

A reaktív aldehidek metabolizmusa 2-es típusú cukorbetegségben és ezek változása antidiabetikus kezelés hatására

Doktori értekezés

Dr. Kender Zoltán

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Reismann Péter, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Kökény Gábor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Nádas Judit, Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Cseh Károly, Ph.D., Ds.C., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hubina Erika, Ph.D., főorvos
Dr. Putz Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
I. Bevezetés.....	10
Irodalmi áttekintés	13
1.1 A cukorbetegség és klasszifikációja.....	13
1.1.1 1-es típusú cukorbetegség.....	13
1.1.2 2-es típusú cukorbetegség.....	13
1.1.3 Egyéb speciális diabéteszformák.....	14
1.1.4 Gesztációs diabétesz.....	14
1.2 A cukorbetegség késői szövődményei.....	15
1.2.1 Makrovaszkuláris szövődmények.....	15
1.2.2 Mikrovaszkuláris szövődmények.....	16
1.3 A cukorbetegség késői szövődményeinek kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok	18
1.3.1 Alternatív anyagcsereutak	18
1.3.2 Oxidatív stressz szerepe a cukorbetegség szövődményeiben.....	20
1.3.3 A diszlipidémia szerepe a cukorbetegség szövődményeiben.....	22
1.4 A metilglioxál és a késői glikációs végtermékek	23
1.4.1 Metilglioxál	23
1.4.2 A késői glikációs végtermékek.....	34
1.4.3 A metilglioxál metabolizmus és a késői glikációs végtermékek szerepe a cukorbetegségben	36
1.4.4 A dikarbonil stressz és glikációs folyamatok gátlása	38
1.5 A metformin szerepe a cukorbetegségben.....	40
1.5.1 A farmakokinetika és a hatásmechanizmus főbb aspektusai.....	40
1.5.2 A metformin lehetséges szerepe a késői szövődmények megelőzésében	41
II. Célkitűzések.....	43
III. Módszerek	45
I. A metformin reaktív metabolitok anyagcseréjére gyakorolt hatásának vizsgálata .	45
1. A vizsgálat felépítése.....	45
2. Vizsgált betegcsoport	45

3. Laboratóriumi vizsgálatok.....	46
4. Statisztikai módszerek	52
II. A metformin kezelés hatásának vizsgálata a lipid paraméterekre és a kardiovaszkuláris rizikóra.....	52
1. A vizsgálat felépítése.....	52
2. Vizsgált betegcsoport	52
3. Rutin laboratóriumi vizsgálatok és diagnosztika.....	53
4. Kardiovaszkuláris rizikó felmérése	53
5. Statisztikai analízis	54
III. Az argininben gazdag, zsírsavhoz kötött, ciklikus MG-kötő fehérje hatásának vizsgálata a MG plazma szintjére és a MG indukálta hiperalgéziára egerekben	54
IV. Eredmények.....	57
I. A metformin hatása a reaktív metabolitok anyagcseréjére	57
1. A vizsgálatban résztvevő betegek.....	57
2. Az életmódváltozás és metformin kezelés hatása a metabolikus paraméterekre	58
3. A metformin kezelés hatása a trióz-foszfát intermedierek képződésére	58
4. A metformin kezelés hatása a metilglioxál képződésére és a glioxaláz enzimrendszeren keresztüli metabolizmusára	59
5. A vérplazma D-laktát szintjének vizsgálata metformin kezelés során	61
6. Az N-Epsilon-(Carboxymethyl)-Lysine (CML) módosította fehérjék koncentrációjának változása a vérplazmában.....	61
7. A metilglioxál plazmaszintjének változását befolyásoló tényezők vizsgálata egyváltozós és többváltozós lineáris regressziós analízissel	62
II. A metformin hatásának vizsgálata a vérzsírértékekre és a kardiovaszkuláris rizikóra	63
1. A vizsgált betegcsoport	63
2. A vizsgált vérzsírértékek az egyes betegcsoportokban	64
3. A szív- és érrendszeri kockázatát befolyásoló tényezők vizsgálata lineáris regressziós analízissel.....	65
4. A szív- és érrendszeri kockázat vizsgálata	65
III. Az argininben gazdag, zsírsavhoz kötött, ciklikus MG-kötő fehérje hatásának vizsgálata a MG plazma szintjére és a MG indukálta hiperalgéziára egerekben	66
1. A metilglioxál plazmakoncentráció változása a CycK(Myf)R ₄ E fehérje hatására	66

2. A CycK(Myr) ₄ E fehérje hatásának vizsgálata a MG indukálta hiperalgéziára	67
V. Megbeszélés.....	68
I. A metformin hatása a metilglioxál és a késői glikációs végtermékek metabolizmusára 2-es típusú cukorbetegségben.....	68
II. A metformin kezelés hatása a vérzsírétekekre és a szív-és érrendszeri betegségek kockázatára 2-es típusú cukorbetegségben.....	72
III. Az argininben gazdag, zsírsavhoz kötött, ciklikus MG-kötő fehérje hatásának vizsgálata a MG plazma szintjére és a MG indukálta hiperalgéziára egerekben	74
VI. Következtetések.....	77
VII. Összefoglalás	78
VIII. Summary.....	79
IX. Irodalomjegyzék.....	80
X. Saját publikációk jegyzéke	112
I. A dolgozat témájában megjelent közlemények	112
II. A dolgozat témájától független közlemények	113
XI. Köszönetnyilvánítás	114

Rövidítések jegyzéke

ACCORD – Action to Control Cardiovascular Risk in Type 2 Diabetes

ACE – angiotensin-converting enzyme, angiotenzin konvertáló enzim

ACR – albumin-creatinin ratio, albumin-kreatinin arány

ADDITION – Anglo-Danish-Dutch Study of Intensive Treatment In People with Screen Detected Diabetes in Primary Care

ADVANCE – Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron MR Controlled Evaluation

AGE – advanced glycation end products, késői glikációs végtermékek

AKR – aldo-keto-reduktáz

AMO – amino-monooxidáz

AMP – adenzil-monofoszfát

AMPK – 5' AMP-activated protein kinase, 5' AMP-aktivált protein kináz

AP – alkalikus foszfatáz

ARE – antioxidant response element

Arg – arginin

ATP – adenzil-trifoszfát

BMI – body mass index, testtömegindex

CEL – carboxyethyl-lisine, karboxi-etil-lizin

CML – carboxymethyl-lisine, karboxi-metil-lizin

CO₂ – széndioxid

DBB - 1,2-diamino-4,5-dimethoxy-benzene

DCCT – Diabetes Control and Complications Trial

DDP-4 – dipeptidil peptidáz-4

DEMQ – 2-ethyl-3-methyl-6,7-dimethoxyquinoxaline

DETAPAC – dietilén-triamin-pentaecetsav

DHAP – dihidrox-aceton-foszfát

DMQ – 6,7-dimethoxy-2-methylquinoxaline

DNS – dezoxiribonukleinsav

DTT – dithiothreitol

EDIC – Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

EKG – elektrokardiogram

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ER – endoplazmatikus retikulum

ERK – extracellular-signal-regulated kinase

F-1,6-bis-P – fruktóz-1,6-biszfoszfát

F-6-P – fruktóz-6-foszfát

FADS – fatty acid desaturase, zsírsav-deszaturáz

FFA – free fatty acid, szabad zsírsav

G-6-P – glükóz-6-foszfát

GA3P – gliceraldehyd-3-foszfát

GAP – gliceraldehyd-foszfát

GAPDH – gliceraldehyd-foszfát-dehidrogenáz

GFAT – glutamin: fruktóz 6-foszfát amidotranszferáz

GFR – glomerulációs filtrációs ráta

GGT – gamma glutamil transzferáz

GLO-1 – glyoxalase-1, glioxaláz-1

GLO-2 – glyoxalase-2, glioxaláz-2

GLP-1 – glucagone-like peptide, glikagonszerű peptid

GLUT – glükóztranszporter

GOLD – glioxál-lizin dimér

GOT – glutamát-oxálacetát transzferáz

GPT – glutamát-piruvát transzferáz

GSH – oxidált glutation

GSSH – redukált glutation

HDL – high density lipoprotein, magas denzitású lipoprotein

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HESP – hesperetin

HIF1 α – hipoxia indukálta faktor 1 α

HMG-CoA – 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase

HPLC – high performance liquid chromatography

ICAM-1 – intercellular adhesion molecule 1

IL-6 – interleukin-6

IMPROVE-IT – IMProved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International

KCl – kálium-klorid

KOH – kálium-hidroxid

LADA – late onset autoimmun diabetes

D-LDH – D-laktát dehidrogenáz

LC-MS/MS – liquid chromatography + mass spectrometry, liquid kromatográfia tömegspektrometriával

LDL – low density lipoprotein, alacsony denzitású lipoprotein

Lys – lizin

MAP kináz – mitogen-activated protein kinase, mitogén aktivált protein kináz

MG – methylglyoxal, metilglioxál

MG-H1 – metilglioxál-hidroimidazon

MOLD – metilglioxál-lizin dimér

Myr – mirisztilsav

NADH – nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NF- κ B – nukleáris faktor kappa-B

NO – nitrogén-monoxid

NOS – NO-szintáz

Nrf2 – Nuclear factor erythroid2-related factor2

OH – hidroxil csoport

OCT – organikus kation transzporter

p38 – protein 38

PAI-1 – plazminogén aktivátor inhibitor

PARP – poli(ADP-ribóz)-polimeráz

pBMC – peripheral mononuclear cell, perifériás mononukleáris sejt

PKC – protein kináz C

PMAT – plazmamembrán monoamin transzporter

PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride (szerin proteáz inhibitor)

PPAR – poli(ADP-ribóz)-polimeráz

PUFA – telítetlen zsírsav

RAAS – renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

RAGE – receptor for AGE

Ras – Rat sarcoma protein, Ras fehérje

RBC – red blood cell, vörösvérsejt

RNS – ribonukleinsav

ROS – reaktív oxigéngyökök

SGLT-2 – sodium glucose transporter-2, nátrium-glükóz kotranszporter-2

SOD – superoxid-dizmutáz

SREBP1 – sterol regulatory element-binding protein 1

SSAO – szemikarbazid-szenzitív amin-oxidáz

TG – triglicerid

TGF- β – Transforming growth factor beta

TNF- α – tumornekrózis faktor alfa

TOR – target of rapamycin

TORC2A - TOR containing complex

TPI – trióz-foszfát intermedier

tRES – transz-resveratrol

TRPA1 – Transient receptor potential ankyrin 1

UDP – uridin-difoszfát

UKPDS – United Kingdom Prospective Diabetes Study

UPR – unfolded protein response

VADT – Veteran's Affairs Diabetes Trial

VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule 1

VEGF – Vascular endothelial growth factor, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

γ H2AX – foszforilált hiszton H2A

I. Bevezetés

A cukorbetegség alatt egy komplex, heterogén anyagcserezavart értünk, amely jelentős népegészségügyi szereppel bír, hiszen az újabb epidemiológiai adatok szerint a Föld lakosságának 9%-át érinti, és incidenciája folyamatos növekedést mutat (1). A cukorbetegség elsősorban a normális értéket tartósan meghaladó vércukorértékekkel jellemezhető, amelynek kóroki szerepe van az egyes szövődmények kialakulásában (2). A betegségnek két fő formáját különítjük el, az 1-es típusú cukorbetegséget, ahol az inzulin termelő sejtek autoimmun folyamat következtében történő irreverzibilis károsodása vezet az inzulinhiányos állapothoz, illetve a 2-es típusú cukorbetegséget, ami elsősorban az inzulinrezisztencia talaján kialakult anyagcserezavar, amelyhez a béta sejtek kimerülése illetve károsodása okozta relatív inzulinhiány társul. A 2-es típusú cukorbetegség esetében a szénhidrátanyagcsere zavarához egyéb tényezők, mint elhízás, szerzett vagy örökletes zsíryananyagcserezavar, hipertónia-betegség is gyakran társulnak, melyek tovább növelik a szív- és érrendszeri megbetegedések előfordulását (3). A cukorbetegség népegészségügyi és gazdasági vonatkozásainak tekintetében elsősorban a késői szövődmények játszanak szerepet. A késői szövődményeket feloszthatjuk a nagyereket érintő un. makrovaszkuláris szövődményekre, amelyek kiemelkedő szereppel bírnak a szív-érrendszeri megbetegedések és halálozás tekintetében, valamint az elsősorban mikrocirkulációt érintő, un. mikrovaszkuláris szövődményekre, amelyek közül a legfontosabbak a diabéteszes neuropátia, nefropátia és retinopátia (2). A kisérszövődmények következtében kialakuló diabéteszes láb szindróma, a sok esetben dialízishez vezető súlyos veseelégtelenség, a látás súlyos romlása (4), a szexuális diszfunkció (5) illetve a következményes depresszió (6) tovább rontják a betegek életminőségét, és kifejezett gazdasági teherrel járnak. A jelenlegi terápiás lehetőségek elsősorban a szénhidrátanyagcsere optimalizálására, a társuló hiperlipidémia, elhízás és hipertónia kezelésére irányulnak. Ezt egészítik ki az egyes szövődmények progressziójának mérséklésére (pl. ACE-gátlók albuminuria esetén), a kialakult szövődmények okozta állapotok kezelésére (pl. lokális szemészeti beavatkozások), illetve a tünetek enyhítésére irányuló kezelések (pl. neuropátia gyógyszeres terápiája) (7, 8). A cukorbetegség ellenőrzése során a szövődmények megelőzésére alkalmazott un.

„surrogate paraméterek”, mint vércukor, HbA_{1c} szintén a glükóz metabolizmusra helyezik a hangsúlyt (8). Ezzel szemben egy, a diabéteszes retinopátiában szenvedő 1-es típusú cukorbetegeket vizsgáló tanulmányban a betegek csupán 11%-ában volt a betegség kialakulása az emelkedett HbA_{1c} értékkel és a betegségtartammal magyarázható (9). Emellett bebizonyosodott, hogy a késői szövődmények kialakulására az intenzív életmódváltozás okozta testsúlycsökkenésnek nincs preventív hatása (10). Mindezek mellett megemlítendő, hogy a diabéteszes neuropátia klinikai megjelenése a betegség diagnózisát megelőzheti (11). A nagy esetszámot magukban foglaló, randomizált klinikai vizsgálatok egy része ugyan igazolta a vércukorcsökkentő kezelés preventív hatását egyes makro-és mikrovaszkuláris szövődményekre 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben (DCCT/EDIC, UKPDS), ugyanakkor későbbi vizsgálatok (ADVANCE, ACCORD, VADT) nem tudták egyértelműen igazolni az intenzív vércukorcsökkentő kezelés preventív hatását a késői szövődményekre illetve az ezek által okozott mortalitásra, sőt az ACCORD vizsgálat során az agresszív antiglikémiás kezelés mortalitást fokozó hatását észlelték (12-16). Ezen irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a hiperglikémia mellett egyéb mechanizmusok, illetve egyéni különbségek is lényeges szerepet tölthetnek be a késői komplikációk kialakulásában. Mindezek ismeretében rendkívül nagy az igény olyan kóroki folyamatok feltárására, amelyek lehetőséget teremtenek új, a szövődmények szempontjából is releváns „surrogate markerek” és új gyógyszeres kezelési lehetőségek kifejlesztésére, amelyekkel sikerrel gyógyíthatók vagy megelőzhetők a cukorbetegséghez társuló szövődmények. Ezen célhoz a glükózzetabolizmus zavarával összefüggő, azonban nem közvetlenül a hiperglikémiával összefüggésben álló folyamatok és anyagcseretermékek vizsgálata vezethet. Ezen anyagcseretermékek közé tartoznak az un. reaktív aldehidek, amelyek a reaktív oxigén speciosek (ROS - reaktív oxigéngyökök hatására képződő nagy reakcióképességű molekulák) és az un. krónikus glikációs végtermékek fokozott képződésén keresztül kiemelkedő szerepet játszanak a cukorbetegségben észlelt fokozott érrelmeszesedésben és az egyes szervspecifikus mikroangiopátiás szövődményekben (17). A legjelentősebbnek tartott reaktív aldehid a glikolízis során a trióz-foszfátokból képződő metilglioxál (MG) (18), amely többek között fehérjékkel történő reakciója során késői glikációs végtermékek képződéséhez vezet. A reaktív dikarbilok, köztük a metilglioxál emelkedett plazmakoncentrációját több vizsgálat is megerősítette (19-21), ahogy a reaktív aldehidek hatására képződő késői

glikációs végtermékek emelkedett szöveti koncentrációja is igazolódott diabéteszben, mind állatkísérletes modellben (22), mind humán vizsgálatok során (23, 24). Számos vizsgálat történt a reaktív aldehidek illetve glikációs termékek anyagcseréjének befolyásolását célzó molekulák (pl. ún. scavenger, azaz megkötő molekulák) kifejlesztésére, amelyek azonban ezidáig nem hoztak átütő eredményt a szövődmények megelőzésében, klinikai alkalmazásukra nem került sor (2).

A metformin a 2-es típusú cukorbetegség alapgyógyszere, amelynek jól ismert vércukorcsökkentő hatásán kívül egyes vizsgálatok felvetették a hosszú távú szív- és érrendszeri eseményekre gyakorolt pozitív hatását (25, 26). Emellett a metformin számos szisztémás és szerv specifikus pleiotróp hatásáról számol be az irodalom (27), amelyek pontos hatásmechanizmusa sok esetben azonban továbbra is tisztázatlan. Egyik fontos pleiotróp hatása a reaktív metabolitok metabolizmusának befolyásolása, hiszen a metilglioxál plazmaszintjének csökkenését igazolták metformin kezelésben részesülő 2-es típusú cukorbetegekben (28), ugyanakkor ezen hatásmechanizmus molekuláris hátterét ezidáig nem sikerült részleteiben feltárni. A makrovaszkuláris szövődmények egyik rizikófaktorának, a szérum koleszterin és LDL-koleszterin szintjére gyakorolt pozitív pleiotróp hatás szintén szerepet játszhat a metformin szövődményekre gyakorolt protektív hatásában (29, 30). A metformin lipidprofilra kifejtett hatásának megelőző szerepe a szív- és érrendszeri megbetegedések és halálozás tekintetében azonban továbbra sem egyértelmű.

Irodalmi áttekintés

1.1 A cukorbetegség és klasszifikációja

A cukorbetegség, vagy más néven diabétesz mellitusz egy komplex, heterogén betegségcsoport, amely krónikusan emelkedett vércukorértékekkel jellemezhető. Hátterében a szénhidrát és sok esetben az ehhez társuló zsír- és fehérjeanyagcsere komplex zavara áll (2). A betegséghez nagyon gyakran következményes szerv-, illetve szövethárosodások társulnak, amelyek nagyban rontják a betegek életminőségét (31). A diabétesz mellitusz jelenleg érvényben lévő felosztása a következő (3) (1. táblázat).

1.1.1 1-es típusú cukorbetegség

Az 1-es típusú cukorbetegsége a hasnyálmirigy un. β -sejtjeinek autoimmun folyamatok következtében vagy nagyon ritkán idiopátiásan bekövetkező irreverzibilis károsodása, végeredményben pusztulása jellemző. Ennek következtében a betegséget teljes inzulinhiány jellemzi, aminek megfelelően egyedüli gyógyszeres terápiaként az inzulinkezelés jön szóba. Megjelenése alapvetően fiatal korra jellemző, egyre gyakrabban jelentkezik azonban un. késői autoimmun diabétesz formájában (LADA- late onset autoimmun diabetes). Kialakulásának hátterében elsősorban genetikai és környezeti tényezők következtében kialakult kóros immunválasz kóroki szerepét feltételezik (32, 33).

1.1.2 2-es típusú cukorbetegség

A 2-es típusú cukorbetegség egy sokkal heterogénebb forma, kialakulásában elsősorban az inzulinrezisztencia és a társuló, illetve a következményes (inzulin hiperszekréció) károsodott β -sejtfunkció okozta relatív inzulinhiány játszik szerepet. A fejlett országokban a 2-es típusú cukorbetegség a leggyakoribb forma, az összes diabéteszes beteg kb. 85%-át tesz ki (2). Kialakulásában elsődleges szerepet a perifériás inzulinrezisztencia tölti be, amelynek hátterében számos környezeti, életmódbeli (un. nyugati diéta és következményes elhízás) és örökletes faktor állhat. Számos genetikai eltérés, génpolimorfizmus patofiziológiai szerepe is ismert ezen diabéteszforma megjelenésében (34). Az inzulinrezisztencia kiváltotta hiperinzulinémia a β -sejtek fokozott inzulintermeléséhez és idővel kimerüléséhez vezet (35). Az egyes életmódbeli és örökletes faktorok következtében a betegség gyakran társul más kórképekkel, mint magasvérnyomás betegség, elhízás és a zsíryanagcsere zavara, amelyeket összefoglaló

néven „metabolikus szindróma”-ként említ az irodalom (36), különálló entitásként történő elfogadása azonban továbbra is kérdéses (37).

1.1.3 Egyéb speciális diabéteszformák

Ebbe a csoportba azon formák tartoznak, amelyeknek ismert a kiváltó oka. Ide tartoznak a β -sejtfunkció és az inzulinszekréciónak a genetikai rendellenességei, az endokrin hasnyálmirigy károsodásával járó megbetegedések, diabéteszrel gyakran társuló endokrin kórképek, gyógyszer vagy toxikus hatás kiváltotta diabéteszformák, fertőző kórokozók kiváltotta β -sejtkárosodás, ritka immunológiai hátterű diabéteszformák és egyéb diabéteszrel társuló genetikai szindrómák (3). Ezen betegségcsoport kifejezetten heterogén és az összes diabétesz kevesebb mint 5%-át teszi ki.

1.1.4 Gesztációs diabétesz

Ezen diabéteszforma a terhesség során fiziológiásan is csökkenő inzulinérzékenység (elsősorban a placenta által termelt kontra-inzuláris hormonok hatása) következtében alakul ki azon terhesekben, akiknél a kompenzatórikus hiperinzulinémia nem elégséges a normális vércukorszint fenntartásához (38). Az összes terhesség kb. 7%-ában jelentkezik gesztációs diabétesz (3).

1. táblázat. A diabétesz mellitusz felosztása

1. 1-es típusú diabétesz mellitusz (teljes inzulinhiányhoz vezető β -sejt károsodás)
2. 2-es típusú diabétesz mellitusz (inzulinrezisztencia és társuló relatív inzulinhiány)
3. Egyéb speciális formák <ul style="list-style-type: none"> ➤ A β-sejtek működésének genetikai zavarai (pl. MODY 1-6) ➤ Az inzulinhatás genetikai zavarai ➤ Az exokrin pankréász betegségei (pl. gyulladás, tumor, cisztás fibrózis, hemochromatosis, trauma) ➤ Endokrin kórképekhez társuló diabétesz (pl. akromegália, Cushing-szindróma, Phaeochromocytoma) ➤ Gyógyszer indukálta diabétesz (pl. glükokortikoid, thiazid) ➤ Infekciók indukálta diabétesz (pl. CMV) ➤ Immun-mediálta diabétesz ritka formái (pl. inzulin-receptor ellenes antitest) ➤ Egyéb genetikai betegségek, amelyekhez gyakran diabétesz társul (pl. Down-, Klinefelter-, Turner-szindróma)
4. Gesztációs diabétesz

1.2 A cukorbetegség késői szövődményei

A cukorbetegség számos szövet és szerv károsodását okozza, amelyek előfordulása és súlyossága a betegség időtartamával növekedhet. A cukorbetegségekre jellemző érkárosodások alapján a késői szövődményeket elsősorban a nagyereket érintő ún. makrovaszkuláris szövődményekre és a mikrocirkulációt ért károsodás kiváltotta ún. mikrovaszkuláris szövődményekre oszthatjuk. Ezek mellett a cukorbetegséghez egyéb szövődmények is társulnak, mint szexuális diszfunkció, depresszió, demencia és az elmúlt években közölt diabéteszes tüdőfibrózis (5, 6, 39, 40), amelyek részletezése azonban meghaladja jelen értekezés kereteit.

1.2.1 Makrovaszkuláris szövődmények

A diabétesz mellitusz nagyereket érintő szövődményei alatt elsősorban a felgyorsult érlemezés okozta szív- és érrendszerei betegségeket értjük. Az ateroszklerotikus plakkok kialakulásában számos tényező szerepet játszik úgy, mint az érfalban kialakuló gyulladási folyamatok, majd ezt követően az adhéziós molekulák, immunsejtek, glikációs végtermékek letapadása, a bazális membrán megvastagodása és koleszterintartalmú monociták felszaporodása. Ezen folyamatok az ún. „fatty streak”, azaz zsíros csík megjelenéséhez vezetnek, amelyből a folyamat előrehaladtával komplex plakk, majd érszűkület alakul ki (2, 41). A halálozás szempontjából ezen szövődmények legjelentősebb megjelenési formái az iszkémiás szívbetegség és az agyi ereket érintő érlemezés, amelyek a szív- és agyi infarktushoz vezetnek. A szívet és az agyat érintő súlyos iszkémiás betegségek okozzák a diabéteszes betegek több, mint felének a halálát (42). Emellett nem elhanyagolható a perifériás verőérbetegség okozta komplikációk szerepe sem ezen betegcsoport morbiditásában és mortalitásában (2). Külön kiemelendő, hogy a cukorbetegség önálló rizikófaktora a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának (43). Mindezek alapján egyértelmű, hogy a makrovaszkuláris szövődmények jelentős népegészségügyi és gazdasági kihatással bírnak.

A makrovaszkuláris szövődmények kialakulásában az emelkedett vércukorszint mellett a komplex zsír- és fehérjemetabolizmust érintő anyagcserezavar szintén fontos szereppel bír. A zsíryanycsere szerzett vagy örökletes zavara (hiperlipidémia) a szív-érrendszeri rizikót tovább növeli (44, 45). Az ezen betegcsoportra jellemző egyéb állapotok, mint magasvérnyomás betegség, elhízás, mozgásszegény életmód, dohányzás tovább növelik

a kardiovaszkuláris kórképek és halálozás kockázatát. Több, nagy esetszámot magában foglaló tanulmány vizsgálta a vércukorcsökkentő kezelés hatását a szív-és érrendszeri betegségek kockázatára 2-es típusú cukorbetegségben, amelyek azonban nem tudták egyértelműen igazolni az intenzív vércukorcsökkentő kezelés makrovaszkuláris szövődményekre gyakorolt pozitív hatását (13-16), sőt az ACCORD vizsgálat során az agresszív vércukorcsökkentő kezelés mortalitást fokozó hatását észlelték (14). A UKPDS hosszú távú, 10 éves passzív követése kapcsán tudták először igazolni a kezdetben intenzív vércukorcsökkentő kezelésben részesülő betegek szívinfarktus kockázatának csökkenését (46). A zsíryanycsere zavarának gyógyszeres kezelése nagy rizikójú betegek körében sem bizonyult önmagában elégségesnek a kardiovaszkuláris halálozás primér prevenciójára (47). Az IMPROVE-IT vizsgálatban alkalmazott kombinált koleszterincsökkentő kezelés a halált okozó végpontok csökkentése nélkül mérsékelte a kardiovaszkuláris események előfordulási gyakoriságát (48). A 2-es típusú cukorbetegség körében elvégzett Steno-2 vizsgálat hozott csak igazi eredményt a szív- érrendszeri betegségek és általuk okozott halálozás tekintetében. Ennek során igazolták, hogy az intenzív, multifaktoriális kezelés (vércukorkontroll, thrombocita aggregáció gátlása, RAAS-gátló kezelés, antilipémiás terápia, dohányzás elhagyása, életmódváltozás) tudja eredményesen csökkenteni a kardiovaszkuláris kockázatot (49). Ezen eredmények alátámasztják a makrovaszkuláris szövődmények patomechanizmusának komplexitását és a több támadásponton történő kezelés alapvető fontosságát.

1.2.2 Mikrovaszkuláris szövődmények

A cukorbetegség kisereket érintő szövődményei számos szervrendszert érintenek, és jelentősen hozzájárulnak a cukorbetegség okozta egészségkárosodáshoz illetve életminőségromláshoz.

1.2.2.1 Diabéteszes vesekárosodás (nephropathia diabetica)

A diabéteszes nefropátia elsősorban a glomerulusokat érintő vesebetegség, amely a bazális membrán megvastagodásával, a glomerulusok fehérjeáteresztő képességének növekedésével jellemezhető. Klinikailag lassú progresszió jellemzi, kezdetben glomeruláris hiperfiltráció, fokozott albumin kiválasztás, majd proteinuria és a vesefunkció fokozatos romlása következik be (50). Kezelés nélkül évek alatt súlyos veseelégtelenséghez, halálhoz vezet. Kiemelkedő jelentőségét mutatja, hogy a dialízisre

szoruló betegek legnagyobb része diabéteszes nefropátia talaján kialakult végstádiumú vesebeteg, illetve a vesetranszplantáció indikációinak legjelentősebb hányadát is a cukorbetegség következtében kialakult végállapotú vesebetegség teszi ki (51). A krónikus vesebetegség ugyanakkor a szív- és érrendszeri szövődmények kialakulásának jelentős rizikófaktora, ezáltal járulva hozzá a makrovaszkuláris szövődmények okozta kardiovaszkuláris morbiditáshoz és mortalitáshoz (52).

1.2.2.2 Diabéteszes szemészeti szövődmények (retinopathia diabetica)

A diabéteszes retinopátia alatt az ideghártya cukorbetegségben kialakuló különböző elváltozásait értjük, amelyek súlyos esetben vaksághoz vezetnek (4). Ezen elváltozások az érfal károsodása okozta megváltozott átteresztőképesség, un. mikroaneurizmák kialakulása, kapillárisdegeneráció és retinális vérzés formájában jelentkeznek. Legsúlyosabb formája a proliferatív retinopátia, amely során un. neovaszkularizáció (érújraképződés) és makulaödéma alakul ki. Ebben a mikrocirkuláció zavara által kiváltott hipoxia okozta vaszkuláris növekedési faktorok fokozott termelődésének tulajdonítunk kóroki szerepet (53).

1.2.2.3 Az idegrendszert érintő szövődmények (neuropathia diabetica)

Az un. diabéteszes neuropátia változatos megjelenésű komplikáció, amely a cukorbetegség több mint felében, sőt egyes tanulmányok alapján 95%-ában megjelenik (54, 55). Megjelenési formája alapján szomatikus (szenzomotoros) és autonóm perifériás neuropátiát különíthetünk el, ugyanakkor egyes vizsgálatok a központi idegrendszert is érintő eltéréseket észleltek diabéteszben (56, 57). A szomatikus neuropátia megjelenhet szenzoros deficit, azaz érzéscsökkenés formájában, illetve spontán fájdalommal, paresztéziákkal. Kevert formában is jelentkezhet. Ezek mellett fájdalmas mononeuropátiák illetve radikulopátiák is gyakrabban fordulnak elő cukorbetegség körében. Az autonóm neuropátia során a kardiovaszkuláris, a gastrointesztinális és az urogenitális rendszer zavarai léphetnek fel. A neuropátia patomechanizmusában a mikrocirkuláció zavara mellett metabolikus tényezők is szerepet játszanak. A kiserek szintjén fellépő keringésszavar zavar okozta érzéskiesés, a makrovaszkuláris szövődmény következtében kialakuló csökkent végtagi vérellátás és a sebgyógyulás zavara az un. diabéteszes láb szindrómához vezetnek, amelynek következménye alsó végtagi amputáció is lehet (58).

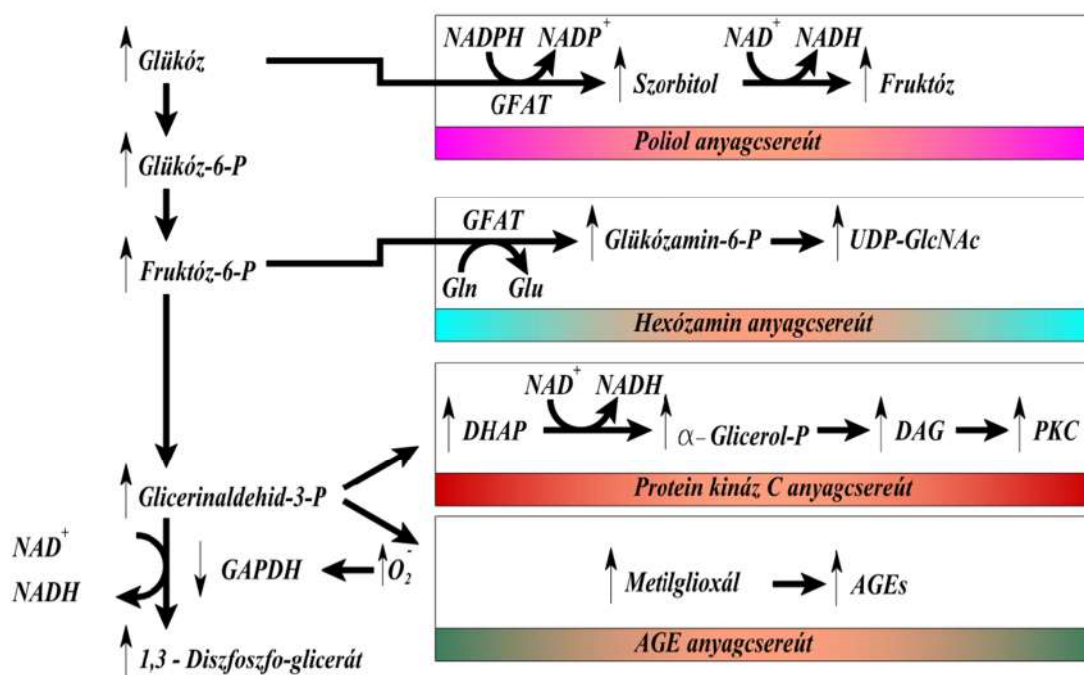
1.3 A cukorbetegség késői szövődményeinek kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok

A krónikus hiperglikémia több, egymással összefüggő patofiziológiai folyamatot indít be, ezáltal károsítva a sejtek, szövetek működését. Ezen molekuláris mechanizmusok jobb megértése vezethet a szövődmények kialakulásának részletesebb megismeréséhez, amin keresztül új prognosztikai (surrogate markerek) és terápiás lehetőségek tárulhatnak fel.

