

Biológia

OTDK 2023

Tavaszi forduló

**A tiloron metabolikus hatásai magas zsírtartalmú diéta esetén
in vivo egérmodellben.**

Készítette:

Horváth Barnabás

Szegedi Tudományegyetem, Biológia MSc, 2. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Keller-Pintér Anikó, tudományos főmunkatárs

Köhler Zoltán Márton, kutató

SZTE SZAOK Biokémiai Intézet

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék.....	3
Tartalmi összefoglaló.....	4
1. Bevezetés	5
1.1 Glükóz homeosztázis	5
1.2 Glükózfelvétel szabályozása a vázizmokban	6
1.3 Diabétesz mellitusz	7
1.4 Csontmorfogenikus fehérjék (BMP)	10
1.5 Tiloron dihidroklorid	12
2. Célkitűzés.....	14
3. Anyagok és módszerek	15
3.1 Állatok	15
3.2 Vércukor és testsúlymérés.	16
3.3 Glükóz tolerancia teszt.....	16
3.4 Western Blot	17
3.5 Szöveti glükózfelvétel vizsgálata.....	18
3.6 A máj hisztológiai vizsgálata	19
3.7 Statisztikai analízis	19
4. Eredmények	20
4.1 Testtömeg változás	20
4.2 A belső szervek és izmok súlyváltozásai	20
4.3 Éhomi vércukorszint és GTT eredmények.....	23
4.4 A tiloron javítja a szöveti glükózfelvételt a PET/CT eredmények alapján	23
4.5 A tiloron kezelés hatása a GLUT4 expressziójára és az AS160, a GLUT4 transzlokációját szabályozó molekulákra	24
4.6 A tiloron hatása a májszövet lipid akkumulációjára	25
5. Összefoglalás	27
6. Irodalomjegyzék.....	30
7. Köszönetnyilvánítás	35
Tételes szerzői hozzájárulás	Hiba! A könyvjelző nem létezik.

Rövidítésjegyzék

[¹⁸F] FDG	2-dezoxi-2-[¹⁸ F] -fluoroglükóz
AMPK	AMP-aktivált kináz
AS160	Akt-szubsztrát 160 kDa
BCA	bicinchininsav esszé
BMP	csontmorfogenikus fehérjék
DM	diabétesz mellitusz
ECL	fokozott kemilumineszcencia
NAFLD	nem alkoholos zsírmáj betegség
GLUT	glükóztranszporter
GLUT4	glükóztranszporter 4
HFD	magas zsírtartalmú diéta
HRP	torma peroxidáz
IRS	inzulinreceptor szubsztrát-1
PDK1	PIP3 függő kináz 1
PGC-1α	peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor gamma, koaktivátor-1
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PIP2	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PIP3	foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát
PPARγ	peroxiszóma proliferátor-aktiváló receptor gamma
T1DM	1-es típusú diabétesz mellitusz
T2DM	2-es típusú diabétesz mellitusz
TZD	tiazolidindion

Tartalmi összefoglaló

A világ egyik vezető halálozási okának a 2-es típusú cukorbetegség tekinthető. A betegség kialakulásához a mozgásszegény életmód és a nem megfelelő táplálkozás nagymértékben hozzájárulhat. Szerveztünk egyik legnagyobb glükózfelhasználója a vázizomzat, mely a 4-es típusú glükóztanszporter (GLUT4) segítségével hozzájárul testünk glükózhomoeosztázisának fenntartásához. Az 1970-es évek óta ismert tiloron egy kismolekulasúlyú széles spektrumú antivirális szer, mely képes javítani glükózfelvételt in vivo módon. A tiloron az epithélsjtekben képes fokozni a transzformáló növekedési faktor β szupercsaládba tartozó BMP (bone morphogenetic protein) fehérjék expressziós szintjét. Ezek a fehérjék képesek foszforilálni a SMAD1/5/8 molekulát, mely komplexet képez a SMAD4-gyel és szabályozzák a GLUT4 transzkripcióját. Ezen felül a GLUT4 plazmamembránba történő kihelyeződését is szabályozza az IRS-1/PI3K/Akt2/AS160 jelpályán inzulin jelenléte nélkül. Kísérletünk célja a tiloron BMP indukáló és glükózfelvételt javító hatásának tesztelése magas zsírtartalmú étrend esetén in vivo egérmodellben.

Kísérletünk során 12-14 hetes, hím C57BL/6 egereket alkalmaztunk. Az állatokat 3 csoportba osztottuk, egy normál táppal és 2 magas zsírtartalmú táppal etetett csoportba, melyek közül az egyiket a 2. héttől kezdve 3 naponta intraperitoneálisan tiloronnal (25 mg/ttkg) oltottuk. A kísérlet 6 hetes időtartama alatt hetente mértük a testtömeget és vércukorszintet, valamint az utolsó héten a glükóz toleranciát. PET/CT-vel radioaktív glükóz analóg (^{18}FDG) felvételt és a szövet szerinti eloszlását mértük. A kísérleti idő végeztével vizsgáltuk a szerv- és izomtömegeket, a máj lipid akkumulációját, továbbá a fehérjék expresszióját és foszforilációját Western blot technikával. Jelentős súlygyarapodást, emelkedett vércukorszintet és csökkent glükóz toleranciát tapasztaltunk a HFD hatására, melyet a tiloron csökkentett. A HFD fokozta a hasi zsír mennyiségét, továbbá csökkentette a vizsgált vázizmok, szív és máj tibiahosszra normalizált tömegét. A PET/CT eredmények alapján a tiloron javítja a vázizom, zsírszövet, szívizom és máj ^{18}FDG felvételét. Az AS160 foszforilációja és a GLUT4 expresszió fokozódása a tiloron kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett. A máj hisztológiai vizsgálata alapján a HFD hatására diffúz, dominánsan mikrovezikuláris steatosis (S3/3) alakult ki a mintákban, a tiloron hatására ezen vezikulák száma és mérete csökkent. Eredményeink alapján a magas zsírtartalmú diétával szembeni számos pozitív hatása felveti a tiloron, illetve az általa indukált jelpálya alkalmazásának lehetőségét az antidiabetikus terápiában, mely további vizsgálatokat igényel.

1. Bevezetés

1.1 Glükóz homeosztázis

A glükóz az egyik legfontosabb energiaforrás a szervezet számára. Befolyásolja az izomösszehúzódás mértékét és a megfelelő glükózanyagcsere létfontosságú az egészséges élethez (Richter és mtsai, 2013). A vérben keringő glükóz molekulák koncentrációja szigorú szabályozás alatt áll, normál tartománya 3-5,6 mmol/L (Gregg és mtsai, 2007). A sejtek facilitált glükóztranszporterek (GLUT) segítségével veszik fel az energiaforrásként is szolgáló glükózt. Az emberben 14 GLUT fehérje fejeződik ki, melyek szövetspecifitást mutatnak (Mueckler és mtsai, 2013). A szervezetünkben található glükóz transzporterek kifejeződési helyeit és szubsztrátjait az 1. táblázat tartalmazza.

Transzporter neve	Kifejeződési helye	Szubsztrátja
GLUT1	mindenhol előfordul	glükóz, galaktóz, mannóz, glükozamin
GLUT2	máj, vékonybél, vese, hasnyálmirigy	glükóz, galaktóz, fruktóz, glükozamin
GLUT3	agy, herék	glükóz, mannóz, galaktóz, xilóz
GLUT4	vázizomzat, zsír, szív	glükóz, glukozamin
GLUT5	bél, herék, vese	fruktóz
GLUT6	agy, leukociták, lép	glükóz
GLUT7	vékonybél, herék, prosztata	glükóz, fruktóz
GLUT8	agy, máj, zsír, herék, lép, tüdő, mellékvese	glükóz
GLUT9	máj, vese, placenta, hasnyálmirigy	glükóz, fruktóz,
GLUT10	szív, agy, máj, izom, tüdő	galaktóz
GLUT11	szív, izom, zsír, vese	glükóz, fruktóz
GLUT12	izom, szív, zsír, hasnyálmirigy	glükóz
GLUT13	agy	inozitol
GLUT14	herék	nincs adat

1. táblázat: A glükóz transzporterek tulajdonságai.

(Barron és mtsai, 2016)

A fent felsorolt transzporterek közül kiemelt jelentősége van a GLUT4-nek. Ez a transzporter elsődlegesen inzulin szabályozás alatt áll és az inzulinérzékeny szövetekben (zsírszövet, szív- és vázizomzat) fejeződik ki.

1.2 Glükózfelvétel szabályozása a vázizmokban

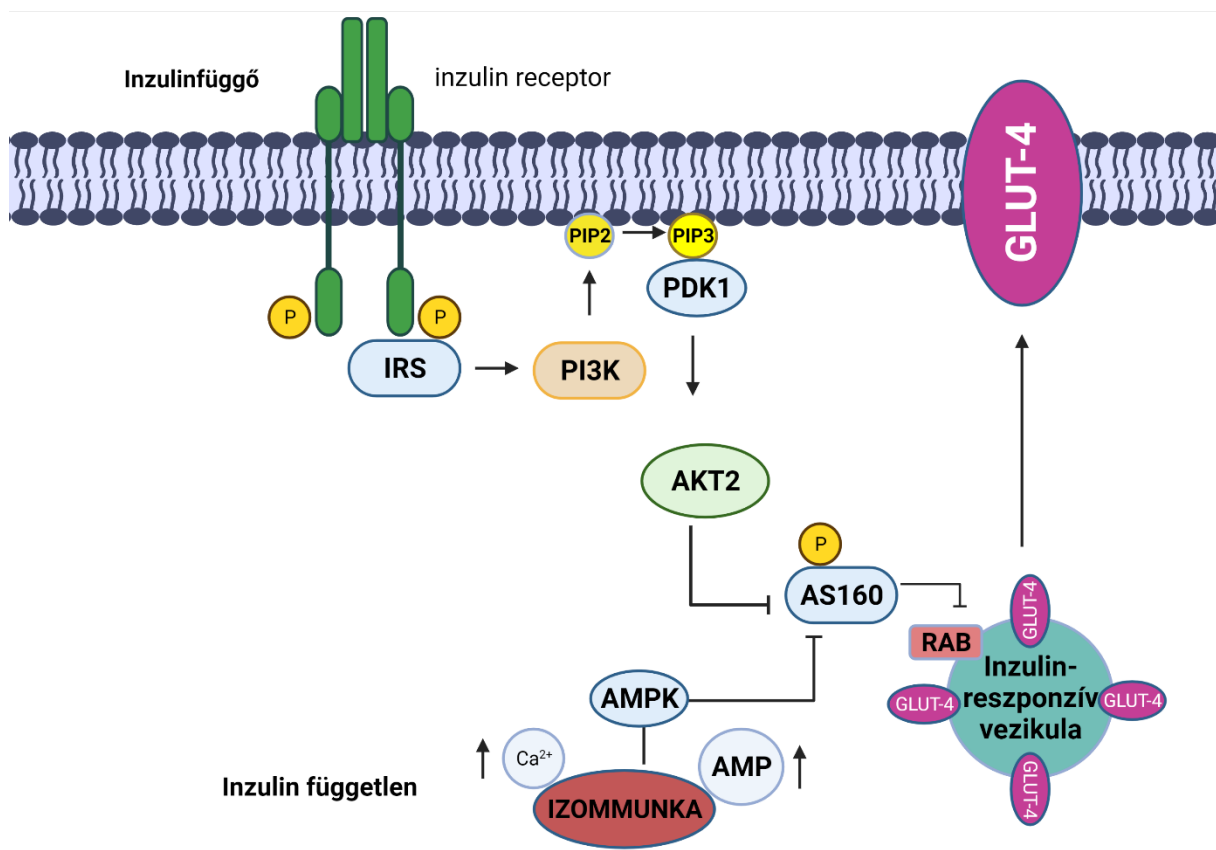
A glükóz homeosztázisának fenntartásában kulcsfontosságú szerepe van a vázizomzatnak. A posztprandiális glükóz körülbelül 80%-át a vázizom veszi fel, mely a GLUT4-en keresztül jut be a sejtekbe. Alapállapotban a GLUT4 tartalmú vezikulák intracellulárisan helyezkednek el és a megemelkedett inzulinszint hatására a plazmamembránba helyeződnek ki. Ez a transzlokáció történhet inzulinfüggő vagy független útvonalakon (*1. ábra*), mely a GLUT4 vezikulák transzlokációját fogja kiváltani (Hulett és mtsai, 2022).

