, és ezen adatok ismeretében szervezni széleskörű, randomizált, kontrollált vizsgálatokat.

A terápiás célokon túl a mágneses tér hatásainak pontos feltérképezése és megértése epidemiológiai szempontok miatt is szükségszerű, hiszen az MRI-vel vizsgált betegek és a vele dolgozó személyzet is ki van téve hatásuknak. A hatások és mellékhatások felmérésének nehézségét mutatja, hogy az igény felmerülésének ellenére máig sem született hivatalos EU állásfoglalás a SMF potenciális káros hatásairól. Az Európai Bizottság SCENIHR Bizottsága (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) 2009-ben kiadott egy összefoglaló írást a SMF potenciális veszélyeiről.

In vitro neurodegeneratív állapotot modellező sejt kultúrás kísérletben vizsgálták Ben Yakir-Blumkin és mtsai. 2014 a gyenge SMF (5 mT) hatásait patkány primer agykérgi és hippocampus-ban található idegsejtek túlélésére. Eredményeik szerint a mágneses expozíció gátolja az etopozid-indukálta apoptózist.

Houpt és mtsai 2007 vizsgálták az erős SMF (1-14 T) hatását patkányok viselkedésére. Az állatok szabad mozgásuk során lehetőséget kaptak és megtanultak átmászni egy furaton, mely egy NMR gép mágneses terébe vezetett. Aktív mágneses tér nélkül ezt az állatok rendszeresen megtették. Amikor valódi, erős mágneses teret gerjesztettek, az állatok az első alkalom után többször már nem mentek be a mágneses térbe, elkerülték azt. Ezt az elkerülő magatartást a belső fülben elvégzett labirintektómia segítségével ki tudták iktatni, ami a vestibuláris rendszer SMF érzékelésében való részvételét igazolja.

Több kutatócsoport vizsgálta a SMF keringésre gyakorolt hatását is. Gmitrov 2007 nyulakat tett ki 350 mT erősségű SMF hatásának 40 percig, melynek során fokozott artériás baroreflex érzékenységet és fokozott mikrocirkulációt tapasztalt.

László és Pórszász 2011 vizsgálták a SMF hatását a koraszülésre. A koraszülés modellezésére lipopoliszacharid (LPS) használható, melyből 25 µg intraperitoneális adásával indukálható a koraszülés a vemhes egereken. Napi 40 perces 2,8-476,7 mT erősségű teljes test SMF kezelés képes volt a koraszülés bekövetkezését eltolni a LPS beadását követő 17,43 órától 21,93 órára. A kísérlet során a LPS-dal nem kezelt egerek vemhességének idejére a SMF nem volt hatással.

A SMF fájdalomcsillapító hatását meggyőzően alátámasztották László és mtsai 2007 vonaglási teszt vizsgálatai: az egér hasüregébe juttatott irritáló anyag kiváltotta vonaglás az SMF-el kezelt állatcsoportban 54, 07%-kal csökkent. Későbbi vizsgálatok arra is kiterjedtek, hogy a sztatikus mágneses tér hatásának időtartamát is feltérképezzék: az eredmények alapján a 10 perces SMF expozíció vonaglási teszttel mérhető hatása a hatás megszűnését követő 30 percig nem csökken 90% alá (László és mtsai., 2009). A munkacsoport további vizsgálataiban kísérletet tett a hatásmechanizmus felderítésére is. A leírt fájdalom modellen különböző opioid receptor antagonistákkal végeztek előkezelést és ilyen körülmények között vizsgálták a mágneses tér hatását. Ezek a mérések úgy találták, hogy a SMF fájdalomcsillapító hatását leginkább a μ -, kisebb részben a δ -opioid receptorok közvetíthetik, míg a κ -receptorok részvételére nem találtak bizonyítékot (Gyires és mtsai., 2008). További, akut szomatikus/gyulladásos állatmodellekben igazolták a capsaicin-érzékeny rostok szerepét a fájdalomcsillapító hatás közvetítésében (Sándor és mtsai., 2007).

Munkacsoportunk kísérletei során a László és mtsai., 2007 által fejlesztett, inhomogén SMF előállítására alkalmas készüléket használt, melynek részletes leírását és paramétereit a metodikai leírások között részletezem.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok és etikai irányelvek

Az in vivo kísérleteket 25-35 g súlyú CD1 (Charles River, Gödöllő, Magyarország) és CFLP (Toxicoop Ltd, Budapest, Magyarország) hím egereken végeztük. Az állatokat standard patogénmentes környezetben, 22 ± 3 °C-on tartottuk 12/12 órás fény/sötét ciklusban, standard rágszálótáphoz és vízhez szabad hozzáférést biztosítva.

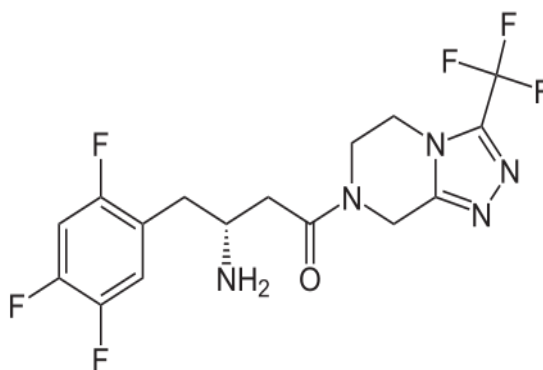
Az állatkísérletes protokollokat a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (engedélyszám: 26/2007 DE-MÁB) és a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi és Állatvédelmi Igazgatósága engedélyezte. A kísérletes munka során szem előtt tartottuk továbbá az Európai Bizottság 86/609/ECC irányelve, az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény 32§, az International Association for the Study of Pain (Zimmermann M., 1983) és a Helsinki Deklaráció ajánlásait.

3.2. Sitagliptin és vildagliptin alkalmazása

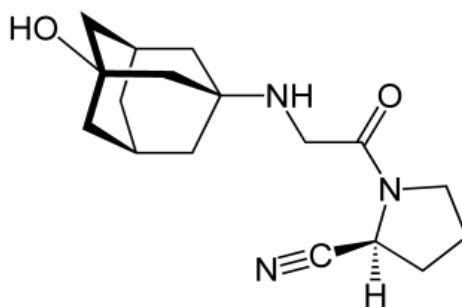
A sitagliptint (1. kép) és a vildagliptint (2. kép) (Nanjing Ange Pharmaceuticals, Nanjing, Jiangsu, China) 1, 3 és 10 mg/kg dózisokban, fiziológiás sóoldatban oldva adagoltuk per os szonda segítségével (1 ml/100 g). A kontroll csoportok azonos mennyiségű a gliptinekhez használt oldószert (azaz fiziológiás sóoldatot) kaptak, megegyező módon.

Az egynapos kísérleteknél egyszeri, míg a 21 napos protokolloknál napi kezelést alkalmaztunk (Thomas és mtsai., 2008).

A kísérleteket és méréseket 30 perccel a sitagliptin és vildagliptin adagolása után végeztük.



1. kép Sitagliptin molekula szerkezeti képlete



2. kép Vildagliptin molekula szerkezeti képlete

3.3. Allyl-isothiocyanate (AITC, mustárolaj) által kiváltott gyulladásos modell

A kísérleti állatokat 30 perccel a gliptin/placebo kezelést követően – 50 mg/kg intraperitoneálisan (i.p.) adott thiopental (Trapanal, Sandoz, Basel, Svájc) injekcióval altattuk el. A jobb fül külső és belső felületét a kereskedelemben kapható fültisztító pálca vattás végének segítségével paraffinban oldott 1%-os mustárolajjal (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) kentük. A kezelést az első kenés után 45 perccel megismételtük (Bánvölgyi és mtsai., 2004; Inoue és mtsai., 1997).

A vizsgálat végén cervicalis dislocatio-t követően a kezelt füleket eltávolítottuk, majd -20°C-on tároltuk a neutrofil granulocita akkumuláció mérés elvégzéséig.

3.4. Fül ödéma mérése

A fül vastagságát 0,1 mm pontosságú mérnöki mikrométer (3. kép) (Oxford Precision, Leicester, Anglia) segítségével mértük Inoue és mtsai., 1997 iránymutatásait alapul véve. A fül vastagságát közvetlenül a mustárolaj kezelés előtt, az első kenés után 15 perccel, majd 6 órás perióduson keresztül óránként mértük. A mért eredményeket mikrométerben adtuk meg.



3. kép Mérnöki mikrométer

3.5. Neutrofil granulocita akkumuláció mérése

A fagyasztott fül mintákat szobahőmérsékleten kiolvasztottuk, aprítottuk, majd 0,5% HTAB (hexadecyltrimethylammonium-bromid, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) tartalmú 0,05 M kálium-foszfát pufferben homogenizáltuk, 1 ml puffert használva fűlenként. A homogenizátumot 11000 g-n, 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszóból 200 µl-t Eppendorf csőbe helyeztünk.

A mieloperoxidáz aktivitást 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) hidrogénperoxid-függő oxidációján keresztül határoztuk meg (Suzuki és mtsai., 1983). A TMB festék oxidált formában kék színű, ezt 620 nm-en mértük spektrofotométer segítségével. A reakcióelegy 25 µl szövetmintát, 25 µl TMB festéket (végső koncentráció 0,16 mM, dimethylsulfoxidban (DMSO) oldva) és 200 µl, pH 5,4-re beállított 0,08 M foszfát pufferben hígított hidrogénperoxidot (H₂O₂, végső koncentráció 0,24 mM, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) tartalmazott (Schierwagen és mtsai., 1990). A reakció 96 lyukú átlátszó plate-ben, szobahőmérsékleten zajlott. Az abszorbanciát microplate reader-rel (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Németország) mértük 30 perces perióduson keresztül, 5 perces időközönként.

A relatív abszorbancia értékeket az idő függvényében ábrázoltuk.

3.6. Plazmaextravazáció mértékének mérése egér húgyhólyagban

A kísérleti állatokat 50 mg/kg intraperitoneálisan adott thiopental injekcióval elaltattuk. A vizsgálati készítmények intravénás adagolásához a laterális farokvénába kanült helyeztünk. A művelet előtt 30 perccel 1 vagy 3 mg sitagliptint vagy vildagliptint adtunk per os szondán keresztül.

