

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**DPP-4 INHIBITOROK ÉS INHOMOGÉN SZTATIKUS  
MÁGNESES TÉR, MINT 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

DPP-4 INHIBITOROK ÉS INHOMOGEN SZTATIKUS MÁGNESES TÉR, MINT A  
NEUROPÁTIÁS FÁJDALOM ÉS A GYULLADÁS ÚJ KEZELÉSI LEHETŐSÉGEI

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Ujhelyi Judit Ágnes okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszertudományok doktori iskolája  
(Farmakológia doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Pórszász Róbert, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora  
tagok: Dr. Balogh Zoltán, PhD  
Dr. Kemény Ágnes, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék  
könyvtára (Elméleti Tömb, 5. emelet)

2015. január 19. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Csiki Zoltán, PhD  
Dr. Sántha Péter, PhD

A bíráló bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora  
tagok: Dr. Balogh Zoltán, PhD  
Dr. Csiki Zoltán, PhD  
Dr. Kemény Ágnes, PhD  
Dr. Sántha Péter, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A”  
épület tanterme

2015. január 19. 13 óra

## 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.

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. 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. Az összes diabéteszes eset kb. 90%-át 2-es típusú diabétesz teszi ki.

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 glükoneogenezis (endogén hiperglikémia) is.

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 legköltségesebb szövődmény a neuropathia diabetica. 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 gyulladással járó betegségekben, és humán vizsgálatok is alátámasztották a gyulladáscsökkentő hatást.

A neuropátiás fájdalmak csillapításának egy alternatív lehetősége a gyógyszeres terápiák mellett a sztatikus mágneses tér (SMF) alkalmazása. 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. 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

### A hasnyálmirigy rövid anatómiai és szövettani jellemzése

A hasnyálmirigy (pancreas) retroperitoneális helyzetű elnyúlt mirigy, endodermális eredetű, a bélcső származéka. Különálló struktúrákhoz kötötten 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  $\alpha$ - és  $\delta$ -sejtek a perifériás részben, a  $\beta$ -sejtek a centrális részben helyezkednek el, míg az  $\gamma$ -sejtek mindenütt megtalálhatók. Az  $\alpha$ -sejtek glukagont, a  $\beta$ -sejtek inzulint, a  $\delta$ -sejtek szomatostatint, míg az  $\gamma$ -sejtek pankreatikus polipeptidet termelnek.

### Az inzulinszekréción szabályozó tényezők

A Langerhans-szigetek sejtjei közül a  $\beta$ -sejtek termelik a tápanyagforgalom szabályozásának középpontjában álló és gyógyszeres szempontból is kiemelkedő fontosságú inzulin hormont. Az inzulinszekréción befolyásoló legrégebben ismert alapvető stimuláns a vérplazma glükózsintjének emelkedése. A glükóz inzulinszekréción hatását közvetlenül a  $\beta$ -sejteken fejtik ki a GLUT-2 facilitatív glükóz transzporterén keresztül. 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  $\beta$ -sejtek inzulin szekréciónjára. 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 szájban érzett édes íz, valamint a táplálékfelvételi rituálé válthat ki.

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. Bélben történő felszabadulásának fő ingere a táplálékfelvétel, a bélbe kerülő szénhidrát közvetlenül stimulálja szekrécióját, szintje percek alatt megemelkedik. Habár a GIP glükóz függő inzulin szekréciót serkentő hatása kimutatható volt, bélnedvből eltávolítva annak inkretin hatása (inzulin szekréciót és  $\beta$ -sejt proliferációt serkentő,  $\beta$ -sejt apoptózist gátló hatás) megmaradt, ez további hasonló hatású peptidek jelenlétére utalt. A proglukagon gén klónozása és szerkezeti felderítése vezetett a második inkretin hatású peptid, a glukagonszerű peptid-1 (glukagon-like peptid-1, GLP-1) felfedezéséhez. 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 szekrécióját 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 pozícióban 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.