A késői szövődmények kialakulásában számos molekuláris, illetve sejtszintű mechanizmus szerepet játszik, amelyek közül doktori munkámban a hiperglikémia során felerősödő alternatív anyagcsereutak és az ezekkel szoros kapcsolatban álló oxidatív stressz, valamint a cukorbetegséghez gyakran társuló diszlipidémia szerepét emelném ki. Ezek mellett azonban említést érdemel az inzulinrezisztencia, a hipertónia kóroki tényezői és az egyre nagyobb hangsúlyt kapó genetikai és epigenetikai folyamatok.

1.3.1 Alternatív anyagcsereutak

A hiperglikémia következtében emelkedik a sejtekbe jutó glükóz mennyisége is, ami az inzulintól független glükóztranszporterrel (GLUT-1,- 2, -3) rendelkező sejtek (pl. idegsejtek, vörösvérsejtek, β -sejtek, endotélsejtek) esetében kifejezett mértékű lehet. A glükóz intracelluláris metabolizmusának folyamata a glikolízis, amelynek sebességmeghatározó enzime, a hexokináz nem tudja kellően kompenzálni a glükóztúlkínálatot. Emellett a fokozott sejtanyagcsere a mitokondriumok túlműködését okozza. A mitokondriális légzési lánc fokozott működése szuperoxid túltermeléshez vezet, ami a gliceraldehid-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) enzim gátlásával a glikolízis folyamatát tovább lassítja. A fokozott glükózkínálat következtében felszaporodó szuperoxid DNS-károsító hatásán keresztül aktiválja a poli(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP) enzimet, ami a DNS törések javításában játszik főszerepet. Fokozott aktivitása azonban gátolja a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz aktivitását. Ez a két folyamat (fokozott glükózkínálat és a GAPDH gátlás) vezet a sejtekben fiziológiásan is meglévő, de normális körülmények között alárendelt szereppel bíró alternatív anyagcsereutak aktiválásához, amelyek közül a legjelentősebbek a poliol anyagcsereút, a hexózamin anyagcsereút, a protein kináz C anyagcsereút és a metilglioxál és késői glikációs végtermékek képződésének folyamata (59, 60), amely utóbbi a doktori munkám alapját képezi, ezért ezen anyagcserefolyamatot külön fejezetben tárgyalom. Az alternatív anyagcsereutakat az 1. ábra mutatja be (60).



1. ábra. A hiperglikémia során a fokozott glükózkínálat és a mitokondriális légzési lánc túlműködése következtében felszaporodó szuperoxid által gátolt glicerinaldehyd-foszfát-dehidrogenáz hatására aktiválódó alternatív anyagcsereutak (Michael Brownlee nyomán (60)).

Poliol anyagcsereút

A poliol vagy más néven szorbitol anyagcsereút régóta ismert biokémiai reakció (61). A reakció első lépése a glükóz aldóz-reduktáz enzim általi szorbitollá alakítása, majd ezt követi a szorbitol fruktózzá alakulása a szorbitol-dehidrogenáz enzim segítségével. A fruktóz további átalakulások (glükóz-1-foszfáttá, majd glükóz-1,6-foszfáttá) után ismét a glikolízis folyamatába kapcsolódhat. Tekintettel arra, hogy az aldóz-reduktáz glükóz-affinitása lényegesen kisebb, mint a hexokinázé, ez a folyamat fiziológiás körülmények között alárendelt szereppel bír. A folyamat egyrészt a fokozott szorbitol és fruktóz termelés révén ozmotikusan okozhat károsodást a sejtekben, másrészt a folyamat során elhasznált NADPH a glutation szintézis zavarásával a sejtek egyik legfontosabb antioxidáns rendszerét károsítja. Ezenfelül a fruktóz szintén kiemelt szerepet játszik a késői glikációs végtermékek képződésében (59).

Hexózámin anyagcsereút

Ebben a reakcióban először a fruktóz-6-foszfátból képződik glükózamin-6-foszfát, majd ez több lépésen keresztül UDP N-acetilglükózaminná alakul. Ezen molekula szerepet játszik a fehérjék poszttranszlációs módosításában, sőt ezáltal olyan fehérjék károsodott működéséhez is vezet, melyeknek szerepe lehet az inzulin jelátvitelben. Emellett kimutatott, hogy hatására a PAI-1 és TGF- β expressziója fokozódik (2, 62).

Protein-kináz-C anyagcsereút

A glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz korábban részletezett csökkent aktivitása következtében a felszaporodó diacilglicerol fokozza a protein kináz C (PKC) aktivitását, amely számos gén expresszióját szabályozza. Többek között csökken az endoteliális nitrogén monoxid szintáz (NOS) aktivitása, és fokozódik a vazokonstriktor hatású endothelin-1 expressziója. A PAI, a TGF- β és a VEGF termelődése szintén fokozódik. Mindezen hatások hozzájárulnak a diabétesz mikrovaszkuláris szövődményeihez (63, 64). Emellett a PKC fokozott aktivitásának következtében a nukleáris faktor kappa-B fokozott aktivitását is megfigyelték, aminek komoly szerepe van a gyulladási folyamatokban, a β -sejtkárosodásban és a karcinogenezisben (65, 66)

Reaktív aldehidek (metilglioxál) és késői glikációs végtermékek (AGE)

A metilglioxál és más reaktív dikarbonilok a késői glikációs végtermékek felszaporodásához vezetnek. Ezen glikációs termékek számos módon részt vesznek a sejtek és szövetek károsodott működésében, receptorukhoz kapcsolódva számos jelátviteli utat és transzkripciós faktort aktiválnak (60, 67). A metilglioxál és AGE metabolizmust részletesen a következő fejezetben tárgyalom.

1.3.2 Oxidatív stressz szerepe a cukorbetegség szövődményeiben

A szabad gyökök olyan molekulák vagy molekularészletek, amelyek párosítatlan elektront vagy elektronokat tartalmaznak. Az elektronok párképzésre hajlamosak, ezért más molekuláktól vonnak el elektronokat. Ezen tulajdonságuk következtében rövid az életidejük és nagy a reakcióképességük. Ezen molekuláknak fontos fiziológiai szerepe van az immunrendszer működésében és számos jelátviteli szabályozó folyamatban (68). Sejtbiológiai szempontból a legfontosabb szabadgyökök az oxigén- (szuperoxid anion, hidroxil gyök, peroxid), nitrogén- (nitrogén-monoxid) és kéntartalmú szabadgyökök.

Az oxigén vízzé történő redukciója során számos szabadgyök képződik, ugyanakkor ezen folyamat következtében a szabadgyök által elvont elektron hatására további reaktív, nem gyök jellegű termék keletkezik, amelyeket összefoglaló néven reaktív oxigén fajoknak (ROS) nevezünk. Az oxigéntartalmú szabadgyökök és ROS molekulák képesek a sejtek makromolekuláival kölcsönhatásba lépve azok funkcióját károsítani. Ezen folyamatok közül a legfontosabbak: a zsírsavak oxidációja, amely során további reaktív oxigénvegyületek képződhetnek (láncreakció); a fehérjékkel történő reakció, amelynek következményeként többek között aminosavmódosulások, keresztkötések jöhetnek létre; a nukleinsavakkal való reakciók pedig DNS károsodást okozhatnak. A sejtekben képződő ROS-ek legfontosabb forrása a mitokondriális légzési lánc, melynek intracelluláris hiperglikémia okozta túlműködése a ROS termékek fokozott keletkezéséhez vezet (60, 69). Tekintettel a szabadgyökök és ROS-ek nagy reakciókészségére és károsító hatásaira, a sejtek saját védelmi rendszerrel rendelkeznek a ROS-ek hatástalanítására. Ebben legjelentősebb szereppel a szuperoxid dizmutáz bír, amely a szuperoxidot hidrogénperoxiddá alakítja, ami a kataláz enzim hatására vízzé alakul. Szintén fontos antioxidáns mechanizmus a redukált/oxidált glutation és a glutation peroxidázok működése, amelyek ugyancsak a hidrogén peroxid eliminálásában játszanak szerepet (68). A ROS-ek szerepe a cukorbetegségben komplex folyamat, direkt sejtkárosító hatásaikon túl a lipidperoxidáció (elsősorban az LDL-koleszterin oxidációja) folyamatával hozzájárulnak a fokozott érlemezéshez (70) és a DNS károsító hatásuk révén aktiválják a PPAR enzimet, amely a GAPDH gátlásával az alternatív anyagcsereutak felé tolja el a glükózmetabolizmust.

A nitrogén tartalmú szabadgyökök közül a nitrogén monoxid (NO) a legjelentősebb, amely a szuperoxid gyökökhöz képest kisebb reaktivitású. Nagyon fontos fiziológiás szerepe van az endotélsejtek működésében és a vazodilatációban. A szervezetben NO-szintáz (NOS) közreműködésével, L-argininből képződik. A NOS konstitutív (eNOS), valamint indukálható (iNOS) formái ismertek. Az indukálható forma működését a hiperglikémia fokozza, míg a mitokondriális szabadgyökök az eNOS aktivitását gátolják. A NO legjelentősebb hatása, hogy az erek simaizomzatára hatva vazodilatációt okoz. Ennek fontos szerepe van az érlemezés elleni védelemben. Ugyanakkor a reaktív oxigén vegyületekkel történő reakciói során peroxinitrit keletkezik (nitrozatív stressz),

ami károsítja a mitokondriális légzési lánc működését és a DNS-t, emellett redukálja a glutationt, ami az antioxidáns védelem gyengülését eredményezi (71).

Oxidatív stressznek azt az állapotot nevezzük, amikor az oxidatív és antioxidáns reakciók egyensúlya a szabadgyökös reakciók irányába tolódik el. A hiperglikémia hatására fokozódó szabadgyök és ROS képződés, illetve a részben ezek hatására csökkenő antioxidáns védelem tartósan fennálló oxidatív stresszhez vezetnek, aminek jelentős szerepe van a késői mikro- és makrovaszkuláris szövődményekben. Az oxidatív stressz egyrészt a már említett alternatív anyagcsere utak felerősödéséhez vezet, másrészt a reaktív aldehidek (metilglioxál) okozta fokozott fehérjeglikációs folyamatok következtében további szabadgyökök képződnek, harmadrészt a lipidperoxidáció és nitrozatív stressz kapcsán fokozott érlemezésedéshez vezet (72). Mindezen mechanizmusok mellett az oxidatív stressz számos intracelluláris jelátviteli folyamatot kórosan befolyásolva szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban, a sejtkárosodásban, az apoptózisban, illetve a tumorképződésben is (68).

1.3.3 A diszlipidémia szerepe a cukorbetegség szövődményeiben

A cukorbetegségben, elsősorban a 2-es típusban észlelt, gyakran metabolikus szindróma részeként jelentkező diszlipidémia a legjellemzőbb rizikófaktora a diabéteszhez társuló szív- és érrendszeri megbetegedéseknek. A cukorbetegségre jellemző diszlipidémia a magas triglicerid és a csökkent HLD-koleszterin szintet jelenti, amihez gyakran társul az LDL-koleszterin emelkedése is. A diabéteszre jellemző, hogy az LDL-koleszterint tartalmazó lipoproteinek kisebbek és nagyobb koncentrációjúak, mint nem cukorbetegekben. Ezek a részecskék jobban ki vannak téve az oxidatív stressz általi károsodásnak (73). Az oxidált LDL-koleszterin bejutva az endotélsejtekbe jelentős szerepet játszik az atheroszklerotikus plakkok képződésében, a plakkok fibrotikus átalakulásában és a plakkinstabilitásban (70). A csökkent HLD-koleszterin szint következtében az LDL-koleszterin oxidatív stressz elleni védelme csökken, tovább erősítve az atheroszklerózis folyamatát (73).

A makrovaszkuláris szövődményekben megfigyelt jelentősége mellett vannak adatok a diszlipidémia mikrovaszkuláris szövődmények patofiziológiájában betöltött szerepéről is. Kimutatták, hogy a diszlipidémia, elsősorban a hipertrigliceridémia szerepet játszhat a diabéteszes neuropátia kialakulásában illetve progressziójában (74). A diszlipidémia

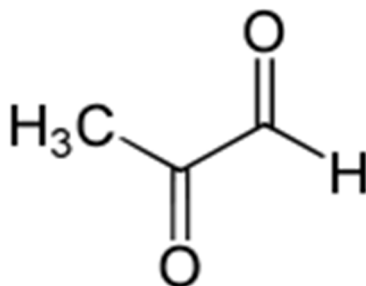
szerepét a diabéteszes nefropátia progressziójában is igazolták mind humán, mind állatkísérletes vizsgálatokkal (75, 76).

1.4 A metilglioxál és a késői glikációs végtermékek

A hiperglikémia okozta fokozott sejttanyagcsere során képződő reaktív oxigén gyökök mellett illetve következtében más reaktív molekulák felszaporodása is fontos szerepet játszik a szövődmények kialakulásában. Ezek közül kiemelkedő szereppel bírnak az enzimatis és nem-enzimatis reakciók során keletkező reaktív aldehidek és ketonok. Ezeket összefoglalóan karbonil termékeknek nevezik, a sejten belüli felhalmozódásukat pedig karbonil stressznek. A karbonil stressz kórélettani jelentőséggel bír a cukorbetegség mellett például egyes neurodegeneratív kórképek patofiziológiájában is (77, 78).

1.4.1 Metilglioxál

A reaktív aldehidek közül kiemelkedően fontos a glükóz függő α -dikarbonil molekula, a metilglioxál (MG). A metilglioxál (2-oxopropanal, pyruvaldehide, $C_3H_4O_2$) (2. ábra) egy fiziológiásan is képződő, erősen elektrofil α -oxoaldehyd, amelyet először 1887-ben állítottak elő (79). Több élelmiszerben (káv, tea, szója) és a dohányfüstben is megtalálható (80), az emlős szervezet különböző szöveteiben változó mennyiségben kimutatható (81). A metilglioxál reverzibilisen és irreverzibilisen kapcsolódik a lizin amino- és az arginin guanidin-csoportjával, illetve reakcióba lép a fehérjék szabad SH-csoportjával (82). A nukleotidok közül leginkább a guanin 2-aminocsoportjával lép reakcióba. Fenti kémiai tulajdonságaiból következik, hogy képes kapcsolódni az enzimek aktív centrumában található amino- és SH-csoportokkal, gátolva ezzel működésüket. A nukleinsavakkal való reakció folytán transzlációt gátló hatása is ismert (83).

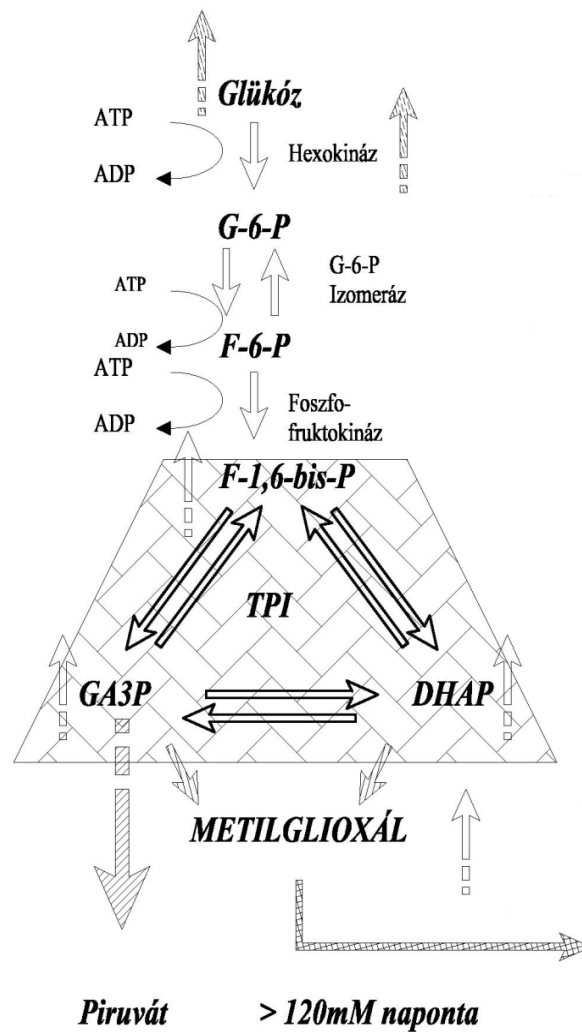


2. ábra. A metilglioxál molekula kémiai szerkezete

A metilglioxál a szervezeten belül mind enzimatikus, mind nem-enzimatikus reakciók során képződhet. Bizonyított, hogy cukorbetegségben a metilglioxál akkumulálódik a sejtekben (79). A MG felhalmozódása fehérje és nukleinsav károsodáson keresztül mutagenézishoz, apoptózishoz vezethet (78). A hasnyálmirigy β -sejtjeiben történő MG felhalmozódás hatására károsodik az inzulin szekréciója, aminek a cukorbetegség progressziójában van jelentősége (84). A MG ugyanakkor fontos prekuzora az előrehaladott glikációs végtermékek (AGE) képződésének, így a késői szövődmények és az öregedés egyik kulcsfontosságú molekulájának számít (85). A metilglioxál anyagcseréjében kiemelkedő szerepe van a MG felhalmozódás elleni védelmet jelentő glioxaláz enzimrendszernek, amely minden emlős sejt citoplazmájában megtalálható (79). Fiziológias körülmények között a sejtekben képződő reaktív oxoaldehidek lebontását ez az enzimrendszer végzi. A MG koncentrációja a különböző szövetekben általában alacsony, védve ezzel a sejt makromolekuláit a karbonil-stressztől.

1.4.1.1 A metilglioxál képződése

A metilglioxál legnagyobb mennyiségben a glikolízisben résztvevő trióz-foszfát intermedierekből (dihidroxiaceton-foszfát-DHAP, gliceraldehid-3-foszfát-GA3P) nem-enzimatikus úton keletkezik (86). A glükóz katabolizmusának első lépése a glikolízis, amely minden emberi sejtben lezajló folyamat. A glikolízis folyamatának első szakaszában a glükóz glükóz-6-foszfáton, fruktóz-6-foszfáton, majd fruktóz-1,6-bisfoszfáton keresztül triózfoszfáttá, a gliceraldehid-3-foszfáttá (GAP) és dihidroxiaceton-foszfáttá (DHAP) alakul át. A metilglioxál egy nem-enzimatikus folyamat révén a trifoszfát GAP-ról történő foszfát leválás során a dihidroxiaceton-foszfáton (DHAP) keresztül alakul ki. Megközelítőleg 120 μ M metilglioxál keletkezik naponta (ez a glukotrióz-flux 0,1%-a) (87). A metilglioxál képződés akkor fokozódik, amikor a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) enzim aktivitása csökken, például a hiperglikémia okozta fokozott oxidatív stressz, a sejtben belül felhalmozódó reaktív oxigéngyökök és egyéb szuperoxid-termékek káros hatása miatt. A csökkent GAPDH-aktivitás miatt a glikolízis nem a piruvát felé folytatódik, hanem a felgyülemelő anyagcsere-termékek a már említett alternatív anyagcsere-útvonalakba lépnek be (60). A glikolízis során a trióz-foszfátokból történő metilglioxál képződést a 3. ábra mutatja be.



3. ábra. A MG képződés nem-enzimatikus folyamata a glikolízis során a trióz-foszfát intermedierekből. G-6-P – gliceraldehyd-foszfát; F-6-P – fruktóz-6-foszfát; F-1,6-bis-P – fruktóz-1,6-biszfoszfát; GA3P – gliceraldehyd-3-foszfát; DHAP – dihidroxi-aceton-foszfát.

A nem-enzimatikus folyamat mellett a metilglioxál enzimatikus úton is képződhet. Az irodalmi adatok szerint az élettani körülmények között igen lassú enzimatikus metilglioxál képződés alárendelt szereppel bír a nem-enzimatikus folyamathoz képest (81, 84). A 4. ábra foglalja össze azokat az anyagcsere útvonalakat, amelyek metilglioxál képződéshez vezetnek.

1. A metilglioxál képződhet a trióz foszfátok (DHAP) enzimatikus degradációja következtében, melyet a metilglioxál-szintáz enzim katalizál (88). A reakció során

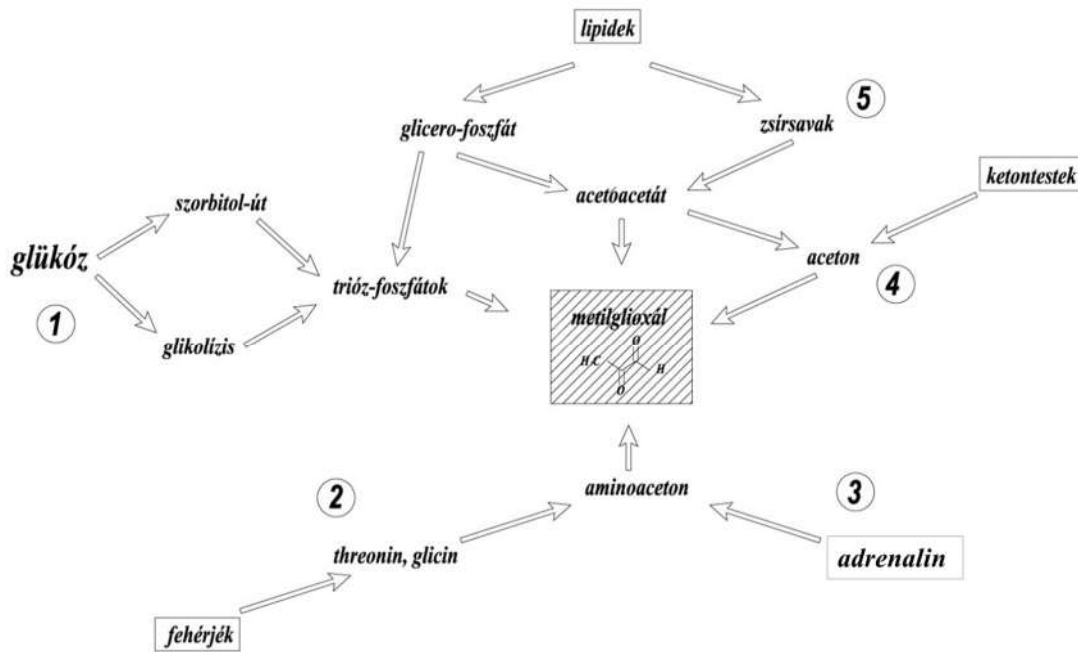
foszfát és víz képződik. Fiziológias körülmények között ez az enzimátikus út igen lassú és elenyésző mennyiségű metilglioxál képződéshez vezet. Ezen reakcióút szerepe diabetesben nem tisztázott.

2. A metilglioxál képződhet aminoacetontól a treonin lebontása során. A treonin egy esszenciális aminosav, azaz a humán sejtek nem képesek szintetizálni. A treonin a treonin-dehidrogenáz enzim által 2-amino-3-oxobutiráttá alakul át, amelyből ezt követően a 2-amino-3-ketobutirát-CoA-ligáz enzim segítségével glicin és acetyl-CoA képződik (89). Egy másik útvonal során a treonin spontán aminoacetonná alakul át. A metilglioxál az aminoaceton oxidációja kapcsán keletkezik. Egyes tanulmányok arra utalnak, hogy cukorbetegségben az aminoaceton képződés fokozott lehet (90).

3. A katekolaminok oxidatív deaminálása során metilamin képződik több közttermék mellett. Az adrenalin lebontása kapcsán keletkező metilamin a szérum-amin-oxidáz enzim által katalizált reakcióban aminoacetonná, majd oxidációt követően metilglioxállá alakul át. Cukorbetegségben, illetve krónikus stressz esetén kimutatták, hogy a deaminálási folyamat fokozódik, amelynek következménye a fokozott metilglioxál képződés lehet (91).

4. Ketontestképződés folyamán az acetoacetát dekarboxilációja aceton képződéséhez vezet, mely tovább alakul metilglioxállá (92).

5. A metilglioxál a lipidperoxidáció következményeként is képződhet, amelynek pontos mechanizmusa ma még nem teljesen ismert (93).



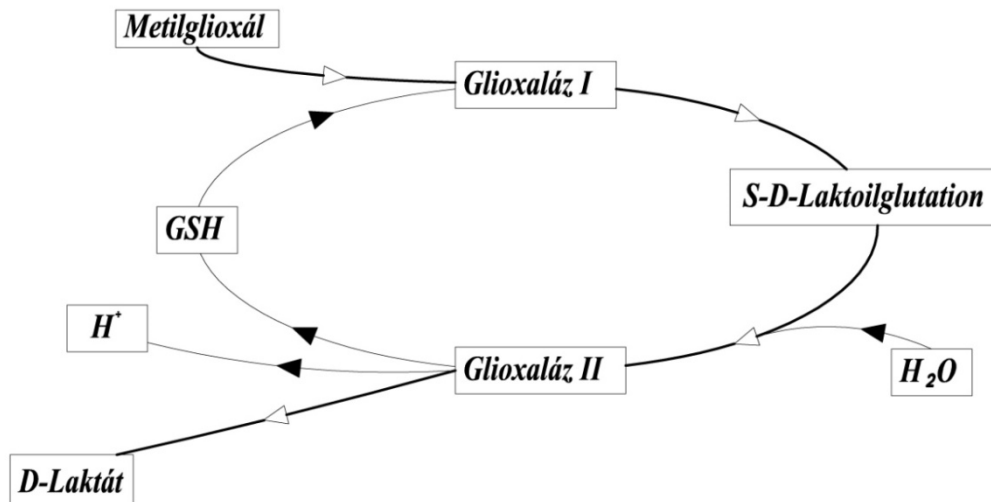
4. ábra. A metilglioxál képződésében szerepet játszó enzimatikus folyamatok. Az egyes folyamatok számozása a fenti szövegben történő felsorolás sorrendjére utal.

1.4.1.2 A metilglioxál metabolizmusa

A metilglioxál lebontását a glioxaláz enzimrendszer végzi, amely minden pro- és eukarióta sejt citoplazmájában jelen van. A glioxaláz rendszert 1913-ban fedezte fel Dalkin és Dudley, majd Lohmann 1932-ben mutatta ki, hogy a glutation esszenciális kofaktor a glioxaláz aktivitáshoz (81). A glioxaláz rendszer magában foglalja a thiolfüggő glioxaláz-I (GLO-I) és glioxaláz-II (GLO-II) enzimeket, valamint a glutationt, mint kofaktort (94). Az enzimkomplex része a sejtek reaktív aldehidekkel szembeni védekező rendszerének, emellett szerepe van az embriogenezisben és a sejtnövekedésben (79).

A glioxaláz rendszer a metilglioxál D-laktáttá történő átalakulását katalizálja S-D-laktoilglutation intermediéren keresztül. A reakció első lépését a citoplazmában lévő oxo-reduktáz GLO-I (laktoilglutation liáz) enzim katalizálja, amely a metilglioxált és a redukált glutation komplexet, a hemitioacetalt S-D-laktoilglutationná alakítja át. Ez a reakció a metilglioxál lebontás sebességmeghatározó lépése. A reakció második lépését a citoszolban és a mitokondriumban egyaránt megtalálható glutation-észteráz GLO-II (hidroxiacilglutation hidroláz) enzim végzi, amely hidrolizálja a tiolészter S-D-laktoilglutationt, így az D-laktáttá és glutationná bomlik (94, 95). A tejsav ezután a

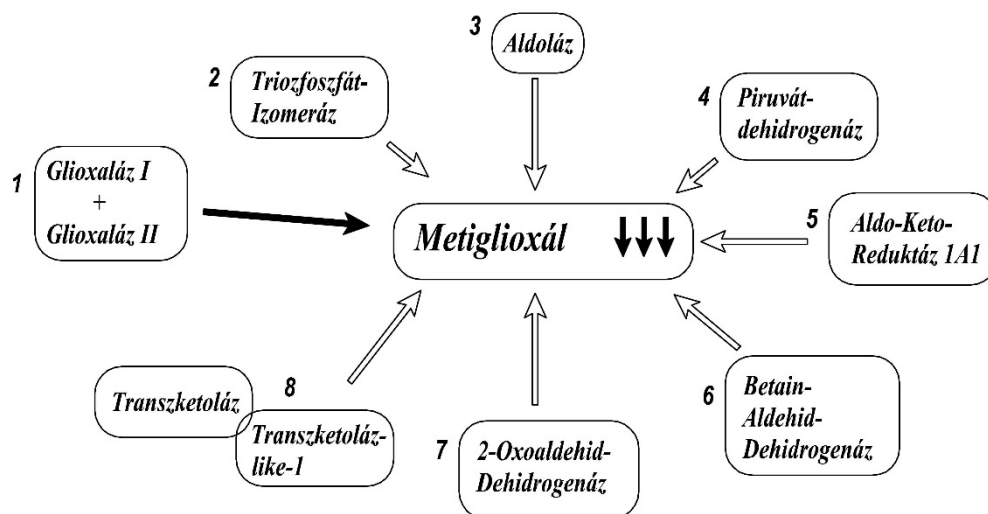
mitokondriumban piruváttá oxidálódhat. A glioxaláz enzim működését az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra. A glioxaláz enzimrendszer által katalizált reakció. GSH: glutation.

A legfontosabb glioxaláz-függő metilglioxál lebontási útvonal mellett számos nem glioxaláz-függő katabolikus útvonal is ismert, amelyeket a 6. ábra mutat be. Ezek közé tartozik az aldo-keto-reduktáz (AKR), amely a metilglioxált hidroxiacetonná (95%) és D-laktáldehiddé (5%) alakítja (96). Újabb adatok szerint az AKR aktivitás fokozódása glioxaláz 1 knock-out egerekben ($Glo1^{-/-}$) képes a streptozotocin indukálta diabétesz során felszaporodó metilglioxál katabolizmusát átvenni (97, 98). A metilglioxál-reduktáz által katalizált reakció során L-laktáldehid keletkezik. A metilglioxál acetyl-CoA-vá alakítását a piruvát dehidrogenáz enzim végzi (99). A betain-aldehyd-dehidrogenáz enzim is képes a metilglioxált piruváttá alakítani egy NAD-függő oxidáció során (100). Szintén piruváttá képes alakítani a metilglioxált a 2-oxoaldehyd dehidrogenáz enzim (101). Ezen metabolikus utak mellett még meg kell említeni a metilglioxál metabolizmusban szerepet játszó triózfoszfát izomeráz, a transzketoláz és a transzketoláz-like 1 enzim által katalizált útvonalakat is (100). Ezen metabolikus útvonalak kisebb jelentőségűek, egyrészt mert kevésbé specifikusak a metilglioxálra (elsődleges szubsztrátjuk nem a metilglioxál), másrészt az enzimeknek valamely kofaktorra van szükségük, amely limitáló tényezőként

szerepelhet. Mindezek ellenére szerepük nem elhanyagolható a hiperglikémia okozta fokozott metilglioxál képződés elleni védekezésben.



6. ábra. A metilglioxál katabolizmusában résztvevő enzimek

1.4.1.3 A metilglioxál felszaporodása cukorbetegségben

A metilglioxál képződéséhez vezető folyamatok cukorbetegségben

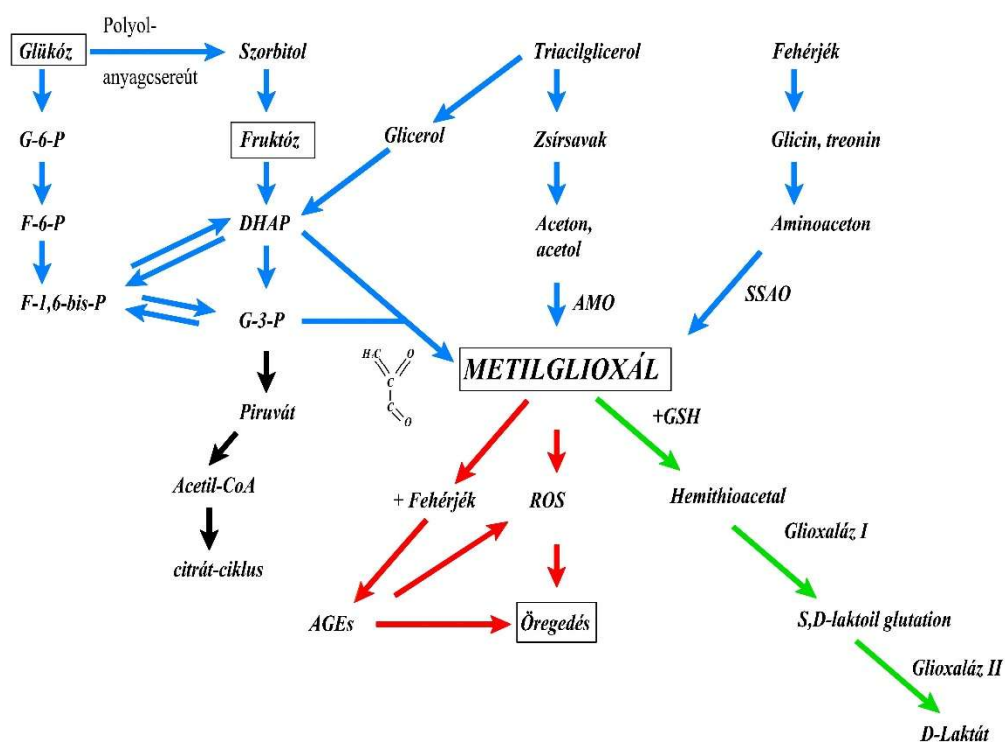
Cukorbetegségben illetve hiperglikémia során megnő a sejtek metilglioxál koncentrációja. Thornalley 1989-ben írta le a metilglioxál szint növekedését *in vitro* magas glükóz koncentráció mellett inkubált vörösvérsejtekben (102), majd Atkins és Thornalley kimutatta, hogy streptozotocinnal kiváltott diabeteses egerekben emelkedik a glioxaláz-I enzim aktivitása (103). Egy másik tanulmányban megfigyelték, hogy a diabeteses betegek plazmájának MG-szintje szignifikánsan emelkedett volt a kontroll csoporthoz képest (28), illetve a MG szintje tükrözte a glikémia (aktuális és krónikus vércukorszint) változását (104). Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a MG koncentrációja összefüggést mutat a HbA_{1c} szint emelkedésével (105). Hiperglikémia esetén mind glükózból, mind annak lebontásakor keletkező triózfoszfátokból fokozódik az α -ketoaldehidek képződése. Periodikus hiperglikémia során is kimutatták a MG és más reaktív aldehidek ill. az S-D-laktoilglutation felhalmozódását. A cukorbetegség patogenezisében jól ismert, NADPH-t igénylő szorbitol anyagcsereút szintén fokozza a triózfoszfátok és ezen keresztül a reaktív aldehidek termelődését (96, 100).