A farokvéna kanülön keresztül 30 mg/kg Evans Blue festéket, majd 1 perc elteltével 1 mg/kg capsaicint oldatot adagoltunk. A festék beadását követően 10 perc múlva minden állatot transzkardiálisan perfundáltunk 50 ml 0,9% w/v sóoldat bal szívkamrába történő injektálásával. Ezt követően a húgyhólyagot eltávolítottuk és a súlyát megmértük. Az eltávolított szövetet 48 óráig 1ml formamidban inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd az Evans Blue festék abszorbanciáját spektrofotométerrel 620 nm-en mértük (Pintér és mtsai., 1999 alapján), majd meghatároztuk a szövet festék tartalmát. A mért festékmennyiséget µg-ban adtuk meg a nedves szövet egységnyi tömegére (g) vonatkoztatva.

3.7. Krónikus arthritis modell

A jobb oldali térdízületben krónikus arthritis kiváltásához a kísérleti egereket a következő módon kezeltük: 0,1 ml komplett Freund adjuváns (CFA, előlt Mycobacterium paraffin olajban szuszpendálva: 1 mg/ml, Sygma-Aldrich, Budapest, Magyarország) injekciót adtunk a jobb oldali talp bőre alá, valamint a farok töbe. A szisztémás hatás fokozása érdekében a kezelést követő napon megismételtük az injekció farok töbe történő beadását (Helyes és mtsai., 2004). A kísérleti állatok kímélete érdekében rövid hatású általános érzéstelenítést végeztünk, melyhez 1:2 arányú oxigén/dinitrogén-oxid (O_2/N_2O) közegben elosztatott 1%-os isoflurane-t (Abbott Laboratories, Budapest, Magyarország) használtunk.

3.8. Mechanikai ingerre adott fájdalom reakció mérése

Az egér talp felületének mechanikai érzékenységét von Frey filamentum sorozattal (4. kép) (Bioseb, Chaville, Franciaország) mértük a CFA kezelést megelőzően, majd a kezdő kezelést követő 3., 7., 10., 14., 17. és 21. napon. A szett 20 monofilamentumból áll, melyek hozzávetőlegesen logaritmikus skálát adnak a kifejtett erő mértéke (0,008 g-300 g), míg lineáris skálát az érzékelt intenzitás mértékére vonatkozóan. Az egereket olyan állványra rögzített plexi dobozba tettük, melynek alja rácsos, így az állat talpfelülete hozzáférhető. Néhány perces akklimatizációt követően a filamentum sorozat tagjait – a puhább, kisebb erőhatás kifejtésére képestől a keményebb felé haladva – sorban a vizsgált állat talpának felületéhez nyomtuk, keresve a nyomásérzékenységi küszöböt, melyet az állat lábrázással vagy talpnyalással jelez. Ha a filamentum a leírt reakciók nélkül meggörbült, úgy sorra próbáltuk a következő keménységű szálakat.



4. kép Von Frey filament sorozat

3.9. Hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció mérése (Increasing hot plate test)

A hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció mérésére increasing hot plate tesztet használtunk (Hunskaar és mtsai., 1986). Az egereket egy szobahőmérsékletre lassan melegedő, 80 x 110 mm méretű, átlátszó oldalfalakkal (Plexi) határolt felületre helyeztük (5. kép) (Increasing Hot Plate, Supertech, Pécs, Magyarország) és kerestük azt a hőmérsékleti fájdalomküszöböt, melyet az állat lábrázással, talpnyalással jelzett. A programot lassú (3 °C/perc), folyamatos melegítésre állítottuk, így minimalizálva az állatok stressznek való kitettségét (László és mtsai., 2011). Fájdalom reakció esetén az aktuális hőmérsékleti értéket rögzítettük és a műveletet termináltuk, reakció hiányában 50 °C-nál a szövetkárosodást megelőzendő a kísérletet leállítottuk (Tjolsen és mtsai., 1991). Az eredményeket °C-ban adtuk meg.



5. kép Increasing Hot Plate

3.10. Sztatikus mágneses tér kezelés

Az inhomogén sztatikus mágneses tér (SMF) előállítására használt eszköz László és mtsai., 2007 fejlesztése (6. kép).



6. kép: Inhomogén sztatikus mágneses tér előállítására használt eszköz.

A készülék két vastálcából áll, melyek 10x10 mm-es (átmérő x magasság) hengeres neodímium vas bór (NdFeB) N50 mágneseket ($B_r=1,47$ T) (ChenYang Technologies GmbH & Co. KG, Finsing, Germany) tartalmaznak. Az inhomogén SMF oldalirányú szakaszossága 10 mm. Az egyes mágnesek mindkét tálcában váltakozó polaritással helyezkednek el egymás mellett és az egymással szembe lévő mágnesek ellentétes pólusúak. A tálcák távolsága 50 és 90 mm között változtatható, a kísérlet során egymástól 50 mm távolságra kerültek rögzítésre. A készülék kamrájába egy 140x140x46 mm-es (szélesség, hosszúság, magasság), légzőnyílásokkal ellátott plexi ketrecben helyeztük be az állatokat. A placebo kezeléshez azonos méretű, négy oldalán átlátszatlan anyaggal borított plexi ketrecet használtunk, hogy a fényviszonyok azonosak legyenek. A kezeléshez 2-3 egeret együtt tettünk a plexiketrecbe, majd a mágneses térbe, szem előtt tartva az egerek szociális érzékenységét (Langford és mtsai., 2006). A kezelést naponta 30 percig végeztük a kísérleti állat teljes kísérletben töltött ideje alatt (legalább 6 hétig). A mágneses tér hatása a teljes testet érte, az állatok mozgása közben szabad volt, viselkedésüket a mágneses tér hatása nem befolyásolta (László és mtsai., 2009). A placebo kezelés során azonos körülmények között tartottuk az állatokat napi 30 percig mágneses térnek való kitettség nélkül.

3.11.Diabétesz modell

A diabéteszt egyszeri 100, 150 vagy 200 mg/kg intraperitoneális streptozotocin (STZ, Tocris Bioscience, Bristol, Anglia) injekció adásával váltottuk ki (Chen és mtsai., 2001, Khan és mtsai., 2002). A STZ-t 0,9% steril fiziológiás sóoldatban oldottuk. A 200 mg/kg dózis mellett a másik két dózist a kevésbé súlyos diabéteszes esetek modellezésére használtuk. A

mágneses kezelést az STZ kezelés másnapján indítottuk, ebbe minden STZ-t kapott állatot bevontunk.

3.12. A vér glükóz szintjének meghatározása

Az STZ-vel (és placebo) kezelt, inhomogén sztatikus mágneses tér hatásának kitett (és placebo) egerek vérglükóz szintjét hetente mértük farok vénából vett vérből, Accu-Check (Roche Hungary, Budaörs, Magyarország) vérglükóz-mérő készülék segítségével.

A mért értékeket mmol/l egységben tüntettük fel.

3.13. Kísérleti csoportok

Az állatokat véletlenszerűen a következő vizsgálati csoportokba osztottuk:

1-4 csoportok: SMF kezelés nélkül (mágnes placebo)

1. csoport: 3 db egér. Ezek az állatok nem kaptak STZ kezelést. (no STZ, no SMF)

2., 3. és 4. csoport: 6 db egér csoportonként. Rendre 100, 150 vagy 200 mg/kg STZ injekció.

5-8 csoportok: napi 30 perces inhomogén SMF hatás a vizsgálat 0. napjától az állatok haláláig.

5. csoport: 3 db egér. Ezek az állatok nem kaptak STZ kezelést, de mágneses kezelést igen. (no STZ, SMF)

6., 7. és 8. csoport: 6 db egér csoportonként. Rendre 100, 150 vagy 200 mg/kg STZ injekció.

3.14. Statisztika

A gliptin vegyületek mérési eredményeinek statisztikai elemzéséhez kétutas varianciaanalízist (two way ANOVA) használtunk. A csoportok átlagait Games-Howell post hoc teszttel hasonlítottuk össze. Az alapvonal értékek a különböző csoportokban minden mérésben szignifikáns mértékű különbséget adtak, ezért alapvonal korrekciót (baseline correction) alkalmaztunk és az így kapott eredményeket, mint elsődleges mérési eredményeket ábrázoltuk.

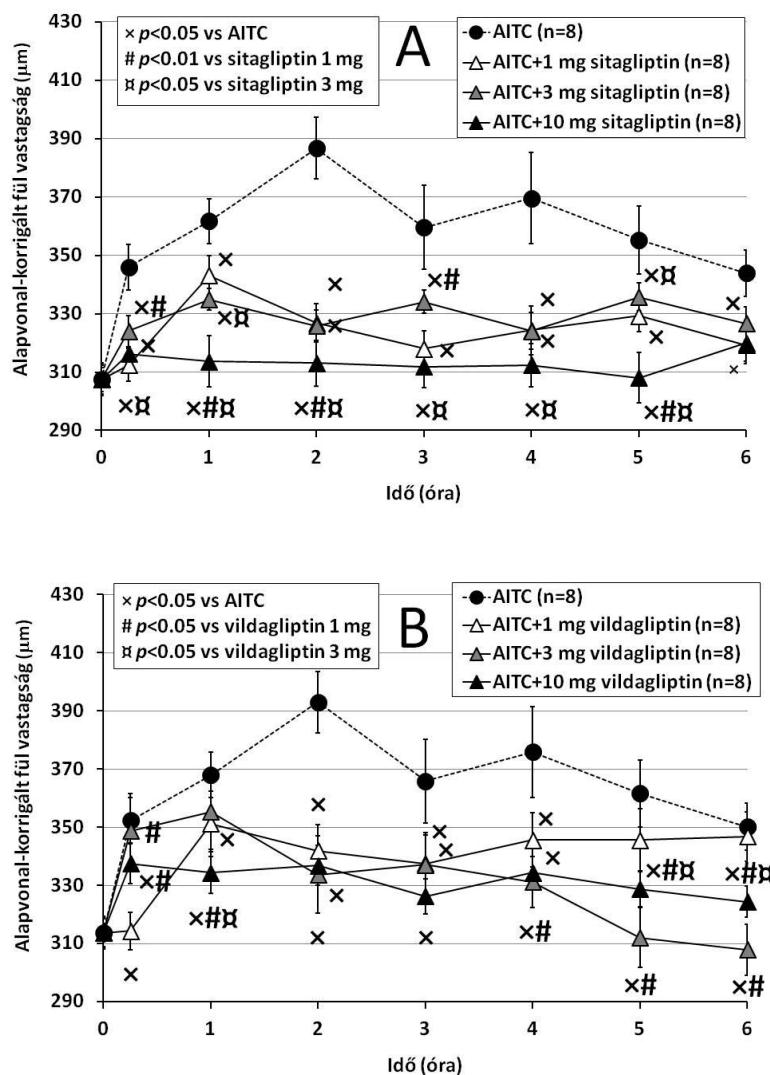
Statisztikai elemzéseinkhez az SMF hatásának vizsgálatánál egyutas varianciaanalízist (one way ANOVA) használtunk. A statisztikai különbséget két csoport között Dunnett's teszttel becsültük meg. A különböző adatmennyiséget tartalmazó halmazokat Bonferroni korrekciót használva hasonlítottuk össze.

