

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
Szénhidrátbontó enzimek gátlásának vizsgálata STZ
indukált diabetes mellitus egérmodellben

Takács István Gábor

Doktori értekezés

Témavezetők:

Dr. Pósa Anikó

Egyetemi adjunktus

Dr. Szekeres András

Tudományos főmunkatárs



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

Mikrobiológiai Tanszék

SZEGED

2018

1 Tartalomjegyzék

1	Tartalomjegyzék	1
2	Bevezetés.....	2
3	Célkitűzések.....	3
4	Anyagok és módszerek.....	4
5	Eredmények.....	6
5.1	Az amiláz gátlás mérésének kidolgozása.....	6
5.2	A kiválasztott növényi extraktumok hatása a glikozid-hidroláz enzimekre.....	6
5.3	A kiválasztott növényi extraktumok antioxidáns hatása	8
5.4	A kiválasztott növényi extraktumok tömegspektrometriás analízise	8
5.5	A kiválasztott növényi kivonatok citotoxicitásának és citoprotekciójának vizsgálata.....	9
5.6	Az extraktumok vizsgálata <i>in vivo</i> diabétesz egér modellekben.....	9
6	Következtetések	11
7	A dolgozat alapját képező közlemények	15

2 Bevezetés

A hiperglikémia kezelése nagyon fontos az olyan anyagcsere rendellenességek gyógyítása során, mint például a 2-es típusú diabétesz és a metabolikus szindróma. Az α -amiláz, mint az étrendi poliszacharidok glükóz felszabadításának első enzime, potenciális célpont az új, elhízás elleni és antidiabetikus gyógyszerek fejlesztésének területén. Az általánosan elfogadott terápiás stratégia az étkezés utáni hiperglikémia szabályozására, az α -glükozidáz és az α -amiláz enzim gátlása. Ezen enzimek gátlása jelentősen késlelteti a szénhidrát lebomlását, monoszacharidok felszívódását és a posztprandiális hiperglikémiát. Az akarbóz egy antidiabetikus gyógyszer, amely gátolja a hasnyálmirigy α -amilázt és az intestinalis α -glükozidázt. Azonban több nemkívánatos gasztrointesztinális mellékhatásokkal is rendelkezik, ezért növekvő igény van arra, hogy hatékony, természetes vagy növényi hatóanyagokat izoláljanak káros mellékhatások nélkül. A posztprandiális glikémiás válaszokat vizsgáló klinikai vizsgálatok kimutatták az élelmiszerrel

kapcsolatos polifenolok potenciálját a vércukorszintek csökkentésében. Mivel a vadon élő bogyós növények különösen gazdagak e vegyületekben, az erdei szamócát, szedret és áfonyát választottuk ki a glikozidáz enzimek gátló hatásának vizsgálatára és a posztprandiális hiperglikémia enyhítésére.

3 Célkitűzések

Napjainkban a 2-es típusú cukorbetegség az egyik leggyakrabban előforduló civilizációs betegség, melynek eredményes kezelésére kiváló lehetőséget nyújthat a természetes, növényi kivonatok alkalmazása. Ezen lehetőség gyakorlati megvalósítását elősegítendő doktori munkám céljai a következők voltak:

1. Különböző, bioaktív komponenseket tartalmazó gyógynövény-kivonatok készítése és *in vitro* antidiabetikus hatásai tanulmányozására
2. Új HPLC alapú mérési módszer kidolgozása az *in vitro* α -amiláz aktivitás méréséhez.