Az inzulinfüggő útvonal az inzulinreceptor szubsztrát-1 (IRS) foszforilációjával indul el, melyhez hozzákapcsolódik és ezáltal aktiválódik a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K). Az aktiválódott PI3K beépül a sejtmembránba, ahol a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP2) foszfatidil-inozitol-3,4,5 trifoszfáttá (PIP3) alakítja. A PIP3 fokozza a PIP3-dependens protein kináz 1 (PDK1) aktivitását, ami foszforilálja és így aktiválja a proteinkináz B-t (Akt) (Lankatillake és mtsai, 2019).

Inzulin független útvonal esetén az izommunka következtében megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} - valamint AMP-szint által szabályozott AMP-aktivált kináz (AMPK) molekulán keresztül történik meg a transzlokáció (Klip és mtsai, 2014). A megnövekedett AMPK aktivitás fokozza a vázizomzat glükózfelvételét (Jäger és mtsai, 2007). Emlősökben az egész testet érintő energiaegyensúlyt is az AMPK szabályozza (Hardie és mtsai, 2012).

Mindkét útvonal az Akt-szubsztrát 160 kDa (AS160) molekulához vezet, mely a GLUT4 transzlokációt szabályozó Rab GTP-ázok GTP-áz aktiváló proteinje. A Rab fehérjék a monomer G-fehérje család tagjai, és kitüntetett szerepet játszanak az intracelluláris vezikulák sejten belüli targetálásában (Ádám, 2016). Az AS160 foszforilált állapotban inaktiválódik, így a Rab GTP-áz szabályozó molekulák felszabadulnak a gátlás alól és végbemehet a transzlokáció (Lankatillake. és mtsai, 2019).

A GLUT4 tartalom mérhető a különböző típusú vázizomrostokban, a lassú oxidatív rostokban magasabb a GLUT4 expresszió, mint a gyors oxidatív rostokban. Cukorbetegségekből származó minta esetén azt figyelték meg, hogy a GLUT4 sűrűsége 9%-kal csökkent a súlyosan elhízott, és 18%-kal a kontrollcsoport alanyaihoz képest (Gaster és mtsai, 2001).



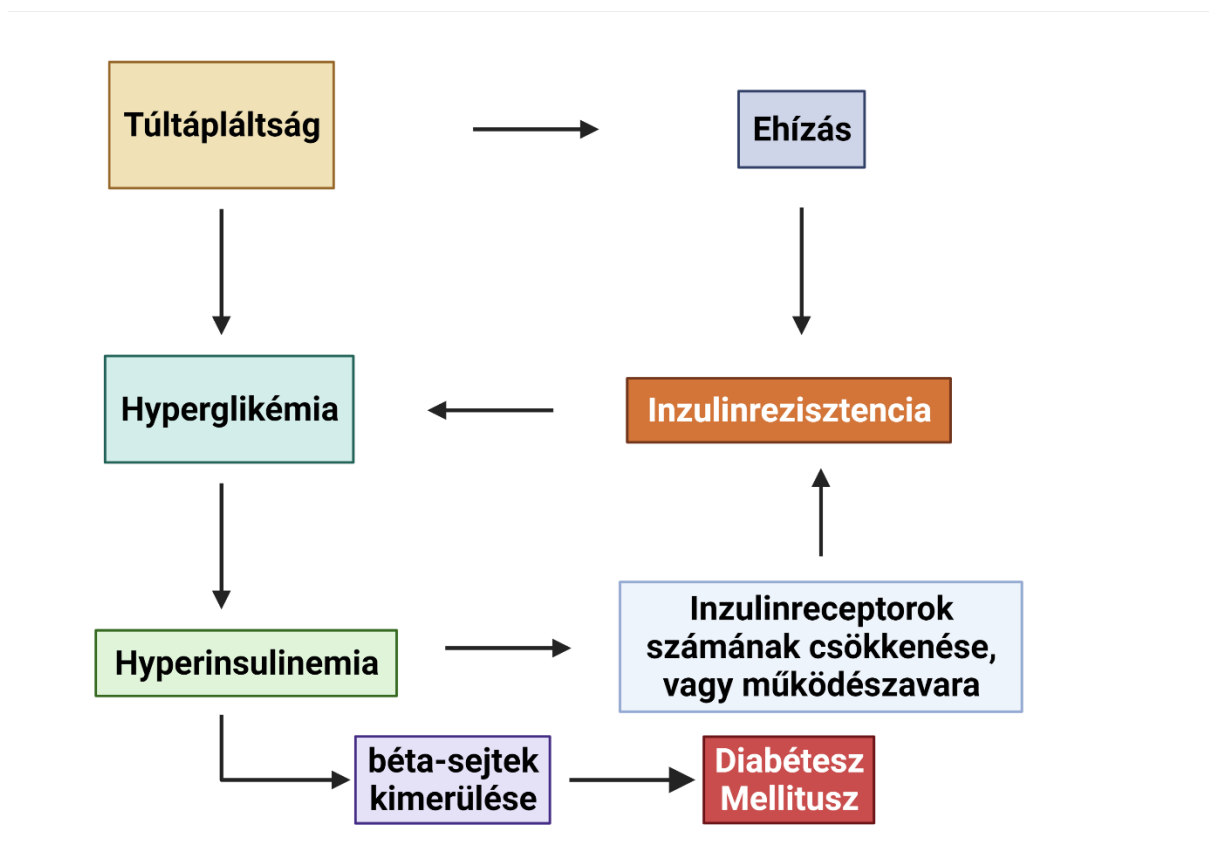
1. ábra: Inzulinfüggő és inzulintól független jelpálya

Az egészségtelen táplálkozás hatására romlik az inzulinérzékeny szövetek glükózfelvétele. Ennek oka, hogy rendszeres nagymennyiségű táplálék elfogyasztása miatt inzulinrezisztencia alakul ki, ami cukorbetegséghez vezethet (Zierath és mtsai, 1997).

1.3 Diabétesz mellitusz

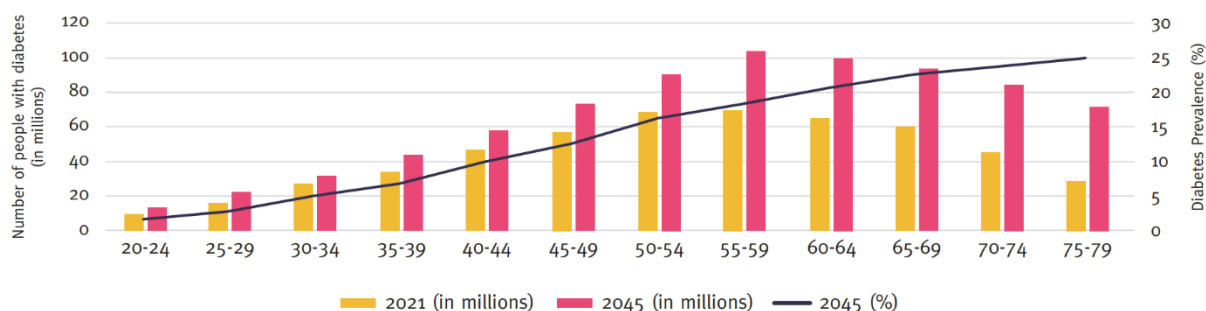
Napjaink egyik vezető halálozási okának számító diabétesz mellitusz (DM) egy anyagcserét érintő betegség, melynek központjában a nem megfelelő szénhidrát anyagcsere áll (Diabetes Care, 2007). A cukorbetegséget két nagy csoportra lehet osztani. Az I-es típusú diabétesz mellitusz (T1DM) esetén egy autoimmun megbetegedés miatt a hasnyálmirigy langerhans szigeteinek inzulint termelő β -sejtjei elpusztulnak. Ebben az esetben abszolút inzulinhiány lép fel (Lucier és mtsai, 2018). A betegség másik nagy csoportja a II-es típusú diabétesz mellitusz (T2DM) melynek hátterében a relatív inzulinhiány áll. Rendszeres, fokozott táplálékbevitel estén az inzulin szekréció állandósul. A folyamatosan magas inzulinszint miatt hiperinzulinémia alakul ki, melynek következtében sejtjeink érzéketlenek lesznek az inzulinra és nem fogják felvenni a cukrot. A vér magas glükózsztintje azonban tovább fokozza a

hasnyálmirigy inzulin szekrécióját. A fokozódó enzintermelés miatt a β -sejtek kimerülnek, leesik az inzulinszint és a továbbra is fennálló magas glükózsztint miatt kialakul a T2DM (Galicia-Garcia és mtsai, 2020); (DeFronzo és mtsai, 2015) (2. ábra). Több klinikai vizsgálat is kimutatta, hogy az életmódváltás hatékonyan csökkenti, esetenként meg is akadályozza a T2DM kialakulásának kockázatát (Zheng és mtsai, 2017).



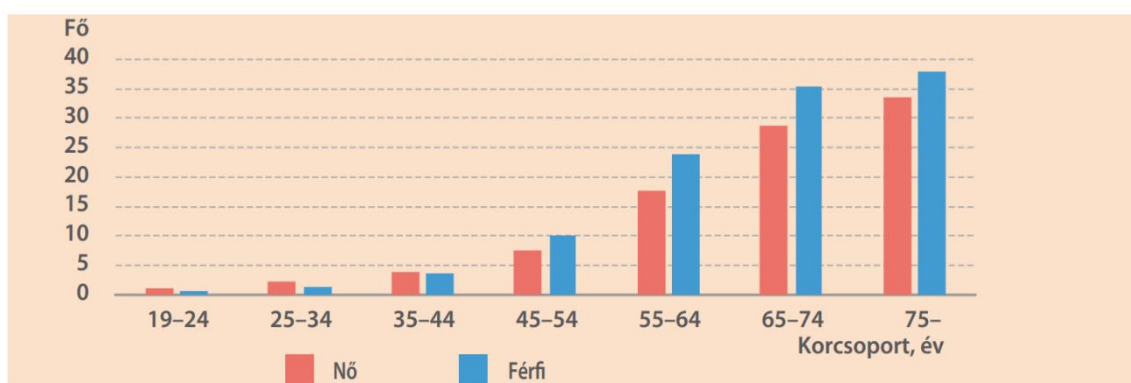
2. ábra: A T2DM kialakulásának vázlatos ábrázolása

A Központi Statisztikai Hivatal 1999-2019 felmérése alapján a felnőtt cukorbetegek száma 20 év alatt megháromszorozódott. A világviszonylatban is komoly népegészségügyi problémát az International Diabetes Federation becslése is mutatja, miszerint 2021-ben 61 millió felnőttet (20 és 79 év között) érint a betegség Európa szerte (3. ábra). Ez az érték várhatóan csak növekedni fog és 2030-ra 67 millió, míg 2045-re 69 millió embert fog érinteni a cukorbetegség valamelyik típusa (IDF, 2021). Egy 2017-ben megjelent cikk alapján globálisan 11 felnőttből 1-nek van cukorbetegsége és 90%-a T2DM (Zheng és mtsai, 2017).