Az értékeket akkor tekintettük szignifikánsan különbözőnek, ha $p < 0,05$.

4. Eredmények

4.1. AITC által kiváltott gyulladásos modell

Mindkét per os alkalmazott gliptin (sitagliptin és vildagliptin) egyaránt dóziszfüggő módon csökkentette a fül vastagságát a teljes vizsgálati periódus alatt. Az eredményeket a pozitív kontrollhoz (csak AITC kezelés, gliptin kezelés nélkül) viszonyítottuk, az összevetés mindkét vizsgálati szer esetében szignifikáns különbséget adott (1. ábra).

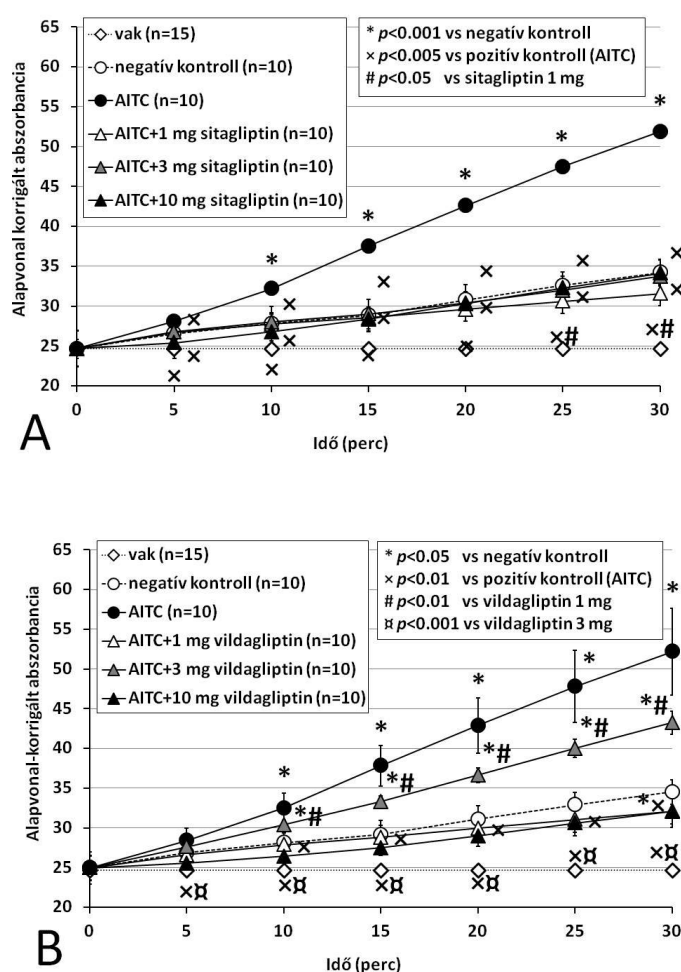


1. ábra. Alapvonal-korrigált fül vastagság mikrométerben ($\pm$ SEM) időbeli fejlődése AITC által kiváltott gyulladásos modellben sitagliptin (A) és vildagliptin (B) kezelés függvényében. Games-Howell post hoc teszttel történt kiértékelés után: x ($p < 0.01$), # ($p < 0.005$) és □ ($p < 0.001$) szignifikáns különbséget mutatott rendre a pozitív kontrollhoz, 1 mg és 3 mg sitagliptinhez; x ($p < 0.001$) és # ($p < 0.01$) rendre a pozitív kontrollhoz és 1 mg vildagliptinhez viszonyítva a teljes vizsgálati idő alatt.

A mustárolaj kezelés hatásának maximumát minden esetben az alkalmazást követő 2. órában tapasztaltuk.

4.2. Neutrofil granulocita akkumuláció mérése

A pozitív kontroll csoportban (csak AITC kezelés, gliptin kezelés nélkül) a gyulladás kialakulását mutatják a 2. ábrán látható magas mieloperoxidáz enzim értékek. Ezek az eredmények határozottan különböztek a negatív kontroll csoport (sem AITC, sem gliptin kezelés) eredményeitől, ami alátámasztotta, hogy a módszer alkalmas a növekvő gyulladás követésére és mérésére.

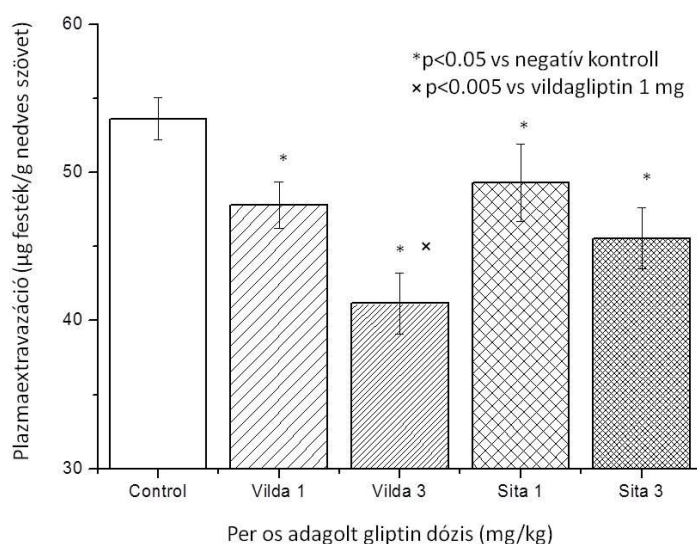


2. ábra. Alapvonal-korrigált mieloperoxidáz abszorbancia értékek ($\pm$ SEM) időbeli alakulása AITC által kiváltott gyulladásos modellben sitagliptin (A) és vildagliptin (B) kezelés függvényében. Games-Howell post hoc teszttel történt kiértékelés után: * ($p<0.05$) és × ($p<0.01$) szignifikáns különbséget mutatott rendre a negatív és a pozitív kontrollhoz; * ($p<0.05$), × ($p<0.005$), # ($p<0.01$) és □ ($p<0.005$) rendre a negatív kontrollhoz, a pozitív kontrollhoz, 1 mg és 3 mg vildagliptinhez viszonyítva a teljes vizsgálati idő alatt.

A sitagliptin kezelés szignifikáns eredményt hozott, minden alkalmazott dózisban gátolta a gyulladás kialakulását. A vildagliptin kezelés a sitagliptinhez hasonlóan eredményesnek mutatkozott a gyulladás visszaszorításában, habár a 3 mg/kg-os dózis értékei itt nem adtak szignifikáns különbséget, annak ellenére, hogy az 1 mg/kg és a 10 mg/kg dózisok szignifikánsan hatékonyak bizonyultak.

4.3. Plazmaextravazáció mértékének mérése egér húgyhólyagban

A capsaicin-indukálta plazmaextravazációt mind a sitagliptin, mind a vildagliptin kezelés (1 mg/kg és 3 mg/kg egyaránt) szignifikánsan gátolta a kísérleti állatok húgyhólyagjában (3. ábra).

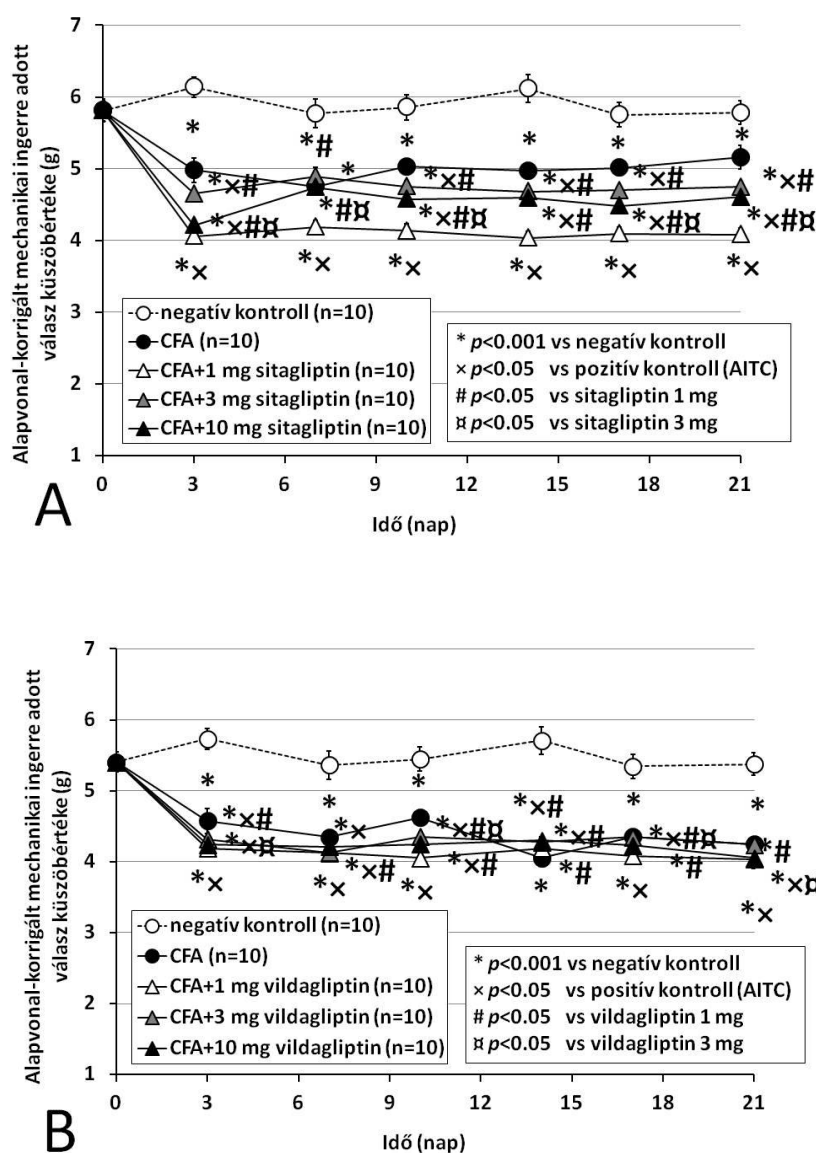


3. ábra: Plazmaextravazáció egér húgyhólyagban ($\pm$ SEM) a különböző dózisú sitagliptinnel vagy vildagliptinnel kezelt csoportokban. Games-Howell post hoc teszttel történt kiértékelés után: * és x szignifikáns különbséget jeleznek rendre a negatív kontrollhoz és a vildagliptin 1 mg-hoz viszonyítva.