Az inzulinszekréciót gátló mechanizmus a hasnyálmirigy  $\delta$ -sejtjei által elválasztott szomatosztatin hatása. A szomatosztatin állandó gátló tónusával és inzulin illetve glukagon hatására erőteljesebb elválasztásával véd a túlzott inzulin és glukagon hatástól, csillapítja az ingadozások amplitúdóját. A  $\beta$ -sejteket gátló további mechanizmus stressz hatására indul be: a szimpatikus izgalom, az adrenalin és a noradrenalin a  $\beta$ -sejtek  $\alpha$ -receptorain hatva gátló hatású, ezzel megakadályozva vészhelyzet esetén a vér glükóz szintjének csökkenését.

## **2-es típusú diabétesz kezelési lehetőségei**

A 2-es típusú diabétesz orális antidiabetikus kezelését akkor kell elkezdni, ha az intenzív életmódkezelés (orvosi táplálkozási terápia és fizikai aktivitás) 6-8 hét elteltével sem biztosítják a kívánt glikémiás kontrollt, ilyen esetekben az elsőként választandó szer a metformin.

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

A nem inzulinotrop vagy antihyperglükemizáló 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. Ide tartozik a metformin is, mely az inzulin-receptor kötődést segíti elő főként a vázizomsejteken és a májsejteken. Csökkenti a glükóz bélből való felszívódását is, 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 inzulinszekréciónak serkenténék. A csoport forgalomban lévő képviselője a pioglitazon.

Az inzulinotrop 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  $\beta$ -sejtek ATP-függő  $K^+$ -csatornához kötődve fejtik ki, bezárva azokat, így depolarizálva a sejtet, ami a feszültségfüggő  $Ca^+$ -csatornák nyitására és gyors inzulinkirámláshoz vezet. Az inzulin szintézisét azonban nem befolyásolják, tehát hatásuk kifejtéséhez szükséges bizonyos mennyiségű inzulin megléte a  $\beta$ -sejtekben. Étkezési vér glükóz szabályozók vagy prandiális glükózregulátorok a meglitinid származékok: nateglinid és repaglinid. Ezeket a vegyületeket a szulfanil-urea származékokból fejlesztették, közvetlenül a  $\beta$ -sejtekre hatva fokozzák különösen a posztprandiális inzulin elválasztást.

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, inzulinszekréciónak és  $\beta$ -sejt proliferációnak 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, lépben, prosztatán, adipocitákon, aktivált limfocitákon és monocitákon is. Az enzim fő működése, hogy a fehérjéket az N-terminus felőli második aminosavnál rendkívül gyorsan hasítja, különösen alanint és prolint preferálva ebben a pozícióban. A DPP-4-nek az inkretin hormonok mellett számos egyéb potenciális szubsztátja 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. A legintenzívebben vizsgált gliptin vegyületek a sitagliptin és a vildagliptin. Mindkettőre jellemző, hogy kompetitív módon, reverzibilisen gátolják a keringő DPP-4 enzimet. 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. A máj nem vesz részt számottevően a vegyületek szervezetből történő eliminálásában, a veséknek azonban annál nagyobb jelentősége igazolódott. 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.

Az új irányelvek az életmód terápia és az orális antidiabetikus kezelés sikertelensége (HbA<sub>1c</sub>>7%) esetén akár már a sikertelen metformin-monoterápiát követően alternatív választási lehetőségnek tekintik az inzulin bázisinzulin formájában történő bevezetését. Ennek oka a  $\beta$ -sejtek kímélete valamint, hogy a jó anyagcsere állapot rövid időn belül beállítható vele, így megelőzhetők a szövődmények.

## **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 cerebrovascularis szövődmények és az alsó végtagi artériás keringési zavar következményei.

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. Kórlefolását befolyásoló tényezők a tartós hiperglikémia, hipertónia, szérumban lipid eltérések és a terhesség.

A nephropathia 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 kardiovaszculáris megbetegedések tekintetében is prediktív tényezőnek minősül. A mikroalbuminúria az általános vaszkuláris (endothel) károsodás jeleként értékelhető.