A felhalmozódó reaktív anyagcseretermékek károsítják a membránokat, lipidperoxidációhoz, fehérje glikozilációhoz vezetnek (106). A MG képződés elsősorban intracelluláris hiperglikémia hatására fokozódik, azonban kisebb mennyiségben képződhet ketontest illetve treonin lebontás során és lipidperoxidáció révén is. A treonin lebontás során fiziológiásan glicin és acetyl-CoA keletkezik, azonban alacsony CoA szinttel járó állapotokban, mint például diabéteszes metabolikus krízisállapotokban, amikor a CoA jelentős része acetyl-CoA formában van jelen, a treonin aminoacetáttá bomlik, aminek oxidációja révén MG keletkezik (107). A metilglioxál koncentrációja emelkedik trióz-foszfátokból történő glicerol képződés, valamint triglicerid lebontás és lipidperoxidáció következtében. A lipidperoxidáció során akkumulálódó köztitermékek felhalmozódását kimutatták a bőr fibroblast sejtjeiben és lymphoblastokban is. Mindezek mellett ez a folyamat feltételezhetően szerepet játszik az Alzheimer-kór patogenezisében és az érlemezésében is (108, 109).

A glioxaláz enzimrendszer csökkent működése cukorbetegségben

A metilglioxál lebontásáért felelős legfontosabb mechanizmus, a glioxaláz enzimrendszer működésének károsodása is MG akkumulációhoz vezet (78). A glioxaláz rendszer optimális működéséhez megfelelő mennyiségű redukált glutation (GSH) szükséges. Diabéteszben mind a hiperglikémia, mind az oxidatív stressz GSH deplációhoz vezet, amely a detoxifikáló glioxaláz rendszer csökkent kapacitását eredményezi (110). A fokozott metilglioxál képződés és a csökkent glioxaláz-1 enzimaktivitás együttesen vezetnek a cukorbetegségre jellemző dikarbonil stresszhez (111).

A metilglioxál cukorbetegségben történő felhalmozódásának legfőbb folyamatait a 7. ábra hivatott szemléltetni.

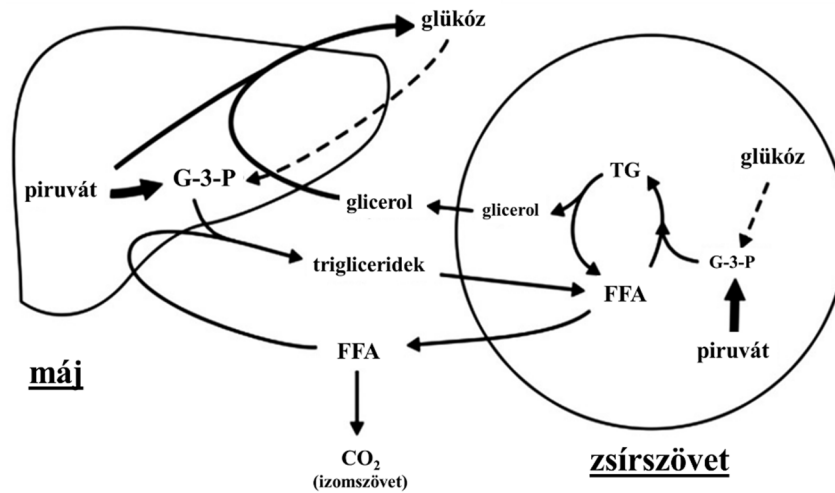


7. ábra. A metilglioxál felhalmozódás metabolikus útjai cukorbetegségben. ROS: reaktív oxigén species; AMO: amino-monooxidáz; SSAO: szemikarbazid-szenzitív aminoxidáz; GSH: glutation. Kék nyíl: MG képződés; zöld nyíl: MG detoxifikáció; piros nyíl: MG toxicitás; fekete nyíl: trióz-foszfátok fiziológias katabolizmusa.

1.4.1.4 A metilglioxál felszaporodása elhízásban

Kimutatták, hogy az elhízás során is fokozódik a reaktív aldehidek képződése, amelynek mértéke azonban nem éri el a manifeszt cukorbetegségben észlelt szintet. Túlsúlyos önkéntesek plazma metilglioxál szintje kb. 35 %-kal volt magasabb 2 hetes izokalóriás diéta után, mint a normális testsúlyúaké (112). Hasonlóan, túlsúlyos egerek szöveti MG szintjét szintén emelkedettnek találták (113). A fenti vizsgálatokból az is következik, hogy a karbonil stressz elhízás során nem elsősorban a bevitt táplálékkal áll összefüggésben. Ezt korábbi adatok is alátámasztják, amelyek a MG béllumenben történő fehérjékkel való kapcsolódásából eredően, annak csökkent bioaktivitását írták le (114). Az elhízás során fokozódó MG képződés hátterében a trigliceridszintézishez használt glicerol fokozott képződése állhat. A fokozott trigliceridszintézis során a szabad zsírsavak fokozzák a glicerolneogenezist, amelynek közttermékei a trióz-foszfátok, mint jól ismert

MG-prekursorok (115). A folyamat a máj és zsírszövet között zajlik: szabad zsírsav-triglicerid ciklus, aminek folyamatát a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra. Az un. szabad zsírsav-triglicerid ciklus, amelynek során a fokozott glicerolképződés a trióz-foszfátok, mint köztitermékek felszaporodásához vezet (115). FFA: free fatty acid – szabad zsírsav; TG: triglicerid; G-3-P: glicerinalehid-3-foszfát; CO₂: széndioxid.

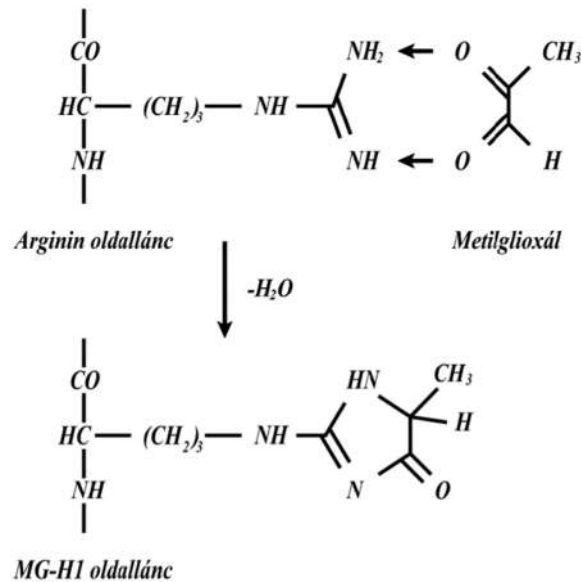
Az elhízásban észlelt fokozott metilglioxál képződésben ugyanakkor a szabad zsírsavak közvetlen szerepe is felmerült. Egy „*in vitro*” vizsgálatban a szabad zsírsavak hatására fokozott intracelluláris metilglioxál szintet észleltek (116).

1.4.1.5 A metilglioxálnak a makromolekulákat és a jelátviteli folyamatokat módosító főbb hatásai

A fehérjék módosítása

A MG több, mint 90%-a reverzibilisen kapcsolódik a sejtfehérjékhez (117), ugyanakkor kimutatták, hogy *in vitro* körülmények között a humán plazmához adott, jelölt MG 37°C-on irreverzibilisen is kötődik a plazmafehérjékhez (18). A MG kapcsolódik a fehérjék arginin, lizin és cisztein tartalmú részeihez, amelynek fontos szerepe van a MG indukálta AGE képződésben. A legnagyobb mennyiségben a szintén reaktív, azaz további AGE-termékek képződését indukáló metilglioxál-hidroimidazol (MG-H1) képződik (118) (9. ábra). A 3-DG-imidazolon, az *N* ϵ -karboxietil-lizin (CEL) és az *N* ϵ -karboximetil-lizin (CML), szintén, mint jól ismert glikációs végtermékek, a MG-fehérje interakció termékei

(117). A MG és glioxál emellett kapcsolódhat a keringő aminosavakkal, ezáltal aminosav-MG dimérek jönnek létre, melyek közül a MOLD (MG-lizin-dimér) és GOLD (glioxál-lizin-dimér) szerepe igazolódott az öregedésben és a diabétesz késői szövődményeinek kialakulásában (18).



9. ábra. A MG argininhez való kapcsolódásának folyamata, amelyből MG-hidroimidazon (MG-H1) származékok alakulnak ki (112).

Újabb adatok szerint a MG okozta fehérjemódosulások következtében helytelenül feltekeredett fehérjék aktiválhatják az ún. unfolded protein response (UPR) mechanizmust, ami egy stressz kiváltotta adaptív válasza az endoplazmatikus retikulumnak (ER) (111). Amennyiben ezen túlélési reakció nem képes a stressz feloldására, beindul a mitokondriális apoptózis folyamata (119).

A nukleinsavak módosulása MG hatására

A reaktív aldehidek szerepet játszanak a nukleinsavak glikációjában is. Az ennek során képződő termékeket „nucleotide advanced glycation endproducts” néven említi az irodalom (18). Metilglioxállal kezelt emlős sejtekben a DNS, az RNS és a fehérjeszintézis csökkenését találták (120). A metilglioxál sejtosztódást és növekedést gátló hatásának felismerése Szent-Györgyi Albert nevéhez fűződik (121). Később igazolódott, hogy a MG citotoxikus és koncentrációfüggően mutagén hatású. A leggyakoribb mutációk a több bázispárt érintő deléciók (50%) és a bázispár cserék (35%) (122), valamint a DNS-

glikáció mértékével arányosan a pontmutációk (123). Metilglioxál hatására a fehérje-DNS keresztkötések kialakulását is megfigyelték, amely a DNS-polimerázok kötőhelyénél kialakulva képes gátolni a DNS szintézist (124). Ezen eredmények alapján történtek kísérletek a metilglioxál daganatos betegségek terápiájában történő felhasználására is (125). A '70-es években történtek preklinikai, állatkísérletes vizsgálatok a metilglioxál tumorgátló, illetve tumorprogressziót mérséklő hatásáról, azonban a nem tumoros sejtekre kifejtett citotoxikus hatása miatt humán klinikai vizsgálat már nem történt (126, 127).

A metilglioxál hatása a jelátviteli folyamatokra

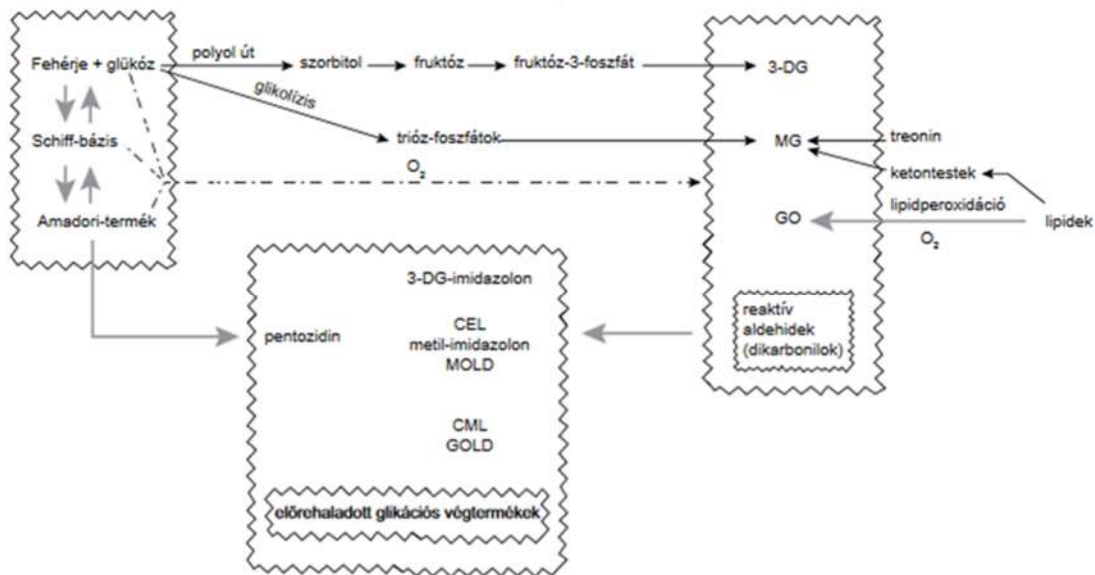
A metilglioxál indirekt és direkt hatásai a jelátvitelre nagyrészt a metilglioxál metabolizmust érintő folyamatokban mutatkoznak meg. Kimutatták, hogy izomsejtekben metilglioxál hatására dózis- és időfüggő módon gátlódik az aldóz-reduktáz képződése mind mRNS, mind fehérje szinten (128). Ezen hatás a p38 fehérje gátlásán keresztül történik, ami arra enged következtetni, hogy a MG hatása a MAP kináz jelátviteli mechanizmuson keresztül valósul meg. Egy eger fibroblaszt és humán embrionális sejteken végzett vizsgálat kimutatta, hogy metilglioxál expozíció hatására, a MAP kináz aktiválásán keresztül az IGF-1 mitogén hatása fokozódik (129). Egy másik vizsgálatban a metilglioxál által károsított albumin a TNF- α aktivitásának fokozódásán keresztül növelte a p38, az ERK (extracellular-signal-regulated kinase) és az NF- κ B aktivitását (130). Ez arra enged következtetni, hogy a fokozott ROS termelés és a TNF α szint emelkedése eredményezi az NF- κ B Ras függő aktivációját. Más jelátviteli folyamatokban is igazolták a metilglioxál károsító hatását, például endotélsejtekben fokozza a VEGF expresszióját, ami feltehetően a Ras és NF- κ B aktiváció következménye (131).

1.4.2 A késői glikációs végtermékek

Nem-enzimatis glikációnak vagy Maillard-reakciónak nevezzük azt a több lépésben zajló kémiai folyamatot, amely redukáló monoszacharidok és aminocsoportot tartalmazó molekulák (fehérjék, nukleinsavak, lipidek) között játszódik le. A folyamat eredményeként keletkező *késői glikációs végtermékeknek* (advanced glycation end products – AGE) kiemelkedő szerepet tulajdonítanak a cukorbetegség késői szövődményeinek patogenezisében (60).

1.4.2.1 A késői glikációs végtermékek forrásai

A klasszikus Maillard-reakció kezdő lépéseként redukáló cukormolekulák kapcsolódnak aminosavak és fehérjék szabad aminosóportjaihoz. Ennek során labilis Schiff-bázisok keletkeznek, melyek Amadori-termékeké alakulnak át, majd további reakciósorok után különböző AGE-termékek jönnek létre (132). E klasszikus reakcióút mellett számos más módon is képződhetnek glikációs végtermékek. Ezen járulékos reakcióutak találkozási pontjában az α -dikarbonilok állnak. A nem-enzimatis glikáció mind a klasszikus úton, mind pedig a dikarbonil anyagcsere-termékeken keresztül végeredményben AGE-termékek kialakulásához vezet (81). A HbA1c, amelyet a szénhidrát-háztartás ellenőrzésére rutinszerűen meghatároznak, is ennek a folyamatnak a terméke. A nem-enzimatis glikáció folyamatait a 10. ábra mutatja be.



10. ábra. A késői glikációs végtermékek képződésében szerepet játszó biokémiai folyamatok. 3-DG: 3-deoxiglukazon; MG: metilglioxál; GO: glioxál; CEL: karboxi-etilizin; MOLD: metilglioxál-lizin dimér; GOLD: glioxál-lizin dimér.

1.4.2.2 A késői glikációs végtermékek hatása a metilglioxál metabolizmusára

Feltételezhető, hogy a RAGE aktivációnak közvetlen szerepe van a GLO rendszer csökkent működésében (133, 134), ezáltal a metilglioxál katabolizmusának csökkenésében. Feltételezhető a RAGE mediálta GLO-I aktivitáscsökkenés kóros szerepe a diabeteses nefropátia kialakulásában és az MG kiváltotta neuronális

károsodásban (133). A folyamat azonban részleteiben még nem teljesen tisztázott. Endotélisejtekben magas glukózkoncentráció hatására fokozódik a RAGE, S100 gyulladáshoz kapcsolódó fehérjék expressziója, ami a GLO-1 túlzott expressziójának hatására normalizálódik (135).

1.4.3 A metilglioxál metabolizmus és a késői glikációs végtermékek szerepe a cukorbetegségben

A fokozott MG termelődés és csökkent lebontás (csökkent glioxaláz-1 expresszió) okozta dikarbonil stressz és a következményes felgyorsult glikáció együttesen járulnak hozzá a mikro- és makrovaszkuláris szövődmények kialakulásához. A két folyamat szerepe nehezen szétválasztható, hiszen az egyes kémiai és jelátviteli folyamatok több ponton kapcsolódnak, és egymás hatását erősítik. Sőt, egy közelmúltban megjelent közleményben a glioxaláz knock-out *Drosophila* vizsgálata során a glioxaláz-1 enzim hiányával előidézett emelkedett metilglioxál hatására a cukorbetegségre jellemző fenotípus kialakulását észlelték (136). Ebből azt a következtetést vonták le, hogy az emelkedett metilglioxál szint vezethet a 2-es típusú cukorbetegségre jellemző inzulin rezisztencia, hiperglikémia, emelkedett vérsírszintek kialakulásához.

Az utóbbi években igazolták, hogy mind 1-es, mind 2-es típusú cukorbetegségben az emelkedett metilglioxál szint összefüggésben áll a szív-és érrendszeri betegségek, illetve események incidenciájával (137, 138). 2-es típusú cukorbetegségben az emelkedett metilglioxál koncentráció a szív- és érrendszeri összhalálozáson felül a szívinfarktus és az alsó végtagi amputáció rizikóját fokozta (138).

Állatkísérletes adatok igazolták, hogy diabéteszben a fokozott glioxaláz-1 aktivitás preventív hatású a mikrovaszkuláris szövődményekkel szemben (139-142), ami szintén alátámasztja a metilglioxál szerepét a szövődmények kialakulásában. Ugyanakkor a glioxaláz-1 enzim csökkent expresszióját összefüggésbe hozták a koronáriabetegség kialakulásával, mert feltehetően a Glo-1 gén fontos regulátor szerepet játszik az érlemezés hátterében álló patomechanizmusokban (143).

Az előrehaladott glikációs végtermékek felhalmozódása központi szerepet tölt be a diabéteszes mikro- és makroangiopátia kialakulásában (144). Kimutatták, hogy cukorbetegségben a szérumban a AGE-szintje magasabb a nem cukorbetegkéhez képest (145, 146).

A MG indukálta AGE termékek mellett számos betegség patogenezisében részt vesznek, ilyen a hipertónia és bizonyos neurodegeneratív betegségek (pl: Alzheimer-kór). A különböző szervekben (szív, endotélium, vese, retina) felhalmozódó AGE-termékek károsítják azok működését (147, 148). Az AGE-termékek specifikus AGE-receptorokon fejtik ki hatásaikat, amelyek közül kiemelkedő szereppel bír az immunglobulin szupercsaládba tartozó RAGE (receptor for AGE) receptorok családja. Ezen RAGE receptorok számos különböző sejttípus felszínén megtalálhatóak, többek között az endotélsejtek, simaizomsejtek és monociták felszínén. Emelkedett RAGE expressziót találtak diabéteszes betegek endotélium és vaszkuláris simaizom sejtjein. Kimutatták, hogy az AGE-RAGE kapcsolódás tartós intracelluláris NF- κ B aktivitást vált ki, amely következményes proinflammatorikus citokin, valamint további RAGE képződéshez vezet (67, 135, 149). A MG indukálta AGE termékek gátolják az antioxidáns rendszerben részt vevő fehérjéket, ami további reaktív anyagok felhalmozódáshoz vezethet. Felismerték, hogy patkány aortában a glutation reduktáz és a glutation peroxidáz enzimek aktivitását szignifikánsan csökkentik a MG indukálta AGE termékek (150). A szuperoxid dizmutáz MG-AGE hatására történő aktivitás csökkenését is leírták, aminek jelentős szerepe lehet az intracelluláris antioxidáns védelem gyengülésében (151). A fehérjeglikáció és ennek következtében keletkező AGE-termékek, illetve a metilglioxál által közvetlenül károsított fehérjék maguk is szabadgyökképződést indukálnak (152, 153). MG hatására károsodnak a mitokondriális légzési lánc fehérjéi, illetve az AGE-RAGE jelátvitel a NADPH-oxidáz aktivitását fokozva ROS képződéshez vezet (154).

Az AGE felhalmozódás szerepet játszik az ateroszklerózis patogenezisében is. A vaszkuláris endotélium növekedési faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) mind a fiziológiás, mind a patológias angiogenezisben szerepet játszik. Kimutatták, hogy a MG akkumuláció növeli a VEGF szintjét, befolyásolva ezzel az angiogenezist. Az AGE termékek RAGE-közvetítette tartós NF- κ B aktiváción keresztül növelik a VCAM-1 expresszióját, amely fokozza a monocita migrációt az endotéliumba (155, 156). Az AGE termékek felhalmozódása az endotéliumban endotéliális diszfunkcióhoz vezet, amelynek fontos szerepe van a vaszkuláris szövődmények megjelenésében. Az AGE termékek emellett csökkentik a NO hatását. A metilglioxálról kimutatták, hogy a károsított plazmafehérjéken keresztül a makrofágokból TNF- α felszabadulást idéz elő, ezzel is hozzájárulva krónikus gyulladásra jellemző állapot fenntartásához (130).

A vesében megjelenő MG és AGE felhalmozódás vesekárosító hatású. Állatkísérletes modellben metilglioxál hatására magasabb kollagén szintet és vastagabb glomeruláris bazálmembránt észleltek (157). Diabéteses patkányokban szintén emelkedett AGE szintet találtak a veseszövetben (158).

Diabéteses retinopátia kialakulásában is feltételezhető a MG és a MG-indukálta AGE termékek szerepe. Streptozocinnal indukált diabéteszes patkányok retinájában emelkedettnek találtak a MG indukálta hidroimidazon szintjét (159). A MG-ból képződő CML jelenlétét kimutatták 2-es típusú cukorbetegség retinális ereinek falában, és a CML mennyisége összefüggést mutatott a retinopátia súlyossági fokával (160).

A diabéteszes neuropátia patogenezisében is számos vizsgálat kimutatta a metilglioxál és a következményes glikáció szerepét (161-163). A szenzoros neuronok egyes csoportjai a csökkent glioxaláz-1 expresszió következtében kifejezetten érzékenyek a metilglioxál okozta károsító hatásokra (164). A fájdalmas neuropátia patogenezisében az ioncsatornák poszttranszlációs változásainak szerepét igazolták (165, 166). A metilglioxál felhalmozódása a Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) kalcium csatornák fokozott aktivitáshoz vezet, amely fokozott fájdalomérzetet okoz (166). A metilglioxál emellett károsítja a Na_v1.8 nátrium csatorna szerkezetét, illetve inaktíválja a Na_v1.7 nátrium csatornákat, ami szintén hiperalgéziához vezet (165).

1.4.4 A dikarbonil stressz és glikációs folyamatok gátlása

Az utóbbi években több *in vitro* és állatkísérletes vizsgálat történt a reaktív metabolitok és a következményes késői glikációs végtermékek képződését vagy hatását gátló szerekkel (2, 167-170).

Az első szerek a reaktív metabolitok megkötésére irányuló, ún. scavenger molekulák voltak, amelyek prototípusa az aminoguanidine (171). Ez a vegyület a guanidin csoporton keresztül nagy határfokkal kötődésbe lépett a metilglioxállal és a glioxállal, ezáltal csökkentve a metilglioxál szintet (172). Állatkísérletekben ígéretesnek bizonyult az albuminuria és a diabéteszes retinopátia kezelésében (173-175). A NOS-ra kifejtett aktiváló hatásáról is beszámoltak, amely a vaszkuláris szövődmények megelőzésében játszhat fontos szerepet (176). Az ígéretes preklinikai vizsgálatokat követően, mind 1-es típusú, mind 2-es típusú diabéteszes betegekkel végeztek klinikai vizsgálatokat, amelyek

azonban nem váltották be a szerhez fűződő reményeket, sőt glomerulonefritist kiváltó hatása miatt az egyik vizsgálatot le is állították (177, 178).

A B-vitaminokkal és származékaikkal is folytak vizsgálatok a glikációs folyamatok megelőzésére. A B₆ vitamin, a piridoxamin és származéka a piridoxin hatékonyan gátolta a késői glikációs végtermékek képződését *in vitro* és állatkísérletes modellekben (179, 180) és csökkentette a késői glikációs végtermékek plazmaszintjét diabéteszes patkánymodellekben (181, 182). Ennek hátterében a fehérjék oxidatív degradációjának gátlását feltételezték (183). Klinikai vizsgálatok során azonban nem csökkentette az AGE-termékek (CML, CEL) plazmakoncentrációját sem az albuminkiválasztást (184). A B₁ vitamin, a thiamin és a szintetikus benfotiamin *in vitro* és állatkísérletes modellben gátolta a késői glikációs végtermékek képződését (185, 186). Hatásának hátterében a transzketoláz aktivitás fokozását feltételezik, ami a pentóz-foszfát anyagcsereúton keresztül csökkenteni tudja a reaktív metabolitok képződését (185).

A metformin a 2-es típusú cukorbetegség egyik alapgyógyszere, melynek metilglioxál csökkentő hatását igazolták diabéteszes betegekben (28), azonban ezen hatás háttere tisztázatlan maradt. A metforminnak a guanidin csoporton keresztüli scavenger funkcióját feltételezték, azonban ez a folyamat egy viszonylag lassú reakció (187), bár vizeletben kimutatható volt a metilglioxállal kötésben lévő metformin (188). Tekintettel arra, hogy a metformin doktori munkám egyik alappillére, hatásmechanizmusát a következő fejezetben tárgylom. Más vércukorcsökkentő szerekkel is történtek vizsgálatok a glikáció gátlása tekintetében, azonban komolyabb AGE-gátló hatást nem tudtak igazolni (189).

A dikarbonil stressz gátlásánál a lebontásban szerepet játszó glioxaláz enzimrendszer indukálása is terápiás célként szolgálhat. Túlsúlyos betegekben kimutatták, hogy a glioxaláz-1 expressziót fokozó transz-resveratrol (tRES) és hesperetin (HESP) kombinációjával (tRES-HESP) javítható az artériák dilatációja és csökkenthető az érfalban zajló gyulladáshoz vezető folyamat (csökkent endoteliális ICAM-1 szint) (190). A tRES-HESP hatására a glioxaláz-1 gén expressziójának és az enzim aktivitásának fokozódásával párhuzamosan a MG szint és a glikációs folyamatok csökkenését tapasztalták.

Egy szerről érdemes még említést tenni, az alagebriumról, amely az AGE-termékekkel való reakciója, és az azok által létrehozott keresztkötésekben létrehozott törések révén volt ígéretes, ezen hatást azonban *in vivo* nem tudták megerősíteni (191, 192).

1.5 A metformin szerepe a cukorbetegségben

A metformin az egyik legrégebben használt gyógyszer a cukorbetegség kezelésében, először 1957-ben alkalmazták (193). Gyakorlatilag a 2-es típusú cukorbetegség első vonalbeli terápiáját képezi (8, 194). Hatásmechanizmusával kapcsolatosan egyre több adat áll rendelkezésre, számos pleiotróp hatása ismert, azonban sok esetben továbbra is tisztázatlan a hatásmódja (27, 195).

1.5.1 A farmakokinetika és a hatásmechanizmus főbb aspektusai

Orálisan alkalmazott készítmény, i.v. adását követően plazma féléletideje 1,7-4,5 óra, nagy része a vizelettel ürül (kb. 90%) (196). Felszívódása nagyrészt a vékonybél aborális szakaszán történik, orális alkalmazás során plazma féléletideje 6,2 óra körüli, nem kötődik plazmafehérjékhez. Átjut a placentán (196). Szövetekbe, sejtekbe történő bejutásához speciális transzporterek szükségesek, a bélben a plazmamembrán-monoamin-transzporter (PMAT) a célszövetekben (izom, máj) pedig az organikus kation-transzporterek (OCT-1, OCT-3) segítségével jut a sejtekbe (197, 198).

Hatásmechanizmusának alapját a sejtek energia-homeosztázisát irányító AMPK-ra kifejtt hatása adja. Fiziológiásan az AMPK-t a sejtek ATP tartalmának csökkenése aktiválja, aminek hatására gátlódik az ATP lebontása, ami végeredményben a cAMP csökkenéséhez vezet. A májsejtekben történő aktivációja a glükoneogenetikus génexpressziót gátolja. Ezzel párhuzamosan az SREBP-1 expressziója gátlódik, ami a lipogenezis egyik kulcsenzime, így fokozódik a májsejtek zsírsavoxidációja. Ezen hatások mellett a glükoneogenezist serkentő TORC2A (TOR containing complex vagy mTOR) gátlása révén szintén a májsejtek glükóztermelését csökkenti (27). Az izomszövetben történő AMPK aktiváció a GLUT-4 glükóztranszporter működését fokozza, ami által fokozódik a sejtek glükózfelvétele. A hipotalamuszban ezzel ellentétben az AMPK-át gátló hatás érvényesül, amely az éhségérzet csökkenéséhez és ezáltal csökkent táplálékfelvételhez vezet (197-200). Ezen főbb hatások mellett a metformin számos pleiotróp hatásáról számoltak be, a teljesség igénye nélkül: fokozza a GLP-1 elválasztást, csökkenti a fibrinogén szintet, a PAI-1 szintjét, gátolja a trombocita-

aggregációt, a ICAM1 és VCAM1 adhéziós molekulák csökkent expresszióját váltja ki, a TNF α -NF- κ B rendszer gátlásával anti-inflammatórikus hatással bír (27, 201-203).

1.5.2 A metformin lehetséges szerepe a késői szövődmények megelőzésében

Mint a bevezetőben már említésre került, a nagy esetszámú klinikai vizsgálatok ezidáig nem tudták egyértelműen bizonyítani az intenzív vércukorcsökkentő kezelés késői szövődményeket megelőző hatását, sem a makrovaszkuláris, sem a mikrovaszkuláris szövődmények tekintetében (13, 14, 16). Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a szövődmények csupán kis százaléka hozható közvetlen összefüggésbe a glikémiás kontrollal (9). Ezzel szemben számos adat utal a metformin kezelés esetleges pozitív hatására a mikro- és makrovaszkuláris szövődmények kialakulásának megelőzésében, sőt daganatkialakulást gátló hatásairól is beszámoltak (29, 30, 204-206).

A metformin hatása a reaktív aldehidekre és a glikációra

Besisswenger és munkatársai a metilglioxál csökkent szintjét igazolták napi 1000 mg-t meghaladó metforminnal kezelt betegekben (16 %-os csökkenés a kezelést nem kapó csoporthoz képest) (28). Ezen hatást a metformin guanidin csoportot tartalmazó szerkezetével hozták összefüggésbe, amely képes a metilglioxál megkötésére (207). Ugyanakkor az aminoguanidinnel összehasonlítva jóval kisebb affinitással képes a metformin a metilglioxálhoz kötődni. Emellett kimutatták, hogy metilglioxál csökkentő hatásával párhuzamosan a metilglioxál katabolizmus végtermékének, a D-laktátnak a szintje emelkedést mutat (208), ami a metilglioxál detoxifikációjában játszott esetleges szerepét veti fel.

A metformin hatása a lipidek metabolizmusára

Az utóbbi években számos, a metformin terápiának a zsíryanycserére és a kardiovaszkuláris rizikóra gyakorolt hatását vizsgáló meta-analízis született egymásnak ellentmondó eredményekkel (29, 30, 209). Sok esetben a párhuzamosan folytatott antilipémiás kezelés nehezítette a metformin koleszterincsökkentő hatásának értékelését. Mindössze egy tanulmány vizsgálta célzottan a 2-es típusú cukorbetegségben a metformin kezelés metabolikus profilra gyakorolt hatását, amely vizsgálat a metformin kezelés LDL-koleszterin szintet csökkentő hatását támasztotta alá (30). Továbbá, egy közelmúltban megjelent meta-analízis a metformin kezelés lipidanyagcserére kifejtett

pozitív hatására hívta fel a figyelmet a testtömeg mérsékelt, ugyanakkor szignifikáns csökkentése mellett 60 év feletti, 2-es típusú cukorbetegség körében (210).