A két gliptin közötti hatásbeli különbséget a magasabb dózisok alkalmazása során tapasztaltunk. A kontroll csoport eredményeihez viszonyított legkevesbé szignifikáns különbséget a sitagliptin 1 mg/kg-os dózisa mutatta.

4.4 Mechanikai ingerre adott fájdalom reakció mérése

Mérési eredményeink szerint a kezeletlen csoportok mechanikai ingerre adott fájdalom reakció küszöbértékei a teljes 21 napos vizsgálati idő alatt szignifikánsan magasabbak voltak, mint a CFA-val kezelt csoport (pozitív kontroll) küszöbértékei (4. ábra).

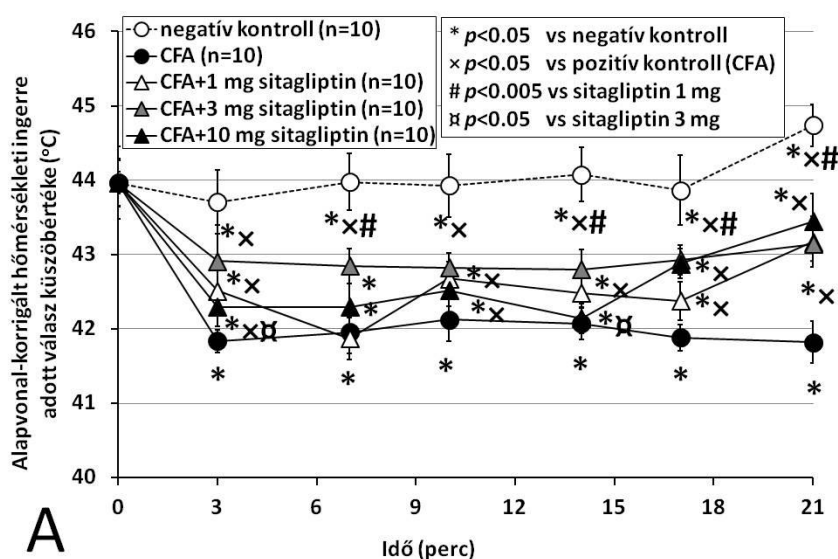


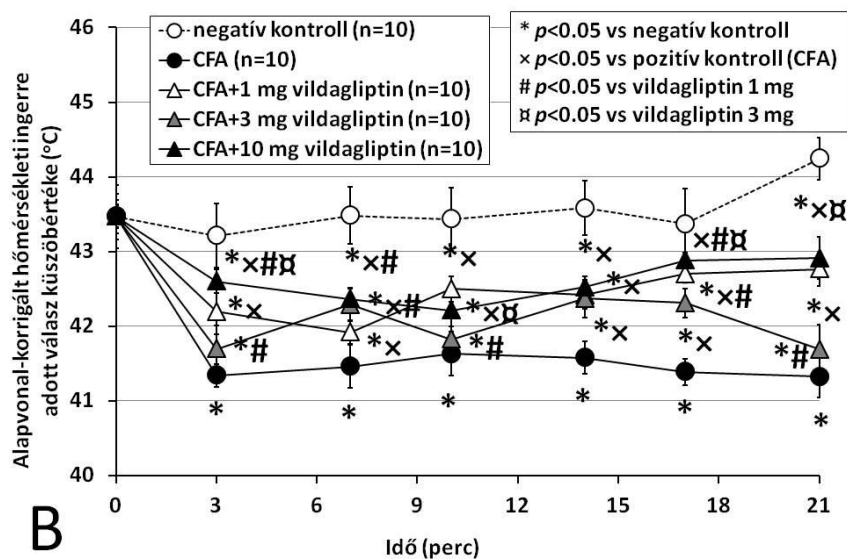
4. ábra. Alapvonal-korrigált mechanikai ingerre adott fájdalom reakció küszöbértékek ($\pm$ SEM) időbeli alakulása CFA kezeléssel indukált krónikus arthritis modellben sitagliptin (A) és vildagliptin (B) kezelés függvényében. Games-Howell post hoc teszttel történt kiértékelés után: * ($p < 0.001$), x ($p < 0.01$) és # ($p < 0.05$) szignifikáns különbséget mutatott rendre a negatív kontrollhoz, a pozitív kontrollhoz és 1 mg sitagliptinhez; * ($p < 0.001$) a negatív kontrollhoz viszonyítva a teljes vizsgálati idő alatt.

A sitagliptinnel és vildagliptinnel kezelt csoportok eredményei minden esetben szignifikánsan alacsonyabbak voltak a negatív kontroll csoport értékeinél. Eredményeink szerint így egyik gliptin kezelés sem tudta megakadályozni az allodynia kialakulását. A sitagliptin 3 mg/kg és 10 mg/kg dózisa kifejezetten rontották a mechanikai ingerre adott válaszreakciókat, míg a vildagliptin minden alkalmazott dózisban hatástalan maradt ebben a mérésben.

4.5. Hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció mérése (Increasing hot plate test) CFA-indukálta krónikus arthritisben

Az első kezelési napot követően a teljes 21 napos vizsgálati időre jellemző volt, hogy a kezeletlen csoport (negatív kontroll) hőmérsékleti küszöbértékei szignifikánsan magasabbak voltak, mint a CFA-val kezelt csoport értékei (5. ábra).



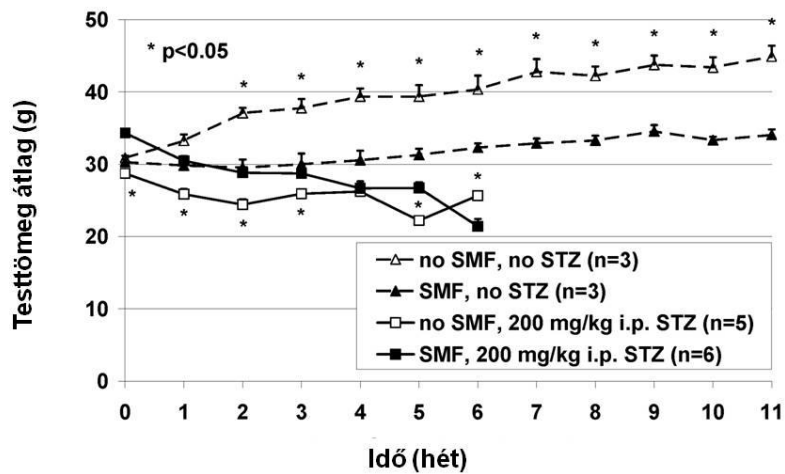


5. ábra. Alapvonal-korrigált hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció küszöbértékek ($\pm$ SEM) időbeli alakulása CFA kezeléssel indukált krónikus arthritis modellben sitagliptin (A) és vildagliptin (B) kezelés függvényében. Games-Howell post hoc teszttel történt kiértékelés után: * ($p < 0.001$), $\times$ ($p < 0.05$) és # ($p < 0.05$) szignifikáns különbséget mutatott rendre a negatív kontrollhoz, a pozitív kontrollhoz és 1 mg sitagliptinhez; * ($p < 0.001$), $\times$ ($p < 0.05$), # ($p < 0.05$) és $\square$ ($p < 0.01$) rendre a negatív kontrollhoz, a pozitív kontrollhoz, 1 mg és 3 mg vildagliptinhez viszonyítva a teljes vizsgálati idő alatt.

Mind a sitagliptin mind a vildagliptin minden alkalmazott dózisa szignifikáns mértékben emelte a hőmérsékleti küszöbértékeket a pozitív kontroll csoport eredményeihez hasonlóan. Azonban sem a sitagliptin sem a vildagliptin nem tudta teljes mértékben megakadályozni a gyulladás kialakulását, tekintve hogy a gliptinnel kezelt csoportok értékei minden esetben szignifikánsan elmaradtak a negatív kontroll csoportban mért eredményektől.

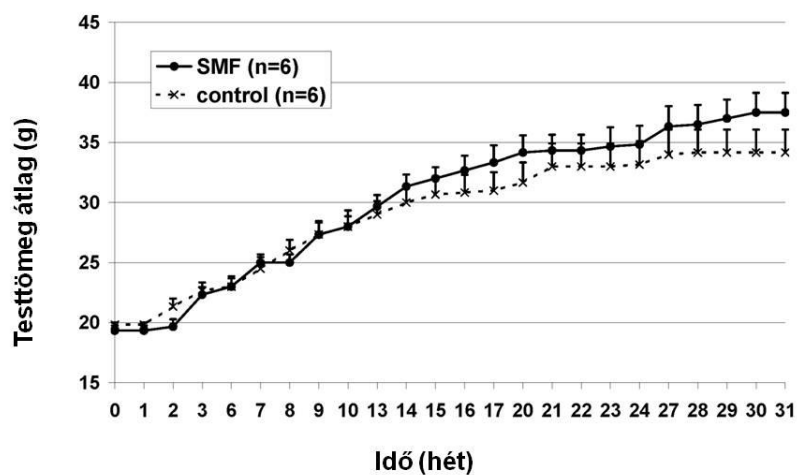
4.6. Sztatikus mágneses tér hatása a testtömeg változására

A diabéteszes egerek a 6. héten elhaltak, így azok vizsgálati eredményei eddig az időpontig állnak rendelkezésre. A 6. ábra mutatja a kísérleti egerek testtömegének alakulását: az 5. vs 1. és a 8. vs 4. csoportokat vetettük össze. A megfelelő, STZ szempontjából azonos módon kezelt, de sztatikus mágneses tér kitettségben különböző csoportok adatai között az ábrán feltüntetett szignifikáns különbségek mutatkoztak.