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 hypotensiót, erekcióképtelenséget. 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, ezáltal a legköltségesebb 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. 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 hiperalgézia (fokozott érzékenység fájdalmas behatásokra). A tünetek alapján a betegség könnyen felismerhető, a beteg alapos kikérdezése alapján a diagnózis gyanítható. Az ENG egy megbízható módszer az állapot követésére, amennyiben hozzáértő szakember végzi és értékeli a vizsgálatot. 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. Epidermális bőrbopsziával vizsgálható a kis, mielinhüvellyel nem rendelkező C-rostok érintettsége. A bőrbopsziát előnyösebb csupasz, szőrrel nem borított területről venni (tenyér, talp), mivel ott megfelelő a disztális mielinhüvellyel rendelkező rostok relatív mennyisége azok érintettségének vizsgálatához. A bőrbopszia 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. Már évekkel ezelőtt megfigyelték, hogy a fokozott glükóz kontroll különböző adatokat eredményez az 1-es és a 2-es típusú diabéteszes betegekben. A hyperglükémia 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.

A neuropathia diabetica kezelésére jelenleg nem áll rendelkezésre olyan gyógyszer, amely bizonyítottan stabilizálja vagy visszafordítja a panaszok háttérében álló patomorfológiai elváltozásokat: a mielinhüvely pusztulását vagy az axondegenerációt. 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. 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 GABA-analóg gabapentin és a pregabalin. 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. Az ópium-fájdalomcsillapítók ismert hatásukat placebo-kontrollált vizsgálatokban is bizonyították, ám alkalmazásukat hátráltatja a hozzászokás veszélye, a terápia folytatásának elutasítása és a visszaélés lehetősége. Oki terápiais lehetőségként tartják számon az  $\alpha$ -liponsav adását, melynek hatása antioxidáns tulajdonságaiból és glutathion-szint csökkentő képességéből eredhet. A polineuropátia egyes kóros paramétereit javítja a szintén oki terápiaaként alkalmazott hexóz út inhibitor benfotiamin is, ami B-vitamin-kombinációban érhető el a piacon. 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. Egyéb nem gyógyszeres kezelések (transzkután elektromos idegstimuláció, elektromágneses stimuláció, gerincvelő stimuláció, alacsony energiájú lézertérápia, masszázs, akupunktúra) is a vizsgálódások tárgyát képezik, mindezidáig azonban nem sikerült e módszerek egyértelmű hatékonyságát megfelelő klinikai vizsgálatokkal alátámasztani.

### **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. 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 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 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 SMF fájdalomcsillapító hatását meggyőzően alátámasztották László és mtsai vonaglasi teszt vizsgálatai: az egér hasüregébe juttatott irritáló anyag kiváltotta vonaglasi 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 vonaglasi tesztel mérhető hatása a hatás megszűnését követő 30 percig nem csökken 90% alá. 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 találtak, hogy a SMF fájdalomcsillapító hatását leginkább a  $\mu$ -, kisebb részben a  $\delta$ -opioid receptorok közvetítetik, míg a  $\kappa$ -receptorok részvételére nem találtak bizonyítékot. További, akut szomatikus/gyulladásos állatmodellekben igazolták a capsaicin-érzékeny rostok szerepét a fájdalomcsillapító hatás közvetítésében.

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

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **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 körülmények között, normál rágcsálótáphoz és vízhez szabad hozzáférést biztosítva tartottuk.

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 és a Helsinki Deklaráció ajánlásait.

#### **Sitagliptin és vildagliptin alkalmazása**

A sitagliptint és a vildagliptint (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.

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

#### **Allyl-isothiocyanate (AITC, mustárolaj) által kiváltott gyulladáisos 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 kereskedelembe 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.

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

## **Fül ödéma mérése**

A fül vastagságát 0,1 mm pontosságú mérnöki mikrométer (Oxford Precision, Leicester, Anglia) segítségével mértük. 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.

## **Neutrofil granulocita akkumuláció mérése**

A fagyasztott fül mintákat szobahőmérsékleten kiolvastottuk, aprítottuk, majd 0,5% HTAB (hexadecyltrimethylammonium-bromid, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) tartalmú 0,05 M kálium-foszfát pufferben homogenizáltuk, 1ml puffert használva fülenként. 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. 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, végső koncentráció 0,24 mM, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) tartalmazott. 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.

## **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, majd meghatároztuk a szövet festék tartalmát. A mért festékmennyiséget  $\mu\text{g}$ -ban adtuk meg a nedves szövet egységnyi tömegére (g) vonatkoztatva.