Feltételezhető, hogy a zsírsavanyagcserére gyakorolt hatásának háttérében szervspecifikus pleiotróp hatásmechanizmusok állnak. Egyrészt szerepe lehet a táplálkozási szokásokra gyakorolt központi idegrendszeri hatásának, amely a hipotalamikus AMPK gátló, illetve GLP-1 aktiváló hatáson keresztül csökkent éhségérzethez és következményes csökkent táplálékfelvételhez vezet (199, 200). Ugyanakkor a májsejtekben az AMP/ATP arány növelése következtében fokozott AMPK aktivitáshoz vezet, amely az SREBP1c transzkripciós faktor gátlásán keresztül csökkent zsírsav-deszaturáz-1 és -2 (FADS1 és -2) aktivitáshoz, a többszörösen telítetlen zsírsavak (például arachidonsav) és az LDL-koleszterin csökkent szintéziséhez vezet (30, 204, 205). Az arachidonsav és származékai egy közelmúltban megjelent tanulmány szerint jelentős szerepet játszanak a koleszterinanyagcserében (211). Egyes vizsgálatok a metformin epigenetikus hatását is alátámasztották, amelynek ugyancsak szerepe lehet az anyagcserére gyakorolt komplex hatásmechanizmusban (212, 213). Számos részlet azonban továbbra is tisztázatlan a metformin zsírsavanyagcserére gyakorolt molekuláris hatásmechanizmusában.

II. Célkitűzések

Munkám első részében a metformin kezelés hatását vizsgáltam a reaktív metabolitok képződésére, metabolizmusára, illetve egy vérplazmában is kimutatható késői glikációs végtermék, a CML plazmaszintjére frissen diagnosztizált 2-es típusú cukorbetegekben. Ezúton kívántam vizsgálni a metformin reaktív aldehidek metabolizmusára kifejtett hatását, amelynek az antiglikémiás hatás mellett szerepe lehet a cukorbetegség késői mikro- és makrovaszkuláris szövődményeinek megelőzésében.

Jelen munkám második fázisában a metformin terápia vérzsírértékekre és szív-érrendszeri kockázatra kifejtett hatását kívántam felmérni zsírsanyagcserét befolyásoló gyógyszeres kezelésben nem részesülő, 2-es típusú cukorbetegek körében.

Munkám harmadik részében az argininben gazdag ciklikus fehérje, a CycK(Myrr)R4E hatását vizsgáltam a MG plazmakoncentrációra és a MG indukálta hiperalgéziára állatkísérletes modellben.

Célkitűzéseim a következők voltak:

1. A reaktív aldehid, a metilglioxál plazmakoncentrációjának vizsgálata metformin kezelés hatására.
2. A glikolízis során képződő, és a reaktív aldehidek termelődésében szerepet játszó triózfoszfát intermedierek (GAP, DHAP, FDP) koncentrációjának változása vörösvérsejtekben metformin kezelés hatására.
3. A metilglioxál metabolizmusát végző glioxaláz enzimrendszer vizsgálata vörösvérsejtekben és perifériás mononukleáris sejtekben metformin kezelés hatására.
4. A glioxaláz enzimrendszer végtermékének, a D-laktát szintjének vizsgálata metformin kezelés során.
5. A reaktív metabolitok hatására képződő, vérplazmában is vizsgálható késői glikációs végtermék, a CML koncentrációjának változása metformin kezelés során.

6. A metformin terápia hatásának vizsgálata a szérum lipid paraméterekre statin és más lipidanyagcserére ható gyógyszeres kezelésben nem részesülő, 2-es típusú cukorbetegségben
7. A metformin kezelés hatása a becsült szív-érrendszeri kockázatra statin kezelésben nem részesülő, kardiovaszkuláris betegségben nem szenvedő, 2-es típusú cukorbetegség körében.
8. Az argininben gazdag, zsírsavhoz csatolt ciklikus fehérje, a CycK(My₄R)₄E, mint MG scavenger hatékonyságának vizsgálata egerek MG plazmaszintjének mérésével.
9. A MG-kötő CycK(My₄R)₄E fehérje hatása a MG indukálta hiperalgéziára egerekben.

III. Módszerek

Jelen vizsgálatok egy nemzetközi kooperáció keretén belül valósultak meg, amely a Semmelweis Egyetem II. számú Belgyógyászati Klinika és a Karls-Ruprecht Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika (Heidelberg, Németország) kutatólaboratóriuma és klinikai vizsgálatokat végző diabétesz ambulanciája (Clinical Study Center for Diabetes Research) között jött létre.

I. A metformin reaktív metabolitok anyagcseréjére gyakorolt hatásának vizsgálata

1. A vizsgálat felépítése

Prospektív, egykarú obszervációs vizsgálat.

2. Vizsgált betegcsoport

Vizsgálatunkba 12 frissen diagnosztizált, rossz szénhidrát-anyagcseréjű, 2-es típusú cukorbeteg került bevonásra a Semmelweis Egyetem II. számú Belgyógyászati Klinika beteganyagából. A vizsgálatban résztvevő betegek kivétel nélkül írásban egyeztek bele a klinikai vizsgálatba a Helsink Deklaráció irányelveinek megfelelően. A klinikai vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte.

A vizsgálat időtartama 24 hét volt.

Beválasztási kritériumok:

- frissen diagnosztizált, eddig nem kezelt 2-es típusú cukorbetegség;
- 18 év feletti életkor;

Kizárási kritériumok:

- egyéb diabétesz típusok;
- terhesség illetve szoptatás;
- ismert malignus betegség;
- rendszeres alkohol- vagy drogfogyasztás;
- szisztémás glükokortikoid kezelés;
- ismert autoimmun betegség;

- ismert vese- vagy májbetegség;
- metformin érzékenység, intolerancia vagy kontraindikáció.

A 2-es típusú cukorbetegség diagnózisa a Magyar Diabétesz Társaság 2009. évi szakmai ajánlásában foglaltak szerint történt.

Gyógyszeres kezelés: az akkori szakmai ajánlásoknak megfelelően a bevásztott betegek esetében általános életmód és diétás tanácsok mellett az ajánlott maximális terápiás dózisú metformin kezelést vezettünk be, melyet 24 hétig folytattunk. A gyógyszer kezdő dózisa 2x500 mg, amelyet egy hét után 2x1000 mg-ra emeltünk. A vizsgálat során dózismódosítás nem történt. Orvosi vizitre, diétás tanácsadásra és a szénhidrát anyagcsere kontrolljára 4 hetente került sor.

A metabolikus státusz megítélése céljából a betegek antropometriai adatai, mint testmagasság (cm), testtömeg (kg) és az ezen paraméterekből számított BMI rögzítésre került. A vizsgálat kezdetén részletes anamnéziszfelvétel, általános fizikális vizsgálat történt, kiegészítve hangvilla és monofilament tesztekkel a diabéteszes neuropátia megítélése céljából.

Minden beteg esetében a 4 hetente történő vizitek alkalmával éhgyomri vércukorellenőrzés, testsúlymérés, orvosi megbeszélés (gyógyszer tolerancia, illetve adherencia felmérése) és életmódbeli tanácsadás történt. A vizsgálat kezdetén és végén kiterjesztett éhgyomri vérvétel történt, amelyek feldolgozása közvetlenül a vérvételt követően megtörtént. A rutin laboratóriumi vizsgálatok (vércukor, HbA_{1c}) a Semmelweis Egyetem Központi Laboratóriumában történtek standardizált körülmények között.

3. Laboratóriumi vizsgálatok

3.1. A véralkotóelemek izolálása

A reaktív aldehidek anyagcseréjének vizsgálatához a vérminták elsődleges feldolgozására a SE II. sz. Belgyógyászati Klinika Molekuláris Biológiai, valamint Endokrin Laboratóriumában került sor. Ennek során a vérvételt követően a vérminták azonnal feldolgozásra kerültek, az egyes munkafázisok között a vérminták jégen tartásával lehetett biztosítani a később vizsgálni kívánt metabolitok stabilitását. A metilglioxál és a késői glikációs végtermékek szintjét a vérplazmában kívántam vizsgálni, ahol nincsenek jelen a metilglioxál lebontásáért felelős enzimrendszerek. A metilglioxál intracelluláris

képződésében szerepet játszó trióz-foszfát intermedierek koncentrációjának vizsgálatára a vörösvérsejteket választottam, hiszen ezen sejtekben az inzulintól független transzporterrel keresztül (GLUT-1) felvett glükóz gyakorlatilag közvetlenül a glikolízis folyamatába lép, amelynek köztitermékei így könnyen vizsgálhatóak. A metilglioxál metabolizmusát a glioxaláz enzimrendszer működésén keresztül vizsgáltam. Ehhez a glioxaláz-1 és -2 enzimek aktivitását mértem vörösvérsejtekből és perifériás mononukleáris sejtekből.

Ezen vizsgálatok elvégzéséhez a következő minták izolálását végeztem:

- A perifériás mononukleáris sejtek (pBMC) izolálását EDTA-val antikoagulált teljes vérből végeztem (214). 10 ml teljes vér óvatos limfocita izoláló oldatra (Lymphocyte Separation Medium, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) történő rétegzését, majd centrifugálását (30 perc, 1200 rpm, 4°C, fék kikapcsolása mellett) követően a mononukleáris sejteket tartalmazó gyűrű (buffy coat layer) óvatos aspirációját végeztem el. Az ezt követő mosási fázisok (3 alkalommal 50 ml 0,9%-os NaCl oldattal történő mosás, majd centrifugálás) után a sejteket lizáló (cell lysing buffer: 10 mM HEPES-KOH, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF, pH: 7,9, 0°C) oldattal reszuszpendáltam, majd -80 °C-os fagyasztóban tároltam.
- Vörösvérsejtek izolálása EDTA-val antikoagulált teljes vérből (10 ml) történt, amely során a centrifugálást (30 perc, 1200 rpm, 4°C) követően vörösvérsejtfraakció azonnali aspirációját végeztem, a minták tárolása ez esetben is -80°C-on történt.
- Vérplazma izolálását szintén EDTA-val antikoagulált teljes vérből végeztem a vörösvérsejt izolálás során alkalmazott centrifugálást követően aspirációval, majd a minta szállításig -80°C-os fagyasztóban tároltam.

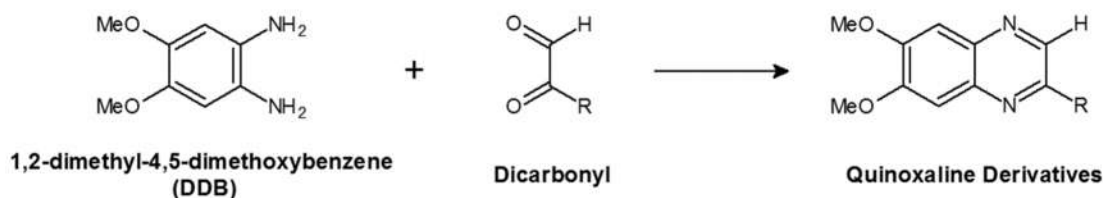
A fent részletezett módon izolált perifériás mononukleáris sejteket, vörösvérsejteket és plazmafrakciókat további laboratóriumi feldolgozását a Karls-Ruprecht Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika (Heidelberg, Németország) kutatólaboratóriumában végeztem. A minták szállítása a heidelbergi laboratóriumba biológiai mintákat is szállító cég segítségével történt. A szállítás során a minták hűtése szárazjég segítségével történt.

3.2. Reaktív metabolitok és anyagcseretermékek vizsgálata

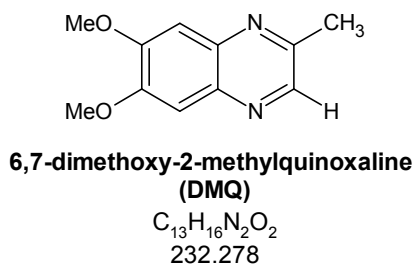
Metilglioxál-koncentráció meghatározása vérplazmában

A metilglioxál koncentrációjának méréséhez a korábban izolált vérplazma fehérjementesítését végeztem perklórsavval (0,8 M). A fehérjementesítést megelőzően elvégeztem a plazmaminták fehérjekoncentrációjának mérését a Bradford-assay alapján (215). Ezt követően a fehérjementes oldat un. derivatizációját végeztem 1,2-diamino-4,5-dimethoxy-benzene segítségével standardizált protokoll alapján. Ezen módszer a reaktív aldehidekből un. Quinoxalin-származékok képződését eredményezi, metilglioxál esetében a 6,7-dimethoxy-2-methylquinoxaline (DMQ) nevű vegyületét (11. ábra).

A)



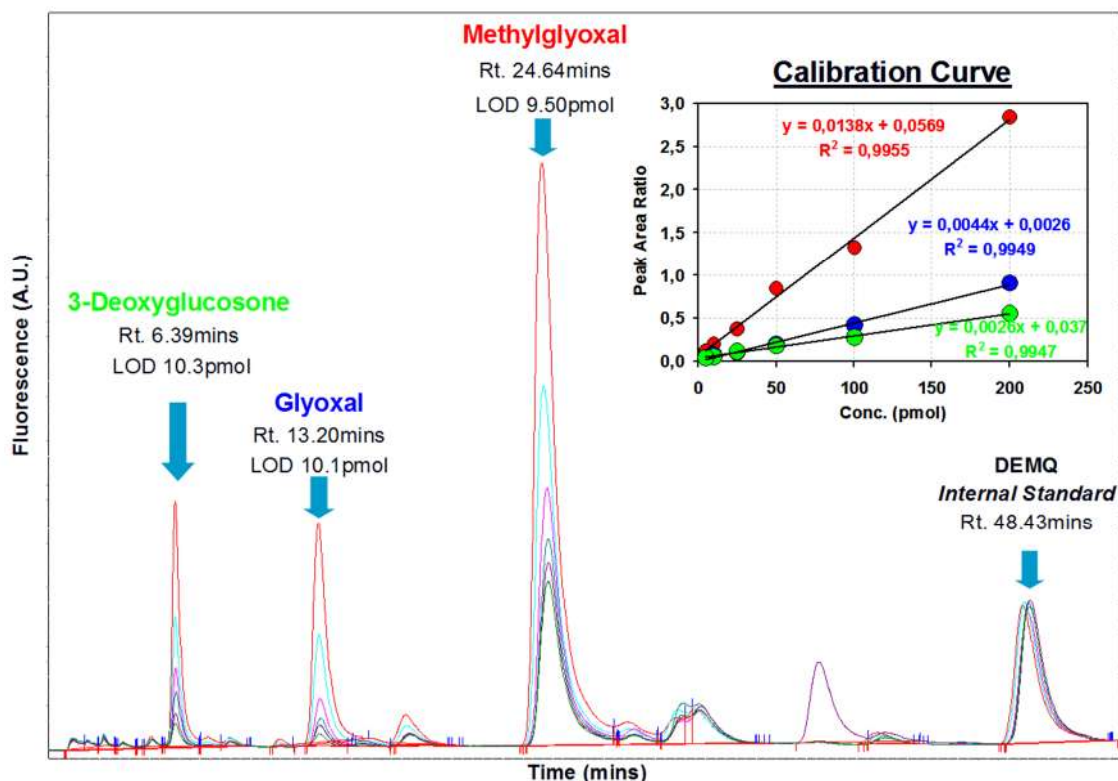
B)



11. ábra. A dikarbonil vegyületek DBB-vel történő kezelésének folyamata, amelynek során quinoxaline származékok képződnek (A), a metilglioxál esetében 6,7-dimethoxy-2-methylquinoxaline (B). (T. Fleming jóvoltából).

Az így előkészített mintákban a 6,7-dimethoxy-2-methylquinoxaline koncentrációjának mérése high performance liquid chromatography (HPLC) segítségével történt az irodalomban közölt módszerek alapján a heidelbergi egyetemi klinika központi laboratóriumában (216). Belső standardként 2-ethyl-3-methyl-6,7-dimethoxyquinoxalint (DEMQ) alkalmaztunk. A 12. ábra egy kromatográfias és a hozzá tartozó kalibrációs

görbét mutat be példaként. A vizsgált mintákban a metilglioxál koncentrációját mM (nmol/l) mértékegységben számoltuk ki.



12. ábra. Egy, a reaktív dikarbonilek koncentrációjának mérése során készült HPLC kromatogram és a hozzá tartozó kalibrációs görbe bemutatása.

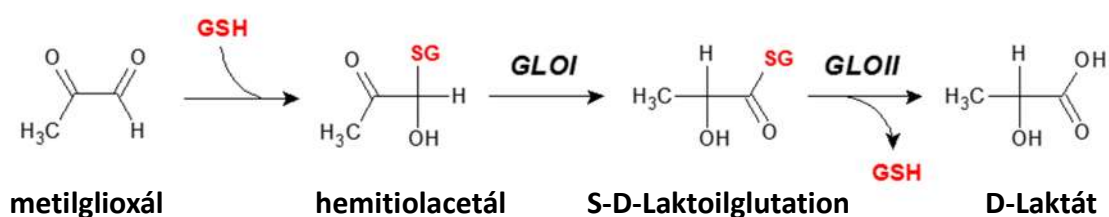
A trióz-foszfát intermedierek meghatározása vörösvérsejt lízátumban

A glikolízis során képződő trióz-foszfát intermedierek úgy, mint a gliceraldehid-3-foszfát (GAP), a dihidroxiaceton-foszfát (DHAP) és a velük dinamikus equilibriumban lévő fruktóz-1,6-biszfoszfát (FDP) koncentrációjának meghatározását hemolizált vörösvérsejtmintákból végeztem. A minták fehérjementesítését perklórsavval végeztem, amit megelőzően azonban minden minta esetében meghatároztam a hemoglobin koncentrációt az un. Drabkin-assay segítségével (217). Az egyes trióz-foszfátok koncentrációjának meghatározása a NADH koncentráció emelkedése alapján mérhető, az egyes trióz-foszfátokat bontó enzimek szekvenciális hozzáadásával. A deproteinizált, előkészített mintákhoz először gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt, majd triózfoszfát-izomerázt, ezt követően aldolázt adtam, majd minden egyes lépést követően fluorescens méréssel meghatároztam a NADH koncentrációt, amelynek változásából

tudtam kiszámolni az egyes intermedierek koncentrációját. A teljes trióz-foszfát intermedier koncentrációt a következő képlet alapján számoltam ki: $[GAP] + [DHAP] + (2*[FDP])$, mivel a sejtekben e három glikolízis köztitermék dinamikus egyensúlyban van. A módszert a heidelbergi kutatólabor irodalmi adatok alapján készített protokollja alapján végeztem (217).

A glioxaláz enzimrendszer vizsgálata: a glioxaláz-1 és glioxaláz-2 enzimek aktivitásának mérése perifériás mononukleáris sejtekben és vörösvérsejtekben

A glioxaláz-1 és -2 enzim aktivitását spektrofotometriás módszerrel határoztam meg. A lizált fehérvérsejteket tartalmazó mintákban meghatároztam a fehérjekoncentrációt (Bradford-assay), a hemolizált vörösvérsejtmintákban a hemoglobin koncentrációt (Drabkin-assay), majd elvégeztem a minták perklórsavas deproteinizációját. A glioxaláz enzimrendszer által katalizált kémiai reakciókat a 13. ábra mutatja be.



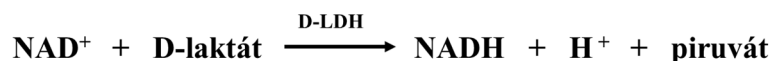
13. ábra. A glioxaláz-1 (GLOI) és glioxaláz-2 (GLOII) enzimek által katalizált reakció (T. Fleming jóvoltából).

A glioxaláz-1 enzim aktivitását a mintákhoz adott metilglioxál és glutation hatására képződő hemitioacetál- a glioxaláz-1 enzim szubsztrátja - lebontásából képződő S-D-laktoilglutation koncentrációjának változásából számoltam ki. Az adott mennyiségű szubsztrátot (2mM metilglioxál és 2 mM glutation) tartalmazó standard puffer oldathoz (nátrium-foszfát puffer, 50 mM pH 6.6) hozzáadtam a mintát, majd 37°C-on, 10 perces inkubálást végeztem. Az így képződő S-D-laktoilglutation mennyiségét a 240 nm hullámhosszúságú fényre történő abszorbancia változás alapján lehetett meghatározni (105, 218). A glioxaláz-1 enzim aktivitását mU/mg egységben adtam meg, ahol az aktivitás fehérvérsejtek esetében a minta kezdeti fehérjekoncentrációjára, vörösvérsejtek esetében pedig a hemoglobinkoncentrációra egységesített.

A glioxaláz-2 enzim aktivitásának méréséhez az enzim által katalizált reakció következtében képződő D-laktát szintjének spektrofotometriás módszerrel történő meghatározását alkalmaztam. A fentiek szerint előkészített mintákhoz meghatározott mennyiségű S-D-laktoilglutination (0,3 mM S-D-laktoilglutination 100 mM koncentrációjú, 7.4-es pH-jú Tris-HCl puffer oldatban) adtam, majd a 10 perces 37 °C-on történő inkubálást követően a D-laktát képződésének hatására megváltozott fényelnyelés méréséből (240 nm) számoltam ki az enzimaktivitást az irodalomban közöltek szerint (219). Az enzimaktivitást a glioxaláz-1 enzim aktivitással megegyező módon mU/mg mértékegységben adtam meg. Az enzimrendszer által katalizált reakciót a 13. ábra mutatja be.

A vérplazma D-laktát szintjének meghatározása

A plazma D-laktát szintjét spektrofotometriás módszerrel határoztam meg az irodalomban közölt adatok alapján (220). A fehérjementesítést követően a mintákban adott pH-nál a hozzáadott NAD⁺ és D-laktát dehidrogenáz (D-LDH) hatására keletkező NADH mennyisége mérhető 340 nm hullámhosszúságú fény elnyelésének mértéke alapján. A mérés során lezajló reakciót a 14. ábra mutatja be. A méréshez a következő összetételű reakcióelegyet használtam: glicin 1.85 g, hidralazin-szulfát 1,3 g, DETAPAC (Dietilén-triamin-pentaecetsav) 20 mg; H₂O 40 ml, 33 mg NAD⁺ (AppliChem, Darmstadt, Németország). A pH 9.2-re történő titrálást 10 M koncentrációjú nátrium-hidroxid hozzáadásával végeztem. A mintákhoz 25 egység D-LDH-t (Sigma Aldrich, Németország) adtam, majd 25 °C-on 90 perces inkubációt követően végeztem a fluoreszcencia mérését.



14. ábra. A D-laktát dehidrogenáz által katalizált reakció.

Az N-Epsilon-(Carboxymethyl)-Lysine (CML) módosította fehérjék koncentrációjának mérése vérplazmában

A CML által módosított fehérjék, mint késői glikációs végtermékek koncentrációját ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) módszerrel határoztam meg standard

protokoll alapján (221). A vizsgálathoz a CML ellenes antitestet használtam (Biologo, Kronshagen, Germany).

4. Statisztikai módszerek

Az egyes vizsgált paraméterek a vizsgálat kezdetekor és a 24 hetes metformin kezelés után mért értékeinek összehasonlítását páros t-próbával végeztük. Az egyes paraméterek változását a vizsgálat végi és kezdeti eredmény egymásból történő kivonásával képeztem (Δ -értékek). A metilglioxál plazmakoncentráció változásában (Δ MG) esetlegesen szerepet játszó tényezők vizsgálatára lineáris regressziót alkalmaztam a következő paraméterek, mint független változók figyelembevételével: életkor, nem, BMI változása (Δ BMI), éhgyomri vércukorérték változása (Δ glükóz), illetve a glioxaláz-1 enzim aktivitásának változása (Δ Glo-1) vörösvérsejtekben és perifériás mononukleáris sejtekben. Az egyes különbségek jellemzése során a $p < 0,05$ szignifikancia szintet alkalmaztam. A statisztikai elemzéseket az IBM SPSS Statistics 19 software (Armonk, USA) segítségével végeztem. Az ábrák készítéséhez a GraphPad Prism 7 software-t használtam (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA; USA).

II. A metformin kezelés hatásának vizsgálata a lipid paraméterekre és a kardiovaszkuláris rizikóra

A Karls-Ruprecht Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika (Heidelberg, Németország) diabétesz ambulanciáján (Clinical Study Center for Diabetes Research) egy klinikai vizsgálatban (Heidelberg Study on Diabetes and Complication) résztvevő 348, 2-es típusú cukorbeteg közül 102 beteg adatait dolgoztam fel. A vizsgálatban résztvevő betegek írásos formában egyeztek bele a vizsgálatba, a Helsinki Deklaráció irányelveivel összhangban. A klinikai vizsgálatot a Heidelbergi Egyetem Etikai Bizottsága jóváhagyta (S-383/2016).

1. A vizsgálat felépítése

Monocentrikus, keresztmetszeti vizsgálat.

2. Vizsgált betegcsoport

Beválasztási kritériumok:

- 2-es típusú cukorbetegség, amely >12 hónapja diagnosztizált;

- Életkor >18 év.

Kizárási kritériumok:

- Koleszterincsökkentő és egyéb antilipémiás kezelés;
- Iszkémiás szívbetegség, illetve sztrók az anamnézisben;
- Pajzsmirigy funkciózavar;
- Hiperlipidémiával járó egyéb kórképek;
- Szteroidkezelés.

3. Rutin laboratóriumi vizsgálatok és diagnosztika

A 2-es típusú cukorbetegség diagnózisa a Német Diabétesz Társaság (German Diabetes Association) irányelveinek megfelelően történt, amely összhangban van Európai Diabétesz Társaság (European Association for Study of Diabetes) irányelveivel (222). A laboratóriumi vizsgálatok éhgyomri vérvételt követően azonnali szállítás után a Karls-Ruprecht Egyetem Központi Laboratóriumában (Department of Medical Chemistry, University of Heidelberg) standardizált körülmények között történtek. A glomeruláris filtrációs ráta meghatározása a CKD-EPI formula alapján történt (223). Minden beteg esetében rutin 12 elvezetési EKG vizsgálatot készült.

4. Kardiovaszkuláris rizikó felmérése

A szív-érrendszerei kockázat becslésére a UKPDS vizsgálat adatai (53000 betegév) alapján kifejlesztett diabétesz specifikus rizikókalkulátort alkalmaztuk (UKPDS Risk Engine, www.dtu.ox.ac.uk/riskengine). A rizikókalkulátor az igazolt iszkémiás szívbetegség nélküli, 2-es típusú cukorbetegség esetében végez az elkövetkező 10 évre vonatkoztatott rizikóbecslést a következő paraméterekre: koronáriabetegség, halált okozó koronáriabetegség, sztrók, halált okozó sztrók. A rizikókalkulátor a következő paraméterek figyelembevételével végzi a rizikóbecslést: életkor, nem, cukorbetegség időtartama, HbA_{1c}, szisztolés vérnyomás, pitvarfibrilláció megléte, etnikai hovatartozás, teljes szérum koleszterin, HDL-koleszterin, dohányzás (224).

5. Statisztikai analízis

Az egyes adatok elemzése során minden esetben figyelembe vettük az adatok normális vagy nem-normális eloszlását (Kolmogorov-Smirnov teszt), ennek megfelelően folytonos változók esetében egyszempontos varianciaanalízist (one-way ANOVA) vagy Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. A kategoriális változók vizsgálatát khí-négyzet próbával végeztük. Lineáris regresszióanalízist végeztünk, amely során függő változóként az LDL koleszterinszintet vettük, a következő változók, mint független változó figyelembevételével: életkor, nem, diabétesz időtartam, BMI, GFR-EPI, HbA_{1c}, metformin kezelés, RAAS-gátló kezelés, acetilszalicilsav-kezelés, Ca-antagonista kezelés, TSH. A statisztikai elemzések során a szignifikancia szintnek a $p < 0,05$ értéket vettük. A statisztikai elemzéseket az SPSS statisztikai program segítségével végeztük (IBM-SPSS Version 23.0, Chicago, IL, USA).

III. Az argininben gazdag, zsírsavhoz kötött, ciklikus MG-kötő fehérje hatásának vizsgálata a MG plazma szintjére és a MG indukálta hiperalgéziára egerekben

Jelen vizsgálat a Karls-Ruprecht Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika (Heidelberg, Németország) Diabétesz Kutatólaboratóriumában történt. A vizsgálatot a tübingeni és karlsruhei állatkísérleti etikai bizottság (Animal Care and Use Committees, Regierungspräsidium Tübingen és Karlsruhe, Németország) jóváhagyta (35-9185.81/G-3/15). A kísérleti állatokkal közvetlen kapcsolatban álló vizsgálatokat a kutatólaboratórium állatkísérletekért felelős tudományos munkatársával végeztem.

1. Kísérleti állatok

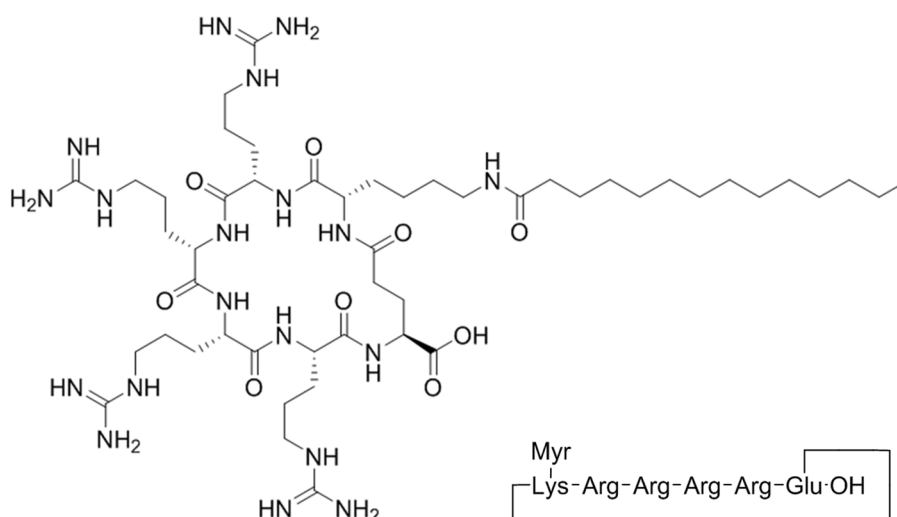
36 C57BL/6 egérrel végeztünk vizsgálatot (Charles River, Boston, USA). A kezelés elején az egereket közös helyen tartották ellenőrzött körülmények között (hőmérséklet: 21 ± 1 °C, páratartalom: 60%, 12 órás világos-sötét ciklus, korlátozás nélküli táplálék- és folyadék-hozzáférés) a heidelbergi egyetem állatházában (Interfaculty Biomedical Facility). Az állatok vizsgálata 10-12 hetes koruk között történt, testsúlyuk ekkor 23-25 g volt. Az állatokat véletlenszerűen három kezelési főcsoportra osztottuk:

- 1) Az első csoportnak 0,25 mg CycK(My_r)R₄E fehérje került beadásra 0,9%-os NaCl oldatban intraperitonealisan. Ezt követően 30 perc múlva 5 µg/g dózisban MG intravénás beadása történt.

- 2) Tiszta 0,9%-os NaCl oldat i.p. beadását követően 30 perccel 5 µg/g dózisban i.v. MG beadása történt.
- 3) Tiszta 0,9%-os NaCl oldat került i.p., majd 30 perc elteltével i.v. beadásra.

2. CycK(Myr)R₄E fehérje

A MG kötő tulajdonságú fehérje a heidelbergi laboratóriumban került szintetizálásra. A ciklikus protein 4 arginin (Arg) aminosavat tartalmaz, amelyhez egy lizin (Lys) aminosavon keresztül mirisztül sav (telített zsírsav, képlete: CH₃(CH₂)₁₂COOH) kapcsolódik. A komplex molekula ciklikusságát egy cukormolekula hozzákapcsolásával érték el. A molekula szerkezeti és sematikus képletét a 15. ábra mutatja be. A protein plazma stabilitását korábbi vizsgálatok során igazolták (a protein szintézisben és a stabilitási illetve toxicitási vizsgálatokban nem vettem részt, ezért ezeket értekezésemben nem részletezem).



15. ábra. A CycK(Myr)R₄E fehérje szerkezeti és sematikus képlete. Lys: lizin; Arg: arginin; Myr: mirisztül sav; Glu: glükóz; OH: hidroxil-csoport.

3. A metilglioxál plazmakoncentráció meghatározása

A metilglioxál koncentráció meghatározásához 30 perccel a MG i.v. beadását követően a submandibuláris vénából kb. 40 µl vér vétele történt EDTA tartalmú (2 µl 0,5 M EDTA) Eppendorf csőbe. Ezt követően azonnali centrifugálás történt (5 perc, 4 °C, 6000 rpm), majd a felülúszó pipettálása után a plazmaminta azonnali fagyasztása történt folyékony nitrogén segítségével. A minták tárolása -80 °C-on történt. A MG koncentráció meghatározása folyadék-kromatográfiás-tömegspektrometriás módszerrel (LC-MS/MS)

történt a heidelbergi laboratórium LC-MS/MS laborjában. A MG koncentrációt a laboratórium nmol/ml mértékegységben adta meg.

4. A CycK(Myr)R4E fehérje hatásának vizsgálata a MG indukálta hiperalgéziára

A hőhatás kiváltotta fájdalominger vizsgálatát az ún. forró lap teszttel végeztük (hot plate analgesia meter, Columbus Instruments, Ohio, USA). A vizsgálat során az egér szabadon mozog egy fémfelületen, melynek hőmérsékletét állandó, 50 °C-os értéken tartottuk. A típusos nociceptív reakciók, mint valamelyik hátsó végtag nyalása, hátsó végtag emelése, rázása vagy az állat ugrása, megjelenéséig eltelt latenciaidő mérése történt. A nociceptív reakció megjelenésekor az állat a forró lapról eltávolításra került. A maximális vizsgálati idő 60 másodperc volt. A vizsgálat minden állat esetében 3 alkalommal történt, majd a latencia idők átlagát vettük. A vizsgálatokat azonos napszakban végeztük. Az állatokon a tényleges mérést megelőzően 1 héttel próbamérést végeztünk, hogy hozzászokjanak a vizsgálati körülményekhez.