3. ábra: Cukorbetegségben szenvedő felnőtt (20-75 év között) emberek száma (millió fő) (IDF, 2021) sárga oszlop: cukorbetegség száma 2021-ben; piros oszlop: cukorbetegség várható száma 2045-re; fekete vonal: százalékos emelkedés

2019-ben egy Magyarországon történő felmérés kimutatta (4. ábra), hogy több mint 1,1 millió felnőtt és több mint 5 ezer gyermek él cukorbetegséggel (Központi Statisztikai Hivatal, 2020).



4. ábra: Száz megfelelő korú lakosra jutó cukorbetegség száma Magyarországon életkori csoportok szerint (2019) (Központi Statisztikai Hivatal, 2020).

A nem megfelelően kezelt DM hosszútávú szövődései közé tartozik a szív- és érrendszeri megbetegedések (Meigs, 2003). A kezeletlen vagy rosszul kezelt T2DM jelentősen befolyásolja a mikrovaskulátúrát, mely végső soron diabéteszes nephropáthiát, retinopáthiát és neuropáthiát eredményez, ami komoly hatással van az életminőségre és a várható élettartamra (Faselis, és mtsai., 2020). A T2DM-ben szenvedő betegek között nagyon gyakori az alkoholmentes zsírmájbetegség (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) (Harikrishna, 2015). Felmérések alapján megállapították, hogy az NAFLD kialakulása megduplázódott a T2DM-ben szenvedő betegeknél. Statisztikai adatok alapján napjainkban az NAFLD a

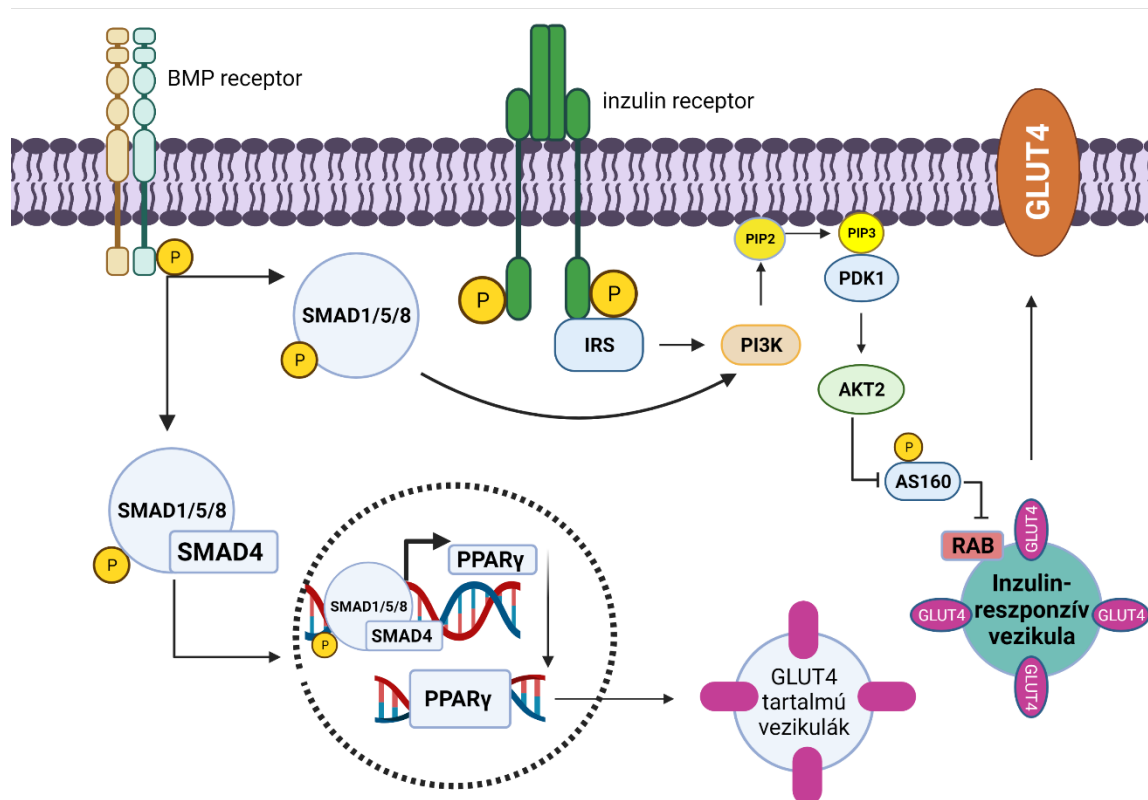
leggyakoribb májbetegség, és a felnőtt lakosság 25%-át érinti. A betegség hátterében az T2DM-hez hasonlóan az egészségtelen életmód és a kóros elhízás következtében kialakuló inzulinrezisztencia áll (Tanase és mtsai, 2020).

Klinikai gyakorlatban számos orális antidiabetikus szert használnak. A GLUT4 transzlokációjának fokozására a metformin (1,1-dimetil-biguanid-hidroklorid) gyógyszer alkalmazása a leggyakoribb. Kutatások alapján 31%-kal csökkenti a T2DM kialakulásának kockázatát. A gyógyszer javítja az inzulinérzékenységet miközben csökkenti az éhomi glükózkoncentrációt. A glükoneogenesis gátlásával csökkenti a máj glükóz-kibocsátását és növeli az izmok és zsírszövetek glükózfelvételét. Megállapították, hogy az AMPK-tól függő mechanizmuson keresztül fejt ki a hatását (Zhou és mtsai, 2001). Ismert továbbá a mitokondriális légzési láncot gátló hatása, mely a metformin hatásának legvalószínűbb magyarázataként szolgál (Hajjar és mtsai, 2013). A rosiglitazon (kereskedelmi név: Avandia®) a tiazolidindionok (TZD) vagy más néven glitazon gyógyszer család tagja, hatását tekintve PPAR γ antagonistá és javítja a glükózanyagcserét (Stumvoll és mtsai, 2009). Kedvezőtlen kardiovaszkuláris hatásai miatt (Psaty és mtsai, 2007) azonban kivonták a kereskedelmi forgalomból.

1.4 Csontmorfogénikus fehérjék (BMP)

A csontmorfogénikus fehérjék a (BMP) a transzformáló növekedési faktor β szupercsalád tagjai. Ezek a fehérjék elsősorban a porc és csontmorfogenezist, differenciálódást és a regenerációt indítják el. Ma már több mint 30 BMP-t ismerünk és ezek közül 15 emlőseben is megtalálható (Wang és mtsai, 2014). Számos klinikai vizsgált indult arra nézve, hogy ezek a fehérjék képesek-e hatékonyan javítani a glükózfelvételt T2DM betegek esetén (Zhang és mtsai, 2015).

A BMP fehérjék többsége hatásukat a SMAD útvonalon keresztül fejtik ki. Ennek első lépéseként a BMP-k kötődnek a plazmamembránban elhelyezkedő heterodimer receptorukhoz. A kötődés hatására foszforilálódik a SMAD 1/5/8, mely így aktiválódik és komplexet képez a SMAD4-gyel. A komplex a sejtmagba transzlokálódik, ahol a DNS megfelelő régiójához kötődve transzkripció szabályozóként működik. A PPAR γ gén expressziójának fokozásával hozzájárulnak a vázizomsejtek inzulinérzékenységének növeléséhez. A foszforilált SMAD 1/5/8 továbbá a PI3K aktiválásán keresztül fokozza a GLUT-4 transzlokációját (Massagué és mtsai, 2005). Ezek alapján megállapítható, hogy összefüggés van a BMP és az inzulinfüggő útvonalak között (5. ábra).



5. ábra: BMP és az inzulinfüggő jelpálya kapcsolata

A glükóz homeosztázisának javításában fontos szerepet játszanak a szervezetünkben keringő BMP-k (Luo, és mtsai., 2017). A BMP-7 fokozza a zsírszövet és az izmok glükózfelvételét, a PDK1 és Akt aktiválásán keresztül, ami a GLUT4 transzlokációt serkenti. A szérumban BMP-7 szintje csökkent T2DM betegség modellben. A megfelelő szintre visszaállított BMP-7 szint a vércukorszint csökkenését eredményezte. A BMP-4 ezzel szemben pont ellenkező aktivitást mutatott. A PKC- θ izoform aktiválásával ugyanis gátolja az inzulinjelátvitelt, ami inzulinrezisztencia kialakulását okozza (Chattopadhyay és mtsai, 2017).

A BMP jelátvitelnek az idegrendszer fejlődésében is alapvető szerepe van. Kutatások során felnőtt egér retina ganglionsejtekben *in vivo* károsodást idéztek elő. A vizsgálatok megállapították, hogy a sérült retinában megemelkedett a BMP2, -4 és -7 szintje, ami SMAD1/5/8 fokozott foszforilációját váltotta ki. BMP gátlók befecskendezése azonban blokkolta ezt a folyamatot, és kimutatták a BMP-SMAD1/5/8 jelzés neuroprotektív hatását (Ueki és mtsai, 2012).

Kutatások kimutatták, hogy érett adipocitákban a BMP-2 és BMP-6 fokozza a glükózfelvételt, valamint indukálják a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma (PPAR γ) expresszióját, mely fokozza a szövetek inzulinérzékenységét T2DM

állatmodellekben. A BMP-2 és BMP-6 hatásai egyaránt hatnak a glükóz- és zsírsavanyagcserére, valamint az adipokin expresszióra. Ezen eredmények birtokában a BMP-2 és BMP-6 útvonalak egy ígéretes terápiának bizonyulnak az inzulinrezisztencia kezelésében. (Schreiber és mtsai, 2017). A BMP14 egy másik útvonalon keresztül képes fokozni a Sirt1 expresszióját, mely deacetilálódik és aktiválja a PPAR γ működését (Wang és mtsai, 2018).

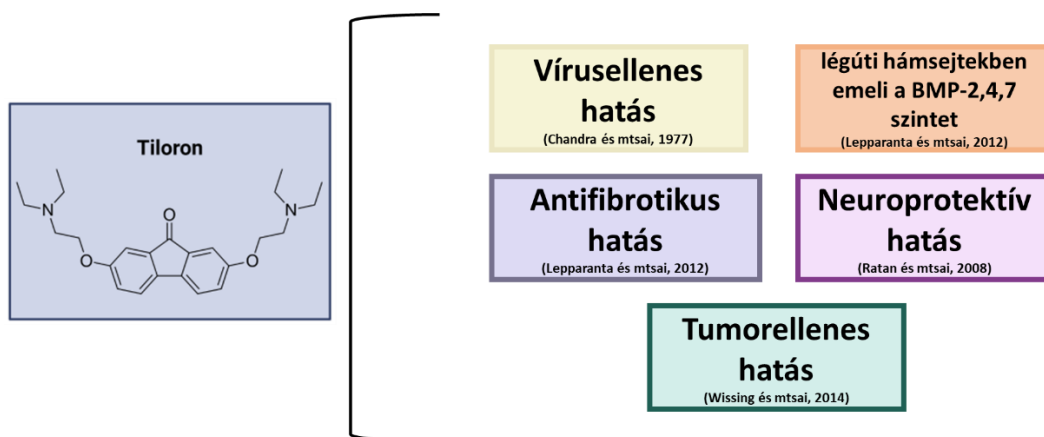
A T2DM világméretű elterjedése miatt különösen fontos új terápiás szerek felfedezése és tesztelése.

1.5 Tiloron dihidroklorid

Az 1970-es években felfedezett tiloron dihidroklorid egy kismolekulású szintetikus vegyület, amit interferon indukáló hatása miatt azonosítottak (Kaufman és mtsai, 1971) (6. ábra). Kísérleti állatokon végzett kutatások bizonyítják lázcsillapító és gyulladáscsökkentő hatását is (Clark, 1978). Már a 70-es évektől kezdve komoly igény mutatkozott vírusfertőzések kezelésére alkalmas új készítmények felfedezése, így felmerült a tiloron antivirális hatásának tesztelése (Chandra és mtsai, 1977). Számos tanulmányban bizonyították a tiloron hatékonyságát olyan vírusokkal szemben, mint az Ebola vagy influenza (Sean és mtsai, 2020) illetve a közelmúltban tesztelték eredményesen a SarsCov-2 humán koronavírussal szemben is (Puhl és mtsai, 2021).