### **Krónikus arthritis modell**

A jobb oldali térdízületben krónikus arthritis kiváltásához a kísérleti egereket a következő módon kezeltük: 0,1 ml komplett Freund adjuváns injekciót adtunk a jobb oldali talp bőre alá, valamint a farok többe. A szisztémás hatás fokozása érdekében a kezelést követő napon megismételtük az injekció farok többe történő beadását. A kísérleti állatok kímélete érdekében rövid hatású általános érzéstelenítést végeztünk, melyhez 1:2 arányú oxigén/dinitrogén-oxid ( $\text{O}_2/\text{N}_2\text{O}$ ) közegben elosztatott 1%-os isoflurane-t (Abbott Laboratories, Budapest, Magyarország) használtunk.

### **Mechanikai ingerre adott fájdalom reakció mérése**

Az egér talp felületének mechanikai érzékenységet von Frey filamentum sorozattal (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 logaritmusos 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 nyomásérzékelési küszöböt, melyet az állat lábrázással vagy talpnyalással jelez. Ha a filamentum a leírt reakciók nélkül meggörbült, úgy sorra próbáltuk a következő keménységű szálakat.

### **Hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció mérése (Increasing hot plate test)**

Az egereket egy szobahőmérsékletéről lassan melegedő, 80 x 110 mm méretű, átlátszó oldalfalakkal (Plexi) határolt felületre helyeztük (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. Fájdalom reakció esetén az aktuális hőmérsékleti értéket rögzítettük és a műveletet termináltuk, reakció hiányában 50 °C-nál a szövetkárosodást megelőzendő a kísérletet leállítottuk.

Az eredményeket °C-ban adtuk meg.

### **Sztatikus mágneses tér kezelés**

Az inhomogén sztatikus mágneses tér (SMF) előállítására használt eszköz László és mtsai. fejlesztése. 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) tartalmazzak. 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. 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. A placebo kezelés során azonos körülmények között tartottuk az állatokat napi 30 percig mágneses térnek való kitettség nélkül.

### **Diabétesz modell**

A diabéteszt egyszeri 100, 150 vagy 200 mg/kg intraperitoneális streptozotocin (STZ, Tocris Bioscience, Bristol, Anglia) injekció adásával váltottuk ki. 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.



## **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

## **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

## **Statisztika**

A gliptin vegyületek mérési eredményeinek statisztikai elemzéséhez kétutas variancia-analízist (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 ábráztuk.

Statisztikai elemzéseinkhez az SMF hatásának vizsgálatánál egyutas variancia-analízist (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**

### **AITC által kiváltott gyulladásoos 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 ( $p < 0.05$  vs pozitív kontroll). A mustárolaj kezelés hatásának maximumát minden esetben az alkalmazást követő 2. órában tapasztaltuk.

### **Neutrofil granulocita akkumuláció mérése**

A pozitív kontroll csoportban (csak AITC kezelés, gliptin kezelés nélkül) a gyulladás kialakulását mutatják a 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. A sitagliptin kezelés szignifikáns eredményt hozott, minden alkalmazott dózisban gátolta a gyulladás kialakulását ( $p < 0.005$  vs pozitív kontroll). 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 ( $p < 0.01$  vs pozitív kontroll).

### **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 ( $p < 0.05$  vs negatív kontroll). A két gliptin közötti hatásbeli különbséget a magasabb dózisok alkalmazása során tapasztaltunk. A kontroll csoport eredményeihez viszonyított legkevesebbé szignifikáns különbséget a sitagliptin 1 mg/kg-os dózisa mutatta.

### **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. A sitagliptinnel és vildagliptinnel kezelt csoportok eredményei minden esetben szignifikánsan alacsonyabbak voltak a negatív kontroll csoport értékeinél ( $p < 0.001$  vs negatív kontroll). 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.

### **Hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció mérése (Increasing hot plate test) CFA-indukálta krónikus arthritisen**

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. Mind a sitagliptin mind a vildagliptin minden alkalmazott dózisa szignifikáns mértékben emelte a hőmérsékleti küszöbértékeket a pozitív kontroll csoport eredményeihez hasonlítva ( $p < 0.05$  vs pozitív kontroll). 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 ( $p < 0.05$  vs negatív kontroll).

