

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **A nitrogén monoxid szerepének tanulmányozása az inzulinrezisztencia kialakulásában**

Bajza Ágnes

Témavezető: Dr. Szilvássy Zoltán, az MTA doktora



**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2013**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1.</b>	<b>Rövidítések</b>	<b>4.</b>
<b>2.</b>	<b>Bevezetés</b>	<b>6.</b>
2.1.	Az inzulinrezisztencia	7.
	<i>Az inzulinreceptor</i>	7.
	<i>Inzulinhatás és szignáltranszdukció</i>	8.
	<i>Az inzulin mennyiségének meghatározása</i>	10.
2.2.	A nitrátok	13.
	<i>A nitrátok hatásmechanizmusa</i>	14.
	<i>A nitrát tolerancia mechanizmusai</i>	15.
	<i>A nitrát tolerancia és a kardioprotektív mechanizmusok</i>	17.
2.3.	A kolecisztokinin	18.
	<i>A CCK-hatás és jelátvitel</i>	19.
<b>3.</b>	<b>Célkitűzések</b>	<b>21.</b>
<b>4.</b>	<b>Anyagok és módszerek</b>	<b>23.</b>
4.1.	Az akut és a szubkrónikus (7 napos) nitroglicerinnel történő kezelés hatásainak összehasonlítása és az inzulinrezisztencia kialakulásának vizsgálata éber nyulakban	23.
	<i>Műtéti beavatkozás</i>	23.
	<i>Intravénás glükóz felhasználás</i>	24.
	<i>Hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC)</i>	24.
	<i>Hemodinamikai nitrát tolerancia indukciója</i>	24.
	<i>A kísérlet leírása</i>	25.
	<i>Statisztikai analízis</i>	26.
4.2.	A nitrát tolerancia hatásának és a CCK potenciális szerepének vizsgálata a táplálék-indukált inzulin szenzitivizáció jelenségére nyulakban	26.
	<i>A kísérlet leírása</i>	26.
	<i>A nitrát tolerancia meglétének igazolása (verifikáció)</i>	28.
	<i>RIST (Rapid insulin sensitivity test)</i>	28.
	<i>HEGC (hiperinzulinémiás euglikémiás clamp)</i>	29.
	<i>A máj cGMP szintjének mérése</i>	30.
	<i>Statisztikai analízis</i>	30.

<b>5.</b>	<b>Eredmények</b>	<b>31.</b>
5.1.	Az akut és a szubkrónikus (7 napos) nitroglicerín kezelés hatásainak összehasonlítása és az inzulinrezisztencia kialakulásának vizsgálata éber nyulakban	31.
	A hemodinamikai nitrát tolerancia hatása a hemodinamika alapjaira és a methemoglobin keletkezésére	31.
	A nitrát tolerancia hatása a glükózfelhasználásra	32.
	A nitrát tolerancia hatása az inzulinérzékenységre	32.
	A transzdermális nitroglicerín hatása az inzulinérzékenységre nitrát toleranciában vagy annak hiányában	33.
5.2.	A nitrát tolerancia hatásának és a CCK potenciális szerepének vizsgálata a táplálék-indukált inzulin szenzitizáció jelenségére nyulakban.	34.
	A transzdermális NG hatására kialakult hemodinamikai nitrát tolerancia	34.
	A RIST index változása éheztetett és az újra etetett nitrát toleráns és nem-toleráns állatokban	35.
	A HEGC módszerrel mért inzulinérzékenység éheztetett és újra etetett nitrát toleráns és nem-toleráns állatokban	36.
	A CCK8 inzulinérzékenyítő hatása a HEGC steady state állapotának ideje alatt	36.
	A CCK8 infúzió hatása a hepatikus cGMP-re a nitrát toleráns nyulakban	37.
<b>6.</b>	<b>Megbeszélés</b>	<b>38.</b>
<b>7.</b>	<b>Összefoglalás</b>	<b>44.</b>
<b>8.</b>	<b>Summary</b>	<b>45.</b>
<b>9.</b>	<b>Irodalom</b>	<b>46.</b>
<b>10.</b>	<b>Saját közlemények</b>	<b>55.</b>
<b>11.</b>	<b>Tárgyszavak</b>	<b>57.</b>
<b>12.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás</b>	<b>58.</b>
<b>13.</b>	<b>Függelék</b>	<b>59.</b>

## 1. Rövidítések

Akt (PKB)	protein kináz-b
PKC	protein kináz-c
CCK-1 (CCK-A)	kolecisztokinin receptor-1
CCK-2 (CCK-B)	kolecisztokinin receptor-2
CCK-4	kolecisztokinin tetrapeptid
CCK-8	kolecisztokinin oktapeptid
CCK-receptor	kolecisztokinin-receptor
cGMP	ciklikus guanozin monofoszfát
DAG	diacil-glicerol
GC	euglikémiás clamp
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay
eNOS	endothelialis nitrogén-monoxid szintáz
ET-1	endothelin-1
FOXO	forkhead bokszerű fehérje (transzkripciós faktor)
FSIGTT	Frequently Sampled IVGTT
GAP	G-protein-aktiváló protein
GIR	glükóz infúziós ráta
GMP	guanozin-monofoszfát
GRB2	kapcsoló fehérje (growth factor receptor-bound protein)
GSK3	glycogen synthase kinase 3
GTN	gliceril-trinitrát
GTP	guanozin-monofoszfát
HEGC	hiperinzulinémiás euglikémiás clamp
HISS	Hepatic Insulin Sensitizing Substance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	szívfrekvencia
IDDM	inzulin dependens diabetes mellitus
IP <sub>2</sub>	inozitol-1,4-biszfoszfát
IP <sub>3</sub>	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
IRS	inzulinreceptor-szubsztrát
iv.	intravénás

IVGTT	intravénás glükóztolerancia teszt
IVITT	intravénás inzulintolerancia teszt
L-NAME	NG-nitro-L-arginin metil észter
MABP	artériás középnyomás
MAPK	mitogén aktivált protein-kináz
MEK	mitogén aktivált protein-kináz-kináz
NANC	non-adrenerg non-kolinerg
NG	Nitroglicerín
NIDDM	nem inzulin dependens diabetes mellitus
NO	nitrogén monoxid
NOS	nitrogén monoxid-szintáz
OGTT	orális glükóz tolerancia teszt
PDK	phosphoinositide dependent protein kinase
PHA	plexus hepaticus anterior
PI-3-kináz	foszfatidilinozitol 3-kináz
PIP2	foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát
PIP3	foszfatidilinozitol 3,4,5-triszfoszfát
PL-C, PLC	foszfolipáz-C
RAF	proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
RAS	GTP-kötő fehérje
RIA	Radioimmunoassay
RIST	Rapid Insulin Sensitivity Test
SD	standard deviancia
SH2, SH3	Src homológia domének
SH-csoport	szulfhidril-csoport
SIN-1	3-morpholinosydnonimine
SOS	guanin-nukleotid cserélő fehérje (Son of Sevenless)
SSPG	steady state plazma glükóz

## 2. Bevezetés

A cukorbetegséggel kapcsolatos kutatások napjaink orvostudományának egyik legdinamikusabban fejlődő területe. Fontosságát az is mutatja, hogy a cukorbetegséget ma korunk „pestis-ének” tartják, mivel egyre jobban terjed, a cukorbetegek száma világszerte emelkedik, és elmondható, hogy a kardiovaszkuláris megbetegedéseknek a legfőbb kockázati tényezője. Népegészségügyi szempontból is óriási jelentőséggel bír. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai alapján világszerte mintegy 345 millió embert érint. Az iparilag fejlett országokban az úgynevezett civilizációs betegségek közé tartozik. Alapvető befolyással bír az élettartamunkra, és az életminőségünkre.

A cukorbetegség és annak szövődményei, mint az ischaemiás szívbetegség, az agyérbetegségek, a veseelégtelenség, a polineuropátia, a diabeteses szemlencse, valamint a retina betegségek mind a modern társadalom megbetegedési illetve halálozási listájának élén állnak. Eredetileg a cukorbetegséget egységes megbetegedésnek tartották. Később derült csak ki, hogy a diabetes heterogén betegségcsoport, amelynek háttérében elégtelen inzulinhatás áll. A betegség patofiziológiailag két alapvető csoportba sorolható. Az 1-es típus (korábbi elnevezése: inzulinfüggő diabetes mellitus, IDDM), melyben a hasnyálmirigy béta sejtjeinek funkciózavara miatt az inzulin termelése csökkent, illetve a 2-es típus (nem inzulinfüggő diabetes mellitus, NIDDM), amelyben a perifériás szövetek, főként a harántcsíkolt izomszövet és a zsírszövet érzéketlen az inzulin hatásaival szemben.

Bár már jónéhány évtizeddel korábbról is léteznek leírások, esetek, amelyekben együtt fordul elő a cukorbetegség, a köszvény, a magas vérnyomás és a zsírsanyagcsere zavara, azonban metabolikus szindróma felismerése Gerald Reaven (Reaven 1988) nevéhez fűződik, mivel elsőként ismerte fel e klinikai tünetek között az ok-okozati kapcsolatot. A „reaveni elmélet” azóta számos változáson ment keresztül, de a tünetegyüttes molekuláris biológiai alapjának az inzulinrezisztencia/hiperinzulinémiát tartják.

Az inzulinrezisztencia definíciószerűen az az állapot, amelyben normális mennyiségű inzulin szubnormális hatással válaszol.

Fontos megjegyezni, hogy az inzulinrezisztencia a valódi cukorbetegség nélkül is számos, legfőképpen szív-érrendszeri szabályozási zavar kiindulópontja, éppen ezért az inzulin

rezisztenciát a koszorúér-betegség független kockázati tényezőjének tekinthetjük (Reaven 1996).

## **2.1. Az inzulinrezisztencia**

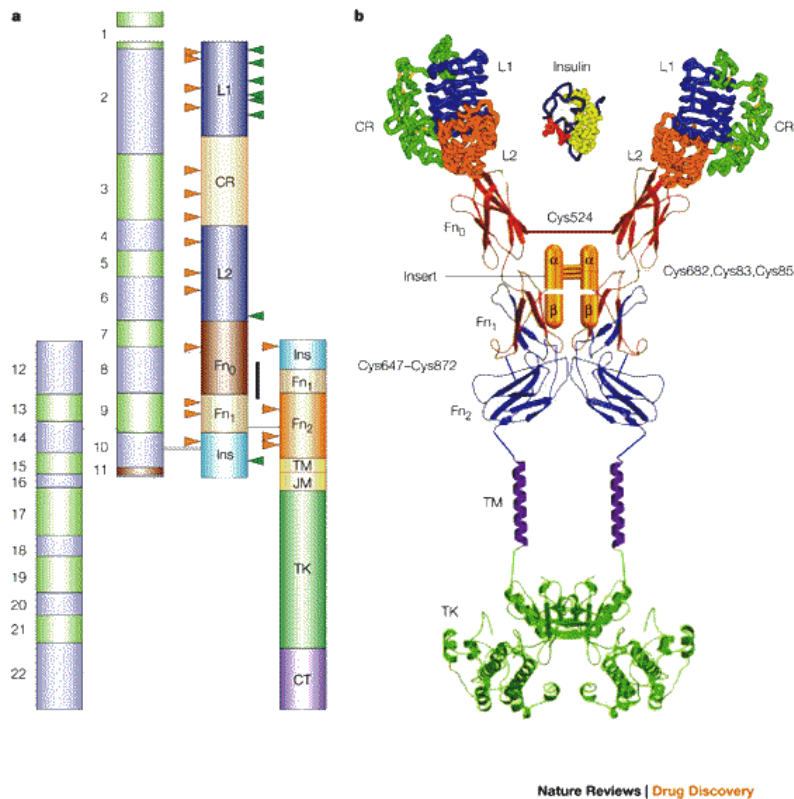
### **Az inzulinreceptor**

Az inzulinrezisztencia jelensége az inzulinreceptorok felfedezését követően került a kutatások érdeklődésének középpontjába.

Az inzulinhatás kialakulásának első lépése a receptorhoz való kötődés. Jelenlegi ismereteink szerint az inzulinreceptor egy transzmembrán, tirozin-kináz enzimsoportha tartozó komplex fehérje, amely két  $\alpha$ -alegységet (135 kDa) és két  $\beta$ -alegységet (95 kDa) tartalmaz. A két-két alegységet diszulfidhidak kapcsolják össze tetramerekké.

A reguláló tulajdonságokkal rendelkező  $\alpha$ -alegység extracellulárisan helyezkedik el, és feladata az inzulin felismerése és megkötése. Ez a 719-731 aminosavból álló egység egy ciszteinben gazdag régiót tartalmaz, amely régió az inzulin kötőhelyéül szolgál (Gherzi és mtsai 1989, Kellere és mtsai 1999).

A  $\beta$ -alegység 620 aminosavból álló, sejtmembránban elhelyezkedő fehérje-alegység, mely katalitikus tulajdonságokkal rendelkezik, vagyis egyidejűleg nevezhető szubsztrátnak és enzimnek. Egy kisebb, extracelluláris része szintén tartalmaz cisztein részt, amely a diszulfidhidak képzésére alkalmas, és amelyek segítségével megkötik az  $\alpha$ -alegységet. A  $\beta$ -alegység membránban elhelyezkedő részének nagy valószínűséggel csupán passzív szerepe van, feladata a receptor lehorgonyzása. Végül, a harmadik rész, a  $\beta$ -alegység intracellulárisan, a citoplazmában található része kináz aktivitással rendelkezik, így meghatározó szerepe van a szignáltranszdukció folyamatában (Olefsky 1990).