A tiloron képes a ciklin-dependens kináz 5 expresszióját csökkenteni, mely a daganatos sejtek méretének csökkenéséhez vezet (Wissing és mtsai, 2014).

Kutatások során igazolták a tiloron antifibrotikus hatását tüdőben (Lepparanta és mtsai, 2012), antifibrotikus hatását humán kardiális fibroblasztokon és egérszívben (horlock és mtsai., 2021), neuroprotektív (Ratan és mtsai, 2008), valamint BMP-t indukáló hatását. Leírták, hogy a légúti hámsejtekben fokozódik a BMP-2,4,7 szintje tiloron hatására (Lepparanta és mtsai, 2012). A rendelkezésre álló szakirodalom azonban nem számol be a tiloron vázizomsejtekre gyakorolt hatásáról.



6. ábra: Tiloron eddig leírt hatásai

2. Célkitűzés

A rendelkezésre álló szakirodalom alátámasztja, hogy az egészségtelen táplálkozás és a mozgásszegény életmód a T2DM kialakulásához vezethet. Számos tanulmány igazolja a tiloron jótékony hatásait különféle betegségmodellekben, de kevés adat áll rendelkezésre a vázizomsejtekre kifejtett hatásáról. Ennek következtében célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a tiloron növeli-e a szöveti glükózfelvételt és a GLUT4 transzlokációját in vivo modellben. Továbbá vizsgáltuk, hogy a kezelés javítja-e a magas zsírtartalmú diéta okozta elváltozásokat az izmokban, illetve a belső szervekben.

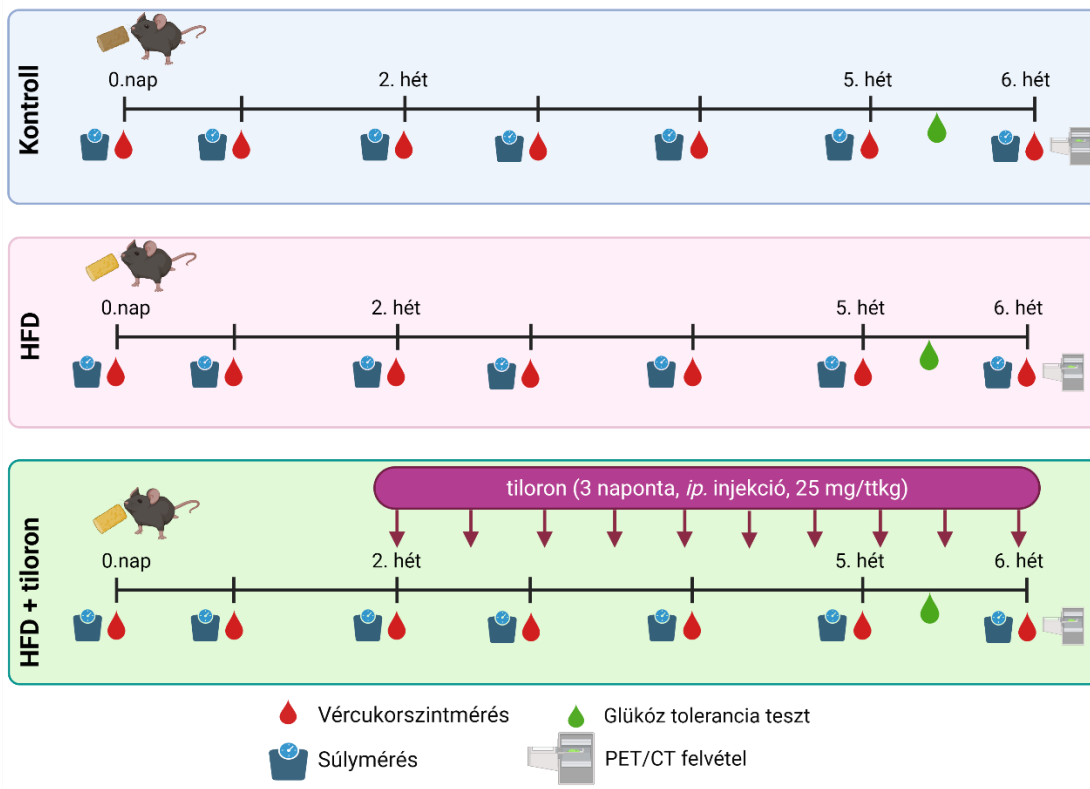
3. Anyagok és módszerek

3.1 Állatok

Kutatásunk során hím 12-14 hetes C57BL/6 egereket használtunk melyeket az Akronom Kft.-től vásároltunk (1149 Budapest, Angol u. 34.). Minden egyedét szabványos méretű 530 cm² ketrecben tartottunk. A kísérletbe 30 db állatot vontunk be, akiknek a jelenleg hatályos Európai Uniók direktíváknak megfelelő körülményeket biztosítottunk. Az állatokat faforgács almon, 12 órás fénycikluson, 22±2 °C-on és 55± 10%-os páratartalmon tartottuk. Az élelmiszerhez és a friss, tiszta ivóvízhez szabadon hozzáférhettek. Minden állatot a kísérletbe való bevonás előtt kézzel szoktattuk, ezzel próbálva csökkenteni a mérések során fellépő stresszfaktort. Állatkísérletes engedélyek száma: XV. /2662/2021. és 1/2017/DEBÁB.

A 6 hétig tartó kísérlet alatt 3 csoportot alakítottunk ki, amit a 7. ábra reprezentál és melyekbe véletlenszerűen soroltunk be az egereket. A kontroll csoportba egyedeket 6 hétig normál táppal etettük (LT/R Rágcsálótáp, gyártó: Szinbád Kft. Gödöllő, forgalmazó: Innovo Kft. Isaszeg). A 2. és 3. csoportba tartozó egereket pedig (Hight Fat Diet; HFD) étrenden tartottuk. Ezek az állatok a kísérlet időtartama alatt olyan keveréket kaptak melynek 20%-a fehérje, 36%-a zsír és 36,7%-a szénhidrát (HF260 rágcsálótáp, gyártó: SAFE® Augy, Franciaország; forgalmazó: Innovo Kft. Isaszeg). Az egyik HFD-s csoport tagjai a 2. héttől kezdve intraperitoneálisan 25mg/ttkg tiloronnal oltottuk, 3 naponta, 4 héten keresztül. A diéta az oltások ideje alatt is folytatódott.

A 6. hét után a kezelés hatásának vizsgálatára az egerek hátsó lábszár izmait, valamint különböző szerveit (szív, máj, vesék, hasi zsírszövet) eltávolítottuk, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk őket.



7. ábra: A kísérletben résztvevő egércsoportok

3.2 Vércukor és testsúlymérés.

Az állatok fejlődésnek, valamint a HFD és a tiloron kezelés hatásának monitorozása céljából hetente mértük a vércukrukát és a testsúlyukat. A vércukormérést minden esetben 16 órás éheztetés előzte, miközben a vízhez továbbra is szabadon hozzáférhettek. Mérés előtt az állatokat intraperitoneálisan 60 mg/ttkg tiopental-nátriummal elaltattuk. A tiopental-nátrium enyhe fájdalomcsillapító hatással rendelkezik és nem gyakorol észrevehető hatást a vércukorszintre. A mérést egy kereskedelmi forgalomban is beszerezhető Accu Check (Roche) készülékkel és a hozzá vásárolható tesztcsíkokkal végeztük. Az állatok farok bőrét egy szikepenge segítségével megkarcoltuk, majd óvatos, masszírozó mozdulatot végeztünk az első vércsepp megjelenéséig. Ezt egy steril gézlappal letöröltük és csak a második cseppet használtuk fel. Végezetül vérzéscsillapítás történt és visszahelyeztük őket a ketrecükbe.

3.3 Glükóz tolerancia teszt

A kísérletben résztvevő állatokon egy alkalommal, a 6. héten intraperitoneális glükóz tolerancia tesztet (GTT) végeztünk el.

A GTT-t 16 órás éheztetés előzte meg, de az egerek a vízhez továbbra is szabadon hozzáférhettek. A mérések előtt az állatokat 60 mg / ttkg tiopental-nátriummal elaltattuk. A kiindulási vércukormérést követően intraperitoneálisan 10%-s β -D glükóz oldatot injektáltunk be (2 mg glükóz / 1 g testtömeg). A beadás után 15, 30, 60, 90 és 120 perccel meghatároztuk a vércukorszintjüket, melynek folyamata megegyezik az előbb ismertetett metodikával.

3.4 Western Blot

Western blot előtt a kísérletben részt vett egerek quadricepszét elporítottuk. A mintákhoz a tömegük alapján homogenizáló puffert (50 mM Tris-HCL pH=7,6; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA), proteáz inhibitor és foszfatáz gátlókat adtunk, végül egy szöveti homogenizáló segítségével elhomogenizáltuk őket. Utána a mintákat 30 percig inkubáltuk jégen, majd 4 °C, 16000 g-n 10 percig centrifugáltuk őket.

A minták fehérje koncentrációjának meghatározásához BCA (bicinchonic acid assay) (#23227, Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) fehérje esszét, a kalibráláshoz BSA hígítási sort használtunk. A mintáinkat 10x mértékben hígítottuk ki, majd 10 μ l mintához 200 μ l BCA (Thermo Scientific) reagenst adtunk. Az abszorbanciát 596 nm-en mértük FluoStar Optima Microplate Reader (413-3481, BMG Labtech GmbH, Germany) segítségével.

A fehérjéket SDS-poliakrilamid gélen választottuk el mely egy gyűjtő (0,65 ml 30%-os akrilamid; 1,25ml 0,5 mM-os Tris; 3,05 ml desztillált víz; 25 μ l 10%-os SDS; 25 μ l 10%-os APS; 5 μ l TEMED) egy 8%-os futtató (6ml 30%-os akrilamid; 5,7 ml 15 mM-os Tris; 10,35 ml desztillált víz; 225 μ l 10%-os SDS; 150 μ l 10%-os APS; 15 μ l TEMED-puffer) gélekből állt össze. A polimerizáció befejeztével mintánként 25 μ g fehérjét választottunk el. Ezt követte az elválasztott fehérjék Protran (GE Helthcare, Amersham TM) nitrocellulóz membránra történő transzferálása. Utána a membránt 5% sovány tejport (Bio-Rad) tartalmazó TBST (TBS [50 mM Tris HCL; pH=7,4; 160 mM NaCl] 0,1% Tween 20-szal kiegészítve) oldatban (Na_3VO_4 -el és NaF-fel kiegészítve) szobahőmérsékleten történő 1 órás blokkolása. Ezt követte a membrán TBST-vel való 3*5 perces mosása. Az elsődleges antitestekkel egész éjszaka 4 °C inkubáltuk a membránokat, melynek adatai az 2. táblázatban olvashatók. Mosás után a megfelelő (anti-nyúl), HRP- (torma peroxidáz) konjugált anti-IgG másodlagos antitestekkel 60 percig inkubáltuk szobahőn. Ezt követően a membránokat ECL (enhanced chemiluminescence) detection reagent kit (ADVANSTA, Menlo Park, CA, USA) oldatban inkubáltuk.