IV. Eredmények

I. A metformin hatása a reaktív metabolitok anyagcseréjére

1. A vizsgálatban résztvevő betegek

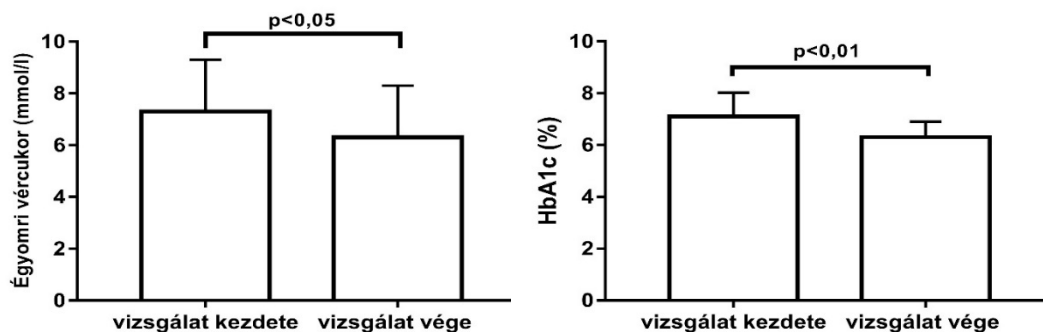
A vizsgálatba 12 beteget vontunk be, 7 nőt és 5 férfit, az átlagéletkor $51 \pm 10,3$ év volt. A beválasztási és kizárási követelményeknek megfelelően a betegek a vizsgálatot megelőzően nem részesültek antidiabetikus kezelésben. Az anamnézis és kezdeti fizikális vizsgálat alapján nem észleltünk manifeszt makrovaszkuláris illetve mikrovaszkuláris szövődmény jelenlétére utaló eltérést. Diabéteszes neuropátiára utaló jelet egyik beteg esetében sem találtunk (hangvilla és monofilament teszt segítségével). Autonóm diabéteszes neuropátiára utaló klinikai jelet sem észleltünk. A betegek nem részesültek acetilszalicilsav, statin illetve egyéb antioxidáns vagy ismertén gyulladáscsökkentő hatású szerrel történő kezelésben. A betegek klinikai adatait és metabolikus paramétereit az 2. táblázat mutatja be.

2. táblázat. A vizsgálatban résztvevő betegek klinikai adatai és metabolikus paramétereit. Adatok: átlag \pm standard deviáció vagy n (%). BMI: testtömegindex; RAAS: renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer.

Vizsgált paraméterek	Eredmények (n=12)
Életkor (év)	$51,3 \pm 10,3$
Nem (nő/ffi)	7/5
BMI (kg/m^2)	$35,4 \pm 6,2$
Éhomi vércukor (mmol/l)	$7,3 \pm 2,0$
HbA _{1c} (%)	$7,1 \pm 0,92$
RAAS-gátló kezelés	8 (67)
Hangvilla teszt (/8)	$7,3 \pm 1,2$
Monofilament teszt (/10)	$9 \pm 0,4$

2. Az életmódváltozás és metformin kezelés hatása a metabolikus paraméterekre

Az életmódváltozás és metformin kezelés szignifikánsan javította a betegek BMI értékét ($35,4 \pm 6,2$ vs. $32,9 \pm 6,3$ kg/m^2 ; $p < 0,01$) és szignifikánsan csökkentette mind az éhgyomri vércukor értéket ($7,3 \pm 2,0$ vs. $6,3 \pm 2,0$ mmol/l ; $p = 0,04$), mind a HbA_{1c} értékeket ($7,1 \pm 0,92$ vs. $6,3 \pm 0,6\%$; $p < 0,01$) 16. ábra.



16. ábra. Az éhgyomri vércukor érték és a HbA_{1c} változása a 24 hetes metformin kezelés hatására

3. A metformin kezelés hatása a trióz-foszfát intermedierek képződésére

A kezelés hatására nem észleltünk szignifikáns változást a vörösvérsejtek trióz-foszfát intermedierek koncentrációjának tekintetében. Az egyes trióz-foszfátok vörösvérsejtekben mért koncentrációját a vizsgálat kezdetén és végén a 3. táblázat mutatja be. Az elvégzett korrelációanalízis során nem találtam szignifikáns összefüggést a trióz-foszfát intermedierek koncentrációja és az éhgyomri vércukor, a HbA_{1c} és a metilglioxál szintek között.

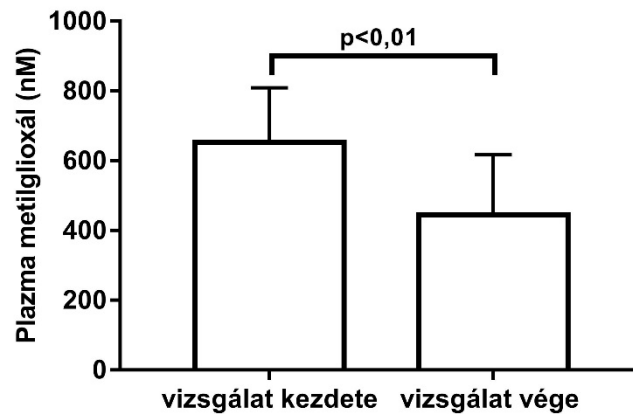
3. táblázat. A trióz-foszfát intermedierek koncentrációja a vörösvérsejtekben metformin kezelés hatására. Az adatok átlag \pm SD formában lettek feltüntetve. T=T-érték, n.s.=nem szignifikáns.

Trióz-foszfátok	Vizsgálat kezdete (n=12)	Vizsgálat vége (n=12)	T	p
Glicerinaldehid-foszfát (pmol/mg Hb)	$25,4 \pm 15,6$	$27,7 \pm 19,4$	-0,01	n.s.
Dihidroxiaceton-foszfát (pmol/mg Hb)	$25,2 \pm 16,1$	$27,1 \pm 18,4$	0,1	n.s.

Fruktóz-1,6-biszfoszfát (pmol/mg Hb)	25,8±14,8	26,1±16,2	0,5	n.s.
Teljes TPI- koncentráció (pmol/mg Hb)	102,3±60,9	106,7±70,3	0,3	n.s.

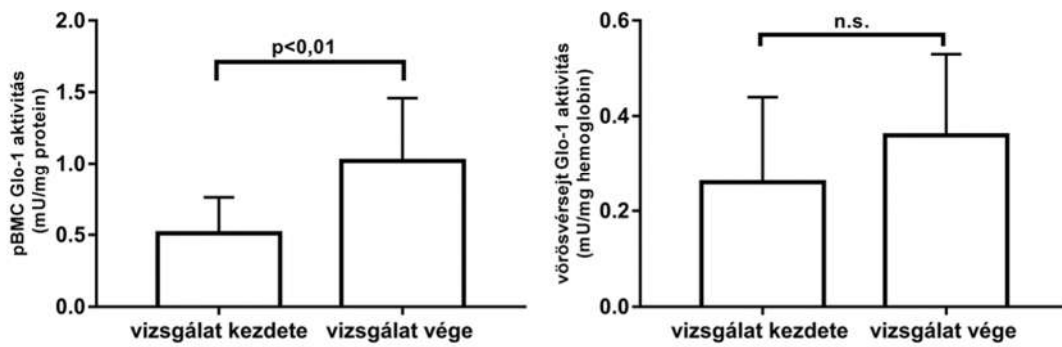
4. A metformin kezelés hatása a metilglioxál képződésére és a glioxaláz enzimrendszeren keresztüli metabolizmusára

A vizsgált beteganyagunkban a metformin kezelés hatására a metilglioxál plazmaszintjének szignifikáns csökkenését értük el (653,3±155,3 vs. 445,5±172,3 mM; $p<0,01$), amit a 17.ábra mutat be.



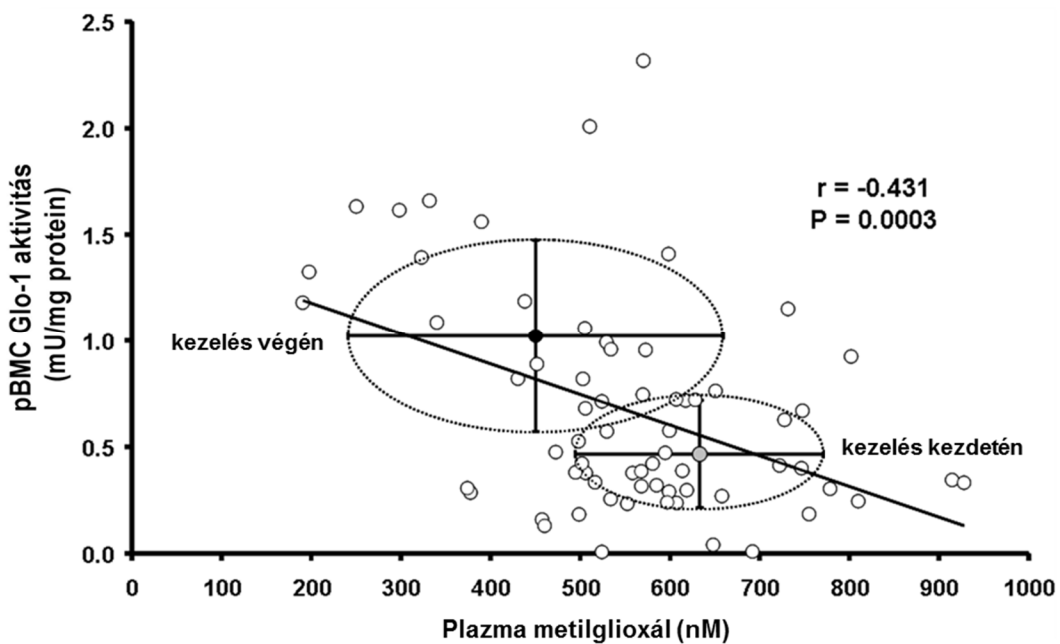
17. ábra. A metilglioxál plazmaszintjének változása a metformin kezelés hatására.

A metilglioxál vérplazmaszintjének csökkenésével párhuzamosan a metformin kezelés hatására a glioxaláz-1 enzim aktivitásának szignifikáns növekedését észleltük a perifériás mononukleáris sejtekben (0,51±0,25 vs. 1,02±0,44 mU/mg protein; $p<0,01$). A vörösvérsejtekben is észlelhető volt a glioxaláz-1 enzimaktivitás fokozódása, a változás azonban a szignifikancia szintet nem érte el (0,26±0,18 vs. 0,36±0,17 mU/mg hemoglobin; $p=0,1$). Az eredményeket a 18. ábra szemlélteti.



18. ábra. A glioxaláz-1 enzim aktivitásának változása metformin hatására perifériás mononukleáris sejtekben (pBMC) és vörösvérsejtekben.

A plazma metilglioxál koncentráció és a glioxaláz-1 enzim aktivitása között szignifikáns negatív korrelációt észleltünk ($p < 0,001$, $R = -0,431$), 19. ábra. Ez az összefüggés a glioxaláz-1 enzimaktivitás fokozódásának szerepét támasztja alá a metformin metilglioxál szintet csökkentő hatásában.

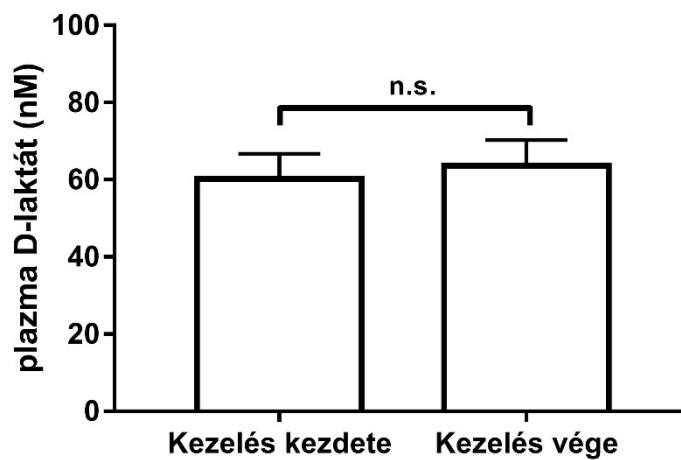


19. ábra. A plazma metilglioxál koncentrációjának a glioxaláz-1 enzim fehérvérsejtekben mért aktivitásának összefüggése a kezelés kezdetén és végén.

A glioxaláz-2 enzim aktivitásában nem észleltünk változást a kezelés során sem perifériás mononukleáris sejtekben ($8,01 \pm 3,6$ vs. $6,7 \pm 3,3$ mU/mg protein, $p: 0,33$), sem vörösvérsejtekben ($0,17 \pm 0,13$ vs. $0,19 \pm 0,11$ mU/mg hemoglobin, $p: 0,68$).

5. A vérplazma D-laktát szintjének vizsgálata metformin kezelés során

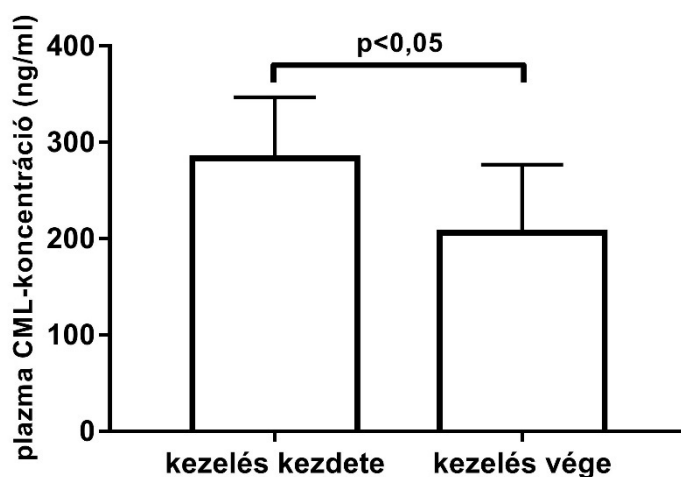
A glioxaláz enzimrendszer végtermékének, a D-laktátnak a plazmakoncentrációjában nem észleltünk szignifikáns eltérést 24 hetes kezelés hatására ($60,2 \pm 6,4$ vs. $63,6 \pm 6,7$ nM; $p=0,3$) (20. ábra).



20. ábra. A plazma D-laktát szintjének változása a kezelés során.

6. Az N-Epsilon-(Carboxymethyl)-Lysine (CML) módosította fehérjék koncentrációjának változása a vérplazmában

A metformin kezelés hatására a plazmában szignifikánsan csökkent a CML-módosította késői glikációs végtermékek koncentrációja ($283,4 \pm 63,5$ vs. $206,3 \pm 70,5$ ng/ml; $p < 0,05$) (21. ábra).



21. ábra. A karboxi-metillizin módosította fehérjék plazmakoncentrációjának változása metformin kezelés hatására.

7. A metilglioxál plazmaszintjének változását befolyásoló tényezők vizsgálata egyváltozós és többváltozós lineáris regressziós analízissel

A többváltozós lineáris regressziós analízis során a független változóként vizsgált életkor, nem, BMI-változás, vércukorszint-változás és a glioxaláz-1 enzim aktivitásának perifériás mononukleáris sejtekben és vörösvérsejtekben bekövetkező változása közül kizárólag az utóbbi, azaz a glioxaláz-1 enzimaktivitás emelkedése bizonyult prediktív értékűnek a metilglioxál plazmaszintjének változásában. A regressziós analízis eredményét a 4. táblázat mutatja be.

4. táblázat. Egy- és többváltozós lineáris regressziós analízis a metilglioxál változását meghatározó tényezők prediktív szerepének vizsgálatára. Lépésenkénti „forward” és „backward” regressziós modellt alkalmaztam, $R^2=0,70$ (determinációs együttható). Beta=standardizált koefficiens, r=regressziós koefficiens, T=T-érték. BMI: testtömegindex; GLO-1: glioxaláz-1.

	n=12	<u>Egyváltozós</u>		<u>Többváltozós</u>		
		r	p	béta	T	P
Δ metilglioxál	-195.3 ± 172.1					
<i>Független változók</i>						
Életkor	51.3 ± 10.3	0.06	0.44	-0.15	-0.6	n.s.

Nem (n/f)	7/5	0.30	0.19	0.17	0.8	n.s.
Δ BMI	-2.6 ± 2.8	-0.01	0.49	-0.08	-0.4	n.s.
Δ éhomi vércukor	-1.0 ± 1.6	0.34	0.15	0.29	1.7	n.s.
Δ GLO-1 pBMC	0.55 ± 0.44	-0.70	0.08	-425.3	-4.3	<0.01
Δ GLO-1 vvs	0.10 ± 0.23	0.11	0.38	-451.7	-2.4	<0.05

II. A metformin hatásának vizsgálata a vérsírértékekre és a kardiovaszkuláris rizikóra

1. A vizsgált betegcsoport

Összesen 102, 2-es típusú cukorbeteg adatainak elemzését végeztük el. A betegeket két csoportra osztottuk az antidiabetikus kezelés alapján: metformin kezelésben nem részesülő betegek (n=50) és metformin kezelésben részesülő betegek (n=52). A metformin napi dózisa 1000-3000 mg között volt (az alkalmazott dózis medián értéke 2000 mg \pm 86,91 (standard error) volt). A két betegcsoport között életkor, nem, betegségstartam, BMI, gyógyszeres kezelés, szisztolés vérnyomás és az aktuális szénhidrát anyagcsere állapotának tekintetében nem találtunk érdemi eltérést. A vizsgált betegek adatait és részletes laboratóriumi paramétereit az 5. táblázat mutatja be.

5. táblázat. A vizsgált betegcsoportok jellemzői illetve laborparamétereit. Az adatokat átlag \pm standard hiba vagy n (%) formájában adtam meg. *p<0,05; **p<0,01. ACR=albumin-kreatinin ratio.

	Metformin kezelésben nem részesülő betegek (n=50)	Metformin kezelésben részesülő betegek (n=52)
Életkor (év)	63,04 \pm 1,55	62,88 \pm 1,50
Nem (nő/férfi)	25/25	21/31
Betegségstartam (év)	10,72 \pm 1,65	10,04 \pm 1,19
Szulfanilurea kezelés	2 (4)	2(3,8)
DPP-4 gátló kezelés	6 (12)	13 (25)
GLP-1 analóg kezelés	2 (4)	0 (0)

SGLT-2 gátló kezelés	5 (10)	6 (11,5)
Inzulin terápia	12 (24)	11 (21,6)
Acetilszalicilsav kezelés	6 (12)	10 (19,2)
RAAS-gátló kezelés	20 (40)	29 (55,8)
Bétablokkoló kezelés	12 (24)	14 (26,9)
Ca-antagonista kezelés	6 (12)	12 (23,1)
Hipertónia betegség	30 (60)	36 (69,2)
Dohányzás	3 (6)	7 (13,5)
BMI (kg/m ²)	30,73±0,95	32,40±0,86
HbA1c (%)	7,11±0,21	7,14±0,14
HbA1c (mmol)	54,55±2,24	53,29±1,69
ACR (mg/g)	161,37±109,67	172,9±98,60
GFR-EPI (ml/min*1.73 m ²)	84,94±2,59	90,13±2,46
Koleszterin (mg/dl)	225,40±7,37	196,98±4,85**
Triglicerid (mg/dl)	206,42±37,2	180,35±15,07
HDL koleszterin (mg/dl)	50,8±2,93	46,85±1,43
LDL koleszterin (mg/dl)	134,17±6,52	114,96±4,45*
GOT (U/l)	29,56±3,44	28,19±2,10
GPT (U/l)	31,6±3,34	33,25±3,28
AP (U/l)	75,24±3,68	73,75±2,71
GGT (U/l)	52,28±15,6	44,92±7,11
TSH (mU/l)	1,66±0,12	1,67±0,17
CRP (mg/l)	3,46±0,61	3,35±0,44
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	138,06±3,13	134,92±2,04

2. A vizsgált vérzsírértékek az egyes betegcsoportokban

A két vizsgált csoport összehasonlítása során szignifikáns eltérést tapasztaltunk a szérumban teljes koleszterin (225,40±7,37 vs. 196,98±4,85 mg/dl; p<0,01) és a szérumban LDL-koleszterin koncentráció (134,17±6,52 vs. 114,96±4,45 mg/dl; p<0,05) esetében. Mindkét paraméter alacsonyabb értéket mutatott a metformin kezelésben részesülők

körében. Ugyanakkor a szérum triglicerid és HDL-koleszterin szintek között nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget (5. táblázat).

3. A szív- és érrendszeri kockázatát befolyásoló tényezők vizsgálata lineáris regressziós analízissel

A lineáris regresszióanalízis során nem találtunk a metformin kezelésen kívül olyan tényezőt, amely e két betegcsoport esetében szignifikáns hatással bírna a szérum LDL-koleszterin szintre. A regresszióanalízis eredményét a 6. táblázat mutatja be.

6. táblázat. Lineáris regresszióanalízis az egyes paraméterek LDL-koleszterin szintre gyakorolt hatásának vizsgálatára. * $p < 0,05$. $R^2 = 0,056$.

Vizsgált paraméter	B koefficiens	T érték	P érték
Életkor	-0,16	-0,15	0,88
Nem	0,086	0,79	0,43
Betegségtartam	0,203	1,911	0,06
BMI	0,055	0,504	0,62
GFR-EPI	0,057	0,515	0,61
HbA1c	0,085	0,781	0,44
Metformin kezelés	-0,236	-2,19	0,032*
RAAS gátló kezelés	0,04	0,37	0,71
Acetilszalicilsav kezelés	0,182	1,683	0,09
Bétablokkoló kezelés	0,171	1,596	0,11
Ca-antagonista kezelés	0,043	0,39	0,7
TSH	0,101	0,93	0,355

4. A szív- és érrendszeri kockázat vizsgálata

A UKPDS rizikókalkulátorral végzett 10 éves rizikóbecslés eredményeiben nem észleltünk eltérést a két betegcsoport között, sem koronáriabetegség, sem sztrók rizikó tekintetében. A UKPDS rizikóbecslés eredményét a 7. táblázat mutatja be.

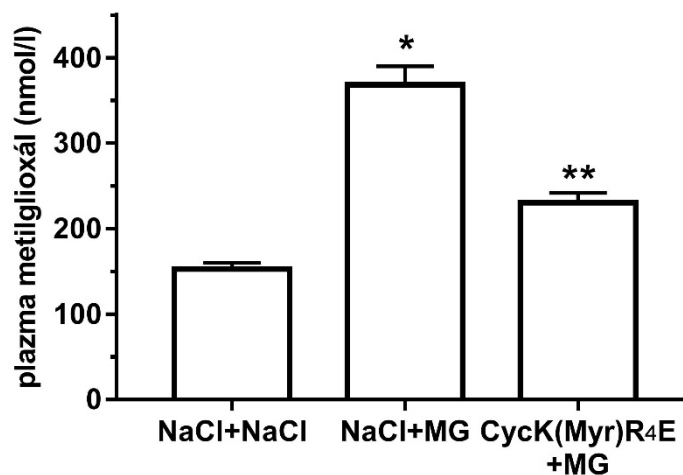
7. táblázat. A UKPDS rizikókalkulátorral végzett kockázatbecslés eredménye a vizsgált betegcsoportokban. Az adatok százalékban kerültek megadásra, amely az egyes események előfordulásának valószínűségét adja meg a következő 10 évben.

UKPDS rizikó számláló (10 év)	Metformin kezelésben nem részesülő betegek (n=50)	Metformin kezelésben részesülő betegek (n=52)
koronáriabetegség	23,5%	24,6%
halálhoz vezető koronáriabetegség	18,0%	18,7%
sztrók	15,9%	15,9%
halálhoz vezető sztrók	2,8%	3,0%

III. Az argininben gazdag, zsírsavhoz kötött, ciklikus MG-kötő fehérje hatásának vizsgálata a MG plazma szintjére és a MG indukálta hiperalgéziára egerekben

1. A metilglioxál plazmakoncentráció változása a CycK(My_r)R₄E fehérje hatására

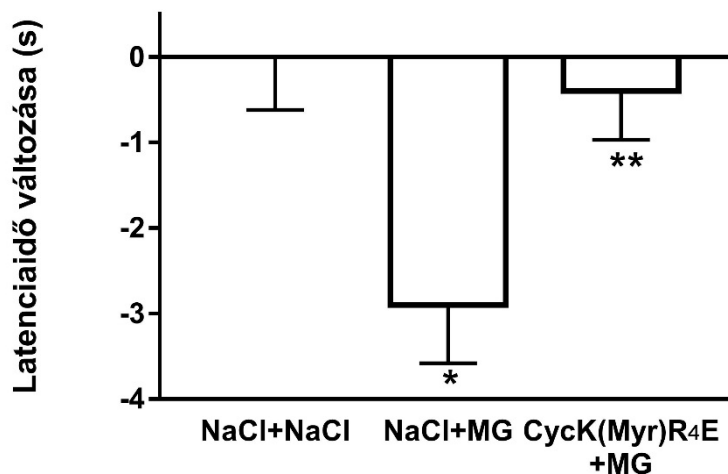
A kizárólag sóoldatot kapó kontroll egerek plazma MG koncentrációja $152,9 \pm 7,1$ nmol/l volt. Az intraperitonealisan sóoldatot, intravénásan MG-t kapó egerek plazma MG szintje ehhez képest szignifikánsan emelkedett volt ($368,5 \pm 21,7$ nmol/l, $p < 0,001$). Az intraperitoneálisan CycK(My_r)R₄E fehérje és intravénás MG adásában részesülő egerek plazma MG koncentrációja a csak MG-t kapó egerekéhez képest szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult ($230,5 \pm 11,6$ nmol/l; $p < 0,001$) (22. ábra).



22. ábra. A MG plazmakoncentrációja a három kezelési csoportban. * $p < 0,001$ NaCl+NaCl/NaCl+MG; ** $p < 0,001$ NaCl+MG/CycK(My₄R₄E)+MG

2. A CycK(My₄R₄E) fehérje hatásának vizsgálata a MG indukálta hiperalgéziára

A kontroll egerek (kizárólag iv. és ip. NaCl-t kapók) átlagos latenciaideje $20,8 \pm 0,60$ s volt. A másik két csoport latenciaidejét ezen értékhez normalizáltuk (20. ábra). Az intraperitonealisan NaCl-t, de intravénásan MG-t kapó egerek latenciaideje szignifikánsan rövidebb volt, azaz fokozott fájdalomérzetük volt ($17,9 \pm 3,85$ s; NaCl+NaCl vs NaCl+MG $p < 0,01$). Az intraperitoneális CycK(My₄R₄E) fehérje adása szignifikánsan mérsékelte a MG kiváltotta latenciaidő csökkenést ($20,3 \pm 3,35$ s; NaCl+MG vs. CycK(My₄R₄E)+MG $p < 0,01$), ezen állatoknál a fájdalomérzet megjelenésének ideje a kontroll csoportéhoz hasonló volt (23. ábra).



23. ábra. A forró lap vizsgálat során megjelenő nociceptív válasz latenciaidejének változása a kontroll csoporthoz képest. * NaCl+NaCl vs. NaCl+MG $p < 0,01$; ** NaCl+MG vs. CycK(My₄R₄E)+MG $p < 0,01$.

V. Megbeszélés

I. A metformin hatása a metilglioxál és a késői glikációs végtermékek metabolizmusára 2-es típusú cukorbetegségben

Vizsgálatom első részében az életmódváltozással kombinált metformin kezelés pozitív glikémiás hatását igazoltam 2-es típusú cukorbetegekben. Ezen felül vizsgálati eredményeim alátámasztják, hogy a metformin képes a vérplazma metilglioxál koncentrációját csökkenteni. Hasonló eredményről már számoltak be az irodalomban (28), azonban a korábbi vizsgálatok a metformin scavenger funkciójával magyarázták ezt a hatást. Ismert ugyanakkor, hogy a scavenger reakció egy kifejezetten lassú folyamat, valamint a metformin jóval gyengébben kötődik a metilglioxálhoz, mint a reaktív aldehidek scavengere, az aminoguanidin (225). Újabb kísérletes adatok azonban a metformin hatékony MG kötő hatását igazolták, amely során azonosításra került a MG-metformin kapcsolódás végterméke, amely a vizelettel ürül ((*E*)-1,1-dimethyl-2-(5-methyl-4-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)guanidine) (188).

A metilglioxál képződésének csökkenésében szerepet játszhat a metilglioxál prekursorainak, a glikolízis folyamán képződő trióz-foszfát intermedierek képződésének gátlása. Korábban igazolódott, hogy az 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben észlelt emelkedett metilglioxál és TPI koncentrációra a vércukorszint és HbA_{1c} normalizása nincs érdemi hatással (217). Vizsgálatom során sem észleltem változást a vörösvérsejtek glükóz metabolizmusa során képződő trióz-foszfát intermedierek intracelluláris koncentrációjában. A vörösvérsejtekben jól vizsgálható a glikolízis első fázisa, hiszen ezen sejtekben ez az egyetlen energiaforrás, amelyet nem befolyásolnak intracelluláris metabolikus hatások (pl. mitokondriális szabadgyök termelődés) és gén szintű változások sem. Ugyanakkor ez azt is jelenti, hogy sejtorganellumok hiányában nem vizsgálhatóak sem az esetleges mitokondriális hatások, sem a transzkripciós változások. Számos vizsgálat igazolta, hogy a metformin képes gátolni a mitokondriális légzési lánc működését, aminek szerepet tulajdonítanak a hiperglikémia következtében fellépő mitokondriális oxidatív stressz elleni védelemben (226-228). Megjegyzendő ugyanakkor, hogy ezen hatásmechanizmus kiemelkedő szerepet játszik a metformin egyik legjelentősebb mellékhatásának, a laktacidózisnak a kiváltásában (227).

A reaktív aldehidek koncentrációjának változásában a csökkent termelődés mellett a lebontó folyamatok fokozódása is szerepet játszhat. A metilglioxál lebontását végző legfontosabb, minden emlős sejtben megtalálható enzimrendszer, a glioxaláz enzimrendszer. A folyamat sebességmeghatározó lépése a glioxaláz 1 által katalizált reakció (94), azaz a MG lebontásában ezen enzim aktivitása a kulcsfontosságú. Vizsgálatunkban a glioxaláz 1 enzim fokozott aktivitását tudtuk kimutatni mind perifériás mononukleáris sejtekben, mind vörösvérsejtekben. Ezzel szemben azonban a MG lebontás második lépését katalizáló enzim, a glioxaláz 2 enzim aktivitásában nem észleltem változást. A glioxaláz 2 enzim végtermékének, a D-laktátnak a plazmaszintje sem változott a metformin kezelés hatására. Az emberi sejtekben gyakorlatilag kizárólag a MG lebontása során képződik D-laktát, azonban a D-laktát plazmaszintjét kis mértékben befolyásolhatják a bélbaktériumok és a táplálékkal bevitt exogén D-laktát is (229).

Vizsgálatunk során a karboximetil-lizin (CML) által módosított fehérjék koncentrációját alkalmaztuk általános oxidatív stressz markerként, mivel a CML a ROS kiváltotta lipid peroxidáció és glikáció markereként szolgálhat (230). Eredményünk alátámasztja a metformin oxidatív stresszt csökkentő hatását, hiszen a 24 hetes kezelés hatására az oxidatív stressz marker CML-termékek csökkent szintjét tudtuk kimutatni. Az oxidatív stressz kiemelkedő szereppel bír a cukorbetegség késői szövődményeinek kialakulásában, (72, 154) és szerepet játszik a reaktív aldehidek fokozott képződésében. Ennek egyik mechanizmusa a glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) enzim gátlásán keresztül a trióz-foszfát intermedierek fokozott termelődése, ami fokozza a reaktív aldehidek képződését (60). Emellett a reaktív oxigéngyökök az intracelluláris glutation redukciójához vezetnek, ami az egyik legfontosabb intracelluláris antioxidáns hatású molekula (231, 232). A glioxaláz-1 enzim szintén glutationt használ, mint kofaktor (208). Korábban kimutatták, hogy a reaktív oxigéngyökök és származékaik a glutation és a NADPH szintet csökkentve képesek a glioxaláz enzimrendszer működését negatívan befolyásolni (208, 233), ezáltal növelve a MG koncentrációját. A metforminról korábban bebizonyosodott, hogy cukorbeteg állatmodellben az oxidált/redukált glutation (GSH/GSSG) arányát növeli (234), ezáltal támogatva az antioxidáns védelmet és gátolva a ROS és a ROS hatására képződő végtermékek, mint például a malonaldehid felszaporodását (235, 236). A metformin kezelés mérsékelheti az oxidatív stressz

indukálta DNS károsodást, mivel metformin hatására csökkent a DNS törések markereként ismert γ H2AX (foszforilált hiszton H2A) szintje (235). Az oxidatív stressz elsődleges forrása a sejtekben a mitokondrium és kisebb részben az endoplazmás retikulum (237). A metformin mitokondriális oxidatív stresszt gátló hatása ismert (238), azonban az endoplazmás retikulumból származó reaktív oxigénradikálok tekintetében kevés adat áll rendelkezésre. Egy közelmúltban megjelent vizsgálat eredményei alapján metformin hatására aktiválódik az endoplazmás retikulumban található glutation-peroxidáz 7, ami a glutation antioxidáns hatásán keresztül csökkenti az oxidatív stresszt (239).

A heidelbergi laboratóriumban elvégzett későbbi vizsgálatok nem igazolták a metformin kezelés hatását a glioxaláz 1 enzim kódoló gén transzkripciójának változására (nem publikált adatok). Ez alapján feltételezhető, hogy a glioxaláz rendszer aktiválásában a metformin glutationon keresztüli antioxidáns hatása játszik szerepet, ezáltal csökkentve a reaktív aldehidek koncentrációját. Ezt támasztja alá a glioxaláz 1 szelektív aktivitásfokozódása is, hiszen a glioxaláz 2 enzim működéséhez nem használ glutationt, mint kofaktort. Glutation mérése vizsgálatuk során sajnos nem volt lehetséges, az irodalmi adatok alapján azonban ezen mechanizmus szerepe a legvalószínűbb.