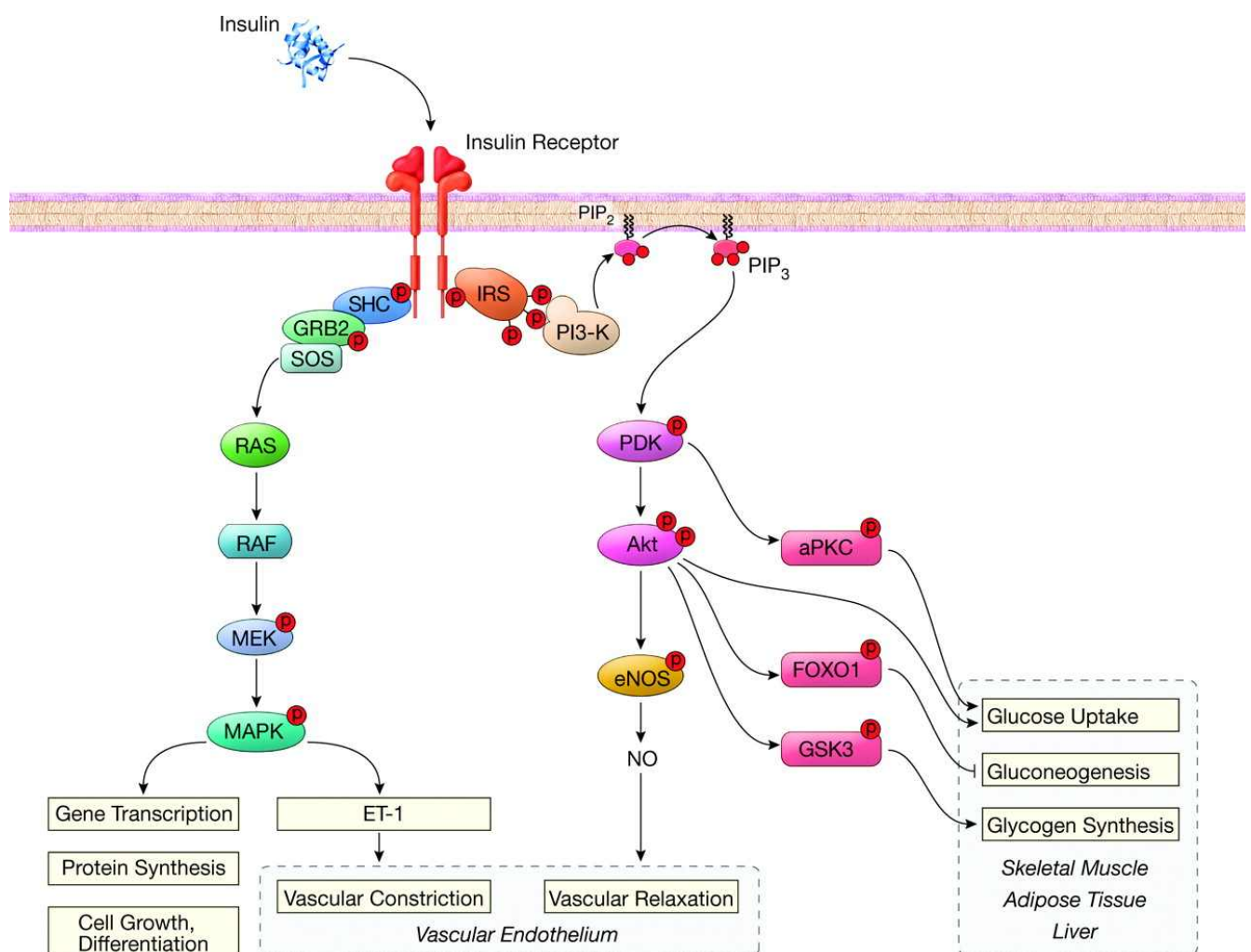
**1. ábra.** Az inzulinreceptor szerkezete. **a.** az inzulin receptor  $\alpha_2\beta_2$  szerkezete: L1, L2 leucinben gazdag domén; CR ciszteinben gazdag domén; Fn<sub>0</sub>, Fn<sub>1</sub>, Fn<sub>2</sub> fibronectin domén; TM transzmembrán domén; JM juxtamembrán domén; TK tirozin-kináz domén; CT karboxi-terminális vég; **b.** az inzulin receptor supra domén szerveződése. Forrás: De Meyts P, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature Review Drug Discovery* 2002; 1: 769-783

Miután egy inzulinmolekula megkötődött a receptorán, ez csökkenti további inzulinmolekulák kötési affinitását. A kötődést követően a receptorok aggregálódnak, amely a jelátvitelhez szükséges, majd internalizálódnak. Az inzulinreceptor állandó változásban van: szintetizálódik és lebomlik, illetve egy része degradáció nélkül recirkulálva visszaépül a membránba (Olefsky 1990).

### Inzulinhatás és szignáltranszdukció

Az inzulinhatás tulajdonképpen az inzulin és a receptor kötődésével kezdődik. Az inzulinmolekula a receptor  $\alpha$ -alegységéhez kötődve felfüggeszti annak kináz-aktivitást gátló hatását, így a  $\beta$ -alegység tirozin-kináz aktivitása stimulálódik. Ennek hatására maga a receptor is autofoszforylálódik, illetve más endogén protein, pl inzulinreceptor-szubsztrát (IRS-1, IRS-2) foszforylációja is megtörténik. A foszforylációt követően az IRS-1 intracelluláris

fehérjékhez kötődik. A kötőfehérjék (más néven dokkoló fehérjék) speciális kötőhelyeket, ún. SH2, SH3 kötőhelyeket tartalmaznak, amelyek enzimek kapcsolódását teszik lehetővé (pl. PI-3-kináz, PL-C, GAP, stb...). Ezen enzimek aktiválása az inzulin által elindított jel továbbításához nélkülözhetetlen. Fontos megjegyezni, hogy az IRS fehérje a kaszkádrendszer igen lényeges pontja, mivel belőle többféle irányba induló útvonalak ágaznak el (Gustafson és mtsai 1999, Kellere és mtsai 1999). Aktiválódik a glükóztranszporter-rendszer és a sejtbe glükóz áramlik. Ezt követően vagy a glükóztárolás irányába, vagy pedig a glükózoxidáció felé halad a folyamat, attól függően, hogy a szervezetben aktuálisan mire van igény (DeFronzo 1988, DeFronzo és mtsai 1979).



2. ábra. Az inzulin jelátviteli út vonal általános tagolása. Az inzulin jelátvitel PI3K ága a glükóz metabolizmust szabályozza a vázizomban, a zsírszövetben és a májban, míg stimulálja a NO termelődést és a vazodilatációt az ér endotheliumban. Az inzulin szignáltranszdukciós út vonal MAPK ága általában a mitogenezist és az ér endotheliumban az ET-1 szekréció kontrollját szabályozza. (a rövidítéseket ld. a Rövidítések jegyzékében). Forrás: Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, *et al.* Cardiovascular action of insulin. *Endocr Rev* 2007; 28: 463-491

## **Az inzulin mennyiségének meghatározása**

A vérben az inzulin, illetve prekursorainak mérésére az alábbi módszereket alkalmazzák:

1. *radioreceptor-assay*: a lényege, hogy az inzulin receptorokhoz kompetitív módon kötődik az izotóppal jelölt inzulin és a vizsgált vérmintában levő jelöletlen inzulin; így a biológiailag aktív, receptorhoz kötődni képes inzulint és az immunoreaktív inzulint is lehet mérni,

2. *kromatográfiás módszerek (HPLC=high performance liquid chromatographia, affinitás-kromatográfia, fordított fázisú HPLC)*: nagyteljesítményű folyadékkromatográfia, amely vegyületek elválasztására, azonosítására és mennyiségi meghatározására alkalmas módszer; nagyon pontos, de munkaigényes,

3. *RIA (radioimmunoassay)-módszerek*: segítségével a hormonok vérbeli koncentrációját lehet meghatározni („valódi” inzulin mérés); lényegében a radioaktívan jelölt hormon speciális antitestekhez való kötődésének kompetitív gátlásáról van szó; újabban enzimeket használnak a radioaktív jelölés helyett, sőt, ha a módszert egy másik enzimmel is kiegészítik (enzimamplifikációs rendszer), akkor a vizsgálat érzékenysége fokozható,

4. *ELISA (enzyme linked immunosorbens assay) módszer*: egy igen érzékeny, nagy specificitású, kvantitatív analízisre alkalmas módszer. Az antigén-ellenanyag kapcsolódás elve alapján az inzulinkötő ellenanyagok kimutatására szolgál.

Mint ismeretes, az inzulin három legfontosabb célszerve a zsírszövet, az izomszövet és a máj, következésképpen az inzulinrezisztencia is e szövetekben, illetve szervben alakul ki. Bár érintettségük megjelenésének sorrendje még tisztázatlan, feltételezhetően a zsírszövet inzulinrezisztenciája az elsődleges eltérés, majd ennek következményeként alakul ki másodlagosan az izomszövet és a máj inzulinrezisztenciája.

### *Centralis inzulinrezisztencia*

A glikolízis, mint ismeretes a máj glükóztermelése, amely az inzulin hatására csökken. Ez a hatás kóros körülmények között nem, vagy csak kis mértékben következik be, így inzulinrezisztenciában megemelkedik a máj glükóztermelése, és amennyiben a magasabb

inzulinszint a glükóztermelést nem képes csökkenteni, akkor kialakul a májsejtek inzulinrezisztenciája (Stumvoll és mtsa 1999)

### *Perifériás inzulinrezisztencia*

Mint ismeretes, a legnagyobb glükózfogyasztó szövet az izomszövet. 2-típusú diabetesben, basalis állapotban az izmok glükózfelvétele kismértékben növekszik. Inzulinrezisztencia esetén a csökkent perifériás glükózfelhasználás és a máj fokozott glükózleadása együttesen vezetnek hyperglykaemiához (Reaven 1988).

### *A perifériás inzulinhatás mérési módszerei*

Az inzulinrezisztencia különböző módszerekkel mérhető. Méréskor az inzulinnak a szervezet glükóz-anyagcseréjére, illetve a vércukorszintre kifejtett hatását veszik figyelembe. Az inzulin vércukorszint-csökkentő hatása két támadásponton keresztül valósul meg, mégpedig a perifériás cukorfelhasználás stimulálásával illetve a máj glükózleadás gátlásával. Mindezek alapján elmondható, hogy inzulinrezisztencia állapotában a csökkent perifériás glükózfelhasználás és/vagy a máj megnövekedett glükózleadása hiperglikémiához vezetnek.

Az inzulin hatásának mérésére manapság számos módszert alkalmaznak. Ezen módszerek két csoportja:

- indirekt módszerek:
  - a. orális glükózterhelés (OGTT)
  - b. intravénás glükózterhelés (IVGTT)
  
- direkt módszerek:
  - a. intravénás inzulintolerancia-teszt (IVITT)
  - b. inzulinsuppressziós teszt
  - c. inzulin-glükóz clamp (EGC)

### *Orális glükóztolerancia-teszt (OGTT)*

A módszer segítségével az inzulinhatásra lehet következtetni. A glükóztérhelés során a mért vércukorértékek alacsony, normális vagy magas inzulinszintekkel is társulhatnak, vagyis hasonló glükózsintek esetén is nagymértékben különbözhet az inzulinszint. Az OGTT módszer bár fiziológiásnak tekinthető, mégis vannak hátrányai, például változhat a glükóz felszívódása, a bélhormonok hatása érvényesülhet, illetve a módszer reprodukálhatósága sem megbízható.

### *Intravénás glükóztolerancia-teszt (IVGTT)*

Az eljárás előnye, hogy az OGTT módszer során előforduló, a glükóz felszívódásából és a bélhormonok hatásából származó bizonytalanságokat kiküszöböli. A módszer alkalmazása során az intravénásan beadott glükóz hatására a vércukorszintek változása logaritmikusan ábrázolható, és a percenként számított koncentrációcsökkenés reprezentálja a glükózelűnés sebességét, amely az inzulinérzékenység mutatója is egyben.

E módszer pontosítására Bergman (1985) kidolgozott egy ún. minimál modellt (FSIGTT – frequently sampled IVGTT). A számítógépes modell segítségével a glükóz intravénás beadását követően annak eltűnését követjük. Ennek mértéke azonban függ az inzulinérzékenységtől és az endogén inzulinszekréciónól is. Az IVGTT módszer elsősorban csökkent glükóztolerancia és a 2-es típusú diabetes mellitus vizsgálatában bizonyult megbízható eljárásnak.

### *Intravénás inzulintolerancia-teszt (IVITT)*

Ez a módszer tulajdonképpen intravénás inzulinterhelés, azaz intravénás inzulin beadása után mérik a vércukor csökkenését. A mérés adataiból kiszámított érték a szövetek inzulinérzékenységének a mérőszáma. A teszt során esetlegesen kialakuló hypoglykaemia veszélye miatt euglykaemiás clamp-vizsgálatokkal szokták kombinálni. Mindent összevetve, pontos és elfogadható módszer az inzulinérzékenység mérésére.

### *Inzulinsuppressziós teszt*

A Reaven által kifejlesztett módszer során a steady state plazmainzulin szintet kezdetben inzulin és glükóz egyidejű infundálásával érték el. Az endogén inzulinszekréciónat adrenalin gátolták, az adrenalin nem kívánt mellékhatását pedig propranolollal kerültk el. A 90. és 150. perc között mért vércukorértékek átlagából számolt érték, az ún. steady state plazmaglükóz

érték (SSPG), amely az inzulin által stimulált glükózfelhasználás mértékét jelzi. Manapság a vizsgálatok során csak glükóz és inzulin infúzióját alkalmazzák.

#### *Inzulin-glükóz clamp módszer (HEGC)*

Az inzulinérzékenység jelenleg legjobbnak tartott módszere, amelyet „gold standard”-ként is emlegetnek. A módszert először Andres dolgozta ki (1956), majd később DeFronzo módosította (DeFronzo és mtsai 1979). A clamp módszer lényege, hogy azt az intravénásan adott glükóz infúziós sebességet határozzuk meg, folyamatos inzulin infundálás mellett, amely a vércukorszint tartós euglikémiás (kb. 5.5 mmol/L) állapotban tartásához szükséges (hiperinzulínémiás-euglikémiás clamp). Ezen egyensúlyi állapotban (amely általában 120 perc múlva alakul ki) adagolt glükóz infúziós sebesség („M” érték = glükóz mg/perc/kg) a szervezet inzulinérzékenységére lesz jellemző. Ennek oka, hogy a magas exogén inzulinszint leszorítja az endogén inzulin termelését és a májból történő glükózkiáramlást is.

#### *Hiperglikémiás clamp módszer*

Az inzulin szekréció mennyiségi meghatározására használt módszer. A plazma glükóz koncentrációját akutan, folyamatos glükóz infúzióval a bazális érték fölé növeljük. Ezt a hiperglikémiás platót az inzulin szekrécióra és a glükóz metabolizmusra adott válaszként váltakozó sebességű glükóz infúzió révén tartjuk fenn. Mivel a plazma glükóz koncentrációja konstans, a glükóz infúziós sebesség az inzulin szekréció és a glükóz metabolizmus mutatója.

## **2.2 A nitrátok**

A szerves nitrát vegyületek, több mint egy évszázada a kardiovaszkuláris betegségek széles körben alkalmazott szereit. Leggyakrabban az angina pectoris és a kongesztív szívelégtelenség terápiájában használják (Stokes és mtsai 1999). Ezenkívül az utóbbi években már számos nem kardiovaszkuláris eredetű megbetegedés gyógyszeres, mint például a gasztrointesztinális motilitászavarok, glaucoma vagy a potenciazavarok kezelésében is egyre hangsúlyosabb szerephez jutnak a nitroglicerinnel és származékai. Sőt, inzulinszenzitizáló hatással is rendelkeznek, amelyet állatkísérletekben (Bajza és mtsai 2004) és egészséges felnőtt önkéntesekben (Kovács és mtsai 2000) is kimutattak. Annak ellenére, hogy a nitrát terápia hatékonysága egyedülálló és megkérdőjelezhetetlen, alkalmazása során számos buktatóval

kell számolni, melyek közül elsősorban a nitrát tolerancia és a nitroglicerín „rebound” a gyakorlati jelentőségük miatt emelendők ki (Parker és mtsai 1998).