Elsődleges antitest neve	Gyártó	Hígítás	Gazdaszervezet
anti-pAS160 (#8881)	Cell Signalling Technology	1:1000	nyúl
anti-AS160 (#2670)			
anti-GAPDH (#2118)		1:5000	
anti-GLUT 4 (CST#2213)		1:1000	

2. táblázat: A Western Blot során felhasznált elsődleges antitestek adatai

GAPDH: glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

A jelet röntgen filmen (Agfa) detektáltuk. Expozíciót követően a filmeket először a hívó oldatba raktuk, majd az első észlelhető jel megjelenése után desztillált vízzel átöblítettük és a fixáló oldatba helyeztük őket. A jelintenzitások kvantifikációját a Bio-Rad Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) szoftverével végeztük.

3.5 Szöveti glükózfelvétel vizsgálata

A HFD és a tiloronnal kezelt csoport egereinek egy részéről PET/CT felvételt készítettünk. Ezt követően a HFD csoportba tartozó állatokat kétszer intraperitoneálisan 25 mg/ttkg tiloronnal oltottuk 3 nap különbséggel, majd ismételten lemértük a glükózfelvételüket. Az állatokat 3%-os Forane®-nal történő altatása után $10,2 \pm 0,9$ MBq ^{18}F -FDG-t (fluorodeoxiglükóz) fecskendeztünk be 100 μl sóoldatban az oldalsó farki vénába. 50 perccel a radioaktív jelölő beadása után az állatokat izofluránnal érzéstelenítettük, majd egész testes PET/CT felvétel készült, amihez nanoScan PET/MRI 1 T (Mediso LTD., Magyarország) készüléket használtuk. A felvételek kiértékelése után a standardizált felvételi értéket (SUV) a következő formula segítségével számoltuk ki: $SUV = [ROI \text{ aktivitás (MBq/mL)}] / [injektált \text{ aktivitás (MBq)} / \text{állat súlya (g)}]$. Méréseinket kollaborációban a Debreceni Egyetem OEC Nukleáris Medicina Intézetével végeztük.

3.6 A máj hisztológiai vizsgálata

A kísérletünk befejeztével az állatok májáról szövettani vizsgálatot készítettünk, melyhez 4 µm vastagságú fagyasztott metszeteket használtunk. A mintákat hematoxilin-eozin festékkel megfestettük és 40x-es nagyítással vizsgáltuk őket. A kiértékeléshez a humán patológiai diagnosztikában a zsírmáj súlyosságának megítélésére is alkalmazott staging skálát használtuk, melynek értékeit a 3. táblázat tartalmazza. Az eredmények validitását két független szakember is ellenőrizte.

S ₀	a hepatociták <5%-ában figyelhetők meg a lipid vakuolumok
S ₁	a hepatociták 5%-33%-ában figyelhetők meg a lipid vakuolumok
S ₂	a hepatociták 34%-66%-ában figyelhetők meg a lipid vakuolumok
S ₃	a hepatociták >66%-ában figyelhetők meg a lipid vakuolumok

3. táblázat: A staging skála értékei.

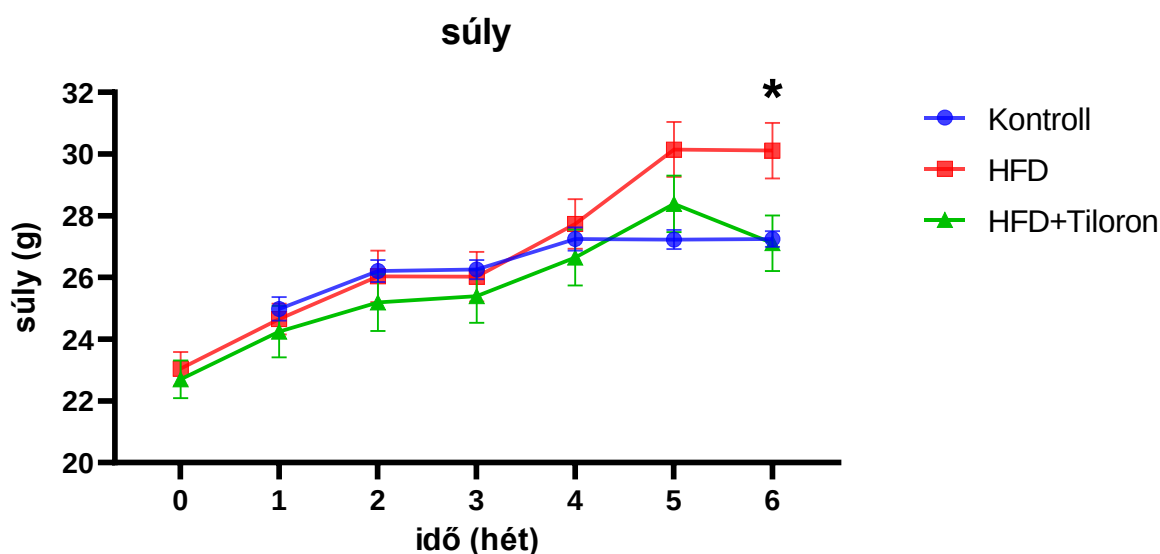
3.7 Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéshez és az ábrák elkészítéséhez a GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) szoftverét használtuk. Statisztikai elemzéshez egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) használtunk. A csoportok páronkénti összehasonlításához post hoc-tesztet (Šidak) alkalmaztunk. A kiértékelt adatokat átlag + SEM alapján lettek kifejezve. Az egyéni p-értékeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. A szignifikancia szinteket és az egyes p-értékeket a diagramokon tüntettük fel.

4. Eredmények

4.1 Testtömeg változás

A kísérlet megkezdése előtt a kiválasztott egerek testtömege nagyjából megegyezett. A heti adatokból az látszódik, hogy kezdetben nem volt látható különbség az egyes csoportok között. Azonban a 4. héttől kezdve a magas zsírtartalmú tápot fogyasztó egyedek testtömege megemelkedett, és a kísérlet végére tartósan magas értéket detektáltunk a többi csoporthoz képest (8.ábra). Statisztikailag szignifikáns különbséget figyeltünk meg kontroll és a HFD csoport tagjai között. A tiloron kezelés a HFD testtömeget növelő hatását kompenzálta, a 6 hét végén az állatok testtömege a kontroll egerekével összevethető nagyságú maradt.



8. ábra: Testtömeg változás a kísérlet ideje alatt.

Egyszempontos ANOVA, ($n=11$), átlag + SEM, $*p<0,05$ a HFD csoport a kontroll csoporthoz viszonyítva

4.2 A belső szervek és izmok súlyváltozásai

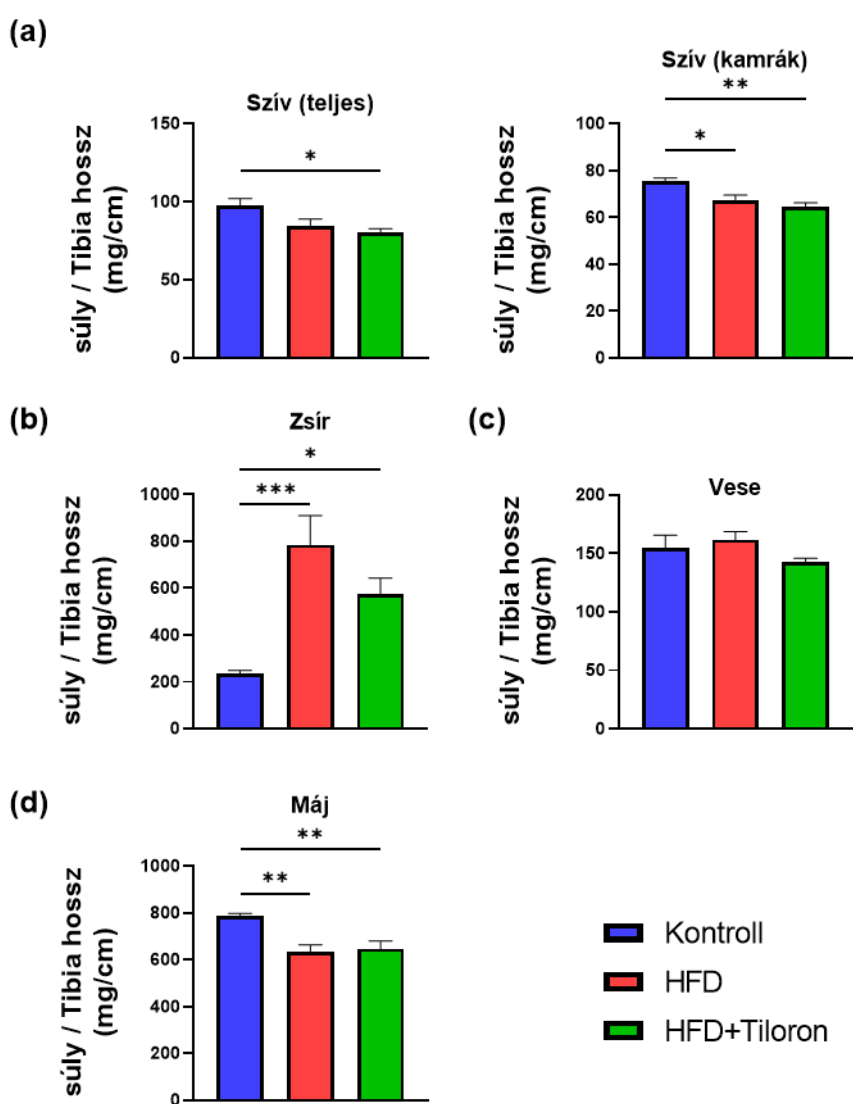
A magas zsírtartalmú diéta okozta szervi és izombéli elváltozások megvizsgálása érdekében a 6 hetes etetési időszak után eltávolítottuk a kísérletben résztvevő állatok különböző belső szerveit és izmait. A kapott eredményeket a Tibia hosszára normalizáltuk.

A szervek mérése során a legnagyobb mértékű súlyváltozást a hasi zsír esetén figyeltük meg (9.b ábra). Szignifikánsan jelentős növekedést láttunk HFD hatására, melyet a tiloron nem szignifikáns mértékben csökkentett.

A kontroll csoporthoz viszonyítva a máj (9.d ábra) tömegének csökkenését figyeltük meg a HFD csoportok esetén. A tiloron kezelés azonban nem mutatott statisztikai különbséget a kezeletlen csoporthoz viszonyítva.

A szív tömegét egészben, illetve a pitvarok nélkül is lemértük (9.a ábra). A teljes szív tömegében csak a tiloronnal kezelt csoport esetén volt szignifikáns különbség. A kamrák tömegének szignifikáns csökkenését detektáltuk a HFD és a kontroll csoport között.

A vese (9.c ábra) esetén nem állapítottunk meg szignifikáns különbséget a csoportok között.



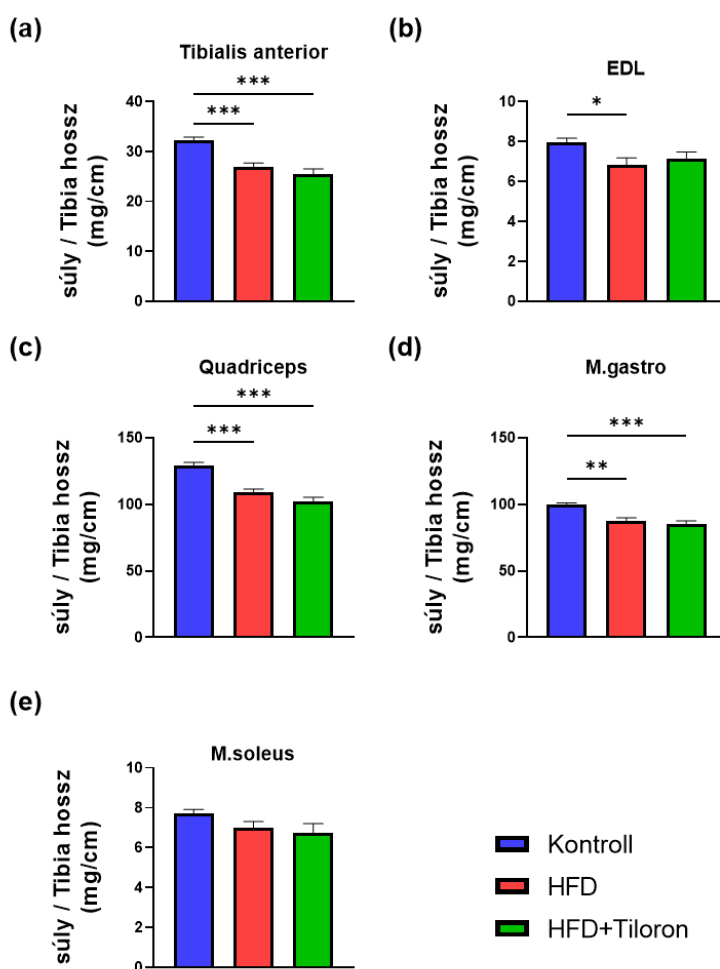
9. ábra: Belső szervek tömegének változása a kísérlet során.

