

# 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

# I. Bevezetés

Cukorbetegség alatt egy komplex, heterogén anyagcserezavart értünk, ami a Föld lakosságának 9%-át érintve jelentős népegészségügyi problémát jelent. Vezető rizikófaktora a szív- és érrendszeri megbetegedéseknek és agyi értörténéseknek. Emellett mikrovaszkuláris szövődményekkel is társul, mint diabéteszes nefropátia, neuropátia és retinopátia. Míg az 1-es típusú cukorbetegségre az autoimmun folyamat kiváltotta teljes inzulinhiány jellemző, addig 2-es típusú cukorbetegségben relatív inzulinhiány áll fenn, és a betegség alapvetően inzulinrezisztencia, hiperglikémia és elhízás együtteseként jellemezhető. A jelenlegi terápiás lehetőségek elsősorban az ún. surrogate paramétereken, mint vércukorszint és HbA1c alapulnak, amelyek ugyan összefüggést mutatnak a szövődmények gyakoriságával, azonban számos klinikai vizsgálat bizonyította, hogy az intenzív vércukorcsökkentő kezelés nem vagy éppen negatív irányban befolyásolja a szövődmények kialakulását a hagyományos kezeléssel szemben. Mindemellett a szövődmények klinikai megjelenése gyakran megelőzi a betegség diagnózisát. Tekintettel arra, hogy jelenlegi terápiás és prevenciós lehetőségeinkkel aligha megelőzhetők a késői szövődmények, feltételezzük, hogy a szövődmények háttérében egyéb kóros anyagcserefolyamatok is szerepet játszanak. Ezen anyagcserefolyamatokhoz tartoznak a reaktív metabolitok vagy más néven dikarbonilek, mint pl. a metilglioxál (MG), és a késői glikációs végtermékek (advanced glycation end products - AGEs). A MG egy erősen reaktív, ezáltal toxikus  $\alpha$ -oxoaldehid,

amely a glikolízis során a trióz-foszfát intermedierekből képződik. Fehérjékkel történő közvetlen és gyors reakciója révén késői glikációs végtermékek képződéséhez vezet, amely számos káros következménnyel jár. A késői glikációs végtermékek felszaporodása fontos szerepet játszik a késői makro- és mikrovaszkuláris szövődmények patogenezisében. Emellett a sejtek energiatermelő folyamatai során reaktív oxigénradikálok képződnek, amelyek az oxidatív stressz révén gyulladáshoz és DNS-károsodáshoz vezetnek. Újabb klinikai vizsgálatok feltételezik a reaktív metabolitok, mint pl. a metilglioxál kóroki szerepét magának a cukorbetegségnek és szövődményeinek kialakulásában. A reaktív metabolitok és késői glikációs végtermékek képződését és lebontását szabályozó mechanizmusok pontosabb megértése fontos lépést jelent a cukorbetegség és szövődményei kapcsán újabb terápiás célpontok meghatározásában. Ezidáig számos állat és humán kísérlet történt a reaktív metabolitok és AGE termékek anyagcseréjét befolyásoló szerek kifejlesztésére. Az. un. dikarbonil scavenger, azaz megkötő molekulák voltak az első, a dikarbonil stressz csökkentésére irányuló szerek. Sajnálatos módon azonban eddig egyik ilyen szer sem került klinikai alkalmazásra a diabéteszes szövődmények kezelésében.

A biguanid metformin a 2-es típusú cukorbetegség elsőként választandó gyógyszere. Vércukorcsökkentő hatása elsősorban a máj- és izomszövet inzulinérzékenységének fokozásán alapszik. Emellett MG szintet csökkentő hatása is igazolódott, azonban ennek pontos mechanizmusa nem tisztázott.

Mindezek mellett figyelmet érdemel a szív- és érrendszeri rizikófaktorokra, mint például a vérsírszintekre kifejtett hatása. Ugyanakkor a szív -és érrendszeri rizikóra kifejtett pozitív hatása 2-es típusú cukorbetegségben továbbra sem egyértelmű.

## **II. Célkitűzések**

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(Myf)R4E) hatását vizsgáltuk a MG plazma szintjére és a MG kiváltotta hiperalgéziára egerekben.

### **II.1. Az első vizsgálat célkitűzései:**

1. A metilglioxál plazmakoncentrációjának vizsgálata metformin kezelés hatására.
2. A triózfoszfát intermedierek koncentrációjának változása vörösvérsejtekben metformin kezelés hatására.
3. A glioxaláz-1 és glioxaláz-2 enzimek aktivitásának vizsgálata vörösvérsejtekben és perifériás mononukleáris sejtekben metformin kezelés hatására.