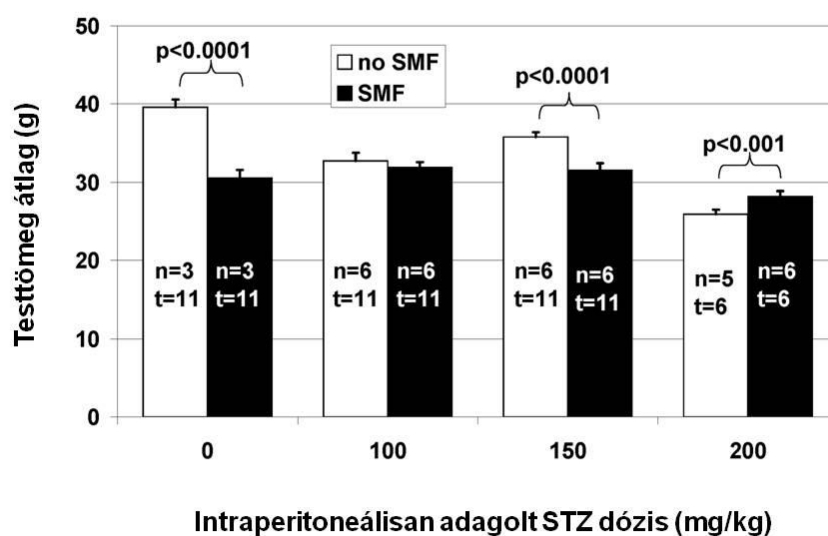
6. ábra: Testtömeg átlagok ($\pm$ SEM) időbeli alakulása egészséges és diabéteszes egerek esetében SMF kezeléssel vagy a nélkül.

A sztatikus mágneses tér nem diabéteszes egerek testtömegének változására gyakorolt hatását az ellenőrző ismételt kísérlet nem támasztotta alá, ennek mérési eredményeit a 7. ábra mutatja.



7. ábra: Testtömeg átlagok ($\pm$ SEM) időbeli alakulása egészséges egerek esetében SMF kezeléssel vagy a nélkül.

A különböző dózisú STZ-vel kezelt egércsoportok testtömegének változását a sztatikus mágneses térnek való kitettség függvényében a 8. ábra mutatja: 100 mg/kg STZ kezelési csoportokban a sztatikus mágneses tér hatása nem befolyásolta a kísérleti állatok testtömegének alakulását, a 150 mg/kg dózisú csoportban a mágneses tér szignifikánsan csökkentette, míg a 200 mg/kg STZ-vel kezelt csoportban kisebb szignifikancia szinttel, de növelte az átlagos testtömeget.

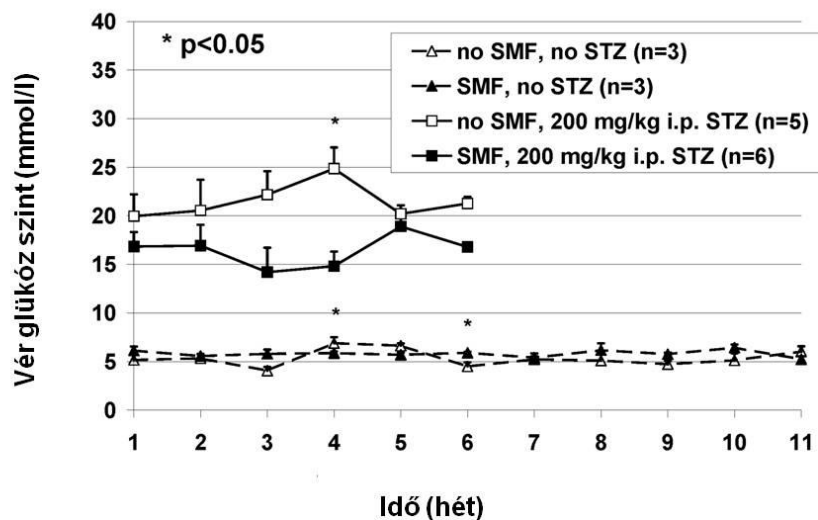


8. ábra: Testtömeg átlagok ($\pm$ SEM) a különböző dózisú STZ-vel kezelt állatcsoportokban.

Üres oszlop: SMF kezelés nélkül, kitöltött oszlop: SMF kezeléssel.

4.7. Sztatikus mágneses tér hatása a vér glükóz szintjének változására

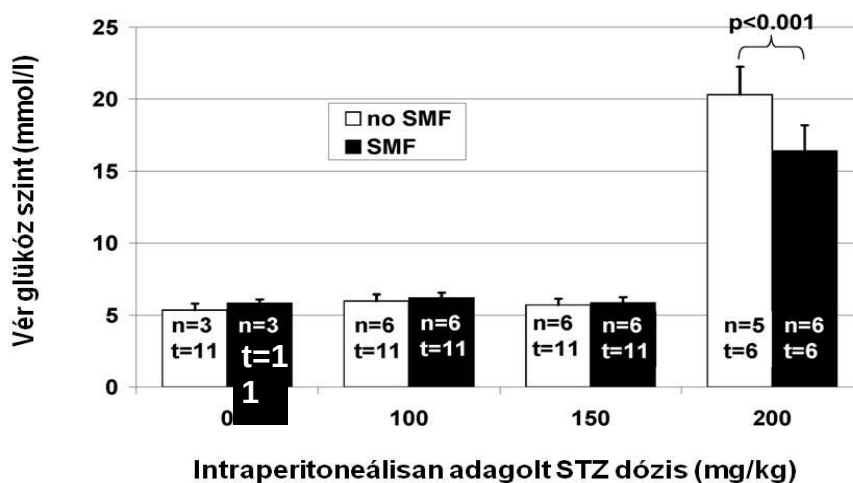
A 9. ábrán látható a sztatikus mágneses tér hatása a diabéteszes és a nem diabéteszes egerek vér glükóz szintjének alakulására.



9. ábra: Vér glükóz szint ($\pm$ SEM) időbeli alakulása egészséges és diabéteszes egerek esetében SMF kezeléssel vagy a nélkül.

A nem diabéteszes állatok értékeinek alakulásában nem volt mérhető hatása a mágneses térnek, de a diabéteszes állatok vér glükóz szintjét jelentős mértékben csökkentette a napi 30 perces sztatikus mágneses tér hatása.

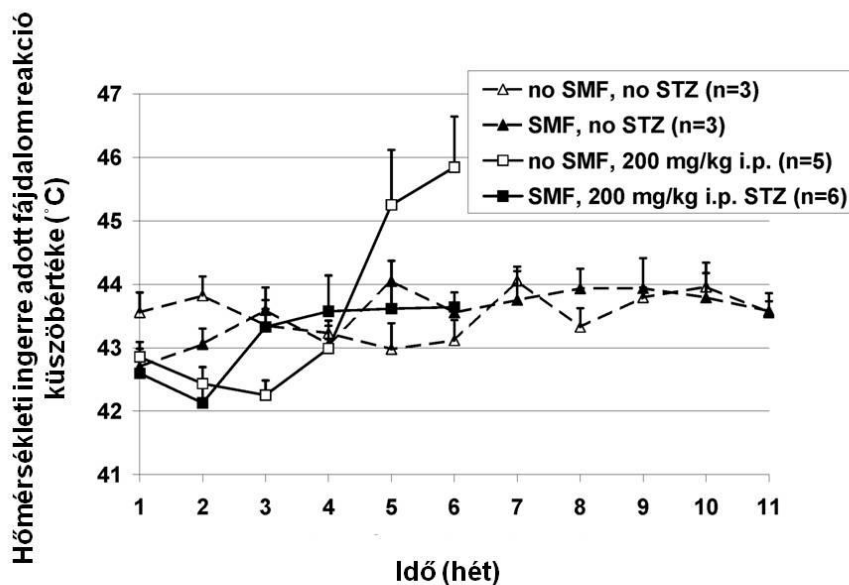
A 10. ábra az azonos STZ kezelésben részesült egerek értékeit veti össze a mágneses tér hatásának függvényében: a 100 mg/kg és a 150 mg/kg STZ kezelés nem alakított ki mérhető diabéteszt, ezek a mért vér glükóz eredmények az STZ kezelés nélküli kontroll csoportok értékeivel korrelálva nem mutattak mágneses kitettségtől való függést.



10. ábra: Vér glükóz szint ($\pm$ SEM) a különböző dózisú STZ-vel kezelt állatcsoportokban. Üres oszlop: SMF kezelés nélkül, kitöltött oszlop: SMF kezeléssel

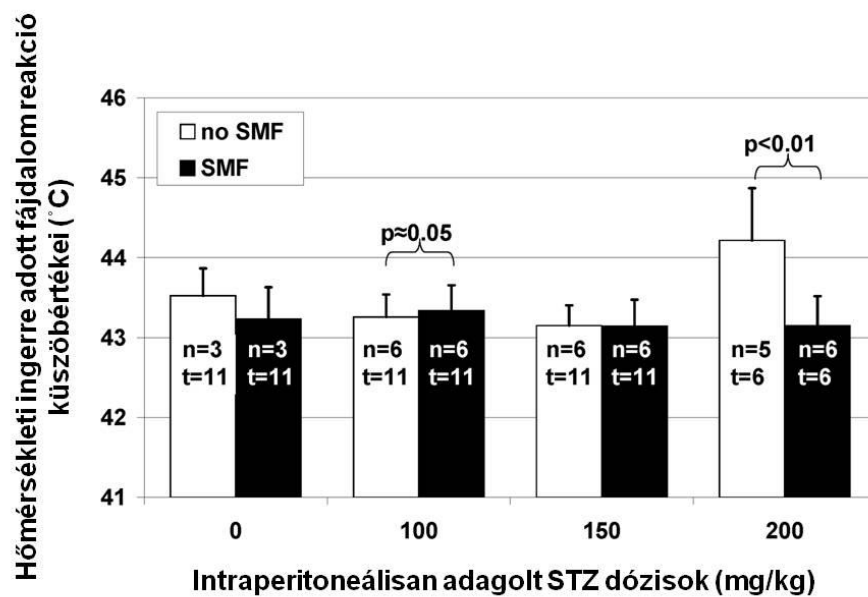
4.8. Sztatikus mágneses tér hatásának mérése increasing hot plate tesztel

A hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció küszöbhőmérsékleteit °C-ban adtuk meg, a 11. ábra mutatja a mágneses tér hatását a diabéteszes és a nem diabéteszes állatcsoport eredményeire. Bár a 200 mg/kg STZ-vel kezelt, sztatikus mágneses tér hatásának kitett csoport értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak az STZ-vel azonos módon kezelt, de mágneses térrel nem kezelt csoport értékeinél, a biológiai hatás mégsem egyértelmű, mivel az állatok korai elpusztulása miatt nem tudtunk meggyőző mennyiségű adatot gyűjteni (az átlagos hőmérsékletek 44,22 °C és 43,15 °C). A nem diabéteszes csoport értékeiben nem volt megfigyelhető a mágneses tér hatása.