A metforminról mindezek mellett bebizonyosodott, hogy számos, a cukorbetegségben csökkent aktivitású, az oxidatív stressz elleni védelemben szerepet játszó enzim kódoló gén transzkripcióját fokozza. Ezek közé tartozik a glutation-S-transzferáz, a NAD(P)H-quinon-oxidoreduktáz és kataláz (27). Emellett a gyulladásos válaszban szerepet játszó proinflammatorikus citokinek, mint az IL-6 és a TNF- α transzkripcióját gátolja (240), melyek a cukorbetegség szövődményeiben szerepet játszó gyulladásos folyamatok ismert mediátorai. A nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) transzkripciójának gátlása mellett az AGE termékek szintjének csökkentésével a RAGE indukálta NF- κ B expressziót is csökkenti (241). Egyes vizsgálatok a metformin senescence-asszociált szekretoros fenotípus NF- κ B-n keresztüli gátlását is igazolták. (241-243). A metformin gátló hatása az NF- κ B fokozott aktivitására előnyös lehet a diabéteszes szövődmények kialakulásának csökkentése mellett a daganatkeletkezés mérséklésében is (244). Kérdéses azonban a metformin pontos hatásmechanizmusa a különböző jelátviteli folyamatokra, mint például az Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) transzkripciós faktorra, amelynek

kimutatták a glioxaláz-1 transzkripcióját fokozó hatását (245). Egyre több kutatási eredmény támasztja alá a metformin jótékony hatását az oxidatív stresszre, sőt sejtenyészeten és állatkísérletes modelleken végzett vizsgálatok felvetették szerepét a karcinogenezis gátlásában és az öregedés folyamatának lassításában is (238). Ezen folyamatok részletes megismeréséhez azonban további *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok szükségesek.

A metilglioxál túlermelődés mellett a glioxaláz 1 enzim csökkent működése szintén kiemelkedő szerepet tölt be a cukorbetegség szövődményeiben. Preklinikai állatkísérletes modellekben igazolták a glioxaláz 1 enzim csökkent aktivitását és ezzel párhuzamosan a MG által módosított fehérje, az MG-H1 emelkedett szintjét vese, retina és idegszövetben (165, 186, 246). Az érlelmeszedés patogenezisében is feltételezik a GLO-1 csökkent aktivitásának szerepét (247). A GLO-1 enzim csökkent transzkripciójának hátterében a RAGE és a hipoxia indukálta faktor 1 α (HIF1 α) szerepét igazolták (248, 249). Krónikus vesebetegség progressziója során is kimutatták a hipoxia indukálta csökkent GLO-1 aktivitást (250, 251). Ugyancsak feltételezik szerepét az öregedés folyamatában is, mivel egyrészt GLO-1 hatására a *Caenorhabditis elegans* hosszabb élettartamát figyelték meg (252), másrészt a GLO-1 csökkent aktivitását összefüggésbe hozták időskori sebgyógyulási zavarral (253).

A GLO-1 transzkripció szintű szabályozásában az Nrf2 elsődleges szerepe merült fel. Az oxidatív stressz hatására aktiválódó Nrf2 nukleáris transzlokációját követően kapcsolódik az un. antioxidáns válasz elem (ARE) gén régióhoz, így segítve elő az antioxidáns enzimek, köztük a GLO-1 génátíródását (245). Ezen mechanizmus kóros működésének szerepe lehet a daganatképződésben is (254), például tüdőrákban (255).

Vizsgálatunk során a metformin MG szintet csökkentő hatását igazoltuk frissen diagnosztizált 2-es típusú cukorbetegségben, aminek hátterében a GLO-1 enzimaktivitás fokozódását tudtuk igazolni. Vizsgálatunk limitáló tényezője a viszonylag alacsony betegszám mellett a rövid követési idő és az egykarú jelleg, azaz a kontroll csoport hiánya. Az egyes szövődmények kialakulására kifejtett hatás vizsgálatához további nagyobb elemszámú, randomizált vizsgálatok indokoltak. További limitáló tényező a vérsejteken történő vizsgálat, hiszen ezáltal a célszervek sejtjeiben zajló folyamatokra indirekt módon tudunk csak következtetni. Ebből következik, hogy a metformin hatására

bekövetkező molekuláris és jeltávíteli mechanizmusok részletesebb megismeréséhez további *in vitro* (sejtkultúrák) és *in vivo* (állatkísérleti modellek) vizsgálatok szükségesek.

Tekintettel arra, hogy a dikarbonil stressz számos degeneratív betegség patogenezisében szerepet játszik, a reaktív aldehidek képződését gátló vagy eliminációját hatékonyan elősegítő gyógyszeres lehetőségek vizsgálata kiemelkedő jelentőségű. Számos kutatás folyik ezen a téren, mint például egyes metilglioxál scavanger molekulák szintetizálása, illetve a GLO-1 induktorok kifejlesztése (187). A metformin mindkét tulajdonsággal rendelkezik, GLO-1 aktiváló hatása vizsgálatunk során is bizonyítást nyert, szerepe azonban a késői szövődmények megelőzésében további vizsgálatokat igényel.

II. A metformin kezelés hatása a vérzsírértékekre és a szív-és érrendszeri betegségek kockázatára 2-es típusú cukorbetegségben

Vizsgálatom második részében a metformin kezelés egyéb tényezőktől (életkor, BMI, betegség tartam és egyéb gyógyszeres kezelés) független összkoleszterin és LDL-koleszterin szintet csökkentő hatását mutattam ki antilipémiás kezelésben nem részesülő, 2-es típusú cukorbeteg körében. Ezen eredmény összhangban áll a korábbi összefoglaló elemzések eredményeivel, amelyek a metformin kezelés teljes koleszterin és LDL-koleszterin szintekre gyakorolt pozitív hatását írták le, a szérum triglicerid, HDL-koleszterin csökkentése nélkül (29, 209, 256). Ugyanakkor a nagy elemszámú tanulmányok esetében a statin és egyéb antilipémiás kezelés nehezítette a vérzsír szintekre gyakorolt hatás vizsgálatát. Egy közelmúltban megjelent tanulmány a metformin metabolikus profilra gyakorolt hatását vizsgálva három acil-alkil-foszfátidilkolin csökkent koncentrációját igazolta (30). Ennek hátterében a májsejtek AMP/ATP arányának növekedése állhat, amely fokozott AMPK aktivitáshoz vezet. Ennek következtében a SREBP1c transzkripciós faktor gátlódik, ez csökkentheti a zsírsav-deszaturáz-1 és -2 (FADS1 és -2) enzimek aktivitását, ami az LDL-koleszterin és a telítetlen zsírsavak (PUFA) csökkent képződéséhez vezet (30). Az arachidonsav szintjének csökkenése egy közelmúltban megjelent tanulmány szerint jelentős szerepet játszik a koleszterin-anyagcserében, mivel a membránok víztartalmának fokozódása révén fokozza az LDL-koleszterin receptorának újrahasznosulását (211). A metformin zsírsav-anyagcserére gyakorolt hatásában emellett szerepe lehet a táplálkozási szokásokra gyakorolt központi idegrendszeri hatásoknak is, hipotalamikusan AMPK gátló, illetve GLP-

1 aktiváló hatáson keresztül csökkent éhségérzethez és következményes csökkent táplálékfelvételhez vezet (199, 200). Egyes vizsgálatok a metformin epigenetikus hatását is alátámasztották, amelynek ugyancsak szerepe lehet az anyagcserére gyakorolt komplex hatásmechanizmusban (212, 213). Számos részlet azonban továbbra is tisztázatlan a metformin zsíryanycserére gyakorolt molekuláris hatásmechanizmusában. Vizsgálatunk erőssége a zsíryanycserére ható gyógyszerektől mentes beteganyagon végzett elemzés, ugyanakkor a keresztmetszeti jelleg jelentős limitáló tényező.

A korábbi randomizált vizsgálatokkal és nagy meta-analízisekkel összhangban jelen vizsgálatunkkal sem tudtuk igazolni a metformin feltételezett kardiovaszkuláris rizikó csökkentő hatását. Fontos azonban kiemelni, hogy vizsgálatunk viszonylag kis esetszámú, illetve keresztmetszeti jellegű, ennek megfelelően a kardiovaszkuláris rizikó csupán becsléssel volt vizsgálható. A metformin a szív- és érrendszeri betegségek kockázatára gyakorolt hatásával kapcsolatban ellentmondásos irodalmi adatok állnak rendelkezésre. A metformin terápia szív- és érrendszeri kemény végpontokra gyakorolt hatását igazoló randomizált, placebo kontrollált tanulmány nem áll rendelkezésre. Egyes tanulmányok azonban a metformin pozitív hatására hívták fel a figyelmet szív- és érrendszeri megbetegedések (257, 258), illetve ezek kockázati paramétereinek tekintetében (29, 256, 259-261). Kérdéses, hogy a feltételezett kardioprotektív hatás hátterében elsősorban az antidiabetikus hatás vagy egyéb pleiotrop hatásmechanizmusok, mint a zsíryanycserére, oxidatív stresszre vagy az érlemezés patomechanizmusában szintén szerepet játszó késői glikációs végtermékek képződésére gyakorolt hatások állnak-e? Számos, korábban részletezett mechanizmuson keresztül a reaktív metabolitok (metilglioxál) és ezek hatására képződő AGE-termékek kiemelkedő jelentőséggel bírnak a mikrovaszkuláris szövődmények patomechanizmusában (135, 262, 263), amelyek közül a diabéteszes nefropátiának szintén szerepet tulajdonítanak a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában (264). A közelmúltban az emelkedett plazma metilglioxál szív- és érrendszeri kockázatot növelő hatását mutatták ki 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben (137, 138). Számos tanulmány született a metformin szív-érrendszeri „surrogate markerekre” gyakorolt hatásával kapcsolatban, mint például csökkent fibrinogén aktivitás, fokozott fibrinolízis, illetve a thrombocytá-aggregációra kifejtett gátló hatás (201, 202). Jelátviteli folyamatokra gyakorolt hatásai is jelentősen hozzájárulhatnak ezen pleiotrop hatásokhoz, mint például az endothel-függő

vazodilatációt okozó hatás (265), a korábban már említett antiinflammatorikus hatás (csökkent C-reaktív protein, TNF- α , NF κ B, Nfr2) (27, 245, 266). Mindezen megfigyelések ellenére azonban továbbra is kérdéses a metformin terápia makrovaszkuláris szövődményekre gyakorolt megelőző hatása.

A metformin hosszútávú, szív-és érrendszeri rizikókra illetve a lipidparaméterekre gyakorolt hatásának megítéléséhez azonban nagyobb elemszámú, prospektív, kontrollált, randomizált vizsgálatra lenne szükség, amelyek megvalósulásának egyik fő limitáló tényezője a hiperlipidémia során alkalmazandó antilipémiás kezelés szükségessége. Ugyanakkor a metformin hatásainak részletesebb megismerése és megértése elsősorban az egyes szervspecifikus pleiotróp hatások sejtszintű vizsgálatával és az egyre több betegség patomechanizmusában igazolt epigenetikai tényezők részletesebb feltérképezésével érhető el.

III. Az argininben gazdag, zsírsavhoz kötött, ciklikus MG-kötő fehérje hatásának vizsgálata a MG plazma szintjére és a MG indukálta hiperalgéziára egerekben

A vizsgálatunk során alkalmazott scavenger molekula hatékonyan csökkentette a plazma metilglioxál koncentrációját állatkísérletes modellben. A ciklikus protein a 4 arginin aminosav tartalmának köszönhetően a metilglioxál argininhez való affinitását kihasználva csökkenti a MG plazma szintjét.

Számos farmakológiai kísérlet történt ezidáig a reaktív aldehideket megkötő scavenger molekulák kifejlesztésére (267). Ezek közül a legígéretesebb a guanidin csoportot tartalmazó aminoguanidin volt, amely azonban mellékhatásprofilja miatt nem került klinikai alkalmazásra (170, 171, 178). Erős affinitása a metilglioxálhoz eredményes és gyors csökkenést ért el a szérum MG szintjében patkányban (172; 268). Egyes vizsgálatok alátámasztották pozitív hatását albuminuria és retinopátia esetében is (173-175). A pyridoxamin in vitro hatékonyan bizonyult a karbonil stressz kiváltotta glikáció gátlásában (183). Emellett fémkelátor hatása következtében gátolja a fémionok által katalizált azon reakciókat, amelyek a glükóz autooxidációjához vezetnek (167, 183). Diabéteszes patkánymodellben normalizálta az albuminuriát, megelőző hatással bírt a retinopátiára és csökkentette a késői glikációs végtermékek szintjét (181, 269, 270). Ezen hatásai azonban humán vizsgálatok során nem nyertek megerősítést (184). Az alternatív scavenger molekulák, mint pl. a kreatin, szabad arginin illetve pyridoxamin elsősorban

rövid felezési idejük miatt nem bizonyultak alkalmasnak a reaktív aldehidek szintjének hatékony csökkentésére (271-273). A metformin scavenger funkciójával kapcsolatos vizsgálatokat korábbi fejezetekben részleteztem. Egy közelmúltban megjelent vizsgálat során az aminoguanidin, a D-arginin és a metformin hatékony MG-scavenger funkciója igazolódott állatkísérletes modellben (274).

A jó scavenger molekula legfontosabb kémiai tulajdonságai a szérum stabilitás, a viszonylag gyors reakciókészség. Az általunk alkalmazott molekula ezen tulajdonságoknak megfelel, hatékony, azonban klinikai alkalmazhatóságához számos további vizsgálatra van még szükség.

A vizsgálat második részében kimutattuk, hogy az általunk vizsgált CycK(Myr)₄E scavenger fehérje a MG megkötő hatásán keresztül képes csökkenteni a MG indukálta hiperalgéziát egerekben. Az idegsejtek fokozottan érzékenyek a metilglioxál okozta toxicitásra, aminek hátterében a glioxaláz-1 csökkent expresszióját feltételezik (164). Emellett megfigyelték, hogy a metilglioxál plazmaszintje a fájdalmas neuropátiában szenvedő cukorbetegekben szignifikánsan magasabb, mint a fájdalom nélküli betegekben (165). Ezen vizsgálat a MG hiperalgéziát okozó hatását is igazolta egerekben. Egy másik vizsgálatban szignifikáns összefüggést észleltek a MG-H1 plazma szintje és a termális hiperalgézia között (275), amit azonban egy későbbi vizsgálat nem erősített meg (163). A szérum metilglioxál illetve MG-H1 azonban nem kellően érzékeny mutatója az idegsejtekben lévő MG és MG-H1 koncentrációnak, hiszen az ülőidegben kifejezetten magas MG-H1 koncentrációt igazoltak, ami nem mutatott korrelációt a plazma MG szintekkel (276). Említést érdemel ugyanakkor, hogy a glioxaláz-1 knock out (Glo1^{-/-}) Schwann-sejtekben az aldo-keto-reduktáz aktiválódásának következtében nem észleltek emelkedett MG- és MG-H1-szinteket sem normoglikémiás, sem hiperglikémiás környezetben (98).

A MG a nociceptív neuronok feszültség-függő ioncsatornáinak működését károsítva fokozott fájdalomérzetet okoz, amelynek szerepe van a hiperalgéziával járó diabéteszes neuropátiában (165, 166). Az ioncsatornák (Nav1.8, TRPA1) poszttranszlációs módosításának hatására fokozott ingerlékenység, az nociceptív neuronok kisebb inger hatására bekövetkező kisülései és lassúbb inaktivációja következik be (165, 166, 277, 278). Kimutatták, hogy a streptozotocin kezelés termális hiperalgéziát és

idegsejtkárosodást okozó hatása összefüggést mutat az ülőidegben és a dorzális ganglionokban lévő immunsejtek csökkent számával, ami feltételezhetően az idegsejtek regenerációs képességének károsodásával van összefüggésben (279). Egy közelmúltban megjelent vizsgálat során szintén igazolták a streptozotocin indukálta diabéteszes egerekben jelentkező hiperalgéziát, ami a MG által módosított feszültség-függő ioncsatornák szelektív gátlásával megelőzhető volt (274). Ugyanezen vizsgálat során a MG kiváltotta hiperalgézia hatékonyan csökkenthető volt a MG-scavenger aminoguanidin, D-arginin és metformin hatására.

Az állatkísérletes eredményekkel szemben az ADDITION vizsgálat során nem találtak összefüggést a szérum MG szintje és az autonóm, illetve perifériás neuropátia között viszonylag rövid betegségtartamú (átlagos betegségtartam 5,8 év) cukorbetegek között (280). Ugyanezen munkacsoport azonban 2-es típusú cukorbetegek 13 éves követése során az emelkedett MG plazmaszint és a követés során megjelenő diabéteszes neuropátia között szignifikáns összefüggést igazolt (281).

A fájdalmas neuropátia kezelésében szerepet játszó gyógyszeres kezelések gyakran nem csökkentik elég hatékonyan a fájdalmat, és sok esetben mellékhatásokkal járnak (282). Ezért kifejezetten fontos olyan molekulák kifejlesztése, amelyek szemben a tüneti szerepekkel hatékonyan tudják csökkenteni a fájdalmat kiváltó mechanizmusokat. Vizsgálatunk limitáló tényezője, hogy csak egy módszerrel történt a hiperalgézia vizsgálata. További vizsgálatok indokoltak a fájdalomérzet csökkentésének pontosabb megítélésére és a vizsgált scavenger molekula a reaktív metabolitok által mediált késői szövődményekre gyakorolt hatásának vizsgálatára.

VI. Következtetések

1. A metformin képes a cukorbetegség során képződő reaktív aldehid, a metilglioxál plazmakoncentrációjának csökkentésére.
2. A cukorbetegségben fokozott mennyiségben termelődő trióz-foszfát intermedierek koncentrációja nem változik metformin kezelés hatására.
3. A metformin fokozza a glioxaláz-1 enzim aktivitását.
4. A metformin hatására nem változik a D-laktát plazmaszintje.
5. A metilglioxál szintet csökkentő hatáson kívül a metformin csökkenti a vérben keringő késői glikációs végtermékek koncentrációját.
6. A metformin kezelés alacsonyabb szérum össz- és LDL-koleszterin szinttel asszociált 2-es típusú cukorbetegségben.
7. A UKPDS kalkulátorral végzett szív- és érrendszeri kockázatbecslés azonban nem támasztja alá a metformin kezelés jótékony hatását a szív- és érrendszeri betegségek és halálozás kockázatára
8. Az argininben gazdag ciklikus fehérje, a CycK(Myf)R4E hatékonyan csökkenti a MG szintet egerekben.
9. A CycK(Myf)R4E fehérje gátolja a MG által kiváltotta hiperalgéziát egérmodellben.

VII. Összefoglalás

A krónikus hiperglikémia fokozza az intracelluláris reaktív oxigén gyökök (ROS) és a glikotoxikus intermedierek, mint a metilglioxál (MG) képződését. Az MG toxikus ágensként és a késői glikációs végtermékek (AGE) prekursoraként fontos szerepet tölt be a cukorbetegség késői szövődményeinek kialakulásában. A metformin az egyik legelterjedtebb orális antidiabetikum, azonban pontos hatásmechanizmusa a cukorbetegség szövődményeinek megelőzésében nem teljesen tisztázott. Prospektív vizsgálatunkban a metformin kezelés hatását vizsgáltuk a MG és AGE metabolizmusára frissen diagnosztizált, 2-es típusú cukorbetegekben. A vizsgálatunk második részében a metformin hatását vizsgáltuk retrospektív a lipid paraméterekre és a szív-érrendszeri rizikóra antilipémiás kezelésben nem részesülő, 2-es típusú cukorbetegekben. A harmadik tanulmányban egy ciklikus, argininben gazdag MG scavanger tulajdonságú fehérje (CycK(Myrr)R4E) hatását vizsgáltuk a MG plazma szintjére és a MG kiváltotta hiperalgéziára egerekben.

Vizsgálatunk során kimutattuk, hogy a metformin kezelés csökkentette a MG és az oxidatív stressz marker karboxi-metil-lizin (CML) plazma koncentrációját. Ennek hátterében a korábban feltételezett alacsony hatásfokú scavanger funkció mellett nagy valószínűséggel a vizsgálatunk során a perifériás mononukleáris sejtekben (és vörösvérsejtekben) észlelt fokozott glioxaláz-1 (Glo-1) aktivitás áll. A metformin kezelésben részesülő 2-es típusú cukorbetegek esetében a glikémiás paraméterektől függetlenül alacsonyabb össz- és LDL-koleszterin szinteket észleltünk. A HDL-koleszterin és a triglicerid szintek, valamint a több paramétert vizsgáló, kockázatbecslő számítás alapján a szív-érrendszeri kockázat tekintetében nem találtunk érdemi eltérést a két betegcsoport között. A vizsgálatunk harmadik részében a CycK(Myrr)R4E fehérjéről igazoltuk, hogy hatékonyan csökkenti a plazma MG szintjét és gátolja a MG indukálta hiperalgéziát egerekben.

Eredményeink alapján a metformin kezelés a metilglioxál detoxifikációjának fokozása révén hozzájárulhat az oxidatív stressz és glikáció mérsékléséhez. A metformin az LDL-koleszterin szintjét csökkenti a kardiovaszkuláris rizikó mérséklése nélkül. A vizsgált MG scavanger fehérje hatékonyan csökkentette a MG plazmaszintjét, és normalizálta a MG kiváltotta hiperalgéziát rágszálókkal végzett vizsgálatban.

VIII. Summary

Chronic hyperglycaemia increases the formation of intracellular reactive oxygen species (ROS) and glycotoxic intermediates, such as methylglyoxal (MG). MG plays an important role either as a toxic agent or a precursor for advanced glycation end products (AGE) in the development of diabetic complications. Metformin is the most widely prescribed oral glucose-lowering agent for the treatment of type 2 diabetes, but its exact mechanism of action to prevent diabetic complications is not completely understood. The effect of metformin on MG and AGE metabolism was studied in a prospective pilot trial in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. Furthermore, we investigated the effect of metformin therapy on lipid parameters and on cardiovascular risk in a retrospective study of patients with type 2 diabetes without lipid lowering therapy. Finally, we studied the role of an arginine-rich, cyclic peptide (CycK(Myrr)R4E) on the plasma MG levels and an MG-induced hyperalgesia in mice.

It has been shown, that metformin treatment is associated with a reduction of plasma MG and carboxymethyl-lysine (CML), a marker of oxidative stress. It has been previously suggested that this effect of metformin is due to its scavenging properties. Beside the scavenger function, we observed an increase in the glyoxalase-1 (Glo-1) enzyme activity, both in the peripheral mononuclear cells (and red blood cells (RBC)). This increased enzyme activity can partly be responsible for the observed lowering effect on plasma MG. Significant lower total and LDL-cholesterol levels were shown in patients with type 2 diabetes treated with metformin, compared to patients without metformin treatment. This effect was independent from glucose control. Furthermore, no intrinsic effect of metformin could be found on HDL cholesterol, triglycerides, and long-term cardiovascular risk using a multivariable risk assessment score. Finally, it has been shown that the MG-scavenger CycK(Myrr)R4E peptide is effective to reduce an MG-induced hyperalgesia by reducing plasma MG levels in mice.

According to our results metformin therapy could reduce the oxidative stress and glycation by improving the detoxification of MG. Metformin therapy has a beneficial effect on LDL cholesterol levels without improving cardiovascular risk. The MG scavenging peptide could reduce efficiently the plasma MG levels and could normalize the MG-induced hyperalgesia in rodents.

IX. Irodalomjegyzék

1. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, Cavan D, Shaw JE and Makaroff LE. (2017) *Idf Diabetes Atlas: Global Estimates for the Prevalence of Diabetes for 2015 and 2040. Diabetes research and clinical practice*, 128: 40-50.
2. Forbes JM and Cooper ME. (2013) *Mechanisms of Diabetic Complications. Physiol Rev*, 93: 137-188.
3. American Diabetes A. (2013) *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes care*, 36 Suppl 1: S67-74.
4. Frank RN. (2004) *Diabetic Retinopathy. N Engl J Med*, 350: 48-58.
5. Adeniyi AF, Adeleye JO and Adeniyi CY. (2010) *Diabetes, Sexual Dysfunction and Therapeutic Exercise: A 20 Year Review. Curr Diabetes Rev*, 6: 201-206.
6. Nouwen A, Nefs G, Caramlau I, Connock M, Winkley K, Lloyd CE, Peyrot M, Pouver F and European Depression in Diabetes Research C. (2011) *Prevalence of Depression in Individuals with Impaired Glucose Metabolism or Undiagnosed Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of the European Depression in Diabetes (Edid) Research Consortium. Diabetes care*, 34: 752-762.
7. Kloos C, Muller N, Hartmann P, Lehmann T, Samann A, Roth J, Wolf G and Muller UA. (2016) *High Quality of Diabetes Care Based Upon Individualised Treatment Goals - a Cross Sectional Study in 4784 Patients in Germany. Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 124: 294-299.
8. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, Rossing P, Tsapas A, Wexler DJ and Buse JB. (2018) *Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (Ada) and the European Association for the Study of Diabetes (Easd). Diabetes care*, 41: 2669-2701.
9. Lind M, Oden A, Fahlen M and Eliasson B. (2010) *The Shape of the Metabolic Memory of Hba1c: Re-Analysing the Dcct with Respect to Time-Dependent Effects. Diabetologia*, 53: 1093-1098.
10. Look ARG, Wing RR, Bolin P, Brancati FL, Bray GA, Clark JM, Coday M, Crow RS, Curtis JM, Egan CM, Espeland MA, Evans M, Foreyt JP, Ghazarian S, Gregg EW, Harrison B, Hazuda HP, Hill JO, Horton ES, Hubbard VS, Jakicic JM,

- Jeffery RW, Johnson KC, Kahn SE, Kitabchi AE, Knowler WC, Lewis CE, Maschak-Carey BJ, Montez MG, Murillo A, Nathan DM, Patricio J, Peters A, Pi-Sunyer X, Pownall H, Reboussin D, Regensteiner JG, Rickman AD, Ryan DH, Safford M, Wadden TA, Wagenknecht LE, West DS, Williamson DF and Yanovski SZ. (2013) Cardiovascular Effects of Intensive Lifestyle Intervention in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, 369: 145-154.
11. Haslbeck KM, Schleicher E, Bierhaus A, Nawroth P, Haslbeck M, Neundorfer B and Heuss D. (2005) The Age/Rage/Nf-(Kappa)B Pathway May Contribute to the Pathogenesis of Polyneuropathy in Impaired Glucose Tolerance (Igt). *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 113: 288-291.
 12. Diabetes C, Complications Trial /Epidemiology of Diabetes I, Complications Study Research G (2016) Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Outcomes in Type 1 Diabetes: The DCCT/EDIC Study 30-Year Follow-up. *Diabetes Care*, 39: 686-693
 13. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998) Intensive Blood-Glucose Control with Sulphonylureas or Insulin Compared with Conventional Treatment and Risk of Complications in Patients with Type 2 Diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 352: 837-853.
 14. Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study G, Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC, Jr., Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH, Jr., Probstfield JL, Simons-Morton DG and Friedewald WT. (2008) Effects of Intensive Glucose Lowering in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, 358: 2545-2559.
 15. Group AC, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Heller S, Liu L, Mancia G, Mogensen CE, Pan C, Poulter N, Rodgers A, Williams B, Bompoint S, de Galan BE, Joshi R and Travert F. (2008) Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, 358: 2560-2572.
 16. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, McCarren M, Vitek ME, Henderson WG, Huang GD and Investigators V. (2009) Glucose Control and

- Vascular Complications in Veterans with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, 360: 129-139.
17. Thornalley PJ. (2005) Dicarbonyl Intermediates in the Maillard Reaction. *Ann N Y Acad Sci*, 1043: 111-117.
 18. Thornalley PJ. (2008) Protein and Nucleotide Damage by Glyoxal and Methylglyoxal in Physiological Systems--Role in Ageing and Disease. *Drug Metabol Drug Interact*, 23: 125-150.
 19. Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, Basso E, Seraglia R and Traldi P. (2003) Glyoxal and Methylglyoxal Levels in Diabetic Patients: Quantitative Determination by a New Gc/Ms Method. *Clin Chem Lab Med*, 41: 1166-1173.
 20. Han Y, Randell E, Vasdev S, Gill V, Gadag V, Newhook LA, Grant M and Hagerty D. (2007) Plasma Methylglyoxal and Glyoxal Are Elevated and Related to Early Membrane Alteration in Young, Complication-Free Patients with Type 1 Diabetes. *Mol Cell Biochem*, 305: 123-131.
 21. Kong X, Ma MZ, Huang K, Qin L, Zhang HM, Yang Z, Li XY and Su Q. (2014) Increased Plasma Levels of the Methylglyoxal in Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes 2. *J Diabetes*, 6: 535-540.
 22. Brings S, Zhang S, Choong YS, Hogl S, Middleditch M, Kamalov M, Brimble MA, Gong D and Cooper GJ. (2015) Diabetes-Induced Alterations in Tissue Collagen and Carboxymethyllysine in Rat Kidneys: Association with Increased Collagen-Degrading Proteinases and Amelioration by Cu(Ii)-Selective Chelation. *Biochim Biophys Acta*, 1852: 1610-1618.
 23. van Eupen MG, Schram MT, Colhoun HM, Scheijen JL, Stehouwer CD and Schalkwijk CG. (2013) Plasma Levels of Advanced Glycation Endproducts Are Associated with Type 1 Diabetes and Coronary Artery Calcification. *Cardiovasc Diabetol*, 12: 149.
 24. Beisswenger PJ, Howell SK, Russell GB, Miller ME, Rich SS and Mauer M. (2013) Early Progression of Diabetic Nephropathy Correlates with Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation End Products. *Diabetes care*, 36: 3234-3239.

25. Roumie CL, Hung AM, Greevy RA, Grijalva CG, Liu X, Murff HJ, Elasy TA and Griffin MR. (2012) Comparative Effectiveness of Sulfonylurea and Metformin Monotherapy on Cardiovascular Events in Type 2 Diabetes Mellitus: A Cohort Study. *Annals of internal medicine*, 157: 601-610.
26. Roussel R, Travert F, Pasquet B, Wilson PW, Smith SC, Jr., Goto S, Ravaud P, Marre M, Porath A, Bhatt DL, Steg PG and Reduction of Atherothrombosis for Continued Health Registry I. (2010) Metformin Use and Mortality among Patients with Diabetes and Atherothrombosis. *Arch Intern Med*, 170: 1892-1899.
27. Pernicova I and Korbonits M. (2014) Metformin--Mode of Action and Clinical Implications for Diabetes and Cancer. *Nat Rev Endocrinol*, 10: 143-156.
28. Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S and Szwegold BS. (1999) Metformin Reduces Systemic Methylglyoxal Levels in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 48: 198-202.
29. Wulffele MG, Kooy A, de Zeeuw D, Stehouwer CD and Gansevoort RT. (2004) The Effect of Metformin on Blood Pressure, Plasma Cholesterol and Triglycerides in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Journal of internal medicine*, 256: 1-14.
30. Xu T, Brandmaier S, Messias AC, Herder C, Draisma HH, Demirkan A, Yu Z, Ried JS, Haller T, Heier M, Campillos M, Fobo G, Stark R, Holzappel C, Adam J, Chi S, Rotter M, Panni T, Quante AS, He Y, Prehn C, Roemisch-Margl W, Kastenmuller G, Willemsen G, Pool R, Kasa K, van Dijk KW, Hankemeier T, Meisinger C, Thorand B, Ruepp A, Hrabe de Angelis M, Li Y, Wichmann HE, Stratmann B, Strauch K, Metspalu A, Gieger C, Suhre K, Adamski J, Illig T, Rathmann W, Roden M, Peters A, van Duijn CM, Boomsma DI, Meitinger T and Wang-Sattler R. (2015) Effects of Metformin on Metabolite Profiles and Ldl Cholesterol in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes care*, 38: 1858-1867.
31. Redekop WK, Koopmanschap MA, Stolk RP, Rutten GE, Wolffenbuttel BH and Niessen LW. (2002) Health-Related Quality of Life and Treatment Satisfaction in Dutch Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes care*, 25: 458-463.
32. Morahan G. (2012) Insights into Type 1 Diabetes Provided by Genetic Analyses. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 19: 263-270.