4. A glioxaláz enzimrendszer stabil végtermékének, a D-laktát szintjének vizsgálata metformin kezelés során.
5. A késői glikációs végtermék, a CML koncentrációjának változása metformin kezelés során.

## **II.2. A második vizsgálat célkitűzései**

1. A metformin terápia hatásának vizsgálata a szérum lipid paraméterekre statin kezelésben nem részesülő, 2-es típusú cukorbetegekben.
2. A metformin kezelés hatása a szív-érrendszeri kockázatra kardiovaszkuláris betegségben nem szenvedő 2-es típusú cukorbetegekben.

## **II.3. A harmadik vizsgálat célkitűzései**

1. Az argininben gazdag, ciklikus fehérje, a CycK(My<sub>4</sub>R<sub>4</sub>E) MG szintet csökkentő hatásának vizsgálata egerekben.
2. A CycK(My<sub>4</sub>R<sub>4</sub>E) fehérje hatása a MG indukálta hiperalgéziára egerekben.

### **III. Módszerek**

#### **III.1. Az első vizsgálat módszerei**

Prospektív, obszervációs vizsgálatuk során 12, frissen diagnosztizált 2-es típusú cukorbetegét kezeltünk magas dózisú metforminnal 24 héten keresztül. Életmódbeli tanácsadásra havonta került sor dietetikus segítségével. Éhomi vérvétel történt a kezelés kezdetén és végén. A vérvételt követően a vérminták azonnali feldolgozásra kerültek a Semmelweis Egyetem Központi Laboratóriumában és a II. sz. Belgyógyászati Klinika Molekuláris Biológiai Laboratóriumában. Vörösvérsejtek (vvt.), perifériás mononukleáris sejtek (pBMC) és vérplazma került izolálásra EDTA-val antikoagulált vérből. A MG koncentráció meghatározása fehérjementesítést után, HPLC-vel történt. A trióz-foszfát intermedierek koncentrációja hemolizátumból végpont enzim vizsgálattal került meghatározásra. A glioxaláz-1 és glioxaláz-2 aktivitás mérése vörösvérsejtekben és mononukleáris sejtekben spektrofotometriás módszerrel történt. A plazma D-laktát szintjét spektrofotometriás módszerrel határoztam meg, ahol a folyamat során keletkező NADH mennyisége volt mérhető 340 nm hullámhosszúságú fény elnyelésének mértéke alapján. A CML plazma koncentrációját direkt ELISA módszerrel határoztam meg, CML-elleni antitest alkalmazásával. A betegek bevonása a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján történt, a molekuláris vizsgálatokat a Karls-Ruprecht Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika kutatólaboratóriumában végeztem.

### **III.2. Az második vizsgálat módszerei**

Keresztmetszeti vizsgálatunk során 102, antilipémiás kezelésben nem részesülő 2-es típusú cukorbeteg adatait dolgoztuk fel. A metformin kezelés függvényében vizsgáltuk a lipidprofil és a kardiovaszkuláris rizikót. Éhomi vérvételt követően a vérminták azonnal feldolgozásra kerültek a Karls-Ruprecht Egyetem Központi Laboratóriumában. A szív-és érrendszeri rizikó meghatározása a UKPDS Rizikókalkulátorral történt. A betegek bevonása a Karls-Ruprecht Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika diabétesz ambulanciáján történt.

### **III.3. A harmadik vizsgálat módszerei**

Harminchat C57BL/6 egérrel végeztünk vizsgálatot, az állatokat véletlenszerűen három kezelési csoportra osztottuk. Az első csoportnak 0,25 mg CycK(My<sub>r</sub>)R<sub>4</sub>E fehérje került beadásra 0,9%-os NaCl oldatban intraperitonealisan, míg a másik két csoportnak 0,9%-os NaCl oldat került i.p. beadásra. A fehérjével kezelt és az egyik sóoldattal kezelt csoportnak 30 perccel a beadást követően 5 µg/g dózisban MG intravénás beadására került sor, a harmadik csoport intravénásan is sóoldatot kapott (kontroll csoport). Az egereket közös helyen tartották 12 órás világos-sötét ciklusban korlátozás nélküli táplálék és folyadék-hozzáférés mellett. 30 perccel a MG i.v. beadását követően vérvétel történt a submandibuláris vénából EDTA tartalmú 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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történt. A MG koncentráció meghatározása folyadék-kromatográfiás-tömegspektrometriás módszerrel (LC-MS/MS) történt. A hőhatás kiváltotta fájdalominger vizsgálatát az ún. forró lap teszttel végeztük (hot plate analgesia meter, Columbus Instruments, Ohio, USA), a forró lapot  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os értéken tartva, 3 órával a MG beadását követően. Valamelyik hátsó végtag emelése, nyalása, rázása vagy az állat ugrása esetén az állat a forró lapról eltávolításra került. A maximális vizsgálati idő 60 másodperc volt. A fájdalomingerre adott válasz vizsgálata minden állat esetében 3 alkalommal 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).