A hosszantartó nitrát terápia komfortos alkalmazása érdekében kifejlesztették a transzdermális, nitroglicerín-felszabadító rendszert, amely hosszantartó és egyenletes hatást biztosít. Ennek eredményeként viszont, folyamatosan magas plazmakoncentráció alakul ki, amely hemodinamikai nitrát toleranciát okoz, miközben az antianginás hatás csökken (Parker és mtsai 1984, Luke és mtsai 1987).

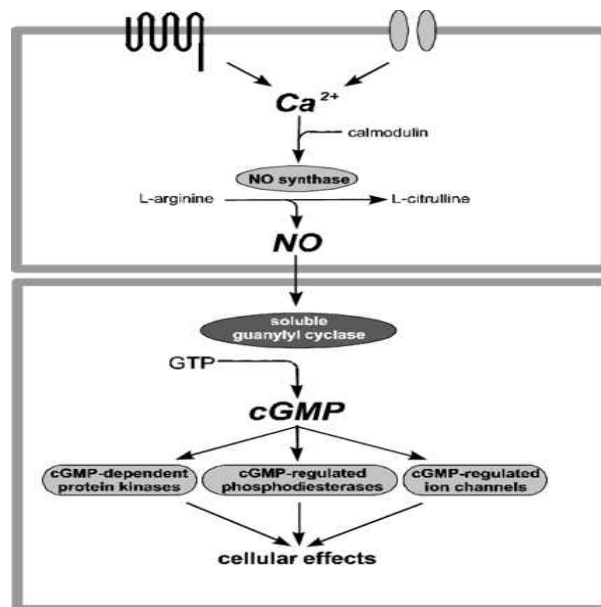
Nyilvánvalóvá vált, hogy a hemodinamikai nitrát tolerancia gátol néhány endogén adaptív mechanizmust, mint pl. a miokardiális prekonfúció antiischemiás hatását (Szilvássy és mtsai 1994, Ferdinandy és mtsai 1995), a gasztrointesztinális sphincterek non-adrenerg, non-kolinerg relaxációját (Sári és mtsai 1998), ezenkívül inzulinrezisztenciát is eredményez (Bajza és mtsai 2004). Ezt követően feltételezték, hogy a hemodinamikai nitrát tolerancia valamilyen módon összefüggésben áll a Sadri és Lautt által elsőként leírt táplálék-indukált inzulinérzékenység fokozódással (Sadri és mtsai 1999). E feltételezésüket később széles körben elfogadták, mint a leghatékonyabb NO-függő endogén inzulinérzékenyítő mechanizmust.

### **A nitrátok hatásmechanizmusa**

Mint köztudott, valamennyi gyógyszerként használt szerves nitrátvegyület egyfajta gyógyszer-előanyag, vagyis ahhoz, hogy gyógyszerhatást fejtsenek ki úgynevezett biokonverzió szükséges, amely tulajdonképpen a nitrátvegyületek denitrációját jelenti. Ennek során nitrogén-monoxid (NO) szabadul fel és a tényleges biológiai hatást ez a felszabadult NO hozza létre. A NO-felszabadulását tekintve a nitrátvegyületek két csoportja ismeretes. Az első csoportba sorolhatók azok, amelyeknél a farmakológiailag aktív NO enzimatis reakció során szabadul fel - ún. enzimatis NO-donorok - például, a nitroglicerín és származékai (mononitrát, gliceril-dinitrát, izoszorbid-dinitrát). A második csoportba azon nitrátvegyületek tartoznak, melyekből a NO spontán szabadul fel - ún. nem enzimatis NO-donorok - , például, a Na-nitroprusszid és a 3-morpholinossydnonimine (SIN-1).

A felszabadult NO átjut a sejtmembránon és a citoplazmában aktiválja az oldott állapotban lévő (szolubilis) guanilát-cikláz (sGC) enzimet. Az enzim guanozin-trifoszfátból (GTP) ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) keletkezését aktiválja. A cGMP, jelátviteli rendszeren

keresztül, protein-kináz enzimek aktiválásával csökkenti az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt, ami a simaizom relaxációjához vezet (Axelsson és mtsai 1979).



**3. ábra. NO/cGMP szignál kaszkád.** Az ábra leírását lásd a szövegben. Forrás: Koesling D, Friebe A. Structure-function relationships in NO-sensitive guanylyl cyclase. In: *Nitric oxide. Biology and pathobiology* 2000; 369-379

A nitroglicerint transzdermális tapaszok formájában már közel három évtizede alkalmazzák. Ezt az adagolási formát elsősorban azért fejlesztették ki, hogy biztosítsák a kényelmes, 24 órás, folyamatos nitroglicerinnel történő kezelést az antianginás kezelések során. Azonban, a tapasz alkalmazása során, már az első 24 órás nitroglicerinnel történő expozíció alatt jelentős hemodinamikai tolerancia kialakulását figyelték meg, amely az antianginás hatás csökkenésével járt, és a hatáscsökkenés további nitroglicerinnel történő dózis emeléssel sem volt megszüntethető (Cowan és mtsai 1987). Így valószínűvé vált, hogy a transzdermális nitroglicerinnel történő megszakítás nélkül nem alkalmazható. Megfigyelték azonban, hogy ha a nitroglicerinnel történő kezelése során váltakoznak a „tapaszos” és a „tapaszmentes” periódusok, a tolerancia kialakulása sikeresen kivédhető.

### A nitrát tolerancia mechanizmusai

A nitrát tolerancia definíció szerint nem más, mint a nitrovasodilatátorok hosszantartó kezelése során kialakuló csökkent hemodinamikai, illetve antianginás nitrát hatás. A fent említett jelenség, vagyis a nitrát tolerancia, a nitrovasodilatátorok megelőző terápiás alkalmazása szempontjából talán a legnagyobb kihívást jelentő korlát.

Ismeretes, hogy a klinikumban alkalmazott gyógyszerek toleranciájának talán a leggyakoribb oka a hosszantartó kezelés miatti felgyorsult gyógyszer metabolizmus, amelyet általában enzim indukció vált ki. Ennek alapján nitrát toleranciában is ezt feltételezték először, azonban számos adat alapján bebizonyosodott, hogy a tolerancia kifejlődésének különböző fázisaiban az egyes nitrovasodilatátorok plazmakoncentráció-értékei megegyeztek a terápia megkezdése előtt mért plazmakoncentráció-értékekkel (a teljes hemodinamikai és antianginás hatás mellett) (Thadani és mtsai 1980). Későbbi megfigyelések alapján úgy gondolták, hogy a vaszkuláris nitrát tolerancia tulajdonképpen megegyezik az antianginás nitrát toleranciával. Ezen elképzelést arra alapozták, hogy az *in vitro* kialakított nitrát tolerancia valóban megfelel a vaszkuláris hatásokhoz kialakított toleranciával. Az elmélet cáfolható, mivel klinikailag a nitrát tolerancia állapotában a betegek fizikai terhelhetősége egyébként is igen alacsony, az ezt követő nitrát megvonás pedig a fizikai teljesítőképességet drámaian lerontja (Parker és mtsai 1995). Ez a tény arra utal, hogy a kialakult nitrát tolerancia mellett számottevő antiischaemiás hatás van.

Kétségtelen, a szakirodalomban manapság számos koncepció, elképzelés létezik a nitrát tolerancia mechanizmusát illetően, ám egyik sem tekinthető bizonyítottnak. Az egyik korai hipotézis alapján a nitrátok a tartós alkalmazás következtében veszítenek hatékonyságukból, mégpedig azért, mert a nitrát-biotranszformációhoz szükséges szulfhidril (-SH)-csoportok, az -SH-csoportok depléciója miatt egyre kisebb mennyiségben állnak rendelkezésre (Needleman és mtsai 1973). Ezen SH-csoportok depléciója/kimerülése következtében a nitrát redukció is deficitessé válik, ebből következően a nitrátok hosszantartó adagolása során, belőlük egyre kevesebb NO keletkezik. Ma már elmondható, hogy ez a legfeljebb történeti jelentőségű koncepció elsősorban *in vitro* vaszkuláris toleranciával függ össze. A fenti, meglehetősen ingatag experimentális adatokon nyugvó megállapítást megcáfolták, tudniillik az SH-csoport túlkínálat még *in vitro* körülmények között sem függeszti fel a nitrát toleranciát (Gruetter és mtsai 1986, Abdollah és mtsai 1987), másfelől a nitrát toleranciában *in vivo* körülmények között a nitroglicerinnél történő NO képzés sem változik bizonyítottan (Laursen és mtsai 1996).

Tulajdonképpen e koncepció alapja egy félreértelmezett jelenség, mert nitrát toleranciában a nitroglicerinnel vasodilatátor hatása SH-donor alkalmazásával részben visszatér (May és mtsai 1987, Packer és mtsai 1987). Továbbá, azt is megfigyelték, hogy SH-donor egyidejű jelenlétében a nitrátok vasodilatátor hatása felerősödik (Horowitz és mtsai 1983, Winniford és

mtsai 1986). A jelenlegi tudományos szemlélet alapján, a szulfhidril-depléció feltéves tulajdonképpen a szulfhidril-csoportot tartalmazó szerek és a nitrátok közötti, egymás hatását segítő kölcsönhatás félreértelmezése (Parker és mtsai 1998).

Egy másik, nevezetesen a neurohumorális elmélet alapján úgy vélték, hogy a nitrátok adagolása közben számos ellenregulációs mechanizmus aktiválódik, mégpedig katekolaminok, endotelin, renin és egyéb vasoaktív hormon illetve neurotranszmitter felszabadulása által (Parker és mtsai 1991). Természetesen ez a teória sem tűnik bizonyosnak, mivel néhány évvel később ugyanez a munkacsoport illetve egy másik kutatócsoport, szinte azonos mennyiségű kísérleti adatot sorakoztatott fel a neurohumorális koncepció ellen és mellett is (Parker és mtsai 1993, Katz és mtsai 1991).

A nitrát tolerancia úgynevezett szabadgyök-hipotézise szerint, a hosszantartó nitrátkezelés ideje alatt fokozódik az oxigén-szabadgyök képződése, ami a nitrátokból képződő NO-t semlegesíti, illetve peroxinitritté alakítja. Ennek eredményeként a nitrát hatás csökken. Bár, a nitrát tolerancia antioxidánsokkal kedvezően befolyásolható állatkísérletekben is és a klinikai alkalmazás során is, valójában az elmélet megalapozottsága mégis kérdéses, mivel a nitrát toleranciában a NO képződése nem csökken (Laursen és mtsai 1996).

Újabb elképzelés alapján fogalmazódott meg a megváltozott cGMP metabolizmus koncepciója, mely szerint a nitrát toleranciában a NO hatás jelátviteli útvonalában van a hiba. Bár jelentős mennyiségű állatkísérletes adattal megfelelően bizonyított ez a teória, vagyis, hogy a nitrát tolerancia alapja a megváltozott cGMP metabolizmus lenne, ám az elmélet klinikai bizonyítékai hiányoznak (Axelsson és mtsai 1979).

### **A nitrát tolerancia és a kardioprotektív mechanizmusok**

A tolerancia fogalma farmakológia értelmezés szerint azt jelenti, hogy a meghatározott gyógyszer hosszantartó adagolása következtében, az eredetileg hatékony dózis/adagolásmód mellett csökken, vagy akár elvész a gyógyszer hatékonysága és a terápiás hatás kiváltását egyre magasabb dózis adagolásával lehet csak elérni. Ez a jelenség, azaz a tolerancia bizonyos gyógyszerek esetében jól ismert (pl. sympathomimeticumok, analgeticumok), de a nitrát tolerancia a hagyományos értelemben vett gyógszertoleranciától több szempontból is különbözik. Az egyik ilyen lényeges farmakológiai különbség, hogy a hemodinamikai nitrát

tolerancia a dózis emelésével nem szüntethető meg (Parker és mtsai 1998). A másik, alapvető jelentőségű megfigyelés, hogy a nitrát tolerancia állapotában az endogén NO kardiovaszkuláris és gasztrointesztinális hatásaival szemben kereszt-tolerancia alakul ki (Szilvássy és mtsai 1994, Ferdinandy és mtsai 1995, Szilvássy és mtsai 1997, Ferdinandy és mtsai 1998, Sári és mtsai 1998).

### **2.3. A kolekisztokinin**

A kolekisztokinin (CCK) a gyomor-bélrendszer gastrin-családjába tartozó peptid. Szekréciója a duodenumban és a jejunum proximális részén levő ún. I-sejtekből történik (Larsson és mtsai 1978). Ezenkívül a CCK jelen van a szervezet egyéb idegi struktúráiban is, valamint a hasnyálmirigy Langerhans-szigetei körül, ahol valószínűleg szerepe van a  $\beta$ - és az  $\alpha$ -sejtek működésének szabályozásában, mivel az inzulin és a glukagon felszabadulását fokozza (Rehfeld és mtsai 1980).

A CCK a célsejteken a megfelelő CCK-receptorokhoz (CCK-1 és CCK-2) kötődve fejt ki a hatását. Specifikus CCK-receptorok találhatóak a hasnyálmirigyben, az epehólyagban, az oesophagealis sphincterben, az ileumban és a vastagbélben, illetve ezen kívül az agyban és a perifériás idegek némelyikében.

A CCK-receptorokat két osztályba sorolhatjuk a ligandjaikat kötő szelektivitásuk alapján (Noble és mtsai 1999):

1. CCK-1 receptor, vagy perifériás-receptor (régebbi neve: CCK-A receptor; A: alimentary)
2. CCK-2 receptor (régebbi neve: CCK-B receptor; B: brain)

	<b>CCK-1</b> (CCK-A; A = alimentary)	<b>CCK-2</b> (CCK-B; B = brain)
<b>előfordulás</b>	perifériásan: hasnyálmirigy, epehólyag centrálisan: hypothalamus	dominánsan az agyban
<b>kötődési szelektivitáshoz</b>	szükséges a szulfatált CCK	nem szükséges a szulfatált CCK
<b>kötődési affinitás</b>	CCK-8, CCK-4 (gyenge) gasztrin (gyenge)	azonos affinitással köti: CCK-8, CCK-4, gasztrin

1. Táblázat. A CCK-receptorok csoportosítása és jellemzése

### A CCK-hatás és jelátvitel

Valószínűsíthető, hogy a CCK-1 receptoron keresztül megvalósuló hatás neuronális, a nervus vagus afferens idegeken keresztül valósul meg (Sternini és mtsai 1999).