Egyszempontos ANOVA, ($n=8$), átlag + SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Az eredményeket a Tibia hosszára normalizáltuk.

Az izmok tömegében keletkező változás eredményeit a 10. ábra tartalmazza.

A belső szervekhez hasonlóan jelentősen csökkent a vizsgált izmok tömege a kontroll csoporthoz viszonyítva, amit a tiloronos kezelés nem tudott kompenzálni. A legnagyobb mértékű tömegváltozást a főként gyors típusú rostokat tartalmazó M. tibialis anterior (10.a ábra), M. quadriceps (10.c ábra) és a M. gastrocnemius (10.d ábra) esetén figyeltük meg. Az EDL (M. extensor digitorum longus) (10.b ábra) tömege szintén csökken a HFD hatására, míg a kizárólag lassú rostokat tartalmazó musculus soleus (10.e ábra) tömege nem változott szignifikánsan. Megállapítható, hogy a tiloron az EDL-t és a musculus soleus-t leszámítva nem volt képes az izmok tömegében bekövetkező csökkenést kompenzálni.



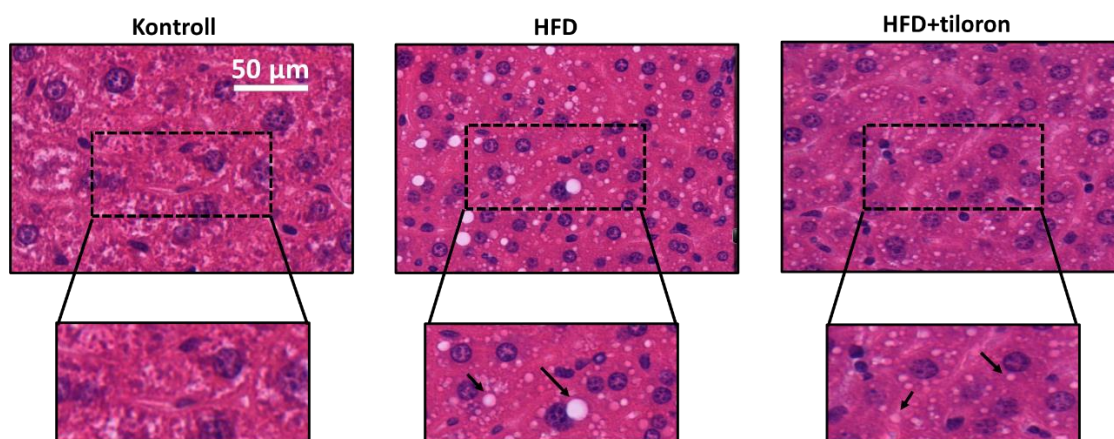
10. ábra: A kísérlet során bekövetkező izomtömegváltozás.

Egyszempontos ANOVA, ($n=8$), átlag + SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Az adatokat a Tibia hosszára normalizáltuk. EDL: Musculus extensor digitorum longus; M. gastro: Musculus gastrocnemius; M. quadriceps: Musculus quadriceps

4.3 A tiloron hatása a májszövet lipid akkumulációjára

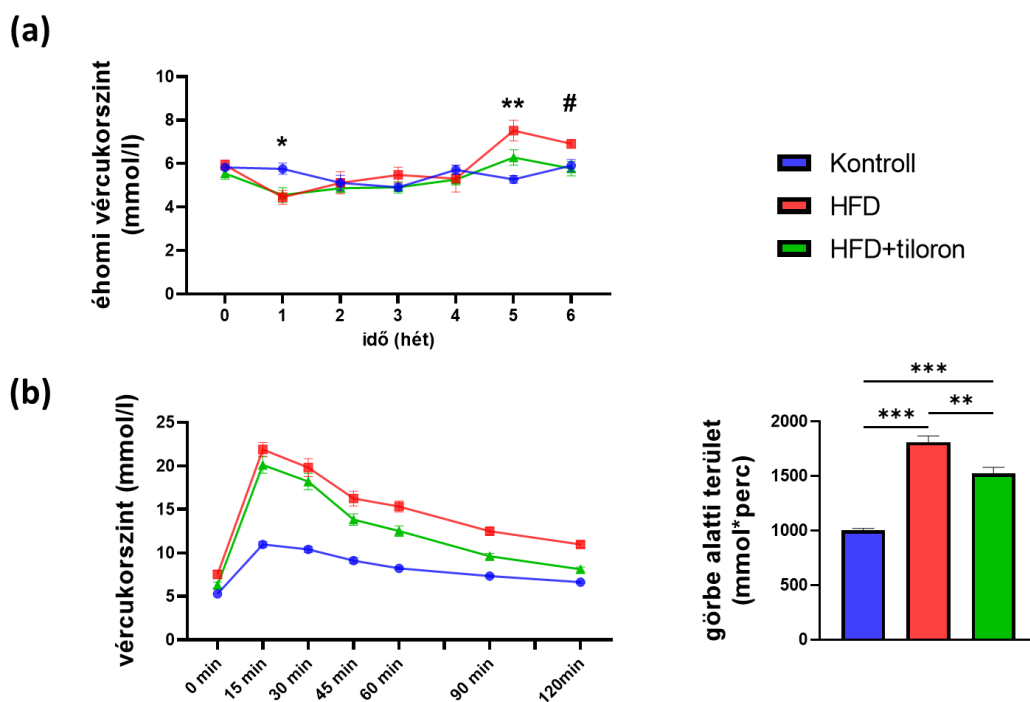
A 6 hetes kísérlet végeztével megvizsgáltuk az egerek májszövetében a lipid akkumulációját (11. ábra). A reprezentatív eredmények jól szemléltetik, hogy a kontroll csoport májában nem találhatóak lipid vezikulák. A magas zsírtartalmú táppal etetett csoportnál diffúz, dominánsan mikrovezikuláris steatosis (S3/3) alakult ki. Ezen vezikulák száma és mérete csökkent a tiloronnal kezelt csoport hepatocitáiban. Az S3/3 a staging beosztásban a 3 fok közül a legmagasabb mértékű, 3. fokú steatosist jelent, mely esetén a hepatociták >66%-a tartalmaz lipid vezikulát.



11. ábra: Máj hisztológia reprezentatív eredményei. A hematoxilin-eozin festett metszetekről készült reprezentatív felvételeken a nyílhegyek a lipid vezikulákat jelölik. Lépték: 50 µm

4.4 Éhomi vércukorszint és GTT eredmények

Az állatok testtömegének mérése mellett hetente végeztünk éhomi vércukorszint mérést. A mérési eredmények alapján az 5., 6. héten a HFD csoportban magasabb éhomi vércukorszintet találunk. A HFD csoport tagjainak vércukorszint értékei az 5. héttől megemelkedtek, míg a kontroll csoport vércukorszintje normál értéket mutatott. (12.a ábra). Az eredmények alapján indokolt lehet a kísérlet időtartamát meghosszabbítani, hogy a csoportok közti különbség jobban látszódjon.



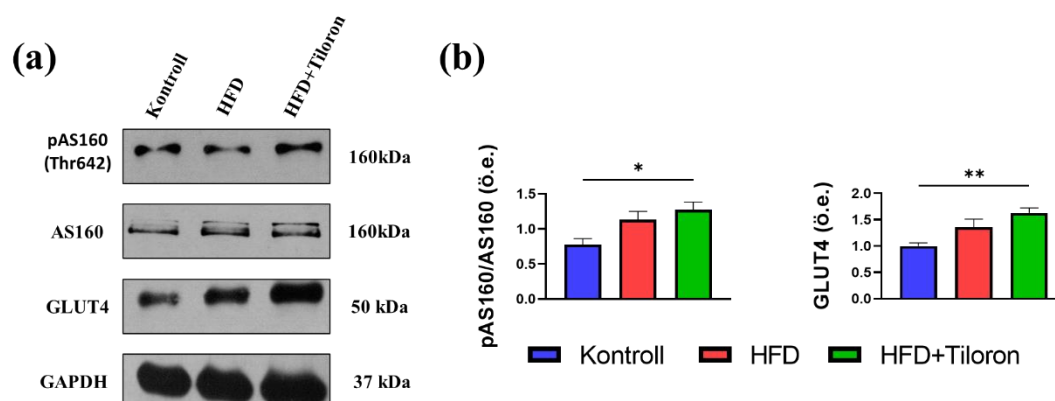
12. ábra: Éhomi vércukorszintek (a) Átlag $\pm$ SEM; Egyszempontos ANOVA; Sidak féléle post hoc teszt; $n=8-11$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; # $p<0,05$; # = HFD csoporthoz viszonyítva a HFD + tiloron értékei. Glükóztolerancia teszt és a görbe alatti terület (b). Átlag + SEM; Egyszempontos ANOVA; Sidak féléle post hoc teszt; $n=8-11$; ** $p<0,01$; * $p<0,001$.**

A kísérlet 6. hetében az állatokon glükóztolerancia tesztet végeztünk el (12.b ábra). A HFD hatására romlott az állatok glükóz toleranciája, melyet a tiloron kezelés javított. Az eredmények alapján a HFD szignifikánsan megemelte a görbe alatti terület nagyságát, melyet a tiloron kezelés szignifikánsan csökkentett a tiloront nem kapott HFD csoporthoz képest, jelezve a tiloron kezelés glükóztoleranciát javító hatását.

4.5 A tiloron kezelés hatása a GLUT4 expressziójára és az AS160, a GLUT4 transzlokációját szabályozó molekulákra

Mivel kimutattuk, hogy a tiloron javítja a glükózfelvételt HFD állatok vázizmában, így a következőkben megvizsgáltuk a glükózfelvételben szerepet játszó GLUT4 glükóztranszporter mennyiségét, valamint a plazmamembránba történő áthelyeződését szabályozó AS160 molekula mennyiségét és foszforilációját Western blot technikával vázizom mintákban (13. ábra). A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a tiloron kezelés hatására szignifikánsan

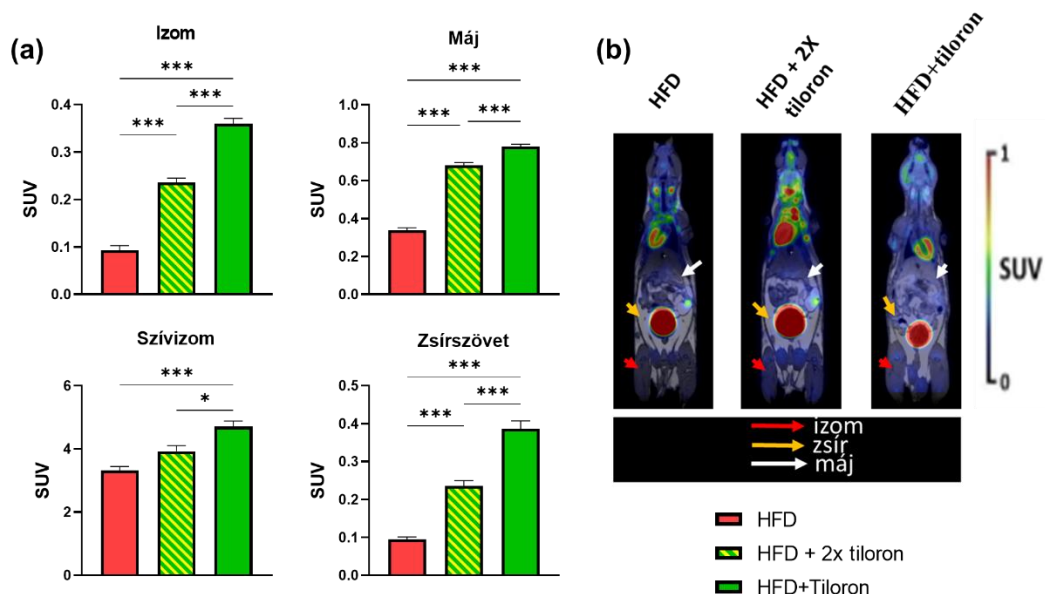
megemelkedett az AS160 foszforilációja, továbbá a GLUT4 expressziója is szignifikáns növekedést mutatott.