3. A kiválasztott növényi kivonatok sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata sejtvonalakon.
4. A növényi kivonatok lehetséges hatóanyagainak feltérképezése tömegspektrometriás vizsgálatokkal.
5. Az extraktumok *in vivo* tesztelése STZ indukált és HFHS diétán kezelt egérmodellekben

4 Anyagok és módszerek

1. Mintaelőkészítési lépések:
 - a. Növények kiválasztása, vizes extrakciója és liofilizálása.
 - b. Az extraktumok tannin mentesítése.
2. A növényi extraktumok hatása a glikozid-hidroláz enzimekre
 - a. HPLC módszer kifejlesztése az α -amiláz gátlás mérésére a szubsztrát szintézise és tisztítása.
 - b. Az extraktumok α -amiláz gátlásának meghatározása a kifejlesztett módszerrel.

- c. Az extraktumok α -glükozidáz gátlásának mérése fotometriás módszerrel.
3. Az extraktumok antioxidáns hatásának meghatározása.
4. Az extraktumok vizsgálata tömegspektrometriai módszerrel (MALDI-TOF).
5. Sejtes hatásvizsgálatok:
 - a. Citotoxicitási tesztek H9c2 sejteken
 - b. Citoprotekció vizsgálata RTCA-SP rendszeren
6. *In vivo* vizsgálatok:
 - a. Kémiai indukált diabétesz modell alkalmazása az extraktumok tesztelésére.
 - b. HFHS diétával indukált egér modell alkalmazása az extraktumok tesztelésére.

5 Eredmények

5.1 Az amiláz gátlás mérésének kidolgozása

A mérés kidolgozása során 2-klór-4-nitrofenil- β -D-maltoheptóz (CNP-G7) szubsztrátot szintetizáltunk, melyet fordított fázisú preparatív kromatográfiás eljárással tisztítottunk. A késztermék tisztaságát folyadék kromatográfiával vizsgáltuk, melynek során a 6.7 percnél eluálódó CNP-G7 szubsztrát tisztasága 96,9% volt. A további ellenőrzés céljából tömegspektrometriás vizsgálatot is végeztünk, pozitív ionizációs módban MALDI-TOF MS technikával. A spektrumon jól láthatók voltak a CNP-G7-re jellemző kálium és a nátrium adduktok m/z értékei.

5.2 A kiválasztott növényi extraktumok hatása a glikozid-hidroláz enzimekre

A mérés előkészítéséhez a növények vizes extraakcióját végeztük el, melyet liofilizálás követett. A száraz növényi extraktumokat vizsgálat előtt feloldottuk desztillált vízben majd lecentrifugáltuk és mértük az α -amilázra és α -glükozidáz aktivitásra kifejtett hatásukat. A

méréseket követően három európai növény került kiválasztásra a következő IC_{50} értékekkel α -amilázra vonatkoztatva, erdei szamóca $8,84 \pm 2,8 \mu\text{g/ml}$, fekete áfonya $25 \pm 8 \mu\text{g/ml}$, szeder $27,27 \pm 9 \mu\text{g/ml}$, melyek α -glükózidáz esetén $7,67 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$ (erdei szamóca), $25,62 \pm 0,85 \mu\text{g/ml}$ (szeder), $30,46 \pm 0,98 \mu\text{g/ml}$ (áfonya) értékeket mutatták. A nyers extraktumokból keveréket is készítettünk és annak hatását is megvizsgáltuk. Az erdei szamóca, áfonya és szeder extraktumokat is tartalmazó keverék az α -glükózidáz gátlása során $11,2 \mu\text{g/ml}$ IC_{50} koncentrációval, míg az α -amiláz gátlása során $15,3 \mu\text{g/ml}$ IC_{50} értékkel volt jellemezhető.

Tannin-mentesített kivonattal ismételten elvégeztük az aktivitás méréseket és az α -amiláz esetében 7,2%-al az α -glükózidáznál pedig 14,9%-al csökkent a gátlás a kiindulási értékhez képest. A mért gátlási értékek még így is jelentősek voltak, ami alapján elmondható, hogy az extraktumban az enzimek gátlásáért más hatóanyagok is felelősek a tanninon kívül.

