

Doktori (Phd) értekezés tézisei

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

dr. Wachal Zita

Témavezető: Dr. Varga Balázs



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

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az
egészségtudományok tudományágban

Írta: dr. Wachal Zita gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori
Iskolája (Táplálkozástudományi programja) keretében

Témavezető: Dr. Varga Balázs, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Ujhelyi Bernadett, PhD

Dr. Dér Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Majoros László, PhD

tagok: Dr. Ujhelyi Bernadett, PhD

Dr. Dér Péter, PhD

Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó, PhD

Dr. Csonka Csaba, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme

2023. július 14. 11 óra

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés	0
2. Anyagok és módszerek.....	2
2.1. Kísérleti állatok.....	3
2.2. Glükózzal kapcsolatos mérések	3
2.2.1 Éhomi vércukorszint	4
2.2.2 Orális glükóz tolerancia teszt (OGTT)	4
2.2.3. Hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC)	5
2.2.4 Számolt mutatók.....	5
2.3. A túlélési görbe kiszámolása és kiértékelése.....	7
2.4. Elektroretinográfia (ERG)	7
2.5. Western blot	9
2.7. Kísérleti protokollok és csoportok.....	11
2.7.1. Első kísérlet.....	11
2.7.2. Második kísérlet	11
2.8. Statisztika.....	12
3. Eredmények	12
3.1. Az első kísérlet eredményei.....	13
3.1.1. Testtömeg-gyarapodás	13
3.1.2. Éhomi vércukorszintek eredmények.....	13
3.1.3. Orális glükóztolerancia teszt eredmények	14
3.1.4. Hiperinzulinémiás euglikémiás clamp (HEGC) eredmények.....	14
3.1.5. Elektroretinográfia eredmények.....	16
3.1.6. Western Blot Eredmények	16
3.2. A második kísérlet eredményei.....	18
3.2.1. Túlélési analízis eredmények	18
3.2.2. OGTT eredmények.....	18
3.2.3. ERG eredmények	19
3.2.4. Western Blot eredmények.....	20

4. Megbeszélés.....	20
5. Összefoglalás.....	32
6. Hivatalos publikációs lista.....	34
7. Köszönetnyilvánítás	36

1. Bevezetés és célkitűzés

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

A diabetes mellitus gyakori mikrovaszkuláris szövődménye, a diabéteszes retinopátia a vakság egyik vezető oka világszerte. A magas vércukorszint a retina ereinek működését teszi tönkre és következményes iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodásokat okoz. A látás romlása funkcionálisan mérhető elektroretinográfia (ERG) segítségével akár laboratóriumi állatok esetén is.

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

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

Munkacsoportunk már több kísérletet végzett retinoprotektív molekulákkal cukorbeteg állatokon a retina károsodásának kivédésére. A BGP-15 egy ígéretes jövőbeli gyógyszerfejlesztési célmolekula, melyet – mivel kémiai rokon a propranolollal – először szív- és érrendszeri célokra fejlesztettek ki, jöhet azóta már számos különböző, diabétesssel és iszkémiareperfúzióval is összefüggő betegségben próbálták ki, úgy mint szív iszkémiareperfúzióban, vesetoxicitásban, neuropátiában, miopátiában, és különösképpen inzulin rezisztencia ellen. Maga a cukorbetegség is összefügg az ischaemia-reperfúziós károsodással: a lokális ischaemia például fokozza a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) expresszióját is, ami aztán neovaszkularizációval járó proliferatív retinopátiához vezet. Így tehát a cukorbetegség fent említett látáskárosító következményeihez vezető háttéreseményeknek bizonyítottan részét képezik a retina ischemiareperfúziós sérülései is. Ugyanakkor kutatómunkám kezdetén a BGP-15-öt még senki sem vizsgálta diabéteszes retinopátiában, jöhet a hatásmechanizmusa miatt ilyen megbetegedések kezelésére vagy megelőzésére is potenciális jelölt.

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

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

2. Anyagok és módszerek

2.1. Kísérleti állatok

Első kísérletünkben vizsgálatunkhoz a hím Goto-Kakizaki és Wistar patkányokat (10 hetesek; 250–300 g) a Charles River Laboratories International Inc.-től (Wilmington, MA, USA) szereztük be. A Goto-Kakizaki (GK) modell – a Charles River leírása alapján – egy nem elhízott Wistar altörzs, amelyben 2-es típusú cukorbetegség alakul ki; kontrollja a Wistar patkány (CrI: WI). Az állatokat ketrechen tartottuk és az állatkutatásra vonatkozó nemzetközi előírásoknak megfelelően (ARVO (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) és az NIH (National Institute of Health) irányelvei) gondoztuk. A vizsgálat során használt összes módszert a Debreceni Egyetem Intézményi Állatetikai Bizottsága hagyta jóvá (18/2013/DE MÁB). Az állatoknak szabad hozzáférése volt a vízhez, és *ad libitum* szabványos rágcsáló táppal etettük őket.