13. ábra: Western blot reprezentatív és kvantitatív eredményei. GLUT4, AS160 és pAS160 reprezentatív eredményei (a). A GAPDH-t belső kontrollként használtuk. A kontroll csoporthoz normalizált kvantitatív eredmények (b). *Átlag + SEM; Egyszempontos ANOVA; Sidak féle post hoc teszt; (n=4-5); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ö.e= önkényes egység*

4.6 A tiloron javítja a szöveti glükózfelvételt a PET/CT eredmények alapján

A GTT vizsgálat során az egész szervezet összesített glükózfelvételének változásáról kaptunk információt. Mivel a GTT kimutatta, hogy a HFD hatására romló glükóz toleranciát, csökkent szisztémás glükózfelvételt a tiloron képes javítani, így a továbbiakban PET/CT vizsgálatokat végeztünk annak megválaszolására, hogy az egyes szövetekben (vázizom, szívizom, máj, zsírszövet) hogyan alakul a glükóz felvétele HFD és tiloron kezelés hatására.



14. ábra: Szöveti (izom, máj, szívizom, zsír) glükózanalóg felvétel eredményei.

Reprezentatív eredmények a tiloron kezelés előtt (bal oldal) és után (jobb oldal). Fehér nyilak: máj; sárga nyilak: zsír; piros nyilak: izom (a). A ^{18}F FDG felvétel kvantitatív eredményei (b). Átlag + SEM; Egyszempontos ANOVA; $n=4-5$; $*p<0,05$;

$***p<0,001$;

$$SUV = \frac{\left[ROI \text{ aktivitás } \left(\frac{MBq}{ml} \right) \right]}{\left[\text{Injektált aktivitás } \left(\frac{MBq}{\text{állat testtömege (g)}} \right) \right]}$$

A szöveti PET/CT eredmények igazolták, hogy a tiloron sikeresen növelte a vizsgált szövetek glükózfelvételét. Az eredményekből megállapítható, hogy a HFD állatokban már két tiloron oltás is jelentős szignifikáns növekedést eredményezett a ^{18}F FDG radioaktívan jelölt glükózanalóg felvételében a kezeletlen HFD csoporthoz képest a vázizomban, zsírszövetben és a májban. A tiloron rendszeres injektálása a harmadik héttől tovább növelte ezt a hatást. A szívizom esetében ez a növekedés alacsonyabb volt. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy a tiloron javítja a szövetek glükózfelvételét HFD esetén.

5. Összefoglalás

A DM komoly népegészségügyi problémát jelent világszerte. Napjainkban a cukorbeteg emberek száma eléri a 463 millió főt és ez a szám folyamatosan növekszik. Ismert, hogy az egészségtelen táplálkozás és mozgásszegény életmód nagymértékben hozzájárul a betegség kialakulásához (Silveira és mtsai, 2020). Az elhízott emberek száma szintén drasztikus növekedésnek indult a világ számos pontján. A WHO beszámolja alapján a 2000-es évek elején 300 millió ember volt túlsúlyos vagy kövér. Abban az esetben, ha ez a tendencia folytatódik akkor 2030-ra 3,28 milliárd elhízott felnőtt lesz a világon (TÁP, 2010). A rendszeres nagymennyiségű táplálékbevitel számos egészségügyi problémát okozhat. Tanulmányok kimutatták, hogy a magas zsírtartalmú étkezés következtében a központi idegrendszerben, a májban, zsírszövetben és a vázizomzatban gyulladás alakul ki (Duan és mtsai, 2018). A testzsír túlzott felhalmozódásának egy komoly következménye a NAFLD. A betegség a trigliceridek kóros lerakódásának a következtében alakul ki. A betegek száma világviszonylatban egyre emelkedik (Lian és mtsai, 2020). A rendszeres testmozgás és az egészséges táplálkozás azonban jelentősen csökkenti a DM és a hozzá kapcsolódó szövődmények kialakulásának valószínűségét.

Szervezetünk számára az egyik legfontosabb energiaforrás a glükóz. A vérben keringő glükóz molekulákat a sejtek a GLUT segítségével veszik fel (Mueckler és mtsai, 2013). Testünk egyik legnagyobb glükózfelhasználó szövete a vázizomzat, mely a táplálékkal bevitt glükóz körülbelül 80%-át veszi fel a GLUT4-en keresztül. Ez a folyamat történhet inzulinfüggő vagy-független útvonalakon (Hulett és mtsai, 2022). Ezek az útvonalak végsősoron a GLUT4 tartalmú vezikulák plazmamembránba történő transzlokációját segítik elő.

Szintén a GLUT4 vezikulák transzlokációját és transzkripcióját segítik elő a BMP fehérjék (Massagué és mtsai, 2005). Ezek a fehérjék a transzformáló növekedési faktor β szupercsalád tagjai és napjainkban több mint 30 BMP-t ismerünk (Wang és mtsai, 2014). Számos kutatási eredmény igazolta, a BMP-k kedvező hatását a sejtek glükózfelvételére. A fehérjék hatásukat a SMAD útvonalon keresztül fejtik ki. Az aktivált SMAD1/5/8 a SMAD4-gyel komplexet végez és a sejtmagba transzlokálódva fokozza a PPAR γ expresszióját (Massagué és mtsai, 2015). A PPAR γ ezen kívül szabályozza a zsírsavak génexpresszióját, valamint az adipociták differenciálódását is koordinálják (Heikkinen és mtsai, 2007).

Az 1970-es években írták le először a tiloron dihidroklorid interferon indukáló hatását (Kaufman és mtsai, 1971). Az évek folyamán több kutatócsoport is vizsgálta a molekula kedvező hatásainak mechanizmusát. Egyik széleskörben ismert tulajdonsága a vírusfertőzés kivédése (Sean és mtsai, 2020) ezért számos országban recept nélkül is kapható, orálisan szedhető gyógyszerkészítményként (Ekins és mtsai, 2020). A 2020-ban kitört COVID-19 járvány óta nagyszámú kutatási eredmény igazolta a Sars-Cov2 elleni hatását (Puhl és mtsai, 2021). Ezenkívül bizonyítást nyert lázcsillapító, gyulladáscsökkentő (Clark, 1978) tumorelles (Wissing és mtsai, 2014) és antifibrotikus tulajdonságai is. Későbbi publikációk beszámoltak a tiloron BMP serkentő hatásáról is (Leppäranta és mtsai, 2012).

A kutatómunkánk célja a tiloron metabolikus hatásának vizsgálata in vivo HFD egérmodellben. A magas zsírtartalmú táppal történő táplálás a T2DM modellezésének egyik ismert, és széleskörben használt lehetősége (SkovsØ., 2014). A HFD hatására nagyfokú súlygyarapodást és vércukorszint emelkedést figyeltünk meg, így sikeresen tudtuk modellezni a T2DM-et, valamint a kóros elhízást. Ezzel a modellezéssel továbbá az elhízás egészségre káros hatását is vizsgáltuk. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a zsíros táppal történő etetés hatására romlik a kísérleti állatok GTT-je (Garg és mtsai, 2011). Ezt az álltalunk elvégzett kísérletek eredményei szintén megerősítik. Ismert tény, hogy az elhízás és a mozgásszegény életmód hatására izomsorvadás léphet fel (Guo és mtsai, 2021). A 6 hetes kísérletidő alatt sikeresen igazoltuk a HFD miatt bekövetkező izomtömeg csökkenést. Egy másik tanulmány eredményei beszámolnak a musculus soleus tömegének csökkenéséről. Lényeges különbség azonban, hogy ebben a publikációban patkányokat alkalmaztak és a kísérleti idő 16 hétig tartott (Hasan és mtsai, 2019). Az álltalunk elvégzett kísérletben nem volt megfigyelhető különbség a soleus tömegében, mely valószínűleg az előbb említett eltérések miatt lehetséges. Megvizsgáltuk a belső szervek tömegének változását is. Egy 2021-ben megjelent publikációban, amiben szintén az álltalunk is használt C57BL/6 egereket használtak, a 12 hetes

HFD időszak alatt a belső szervek tömegének gyarapodásáról számoltak be (Jung és mtsai, 2021). Ezzel szemben a saját eredményeink csak a hasi zsír esetén mutattak növekedést. Kutatásunk során továbbá vizsgáltuk, hogy a magas kalóriatartalmú táplálás okozta szervi és izombéli elváltozásokat a tiloron képes-e kontrolálni. A kapott statisztikai eredmények alapján megállapítható, hogy csak kismértékben tudta ezeket az elváltozásokat kompenzálni. A szöveti glükózfelvétel vizsgálása érdekében PET/CT felvételt készítettünk. Az eredmények azt mutatják, hogy már a tiloron kétalkalommal történő injektálása is képes növelni az inzulin érzékeny szövetek (vázizom, zsír, máj, szívizom) glükózfelvételét. Ezt a növekedést a tiloron rendszeres, 3 hétig tartó injektálása csak tovább fokozta. Ezen eredmények alapján igazolni tudtuk, hogy a tiloron képes javítani a szöveti glukózfelvételt. Tanulmányok alapján a GLUT4 expressziója csökken HFD esetén patkány vázizomzatban (Runtuwene és mtsai, 2016). A saját Western Blot eredményeink nem mutattak szignifikáns különbséget a GLUT4 expressziójára a HFD és kontroll csoport között. A tiloron kezelés hatására azonban szignifikáns növekedést figyeltünk meg. A GLUT4 transzlokációját szabályozó pAS160 molekula esetén hasonló eredményeket értünk el. HFD hatására a májban megnövekszik a lipid tartalmú vezikulák száma és mérete (Echeverría és mtsai, 2019). Eredményeink szintén megerősítik ezen vezikulák növekedését a hepatocitákban, és kimutattuk, hogy a tiloron sikeresen csökkenti a mennyiségüket és a méretüket egyaránt.

Kutatásunkkal igazoltuk, hogy a nem megfelelő táplálkozás a T2DM kialakulásának egyik legfontosabb okozója. Bizonyítottuk, hogy a tiloron képes javítani a szövetek glükózfelvételén. Ezen adatok és eredmények, valamint a fellelhető szakirodalom alapján azonban mindenképpen indokolt lehet a kísérlet idejét növelni, hogy a tiloron egyéb jótékony hatásait is igazolni tudjuk.