Amikor a CCK-receptor megköti a CCK-t, a sejtmembrán intracelluláris oldalán a G-fehérje aktiválja a foszfolipáz-C enzimet (PLC), amely a membránhoz kötött. Az aktivált enzim ezt követően átalakítja az inozitol 4,5-bifoszfátot (IP<sub>2</sub>) inozitol 1,4,5-trifoszfáttá (IP<sub>3</sub>) és diacilglicerollá (DAG).

A DAG protein kináz-C (PKC) enzimet aktivál, amely a sejtben foszforilálja a hormonhatásért felelős fehérjéket.

Az IP<sub>3</sub> a sejt kalcium raktáraiból Ca<sup>2+</sup>-t szabadít fel, ezáltal megnövelve az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szintet. A magas intracelluláris Ca<sup>2+</sup> -szint pedig aktiválja a kalcium-kalmodulin-dependens protein-kinázokat (Berridge 1987, Nishizuka 1988, Roettger és mtsai 1995).

Mint ismeretes, antagonisták alkalmazásával bizonyos élettani funkciók szabályozásában részt vevő anyagok vizsgálata lehetővé válik. Az antagonisták blokkolják a vizsgált anyag kötődését a receptorához, miközben maguk nem váltanak ki biológiai hatást, mely ennek eredményeként csökken vagy teljesen gátolt lesz. A CCK-receptor antagonistái közül a legfontosabbak az antibiotikum származékok (pl. asperlicin), a benzodiazepin származékok

(pl. devazepid) és az aminosav származékok (pl. proglumid) (Bock és mtsai 1986, Chang és mtsai 1986, Hahne és mtsai 1981).

### 3. Célkitűzések

A nitrogén-monoxid köztudottan egy igen fontos molekula, amely különböző szabályozó funkciókkal bír a kardiovaszkuláris rendszerben, az immunfolyamatokban és az idegrendszerben. A véredényekben a NO az endotélium-függő vazodilatációban közvetít (Palmer és mtsai 1987, Ignarro és mtsai 1987), a központi és a perifériás idegrendszerben pedig, mint úgynevezett rendkívüli neurotranszmitter (Garthwaite 1995) játszik fontos szerepet. Kimutatták, hogy a NO-szintáz szisztémás gátlása inzulinrezisztenciát okoz (Sadri és mtsai 1997), amely azonban közönbösíthető a 3-morpholinonydonimine (SIN-1) - amely egy NO-donor - intraportális beadásával (Lautt 1999). A fenti megállapítások arra engednek következtetni, hogy a NO donorok, megfelelő dózisban, olyan gyógyszerekként szolgálhatnak, amelyek fokozzák az inzulinérzékenységet.

A transzdermális nitroglicerint az angina megelőzésére használt dózisban elnyomja a glükóz-stimulált inzulin felszabadulást, mégpedig az inzulinérzékenység növelésével (Kovács és mtsai, 2000). Ez a megfigyelés közvetetten támasztja alá a perifériás inzulinérzékenység nitrerg szabályozásának elképzelését (Shankar és mtsai 1998, Shankar és mtsai 2000) az inzulinrezisztencia kezelésében és/vagy a diabétesz mindkét típusában. A nitrátok hosszútávú használata ugyanakkor gyakran kapcsolatban áll a tolerancia kialakulásával, amellyel a terápiás hatás gyengül. Sőt, az endogén nitrerg mechanizmusok a nitrát tolerancia állapotában komolyan károsodnak.

A táplálék-indukált endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus gátolható proglumiddal, amely egy kolecisztokinin (CCK)-receptor antagonist (Peitl és mtsai 2007). Továbbá felmerült, hogy a CCK-1 receptorok funkcionális integritása előfeltétele a táplálék-indukált inzulinérzékenység kialakulásának, hisz a genetikailag CCK-1 receptor hiányos patkányokban a postprandiális és bazális inzulinérzékenység egyaránt csökkent (Peitl és mtsai 2010). Kimutatták, hogy a neuronális eredetű NO magába foglalja a CCK gasztrointesztinális motilitásra és szekrécióra gyakorolt hatását (Sári és mtsai 2004, Pálvölgyi és mtsai 2005) és a CCK-NO útvonal támadható a hemodinamikai nitrát tolerancia állapotában.

*E megfontolásokból kiindulva a kísérletes munka fő célkitűzései az alábbiak voltak:*

1. az akut és a szubkrónikus (7 napos) nitroglicerín kezelés hatásainak összehasonlítása és az inzulinrezisztencia kialakulásának vizsgálata éber nyulakban,
2. a nitrát tolerancia hatásának és a CCK potenciális szerepének vizsgálata a táplálék-indukált inzulin szenzitizáció jelenségére nyulakban.

## 4. Anyagok és módszerek

Vizsgálataink során minden állatkísérletet a laboratóriumi állatok védelméről és használatáról szóló (NIH publications No. 85-23, 1996; NIH publications No 85-23, 1985) rendelkezések és az ezzel összhangban lévő, a Debreceni Egyetem helyi etikai irányelveinek a betartásával végeztük (6/2007/DE MÁB).

### 4.1. Az akut és a szubkrónikus (7 napos) nitroglicerinnel történő kezelés hatásainak összehasonlítása és az inzulinrezisztencia kialakulásának vizsgálata éber nyulakban

A kísérleteinkben 3–3.2 kg súlyú, hím New Zealand típusú fehér nyulakat (Charles-River Laboratories, Isaszeg, Hungary) használtunk, amelyeket standard állatházi körülmények között tartottuk, azaz biztosítottuk számukra a 12-12 órás világos/sötét periódust, 22-25 °C hőmérsékletet és az 50-70 %-os relatív páratartalmat. Az állatokat egymástól elkülönítve (egy nyúl/ketrec) (Techniplast, Italy) helyeztük el, standard laboratóriumi táppal (Charles-River Laboratories, Isaszeg, Hungary) etettük és csapvízzel itattuk *ad libitum*, majd a 2 hetes adaptációs periódus után csoportosítottuk őket a vizsgálatainkhoz a megfelelő kísérleti protokollok alapján.

#### *Műtéti beavatkozás*

A műtétet aszeptikus körülmények között végeztük el. A nyulakat i.v. bolus 10 mg/kg diazepammal (Sigma, St Louis, MO) és 5 mg/kg ketaminnal (EGIS Pharmaceuticals Ltd., Budapest, Hungary) altattuk el. Fájdalomcsillapítást helyi érzéstelenítő s.c. adásával (Lidocain 1%, EGIS, Hungary) egészítettük ki. Polietilén katétert helyeztünk a juguláris véna két ágába, inzulin és glükóz infúzióhoz, illetve a vénás vérminta (max. térfogat 0.5 ml) vételéhez, amely a methemoglobin meghatározásához volt szükséges. A methemoglobin meghatározás ABL 625 System használatával történt (Radiometer A/S, Copenhagen). Egy másik, a bal carotis artériába helyezett polietilén katéter pedig egy Statham P23 DB transducerhez (Gould, Balainvilliers, France), azon keresztül pedig egy Experimetria (EXP-2, Budapest, Hungary) multiscriptorhoz csatlakozva az artériás középnyomás mérésére szolgált. A katétereket a nyak hátsó részén keresztül vezettük ki. Egy bránült pedig a jobb fül centrális artériájába vezettünk artériás vérminta kinyeréséhez. A katétereket nátrium-heparinos (100 IU/ml) oldattal töltöttük fel.

### *Intravénás glükóz felhasználás*

A nyulak fiziológias sóoldatban oldott izotóniás glükózt kaptak intravénás bolusban (0.5 g/kg), 15 ml térfogatban, 2 percen keresztül infúziós pumpa segítségével (B.Braun, Melsungen, Germany). Az infúzió előtt, majd az infúziót követő 10, 30, 60, 120 és 180 percen artériás vérmintát vettünk, vércukor és plazma inzulin meghatározáshoz. A glükózt glükóz-oxidáz módszer segítségével mértük, a plazma inzulin immunoreaktivitást pedig radioimmunoassay (RIA) segítségével, Izinta (Isotope Institute, Budapest, Hungary) inzulin RIA kit-et használva.

### *Hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC)*

Az egyik vénás katéteren keresztül humán inzulint (NOVO Nordisk, Copenhagen, Denmark) infundáltunk 13 mU/kg dózisban 120 percen keresztül. Ez az inzulin infúzió a plazma inzulin immunoreaktivitást körülbelül  $100 \pm 5$   $\mu$ U/ml-re állítja be. A vér glükózkoncentrációjának meghatározásához a vérmintákat (0.3 ml) az artériás kanülből vettük 10 perces időintervallumokban. A második vénás kanülon keresztül, a glükóz infúzió sebességének megváltoztatásával a vér glükózkoncentrációját  $5.5 \pm 0.5$  mmol/l értéken tartottuk fenn (euglikémia). Amikor a vér glükózsintje stabilizálódott kb. 30 percre, ezt az állapotot tekintettük a steady state állapotnak. Ez többnyire az inzulin infúzió megkezdését követő 100 percen belül kialakult. A steady state állapotban további vérmintákat vettünk (0.5 ml) 10 percenként plazma-inzulin meghatározásához. A a steady state ideje alatt mért glükóz infúziós sebességet (mg/kg/min) az inzulin szenzitivitás jellemzésére használtuk (DeFronzo és mtsai 1979).

### *Hemodinamikai nitrát tolerancia indukciója*

Hemodinamikai nitrát toleranciát folyamatos transzdermális nitroglicerinnel való expozícióval indukáltuk az alábbi módon: nyulak leborotvált mellkasára transzdermális nitroglicerinnel tapaszt alkalmaztunk (Nitroderm TTS 5, Ciba Hungaria, Budapest, Hungary), amelyből 7 napon keresztül folyamatosan körülbelül 0.07 mg/kg/h nitroglicerinnel szabadult fel. A nitrát tolerancia kialakulását a nitroglicerinnel intravénás teszt dózisára (30  $\mu$ g/kg) adott hipotenzív válasz hiánya mutatta, amíg a kontroll állatoknál a teszt dózis az artériás középnyomás több mint 20 %-os csökkenését okozta. A hipotenzív állapotot 6 órán keresztül tartó transzdermális nitroglicerinnel való alkalmazásával tartottuk fenn. Így a folyamatos, 6 óra időtartamú transzdermális nitroglicerinnel való kezelést a nontoleráns állapot nitroglicerinnel való hatásának tanulmányozására

alkalmaztuk, míg a folyamatos, 7 napos TTS tapasz expozíciót a nitrát tolerancia hatásának vizsgálatára használtuk.

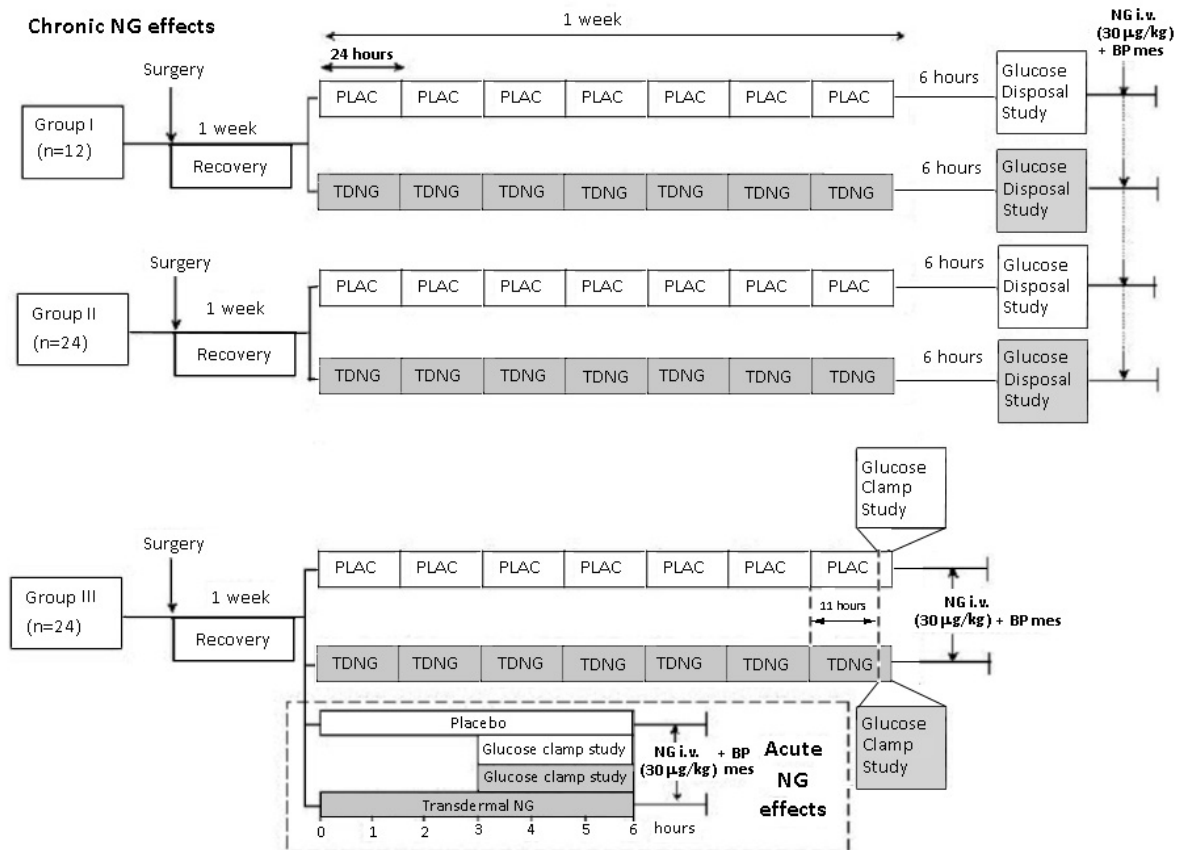
#### *A kísérlet leírása*

Egy héttel a műtét után a nyulakat véletlenszerűen 3 fő csoportba osztottuk. Az 1. csoport (n = 12) a cukorterheléses vizsgálatokban vett részt, míg a 2. (n = 24) és 3. (n = 24) csoport a hiperinzulinémiás euglikémiás clamp kísérletben. Az 1. csoport nyulait további 2 alcsoportba randomizáltuk amelynek egyik csoportját 7 napon keresztül transzdermális, nitroglicerinnel tartalmú tapasszal kezeltük, amelyből folyamatosan kb. 0.07 mg/kg/h nitroglicerinnel szabadult fel, a másik csoport pedig placebo tapasz kapott 7 napon keresztül folyamatosan. Minden tapaszt naponta újra cseréltünk és 6 órával az utolsó tapasz eltávolítása után elkezdtük az intravénás glükózfelhasználási vizsgálatokat.

A 2. csoport nyulait hasonlóképpen két alcsoportba randomizáltuk, majd 6 órával az utolsó tapasz eltávolítása után meghatároztuk az inzulinérzékenységet hiperinzulinémiás euglikémiás clamp módszer segítségével.