5.3 A kiválasztott növényi extraktumok antioxidáns hatása

A növényi hatóanyagoknak azt a képességét, hogy megakadályozzák a szabad gyökök képződését és az azokból eredő káros hatásokat, antioxidáns kapacitásnak nevezzük. A kapacitás mérését mindhárom növényi kivonat esetében elvégeztük. Az áfonya $809,15 \pm 68,27$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, az erdei szamóca $490,47 \pm 56,97$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ és a szeder $366,32 \pm 42,67$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ C-vitaminnak megfelelő antioxidáns kapacitás értékekkel volt jellemezhető.

5.4 A kiválasztott növényi extraktumok tömegspektrometriás analízise

A növényi extraktumok mérése során a mintában lévő vegyületeket a proton, nátrium és/vagy kálium által kationizált kvázi molekula ionok segítségével azonosítottuk. Azon vegyületek esetében, ahol a molekulaionok tekintetében mind a három, a $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$ és $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z értékeket is detektáltuk a Metabolomics Workbench Data adatbank segítségével meghatároztuk a kémiai összetételt. A detektált

vegyületek nagy része a flavonoidok csoportjába tartozott, melyek biológiai aktivitása több aspektusból is ismert.

5.5 A kiválasztott növényi kivonatok citotoxicitásának és citoprotekciójának vizsgálata

A növényi extraktumok sejtkárosító hatásának méréséhez MTT festéses, míg a citoprotekciós vizsgálatokhoz valós idejű sejt életképességi mérést használtunk (RT-CES) és a vizsgálatokat H9c2 embrionális patkány szívizomsejteken végeztük. Az elvégzett vizsgálatok alapján mindenképpen kijelenthető, hogy az alkalmazott növényi kivonatok nem tekinthetők toxikusnak az alkalmazott *in vitro* rendszerben. Azonban az alkalmazott citoprotekciós kísérletben a stresszként használt hidrogén-peroxidos kezelés hatását nem tudta protektálni egyik kivonat sem.

5.6 Az extraktumok vizsgálata *in vivo* diabétesz egér modellekben

Az első *in vivo* egér modellhez STZ indukált CD1 egereket használtunk. Öt nappal az STZ kezelés után a

diabéteszes egereknél az egyszeri dózisban beadott keményítő hatására szignifikánsan megemelkedett a vércukorszint. A növényi extraktummal kezelt egerek vér glükóz koncentrációja az akarbózzal kezelt kontrolhoz hasonlóan viselkedett, azaz a lecsökkent. A második esetben C57Bl6 egereket használtunk *in vivo* egér modellként, melyek hajlamosak a diéta által indukált elhízásra. Ezen kísérleti csoport szintén hasonló vércukorszint változást mutatott, a keményítő által kiváltott majd az akarbózzal vagy növényi extraktummal kezelt egereknél. Így megállapítható, hogy mindkét *in vivo* kísérlet esetén a keményítő és akarbóz, valamint a keményítő és növényi extraktum adagolást követően a vércukorszint a cukorbeteg egerekben stabil maradt a kísérlet végéig.

6 Következtetések

1. Az irodalomból ismert nyolc gyógynövényt választottunk ki, amelyek glikozid-hidroláz aktivitásait *in vitro* teszteltük. A növényi kivonatok dózis függően gátolták az α -amiláz aktivitását. Az egyes kivonatokhoz tartozó IC_{50} értéket meg határoztuk. A kiválasztott növények közül az erdei szamóca kivonatának volt a legalacsonyabb IC_{50} értéke miközben az áfonya és a szeder IC_{50} értéke szignifikánsan magasabb volt.
2. Új érzékeny HPLC módszert dolgoztunk ki az α -amiláz gátlásának a mérésére. A HPLC alkalmazásával a komponensek elválasztása és mennyiségi meghatározása lehetséges és az adatokból a reakciók sebessége kiszámítható. Olyan szintetikus szubsztrátot hoztunk létre mely jobb kötést alakít ki az amiláz enzim aktív centrumával ezáltal jobban tudja modellezni a természetes viszonyokat. A CNP-G7 szintézisének kialakított β -konfiguráció megvédi a szubsztrátot az amiláz hasításától így a kromofor csoport mindvégig a szubsztráton marad specifikussá téve a meghatározást. A

szubsztrát tisztaságát folyadék kromatográfiával és MALDI-TOF MS készülékkel ellenőriztük.