11. ábra: Hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció küszöbértékek ($\pm$ SEM) időbeli alakulása egészséges és diabéteszes egerek esetében SMF kezeléssel vagy a nélkül.

A 12. ábra oszlop diagram formájában mutatja a különböző dózisú STZ-vel kezelt csoportok hőmérsékleti küszöbértékeit sztatikus mágneses tér kezeléssel vagy anélkül. A 100 mg/kg STZ-vel kezelt csoportok eredményeiben kisebb szignifikancia szint adódott, ám az e mögött álló biológiai hatás ebben az esetben is megkérdőjelezendő (43,54 °C és 43,26 °C átlagértékek).



12. ábra: Hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció küszöbértékei ($\pm$ SEM) a különböző dózisú STZ-vel kezelt állatcsoportokban. Üres oszlop: SMF kezelés nélkül, kitöltött oszlop: SMF kezeléssel

5. Megbeszélés

A diabétesz világszerte több százmillió ember életét megnehezítő betegség, az érintettek száma évről évre rohamosan emelkedik annak ellenére, hogy a betegség mind tudományos, szakmai körökben, mind a laikusok körében fokozott figyelmet kap (Nemzetközi Diabétesz Szövetség, 2013). A betegség és szövődményeinek kezelési költségei folyamatosan emelkednek, ami jelentős egészség-gazdasági kihívást jelent napjainkban (Winkler, 2012). Az összes megbetegedés kb. 90%-a a 2-es altípusba tartozik, melyre általában jellemző a szövődmények jelenléte már a betegség diagnosztizáláskor. A leggyakrabban előforduló szövődmény, így a legköltségesebb diabéteszes társbetegség a diabéteszes neuropátia, mely becslések szerint kb. a betegek 1/3-át érinti (Peltier és mtsai., 2014). A diabéteszes neuropátia jellemző manifesztációi az érzéskiesés, allodínia és hiperalgécia. Munkacsoportunk ezeket a jellemzőket a gyulladáscsökkentő hatással kiegészítve vizsgálta különböző in vivo egér modellek segítségével.

A sitagliptin és a vildagliptin vizsgálatát célzó kísérleteinkben kapott eredmények alapján elmondhatjuk, hogy mindkét vegyület képes dóziszfüggő módon csökkenteni a gyulladást in vivo egér kísérleti modellekben. Az alkalmazott módszerek elég érzékenyek bizonyultak ahhoz, hogy ezt a gyulladáscsökkentő hatást mérni tudjuk velük. A dipeptidil-peptidáz-4 enzim inhibitorok 2-es típusú diabétesz kezelésében elterjedt használatuk mellett új terápiás területként, mint gyulladáscsökkentő gyógyszer-csoport is intenzív vizsgálat alatt állnak különböző gyulladásos megbetegedésekben (Balakumar és mtsai., 2013). Gyulladáscsökkentő hatásukat humán vizsgálatokban is leírták (Makdissi és mtsai., 2012). Szív koszorúér betegségben és kontrollálatlan diabétesz mellitusban szenvedőknél a sitagliptin szignifikánsan javítja az endothel funkciót és a gyulladásos állapotot (Matsubara és mtsai., 2013), ami jelzi az indikációs spektrum szélesítésének lehetőségét. A mustárolajjal kiváltott gyulladásos modellben mindkét gliptin képes volt a gyulladás dóziszfüggő csökkentésére, de a sitagliptin hatékonyabb molekulának bizonyult ebben a mérésben. Ez a hatás azonban nem magyarázható sem a GLP-1 p38-MAPK szabályozó szerepével (Kahne és mtsai., 2000), sem a gliptinek a P-anyag metabolizmusára gyakorolt hatásával (Guieu és mtsai., 2006). Vizsgálati eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a gliptinek gyulladáscsökkentő hatásukat direkt módon fejtették ki, tekintettel az akkumulálódott neutrofil granulocita sejtek számára (amit mieloperoxidáz enzim aktivitáson keresztül mértünk) a gyulladt fülben, ezt az akkumulációt az előzetes gliptin kezelések gátolták. A CFA kezeléssel kiváltott krónikus arthritis kompenzálásában a vildagliptin hatástalannak bizonyult.

A magas hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció mérésében azonban a két vegyület azonos hatékonyságú volt. Vizsgálati eredményeink alapján összességében a sitagliptin tűnt erősebb gyulladáscsökkentő hatású szernek, annak ellenére, hogy a vildagliptin hatékonyabban gátolta a capsaicin-indukálta plazmaextravazációt egér húgyhólyagban. Habár a két gyógyszernek azonos a hatékonysága 2-es típusú diabéteszben, feltehetően nem azonos módon fejtik ki hatásukat az immunválasz során. Mindkét vegyület ígéretes kezelési lehetőségnek tűnik a különböző gyulladásos betegségek kezelésében.

Számos korábbi kísérletben vizsgálták a SMF hatását kísérleti állatok testtömegének alakulására. Bár született néhány tanulmány, melyek úgy találták, hogy a SMF csökkentette az állatok által elfogyasztott víz és táp mennyiségét, következményesen csökkent a testtömegük (Tsuji és mtsai., 1996 és Hashish és mtsai., 2008), többségében a testtömeget befolyásoló hatás nem volt kimutatható (High és mtsai., 2000). Munkánk során a SMF hatását különböző dózisban alkalmazott STZ által kiváltott diabéteszes egér modelleken vizsgáltuk meg. A 150 és 200 mg/kg STZ csoportokban ellentétes hatás mutatkozott, a 100 mg/kg csoportban nem detektáltunk változást. Ezen eredmények alapján a teljes test SMF hatása a testtömegre ellentmondásos, esetlegesen függhet a diabéteszes állapot súlyosságától. Az STZ kezelést nem kapott (pozitív és negatív kontroll) csoportok esetében a testtömeg változás követése egy ismételt kísérlet során ellenőrzésre került, ez azonban nem mutatott szignifikáns eltérést a két csoport eredményei között.

A 2-es típusú diabéteszre jellemző β -sejt diszfunkció és inzulin rezisztencia mögött fellelhető gyulladásos folyamatok vizsgálata során Ehses és mtsai 2009 megállapították, hogy Goto-Kakizaki patkányok pankreasz szigeteiben tapasztalt emelkedett interleukin- 1β aktivitás citokin és kemokin expressziót promotál, ami a veleszületett immunrendszer sejteinek mennyiségét megnöveli. Valószínűbb az a lehetőség, hogy az IL- 1β szöveti gyulladáshoz vezet, ami befolyásolja a β -sejtek működését és az inzulinrezisztenciát, minthogy direkt módon lenne citotoxikus. A SMF hatását a vér glükóz szintjének változására több állatmodellt alkalmazó elrendezésben is vizsgálták. Chater és mtsai., 2006 például vemhes patkányokat kezeltek 124 mT erősségű SMF-vel a vemhesség 6-19 napjáig napi 1 óra időtartamig. A kezelés szignifikáns mértékben növelte a hematokrit értéket (6%), a hemoglobin szintet (12%) és a laktát-dehidrogenáz szintet (67%), melyek hipoxia-szerű állapotot jeleznek. Ezen kívül emelte a vér glükóz szintjét és csökkentette az inzulin felszabadulás mértékét, diabétesz-szerű állapotot előidézve. Kísérleteinkben a 200 mg/kg STZ kezelés jelentős mértékben, mintegy négyszeresére emelte a vizsgált állatok vér glükóz szintjét. Ezt a szintet tudta a napi SMF expozíció szignifikáns mértékben csökkenteni, kb 25%-kal. Chater és mtsai és

kutatócsoportunk mérései így látszólag ellentmondásos eredményre vezettek, melynek háttérében feltehetően a különböző kísérleti körülmények állnak. Eltérő a mágneses tér ereje: a hivatkozott munkában 124 mT erősségű mágneses teret használtak, mi 1,47 T-t, mely egy nagyságrendnyi különbséget jelent, valamint a kitettség ideje is, hiszen ők napi 60 perces kezelést alkalmaztak, míg mi napi 30 perces. Ezek az eredmények is ráirányítják a figyelmet a korábban hivatkozott Colbert és mtsai által is hangsúlyozott, egységesítendő és rögzítendő körülmények fontosságára, melyek segítenék a SMF gyógyászati felhasználhatóságának objektív, tudományos megítélését. Nem elhanyagolható különbség továbbá a két vizsgálat kísérleti elrendezésében továbbá, hogy a Chater és mtsai által közölt adatok vemhes egerekre gyakorolt hatást írnak le, míg mi hím egereket használtunk, s mint tudvalevő, a vemhes állapot -de akár a diabéteszes állapot is- gyakran jelentősen eltérő, akár ellentétesen lezajló biológiai folyamatokat produkál a normál fiziológiás állapothoz képest. Összességében tehát megfigyeléseink szerint a napi 30 perces teljes test SMF kezelés az IL-1 β antagonistákhoz hasonló hatást képes kiváltani. Ez a hatás hasonló lehet az inzulin bevitelhez, ahogyan ellensúlyozza az STZ kezelés káros hatásait, csökkentheti az oxidatív stresszt, csökkentheti az IL-1 β szintjét, asszisztálhat az inzulin felszabadulásban, csillapíthatja a veleszületett immunitás kialakításában részt vevő sejteket, ekképpen csökkentheti a vér glükóz szintjét.

STZ-vel kezelt egereknél a diabéteszes neuropátia kórfejlődésében az első szakaszt allodynia jellemzi, majd 3-4 hét elteltével előtérbe kerül a fokozatosan fejlődő hypaesthesia (Kamei és mtsai., 2008). Munkacsoportunk mérései is hasonló eredményre vezettek, habár az SMF hatásának nem kitett csoportban. A hiper- és hiposzenzitivitás bifázisos fejlődését a magas hőmérséklet okozta fájdalom érzékelésében méréseink során a SMF expozíció kivédte. Mivel a kezdeti alacsony mérési eredmények néhány hét után a kontrollokkal azonos szintre tértek vissza, feltételezhető, hogy e mögött inkább a sérült ideg spontán gyógyulási folyamata állt, mintsem a diabéteszes állapot javulása. A kapott eredmények alapján a napi 30 perces SMF kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a hőmérsékleti ingerrel kiváltott fájdalom reakció küszöbértékét az STZ-vel kezelt diabéteszes egerekben.