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

2.2. Glükózháztartás monitorozása

Első kísérletünkben éhomi vércukorszint-elemzést a kezelési időszak kezdetén, majd a 3., 8., 11. hét elején és közvetlenül a vizsgálat befejezése előtt („végpont”) végeztünk. Továbbá Orális glükóztolerancia-tesztet (OGTT) is

végeztünk az összes fent említett időpontban, kivéve a végpontban. Ennek a kísérlet végén ugyanis minden állatot alávetettünk egy hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC) mérésnek, hogy felmérjük inzulinérzékenységüket vagy inzulinrezisztenciájukat.

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

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

2.2.1 Éhomi vércukorszint

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

2.2.2 Orális glükóz tolerancia teszt (OGTT)

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

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

2.2.3. Hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC)

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

2.2.4 Számolt mutatók

A HEGC protokoll előtti és alatti közvetlen mérések eredményeiből - azaz testtömeg (body weight, BW), éhomi (fasting) plazma glükóz (FPG), éhomi (fasting) plazma inzulin (FPI), glükóz infúzió sebessége (GI), inzulin

infúzió sebessége (II) , egyensúlyi (steady-state) plazma glükóz (SSPG), egyensúlyi (steady-state) plazma inzulin (SSPI) - különböző indexeket számítottunk ki, amelyek képletei a következők:

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

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

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

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

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

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

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

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

QUICKI = Kvantitatív inzulinérzékenység-ellenőrző mutató (QUAntitative Insulin sensitivity ChecK Index) (mértékegység nélkül)

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

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

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

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

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

A hasnyálmirigy β -sejtek funkciójának értékeléséhez HOMA-B számítási módszert alkalmaztunk, amely ugyanazon cikken alapul.

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

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

2.3. A túlélési görbe kiszámolása és kiértékelése

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

2.4. Elektroretinográfia (ERG)

Mindkét kísérletünk végén elektroretinográfiás mérést hajtottunk végre: első kísérletünkben a HEGC előtt egy nappal, második kísérletünkben pedig közvetlenül az utolsó OGTT után. Az állatokat ketamin/xilazin kombinációjával (100/10 mg/kg) elaltattuk, hogy elektroretinográfiás mérést végezzünk a következők szerint. Mindkét szem pupilláját egy-egy csepp ciklopentoláttal kitágítottuk (Humapent, Teva Kft., Debrecen, Magyarország), majd rövid szemfenéki vizsgálatra került sor kézi ophthalmoszkóppal (Heine Mini 2000 Ophthalmoscope, HEINE Optotechnik GmbH and Co. KG, Gilching, Németország) a diabéteszes retinopátia megerősítésére a

szakirodalom alapján. Az ERG méréshez öt tüelektrodát használtunk, hogy a fény által generált áramokat egy analóg-digitális átalakítóval (Bridge Amp és PowerLab, ADInstruments, Sydney, Ausztrália) összekapcsolt erősítőbe vezessük, és a hullámformákat a PowerLab Chart szoftver (5.2.2-es verzió, ADInstruments, Sydney, Ausztrália) segítségével számítógépen is láthatóvá tesszük. Két mérőelektrodát behelyeztünk enyhén a szaruhártya felszínébe (anélkül, hogy perforáltuk volna azt), két referenciaelektrodát az állat fülcimpájába szúrtunk, míg az általános földelő elektrodát az állat középvonalában rögzítettük, az ornyereg bőrébe szúrva. Karbomer alapú szemgél (Vidisic, BauschandLomb, Berlin, Németország) alkalmaztuk a szem kiszáradása ellen és kontaktgélként.

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

alkalmazott kísérleti módszer reprodukálható és megbízható adatokat szolgáltat a retina működéséről, és összefüggésben áll a retina integritásával.

2.5. Western blot

Mindkét kísérletet a szem molekuláris biológiai elemzésével zártuk. Az állatok életét kíméletesen kioltottuk az érzéstelenítő keverék túladagolásával, majd szemeiket kimetszettük és lefagyasztottuk. A teljes szemmintákat késes homogenizátorral (IKA-WERKE ULTRA-TURRAX diszpergátor, Staufen, Németország) homogenizáló pufferben jégen homogenizáltuk. A homogenizáló puffer a következőket tartalmazta: 25 mM Tris, 25 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, proteáz inhibitor koktél és desztillált víz (minden összetevőt a Sigma-Aldrich-Merck KGaA-tól vásároltunk, Darmstadt, Németország). 10 000 fordulat/perc sebességgel, 20 percig, 4°C-on végzett centrifugálást követően a citoszolikus fehérjéket a felülúszóval együtt leszívtuk, hogy a felülúszó citoszolfrakciót elválasszuk a pellettől. A pelletet 1 órán át tovább inkubáltuk Triton X-100 tenzidet is tartalmazó homogenizáló pufferrel (szintén a Sigma-Aldrich-Merck KGaA-tól, Darmstadt, Németország), majd a felülúszó nukleáris frakciót centrifugálással választottuk el (14 000 ford./perc, 10 perc, 4°C), és a sejtmag fehérjéket a felülúszóval együtt leszívtuk. Az egyes frakciók felülúszóinak egy kis részéből spektrofotométerrel (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország) megmértük a teljes fehérjekoncentrációt, mely után a felülúszók maradék többi részét Laemmli mintapuffer (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország) hozzáadásával és 5 perc forralással készítettük elő SDS-poliakrilamid gélelektroforézisre. A fehérjéket 100–120 percig 4 mA-en futtatva 12%-os gélen választottuk el (Hoefler miniVe PAGE SE300 függőleges elektroforetikus és elektrotranszfer egység, Hoefler Inc., Holliston, MA, Egyesült Államok). A fehérjéket ezután nitrocellulóz membránra (GE Healthcare, Darmstadt, Németország) transzferáltuk elektroforetikusan a fent említett eszköz (Hoefler miniVE SE300) blot moduljával. 3%-os BSA-oldattal

(Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország) blokkoltuk a nitrocellulóz membrán szabadon maradt kötőfelszínét, majd ezt követően a fehérjéket egy éjszakán át primer antitestekkel inkubáltuk. Első kísérletünkben a következő primer antitestekkel inkubáltunk: anti-SIRT1 egér monoklonális antitesttel (mely a SIRT1-et (~110 kDa) ismeri fel, Cat#ab110304, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság); anti-MMP9 nyúl poliklonális antitesttel (mely az MMP9-et (~92 kDa) ismeri fel, Cat#ab38898, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság); anti-HistoneH3 rekombináns, monoklonális nyúl antitesttel (mely a hiszton H3-at (~17 kDa) ismeri fel, Cat#701517 ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA); és anti-béta-aktin egér monoklonális antitesttel (mely a béta-aktint (~42 kDa) ismeri fel, Cat#A5316, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország). Második kísérletünkben pedig a következő primer antitesteket használtuk: anti- β -aktin (Cat#A5316, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország); anti-Histone H3 (kat. szám: 701517, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok); anti-HSP70 (SAB4200714, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország); és anti-nukleáris faktor κ B (ab 16502, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság). Másnap a membránok desztillált vízzel történő mosása után, a keresett fehérjék megjelenítéséhez torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesteket használtunk: egér elleni antitestet (Cat#A4416) és nyúl elleni antitestet (Cat#A0545; mindkettő a Sigma-Aldrich-Merck KGaA-tól, Darmstadt, Németország). A kimutatáshoz WesternBright™ fokozott érzékenységű kemilumineszcens szubsztrátot (Advansta Inc., Menlo Park, CA, Egyesült Államok) és LI-COR C-DiGit® blot szkennert (LI-COR Inc., Lincoln, NE, Egyesült Államok) használtunk. Csoportonként három blot elemzését ImageJ szoftverrel (1.51-es verzió, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Egyesült Államok) végeztük. Az eredményeket úgy kaptuk, hogy a blotokat a háttérre normalizáltuk, és egy háztartási fehérjére (béta-aktin vagy hiszton H3) standardizáltuk.

2.7. Kísérleti protokollok és csoportok

2.7.1. Kísérlet Goto-Kakizaki patkányokkal

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

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

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

2.7.2. Kísérlet ZDF-patkányokkal

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

A ZDF állatokat véletlenszerűen két csoportba osztottuk: ZDF kontrollcsoportba (ZDF) és BGP-15-kezelt csoportba (BGP). A sovány állatokból egy harmadik csoportot alakítottuk ki (lean). $N=10$ minden

csoportban. 16 hetes koruktól kezdve minden állatot naponta szájon át gavageoltunk (orogasztrikus tápszondán keresztül) a vizsgálat teljes ideje alatt, amely 52 hétig (1 évig) tartott. A kezelt csoport 10 mg/kg BGP-15-öt kapott metilcellulóz nyákban, míg a sovány és ZDF csoportba tartozó állatokat csak vivőanyaggal kezeltük. Az adagot elsőként kivitelezett kísérletünkre alapoztuk. A BGP-15-öt a Sigma-Aldrich-Merck KGaA-tól szereztük be (Darmstadt, Németország).

Ezeken az állatokon a következő kísérleteket végeztük el időrendben: túlélési görbe analízis, éhomi vércukorszint mérés, OGTT, ERG, WB.

2.8. Statisztika

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

3. Eredmények

3.1. A Goto-Kakizaki-patkánykísérlet eredményei

3.1.1. Testtömeg-gyarapodás

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

3.1.2. Éhomi vércukorszintek eredmények

A kísérlet alatt minden beteg, GK csoport éhomi vércukorszintje egy 8-9 mmol/L-es átlag körül mozgott – minden szignifikáns különbség nélkül bármely két csoportot összehasonlítva – míg a Wistar értékek egy szignifikánsan alacsonyabb szinten, átlagosan 5-6 mmol/L körül voltak (9.2 ± 0.589 mmol/L, 9.4 ± 0.526 mmol/L, 8.2 ± 0.171 mmol/L, 9.2 ± 1.059 mmol/L és 9.4 ± 0.692 mmol/L vs. 5.2 ± 0.178 mmol/L rendre Glibenklamid, Metformin, Pioglitazon, Goto kontrol és BGP-15 vs Wistar kontrol összehasonlításban; $p < 0.05$). A BGP-15, a Pioglitazon és Wistar csoportok éhomi vércukor értékei nem változtak, a végponti értékek rendre így alakultak:

$98.87 \pm 4.532\%$; $97.35 \pm 6.116\%$ és $108.6 \pm 10.550\%$, melyekből a két első csoport statisztikailag szignifikánsan különbözött a Goto kontrol csoporttól ($137.4 \pm 5.219\%$). A Glibenklamid és Metformin-csoport értékei a következők voltak: $132.6 \pm 10.15\%$ és $117.8 \pm 8.421\%$.