3. Az állatkísérletek előtt annak megállapítása érdekében, hogy a kipróbálásra szánt növényi hatóanyagok *in vitro* milyen hatást gyakorolnak a sejtekre citotoxicitási és citoprotekciós tesztet végeztünk. Az eredményeink azt mutatták, hogy egyik vizsgált növényi kivonatnak sem volt a citotoxikus hatása a vizsgált koncentrációtartományban.
4. A növényi komponensek hatóanyagait tömegspektrometriás módszerrel vizsgáltuk. A MALDI-TOF-MS eredményekkel több komponens összegképletét meghatároztuk és az irodalmi adatok alapján megadtuk a hozzájuk tartozó vegyületek lehetséges körét. A kivonatok az eredmények alapján nagy mennyiségű polifenolos vegyületeket tartalmaztak, amelyek közül legfontosabbak a tanninok, ellagtanninok, flavonoidok, és ezek származékai.
5. Az *in vivo* kísérleteknél mind a két cukorbeteg modellben teszteltük az általunk alkalmazott növényi keverék kombinációt. A kémiaailag indukált diabétesz

egy egyszerű és viszonylag olcsó modell a diabétesz patogenezisének a tanulmányozására rágcsálókban ezért az 1-es típusú cukorbetegség tanulmányozására a streptozotocin (STZ)- indukálásával hoztuk létre cukorbetegséget a CD1-es típusú egerekben. A 2-es típusú cukorbetegség tesztelésére HFHS tartalmú táplálék által előidézett prediabetikus elhízási modellt alkalmaztunk. Ezeket a kísérleteket hím C57BL6 egereken hajtottuk végre, amelyek hajlamosak a táplálék által kiváltott elhízásra. Mind a két cukorbeteg állat modellnél a farok vénából vett vérminta alapján a kezelést követően meghatároztuk a vércukor értéküket. Beszámolhattunk arról, hogy az általunk alkalmazott növényi kivonatok hatékonyan enyhítik a "posztprandiális" vércukorszint emelkedést normál egerekben és a hiperglikémiát prediabetikus és STC indukált cukorbeteggekben. A három növény keverékének alkalmazása megerősítette, hogy ezek a gyógynövények használhatóak az étkezés utáni hiperglikémia csökkentésére azáltal, hogy hatékonyan gátolják az α -amiláz és α -glükózidáz enzimeket. Továbbá biztonságosan alkalmazhatóak, mert nem

merült fel citotoxikus hatás. A jelenlegi *in vitro* és *in vivo* adatok kombinációja azt sugallja, hogy a növényi kivonatok anti-hiperglikémiás hatása összefügg a bél α -glükózidáz és az α -amiláz gátlásával. A növényi kivonatok nem toxikusak, és nincs nyilvánvaló mellékhatásuk ezért célzott lehet a hiperglikémia lehetséges kiegészítő kezelésére a 2-es típusú cukorbetegségben vagy a metabolikus szindrómában.

7 A dolgozat alapját képező közlemények

MTMT azonosító: 10057721

Referált folyóiratokban megjelent publikációk

HPLC method for measurement of human salivary α -amylase inhibition by aqueous plant extracts.