33. Richardson SJ and Morgan NG. (2018) Enteroviral Infections in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes: New Insights for Therapeutic Intervention. *Curr Opin Pharmacol*, 43: 11-19.
34. Herder C and Roden M. (2011) Genetics of Type 2 Diabetes: Pathophysiologic and Clinical Relevance. *Eur J Clin Invest*, 41: 679-692.
35. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward WK, Beard JC, Palmer JP and et al. (1993) Quantification of the Relationship between Insulin Sensitivity and Beta-Cell Function in Human Subjects. Evidence for a Hyperbolic Function. *Diabetes*, 42: 1663-1672.
36. Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H and Eckel RH. (2008) The Metabolic Syndrome. *Endocr Rev*, 29: 777-822.
37. Gale EA. (2005) The Myth of the Metabolic Syndrome. *Diabetologia*, 48: 1679-1683.
38. Kampmann U, Madsen LR, Skajaa GO, Iversen DS, Moeller N and Ovesen P. (2015) Gestational Diabetes: A Clinical Update. *World J Diabetes*, 6: 1065-1072.
39. Cukierman T, Gerstein HC and Williamson JD. (2005) Cognitive Decline and Dementia in Diabetes--Systematic Overview of Prospective Observational Studies. *Diabetologia*, 48: 2460-2469.
40. Kopf S, Groener JB, Kender Z, Fleming T, Brune M, Riedinger C, Volk N, Herpel E, Pesta D, Szendrodi J, Wielputz MO, Kauczor HU, Katus HA, Kreuter M and Nawroth PP. (2018) Breathlessness and Restrictive Lung Disease: An Important Diabetes-Related Feature in Patients with Type 2 Diabetes. *Respiration*, 96: 29-40.
41. Glass CK and Witztum JL. (2001) Atherosclerosis. The Road Ahead. *Cell*, 104: 503-516.
42. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K and Laakso M. (1998) Mortality from Coronary Heart Disease in Subjects with Type 2 Diabetes and in Nondiabetic Subjects with and without Prior Myocardial Infarction. *N Engl J Med*, 339: 229-234.
43. Domanski M, Mitchell G, Pfeffer M, Neaton JD, Norman J, Svendsen K, Grimm R, Cohen J, Stamler J and Group MR. (2002) Pulse Pressure and Cardiovascular

- Disease-Related Mortality: Follow-up Study of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (Mrfit). *JAMA*, 287: 2677-2683.
44. Kahn SE, Cooper ME and Del Prato S. (2014) Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes: Perspectives on the Past, Present, and Future. *Lancet*, 383: 1068-1083.
 45. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC and Holman RR. (2000) Association of Glycaemia with Macrovascular and Microvascular Complications of Type 2 Diabetes (Ukpbs 35): Prospective Observational Study. *BMJ*, 321: 405-412.
 46. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR and Neil HA. (2008) 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, 359: 1577-1589.
 47. Ray KK, Seshasai SR, Erqou S, Sever P, Jukema JW, Ford I and Sattar N. (2010) Statins and All-Cause Mortality in High-Risk Primary Prevention: A Meta-Analysis of 11 Randomized Controlled Trials Involving 65,229 Participants. *Arch Intern Med*, 170: 1024-1031.
 48. Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, McCagg A, White JA, Theroux P, Darius H, Lewis BS, Ophuis TO, Jukema JW, De Ferrari GM, Ruzyllo W, De Lucca P, Im K, Bohula EA, Reist C, Wiviott SD, Tereshakovec AM, Musliner TA, Braunwald E, Califf RM and Investigators I-I. (2015) Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med*, 372: 2387-2397.
 49. Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH and Pedersen O. (2008) Effect of a Multifactorial Intervention on Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, 358: 580-591.
 50. Cooper ME. (1998) Pathogenesis, Prevention, and Treatment of Diabetic Nephropathy. *Lancet*, 352: 213-219.
 51. Boddana P, Caskey F, Casula A and Ansell D. (2009) Uk Renal Registry 11th Annual Report (December 2008): Chapter 14 Uk Renal Registry and International Comparisons. *Nephron Clin Pract*, 111 Suppl 1: c269-276.
 52. Chronic Kidney Disease Prognosis C, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J and Gansevoort RT. (2010) Association of Estimated Glomerular Filtration Rate and Albuminuria with All-

- Cause and Cardiovascular Mortality in General Population Cohorts: A Collaborative Meta-Analysis. *Lancet*, 375: 2073-2081.
53. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK and Yeo KT. (1994) Increased Vascular Endothelial Growth Factor Levels in the Vitreous of Eyes with Proliferative Diabetic Retinopathy. *Am J Ophthalmol*, 118: 445-450.
 54. Abbott CA, Malik RA, van Ross ER, Kulkarni J and Boulton AJ. (2011) Prevalence and Characteristics of Painful Diabetic Neuropathy in a Large Community-Based Diabetic Population in the U.K. *Diabetes care*, 34: 2220-2224.
 55. Kopf S, Groener JB, Kender Z, Fleming T, Bischoff S, Jende J, Schumann C, Ries S, Bendszus M, Schuh-Hofer S, Treede RD and Nawroth PP. (2018) Deep Phenotyping Neuropathy: An Underestimated Complication in Patients with Pre-Diabetes and Type 2 Diabetes Associated with Albuminuria. *Diabetes research and clinical practice*, 146: 191-201.
 56. Selvarajah D, Wilkinson ID, Emery CJ, Harris ND, Shaw PJ, Witte DR, Griffiths PD and Tesfaye S. (2006) Early Involvement of the Spinal Cord in Diabetic Peripheral Neuropathy. *Diabetes care*, 29: 2664-2669.
 57. Wessels AM, Rombouts SA, Simsek S, Kuijjer JP, Kostense PJ, Barkhof F, Scheltens P, Snoek FJ and Heine RJ. (2006) Microvascular Disease in Type 1 Diabetes Alters Brain Activation: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *Diabetes*, 55: 334-340.
 58. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D and American Diabetes A. (2005) Diabetic Neuropathies: A Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care*, 28: 956-962.
 59. Brownlee M. (2001) Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications. *Nature*, 414: 813-820.
 60. Brownlee M. (2005) The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes*, 54: 1615-1625.
 61. Dvornik E, Simard-Duquesne N, Krami M, Sestanjk K, Gabbay KH, Kinoshita JH, Varma SD and Merola LO. (1973) Polyol Accumulation in Galactosemic and Diabetic Rats: Control by an Aldose Reductase Inhibitor. *Science*, 182: 1146-1148.

62. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J and Brownlee M. (2000) Hyperglycemia-Induced Mitochondrial Superoxide Overproduction Activates the Hexosamine Pathway and Induces Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression by Increasing Sp1 Glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 12222-12226.
63. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K and King GL. (1997) Characterization of Protein Kinase C Beta Isoform Activation on the Gene Expression of Transforming Growth Factor-Beta, Extracellular Matrix Components, and Prostanoids in the Glomeruli of Diabetic Rats. *J Clin Invest*, 100: 115-126.
64. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ and King GL. (2000) Regulation of Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Endothelial Cells and in Vivo : A Specific Vascular Action of Insulin. *Circulation*, 101: 676-681.
65. Kim SW, Schifano M, Oleksyn D, Jordan CT, Ryan D, Insel R, Zhao J and Chen L. (2014) Protein Kinase C-Associated Kinase Regulates Nf-Kappab Activation through Inducing Ikk Activation. *Int J Oncol*, 45: 1707-1714.
66. Moscat J, Diaz-Meco MT and Rennert P. (2003) Nf-Kappab Activation by Protein Kinase C Isoforms and B-Cell Function. *EMBO Rep*, 4: 31-36.
67. Lukic IK, Humpert PM, Nawroth PP and Bierhaus A. (2008) The Rage Pathway: Activation and Perpetuation in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Ann N Y Acad Sci*, 1126: 76-80.
68. Droge W. (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*, 82: 47-95.
69. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I and Brownlee M. (2000) Normalizing Mitochondrial Superoxide Production Blocks Three Pathways of Hyperglycaemic Damage. *Nature*, 404: 787-790.
70. Maiolino G, Rossitto G, Caielli P, Bisogni V, Rossi GP and Calo LA. (2013) The Role of Oxidized Low-Density Lipoproteins in Atherosclerosis: The Myths and the Facts. *Mediators Inflamm*, 2013: 714653.
71. Stark J. (2015) Oxidative Stress and Atherosclerosis. *Orv Hetil*, 156: 1115-1119.

72. Giugliano D, Ceriello A and Paolisso G. (1996) Oxidative Stress and Diabetic Vascular Complications. *Diabetes care*, 19: 257-267.
73. Gowri MS, Van der Westhuyzen DR, Bridges SR and Anderson JW. (1999) Decreased Protection by Hdl from Poorly Controlled Type 2 Diabetic Subjects against Ldl Oxidation May Be Due to the Abnormal Composition of Hdl. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 2226-2233.
74. Davis TM, Yeap BB, Davis WA and Bruce DG. (2008) Lipid-Lowering Therapy and Peripheral Sensory Neuropathy in Type 2 Diabetes: The Fremantle Diabetes Study. *Diabetologia*, 51: 562-566.
75. Ansquer JC, Foucher C, Rattier S, Taskinen MR, Steiner G and Investigators D. (2005) Fenofibrate Reduces Progression to Microalbuminuria over 3 Years in a Placebo-Controlled Study in Type 2 Diabetes: Results from the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (Dais). *Am J Kidney Dis*, 45: 485-493.
76. Park CW, Zhang Y, Zhang X, Wu J, Chen L, Cha DR, Su D, Hwang MT, Fan X, Davis L, Striker G, Zheng F, Breyer M and Guan Y. (2006) Pparalpha Agonist Fenofibrate Improves Diabetic Nephropathy in Db/Db Mice. *Kidney Int*, 69: 1511-1517.
77. Beisswenger PJ, Howell SK, Nelson RG, Mauer M and Szwegold BS. (2003) Alpha-Oxoaldehyde Metabolism and Diabetic Complications. *Biochem Soc Trans*, 31: 1358-1363.
78. Turk Z. (2010) Glycotoxines, Carbonyl Stress and Relevance to Diabetes and Its Complications. *Physiol Res*, 59: 147-156.
79. Thornalley PJ. (1993) The Glyoxalase System in Health and Disease. *Mol Aspects Med*, 14: 287-371.
80. Nagao M, Fujita Y, Sugimura T and Kosuge T. (1986) Methylglyoxal in Beverages and Foods: Its Mutagenicity and Carcinogenicity. *IARC Sci Publ*: 283-291.
81. Kalapos MP. (2008) Methylglyoxal and Glucose Metabolism: A Historical Perspective and Future Avenues for Research. *Drug Metabol Drug Interact*, 23: 69-91.
82. Leoncini G. (1979) The Role of Alpha-Ketoaldehydes in Biological Systems. *Ital J Biochem*, 28: 285-294.

83. Kozarich JW and Deegan JL. (1979) 7-Methylguanosine-Dependent Inhibition of Globin Mrna Translation by Methylglyoxal. *J Biol Chem*, 254: 9345-9348.
84. Vander Jagt DL. (2008) Methylglyoxal, Diabetes Mellitus and Diabetic Complications. *Drug Metabol Drug Interact*, 23: 93-124.
85. Fleming TH, Humpert PM, Nawroth PP and Bierhaus A. (2011) Reactive Metabolites and Age/Rage-Mediated Cellular Dysfunction Affect the Aging Process: A Mini-Review. *Gerontology*, 57: 435-443.
86. Phillips SA and Thornalley PJ. (1993) The Formation of Methylglyoxal from Triose Phosphates. Investigation Using a Specific Assay for Methylglyoxal. *Eur J Biochem*, 212: 101-105.
87. Ponces Freire A, Ferreira A, Gomes R and Cordeiro C. (2003) Anti-Glycation Defences in Yeast. *Biochem Soc Trans*, 31: 1409-1412.
88. Cooper RA and Anderson A. (1970) The Formation and Catabolism of Methylglyoxal During Glycolysis in *Escherichia Coli*. *FEBS Lett*, 11: 273-276.
89. Murata K, Saikusa T, Fukuda Y, Watanabe K, Inoue Y, Shimosaka M and Kimura A. (1986) Metabolism of 2-Oxoaldehydes in Yeasts. Possible Role of Glycolytic Bypass as a Detoxification System in L-Threonine Catabolism by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 157: 297-301.
90. Bechara EJ, Dutra F, Cardoso VE, Sartori A, Olympio KP, Penatti CA, Adhikari A and Assuncao NA. (2007) The Dual Face of Endogenous Alpha-Aminoketones: Pro-Oxidizing Metabolic Weapons. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 146: 88-110.
91. Magyar K and Meszaros Z. (2003) Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase (Ssao): Present and Future. *Inflammopharmacology*, 11: 165-173.
92. Kalapos MP. (1999) Methylglyoxal in Living Organisms: Chemistry, Biochemistry, Toxicology and Biological Implications. *Toxicol Lett*, 110: 145-175.
93. Miyata T, Kurokawa K and Van Ypersele De Strihou C. (2000) Advanced Glycation and Lipoxidation End Products: Role of Reactive Carbonyl Compounds Generated During Carbohydrate and Lipid Metabolism. *J Am Soc Nephrol*, 11: 1744-1752.

94. Thornalley PJ. (1990) The Glyoxalase System: New Developments Towards Functional Characterization of a Metabolic Pathway Fundamental to Biological Life. *Biochem J*, 269: 1-11.
95. Talesa V, Uotila L, Koivusalo M, Principato G, Giovannini E and Rosi G. (1989) Isolation of Glyoxalase II from Two Different Compartments of Rat Liver Mitochondria. Kinetic and Immunochemical Characterization of the Enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 993: 7-11.
96. Vander Jagt DL, Robinson B, Taylor KK and Hunsaker LA. (1992) Reduction of Trioses by NADPH-Dependent Aldo-Keto Reductases. Aldose Reductase, Methylglyoxal, and Diabetic Complications. *J Biol Chem*, 267: 4364-4369.
97. Schumacher D, Morgenstern J, Oguchi Y, Volk N, Kopf S, Groener JB, Nawroth PP, Fleming T and Freichel M. (2018) Compensatory Mechanisms for Methylglyoxal Detoxification in Experimental & Clinical Diabetes. *Mol Metab*, 18: 143-152.
98. Morgenstern J, Fleming T, Schumacher D, Eckstein V, Freichel M, Herzig S and Nawroth P. (2017) Loss of Glyoxalase 1 Induces Compensatory Mechanism to Achieve Dicarboxyl Detoxification in Mammalian Schwann Cells. *J Biol Chem*, 292: 3224-3238.
99. Argiles JM. (1989) The Oxidation of Methylglyoxal by Mammalian Pyruvate Dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 273: 238-244.
100. Vander Jagt DL and Hunsaker LA. (2003) Methylglyoxal Metabolism and Diabetic Complications: Roles of Aldose Reductase, Glyoxalase-I, Betaine Aldehyde Dehydrogenase and 2-Oxoaldehyde Dehydrogenase. *Chem Biol Interact*, 143-144: 341-351.
101. Monder C. (1967) Alpha-Keto Aldehyde Dehydrogenase, an Enzyme That Catalyzes the Enzymic Oxidation of Methylglyoxal to Pyruvate. *J Biol Chem*, 242: 4603-4609.
102. Thornalley PJ. (1988) Modification of the Glyoxalase System in Human Red Blood Cells by Glucose in Vitro. *Biochem J*, 254: 751-755.
103. Atkins TW and Thornalley PJ. (1989) Erythrocyte Glyoxalase Activity in Genetically Obese (Ob/Ob) and Streptozotocin Diabetic Mice. *Diabetes Res*, 11: 125-129.

104. Nemet I, Turk Z, Duvnjak L, Car N and Varga-Defterdarovic L. (2005) Humoral Methylglyoxal Level Reflects Glycemic Fluctuation. *Clin Biochem*, 38: 379-383.
105. Thornalley PJ, Hooper NI, Jennings PE, Florkowski CM, Jones AF, Lunec J and Barnett AH. (1989) The Human Red Blood Cell Glyoxalase System in Diabetes Mellitus. *Diabetes research and clinical practice*, 7: 115-120.
106. Kalapos MP. (1992) Medical Aspects of Methylglyoxal Metabolism. *Orv Hetil*, 133: 587-591.
107. Lyles GA. (1996) Mammalian Plasma and Tissue-Bound Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidases: Biochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects. *Int J Biochem Cell Biol*, 28: 259-274.
108. Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Nacmias B, Bagnoli S, Nassi P and Liguri G. (2002) Oxidative Stress and Reduced Antioxidant Defenses in Peripheral Cells from Familial Alzheimer's Patients. *Free Radic Biol Med*, 33: 1372-1379.
109. Baynes JW and Thorpe SR. (2000) Glycooxidation and Lipoxidation in Atherogenesis. *Free Radic Biol Med*, 28: 1708-1716.
110. Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Vander Jagt TJ, Gomez MS, Gonzales DM, Deck LM and Royer RE. (1997) Inactivation of Glutathione Reductase by 4-Hydroxynonenal and Other Endogenous Aldehydes. *Biochem Pharmacol*, 53: 1133-1140.
111. Irshad Z, Xue M, Ashour A, Larkin JR, Thornalley PJ and Rabbani N. (2019) Activation of the Unfolded Protein Response in High Glucose Treated Endothelial Cells Is Mediated by Methylglyoxal. *Sci Rep*, 9: 7889.
112. Masania J, Malczewska-Malec M, Razny U, Goralska J, Zdzienicka A, Kiec-Wilk B, Gruca A, Stancel-Mozwillo J, Dembinska-Kiec A, Rabbani N and Thornalley PJ. (2016) Dicarbonyl Stress in Clinical Obesity. *Glycoconj J*, 33: 581-589.
113. Maessen DE, Brouwers O, Gaens KH, Wouters K, Cleutjens JP, Janssen BJ, Miyata T, Stehouwer CD and Schalkwijk CG. (2016) Delayed Intervention with Pyridoxamine Improves Metabolic Function and Prevents Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes*, 65: 956-966.

- 114.Degen J, Vogel M, Richter D, Hellwig M and Henle T. (2013) Metabolic Transit of Dietary Methylglyoxal. *J Agric Food Chem*, 61: 10253-10260.
- 115.Nye C, Kim J, Kalhan SC and Hanson RW. (2008) Reassessing Triglyceride Synthesis in Adipose Tissue. *Trends Endocrinol Metab*, 19: 356-361.
- 116.Maldonado E, Rabbani, N., Thornalley, P., Wang, H., Miller, M., Dillon, J., Moore, J. (2015) Examination of Methylglyoxal Levels in an in Vitro Model of Steatosis and Serum from Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 74: E1.
- 117.Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T and Thornalley PJ. (1994) Binding and Modification of Proteins by Methylglyoxal under Physiological Conditions. A Kinetic and Mechanistic Study with N Alpha-Acetylarginine, N Alpha-Acetylcysteine, and N Alpha-Acetyllysine, and Bovine Serum Albumin. *J Biol Chem*, 269: 32299-32305.
- 118.Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei-Jadidi R and Dawnay A. (2003) Quantitative Screening of Advanced Glycation Endproducts in Cellular and Extracellular Proteins by Tandem Mass Spectrometry. *Biochem J*, 375: 581-592.
- 119.Lee J and Ozcan U. (2014) Unfolded Protein Response Signaling and Metabolic Diseases. *J Biol Chem*, 289: 1203-1211.
- 120.Kalapos MP. (1994) Methylglyoxal Toxicity in Mammals. *Toxicol Lett*, 73: 3-24.
- 121.Szent-Gyorgyi A. (1966) Growth and Organization. *Biochem J*, 98: 641-644.
- 122.Murata-Kamiya N, Kamiya H, Kaji H and Kasai H. (2000) Methylglyoxal Induces G:C to C:G and G:C to T:A Transversions in the Supf Gene on a Shuttle Vector Plasmid Replicated in Mammalian Cells. *Mutat Res*, 468: 173-182.
- 123.Migliore L, Barale R, Bosco E, Giorgelli F, Minunni M, Scarpato R and Loprieno N. (1990) Genotoxicity of Methylglyoxal: Cytogenetic Damage in Human Lymphocytes in Vitro and in Intestinal Cells of Mice. *Carcinogenesis*, 11: 1503-1507.
- 124.Murata-Kamiya N and Kamiya H. (2001) Methylglyoxal, an Endogenous Aldehyde, Crosslinks DNA Polymerase and the Substrate DNA. *Nucleic Acids Res*, 29: 3433-3438.

125. Ekelund S, Nygren P and Larsson R. (2001) Guanidino-Containing Drugs in Cancer Chemotherapy: Biochemical and Clinical Pharmacology. *Biochem Pharmacol*, 61: 1183-1193.
126. Jerzykowski T, Matuszewski W, Otrzonek N and Winter R. (1970) Antineoplastic Action of Methylglyoxal. *Neoplasma*, 17: 25-35.
127. Nokin MJ, Durieux F, Bellier J, Peulen O, Uchida K, Spiegel DA, Cochrane JR, Hutton CA, Castronovo V and Bellahcene A. (2017) Hormetic Potential of Methylglyoxal, a Side-Product of Glycolysis, in Switching Tumours from Growth to Death. *Sci Rep*, 7: 11722.
128. Chang KC, Paek KS, Kim HJ, Lee YS, Yabe-Nishimura C and Seo HG. (2002) Substrate-Induced up-Regulation of Aldose Reductase by Methylglyoxal, a Reactive Oxoaldehyde Elevated in Diabetes. *Mol Pharmacol*, 61: 1184-1191.
129. Du J, Cai S, Suzuki H, Akhand AA, Ma X, Takagi Y, Miyata T, Nakashima I and Nagase F. (2003) Involvement of Mekk1/Erk/P21waf1/Cip1 Signal Transduction Pathway in Inhibition of Igf-I-Mediated Cell Growth Response by Methylglyoxal. *J Cell Biochem*, 88: 1235-1246.
130. Fan X, Subramaniam R, Weiss MF and Monnier VM. (2003) Methylglyoxal-Bovine Serum Albumin Stimulates Tumor Necrosis Factor Alpha Secretion in Raw 264.7 Cells through Activation of Mitogen-Activating Protein Kinase, Nuclear Factor Kappab and Intracellular Reactive Oxygen Species Formation. *Arch Biochem Biophys*, 409: 274-286.
131. Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, El-Remessy AE, Al-Shabrawey M, Platt DH, Liou GI and Caldwell RW. (2005) Vascular Endothelial Growth Factor and Diabetic Retinopathy: Role of Oxidative Stress. *Curr Drug Targets*, 6: 511-524.
132. Singh R, Barden A, Mori T and Beilin L. (2001) Advanced Glycation End-Products: A Review. *Diabetologia*, 44: 129-146.
133. Rabbani N and Thornalley PJ. (2011) Glyoxalase in Diabetes, Obesity and Related Disorders. *Semin Cell Dev Biol*, 22: 309-317.
134. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM and Nawroth PP. (2005) Understanding RAGE, the Receptor for Advanced Glycation End Products. *J Mol Med (Berl)*, 83: 876-886.

135. Bierhaus A and Nawroth PP. (2009) Multiple Levels of Regulation Determine the Role of the Receptor for Age (Rage) as Common Soil in Inflammation, Immune Responses and Diabetes Mellitus and Its Complications. *Diabetologia*, 52: 2251-2263.
136. Moraru A, Wiederstein J, Pfaff D, Fleming T, Miller AK, Nawroth P and Teleman AA. (2018) Elevated Levels of the Reactive Metabolite Methylglyoxal Recapitulate Progression of Type 2 Diabetes. *Cell Metab*, 27: 926-934 e928.
137. Hanssen NMJ, Scheijen J, Jorsal A, Parving HH, Tarnow L, Rossing P, Stehouwer CDA and Schalkwijk CG. (2017) Higher Plasma Methylglyoxal Levels Are Associated with Incident Cardiovascular Disease in Individuals with Type 1 Diabetes: A 12-Year Follow-up Study. *Diabetes*, 66: 2278-2283.
138. Hanssen NMJ, Westerink J, Scheijen J, van der Graaf Y, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG and Group SS. (2018) Higher Plasma Methylglyoxal Levels Are Associated with Incident Cardiovascular Disease and Mortality in Individuals with Type 2 Diabetes. *Diabetes care*, 41: 1689-1695.
139. Brouwers O, Niessen PM, Miyata T, Ostergaard JA, Flyvbjerg A, Peutz-Kootstra CJ, Sieber J, Mundel PH, Brownlee M, Janssen BJ, De Mey JG, Stehouwer CD and Schalkwijk CG. (2014) Glyoxalase-1 Overexpression Reduces Endothelial Dysfunction and Attenuates Early Renal Impairment in a Rat Model of Diabetes. *Diabetologia*, 57: 224-235.
140. Giacco F, Du X, D'Agati VD, Milne R, Sui G, Geoffrion M and Brownlee M. (2014) Knockdown of Glyoxalase 1 Mimics Diabetic Nephropathy in Nondiabetic Mice. *Diabetes*, 63: 291-299.
141. Berner AK, Brouwers O, Pringle R, Klaassen I, Colhoun L, McVicar C, Brockbank S, Curry JW, Miyata T, Brownlee M, Schlingemann RO, Schalkwijk C and Stitt AW. (2012) Protection against Methylglyoxal-Derived Ages by Regulation of Glyoxalase 1 Prevents Retinal Neuroglial and Vasodegenerative Pathology. *Diabetologia*, 55: 845-854.
142. Jack MM, Ryals JM and Wright DE. (2012) Protection from Diabetes-Induced Peripheral Sensory Neuropathy--a Role for Elevated Glyoxalase I? *Exp Neurol*, 234: 62-69.

143. Makinen VP, Civelek M, Meng Q, Zhang B, Zhu J, Levian C, Huan T, Segre AV, Ghosh S, Vivar J, Nikpay M, Stewart AF, Nelson CP, Willenborg C, Erdmann J, Blakenberg S, O'Donnell CJ, Marz W, Laaksonen R, Epstein SE, Kathiresan S, Shah SH, Hazen SL, Reilly MP, Coronary ADG-WR, Meta-Analysis C, Luscis AJ, Samani NJ, Schunkert H, Quertermous T, McPherson R, Yang X and Assimes TL. (2014) Integrative Genomics Reveals Novel Molecular Pathways and Gene Networks for Coronary Artery Disease. *PLoS Genet*, 10: e1004502.
144. Goh SY and Cooper ME. (2008) Clinical Review: The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 1143-1152.
145. Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, Beisswenger P, Thorpe SR, Onorato J and Brownlee M. (1998) Overexpression of Glyoxalase-I in Bovine Endothelial Cells Inhibits Intracellular Advanced Glycation Endproduct Formation and Prevents Hyperglycemia-Induced Increases in Macromolecular Endocytosis. *J Clin Invest*, 101: 1142-1147.
146. Kilhovd BK, Berg TJ, Birkeland KI, Thorsby P and Hanssen KF. (1999) Serum Levels of Advanced Glycation End Products Are Increased in Patients with Type 2 Diabetes and Coronary Heart Disease. *Diabetes care*, 22: 1543-1548.
147. Hammes HP, Alt A, Niwa T, Clausen JT, Bretzel RG, Brownlee M and Schleicher ED. (1999) Differential Accumulation of Advanced Glycation End Products in the Course of Diabetic Retinopathy. *Diabetologia*, 42: 728-736.
148. Bucala R and Vlassara H. (1995) Advanced Glycosylation End Products in Diabetic Renal and Vascular Disease. *Am J Kidney Dis*, 26: 875-888.
149. Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D, Coughlan MT, Drew BG, Lancaster GI, Thomas M, Forbes JM, Nawroth PP, Bierhaus A, Cooper ME and Jandeleit-Dahm KA. (2008) Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Deficiency Attenuates the Development of Atherosclerosis in Diabetes. *Diabetes*, 57: 2461-2469.
150. Wang X, Desai K, Chang T and Wu L. (2005) Vascular Methylglyoxal Metabolism and the Development of Hypertension. *J Hypertens*, 23: 1565-1573.
151. Ciechanowski K, Kedzierska K, Golembiewska E, Safranow K, Bober J, Domanski L, Rozanski J and Myslak M. (2005) Impaired Synthesis Is Not the

- Reason for Decreased Activity of Extracellular Superoxide Dismutase in Patients with Diabetes. *Arch Med Res*, 36: 148-153.
- 152.Lee C, Yim MB, Chock PB, Yim HS and Kang SO. (1998) Oxidation-Reduction Properties of Methylglyoxal-Modified Protein in Relation to Free Radical Generation. *J Biol Chem*, 273: 25272-25278.
- 153.Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, Ozdemir AM, Kern TS, Szweda LI, Brownlee M, Monnier VM and Weiss MF. (2005) Glycation of Mitochondrial Proteins from Diabetic Rat Kidney Is Associated with Excess Superoxide Formation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289: F420-430.
- 154.Tan AL, Forbes JM and Cooper ME. (2007) Age, Rage, and Ros in Diabetic Nephropathy. *Semin Nephrol*, 27: 130-143.
- 155.Kunt T, Forst T, Wilhelm A, Tritschler H, Pfuetzner A, Harzer O, Engelbach M, Zschaebitz A, Stofft E and Beyer J. (1999) Alpha-Lipoic Acid Reduces Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Endothelial Adhesion of Human Monocytes after Stimulation with Advanced Glycation End Products. *Clin Sci (Lond)*, 96: 75-82.
- 156.Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A and Vlassara H. (1994) Modification of Low Density Lipoprotein by Advanced Glycation End Products Contributes to the Dyslipidemia of Diabetes and Renal Insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 9441-9445.
- 157.Golej J, Hoeger H, Radner W, Unfried G and Lubec G. (1998) Oral Administration of Methylglyoxal Leads to Kidney Collagen Accumulation in the Mouse. *Life Sci*, 63: 801-807.
- 158.Tan AL, Sourris KC, Harcourt BE, Thallas-Bonke V, Penfold S, Andrikopoulos S, Thomas MC, O'Brien RC, Bierhaus A, Cooper ME, Forbes JM and Coughlan MT. (2010) Disparate Effects on Renal and Oxidative Parameters Following Rage Deletion, Age Accumulation Inhibition, or Dietary Age Control in Experimental Diabetic Nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298: F763-770.
- 159.Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Ahmed N and Thornalley PJ. (2003) Accumulation of Fructosyl-Lysine and Advanced Glycation End Products in the Kidney, Retina and Peripheral Nerve of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biochem Soc Trans*, 31: 1423-1425.

160. Stitt AW. (2001) Advanced Glycation: An Important Pathological Event in Diabetic and Age Related Ocular Disease. *Br J Ophthalmol*, 85: 746-753.
161. Genuth S, Sun W, Cleary P, Gao X, Sell DR, Lachin J, Group DER and Monnier VM. (2015) Skin Advanced Glycation End Products Glucosepane and Methylglyoxal Hydroimidazolone Are Independently Associated with Long-Term Microvascular Complication Progression of Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 64: 266-278.
162. Sveen KA, Karime B, Jorum E, Mellgren SI, Fagerland MW, Monnier VM, Dahl-Jorgensen K and Hanssen KF. (2013) Small- and Large-Fiber Neuropathy after 40 Years of Type 1 Diabetes: Associations with Glycemic Control and Advanced Protein Glycation: The Oslo Study. *Diabetes care*, 36: 3712-3717.
163. Hansen CS, Jensen TM, Jensen JS, Nawroth P, Fleming T, Witte DR, Lauritzen T, Sandbaek A, Charles M, Fleischer J, Vistisen D and Jorgensen ME. (2015) The Role of Serum Methylglyoxal on Diabetic Peripheral and Cardiovascular Autonomic Neuropathy: The Addition Denmark Study. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 32: 778-785.
164. Jack MM, Ryals JM and Wright DE. (2011) Characterisation of Glyoxalase I in a Streptozocin-Induced Mouse Model of Diabetes with Painful and Insensate Neuropathy. *Diabetologia*, 54: 2174-2182.
165. Bierhaus A, Fleming T, Stoyanov S, Leffler A, Babes A, Neacsu C, Sauer SK, Eberhardt M, Schnolzer M, Lasitschka F, Neuhuber WL, Kichko TI, Konrade I, Elvert R, Mier W, Pirags V, Lukic IK, Morcos M, Dehmer T, Rabbani N, Thornalley PJ, Edelstein D, Nau C, Forbes J, Humpert PM, Schwaninger M, Ziegler D, Stern DM, Cooper ME, Haberkorn U, Brownlee M, Reeh PW and Nawroth PP. (2012) Methylglyoxal Modification of Nav1.8 Facilitates Nociceptive Neuron Firing and Causes Hyperalgesia in Diabetic Neuropathy. *Nat Med*, 18: 926-933.
166. Andersson DA, Gentry C, Light E, Vastani N, Vallortigara J, Bierhaus A, Fleming T and Bevan S. (2013) Methylglyoxal Evokes Pain by Stimulating Trpa1. *PLoS One*, 8: e77986.

167. Nagai R, Murray DB, Metz TO and Baynes JW. (2012) Chelation: A Fundamental Mechanism of Action of Age Inhibitors, Age Breakers, and Other Inhibitors of Diabetes Complications. *Diabetes*, 61: 549-559.
168. Sourris KC, Harcourt BE and Forbes JM. (2009) A New Perspective on Therapeutic Inhibition of Advanced Glycation in Diabetic Microvascular Complications: Common Downstream Endpoints Achieved through Disparate Therapeutic Approaches? *Am J Nephrol*, 30: 323-335.
169. Peyroux J and Sternberg M. (2006) Advanced Glycation Endproducts (Ages): Pharmacological Inhibition in Diabetes. *Pathol Biol (Paris)*, 54: 405-419.
170. Thornalley PJ. (2003) Use of Aminoguanidine (Pimagedine) to Prevent the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *Arch Biochem Biophys*, 419: 31-40.
171. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P and Cerami A. (1986) Aminoguanidine Prevents Diabetes-Induced Arterial Wall Protein Cross-Linking. *Science*, 232: 1629-1632.
172. Thornalley PJ, Yurek-George A and Argirov OK. (2000) Kinetics and Mechanism of the Reaction of Aminoguanidine with the Alpha-Oxoaldehydes Glyoxal, Methylglyoxal, and 3-Deoxyglucosone under Physiological Conditions. *Biochem Pharmacol*, 60: 55-65.
173. Degenhardt TP, Fu MX, Voss E, Reiff K, Neidlein R, Strein K, Thorpe SR, Baynes JW and Reiter R. (1999) Aminoguanidine Inhibits Albuminuria, but Not the Formation of Advanced Glycation End-Products in Skin Collagen of Diabetic Rats. *Diabetes research and clinical practice*, 43: 81-89.
174. Soulis T, Cooper ME, Sastra S, Thallas V, Panagiotopoulos S, Bjerrum OJ and Jerums G. (1997) Relative Contributions of Advanced Glycation and Nitric Oxide Synthase Inhibition to Aminoguanidine-Mediated Renoprotection in Diabetic Rats. *Diabetologia*, 40: 1141-1151.
175. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K and Brownlee M. (1991) Aminoguanidine Treatment Inhibits the Development of Experimental Diabetic Retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 11555-11558.
176. Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR, Jr., Williamson JR and McDaniel ML. (1992) Aminoguanidine, a

- Novel Inhibitor of Nitric Oxide Formation, Prevents Diabetic Vascular Dysfunction. *Diabetes*, 41: 552-556.
177. Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, Adler SG, Appel GB, Cartwright K, Foiles PG, Freedman BI, Raskin P, Ratner RE, Spinowitz BS, Whittier FC, Wuerth JP and Group AII. (2004) Randomized Trial of an Inhibitor of Formation of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. *Am J Nephrol*, 24: 32-40.
178. Freedman BI, Wuerth JP, Cartwright K, Bain RP, Dippe S, Hershon K, Mooradian AD and Spinowitz BS. (1999) Design and Baseline Characteristics for the Aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (Action II). *Control Clin Trials*, 20: 493-510.
179. Booth AA, Khalifah RG and Hudson BG. (1996) Thiamine Pyrophosphate and Pyridoxamine Inhibit the Formation of Antigenic Advanced Glycation End-Products: Comparison with Aminoguanidine. *Biochem Biophys Res Commun*, 220: 113-119.
180. Booth AA, Khalifah RG, Todd P and Hudson BG. (1997) In Vitro Kinetic Studies of Formation of Antigenic Advanced Glycation End Products (Ages). Novel Inhibition of Post-Amadori Glycation Pathways. *J Biol Chem*, 272: 5430-5437.
181. Tanimoto M, Gohda T, Kaneko S, Hagiwara S, Murakoshi M, Aoki T, Yamada K, Ito T, Matsumoto M, Horikoshi S and Tomino Y. (2007) Effect of Pyridoxamine (K-163), an Inhibitor of Advanced Glycation End Products, on Type 2 Diabetic Nephropathy in Kk-a(Y)/Ta Mice. *Metabolism*, 56: 160-167.
182. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, Thorpe SR and Baynes JW. (2002) Pyridoxamine Inhibits Early Renal Disease and Dyslipidemia in the Streptozotocin-Diabetic Rat. *Kidney Int*, 61: 939-950.
183. Voziyan PA, Khalifah RG, Thibaudeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS and Hudson BG. (2003) Modification of Proteins in Vitro by Physiological Levels of Glucose: Pyridoxamine Inhibits Conversion of Amadori Intermediate to Advanced Glycation End-Products through Binding of Redox Metal Ions. *J Biol Chem*, 278: 46616-46624.