3.1.3. Orális glükóztolerancia teszt eredmények

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

3.1.4. Hiperinzulinémiás euglikémiás clamp (HEGC) eredmények

Ahogy eredményeinken látszik szignifikáns különbségek voltak a plazma inzulin szintek között a hiperinzulinémiás euglikémiás clamp (HEGC) módszer végén: míg az egészséges Wistar patkányok $366.6 \pm 141.3 \text{ mU/L}$ átlag $\pm \text{SEM}$ értéket prezentáltak, addig a BGP-15-kezelt Goto-Kakizaki patkányoké $178.3 \pm 54.71 \text{ mU/L}$ -nak bizonyult, ami szignifikánsan különbözött a Goto kontrol csoport $513.0 \pm 135.9 \text{ mU/L}$ értékétől (* = $p < 0.05$). A Glibenklamid nem tudta enyhíteni az inzulin-rezisztenciát, ami a relatíve magas inzulin szintekből is látszott ($626.3 \pm 140.7 \text{ mU/L}$) a HEGC protokoll végén, ezzel szemben mind a Metformin, mind a Pioglitazon inzulin-érzékenyítő hatást mutatott (értékeik rendre 266.6 ± 72.93 és $291.5 \pm 65.46 \text{ mU/L}$). Ha megnézzük a direkt éhomi

plazma glükóz értékeket, szembevetve, hogy nemcsak a Metformin (11.28 ± 0.822 ; $p < 0.05$ vs. Goto kontrol (13.15 ± 0.650 mmol/L)) és a pioglitazon (8.27 ± 0.463 mmol/L; $p < 0.0001$ vs. Goto kontrol), hanem a BGP-15 is (10.97 ± 0.460 mmol/L) képes volt szignifikánsan csökkenteni a vércukrot ($p < 0.05$ vs. Goto kontrol), jóllehet ez a csökkenés nem volt olyan kifejezett, mint a pioglitazon esetében. Ugyanakkor, még a pioglitazon sem volt képes elérni az egészséges állatok szintjét ($p < 0.05$ a pioglitazon vs Wistar kontrol (5.86 ± 0.506 mmol/L) összehasonlításban). A glibenklamid-kezelt csoport éhomi plazma glükóz szintje \pm SEM 11.5 ± 1.016 volt. Nem voltak szignifikáns különbségek a csoportok között a éhomi plazma inzulin és a steady state vércukorszintek esetén.

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

3.1.5. Elektroretinográfia eredmények

Az ERG mérések alapján a csoport trendek mind az a- mind a b-hullámok esetén nagyon hasonlóak. A BGP magasabb a- és b-hullámamplitúdókat produkált (rendre $30.25 \pm 0.342 \mu\text{V}$ és $97.39 \pm 0.708 \mu\text{V}$), mint amilyeneket a Goto kontrol csoportnál megfigyelhettünk (rendre $19.7 \pm 0.315 \mu\text{V}$ és $61.11 \pm 0.672 \mu\text{V}$). Sőt, a BGP-értékek statisztikailag még szignifikánsan magasabbak is voltak az egészséges Wistar értékeknél (az a- és b-hullámamplitúdók rendre $26.54 \pm 0.267 \mu\text{V}$ és $76.83 \pm 0.767 \mu\text{V}$). A BGP-kezelés az a- és b-hullám amplitúdókra gyakorolt ezen hatása hasonlóan vagy jobbnak is bizonyult, mint a metformin- és a pioglitazon-kezelésé (metformin átlag a- és b-hullámai rendre: $24.66 \pm 0.316 \mu\text{V}$ és $68.09 \pm 0.628 \mu\text{V}$; pioglitazon átlag a- és b-hullámai rendre: $29.25 \pm 0.426 \mu\text{V}$ és $89.68 \pm 0.862 \mu\text{V}$). Az előbb említett három kezelés hasonló vagy magasabb amplitúdókat produkált, mint az egészséges Wistar állatok.

3.1.6. Western Blot Eredmények

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

A SIRT1 expressziót a BGP-kezelés serkentette: a BGP-15-kezelt csoport standardizált-normalizált pixelsűrűsége szignifikánsan nagyobbak bizonyult mind a Goto kontrol, mind a Wistar kontrol csoportokénál (1.539 ± 0.301 vs 0.6463 ± 0.094 és 0.2346 ± 0.083 , $p < 0.01$ és $p < 0.0001$, az említés sorrendjében). Statisztikailag nem volt szignifikáns különbség a Goto kontrol és Wistar kontrol csoportok között. A BGP-15 érték magasabbnak bizonyult az

összes többi csoportnál is (1.020 ± 0.205 , 0.6371 ± 0.040 és 0.8204 ± 0.1015 rendre: glibenklamid-, metformin- és pioglitazon-csoport; $p < 0.05$, $p < 0.01$ és $p < 0.01$ vs BGP). A glibenklamid- és pioglitazon-csoportokban a SIRT1 szint szignifikánsan nagyobbak mutatkoztak a Wistar kontrol csoportnál ($p < 0.05$ mindkét összehasonlításban).