Takács, I., Takács, Á., Pósa, A., Gyémánt, Gy. Acta Biologica Hungarica, 2017; 68(2):127-136. doi: 10.1556/018.68.2017.2.1; Q3; IF 0.581

Simple ITC method for activity and inhibition studies on human salivary α -amylase

Lehoczki, G., Szabó, K., Takács, I., Kandra, L., Gyémánt, Gy. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2016; 31,(6):1648-1653., Q2 IF: 4.293

*A dolgozat témájához kapcsolódó konferencia
összefoglalók*

**Investigation of α -amylase inhibitory activities of
herbal extracts with a HPLC-based assay**

Takács, I., Gyémánt, Gy., Boros, K., Hohmann, J., Csupor,
D. *Planta Medica*, 2015; 81(16) 1520 DOI: 10.1055/s-
0035-1565726

**Anti-Amylase and antifungal effect of common herbs
and spices**

Lehoczki, G., Kovács, R., Takács, I., Pető, K., Gyémánt,
Gy. 8th Central European Conference “Chemistry towards
Biology“ 28th August – 1st September 2016 Brno, Czech
Republic Published by University of Veterinary and
Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic ISBN
978-80-7305-777-0

Új HPLC eljárás az alfa-amiláz aktivitás és gátlás mérésére

Takács, I., Pósa, A., Szekeres, A., Endre, G., Gyémán, Gy.
23rd International Symposium on Analytical and
Environmental Problems October 9-10, 2017 University
of Szeged, Department of Inorganic and Analytical
Chemistry Szeged Hungary ISBN 978-963-306-563

Társszerzői nyilatkozat

Jelölt neve: Takács István Gábor

Doktori iskola : SZTE TTIK , Biológia Doktori Iskola

Közlemény címe: **Simple ITC method for activity and inhibition studies on human salivary α -amylase**

Szerzők: Gábor Lehoczki, Kármén Szabó, István Takács, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt

Megjelenés helye, ideje: Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2016, Volume 31, Issue 6, 1648-1653.

Alulírottak kijelentjük, hogy a fenti közlemény első szerzős közleményként került megadásra Lehoczki Gábor benyújtott PhD dolgozatához. Takács István hozzájárulása meghatározó volt az enzimreakciók követésére szolgáló HIPLC módszer kidolgozásában és alkalmazásában, ami nem szerepel új tudományos eredményként Lehoczki Gábor tézisei között.

A jelölt által a Szegedi Tudományegyetemre benyújtott Ph.D. értekezésben felhasznált tudományos eredmények nem szerepeltek más Ph.D. értekezés tudományos eredményei között sem. Tudomásul vesszük, hogy a fenti tudományos eredmények később sem szerepelhetnek további Ph.D. értekezések eredményei között.

Takács István (jelölt)




Szeged, 2017. 09. 27.

Szerzők: Lehoczki Gábor



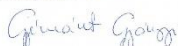
Szabó Kármén



Dr. Kandra Lili



Dr. Gyémánt Gyöngyi



Debrecen, 2017. 10. 03.

Társszerzői nyilatkozat

Jelölt neve: Takács István

Doktori iskola : SZTE TTK , Biológia Doktori Iskola

Közlemény címe: ***HPLC method for measurement of human salivary α -amylase inhibition by aqueous plant extracts.***

Szerzők: Takács István, Takács Ákos, Pósa Anikó és Gyémánt, Gyöngyi

Megjelenés helye, ideje : Acta Biologica Hungarica, (2017) 68 (2), pp. 127-136. ISSN 0236-5383

Nyilatkozat:

Alulírottak kijelentjük, hogy a fenti közleményben megjelölt és a jelölt által a Szegedi Tudományegyetemre benyújtott Ph.D. értekezésben felhasznált tudományos eredmények eddig nem szerepeltek más Ph.D. értekezés tudományos eredményei között. Tudomásul vesszük, hogy a fenti tudományos eredmények nem szerepelhetnek más Ph.D. értekezés eredményei között.

Takács István (jelölt)

Takács Ákos (társszerző)

Dr.Pósa Anikó (témavezető, társszerző)

Szeged, 2017. 10. 03.

Dr. Gyémánt Gyöngyi (társszerző)

Debrecen, 2017.10.03.