A 3. csoport nyulait 4 alcsoportba (n=6) osztottuk, melyek közül 6 állat kapott TTS 5 tapaszkezelést 6 órán keresztül, melynek 3. órájában elvégeztük a HEGC-t (azaz transzdermális nitroglicerinnel jelenlétében, nontoleráns állapotban). A 3 órás transzdermális nitroglicerinnel expozíció azért fontos, hogy kiküszöböljük a kezdeti vérnyomáscsökkenésből fakadó gondokat, amelyek befolyásolhatják az inzulinérzékenységet. A másik alcsoport TTS 5 kezelést kapott 7 napon keresztül folyamatosan és a HEGC-t az utolsó napon végeztük (azaz transzdermális nitroglicerinnel jelenlétében, toleráns állapotban). A két kontroll csoport pedig placebo tapaszokat kapott a megfelelő kezelési periódus alatt.

A glükózfelhasználás és az inzulin clamp vizsgálatok elvégzése után megbizonyosodtunk a nitrát tolerancia hiányáról vagy meglétéről, ami tulajdonképpen a nitroglicerinnel intravénás teszt dózisának (30 µg/kg) a vérnyomás változására adott válaszában illetve annak hiányában nyilvánult meg.



4. ábra. A vizsgálat sematikus megjelenítése. PLAC: placebo, TDNG: transzdermális nitroglicerín, NG: akut nitroglicerín (a magyarázatot ld. a szövegben)

#### Statisztikai analízis

Az adatok elemzése ANOVA-val és az azt követő Bonferroni szerint módosított  $t$  teszt segítségével történt. A kapott eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha  $P < 0.05$  (Wallenstein és mtsai 1980).

#### 4.2. A nitrát tolerancia hatásának és a CCK potenciális szerepének vizsgálata a táplálék-indukált inzulin szenzitizáció jelenségére nyulakban.

##### A kísérlet leírása

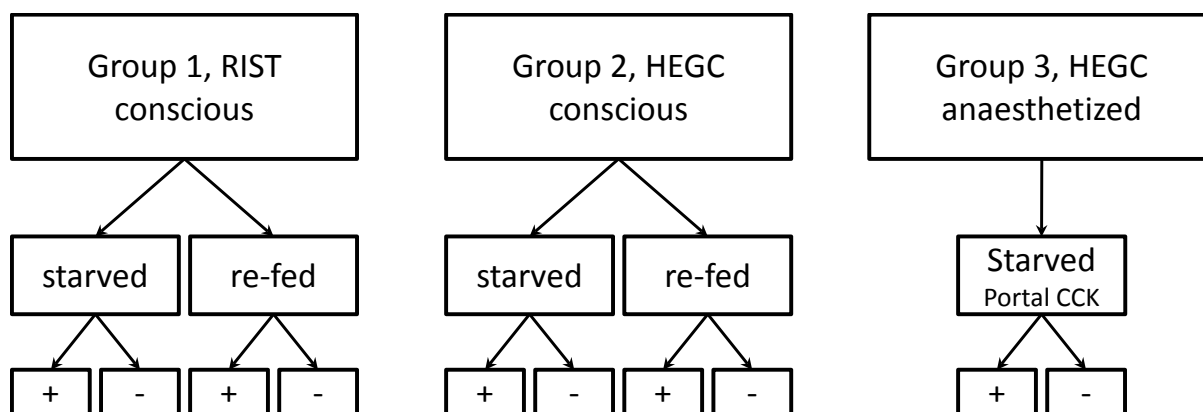
A nyulakat 7 napos akklimatizációs periódus után a nitroglicerín 1 perc alatt beadott intravénás teszt dózisának ( $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) alkalmazásával teszteltük hipotenzív válaszra (Szilvássy és mtsai 1997). A vérnyomás maximális csökkenése képezte az értékelés adatait. Azokat a nyulakat, amelyeknél a nitroglicerín teszt dózisára nem mutatkozott szignifikáns csökkenés a vérnyomásban, kizártuk a további vizsgálatokból. Az állatokat ezt követően randomizáltuk 3 fő kísérleti csoportba.

A kísérlet első csoportjának állatai a RIST vizsgálat sorozatában vettek részt, amelyben a táplálék-indukált inzulinérzékenyítő hatást vizsgáltuk éheztetett (1a csoport) illetve az újra etetett nyulakon (1b csoport). A vizsgálatok e sorozatában kifejezetten a tápláléknak az inzulinérzékenységre gyakorolt hatását vizsgáltuk.(Lautt 2007).

A második fő csoport éber állatai a HEGC vizsgálatban vettek részt, melyben a teljes test inzulinérzékenységét határoztuk meg éheztetett (2a csoport) valamint újra etetett (2b csoport) nyulakban.

A kísérletsorozat 3. csoportján vizsgáltuk az intraportális CCK infúzió hatását az inzulinérzékenységre. A kísérletet altatott nyulakon (thiopenthal 25 mg/kg i.v.) végeztük 24 órás éheztetést követően. A nyulak portális vénájába CCK oktapeptid szulfátot (CCK8) infundáltunk 0.3; 1.0 és 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  kumulatív dózisban 20 percen keresztül a HEGC steady state ideje alatt. A CCK legmagasabb infúziós dózisének végén máj mintákat vettünk cGMP meghatározáshoz. E sorozat kontrolljaiként nitrát toleráns (4 db) és nem-toleráns (4 db) nyulak szolgáltak, amelyek CCK8 vivőanyag infúziót követően nem kaptak CCK8 infúziót. A kísérletek e sorozata igazolta, hogy az intraportális CCK8 infúzió okozhat inzulinérzékenység fokozódást éheztetett nyulakban.

Ezt követően a fő csoportokat úgy randomizáltuk, hogy voltak nyulak, amelyek transzdermális nitroglicerin tapaszt kaptak, amelyből kb. 0.07 mg/kg/h nitroglicerin szabadult fel, illetve amelyek placebo tapaszt kaptak 7 napon keresztül. A tapasztokat naponta cseréltük, majd 1 órával az utolsó tapaszt eltávolítása után végeztük el a RIST- (1. csoport) illetve a HEGC-módszer (2. csoport) vizsgálat sorozatait. A RIST és a HEGC vizsgálatok befejezése után megbizonyosodtunk a nitrát tolerancia jelenlétéről vagy hiányáról, mégpedig a nitroglicerin intravénás teszt dózisének (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) az artériás középnyomás változásaira gyakorolt hatásaival. Mindezt 4 órával az utolsó (7.) tapaszt eltávolítása után, hasonló módon hajtottuk végre, ahogy azt a 4 fő csoportra való randomizálás előtt tettük.



5. ábra. A vizsgálat vázlata. Éheztetett (starved): a RIST vagy a HEGC módszer alkalmazása előtti 16 órás éheztetett periódus; újra-etetett (re-fed): az állatok 14 órán keresztül éheztek, majd 2 órán keresztül táplálkozhattak, mielőtt az inzulinérzékenységet meghatároztuk; „+”: a nyulak nitroglicerinnel tapaszot kaptak; „-”: a nyulak placebo tapaszot kaptak. (további magyarázatot ld. a szövegben)

#### *A nitrát tolerancia meglétének igazolása*

A nyulakon folyamatos, 7 napon keresztül tartó transzdermális nitroglicerinnel tapaszos, illetve placebo tapaszos kezelést alkalmaztunk, melynek célja az volt, hogy kialakuljon a gliceril trinitrátra (GTN) adott vaszkuláris tolerancia (Silver és mtsai 1991). A GTN vaszkuláris tolerancia kialakulásáról a 7. napon bizonyosodtunk meg, az endotélium-mentes arteria carotis gyűrű preparátum izometrikus tenziójának tesztelésével (Szilvássy és mtsai 1994, Ferdinandy és mtsai 1995). Az 5 mm hosszú, izolált arteria carotis gyűrű preparátumon beállítottuk a nyugalmi tenziót (10 mN előfeszítés), majd a norepinephrine  $EC_{50}$  koncentrációjával előfeszítettük. A gyűrűket ezt követően a GTN kumulatív koncentrációjának tettük ki fél-logaritmusos növekedéssel. A fél-maximális relaxáció kiváltásához szükséges GTN koncentráció  $0.091 \pm 0.012$  mM volt a vivőanyaggal kezelt, nontoleráns gyűrűn, míg  $1.72 \pm 0.19$  mM a GTN-kezelt, toleráns gyűrű esetében ( $P < 0.05$ ).

#### *RIST (Rapid Insulin Sensitivity Test)*

A korábban Lauth (Lauth és mtsai 1998) által leírt "rapid insulin sensitivity test"-en (RIST) kisebb módosítást hajtottunk végre, hogy a nyúl kísérleteinkben alkalmazhassuk. A kísérlet során az artériás és a vénás kanült (Vygonüle V G22, Vygon GmbH & Co., Aachen, Germany) bevezettük az arteria illetve a vena auricularisba, majd az állatokat pihenni hagytuk körülbelül 30 percig, hogy az élettani paraméterek stabilizálódjanak. Ezt követően, 5 percenként az artériás vérből meghatároztuk a vércukorszintet. A három egymást követő vércukorszint mérésének átlaga jelentette a kontroll értéket; majd a vénás kanülon keresztül 5

percig tartó folyamatos 50 mU/kg inzulin (NOVO Nordisk, Copenhagen, Denmark) infúziót adagoltunk infúziós pumpa segítségével (Syringe Pump 11 Plus – Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA). Az inzulin hipoglikémiás hatásának ellensúlyozására glükóz infúziót (TEVA, Debrecen, Hungary) is elkezdünk adagolni, oly módon, hogy a fent említett átlagolt kontroll érték fenntartását biztosítani tudjuk. Az a teljes glükózmennyiség (mg/testsúly kg –ban kifejezve), amely az inzulin hipoglikémiás hatásának ellensúlyozásához szükséges, illetve hogy fenntartsa a kontroll vércukor szintet, az ún. RIST index, amely a teljes test inzulin érzékenységének a mutatója (Peitl és mtsa 2007, Peitl és mtsai 2005).

#### *HEGC (hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp módszer)*

A nyulak arteria és vena auricularisába kanült helyeztünk (Vygonüle V 22, Vygon GmbH & Co., Aachen, Germany). A glükóz- és az inzulin infúziós szárat 3-ágú csapon keresztül csatlakoztattuk a vénás kanülhöz, majd 30 perces stabilizációs periódus után infúziós pumpa segítségével (Syringe Pump 11 Plus – Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) 10 mU/kg humán inzulin (NOVO Nordisk, Copenhagen, Denmark) infundáltunk 120 percen keresztül az egyik vénás infúziós száron át. Ez az inzulin infúziós sebesség azt eredményezte, hogy a plazma inzulin immunoreaktivitás értéke  $100 \pm 5$   $\mu$ U/ml volt a steady state ideje alatt. A vércukorszint meghatározásához 10 percenként vérmintákat (0.2 ml) vettünk az artériás kanülből. A vércukorszintet a második vénás infúziós kanülon keresztül indított, váltakozó sebességű glükóz infúzió révén kb.  $5.5 \pm 0.5$  mmol/l értéken tartottuk (euglikémia). Amikor a vércukorszint legalább 30 percig stabilizálódott, akkor ezt az állapotot tekintettük a steady state állapotnak. Ez, általában az inzulin infúzió kezdetét követő 100 percen belül megtörtént. A steady state állapotban további vérmintákat (0.2 ml) vettünk a plazma inzulin meghatározásához 10 perces intervallumokban. A steady state ideje alatt megfigyelt glükóz infúziós sebesség (mg/kg/min) jellemezte az inzulinérzékenységet (DeFronzo és mtsai 1979). Minden clamp meghatározást egy megelőző, 16 órás éhezési periódust követően végeztünk el. Az artériás kanült a vérminta gyűjtésén kívül az artériás vérnyomás és a szívfrekvencia monitorozására is használtuk. Ebben az esetben, az artériás kanült egy jelátalakítóhoz (Statham P23DB transducer) kapcsoltuk, amely egy elektromanométerhez (Experimetria Kft. Budapest, Hungary) csatlakozott (Szilvássy és mtsai 1994).

### *A máj cGMP szintjének mérése*

A máj cGMP szintjét RIA módszerrel (Szilvássy és mtsai 1994), Amesham kit használatával, májmintákból határoztuk meg, amelyeket a CCK8 infúzió befejezése után azonnal kivettünk. Az inter- és intra-assay eltérések nem haladták meg az 5 %-ot. A mintákat nitrát toleráns és nem-toleráns állatokból vettük.

### *Statisztikai analízis*

Az adatok elemzése ANOVA-val, és az azt követő Bonferroni szerint módosított  $t$  teszt segítségével történt. A kapott eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha  $P < 0.05$  (Wallenstein és mtsai 1980).

## 5. Eredmények

### 5.1. Az akut és a szubkrónikus (7 napos) nitroglicerín kezelés hatásainak összehasonlítása és az inzulinrezisztencia kialakulásának vizsgálata éber nyulakban

#### A hemodinamikai nitrát tolerancia hatása a hemodinamika alapjaira és a methemoglobin keletkezésére

A transzdermális nitroglicerín hatására a tapasz felhelyezését követő 30. percben átmeneti csökkenés tapasztalható az artériás középnyomásban, miközben a szívfrekvencia értéke szignifikánsan nem változott. A folyamatos 7 napig tartó nitroglicerín felvétel a szívfrekvenciát szignifikánsan megnövelte a nitroglicerín tapasszal kezelt csoportban. A szívfrekvencia növekedése statisztikailag szignifikáns volt a folyamatos tapasz-expozíció 3. napjától  $277 \pm 11$ ,  $280 \pm 14$ ,  $275 \pm 9$  és  $281 \pm 15$  1/perc a 3., 4., 5. illetve a 6. napon ( $P < 0.05$  versus control mindegyikre). Az alap artériás középnyomás a 7 napos periódus alatt nem változott sem az aktív, sem a placebo tapasz alkalmazás hatására. (2. táblázat)

A methemoglobin képződés 1 % alatti volt a kísérlet teljes ideje alatt és nem változott a hemodinamikai nitrát tolerancia kialakulásával sem (az adatok nincsenek feltüntetve).

MABP (Hgmm)					
Csoport	Tapasz előtt	30 perc	3 óra	7 nap	3 órával a tapasz levétele után
NG tapasz	$86 \pm 4.9$	$70 \pm 4.4^*$	$82 \pm 5.2$	$82 \pm 3.6$	$88 \pm 5.5$
Placebo	$85 \pm 5.2$	$84 \pm 6.1$	$82 \pm 4.9$	$85 \pm 5.5$	$87 \pm 4.6$
Szívfrekvencia (b.p.m.)					
Csoport	Tapasz előtt	30 perc	3 óra	7 nap	3 órával a tapasz levétele után
NG tapasz	$241 \pm 17$	$255 \pm 15$	$239 \pm 9$	$284 \pm 10^*$	$279 \pm 12^*$
Placebo	$252 \pm 14$	$258 \pm 10$	$239 \pm 16$	$241 \pm 8$	$238 \pm 12$

2. Táblázat. A transzdermális nitroglicerín hatása az éber nyulak artériás vérnyomására és szívfrekvenciájára. Az adatok 6 állat/csoport átlagértékei  $\pm$  SD. „\*”: a „tapasz előtti” értékektől szignifikánsan különböző értékek ( $P < 0.05$ ).