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

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

3.2. A ZDF patkánykísérlet eredményei

3.2.1. Túlélési analízis eredmények

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

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

3.2.2. OGTT eredmények

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

Ha az OGTT 120 perces értékeit nézzük, akkor a kétutas ANOVA statisztikai analízis szignifikáns különbséget adott közvetlenül a kiindulási időpontban ($7,630 \pm 0,142$ vs. $5,330 \pm 0,078$, a ZDF vs. sovány összehasonlításban, $p <$

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

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

3.2.3. ERG eredmények

Az ERG mérések szerint mind az a-, mind a b-hullámok átlagos amplitúdója minden csoportban szignifikánsan eltérőnek bizonyult. A tendenciák az a-hullámok és a b-hullámok esetében megegyeztek: a kezeletlen ZDF állatok szignifikánsan alacsonyabb amplitúdót produkáltak, mint az egészséges (sovány) állatok (az a-hullámok esetében ez $23,32 \pm 0,4277$ vs. $62,09 \pm 0,4621$, a ZDF és a sovány csoportokra nézve, a b-hullámok esetében ez $68,07 \pm 0,9519$ vs. $198,4 \pm 0,7796$ volt a ZDF és a sovány csoportokra nézve; $p < 0,0001$ mindkét összehasonlításban), míg a BGP-vel kezelt ZDF állatok szignifikánsan magasabb amplitúdót produkáltak mint a kezeletlen ZDF csoport ($40,88 \pm 0,5149$ az a-hullámok és $131,3 \pm 1,408$ a b-hullámok esetén a BGP-vel kezelt ZDF állatoknál; mindkét összehasonlításban a megfelelő kezeletlen ZDF-értékekkel $p < 0,0001$).

3.2.4. Western Blot eredmények

Western blot mérések szerint szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők a hősokk-fehérje 70 (HSP70) és a nukleáris faktor kapp B (NFκB) expressziós szintjei között a különböző állatcsoportokban.

A HSP70 értékek esetén e fehérje fokozott expressziója figyelhető meg az egészséges (sovány) állatokhoz képest mind a kezeletlen, mind a BGP-vel kezelt ZDF állatokban ($0,7402 \pm 0,0087$ és $0,9059 \pm 0,0621$ vs. $0,3250 \pm 0,0184$ a ZDF és BGP vs sovány csoportokra nézve, illetve $p < 0,0001$ mindkét összehasonlításban). A BGP-15 kezelés tovább növelte a HSP70 expresszióját, ami szintén szignifikánsnak bizonyult a kezeletlen ZDF csoport átlagértékéhez képest ($p < 0,05$).

Hasonlóképpen, az NFκB expressziója mindkét diabéteszes állatcsoportban emelkedett; ez a különbség azonban csak a ZDF vs. sovány összehasonlítás esetén volt szignifikáns ($0,318 \pm 0,0211$ vs. $0,0933 \pm 0,0210$, $p < 0,001$), a BGP vs. sovány összehasonlításban nem ($0,1735 \pm 0,0435$ vs. $0,0,33$ vs. $0,0,9$). A BGP-kezelés szignifikánsan csökkentette az NFκB expressziót a kezeletlen ZDF csoporthoz képest ($p < 0,05$).

4. Megbeszélés

A cukorbetegség szemet érintő szövődményei gyakran a legsúlyosabb szemészeti következményekkel járnak, mint például a látás romlása vagy akár elvesztése. Ahogy a diabetes mellitus incidenciája emelkedik, úgy nő a diabéteszes retinopátia prevalenciája is. A diabéteszes retinopátia jelentőségét tovább hangsúlyozza, hogy ez a vaktság egyik leggyakoribb oka a világon. Ezért elsődleges fontosságú olyan új farmakológiai szerek felfedezése, amelyek képesek ellensúlyozni, vagy legalább enyhíteni vagy késleltetni a cukorbetegség károsító hatásait. Bár a szigorú glikémiás kontroll csökkentheti és elodázhhatja a szövődményeket, sajnos még a jelenlegi antidiabetikus

gyógyszerek sem képesek hatékonyan megakadályozni a retinakárosodás kialakulását: megfelelő kezelés ellenére is a diabéteszes retinopátia hosszú, cukorbetegségben töltött idő után, amit tovább súlyosbít az életkor és a társbetegségek, mint például a hiperlipidémia.

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

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

Kísérletünkben a BGP-csoport nem különbözött szignifikánsan testsúlygyarapodás tekintetében a többi GK csoporttól.