6. Összefoglalás

6.1. Összefoglalás

1. A kutatómunka során két DPP-4 inhibitor vegyület, a sitagliptin és a vildagliptin fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatását vizsgáltuk in vivo modellekben.
2. Vizsgáltuk az inhomogén sztatikus mágneses tér fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatását in vivo modellekben.
3. A két gliptin vegyületről igazolódott, hogy különböző intenzitással, de mindkettő dóziszfüggő módon gátolja a fájdalom kialakulását és a gyulladás kifejlődését. Ezen tulajdonságokat igazoltuk a CFA kezelést követően increasing hot plate és von Frey tesztekkel. A mustárolajjal kiváltott fülgyulladásban az ödéma nagyságának mérésével és a mieloperoxidáz aktivitáson keresztül a granulocita akkumuláció mérésével is bizonyítottuk a vegyületek gyulladásgátló képességét, ezekben a mérésekben a sitagliptin mutatkozott erősebbnek.
4. Mind a sitagliptin, mind a vildagliptin hatékonyan gátolta a capsaicinnel indukált plazmaextravazációt egér húgyhólyagban. Ebben a vizsgálatban a vildagliptin bizonyult hatékonyabb vegyületnek.
5. Az, hogy a két szer más-más kísérleti elrendezésben volt hangsúlyos azt sugallja, hogy hatásmechanizmusuk egymástól eltérő lehet.
6. A DPP-4 inhibitor vegyületek ígéretes gyógyszernek mutatkoztak a 2-es típusú diabétesz kezelésén túl új indikációs területen, a különböző gyulladásos betegségek kezelésében.
7. A napi 30 perces SMF expozíció a vér glükóz szintjét szignifikáns mértékben ($p < 0.05$) csökkentette manifeszt diabéteszes állapot esetén, míg az egészséges állatok vér glükóz szintjét nem befolyásolta.
8. A napi 30 perces SMF expozíció nem volt hatással sem az egészséges, sem a diabéteszes állatok testtömegének alakulására.
9. A napi 30 perces SMF expozíció nem befolyásolta meggyőzően a fájdalomérzet alakulását sem egészséges, sem diabéteszes egerekben increasing hot plate teszttel mérve.

6.2. Summary

1. The purpose of the experimental work was to evaluate two DPP-4 inhibitors, sitagliptin and vildagliptin in the analgetic and antiinflammatory point of view in vivo.
2. We investigated the effects of the inhomogeneous static magnetic field from the analgetic and antiinflammatory point of view in vivo.
3. According to our results substances had different impact but both gliptins showed analgetic and antiinflammatory effectiveness in a dose dependent manner. These properties had been verified in CFA-induced arthritis model by increasing hot plate test and von Frey test, and in mustard-oil-induced ear-inflammation via edema and via neutrophil accumulation as well. Sitagliptin was more potent in the mustard-oil-induced ear-inflammation model.
4. Both gliptins significantly inhibited capsaicin-induced plasmaextravasation in the urinary bladder in mice. In this measurement vildagliptin showed higher impact.
5. The different influence in various experiments suggests that they do not act in the same way.
6. Our results lead to the conclusion that both substances represent promising options for the therapy of inflammatory disorders.
7. The present study provides evidence that 30 min/day, whole body exposure to inhomogeneous SMF significantly diminishes plasma glucose level as compared to control in diabetic mice. Blood glucose level of mice not treated with STZ remained on the normal level with or without SMF exposure.
8. We did not experienced difference in body weight between SMF exposed and not exposed animals neither in healthy nor in diabetic status.
9. We did not experienced significant difference in peripheral nociception between exposed and sham animals neither in healthy nor in diabetic status.

7. Irodalomjegyzék

7.1. Az értekezés elkészítéséhez felhasznált irodalom

Adler AI, Boyko EJ, Ahroni JH, Stensel V, Forsberg RC, Smith DG. 1997. Risk factors for diabetic peripheral sensory neuropathy. Results of the Seattle Prospective Diabetic Foot Study. *Diabetes Care* 20:1162-1167.

Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR, et al. 2003. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 63:225-232.

Ahrén B, Landin-Olsson M, Jansson PA et al. 2004. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels and reduces glucagon levels in type-2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89:2078-2084.

Ahrén B 2007. DPP-4 inhibitors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 21(4):517-533.

Arezzo JC, Zotova E. 2002. Electrophysiologic measures of diabetic neuropathy: mechanism and meaning. *Int Rev Neurobiol* 50:229-255.

Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, et al. 2010. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol* 17:1113-1188.

Balakumar P, Dhanaraj SA. 2013. Cardiovascular pleiotropic actions of DPP-4 inhibitors: a step at the cutting edge in understanding their additional therapeutic potentials. *Cell Signal* 25:1799-1803.

Bánvölgyi A, Pozsgai G, Brain SD, Helyes ZS, Szolcsányi J, Ghosh M, Melegh B, Pintér E. 2004. Mustard oil induces a transient receptor potential vanilloid 1 receptor-independent neurogenic inflammation and a non-neurogenic cellular inflammatory component in mice. *Neuroscience* 125:449-459.

Ben Yakir-Blumkin M, Loboda Y, Schächter L, Finberg JP 2014. Neuroprotective effect of weak static magnetic fields in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 278:313-326.

Bergman AJ, Coyte J & Yi B. 2006. Effect of renal insufficiency on the pharmacokinetics of MK-0431 (sitagliptin), a selective dipeptidyl-peptidase-IV (DPP-IV) inhibitor. *Clinical Pharmacology and Therapy* 30(7):1862-1864.

Bril V, England J, Franklin GM, Backonja M, Cohen J, Del Toro D, et al. 2011. Evidence-based guideline: treatment of painful diabetic neuropathy: report of the American Academy of Neurology, the American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology* 76:1758-1765.

Callaghan BC, Little AA, Feldman EL, Hughes RA. 2012. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 6:CD007543

Callaghan BC, Hur J, Feldman EL. 2012. Diabetic neuropathy: one disease or two? *Curr Opin Neurol* 25:536-541.

Chater S, Abdelmelek H, Pequignot JM, Sakly M, Rhouma KB. 2006. Effects of sub-acute exposure to static magnetic field on hematologic and biochemical parameters in pregnant rats. *Electromagnetic Biology and Medicine* 25(3):135-144.

Chaudhuri A, Dandona P, Fonseca V. 2012. Cardiovascular benefits of exogenous insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 97:3079-3091.

Chen SR, Khan GM, Pan HL. 2001. Antiallodynic effect of intrathecal neostigmine is mediated by spinal nitric oxide in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Anesthesiology* 95(4):1007-1012.

Colbert AP, Markov MS, Souder JS. 2008. Static magnetic field therapy: dosimetry considerations. *J Altern Complement Med.* (5):577-582.

Drucker, D.J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W.L., and Habener, J.F. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3434-3438.

Drucker, D. J. 2006. The biology of incretin hormones. Review. *Cell metabolism* 3:153-165.

Ebert, R., Unger, H., and Creutzfeld, W. 1983. Preservation of incretin activity after removal of gastric inhibitory polypeptide (GIP) from rat gut extracts by immunoadsorption. *Diabetologia* 24:449-454.

Ehses JA, Lacraz G, Giroix MH, Schmidlin F, Coulaud J, Kassis N, Irminger JC, Kergoat M, Portha B, Homo-Delarche F, Donath MY. 2009. IL-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106(33):13998-14003.

Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al. 2004. Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care* 27(suppl 1):S84-87.

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

Fürst Zs. (szerk.): Farmakológia (2006) Medicina Könyvkiadó Rt, ISBN: 9632260074

Gmitrov J. 2007 Static magnetic field effect on the arterial baroreflex-mediated control of microcirculation: implications for cardiovascular effects due to environmental magnetic fields. *Radiat Environ Biophys.* 46(3):281-290.

Gorrell MD. 2005. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond)* 108:277-292.

Guieu R, Fenouillet E, Devaux C, Fajloun Z, Carrega L, Sabatier JM, Sauze N, Marguet D. 2006. CD26 modulates nociception in mice via its dipeptidyl-peptidase IV activity. *Behav Brain Res* 166:230-235.

Gyires K, Zádori ZS, Rácz B, László J. 2008. Pharmacological analysis of inhomogeneous static magnetic field-induced antinociceptive action in the mouse. *Bioelectromagnetics*. 29(6):456-462.

Hashish AH, El-Missiry MA, Abdelkader HI, Abou-Saleh RH. 2008. Assessment of biological changes of continuous whole body exposure to static magnetic field and extremely low frequency electromagnetic fields in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(3):895-902.

Helyes Z, Szabó A, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi A, Kereskai L, Keri G, Szolcsányi J. 2004. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum* 50:1677-1685.

Herman GA, Bergman A, Stevens C et al. 2006. Effect of single oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type-2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91: 4612-4619.

High WB, Sikora J, Ugurbil K, Garwood M. 2000. Subchronic in vivo effects of a high static magnetic field (9.4 T) in rats. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 12(1):122-139.

Haupt TA, Cassell JA, Riccardi C, DenBleyker MD, Hood A, Smith JC. 2007. Rats avoid high magnetic fields: Dependence on an intact vestibular system. *Physiology & Behavior* 92(4):741-747.

Hunskar S, Berge OG, Hole K. 1986. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behavioural Brain Research* 21(2):101-108.

Inoue H, Asaka T, Nagata N, Koshihara Y. 1997. Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 333:231-240.

Kahne T, Reinhold D, Neubert K, Born I, Faust J, Ansorge S. 2000. Signal transduction events induced or affected by inhibition of the catalytic activity of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26). *Adv Exp Med Biol* 477:131-137.

Kamei J, Ohsawa M, Miyata S, Endo K, Hayakawa H. 2008. Effects of cytidine 50-diphosphocholine (CDP-choline) on the thermal nociceptive threshold in streptozotocin-induced diabetic mice. *European Journal of Pharmacology* 598(1–3):32-36.

Khan GM, Chen SR, Pan HL. 2002. Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience* 114(2):291-299.

Kim D, Wang L, Beconi M et al. 2005. (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazol[4,3,a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type-2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* 48: 141-151.

Kluding PM, Pasnoor M, Singh R, Jernigan S, Farmer K, Rucker J, et al. 2012. The effect of exercise on neuropathic symptoms, nerve function, and cutaneous innervation in people with diabetic peripheral neuropathy. *J Diabetes Complications* 26:424-429.

Kreymann, B., Ghatei, M.A., Williams, G., and Bloom, S.R. (1987). Glucagonlike peptide-1 7–36: A physiological incretin in man. *Lancet* 2:1300-1304.

Langford DJ, Cragger SE, Shehzad Z, Smith SB, Sotocinal SG, Levenstadt JS, Chanda ML, Levitin DJ, Mogil JS. 2006. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. *Science* 312(5782):1967-1970.