### A nitrát tolerancia hatása a glükózfelhasználásra

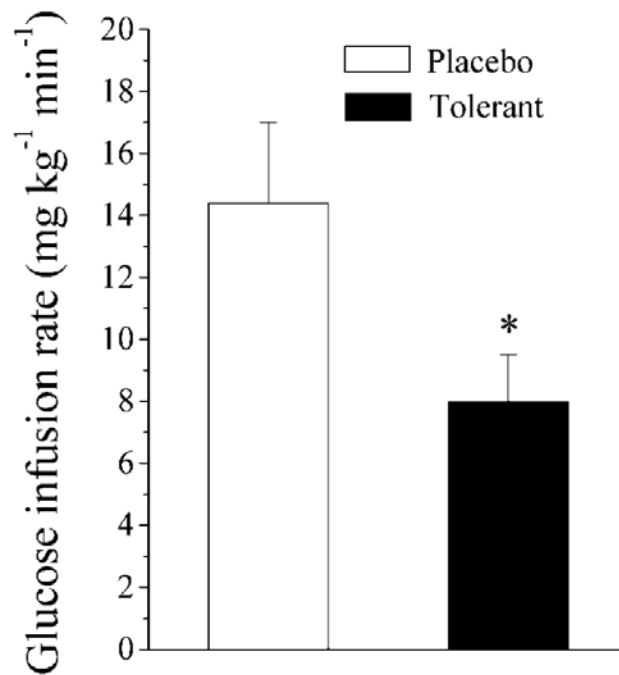
A 3. táblázat adataiból jól látszik, hogy az intravénás glükóz terhelés (0.5 mg/kg) a toleráns és a kontroll állatokban egyaránt hasonló mértékben megnövelte a vér glükózsintjét, bár a plazma inzulinszintek szignifikánsan magasabbak voltak a toleráns nyulakban, mint a kontroll nyulakban.

Mintavétel (min)	Kontroll		Toleráns	
	Glükóz (mmol/l)	Inzulin ( $\mu$ U/ml)	Glükóz (mmol/l)	Inzulin ( $\mu$ U/ml)
0 (alapvonal)	5.5 $\pm$ 0.4	29 $\pm$ 4.0	5.6 $\pm$ 0.6	52 $\pm$ 6.6*
10	11.6 $\pm$ 1.9	46 $\pm$ 5.9	12.7 $\pm$ 2.8	113 $\pm$ 7.7*
30	9.6 $\pm$ 1.5	44 $\pm$ 5.1	8.9 $\pm$ 1.8	114 $\pm$ 9.1*
60	6.2 $\pm$ 0.8	39 $\pm$ 4.0	6.7 $\pm$ 1.4	81 $\pm$ 6.8*
120	5.8 $\pm$ 0.6	35 $\pm$ 3.2	6.0 $\pm$ 0.8	63 $\pm$ 4.9*
180	5.4 $\pm$ 0.5	32 $\pm$ 3.6	5.5 $\pm$ 0.6	54 $\pm$ 4.8*

3. Táblázat. A nitrát tolerancia hatása az intravénás glükóz felhasználásra (0.5 mg/kg), éber nyulak estében. Az adatok 6 állat/csoport átlagértékei  $\pm$  SD. A „\*”: szignifikáns különbség a toleráns és a nem-toleráns inzulin-értékek között ( $P < 0.05$ ). A „kontroll” = placebo tapasszal kezelt állatok, „toleráns” = az állatokat az intravénás nitroglicerinnel hipotenzív hatására toleránssá tettük, egy megelőző folyamatos 7 napos transzdermális nitroglicerinnel tapaszos kezeléssel (0.07 mg/kg/h).

### A nitrát tolerancia hatása az inzulinérzékenységre

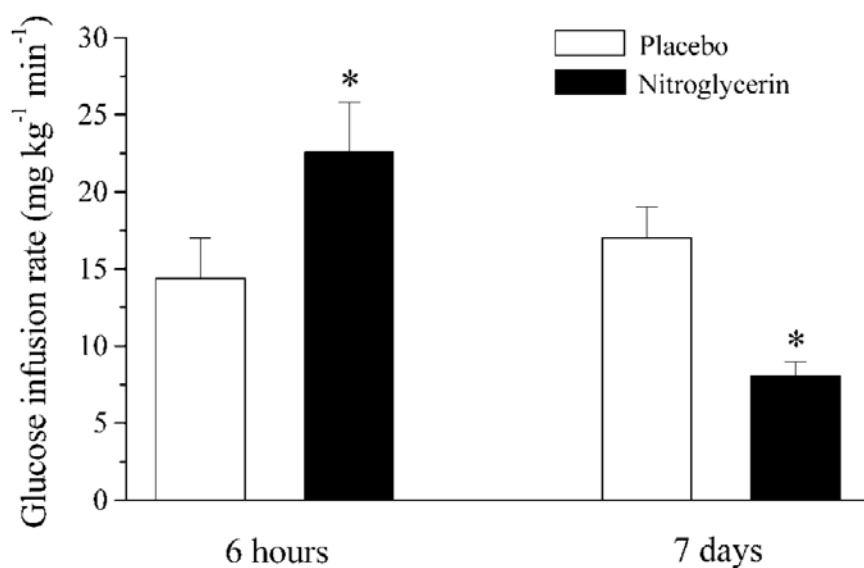
Kísérleteinkben a hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp módszert alkalmaztuk. Amint azt az 6. ábra mutatja, a glükóz-infúzió sebességének változása, amely az inzulinérzékenység változásának felel meg, szignifikánsan alacsonyabb volt a toleráns mint a nem toleráns (Placebo) nyulakban.



6. ábra. A nitrát tolerancia hatása az inzulin érzékenységre, amelyet HEGC módszerrel határoztunk meg. Az adatok 6 állat/csoport átlagértékei  $\pm$  SD, „\*” toleráns versus placebo: szignifikánsan különböző értékek  $P < 0.05$ .

#### **A transzdermális nitroglicerín hatása az inzulinérzékenységre nitrát toleranciában vagy annak hiányában**

Az akut transzdermális nitroglicerín kezelés az aktív nitroglicerín tapaszos állatokban, összehasonlítva a placebo tapaszos nyulakkal, szignifikánsan megnövelte az inzulinérzékenységet, amely az euglikémia fenntartásához szükséges glükóz infúzió sebességének növekedésében nyilvánult meg (7. ábra). A hemodinamikai nitrát toleranciát okozó 7 napos aktív tapaszos felvétel az inzulin hipoglikémiás hatásával szembeni rezisztenciáját okozta, függetlenül attól, hogy a hetedik napon jelen volt a nitroglicerín tapasz, vagy sem. (7. ábra).



7. ábra. A transzdermális nitroglicerín hatása az inzulinérzékenységre. Az adatok 6 állat/csoport átlagértékei  $\pm$  SD, „\*” nitroglicerín versus placebo: szignifikánsan különböző értékek  $P < 0.05$ .

## 5.2. A nitrát tolerancia hatásának és a CCK potenciális szerepének vizsgálata a táplálék-indukált inzulin szenzitizáció jelenségére nyulakban

### A transzdermális NG hatására kialakult hemodinamikai nitrát tolerancia

Amint azt az 4. táblázat adatai mutatják, a transzdermális NG alkalmazása az 1. tapasz után szignifikáns csökkenést okozott az artériás középnyomásban, a szívfrekvenciában bekövetkező változások nélkül. A 3. és a 7. tapasz nem okozott semmilyen változást a paraméterekben. Harminc perccel az utolsó tapasz eltávolítása után sem volt tapasztalható változás a vérnyomásban és a szívfrekvenciában sem.

A NG (30  $\mu$ g/kg) intravénás teszdózisa az artériás középnyomást  $83 \pm 5.1$  és  $86 \pm 4.9$  Hgmm-ről  $61 \pm 4.4$  és  $60 \pm 5.3$  Hgmm-re csökkentette mindkét csoportban, a placebo tapaszos és a NG tapaszos állatokban egyaránt ( $P < 0.01$  mindkettőnél). Azokban a nyulakban, amelyek 7 napig voltak kezelve placebo tapasszal, a tapasz eltávolítása után az intravénás NG teszt dózisa csökkentette a vérnyomást  $83 \pm 4.8$  Hgmm-ről  $60 \pm 3.6$  Hgmm-re ( $P < 0.01$ ), míg az aktív tapasszal kezelt állatokban a vérnyomás nem csökkent ugyanezen NG dózis adásakor. Ez alátámasztja azt a tényt, hogy az aktív tapasszal kezelt nyulak csoportjában kifejlődött a hemodinamikai nitrát tolerancia.

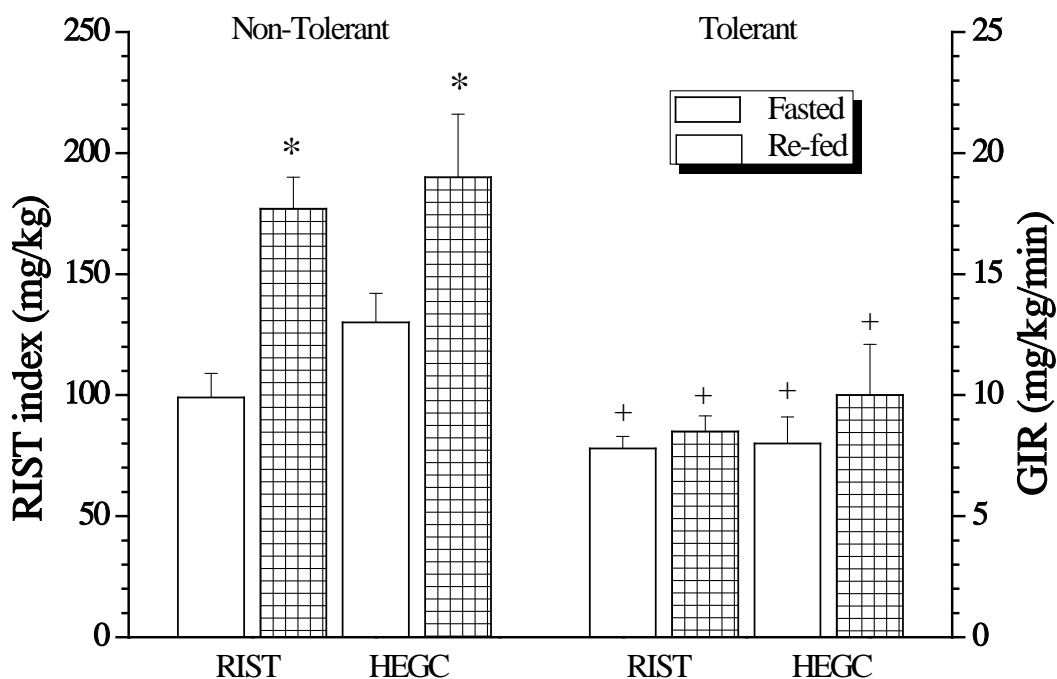
Methemoglobin keletkezése a vizsgálat során nem haladta meg az 1 %-ot sem a toleráns, sem a nem-toleráns állatokban.

<b>MABP (Hgmm)</b>					
<b>Csoport</b>	<b>Tapasz előtt</b>	<b>1. tapasz</b>	<b>3. tapasz</b>	<b>7. tapasz</b>	<b>4 órával a tapasz levétel után</b>
NG tapasz	83 ± 5.1	69 ± 3.2*	85 ± 4.3	84 ± 5.5	85 ± 6.0
Placebo	86 ± 4.9	85 ± 4.4	84 ± 5.5	82 ± 5.4	83 ± 4.8
<b>Szívfrekvencia (b.p.m.)</b>					
<b>Csoport</b>	<b>Tapasz előtt</b>	<b>1. tapasz</b>	<b>3. tapasz</b>	<b>7. tapasz</b>	<b>3 órával a tapasz levétel után</b>
NG tapasz	236 ± 16	242 ± 18	244 ± 19	277 ± 14*	273 ± 14*
Placebo	241 ± 22	248 ± 16	237 ± 22	248 ± 20	235 ± 18

**4. Táblázat. A transzdermális nitroglicerín hatása az artériás vérnyomásra és a szívfrekvenciára éber nyulakban. Az adatok 6 állat/csoport átlagértékei ± SD. A „\*”: a „tapasz előtt” –i értékektől szignifikánsan különböző értékek  $P < 0.05$ . Az adatok azt mutatják, hogy a vérnyomás és a szívfrekvencia értékeiben a maximális változások a tapasz feltételét követő 30 percen belül bekövetkeztek. A tapasz levétel utáni értékeket 4 órával az utolsó tapasz eltávolítása után határoztuk meg.**

#### **A RIST index változása éheztetett és az újra etetett nitrát toleráns és nem-toleráns állatokban**

Az 8. ábra adataiból látható, hogy a placebo tapaszos, újra etetett állatok RIST index értéke közel a duplája volt az éheztetett alomtársaikénál mért értékeknek. Annak ellenére, hogy a hemodinamikai nitrát toleráns nyulakat újra etettük, ez nem volt hatással a RIST index értékeire. A nitrát toleráns állatok posztprandiális inzulinérzékenysége szignifikánsan alacsonyabb volt a nem-toleráns alomtársaik esetében mért értékekkel, az újra etetett és az éheztetett nyulakban egyaránt. (8. ábra).