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

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

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

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

Első kísérletünkben a BGP-15 és a pioglitazon képes volt magasabb elektroretinográfiás hullámokat generálni, mint az egészséges Wistar patkányok, ami egy meglepő eredmény, de nem lehetetlen. A kisebb ERG hullámok egy lehetséges oka a mélyebb általános anesztézia, ami az egészséges Wistarok esetén előfordulhatott: a nagyobb testtömegük miatt a Wistarok nagyobb mennyiségű általános érzéstelenítőt kaptak (ketamin/xylazin 100/10mg/ttkg), és azt figyeltük meg, hogy – feltehetően a nagyobb

zsírmennyiségük miatt – ezek az állatok lassabban ébredtek fel az altatásból, mint a GK patkányok. Ezen túlmenően van egy kevés esély arra is, hogy a BGP-15 és a pioglitazon esetleg érzékenyíti a retinát a fényre egy ismeretlen mechanizmussal. Ez további, jövőbeli kísérleti lehetőségeket vet föl.

A BGP-15 retinoprotektív hatásának mechanizmusa első kísérletünk western blot eredményei alapján körvonalazódni kezdett: a BGP képes megváltoztatni a sirtuin 1 és a mátrix metalloproteináz 9 enzimek expresszióját ezzel enyhítve a diabéteszes retinopátia tüneteit. Ez a két fehérje egy közös útvonalhoz kapcsolódik korábbi tudományos kutatások alapján: a SIRT1 deacetilál és ezáltal gátol olyan fehérje komplexeket – melyek pl. a poli-ADP-ribóz-polimeráz 1-et (PARP1), a kappa B nukleáris faktort (nfkB) és az aktivátor protein 1-et (AP1) foglalják magukba – melyek többek között az MMP9 transzkripcióját iniciálnák a retinában. Viszont diabéteszben a SIRT1 expressziója és aktivitása is gátlódik, így a gátlás gátlása miatt az előbb említett transzkripciós faktorok serkentik az MMP9 szintézisét. Ez túlzott transzaktivációhoz és az MMP9 következményes felhalmozódásához vezet még a mitokondriumban is károsítva a mitokondriális membránt, mely következtében citokróm c szabadul ki a citoszólba és apoptózis aktiválódik.

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

Első kísérletünk eredményei szerint a BGP-15 ellensúlyozhatja a fentebb említett mitokondriális károsodáshoz vezető eseményeket, mivel képes jelentősen növelni a SIRT1 expressziót, még olyan anti-diabetikumoknál is

jobban, mint a glibenklamid, a pioglitazon vagy a metformin. A tudományos szakirodalommal való könnyebb összehasonlíthatóság érdekében: korábbi eredmények szerint a metformin képes emelni a SIRT1 szintjét a retinában. A glibenklamid esetén viszont legjobb tudomásunk szerint ez az első alkalom, hogy SIRT1-emelő hatást demonstrálnak a szemben, jóllehet erre más, nem-retinális szöveteken végzett tanulmányokból következtetni lehetett. Első kísérletünkben a pioglitazon – vese- és máj-eredményekkel egybevégezően – diabéteszes szemben is a SIRT1 expresszió emelkedését produkálta, amely szintén új eredmény.

Ezzel együtt, elsőként bizonyítottuk, hogy a BGP-15 képes lecsökkenteni az MMP9 expresszióját az egészséges kontrol szintjére. Korábban a glibenklamidról már kimutatták, hogy csökkenti az MMP9 szintet, de csak metasztatikus emlő daganatban és agyban. A glibenklamid diabéteszes szemben kifejtett, MMP9-csökkentő hatásával kapcsolatos eredményünk újdonság. A metformin bizonyítottan csökkenti az MMP9 szintézist számos különböző betegségben, például inzulinrezisztens cukorbetegségben, mellrákban, gerincvelősérülésben stb., de eddig egyetlen tudományos cikk sem bizonyította ezt a hatást diabéteszes állatok szemében, mint mi első kísérletünkben. Ugyanez vonatkozik a pioglitazonra is: kimutatták, hogy a pioglitazon csökkenti az MMP9 szintjét egér peritoneális makrofágokban, tüdő és emlőrák sejtekben, valamint az ateroszklerotikus nyúlmodell szérumban. A tudományos szakirodalomban azonban még nincs említés arról, hogy a szer csökkenti az MMP9 expresszióját a szemben. Így a BGP-15 hatékonyságának bizonyítása mellett új tényeket állapítottunk meg három jól ismert cukorbetegség elleni szerről, amelyekre a korábbi eredményekből ugyan következtetni lehetett, de amelyeket még senki nem írt le diabéteszes szemben.

Egy másik kutatócsoport legutóbbi, a BGP-15-ről szóló cikke arra a következtetésre jutott, hogy a BGP védi a mitokondriumokat, ami teljes mértékben összhangban van az itt bemutatott eredményeinkkel. Bár a fent

említett cikkben a BGP-t az acetaminofen által kiváltott hepatotoxicitásban alkalmazták és a hatásmechanizmus útvonala (a JNK aktiváció megelőzése és az autofágia markerek csökkentése) is eltér a miénktől, de lehetséges, hogy összefüggés van az eredményeink között a következők szerint.