### **Sztatikus mágneses tér hatása a testtömeg változására**

A diabéteszes egerek a 6. héten elhaltak, így azok vizsgálati eredményei eddig az időpontig állnak rendelkezésre. Az STZ előkezelést nem kapott csoportokban a SMF kezelés a testtömeg szignifikáns mértékű csökkenését látszott kiváltani, ezt azonban az ismételt, ellenőrző kísérlet nem támasztotta alá. A különböző dózisú STZ-vel kezelt egércsoportokban a 100 mg/kg STZ kezelési csoportokban a statikus mágneses tér hatása nem befolyásolta a kísérleti állatok testtömegének alakulását, a 150 mg/kg dózisú csoportban a mágneses tér szignifikánsan csökkentette ( $p < 0.0001$  vs 150 mg/kg STZ, no SMF), míg a 200 mg/kg STZ-vel kezelt csoportban kisebb szignifikancia szinttel ( $p < 0.001$  vs 200 mg/kg STZ, no SMF), de növelte az átlagos testtömeget.

### **Sztatikus mágneses tér hatása a vér glükóz szintjének változására**

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 ( $p < 0.05$  vs 200 mg/kg STZ, no SMF). 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.

### **Sztatikus mágneses tér hatásának mérése increasing hot plate tesztel**

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 ( $p < 0.01$ ), biológiai hatás mégsem egyértelmű, mivel az állatok korai elpusztulása miatt nem tudunk meggyőző mennyiségű adatot gyűjteni (az átlagos hőmérsékletek 44,22 °C és 43,15 °C). Az STZ-vel kezeletlen, egészséges csoport értékeiben nem volt megfigyelhető a mágneses tér hatása. A 100 mg/kg STZ-vel kezelt csoportok eredményeiben szintén kisebb szignifikancia szint adódott ( $p < 0.05$  vs 1 mg/kg STZ, no SMF), ám az e mögött álló biológiai hatás ebben az esetben is megkérdőjelezendő (43,54 °C és 43,26 °C átlagértékek).

## 5. MEGBESZÉLÉS

Az összes diabéteszes megbetegedés kb. 90-a a 2-es altípusba tartozik, melyre általában jellemző a szövődmények jelenléte már a betegség diagnózisakor. A leggyakrabban előforduló szövődmény, így a legköltségesebb diabéteszes társbetegség a diabéteszes neuropátia. A diabéteszes neuropátia jellemző manifesztációi az érzéskiesés, allodínia és hiperalgéria. 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.

Korábbi vizsgálatok leírták, hogy szív koszorúér betegségben és kontrollálatlan diabétesz mellitusban szenvedőknél a sitagliptin szignifikánsan javítja az endothel funkciót és a gyulladást, ami jelzi az indikációs spektrum szélesítésének lehetőségét. A mustárolajjal kiváltott gyulladástos modellben mindkét gliptin képes volt a gyulladás dóziszfüggő csökkentésére, de a sitagliptin hatékonyabb molekulának bizonyult ebben a mérésben. Ez a hatás azonban korábbi vizsgálatok szerint nem magyarázható sem a GLP-1 p38-MAPK szabályozó szerepével, sem a gliptinek a P-anyag metabolizmusára gyakorolt hatásával. 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 gyulladástos betegségek kezelésében.

Számos korábbi kísérletben vizsgálták a SMF hatását kísérleti állatok testtömegének alakulására, melyek többsége úgy találta, hogy a SMF testtömeget befolyásoló hatása nem

mutatható ki. Méréseinkben 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.

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. Összességében tehát megfigyeléseink szerint a napi 30 perces teljes test SMF kezelés az IL-1 $\beta$  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 $\beta$  szintjét, asszisztálhat az inzulin felszabadulásban, csillapíthatja a veleszületett immunitás kialakításában részt vevő sejteket, ekképpen csökkentheti a vér glükóz szintjét.

Korábbi vizsgálatok leírták, hogy STZ-vel kezelt egereknél a diabéteszes neuropátia kórfejlődésében az első szakaszt allodynia jellemzi, majd 3-4 hét elteltével előtérbe kerül a fokozatosan fejlődő hypaesthesia. 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

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 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.



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/10.3109/095553002.2010.518200>  
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 közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 4,289

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

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

Debrecen, 2014.10.29.