184. Williams ME, Bolton WK, Khalifah RG, Degenhardt TP, Schotzinger RJ and McGill JB. (2007) Effects of Pyridoxamine in Combined Phase 2 Studies of Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes and Overt Nephropathy. *Am J Nephrol*, 27: 605-614.
185. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D, Neumaier M, Bergfeld R, Giardino I and Brownlee M. (2003) Benfotiamine Blocks Three Major Pathways of Hyperglycemic Damage and Prevents Experimental Diabetic Retinopathy. *Nat Med*, 9: 294-299.
186. Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Rabbani N and Thornalley PJ. (2010) Increased Protein Damage in Renal Glomeruli, Retina, Nerve, Plasma and Urine and Its Prevention by Thiamine and Benfotiamine Therapy in a Rat Model of Diabetes. *Diabetologia*, 53: 1506-1516.
187. Brings S, Fleming T, Freichel M, Muckenthaler MU, Herzig S and Nawroth PP. (2017) Dicarbonyls and Advanced Glycation End-Products in the Development of Diabetic Complications and Targets for Intervention. *Int J Mol Sci*, 18.
188. Kinsky OR, Hargraves TL, Anumol T, Jacobsen NE, Dai J, Snyder SA, Monks TJ and Lau SS. (2016) Metformin Scavenges Methylglyoxal to Form a Novel Imidazolinone Metabolite in Humans. *Chem Res Toxicol*, 29: 227-234.
189. Engelen L, Stehouwer CD and Schalkwijk CG. (2013) Current Therapeutic Interventions in the Glycation Pathway: Evidence from Clinical Studies. *Diabetes Obes Metab*, 15: 677-689.
190. Xue M, Weickert MO, Qureshi S, Kandala NB, Anwar A, Waldron M, Shafie A, Messenger D, Fowler M, Jenkins G, Rabbani N and Thornalley PJ. (2016) Improved Glycemic Control and Vascular Function in Overweight and Obese Subjects by Glyoxalase 1 Inducer Formulation. *Diabetes*, 65: 2282-2294.
191. Vasan S, Zhang X, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, Wagle D, Shih D, Terlecky I, Bucala R, Cerami A, Egan J and Ulrich P. (1996) An Agent Cleaving Glucose-Derived Protein Crosslinks in Vitro and in Vivo. *Nature*, 382: 275-278.
192. Yang S, Litchfield JE and Baynes JW. (2003) Age-Breakers Cleave Model Compounds, but Do Not Break Maillard Crosslinks in Skin and Tail Collagen from Diabetic Rats. *Arch Biochem Biophys*, 412: 42-46.

193. Bailey CJ. (2017) Metformin: Historical Overview. *Diabetologia*, 60: 1566-1576.
194. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, Rossing P, Tsapas A, Wexler DJ and Buse JB. (2018) Management of Hyperglycaemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (Ada) and the European Association for the Study of Diabetes (Easd). *Diabetologia*, 61: 2461-2498.
195. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M and Andreelli F. (2012) Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin: An Overview. *Clin Sci (Lond)*, 122: 253-270.
196. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P and Williams KM. (2011) Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin Pharmacokinet*, 50: 81-98.
197. Rena G, Hardie DG and Pearson ER. (2017) The Mechanisms of Action of Metformin. *Diabetologia*, 60: 1577-1585.
198. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB and Klein TE. (2012) Metformin Pathways: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*, 22: 820-827.
199. Stevanovic D, Janjetovic K, Misirkic M, Vucicevic L, Sumarac-Dumanovic M, Micic D, Starcevic V and Trajkovic V. (2012) Intracerebroventricular Administration of Metformin Inhibits Ghrelin-Induced Hypothalamic Amp-Kinase Signalling and Food Intake. *Neuroendocrinology*, 96: 24-31.
200. Maida A, Lamont BJ, Cao X and Drucker DJ. (2011) Metformin Regulates the Incretin Receptor Axis Via a Pathway Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha in Mice. *Diabetologia*, 54: 339-349.
201. Chakrabarti R, Hocking ED and Fearnley GR. (1965) Fibrinolytic Effect of Metformin in Coronary-Artery Disease. *Lancet*, 2: 256-259.
202. Fanghanel G, Silva U, Sanchez-Reyes L, Sisson D, Sotres D and Torres EM. (1998) Effects of Metformin on Fibrinogen Levels in Obese Patients with Type 2 Diabetes. *Rev Invest Clin*, 50: 389-394.

- 203.Hattori Y, Suzuki K, Hattori S and Kasai K. (2006) Metformin Inhibits Cytokine-Induced Nuclear Factor Kappab Activation Via Amp-Activated Protein Kinase Activation in Vascular Endothelial Cells. *Hypertension*, 47: 1183-1188.
- 204.Malin SK and Kashyap SR. (2014) Effects of Metformin on Weight Loss: Potential Mechanisms. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21: 323-329.
- 205.Woo SL, Xu H, Li H, Zhao Y, Hu X, Zhao J, Guo X, Guo T, Botchlett R, Qi T, Pei Y, Zheng J, Xu Y, An X, Chen L, Chen L, Li Q, Xiao X, Huo Y and Wu C. (2014) Metformin Ameliorates Hepatic Steatosis and Inflammation without Altering Adipose Phenotype in Diet-Induced Obesity. *PLoS One*, 9: e91111.
- 206.Heckman-Stoddard BM, DeCensi A, Sahasrabudde VV and Ford LG. (2017) Repurposing Metformin for the Prevention of Cancer and Cancer Recurrence. *Diabetologia*, 60: 1639-1647.
- 207.Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Moinet G, Patereau G, Lagarde M and Wiernsperger N. (1999) Reaction of Metformin with Dicarbonyl Compounds. Possible Implication in the Inhibition of Advanced Glycation End Product Formation. *Biochem Pharmacol*, 58: 1765-1773.
- 208.Thornalley PJ. (2003) Glyoxalase I--Structure, Function and a Critical Role in the Enzymatic Defence against Glycation. *Biochem Soc Trans*, 31: 1343-1348.
- 209.Griffin SJ, Leaver JK and Irving GJ. (2017) Impact of Metformin on Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Randomised Trials among People with Type 2 Diabetes. *Diabetologia*, 60: 1620-1629.
- 210.Solyman M, Ivic I, Poto L, Hegyi P, Garami A, Hartmann P, Petervari E, Czopf L, Hussain A, Gyongyi Z, Sarlos P, Simon M, Matrai P, Bercezi B and Balasko M. (2018) Metformin Induces Significant Reduction of Body Weight, Total Cholesterol and Ldl Levels in the Elderly - a Meta-Analysis. *PLoS One*, 13: e0207947.
- 211.Demetz E, Schroll A, Auer K, Heim C, Patsch JR, Eller P, Theurl M, Theurl I, Theurl M, Seifert M, Lener D, Stanzl U, Haschka D, Asshoff M, Dichtl S, Nairz M, Huber E, Stadlinger M, Moschen AR, Li X, Pallweber P, Scharnagl H, Stojakovic T, Marz W, Kleber ME, Garlaschelli K, Uboldi P, Catapano AL, Stellaard F, Rudling M, Kuba K, Imai Y, Arita M, Schuetz JD, Pramstaller PP, Tietge UJF, Trauner M, Norata GD, Claudel T, Hicks AA, Weiss G and Tancevski

- I. (2014) The Arachidonic Acid Metabolome Serves as a Conserved Regulator of Cholesterol Metabolism. *Cell Metab*, 20: 787-798.
212. Bridgeman SC, Ellison GC, Melton PE, Newsholme P and Mamotte CDS. (2018) Epigenetic Effects of Metformin: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Diabetes Obes Metab*, 20: 1553-1562.
213. Elbere I, Silamikelis I, Ustinova M, Kalnina I, Zaharenko L, Peculis R, Konrade I, Ciuculete DM, Zhukovsky C, Gudra D, Radovica-Spalvina I, Fridmanis D, Pirags V, Schioth HB and Klovins J. (2018) Significantly Altered Peripheral Blood Cell DNA Methylation Profile as a Result of Immediate Effect of Metformin Use in Healthy Individuals. *Clin Epigenetics*, 10: 156.
214. Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Abdel Khalek AK, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A and Nawroth PP. (1999) Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated from Patients with Diabetic Nephropathy Show Increased Activation of the Oxidative-Stress Sensitive Transcription Factor Nf-Kappab. *Diabetologia*, 42: 222-232.
215. Bradford MM. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
216. McLellan AC, Phillips SA and Thornalley PJ. (1992) The Assay of Methylglyoxal in Biological Systems by Derivatization with 1,2-Diamino-4,5-Dimethoxybenzene. *Anal Biochem*, 206: 17-23.
217. Fleming T, Cuny J, Nawroth G, Djuric Z, Humpert PM, Zeier M, Bierhaus A and Nawroth PP. (2012) Is Diabetes an Acquired Disorder of Reactive Glucose Metabolites and Their Intermediates? *Diabetologia*, 55: 1151-1155.
218. McLellan AC and Thornalley PJ. (1989) Glyoxalase Activity in Human Red Blood Cells Fractioned by Age. *Mech Ageing Dev*, 48: 63-71.
219. Allen RE, Lo TW and Thornalley PJ. (1993) Purification and Characterisation of Glyoxalase Ii from Human Red Blood Cells. *Eur J Biochem*, 213: 1261-1267.
220. McLellan AC, Phillips SA and Thornalley PJ. (1992) Fluorimetric Assay of D-Lactate. *Anal Biochem*, 206: 12-16.

- 221.Horiuchi S, Araki N and Morino Y. (1991) Immunochemical Approach to Characterize Advanced Glycation End Products of the Maillard Reaction. Evidence for the Presence of a Common Structure. *J Biol Chem*, 266: 7329-7332.
- 222.Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage. Version 4. (2013). Available From: <http://www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de/>
- 223.Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J and Ckd EPI. (2009) A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Annals of internal medicine*, 150: 604-612.
- 224.Stevens RJ, Kothari V, Adler AI, Stratton IM and United Kingdom Prospective Diabetes Study G. (2001) The Ukpds Risk Engine: A Model for the Risk of Coronary Heart Disease in Type Ii Diabetes (Ukpds 56). *Clin Sci (Lond)*, 101: 671-679.
- 225.Battah S, Ahmed, N, Thornalley, PJ. (2002) Kinetics and Mechanism of the Reaction of Metformin with Methylglyoxal. *International Congress Series*, 1245: 355-356.
- 226.El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M and Leverve X. (2000) Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration Via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I. *J Biol Chem*, 275: 223-228.
- 227.Owen MR, Doran E and Halestrap AP. (2000) Evidence That Metformin Exerts Its Anti-Diabetic Effects through Inhibition of Complex 1 of the Mitochondrial Respiratory Chain. *Biochem J*, 348 Pt 3: 607-614.
- 228.Bridges HR, Jones AJ, Pollak MN and Hirst J. (2014) Effects of Metformin and Other Biguanides on Oxidative Phosphorylation in Mitochondria. *Biochem J*, 462: 475-487.
- 229.Ewaschuk JB, Naylor JM and Zello GA. (2005) D-Lactate in Human and Ruminant Metabolism. *J Nutr*, 135: 1619-1625.
- 230.Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW and Thorpe SR. (1996) The Advanced Glycation End Product, Nepsilon-(Carboxymethyl)Lysine, Is a

- Product of Both Lipid Peroxidation and Glycooxidation Reactions. *J Biol Chem*, 271: 9982-9986.
231. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C and Colell A. (1998) Mitochondrial Glutathione: Importance and Transport. *Semin Liver Dis*, 18: 389-401.
232. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, Ardite E and Morales A. (1997) Gsh Transport in Mitochondria: Defense against Tnf-Induced Oxidative Stress and Alcohol-Induced Defect. *Am J Physiol*, 273: G7-17.
233. Abordo EA, Minhas HS and Thornalley PJ. (1999) Accumulation of Alpha-Oxoaldehydes During Oxidative Stress: A Role in Cytotoxicity. *Biochem Pharmacol*, 58: 641-648.
234. Correia S, Carvalho C, Santos MS, Proenca T, Nunes E, Duarte AI, Monteiro P, Seica R, Oliveira CR and Moreira PI. (2008) Metformin Protects the Brain against the Oxidative Imbalance Promoted by Type 2 Diabetes. *Med Chem*, 4: 358-364.
235. Algire C, Moiseeva O, Deschenes-Simard X, Amrein L, Petruccelli L, Birman E, Viollet B, Ferbeyre G and Pollak MN. (2012) Metformin Reduces Endogenous Reactive Oxygen Species and Associated DNA Damage. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5: 536-543.
236. Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoulet M and Leverve XM. (2006) The Ros Production Induced by a Reverse-Electron Flux at Respiratory-Chain Complex 1 Is Hampered by Metformin. *J Bioenerg Biomembr*, 38: 33-42.
237. Orrenius S, Gogvadze V and Zhivotovsky B. (2007) Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47: 143-183.
238. Novelle MG, Ali A, Dieguez C, Bernier M and de Cabo R. (2016) Metformin: A Hopeful Promise in Aging Research. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6: a025932.
239. Fang J, Yang J, Wu X, Zhang G, Li T, Wang X, Zhang H, Wang CC, Liu GH and Wang L. (2018) Metformin Alleviates Human Cellular Aging by Upregulating the Endoplasmic Reticulum Glutathione Peroxidase 7. *Aging Cell*: e12765.

240. Alhaider AA, Korashy HM, Sayed-Ahmed MM, Mobark M, Kfoury H and Mansour MA. (2011) Metformin Attenuates Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy in Rats through Modulation of Oxidative Stress Genes Expression. *Chem Biol Interact*, 192: 233-242.
241. Zhou Z, Tang Y, Jin X, Chen C, Lu Y, Liu L and Shen C. (2016) Metformin Inhibits Advanced Glycation End Products-Induced Inflammatory Response in Murine Macrophages Partly through Ampk Activation and RAGE/NF- κ B Pathway Suppression. *J Diabetes Res*, 2016: 4847812.
242. Moiseeva O, Deschenes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, Bourdeau V, Pollak MN and Ferbeyre G. (2013) Metformin Inhibits the Senescence-Associated Secretory Phenotype by Interfering with I κ B/NF- κ B Activation. *Aging Cell*, 12: 489-498.
243. Schulten HJ. (2018) Pleiotropic Effects of Metformin on Cancer. *Int J Mol Sci*, 19.
244. Hirsch HA, Iliopoulos D and Struhl K. (2013) Metformin Inhibits the Inflammatory Response Associated with Cellular Transformation and Cancer Stem Cell Growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 972-977.
245. Xue M, Rabbani N, Momiji H, Imbasi P, Anwar MM, Kitteringham N, Park BK, Souma T, Moriguchi T, Yamamoto M and Thornalley PJ. (2012) Transcriptional Control of Glyoxalase 1 by Nrf2 Provides a Stress-Responsive Defence against Dicarbonyl Glycation. *Biochem J*, 443: 213-222.
246. Barati MT, Merchant ML, Kain AB, Jevans AW, McLeish KR and Klein JB. (2007) Proteomic Analysis Defines Altered Cellular Redox Pathways and Advanced Glycation End-Product Metabolism in Glomeruli of Db/Db Diabetic Mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293: F1157-1165.
247. Hanssen NM, Wouters K, Huijberts MS, Gijbels MJ, Sluimer JC, Scheijen JL, Heeneman S, Biessen EA, Daemen MJ, Brownlee M, de Kleijn DP, Stehouwer CD, Pasterkamp G and Schalkwijk CG. (2014) Higher Levels of Advanced Glycation Endproducts in Human Carotid Atherosclerotic Plaques Are Associated with a Rupture-Prone Phenotype. *Eur Heart J*, 35: 1137-1146.

- 248.Rabbani N, Xue M and Thornalley PJ. (2014) Activity, Regulation, Copy Number and Function in the Glyoxalase System. *Biochem Soc Trans*, 42: 419-424.
- 249.Zhang H, Li H, Xi HS and Li S. (2012) Hif1alpha Is Required for Survival Maintenance of Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells. *Blood*, 119: 2595-2607.
- 250.Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Imasawa T, Yoshino A, Ueda Y, Ogura H, Kominami K, Onogi H, Inagi R, Nangaku M and Kurokawa K. (2001) Glyoxalase I Deficiency Is Associated with an Unusual Level of Advanced Glycation End Products in a Hemodialysis Patient. *Kidney Int*, 60: 2351-2359.
- 251.Reiniger N, Lau K, McCalla D, Eby B, Cheng B, Lu Y, Qu W, Quadri N, Ananthakrishnan R, Furmansky M, Rosario R, Song F, Rai V, Weinberg A, Friedman R, Ramasamy R, D'Agati V and Schmidt AM. (2010) Deletion of the Receptor for Advanced Glycation End Products Reduces Glomerulosclerosis and Preserves Renal Function in the Diabetic Ove26 Mouse. *Diabetes*, 59: 2043-2054.
- 252.Morcos M, Du X, Pfisterer F, Hutter H, Sayed AA, Thornalley P, Ahmed N, Baynes J, Thorpe S, Kukudov G, Schlotterer A, Bozorgmehr F, El Baki RA, Stern D, Moehrlen F, Ibrahim Y, Oikonomou D, Hamann A, Becker C, Zeier M, Schwenger V, Miftari N, Humpert P, Hammes HP, Buechler M, Bierhaus A, Brownlee M and Nawroth PP. (2008) Glyoxalase-1 Prevents Mitochondrial Protein Modification and Enhances Lifespan in *Caenorhabditis Elegans*. *Aging Cell*, 7: 260-269.
- 253.Fleming TH, Theilen TM, Masania J, Wunderle M, Karimi J, Vittas S, Bernauer R, Bierhaus A, Rabbani N, Thornalley PJ, Kroll J, Tyedmers J, Nawrotzki R, Herzig S, Brownlee M and Nawroth PP. (2013) Aging-Dependent Reduction in Glyoxalase 1 Delays Wound Healing. *Gerontology*, 59: 427-437.
- 254.Shibata T, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, Asamura H, Yamamoto M and Hirohashi S. (2008) Cancer Related Mutations in Nrf2 Impair Its Recognition by Keap1-Cul3 E3 Ligase and Promote Malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 13568-13573.
- 255.Sakamoto H, Mashima T, Sato S, Hashimoto Y, Yamori T and Tsuruo T. (2001) Selective Activation of Apoptosis Program by S-P-Bromobenzylglutathione

- Cyclopentyl Diester in Glyoxalase I-Overexpressing Human Lung Cancer Cells. *Clin Cancer Res*, 7: 2513-2518.
256. Preiss D, Lloyd SM, Ford I, McMurray JJ, Holman RR, Welsh P, Fisher M, Packard CJ and Sattar N. (2014) Metformin for Non-Diabetic Patients with Coronary Heart Disease (the Camera Study): A Randomised Controlled Trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2: 116-124.
257. Hong J, Zhang Y, Lai S, Lv A, Su Q, Dong Y, Zhou Z, Tang W, Zhao J, Cui L, Zou D, Wang D, Li H, Liu C, Wu G, Shen J, Zhu D, Wang W, Shen W, Ning G and Investigators S-D. (2013) Effects of Metformin Versus Glipizide on Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes and Coronary Artery Disease. *Diabetes care*, 36: 1304-1311.
258. Norwood DK, Chilipko AA, Amin SM, Macharia D and Still KL. (2013) Evaluating the Potential Benefits of Metformin in Patients with Cardiovascular Disease and Heart Failure. *Consult Pharm*, 28: 579-583.
259. Giugliano D, De Rosa N, Di Maro G, Marfella R, Acampora R, Buoninconti R and D'Onofrio F. (1993) Metformin Improves Glucose, Lipid Metabolism, and Reduces Blood Pressure in Hypertensive, Obese Women. *Diabetes care*, 16: 1387-1390.
260. Hermann LS, Schersten B, Bitzen PO, Kjellstrom T, Lindgarde F and Melander A. (1994) Therapeutic Comparison of Metformin and Sulfonylurea, Alone and in Various Combinations. A Double-Blind Controlled Study. *Diabetes care*, 17: 1100-1109.
261. Matsumoto K, Sera Y, Abe Y, Tominaga T, Yeki Y and Miyake S. (2004) Metformin Attenuates Progression of Carotid Arterial Wall Thickness in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 64: 225-228.
262. Groener JB, Oikonomou D, Cheko R, Kender Z, Zemva J, Kihm L, Muckenthaler M, Peters V, Fleming T, Kopf S and Nawroth PP. (2017) Methylglyoxal and Advanced Glycation End Products in Patients with Diabetes - What We Know So Far and the Missing Links. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*.
263. Rabbani N, Xue M and Thornalley PJ. (2016) Dicarbonyls and Glyoxalase in Disease Mechanisms and Clinical Therapeutics. *Glycoconj J*, 33: 513-525.

264. Maqbool M, Cooper ME and Jandeleit-Dahm KAM. (2018) Cardiovascular Disease and Diabetic Kidney Disease. *Semin Nephrol*, 38: 217-232.
265. Mather KJ, Verma S and Anderson TJ. (2001) Improved Endothelial Function with Metformin in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Am Coll Cardiol*, 37: 1344-1350.
266. da Costa RM, Rodrigues D, Pereira CA, Silva JF, Alves JV, Lobato NS and Tostes RC. (2019) Nrf2 as a Potential Mediator of Cardiovascular Risk in Metabolic Diseases. *Front Pharmacol*, 10: 382.
267. Borg DJ and Forbes JM. (2016) Targeting Advanced Glycation with Pharmaceutical Agents: Where Are We Now? *Glycoconj J*, 33: 653-670.
268. Dhar A, Dhar I, Desai KM and Wu L. (2010) Methylglyoxal Scavengers Attenuate Endothelial Dysfunction Induced by Methylglyoxal and High Concentrations of Glucose. *Br J Pharmacol*, 161: 1843-1856.
269. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, Thorpe SR and Baynes JW. (2002) Pyridoxamine Inhibits Early Renal Disease and Dyslipidemia in the Streptozotocin-Diabetic Rat. *Kidney Int*, 61: 939-950.
270. Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, Boyle C, Januszewski AS, Chachich M, Baynes JW and Thorpe SR. (2002) The Age Inhibitor Pyridoxamine Inhibits Development of Retinopathy in Experimental Diabetes. *Diabetes*, 51: 2826-2832.
271. Lobner J, Degen J and Henle T. (2015) Creatine Is a Scavenger for Methylglyoxal under Physiological Conditions Via Formation of N-(4-Methyl-5-Oxo-1-Imidazolin-2-yl)Sarcosine (Mg-Hcr). *J Agric Food Chem*, 63: 2249-2256.
272. Voziyan PA, Metz TO, Baynes JW and Hudson BG. (2002) A Post-Amadori Inhibitor Pyridoxamine Also Inhibits Chemical Modification of Proteins by Scavenging Carbonyl Intermediates of Carbohydrate and Lipid Degradation. *J Biol Chem*, 277: 3397-3403.
273. Bode-Boger SM, Boger RH, Galland A, Tsikas D and Frolich JC. (1998) L-Arginine-Induced Vasodilation in Healthy Humans: Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationship. *Br J Clin Pharmacol*, 46: 489-497.

274. Huang Q, Chen Y, Gong N and Wang YX. (2016) Methylglyoxal Mediates Streptozotocin-Induced Diabetic Neuropathic Pain Via Activation of the Peripheral Trpa1 and Nav1.8 Channels. *Metabolism*, 65: 463-474.
275. Sveen KA, Karime B, Jorum E, Mellgren SI, Fagerland MW, Monnier VM, Dahl-Jorgensen K and Hanssen KF. (2013) Small- and Large-Fiber Neuropathy after 40 Years of Type 1 Diabetes: Associations with Glycemic Control and Advanced Protein Glycation: The Oslo Study. *Diabetes Care*, 36: 3712-3717.
276. Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Ahmed N and Thornalley PJ. (2003) Accumulation of Fructosyl-Lysine and Advanced Glycation End Products in the Kidney, Retina and Peripheral Nerve of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biochem Soc Trans*, 31: 1423-1425.
277. Eberhardt MJ, Filipovic MR, Leffler A, de la Roche J, Kistner K, Fischer MJ, Fleming T, Zimmermann K, Ivanovic-Burmazovic I, Nawroth PP, Bierhaus A, Reeh PW and Sauer SK. (2012) Methylglyoxal Activates Nociceptors through Transient Receptor Potential Channel A1 (Trpa1): A Possible Mechanism of Metabolic Neuropathies. *J Biol Chem*, 287: 28291-28306.
278. Andersson DA, Gentry C, Light E, Vastani N, Vallortigara J, Bierhaus A, Fleming T and Bevan S. (2013) Methylglyoxal Evokes Pain by Stimulating Trpa1. *PLoS One*, 8: e77986.
279. Hidmark AS, Nawroth PP and Fleming T. (2017) Stz Causes Depletion of Immune Cells in Sciatic Nerve and Dorsal Root Ganglion in Experimental Diabetes. *J Neuroimmunol*, 306: 76-82.
280. Hansen CS, Jensen TM, Jensen JS, Nawroth P, Fleming T, Witte DR, Lauritzen T, Sandbaek A, Charles M, Fleischer J, Vistisen D and Jorgensen ME. (2015) The Role of Serum Methylglyoxal on Diabetic Peripheral and Cardiovascular Autonomic Neuropathy: The Addition Denmark Study. *Diabet Med*, 32: 778-785.
281. Andersen ST, Witte DR, Dalsgaard EM, Andersen H, Nawroth P, Fleming T, Jensen TM, Finnerup NB, Jensen TS, Lauritzen T, Feldman EL, Callaghan BC and Charles M. (2018) Risk Factors for Incident Diabetic Polyneuropathy in a Cohort with Screen-Detected Type 2 Diabetes Followed for 13 Years: Addition-Denmark. *Diabetes Care*, 41: 1068-1075.

282.Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, Sosenko JM and Ziegler D. (2017) Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care*, 40: 136-154.

X. Saját publikációk jegyzéke

I. A dolgozat témájában megjelent közlemények

1. Kender Z, Groener J, Reismann P, Kopf S. (2019) The effect of Metformin Therapy on Cholesterol, LDL Levels, and Cardiovascular Risk in Patients with Type 2 Diabetes without Statin Therapy. *Orv Hetil*, 160: 1346-1352
2. Brings S, Fleming T, De Buhr S, Beijer B, Lindner T, Wischnjow A, Kender Z, Peters V, Kopf S, Haberkorn U, Mier W and Nawroth PP. (2017) A Scavenger Peptide Prevents Methylglyoxal Induced Pain in Mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863: 654-662.
3. Kender Z, Fleming T, Kopf S, Torzsa P, Grolmusz V, Herzig S, Schleicher E, Racz K, Reismann P and Nawroth PP. (2014) Effect of Metformin on Methylglyoxal Metabolism in Patients with Type 2 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 122: 316-319.
4. Kender Z, Torzsa P, Grolmusz KV, Patocs A, Lichthammer A, Veresne Balint M, Racz K and Reismann P. (2012) [The Role of Methylglyoxal Metabolism in Type-2 Diabetes and Its Complications]. *Orv Hetil*, 153: 574-585.

II. A dolgozat témájától független közlemények

1. Jende JME, Groener JB, Rother C, Kender Z, Hahn A, Hilgenfeld T, Juerchott A, Preisner F, Heiland S, Kopf S, Pham M, Nawroth P, Bendszus M and Kurz FT. (2019) Association of Serum Cholesterol Levels with Peripheral Nerve Damage in Patients with Type 2 Diabetes. *JAMA Netw Open*, 2: e194798.
2. Groener JB, Gelen D, Mogler C, Herpel E, Toth C, Kender Z, Peichl M, Haufe S, Haberkorn U, Sulaj A, Zemva J, Kopf S, Nawroth PP, Brune M and Rudofsky G. (2019) Braf V600e and Retinoic Acid in Radioiodine-Refractory Papillary Thyroid Cancer. *Horm Metab Res*, 51: 69-75.
3. Kopf S, Groener JB, Kender Z, Fleming T, Bischoff S, Jende J, Schumann C, Ries S, Bendszus M, Schuh-Hofer S, Treede RD and Nawroth PP. (2018) Deep Phenotyping Neuropathy: An Underestimated Complication in Patients with Pre-Diabetes and Type 2 Diabetes Associated with Albuminuria. *Diabetes Res Clin Pract*, 146: 191-201.
4. Kopf S, Groener JB, Kender Z, Fleming T, Brune M, Riedinger C, Volk N, Herpel E, Pesta D, Szendrodi J, Wielputz MO, Kauczor HU, Katus HA, Kreuter M and Nawroth PP. (2018) Breathlessness and Restrictive Lung Disease: An Important Diabetes-Related Feature in Patients with Type 2 Diabetes. *Respiration*, 96: 29-40.
5. Muller-Krebs S, Nissle K, Tsobaneli J, Zeier M, Kihm LP, Kender Z, Fleming T, Nawroth PP, Reiser J and Schwenger V. (2015) Effect of Benfotiamine in Podocyte Damage Induced by Peritoneal Dialysis Fluid. *Front Med (Lausanne)*, 2: 10

XI. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném köszönetemet kifejezni családomnak (szüleimnek, testvéreimnek) és feleségemnek, akik töretlenül biztattak és türelmükkel, támogatásukkal, szeretetükkel lehetővé tették számomra a biztos hátteret. János testvéremet külön köszönet illeti a grafikai és informatikai segítségéért. Krisztina nagynénémet külön köszönet illet meg, aki egyetemi tanulmányaim alatt és azt követően is mindig szerető otthont adott és támogatott.

Köszönettel tartozom Rácz Károly professzornak Úrnak, a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika volt igazgatójának, hogy befogadott a Klinikára és az Endokrin Munkacsoportba, és mindig támogatta szakmai és tudományos munkámat!

Köszönetemet szeretném kifejezni Reismann Péter egyetemi docens Úrnak, PhD témavezetőmnek a rengeteg segítségéért és folyamatos támogatásáért tudományos munkám során!

Köszönettel tartozom Angelika Bierhaus professzor Asszonynak, a heidelbergi Belgyógyászati Klinika Diabetes és Molekuláris Biológiai Kutatócsoport korábbi vezetőjének, aki bevezetett a laboratóriumi kutatásba, befogadott a heidelbergi kutatócsoportba és munkámat mindvégig támogatta.

Köszönettel tartozom Peter Nawroth professzornak Úrnak, a heidelbergi I. sz. Belgyógyászati Klinika igazgatójának, hogy lehetővé tette az intézetében való kutatómunkámat, majd később befogadott a klinikára.

Egyúttal köszönöm a Semmelweis Egyetem II. Belklinika Endokrin Munkacsoport tagjainak, köztük sok barátomnak a rengeteg támogatást, szakmai segítséget, és közösen eltöltött örömteli pillanatot, amelyet a közös munka és az endokrin továbbképzések során átéltünk. A II. Belklinika minden dolgozójának köszönöm, hogy az ott töltött évek alatt támogattak. Külön köszönöm a SE II. Belklinika Molekuláris és Endokrinológiai Laboratóriumok munkatársainak a laboratóriumi vizsgálatokban való segítséget. Dr. Grolmusz Vince kollégámat külön köszönet illeti a laboratóriumi vizsgálatokban való segítségéért.

Köszönöm Sebastian Brings és Erhard Axel kollégáimnak, akikkel az állatkísérleteket közösen végeztük.

Köszönettel tartozom Thomas Flemingnek, a heidelbergi labor jelenlegi vezetőjének a molekuláris laborvizsgálatokban nyújtott szakmai segítségéért. Egyúttal köszönöm a heidelbergi labor minden munkatársának a segítséget és támogatást.

Köszönettel tartozom Stefan Kopf és Jan Benedikt Gröner kollégáimnak és barátaimnak, akik rengeteget segítettek a kutatómunkában. Stefant külön köszönet illeti a statisztikai elemzésekben való segítségéért.