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

Valójában az MMP9 lehet a kapcsolat: míg a cukorbetegségben az MMP9 túlzottan expresszálódik a SIRT1-hiány miatt, vannak olyan eredmények is, amelyek megerősítik az MMP9 aktiválását a diabéteszes retinában egy ú.n. extracelluláris szignál-szabályozott kináz (ERK) MAP kináz útvonal által. Így a felhalmozott és aktivált MMP9 károsítja a mitokondriális membránt, ami ugyanaz az eredmény, mint a JNK MAP kináz útvonal esetében, amelyet a BGP-15 képes gátolni. Azonban kísérleteinkben az MMP9 aktivitását nem mértük, ami a vizsgálatok egyik hiányossága. További kísérletekre van szükség a BGP és az ERK MAP kináz útvonal közötti lehetséges kölcsönhatások felméréséhez is, hogy a szer képes-e gátolni az MMP9-aktivációt.

Mindent egybevetve, ha értékelni akarjuk az első kísérletünk összes

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

Második kísérletünk egyik legfontosabb eredménye a BGP-vel kezelt állatok túlélése a 12 hónap alatt. Kevés olyan vizsgálat született, amely hosszú ideig, például 9 hónapig operált ZDF patkányokkal a diabéteszes retinopátiával kapcsolatos egyéb cikkekben, de ezekben perifériás vérparamétereket mértek vagy szövettani elemzéseket végeztek. A kardiovaszkuláris funkciót és a

központi idegrendszer fehérje változásait , valamint az endothel diszfunkciót elemezték már 12 hónapos ZDF állatokon, ill. veseműködést vizsgáltak már 12 hónapos ZDFxSHHF hibrid patkányokon , de tudomásunk szerint olyan cikk nincs, amely olyan cukorbeteg ZDF patkányok retinafunkciójáról tartalmazna információkat amelyek egy egész éven, tehát 52 héten át voltak diabetesesek. Hasonlóképpen, az eddig publikált leghosszabb BGP-kezelés 12 hét (3 hónap) volt izomdisztrófia modell esetén , illetve első kísérletünkben GK patkányokon. Legjobb tudomásunk szerint ilyen hosszú BGP-kezelésről második kísérletünket megelőzően nem publikáltak. Nem példa nélküli, hogy egy gyógyszeres kezelés meghosszabbíthatja a túlélést egy beteg állatmodellben ; jóllehet második kísérletünkből született az első olyan publikáció, amely egy ilyen hatékony, hosszú távú BGP-kezelés eredményeit tartalmazza egy 52 hétig fenntartott II-es típusú diabéteszes állatmodellben, ZDF patkányokban.

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

A retina működése elektromos jeleket produkál, amelyek cukorbetegségben a mikrokeringési problémák miatt gyengülnek. Így a BGP-15 második kísérletünk elektroretinográfiai eredményeiben látható hatása összefüggésbe hozható az ilyen mikrokeringési szövődmények csökkenésével. Kísérletünk figyelemreméltó újdonsága, hogy a BGP-15 képes ellensúlyozni a hosszú távú cukorbetegség ZDF patkányok retinájának működésére gyakorolt

káros hatását. Ilyen retinaprotekció cukorbetegségben általában neuropeptidek, trofikus faktorok, antioxidánsok, vagy gyulladásgátló hatású szerek esetében tapasztalható. Bár a BGP nem neuropeptid, és nem is trofikus faktor, bizonyos antioxidáns vagy gyulladáscsökkentő tulajdonságokat fejthet ki a retinán, amint azt korábban nem retinális sejtvonalakon le is írták már. A BGP hatásainak háttérében különböző effektormolekulákról számoltak már be, ideértve például a HSP70-et rekeszizom-sejtekben, a hiszton-deacetilázokat egér endoteliális fibroblaszt sejtekben, a RAC-alfa szerin/treonin-protein kinázt (ATK) szívizomsejtekben, vagy a Sirtuin 1-et (SIRT1) teljes szem homogenizátum szemsejtjeiben (első kísérletünk). Másrészt a BGP-15 gátolja a poli-ADP-ribóz-polimeráz 1-et (PARP1) a szívizomban és a c-Jun N-terminális kináz (JNK) útvonalat, illetve csökkenti az MMP9 expresszióját (első kísérletünk). Ezek a molekuláris célpontok gyulladással és ischaemiás kaszkádok részei, és diabéteszes szemekben is előfordulnak, amelyek alapján második kísérletünkben a HSP70 és az NFkB szerepét vizsgáltuk a BGP funkcionális retinoprotektív hatásában.

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

hozzájárulhat a kezelés funkcionális retinoprotektív hatásához.