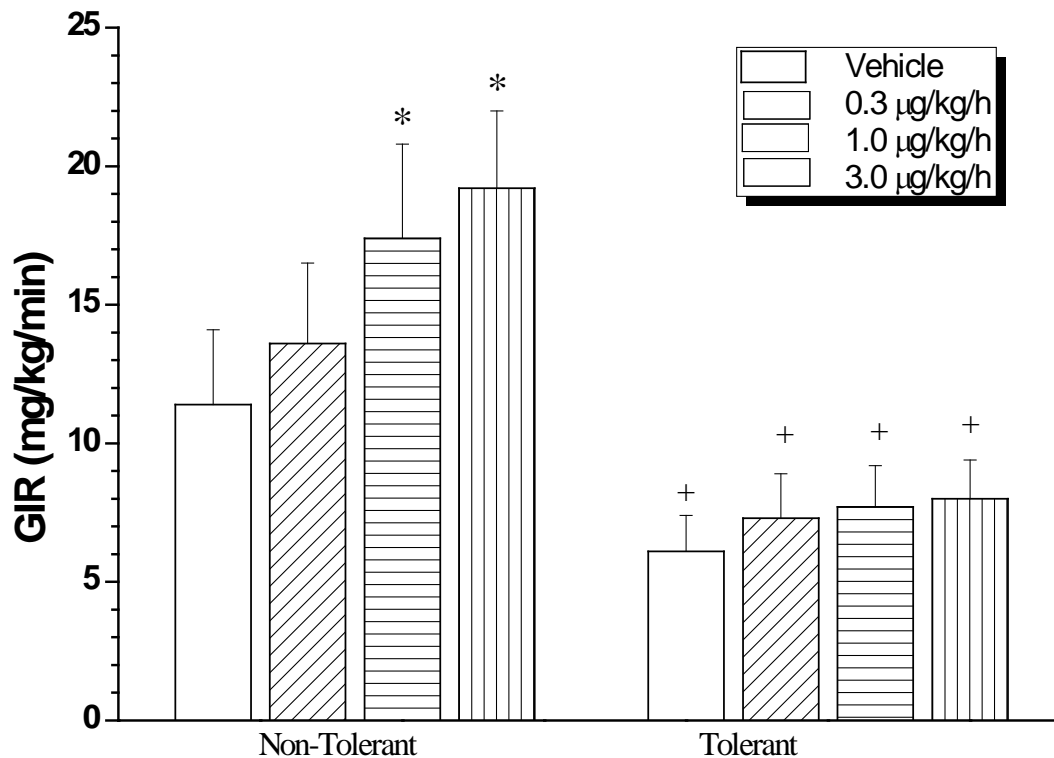
8. ábra. A nitrát tolerancia hatása a táplálék által kiváltott inzulin érzékenység változására. A teljes test inzulinérzékenység RIST és HEGC módszerrel meghatározott értékei éheztetett (fehér oszlop/fasted) vagy újra-etetett (kockás oszlop/re-fed) nyulakban. Minden oszlop 6 nyúl/alcsoport adatait jeleníti meg. Az adatokat a számtani átlag és a középérték standard hibájaként adtuk meg. A „\*”: újra-etetett vs éheztetett közti szignifikáns különbséget jelzi, ahol  $P \leq 0.05$ ; A „+”: toleráns vs nem-toleráns közti szignifikáns különbséget jelzi, ahol  $P \leq 0.05$ . (további magyarázat: lásd a szövegben ill. a rövidítések jegyzékében)

### A HEGC módszerrel mért inzulinérzékenység éheztetett és újra etetett nitrát toleráns és nem-toleráns állatokban

Amint azt a 9. ábra adatai mutatják, a HEGC steady state alatt az euglikémia fenntartásához szükséges glükóz infúzió sebessége magasabb volt az újra-etetett állatokban, mint a nem-toleráns állatok megfelelő éheztetett értékei. A táplálékra adott válaszként megnőtt az egész test inzulinérzékenysége. A táplálék-indukált inzulinérzékenység jelensége eltűnt a nitrát toleráns állatokból.

### A CCK8 inzulinérzékenyítő hatása a HEGC steady state állapotának ideje alatt

A 9. ábra adatai alapján látható, hogy a CCK8 dózis-függő módon növelte az euglikémia fenntartásához szükséges a glükóz infúzió sebességét a HEGC steady state állapotának ideje alatt. A nitrát toleráns nyulakban a CCK8 infúzió nem okozott változást az inzulinérzékenységben.



9. ábra. A nitrát tolerancia hatása az intraportális CCK8 inzulinérzékenyítő hatására altatott nyulakban. A HEGC „steady state” ideje alatt a portális vénába CCK8-t infundáltunk növekvő dózisban (0.3-3.0 mg/kg/h). „Toleráns”: az állatokat toleránssá tettük a nitroglicerín (30 µg/kg) intravénás dózisának hipotenzív hatásával szemben, amelyet egy megelőző folyamatos 7-napig tartó, transzdermális tapasztól történő nitroglicerín expozíció (0.07 mg/kg/h) előzött meg. „non-tolerant”: az állatok 7 napig placebo tapaszt kaptak és az intravénás nitroglicerín teszt-dózisra (30 µg/kg) jelentős vérnyomás csökkenéssel válaszoltak. Az adatokat, amelyek 6 nyúl/alsoport eredményeiből származtak, a számtani átlag és a középérték standard hibájaként adtuk meg. A „\*”: szignifikáns különbség a GIR (glükóz infúziós ráta) értékei között CCK vs vivőanyag beadása után,  $P \leq 0.05$ ; „+”: toleráns vs nem-toleráns,  $P \leq 0.05$ .

#### A CCK8 infúzió hatása a hepaticus cGMP-re a nitrát toleráns nyulakban

A 3 µg/kg/h CCK8 infúzióra adott válaszként a hepaticus cGMP szint megemelkedett  $0.22 \pm 0.07$  és  $0.13 \pm 0.04$  pmol/mg nedves szövetsúlyról  $1.11 \pm 0.09$  és  $0.19 \pm 0.04$  pmol/mg nedves szövetsúlyra, non-toleráns és toleráns állatokban egyaránt.

## 6. Megbeszélés

### 6.1. Az akut és a szubkrónikus (7 napos) nitroglicerinnel történő kezelés hatásainak összehasonlítása és az inzulinrezisztencia kialakulásának vizsgálata éber nyulakban

Az eredmények igazolják azon korábbi feltevésünket, hogy a folyamatos, 7 napos transzdermális tapaszról felszabaduló, megközelítőleg 0.07 mg/kg/h nitroglicerinnel az éber nyulakban hemodinamikai nitrát toleranciát okoz (Szilvássy és mtsai 1997). A toleráns állapotot az intravénás bolus nitroglicerinnel adott hipotenzív válasz hiánya jellemzi, amely az intoleráns nyulak esetében jelentős vérnyomás csökkenést okozott. Az eredmények továbbá azt mutatják, hogy a nitrát tolerancia nem csak a nitroglicerinnel történő vazodilatációs hatásának csökkenésére korlátozódott, hanem zavart okozott a szénhidrát anyagcsere szabályozásában is, mégpedig az inzulinérzékenység csökkenésével. Ez a felvetésünk a kísérleteink két különböző paradigmájának eredményeiből adódott:

1. a plazma inzulin immunoreaktivitása nagymértékben növekedett a toleráns állatokban a glükózfelvétel ideje alatt, és
2. a hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp vizsgálatok során sokkal alacsonyabb glükóz infúziós sebesség tartotta fenn az euglikémiás állapotot a HEGC steady state alatt a nitrát toleráns állatokban, mint a nem-toleránsokban.

Miután ezen utóbbi módszer, vagyis a HEGC az inzulinérzékenység meghatározásának az ún. „arany standard” módszere, arra következtettünk, hogy a hemodinamikai nitrát tolerancia csökkenti az inzulinérzékenységet, legalábbis a nyulakban. Továbbá, eredményeink összhangban állnak a Kovács és mtsai (2000) eredményeivel, miszerint a transzdermális nitroglicerinnel csökkenti az inzulin felszabadulást és növeli az inzulin-stimulált glükózfelvételt egészséges önkéntes férfiakban. A nitroglicerinnel történő metabolikus hatása szintén gátolva volt a „toleráns” állapotban.

Az elmúlt időszakban munkacsoportunk kísérletes eredményeivel demonstráltuk azt a néhány endogén nitrerg mechanizmust, amely a nitrát toleranciában károsodik. A prekondicionálást, amelyet a leghatásosabb kardioprotektív mechanizmusként tartanak számon (Murry és mtsai 1986), nyulakban (Szilvássy és mtsai 1994, Szilvássy és mtsai 1997) és patkányokban (Ferdinandy és mtsai 1995) a nitrát tolerancia gátolja. Ezekben az esetekben a gyors kamrai pacing felerősítette a prekondicionálás jelenségét, amelynek protektív mechanizmusát a nitrerg idegek szenzoros-effektoros funkciója alátámasztotta (Csont és mtsai 1999,

Ferdinandy és mtsai 1997). Sári és mtsai (1998) megfigyelték, hogy a nyúl Oddi-sphincter nonadrenerg-nonkolinerg relaxációja, amely mint ismeretes alapvetően egy nitreg jelenség, szintén komolyan károsodott a nitrát toleranciában. Oroszi és mtsai (1999a) további bizonyítékot szolgáltatott a nitrát tolerancia állapotában bekövetkező nitreg szenzoros idegi funkció károsodására. Úgy találták, hogy a kapszaicinnal kiváltott koronária-vazodilatáció a nitroglicerinnel hipotenzív hatásával szemben toleránssá tett tengerimalac szívében szignifikánsan kisebb volt. Hasonló hatást értek el a NO szintézis gátlása után ugyanezen modellben (Oroszi és mtsai 1999b). Tehát, a hemodinamikai nitrát tolerancia következménye hasonlít ahhoz, ami látható volt a NO szintézis gátlása után, 3 különböző fajban, 4 különböző kísérleti minta használatával.

A munkánk legfőbb megfigyelése tehát, hogy a hemodinamikai nitrát tolerancia inzulinrezisztenciát indukál. Eredményeink összhangban állnak a Lauth vezette munkacsoport hepatic insulin sensitizing substance (HISS) mechanizmusának úttörő felismerésével. Patkány kísérleteik adatai alapján úgy gondolták, hogy a post-prandialis inzulin felszabadulás aktivál egy neurális mechanizmust, amely a májhoz futó plexus hepaticus anterior-hoz (PHA) kapcsolódik és érzékeny a NO-szintézis gátlására, s mely megnöveli a perifériás szövetek érzékenységét az inzulin hipoglikémiás hatásával szemben (Lauth 1999). Lauth csoportja azt is felveti, hogy ez a mechanizmus nitrátok által aktiválható. További vizsgálatban, Reaven - az inzulin rezisztencia-szindróma elképzelés szülőatyja (Reaven 1991) - a kollégáival együtt (Piatti és mtsai 2000) úgy találta, hogy a NO/cGMP útvonal megváltozása lehet egy korai esemény azoknál a nem-diabetikus egyéneknél, akiknél családi kórtörténetű a 2-típusú diabetesz, és hogy ezek a változások összefüggésben állnak az inzulinrezisztencia fokával. A perifériás inzulinérzékenység szabályozásában, a NO szerepének jelentőségét illetően, a NO feladására újszerű terápiás megközelítésként szolgálhat az inzulinrezisztencia kezelésében, például szerves nitrátok használatával (Lauth 1999). Másfelől, McGowder és mtsai eredményei (McGowder 1999) úgy tűnik, hogy nem támasztják alá ezt a feltételezést, mivel ők úgy találták, hogy az S-nitrosoglutathion, amely szintén egy NO donor, gátolja az inzulin felszabadulását egészséges normoglikémiás kutyákban. A vizsgálatuk során, az alkalmazott dózisú nem-enzimatis NO donor, szignifikáns csökkenést produkált a vérnyomásban. Tehát a fajok különbözősége és az alkalmazott NO donorok közötti különbség mellett, a kifejeződött hipotenzív válasz elfedheti a NO donor metabolikus hatásait az ellenregulációs szimpatikus reflex aktiválódáson keresztül (kutyákban), amely megmagyarázhatja az eredmények közötti látszólagos ellentmondást.

Vizsgálataink során arra a következtetésre jutottunk, hogy az akut nitrát tapasz alkalmazása során az inzulinérzékenység megmarad, míg a 7 napos szubkrónikus kezelés következtében fellépő hemodinamikai nitrát tolerancia állapotában kialakul az inzulinrezisztencia.

## **6.2. A nitrát tolerancia hatásának és a CCK potenciális szerepének vizsgálata a táplálék-indukált inzulin szenzitizáció jelenségére nyulakban.**

Az eredmények azt mutatják, hogy éber nyulakban a hemodinamikai nitrát tolerancia állapota, amely a transzdermális nitroglicerinnel tapasz 7-napig tartó folyamatos alkalmazása során alakul ki, kapcsolatban áll a táplálék-indukált inzulinérzékenység jelenségének az elvesztésével. E megfigyelésen kívül, a kapott eredmények alátámasztják azon korábbi megfigyelésünket, miszerint a bazális, éhgyomri teljes test inzulinérzékenység jelentősen károsodott krónikus, folyamatos nitrát tapasz viselése révén kiváltott hemodinamikai nitrát tolerancia állapotában (Bajza és mtsai 2004). További eredeti megfigyelésünk, hogy az intraportális CCK8 inzulinérzékenyítő hatása károsodik hemodinamikai nitrát tolerancia állapotában. Figyelembe véve, hogy a CCK a post-prandiális inzulinérzékenyítő mechanizmus fiziológiás triggerének tekinthető (Peitl és mtsai 2007, Peitl és mtsai 2010), a jelen eredményeink előrelépést jelentenek azon mechanizmusok jobb megértésében, melyek feltételezéseink szerint a táplálkozás kiváltotta inzulinérzékenység fokozódásában játszanak szerepet.

Az az elgondolás, miszerint bármilyen eredetű, az NO-cGMP útvonalban bekövetkező hiányosság az inzulinérzékenység csökkenését eredményezi, nem újkeletű. Petrie és mtsai (1996) egészséges önkéntesekben HEGC módszerrel meghatározták a perifériás inzulinérzékeny szövetek cukorfelvételét és megbecsülték a kapcsolatot a teljes test inzulinérzékenység és a feltételezett NO termelés között. Megállapították, hogy az endotheliális NO termelődése és az inzulinérzékenység között pozitív korreláció létezik. Az NO-cGMP út jelentőségét támasztja alá Piatti és mtsai (2000) vizsgálata, akik beszámoltak arról, hogy azok a nem cukorbeteg egyének, akiknél a családi anamnézis pozitív a 2-típusú cukorbetegség előfordulására, azoknál inzulin rezisztencia áll fenn, s emellett magasabb plazma NO koncentráció mellett a cGMP képződés is elégtelen, szemben azokkal az egészséges önkéntesekkel, akiknek a családi kórtörténetükben nincs diabétesz. A klinikai vizsgálatok eredményeit alátámasztják azok az állatkísérletek során nyert eredmények, melyek az NOS-gátlás hatását vizsgálták a postprandiális inzulinérzékenység fokozódásában. Lauth és mtsai írták le először, hogy a HISS-mechanizmus nem specifikus NOS gátló

alkalmazásával (L-NAME) gátolható, s mely intraportálisan adott NO donor alkalmazásával helyreállítható (Sadri és mtsai 1999). Porszász és mtsai (2003) azt is kimutatták, hogy a NO valószínűsített származási helye a májat ellátó, a nervus vagus PHA-ban futó kapszaicin-érzékeny szenzoros idegek, hisz az idegi eredetű NOS-t gátló 7-nitroindazol valamint PHA kapszaicin kezelésének hatására a HISS mechanizmus károsodik (Porszász és mtsai 2002, 2003).