6. Irodalomjegyzék

- A.M., S., & C.D., K. (2016). Glucose: Properties and Analysis. *Encyclopedia of Food and Health*, 239-247.
- Abdulfatai B. Olokoba, O. A. (2012). Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Medical Journal*, 269-273.
- Association, A. D. (2007). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*.
- Barron, C. C. (2016). Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism*, 124-139.
- Chandra, P. &. (1977). Tilorone hydrochloride: the drug profile. *Mechanism of Action of Antieukaryotic and Antiviral Compounds*, 125-148.
- Chattopadhyay, T. S. (2017). Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) augments insulin sensitivity in mice with type II diabetes mellitus by potentiating PI3K/AKT pathway. *IUBMB Journals*, 195-209.
- Clark, W. G. (1978). The antipyretic effect of tilorone hydrochloride in the cat. *British Journal of Pharmacology*, 281-287.
- DeFronzo, R. F. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*.
- Duan, Y. Z. (2018). Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. *Increase the discoverability of your research*.
- Echeverría, F. V.-M. (2019). High-fat diet induces mouse liver steatosis with a concomitant decline in energy metabolism: attenuation by eicosapentaenoic acid (EPA) or hydroxytyrosol (HT) supplementation and the additive effects upon EPA and HT co-administration. *Royal Society of Chemistry*, 6170-6183.
- Ekins, S. &. (2020). Tilorone, a Broad-Spectrum Antiviral for Emerging Viruses. *Journals*.
- Faselis, C. K. (2020). Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current vascular pharmacology*, 117-124.
- Faselis, C., Katsimardou, A., Imprialos, K., Deligkaris, P., Kallistratos, M., & Dimitriadis, K. (2020). Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. In *Current Vascular Pharmacology* (old.: 117-128). Bentham Science Publishers.

- Galicia-Garcia, U. B.-V.-S. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*,.
- Garg, N. T. (2011). High fat diet induced insulin resistance and glucose intolerance are gender-specific in IGF-1R heterozygous mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476-480.
- Gaster, M. S.-N. (2001). GLUT4 Is Reduced in Slow Muscle Fibers of Type 2 Diabetic Patients: Is Insulin Resistance in Type 2 Diabetes a Slow, Type 1 Fiber Disease? *American Diabetes Association*, 1324-1329.
- GLUT: funkciók, fő glükóztranszporterek.* (2022). Forrás: WARBLETONCOUNCIL: <https://hu.warbletoncouncil.org/glut-453#menu-4>
- Gregg, E. W. (2007). Prevalence of lower extremity diseases associated with normal glucose levels, impaired fasting glucose, and diabetes among U.S. adults aged 40 or older. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 485-488.
- Guo, A. L. (2021). FGF19 protects skeletal muscle against obesity-induced muscle atrophy, metabolic derangement and abnormal irisin levels via the AMPK/SIRT-1/PGC- α pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 3585-3600.
- Hajjar, J. H. (2013). Metformin: an old drug with new potential. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 1511-1517.
- Hardie, D. G. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 251-262.
- Hasan, M. M.-G. (2019). Beneficial effects of metformin on muscle atrophy induced by obesity in rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2677-5686.
- Heikkinen, S. A. (2007). PPAR γ in human and mouse physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*.
- Hivatal, K. S. (2020. november 14). Forrás: https://www.ksh.hu/infografika/2020/infografika_diabetesz.pdf?lang=hu
- Horlock, D. K. (2021). Old Drug, New Trick: Tilorone, a Broad-Spectrum Antiviral Drug as a Potential Anti-Fibrotic Therapeutic for the Diseased Heart. *Pharmaceuticals*.

- Hulett, N. A. (2022). Glucose Uptake by Skeletal Muscle within the Contexts of Type 2 Diabetes and Exercise: An Integrated Approach. *MDPI*.
- IDF, I. F. (2021). Forrás: <https://www.idf.org/our-network/regions-members/europe/welcome.html>
- Jäger, S. H.-P. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *PNAS*.
- Jung, J. H. (2021). Antiobesity and Antidiabetic Effects of Portulaca oleracea Powder Intake in High-Fat Diet-Induced Obese C57BL/6 Mice. *Hindawi*.
- Kaufman, H. E. (1971). Tilorone Hydrochloride: Human Toxicity and Interferon Stimulation. *Sage journals, Experimental Biology and Medicine*, 357-360.
- Klip, A. S. (2014). Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. *American journal of physiology Cell Physiology*, 879-886.
- Lankatillake, C. H. (2019). Understanding glycaemic control and current approaches for screening antidiabetic natural products from evidence-based medicinal plants. *Plant Methods*.
- Lian, C. Y. (2020). High fat diet-triggered non-alcoholic fatty liver disease: A review of proposed mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*.
- Lucier J, W. R. (2018). Diabetes Mellitus Type 1. *Europe PMC*.
- Luo, Y. L. (2017). Decreased circulating BMP-9 levels in patients with Type 2 diabetes is a signature of insulin resistance. *Clinical Science*, 239-246.
- Massagué, J. S. (2005). Smad transcription factors. *Genes & Development*, 2783-2810.
- Meigs, J. B. (2003). Epidemiology of cardiovascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, 358-361.
- Mueckler, M. &. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 121-138.
- Outi Leppäranta, J. M. (2012). Bone Morphogenetic Protein–Inducer Tilorone Identified by High-Throughput Screening Is Antifibrotic In Vivo. *Journals*.

- Psaty, B. M. (2007). Rosiglitazone and Cardiovascular Risk. *New England Journal of Medicine*, 2522-2524.
- Puhl, A. C.-R. (2021). Repurposing the Ebola and Marburg Virus Inhibitors Tilorone, Quinacrine, and Pyronaridine: In Vitro Activity against SARS-CoV-2 and Potential Mechanisms. *ACS Omega*, 7454-7468.
- Rajiv R. Ratan, A. S.-H. (2008). Small Molecule Activation of Adaptive Gene Expression. *The New York Academy of Sciences*, 383-394.
- Richter EA, H. M. (2013). Exercise, GLUT4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake. *Physiological Reviews*, 993-1017.
- Runtuwene, J. C. (2016). Rosmarinic acid ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity in diabetic rats, potentially by modulating the expression of PEPCK and GLUT4. *Drug Design, Development and Therapy*, 2193-2202.
- S., S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation*, 349-358.
- Schreiber, I. D. (2017). BMPs as new insulin sensitizers: enhanced glucose uptake in mature 3T3-L1 adipocytes via PPAR γ and GLUT4 upregulation. *Scientific reports*.
- Sean Ekins, T. R. (2020). Tilorone: a Broad-Spectrum Antiviral Invented in the USA and Commercialized in Russia and beyond. *Pharmaceutical Research*.
- Silveira, E. A. (2020). Type 2 Diabetes Mellitus in Class II and III Obesity: Prevalence, Associated Factors, and Correlation between Glycemic Parameters and Body Mass Index. *International Journal of Environmental Research and Public Health*.
- Smith, H. B. (2015). Fatty liver disease in diabetes mellitus. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 101-108.
- Stumvoll, M. &. (2009). Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. *Annals of Medicine*, 217-224.
- Tanase, D. M. (2020). The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Journal of Diabetes Research*.

- Ueki, Y. &. (2012). Activation of BMP-Smad1/5/8 Signaling Promotes Survival of Retinal Ganglion Cells after Damage In Vivo. *Plos One*.
- Veronika, Á. (2016). *Orvosi biokémia*. Budapest: Semmelweis Kiadó.
- Vizsgálat, O. T. (2010). Forrás:
https://www.ksh.hu/elef/archiv/2009/pdf/elef_1004_otap.pdf?lang=hu
- Wang, D. J. (2018). BMP14 induces tenogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1165-1174.
- Wang, R. N. (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & Diseases*, 87-105.
- Wissing, M. D. (2014). Small-molecule screening of PC3 prostate cancer cells identifies tilorone dihydrochloride to selectively inhibit cell growth based on cyclin-dependent kinase 5 expression. *Spandidos Publications, Oncology Reports*, 419-424.
- Zhang, M. S. (2015). Increased plasma BMP-2 levels are associated with atherosclerosis burden and coronary calcification in type 2 diabetic patients. *Cardiovascular Diabetology*.
- Zheng, Y. L. (2017.). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*.
- Zhou, G. M.-M. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation*.
- Zierath, J. R. (1997). High-Fat Feeding Impairs Insulin-Stimulated GLUT4 Recruitment via an Early Insulin-Signaling Defect. *diabetes journals*, 215-223.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Keller-Pintér Anikónak, aki biztosította számomra a lehetőséget, hogy az általa vezetett Izomadaptációs Munkacsoport kutatómunkáikba, bekapcsolódhassak. Köszönettel tartozom Köhler Zoltán Márton kutatónak a rengeteg szakmai tanácsért és segítségért.

Megszeretném köszönni Dr. Csont Tamás jelenlegi és Prof. Dr. Dux László korábbi tanszékvezető uraknak, hogy bekapcsolódhattam a Szent-Györgyi Albert Általános Orvostudományi Kar Biokémiai Intézetének munkájába.

Köszönöm Szenci-Kaszás Balázs V. éves orvostanhallgatónak a mérésekhez nyújtott segítségért, valamint Szabó Kitti kutatónak az átadott információkért.

Köszönet illeti továbbá munkacsoportunk volt és jelenlegi laboratóriumi asszisztenseit Makráné Felhő Zitát és Rádi Erzsébet Klárát a kísérletes munkákhoz nyújtott segítségükért, valamint a SZAOK-ÁOK Biokémiai Intézet valamennyi munkatársát.

Külön köszönöm kollaborációs partnereinknek Dr. Trencsényi Györgynek (Debreceni Egyetem OEC Nukleáris Medicina Intézet), aki a szöveti glükózfelvétel vizsgálatában volt a segítségemre, Prof. Dr. Schaff Zsuzsának és Dr. Halász Juditnak (Semmelweis Egyetem, Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet) a májminták hisztológiai feldolgozásában nyújtott segítségükért.

A kutatás az NKFI FK 134684, NKFI K 132446, a TKP2021-EGA-28 számú projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a TKP2021-EGA pályázati program finanszírozásában valósult meg, továbbá a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00734/19) és az Innovációs és Technológiai Minisztérium UNKP-21-5-SZTE-571 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

**A 36. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Horváth Barnabás** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **A tiloron metabolikus hatásai magas zsírtartalmú diéta esetén in vivo egérmodellben** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
<i>A kísérleti állatok mérése és kezelése¹</i>	5
<i>Az állatok feldolgozásában való segédkezés</i>	2
<i>Glükóz tolerancia teszt</i>	4
<i>A minták feldolgozása²</i>	5
<i>A minták fehérjetartalmának mérése</i>	3
<i>Közreműködés a Western blot analízisben³</i>	4
<i>PET/CT vizsgálatok⁴</i>	5
<i>Máj hisztológiai vizsgálatok⁵</i>	2
<i>Adatok statisztikai feldolgozása</i>	5
<i>A dolgozatban szereplő ábrák és táblázatok elkészítése</i>	5
<i>Absztrakt, dolgozat és az előadás elkészítése</i>	5

Kelt: 2022. 06. 16.

Kétszerzős pályamunka esetén:


Pályamunkát benyújtó hallgató (név)
aláírása

Társszerző (név)
aláírása

¹ Az állatok testtömegének és vércukorszintjének monitorozása, illetve tiloron kezelésük

² Izomminták porítása és homogenizálása

³ Poliakrilamid gél öntése, gélelektroforézis, blotolás, előhívás

⁴ Adatok feldolgozása

⁵ Adatok feldolgozása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

Dr. Keller Anikó

Témavezető

(Dr. Keller-Pintér Anikó

SZTE SZAOK Biokémiai Intézet)

aláírása

#Magyarázat:

A munkafolyamatokban való részvétel mértékét ötfokozatú skálán kérjük értékelni. A skála egyes értékeinek jelentése:

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.