Az előrehaladott glikációs végtermékek (AGE; advanced glycation endproducts) és a következményes fokozott oxidatív stressz és alacsony szintű gyulladás szintén a cukorbetegség vaszkuláris szövődményeinek hátterében áll. A HSP70 pedig képes gátolni ezeket a gyulladós folyamatokat az NFkB megkötésével, ezáltal csökkentve az NFkB-indukált iNOS expressziót és így csökkentve a reaktív oxigéngyökök (ROS) és peroxinitritek képződését. Ezen túl a HSP70 gátolja az NFkB és a tumor nekrozis faktor alfa (TNF α) aktivációját és transzlokációját is. Ez volt az oka annak, hogy ez a nukleáris faktor is vizsgálatunk célpontjává vált. Második kísérletünkben kapott Western blot eredményeink szerint a BGP-15 képes csökkenteni az NFkB expresszióját ZDF patkányok diabéteszes szemében, ami egy új eredmény. Ez összhangban van korábbi, SIRT1-gyel kapcsolatos megállapításainkkal (első kísérletünk): a SIRT1 fiziológiásan inaktiválja az NFkB-t és a PARP1-et; azonban cukorbetegségben a SIRT1 expressziója lecsökken, ami a diabéteszes szemben káros gének túlzott transzaktiválásához vezet, mint amilyen az MMP9, amely enzimről ismert, hogy részt vesz diabéteszes retinopátiában a mitokondriális károsodások kialakulásában. Korábban kimutatták, hogy az NFkB-függő gyulladás az endoteliális inzulinrezisztencia fontos kiváltó oka, és ennek a fehérjének a gátlása javítja az inzulin transzdukciós kaszkádját, és meghosszabbítja az egerek élettartamát. A mi kísérleteinkhez hasonlóan karotinoidekról bizonyították már, hogy jótékony hatást gyakorolnak a diabéteszes retinopátia kialakulására azáltal, hogy hatékonyan csökkentik az NFkB szintet streptozocin-kiváltotta diabéteszes patkánymodell szemében.

Meglehetősen általános megközelítés, hogy a HSP70 expressziója celluláris stresszben indukálódik, mely helyett a legfrissebb cikkek külön tanulmányozzák az extra- és intracelluláris HSP70-et (eHSP72 és iHSP72). Az előbbi a 70kDa-os hőszokkfehérje-család gyulladást elősegítő, utóbbi pedig gyulladásgátló indukálható formája. Így az összkép összetettebb, és mivel a

HSP70 és az NFkB hatnak egymásra, amint azt az előző bekezdésekben említettük, ezek egybevont tárgyalására van szükség. Cukorbetegségben, bár az iHSP72 szintje csökken, az eHSP72 szintje nő. Hipotézisünk az, hogy ezeknek a változásoknak az összegződése második kísérletünkben a diabéteszes ZDF állatok össz-HSP70 szintjének emelkedéseként jelenik meg. Mások bebizonyították, hogy a cukorbetegségben eltöltött hosszabb idő jobban megemeli az eHSP72-t, mint a rövidebb idő, és hogy az iHSP72 szint cukorbetegségben – kezelés nélkül – csökken, továbbá az is ismert, hogy az iHSP72 gyulladáscsökkentő hatását főként az NFkB-gátlás közvetíti. Így feltehetően ezek az okai annak, hogy második, hosszú kísérletünkben az össz-HSP70 szint is magas (az egészséges csoporthoz képest), valamint az NFkB szint is szintén magas a kezeletlen ZDF csoportban. Hipotézisünk az, hogy közvetve bebizonyítottuk, hogy a HSP70 ezen magas szintje a megnövekedett eHSP72-nek köszönhető, amit megerősít a magas NFkB eredményünk, az össz-HSP szint feltételezhetően magas e/i arányát mutatva. Emiatt néhány tanulmány egy ún. H-index (e/i arány) bevezetését is javasolta. A BGP-vel kezelt állatok szintén cukorbeteg, ZDF patkányok, így feltehetően ugyanolyan magas eHSP70-szinttel rendelkeznek, egy különbséggel. Itt még magasabb össz-HSP70 szintet látunk, sőt, ezzel párhuzamosan csökkent NFkB szint is megfigyelhető, és amint már említettük, az iHSP72 gyulladáscsökkentő hatását igazoltan elsősorban az NFkB-gátlás közvetíti. Mivel az NFkB szintek szignifikánsan csökkentek, ugyanakkor a teljes HSP70 szint emelkedett a BGP-vel kezelt csoportunkban a kezeletlen ZDF állatokhoz képest, úgy gondoljuk, hogy ez az össz-HSP70 növekedés feltehetően az NFkB-csökkentő, protektív iHSP72 szint növekedésének köszönhető. Második hipotézisünk tehát az, hogy közvetve bebizonyítottuk, hogy a BGP-15 megemeli a jótékony hatású iHSP72 szintjét, ami aztán az e/i arányt az iHSP72 felé tolja el, mivel képes volt csökkenteni az NFkB szintjét, ami az iHSP72-re jellemző. Második kísérletünkben ezen két, egymást erősítő hipotézisünk felállítását az tette

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

5. Összefoglalás

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

retinafunkció-károsító hatását.

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

6. Hivatalos publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

Jelölt: Wachal Zita

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,277

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

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

Debrecen, 2023.04.24.



7. Köszönetnyilvánítás

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

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Varga Balázs egyetemi adjunktusnak (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet), hogy kísérletes munkámat végigvezette, továbbá, hogy mindvégig támogatott a PhD-képzésem alatt és disszertációm írása közben is mindig iránymutatást adott, amikor kellett.

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

Köszönöm családomnak, férjemnek, Bélának, kislányaimnak, Zizinek, Jazinak és Hannának szerető támogatásukat!

Köszönöm barátaimnak a velük kikapcsolódással, feltöltődéssel eltöltött időt!

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