László J, Reiczigel J, Székely L, Gasparics A, Bogár I, Bors L, Rácz B, Gyires K. 2007. Optimization of static magnetic field parameters improves analgesic effect in mice. *Bioelectromagnetics* 28:615-627.

László J, Gyires K. 2008. 3 T homogeneous static magnetic field of a clinical MR significantly inhibits pain in mice. *Life Sciences* 84(1–2):12-17.

László J, Tímár J, Gyarmati Zs, Fürst Zs, Gyires K. 2009. Pain inhibiting inhomogeneous static magnetic field fails to influence locomotor activity and anxiety behaviour in mice: No interference between magnetic field- and morphine-treatment. *Brain Research Bulletin* 79:316-321.

László JF, Pórszász R. 2011 Exposure to static magnetic field delays induced preterm birth occurrence in mice. *Am J Obstet Gynecol.* 205(4):362.e26-31.

László J, Szilvási J, Fényi A, Szalai A, Gyires K, Pórszász R. 2011. Daily exposure to inhomogeneous static magnetic field significantly reduces blood glucose level in diabetic mice. *Int J Radiat Biol* 87:36-45.

Makdissi A, Ghanim H, Vora M, Green K, Abuaysheh S, Chaudhuri A, Dhindsa S, Dandona P. 2012. Sitagliptin exerts an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab* 97:3333-3341.

Malik RA, Tesfaye S, Newrick PG, Walker D, Rajbhandari SM, Siddique I, et al. 2005. Sural nerve pathology in diabetic patients with minimal but progressive neuropathy. *Diabetologia* 48:578-585.

Matsubara J, Sugiyama S, Akiyama E, Iwashita S, Kurokawa H, Ohba K, Maeda H, Fujisue K, Yamamoto E, Kaikita K, Hokimoto S, Jinnouchi H, Ogawa H. 2013. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, improves endothelial dysfunction in association with its anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease and uncontrolled diabetes. *Circ J* 77:1337-1344

McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. 1998. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 55:1513-1520.

Mentlein R. 1999. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) – role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory Peptides* 85: 9-24.

Myers MI, Peltier AC, Li J. 2013/1. Evaluating dermal myelinated nerve fibers in skin biopsy. *Muscle Nerve* 47:1-11.

Myers MI, Peltier AC. 2013/2. Uses of skin biopsy for sensory and autonomic nerve assessment. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13:323

Nemzetközi Diabétesz Szövetség (International Diabetes Federation), *Diabetes Atlas*, 6. kiadás, 2013

Nyberg, J., Anderson, M.F., Meister, B., Alborn, A.M., Strom, A.K., Brederlau, A., Illerskog, A.C., Nilsson, O., Kieffer, T.J., Hietala, M.A., et al. (2005). Glucose-dependent insulintropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *J. Neurosci.* 25, 1816-1825.

Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, Orchard TJ. 2006. The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. *Diabetes* 55:1463-1469

Peltier A, Goutman SA, Callaghan BC. 2014. Painful diabetic neuropathy. *BMJ* 348:g1799

Pergolizzi JV Jr, Raffa RB, Taylor R Jr, Rodriguez G, Nalamachu S, Langley P. 2013. A review of duloxetine 60 mg once-daily dosing for the management of diabetic peripheral neuropathic pain, fibromyalgia, and chronic musculoskeletal pain due to chronic osteoarthritis pain and low back pain. *Pain Pract* 13:239-252.

Pintér E, Szolcsányi J. 1995. Plasma extravasation in the skin and pelvic organs evoked by antidromic stimulation of the lumbosacral dorsal roots of the rat. *Neuroscience* 68: 603-614

Pittler MH, Brown EM, Ernst E. 2007. Static magnets for reducing pain: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *CMAJ.* 177(7):736-742.

Powers AC, Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, 2012 *Harrison's principles of internal medicine - Diabetes mellitus* 18. kiadás

Rowbotham MC, Goli V, Kunz NR, Lei D. 2004. Venlafaxine extended release in the treatment of painful diabetic neuropathy: a double-blind, placebo-controlled study. *Pain* 110:697-706.

Röhlich P. (szerk.): Szövektan (1999), Folpress Nyomdaipari Kft, ISBN:963773192X 9637731938

Schierwagen C, Bylund-Fellenius A C, Lundberg C. 1990. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *J Pharmacol Methods* 23:179-186.

Sills GJ. 2006. The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. *Curr Opin Pharmacol* 6:108-113.

Spallone V, Lacerenza M, Rossi A, Sicuteri R, Marchettini P. 2012. Painful diabetic polyneuropathy: approach to diagnosis and management. *Clin J Pain* 28:726-743.

Surma SV, Belostotskaya GB, Shchegolev BF, Stefanov VE. 2014. Effect of weak static magnetic fields on the development of cultured skeletal muscle cells. *Bioelectromagnetics*. 2014 Sep 29. megjelenés alatt

Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 132:345-352.

Szende B. (szerk.): *Pathologia* (1999), Medicina Könyvkiadó Rt, ISBN: 9632425316

SzII: A diabetes mellitus kórismézéséről, a cukorbetegség kezeléséről és gondozásáról a felnőttkorban Szakmai Irányelv Hozzáférés dátuma: 2014. 09.25.

<<http://www.pharmindex-online.hu/diagnosztika-es-terapia/terapias-iranyelvek/a-diabetes-mellitus-korismezeserol-a-cukorbetegseg-kezeleserol-es-gondozasarol-a-felnottkorban-2518.html>>

Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Ward JD, Manes C, Ionescu-Tirgoviste C, et al. 2005. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 352:341-350.

Thomas L, Eckhardt M, Langkopf E, Tadayyon M, Himmelsbach F, Mark M. 2008. (R)-8-(3-amino-piperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydro-purine-2,6-dione (BI 1356), a novel xanthine-based dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, has a superior potency and longer duration of action compared with other dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 325:175-182.

Thrainsdottir S, Malik RA, Rosen I, Jakobsson F, Bakhtadze E, Petersson J, et al. 2009. Sural nerve biopsy may predict future nerve dysfunction. *Acta Neurol Scand* 120:38-46.

Tjolsen A, Rosland JH, Berge OG, Hole K. 1991. The increasing-temperature hot-plate test: an improved test of nociception in mice and rats. *J Pharmacol Methods* 25:241-250.

Tsuji Y, Nakagawa M, Suzuki Y. 1996. Five-tesla static magnetic fields suppress food and water consumption and weight gain in mice. *Industrial Health* 34(4):347-357.

Vallianou N, Evangelopoulos A, Koutalas P. 2009. Alpha-lipoic acid and diabetic neuropathy. *Rev Diabet Studies* 6:230-236.

Van Acker K, Bouhassira D, De Bacquer D, Weiss S, Matthys K, Raemen H, et al. 2009. Prevalence and impact on quality of life of peripheral neuropathy with or without neuropathic pain in type 1 and type 2 diabetic patients attending hospital outpatients clinics. *Diabetes Metab* 35:206-213.

Villhauer EB, Brinkman JA, Naderi GB et al. 2003. 1[[[3-hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]-2-cyano-(s)-pyrrolidine: a potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. *Journal of Medicinal Chemistry* 46: 2774-2789.

Webster LR, Peppin JF, Murphy FT, Tobias JK, Vanhove GF. 2012. Tolerability of NGX-4010, a capsaicin 8% patch, in conjunction with three topical anesthetic formulations for the treatment of neuropathic pain. *J Pain Res* 5:7-13.

Winkler G. 2012. A cukorbetegség XXI. századi kihívásai – a gyakorló orvos szemszögéből. IME, XI. évfolyam, 9. szám, 34-38. oldal

Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 16:109-110.

7.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/352/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ujhelyi Judit Ágnes
Neptun kód: BZIK5C
MTMT azonosító: 10045973
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

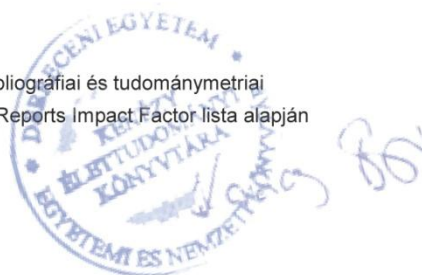
1. László, F.J., **Szilvási J.**, Fényi, A., Szalai, A., Gyires, K., Pórszász, R.: Daily exposure to inhomogeneous static magnetic field significantly reduces blood glucose level in diabetic mice.
Int. J. Radiat. Biol. 87 (1), 36-45, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/09553002.2010.518200>
IF:2.275
2. **Ujhelyi, J.**, Ujhelyi, Z., Szalai, A., László, F.J., Cayasso, M., Vecsernyés, M., Pórszász, R.: Analgesic and anti-inflammatory effectiveness of sitagliptin and vildagliptin in mice.
Regul. Pept. Epub ahead of print (2014)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2014.09.006>
IF:2.014 (2013)

A közzé folyóiratok összesített impakt faktora: 4,289

A közzé folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,289

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

Debrecen, 2014.10.29.



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu

8. Tárgyszavak

Magyar tárgyszavak: diabéteszes neuropátia, sitagliptin, vildagliptin, streptozotocin (STZ), egér, mustárolaj, mechanikai és termális érzékenység, sztatikus mágneses tér (SMF)

Angol tárgyszavak: diabetic neuropathy, sitagliptin, vildagliptin, streptozotocin (STZ), mice, mustard oil, mechanical and thermal touch sensitivity, static magnetic field (SMF)

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Dr. Szilvássy Zoltán intézetvezető úrnak, hogy hozzájárult, hogy kutatómunkámat a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben végezzem.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Pórszász Róbert egyetemi docensnek a széleskörű szakmai útmutatást, türelmét és önzetlen segítségét. Hálás vagyok szakmai és emberi hozzáállásáért, szemléletformáló tanításáért.

Köszönettel tartozom Szalai Andreának a kísérletes munka során nyújtott segítségért, és hogy mindig számíthattam rá.

Köszönöm Dr. László János egyetemi docensnek a kooperációs munka során nyújtott segítségét, szakmai hozzáértését és hozzájárulását közös cikkeink megjelenéséhez.

Köszönöm a kollaborációs munkát a Gyógyszertechnológiai Tanszék és a Klinikai Fiziológiai Tanszék munkatársainak.

Köszönöm családomnak, különösképpen férjemnek a szeretetet, támogatást, kitartásukat és türelmüket.

10. Fűggelék