## **IV. Eredmények**

### **IV.1. Az első vizsgálat eredményei**

A metformin kezelés szignifikánsan csökkentte az éhomi vércukor ( $p < 0,05$ ) és HbA<sub>1c</sub> ( $p < 0,01$ ) szinteket. A metformin szignifikánsan csökkentette a plazma MG szinteket ( $p < 0,01$ ). A metformin nem volt hatással a trióz-foszfát intermedierek szintjére vörösvérsejtekben. A plazma MG szintjének csökkenésével párhuzamosan a glioxaláz-1 enzim aktivitásának szignifikáns növekedését észleltük perifériás mononukleáris sejtekben ( $p < 0,01$ ), míg vörösvérsejtekben csak csökkenő tendenciát tudtunk kimutatni. A glioxaláz-2 enzim aktivitásban nem észleltünk változást metformin kezelés hatására. A D-laktát plazma koncentrációjában sem történt változás a kezelés során. A metformin kezelés szignifikánsan csökkentte a CML-módosította fehérjekoncentrációt a plazmában ( $p < 0,05$ ). A többváltozós lineáris regressziós analízis során a plazma MG koncentrációjának csökkenése kizárólag a glioxaláz-1 enzim mononukleáris sejtekben ( $p < 0,01$ ) és vörösvérsejtekben ( $p < 0,05$ ) észlelt aktivitásnövekedésével mutatott összefüggést.

### **IV.2. A második vizsgálat eredményei**

A metformin kezelésben részesülő betegek teljes koleszterin ( $p < 0,01$ ) és LDL-koleszterin ( $p < 0,05$ ) szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a metformint nem szedő csoporthoz képest. Ez a hatás független volt a glikémiás kontrolltól és egyéb gyógyszeres kezeléstől. A metformin kezelés nem volt hatással a szív- és érrendszeri rizikóra.

### **IV.3. A harmadik vizsgálat eredményei**

A kontroll egerek plazma MG szintje 150 mmol/l körül mozgott, ami MG adására szignifikáns emelkedést mutatott ( $p < 0,001$ ), ez az emelkedés azonban a CycK(My<sub>r</sub>)R<sub>4</sub>E fehérjét kapó csoportban szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult ( $p < 0,001$ ). A MG-t kapó csoport esetében a kontroll csoporthoz képest szignifikáns hyperalgeziát észleltünk ( $p < 0,01$ ), ami a CycK(My<sub>r</sub>)R<sub>4</sub>E fehérje hatására csaknem normalizálódott ( $p < 0,01$ ).

## **V. Következtetések**

### **V.1. Az első vizsgálat következtetései**

1. A metformin képes a metilglioxál plazmakoncentrációjának csökkentésére 2-es típusú cukorbetegségben.
2. A vörösvérsejtek trióz-foszfát intermedier koncentrációja nem változik metformin kezelés hatására 2-es típusú cukorbetegségben.
3. A metformin fokozza a glioxaláz-1 enzim aktivitását vörösvérsejtekben és perifériás mononukleáris sejtekben, de a glioxaláz-2 aktivitását nem.
4. A metformin hatására nem változik a D-laktátnak, a glioxaláz enzimrendszer stabil végtermékének plazmaszintje.
5. A metformin csökkenti a vérben keringő késői glikációs végtermékek koncentrációját.

### **V.2. A második vizsgálat következtetései**

1. A metformin kezelés pozitív hatású a szérum koleszterin és LDL-koleszterin szintekre statin kezelésben nem részesülő 2-es típusú cukorbetegségben.
2. A többváltozós kockázatbecslés eredménye nem támasztja alá a metformin kezelés jótékony hatását a szív- és érrendszeri kockázatra 2-es típusú cukorbetegségben.

### **V.3. A harmadik vizsgálat következtetései**

1. Az argininben gazdag ciklikus fehérje, a CycK(My<sub>r</sub>)R4E hatékonyan csökkenti a MG szintet egerekben.
2. A CycK(My<sub>r</sub>)R4E fehérje hatékonyan gátolja a MG által kiváltotta hiperalgéziát egerekben.

## **VI. 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