Jelen munkánk eredményei alapján úgy gondoljuk, hogy a táplálék-indukált inzulinérzékenyítő mechanizmus hemodinamikai nitrát toleranciában károsodik. Ennek jelentőségét a hemodinamikai terápia hatékonyság elvesztésén túl az adja, hogy amennyiben a postprandiális inzulinérzékenység károsodása hosszú távon fennáll, az manifeszt 2-es típusú cukorbetegség kialakulásához vezethet (Herczeg és mtsai 2007).

Feltételezzük, hogy e mechanizmus hátterében egy kémiaiilag mindeddig meghatározatlan anyag felszabadulása áll, amely anyag feltételezések szerint a májból szabadul fel az elfogyasztott táplálékra adott válaszként és érzékenyíti a perifériás szöveteket, legfőképpen a vázizomzatot, az inzulin hipoglikémiás hatására (Lautt 1999). Ezt a kémiaiilag meghatározatlan anyagot a feltételezett származási helye alapján hepatikus inzulin szenzitizáló anyagnak (hepatic insulin sensitizing substance, HISS) nevezték el. A HISS mechanizmus kísérletes megközelítésének vizsgálatára Lautt és mtsai a RIST módszer (Reid és mtsai 2002) alkalmazását javasolták a hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp módszer helyett, mely utóbbi a klinikai gyakorlatban a teljes test inzulinérzékenységének a meghatározására alkalmas arany standard módszer (DeFronzo és mtsai 1979). A RIST módszer során rövid idejű inzulin infúzióval (általában 5 perc) átmeneti hiperinzulinémiát okozunk, majd az inzulin hipoglikemizáló hatását cukor infúzió adásával védjük ki (Lautt és mtsai 1998).

A hiperinzulinémiás euglikémiás clamp módszer ideje alatt, a plazma inzulin immunoreaktivitása 10-szer vagy ennél többször magasabb szinten volt, mint a megfelelő éhomi érték (s ami megfelel az egészséges poszt-prandiális csúcsértéknek). Feltételezve, hogy a HISS mechanizmust legalább részben a hiperinzulinémia aktiválja, úgy gondoljuk, hogy a hosszantartó stabil hiperinzulinémia miatt e mechanizmus aktivációjának magasabb foka valósul meg a HEGC módszer esetén, mint a RIST metodika által. Ugyanakkor a hiperinzulinémia szerepét a HISS-mechanizmus aktiválásában mindez ideig nem sikerült megnyugtatóan tisztázni, Lautt és mtsai hipotéziását (Lautt 1999, 2003) Peitl és mtsai megkérdőjelezték (2009), s egyben felvetik, hogy a kolecisztoxinnek (CCK) mediátor

szerepe lehet az étkezés hatására kialakult inzulinérzékenység fokozódásában (Peitl és mtsai 2010). Bármilyen módszert használtunk az inzulinérzékenység meghatározására, az eredményeink tisztán mutatják, hogy perifériás szövetek inzulinérzékenysége szignifikánsan megnövekszik, amikor az állatokat egy éhezési periódust követően visszaállítjuk a táplálkozásra, s ezen endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus hemodinamikai nitrát toleranciában gátolva van.

A jelenlegi eredmények közvetetten is alátámasztják Peitl és mtsai, eredményeit (Peitl és mtsai 2010), miszerint a CCK kulcs szerepet játszik a postprandiális inzulinérzékenyítő mechanizmus aktiválásában. Vizsgálatainkban egyrészt kimutatták, hogy CCK-receptor antagonistá proglumid alkalmazásával az étkezés kiváltotta inzulinérzékenyítő mechanizmus gátolható. De nem csak farmakológiai úton létrehozott CCK-1 receptor gátlás vezet inzulin rezisztenciához. A genetikusan CCK-1 receptor hiányos Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) patkányokról ismert, hogy inzulin rezisztensek (Jia és mtsai 2001), emellett Peitl és mtsai igazolták, hogy a CCK-1 receptor hiányában az OLETF állatokban a HISS mechanizmus postprandiális aktiválódása is elmarad (Peitl és mtsai 2010). Jelen munkánk további bizonyítékul szolgál a CCK inzulinérzékenyítő hatását illetően, hiszen a CCK8 intraportális dózisének fokozatos növelése dózis-függő módon képes fokozni a teljes test inzulin érzékenységet, s amely hatás nitrát toleranciában teljesen gátolt.

A CCK szerteágazó hatásspektruma és e hatások nitrát toleranciában történő megváltozása összetett folyamatok eredménye, gyakran egymással látszólag ellentétes hatásokkal. Így például Szilvássy munkacsoportja kimutatta, hogy a CCK Oddi sphincter kontrakciót okozó hatása hemodinamikai nitrát tolerancia állapotában nem változik (Sári és mtsai 1998), míg különböző fajokban is több szerző bizonyította a NO szerepét a HISS mechanizmusban (Sadri és mtsai 1999, Porszasz és mtsai 2002, Moore és mtsai 2002). E látszólagos ellentmondás magyarázataként szolgálhat az a feltételezés, hogy az exogén és endogén NO között kereszt tolerancia alakul ki (Papapetropoulos és mtsai 1998). Természetesen, több mint valószínű, hogy az oxidatív stressz szerepet játszik a kereszt tolerancia kialakulásában, mégpedig vélhetően különféle biokémiai mechanizmusok által a különböző eredetű NO semlegesítése révén. Tekintettel arra, hogy a reaktív oxigén gyökök fontos mediátorai a hemodinamikai nitrát toleranciának, ezért az oxidatív stressz táplálék-indukálta inzulin szenzitivizációra gyakorolt hatásának elemzésére további kiegészítő kísérleteket nem végeztünk. Nyúlkísérletek eredményei alapján elmondható, hogy a cGMP metabolizmusában történt változások fontos tényezői a NO-függő folyamatok deszenzitivizációjának a nitrát tolerancia

állapotában. A cGMP foszfodiészteráz gátlók, mint amilyen a cicletanine és a zaprinast képesek visszafordítani a hemodinamikai nitrát tolerancia állapotát, legalábbis izolált érpreparátumokon illetve gastrointestinalis simaizomban (Szilvássy és munkacsoportjának korábbi, még nem közölt megfigyelése). A jelen vizsgálat eredményei alapján lehetetlen megmagyarázni, hogy a nitrát tolerancia vajon milyen mechanizmus által rontja az intraportális CCK8 inzulinérzékenyítő hatását. Mivel a nitrát toleráns állatok májszövetében a cGMP szintje sokkal kisebb mértékben növekedett CCK8 intraportális adására, mint a nem-toleráns állatokban, így a nitrát tolerancia kialakulásának hátterében a fokozott cGMP lebomlás sem zárható ki.

## 7. Összefoglalás

A NO inzulinérzékenyítő szerepe többszörösen igazolt, s mivel ismert, hogy a NO hemodinamikai hatásaival szemben tolerancia fejlődhet ki, így azt a célt tűztük magunk elé, hogy megvizsgáljuk, hogy vajon a nitrát tolerancia az inzulinérzékenyítő hatással szemben is kialakul-e? Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az nitrát tapasz akut, egyszeri alkalmazása az inzulinérzékenységet javítja, míg a 7 napos, folyamatos (nem intermittáló) kezelés következtében fellépő hemodinamikai nitrát tolerancia állapotában inzulinrezisztencia alakul ki.

Mivel korábbi vizsgálatok kimutatták a NO szerepét a táplálék kiváltotta inzulinérzékenység fokozódás (HISS-) mechanizmusában, s mivel a HISS-mechanizmus tartós károsodása 2-es típusú cukorbetegség kialakulásához vezethet, így megvizsgáltuk azt is, hogy a kialakuló hemodinamikai nitrát tolerancia miként befolyásolja a HISS mechanizmust? Megállapítottuk, hogy hemodinamikai nitrát tolerancia esetében nem csak bazális, éhgyomri inzulinrezisztencia alakul ki, hanem postprandiális inzulinrezisztencia is. Ezen túlmenően újabb bizonyítékul szolgáltunk a CCK inzulinérzékenyítő hatását illetően, illetve azt is kimutattuk, hogy a CCK inzulinérzékenyítő hatásában az NO-cGMP út központi szerepet játszik.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az eredményeink alátámasztják Kovács és munkatársai (2000) azon eredeti megfigyelését, miszerint transzdermális nitroglicerinnel tapasz alkalmazásával inzulinérzékenyítő hatás váltható ki. Eredményeink ugyanakkor a helyesen megválasztott nitrát terápia jelentőségére is felhívják a figyelmet, hiszen a nitrát terápia kétélű fegyver lehet az iszkémiás szívbetegségben szenvedők kezelésében, akiknél a háttérben gyakran a metabolikus szindróma részeként inzulin rezisztencia állhat.

## 8. Summary

Several studies have proved the insulin sensitizing effect of NO. Furthermore, it is also well established that tolerance can develop against the hemodynamic effect of NO; therefore we aimed to study whether the development of nitrate tolerance also results in tolerance against the hypoglycaemic effect of insulin (i.e. insulin resistance). Our results showed that the acute treatment with nitrate-containing patches improves insulin sensitivity, however a continuous 7-day (non- intermittent) treatment, which resulted hemodynamic nitrate tolerance also led to insulin resistance.

Previous studies have revealed the role of NO in the mechanism of meal-induced insulin sensitization (HISS-mechanism) and since the persistent impairment of the HISS-mechanisms can lead to the development of type II diabetes mellitus, we evaluated the effect of evolving hemodynamic nitrate tolerance on the HISS-mechanisms. We concluded that continuous NO exposure that induced hemodynamic nitrate tolerance was associated not only with basal, fasted insulin resistance, but it also caused postprandial insulin resistance. Furthermore, we provided novel evidence for the insulin sensitizing effect of CCK and it was proved that the NO-cGMP pathway plays a central role in the insulin sensitizing effect of CCK.

Our results support the original observation of Kovacs et al. (2000), that transdermal nitroglycerin-containing patch can generate insulin sensitizing effect. In addition, our results put the scope on the importance of the schedule of nitrate therapy, because it can be a two edges sword in the treatment of ischemic heart disease, where insulin resistance as a part of metabolic syndrome can be in background of the disease.

## 9. Irodalom

1. Abdollah A, Moffat JA, Armstrong PW. N-acetylcysteine does not modify nitroglycerin-induced tolerance in canine vascular rings. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 9: 445-450
2. Andres R, Cader G, Zierler KL. The quantitatively minor role of carbohydrate in oxidative metabolism by skeletal muscle in intact man in the basal state; measurements of oxygen and glucose uptake and carbon dioxide and lactate production in the forearm. *J Clin Invest* 1956; 35: 671-682
3. Axelsson KL, Wikberg JE, Andersson RG. Relationship between nitroglycerin, cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. *Life Sci* 1979; 24: 1779-1786
4. Bajza Á, Peitl B, Németh J, *et al.* Development of insulin resistance by nitrate tolerance in conscious rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43: 471-476
5. Bergman RN, Finegood DT, Ader M, *et al.* Assessment of insulin sensitivity in vivo. *Endocr Rev* 1985; 6: 45-86
6. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 159-193
7. Bock MG, DiPardo RM, Rittle KE, *et al.* Cholecystokinin antagonists. Synthesis of asperlicin analogues with improved potency and water solubility. *J Med Chem* 1986; 29: 1941-1945
8. Chang RS, Lotti VJ. Biochemical and pharmacological characterization of an extremely potent and selective nonpeptide cholecystokinin antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4923-4926
9. Cowan C, Bourke J, Reid DS, *et al.* Tolerance to glyceryl trinitrate patches: prevention by intermittent dosing. *Br Med J* 1987; 294: 544-545

10. Csont T, Szilvássy Z, Fülöp, F, *et al.* Direct myocardial anti-ischaemic effect of GTN in both nitrate-tolerant and nontolerant rats: a cyclic GMP-independent activation of KATP. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1427-1434
11. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237: E214-E223
12. DeFronzo RA. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; 37: 667-687
13. DeMeyts P, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 769-783
14. Ferdinandy P, Szilvássy Z, Csont T, *et al.* Nitroglycerin-induced direct protection of the ischaemic myocardium in isolated working hearts of rats with vascular tolerance to nitroglycerin. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 1129-1131
15. Ferdinandy P, Csont T, Csonka C, *et al.* Capsaicin-sensitive local sensory innervation is involved in pacing-induced preconditioning in rat hearts: role of nitric oxide and CGRP? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 356: 356-363
16. Ferdinandy P, Szilvássy Z, Baxter GF. Preconditioning of the diseased heart. *Trends in Pharmacol Sci* 1998; 19: 223-229
17. Garthwaite J. Neural nitric oxide signalling. *Trends Neurosci* 1995; 18: 51-52
18. Gherzi R, Sesti G, Andraghetti G, *et al.* An extracellular domain of the insulin receptor beta-subunit with regulatory function on protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1989; 264: 8627-8635
19. Gruetter CA, Lemke SM. Effects of sulfhydryl reagents on nitroglycerin-induced relaxation of bovine coronary artery. *Can J Physiol Pharmacol* 1986; 64: 1395-1401

20. Gustafson TA, Moodie SA, Lavan BE. The insulin receptor and metabolic signaling. *Rev. Physiol Biochem Pharmacol* 1999; 137: 71-190
21. Hahne WF, Jensen RT, Lemp GF, *et al.* Proglumide and benzotript: members of a different class of cholecystokinin receptor antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6304-6308
22. Herczeg L, Buherenkova T, Szilvássy Z *et al.* Diabetes induced by partial hepatic sensory denervation in conscious rabbits. *Eur J Pharmacol* 2007; 568: 287-288
23. Horowitz JD, Antman EM, Lorell BH, *et al.* Potentiation of the cardiovascular effects of nitroglycerin by N-acetylcysteine. *Circulation* 1983; 68: 1247-1253
24. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9269
25. Jia DM, Fukumitsu KI, Tabaru A *et al.* Troglitazone stimulates pancreatic growth in congenitally CCK-A receptor-deficient OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: R1332-R1340
26. Katz RJ, Levy WS, Buff L, *et al.* Prevention of nitrate tolerance with angiotension converting enzyme inhibitors. *Circulation* 1991; 83: 1271-1277
27. Kellerer M, Lammers R, Haring HU. Insulin signal transduction: possible mechanisms for insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107: 97-106
28. Koesling D, Friebe A. Structure-function relationships in NO-sensitive guanylyl cyclase. In: Nitric oxide. Biology and pathobiology 2000; 369-379
29. Kovács P, Szilvássy Z, Hegyi P *et al.* Effect of transdermal nitroglycerin on glucose-stimulated insulin release in healthy male volunteers. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 41-44

30. Larsson LI, Rehfeld JF. Distribution of gastrin and CCK cells in the rat gastrointestinal tract. Evidence for the occurrence of three distinct cell types storing COOH-terminal gastrin immunoreactivity. *Histochemistry* 1978; 58: 23-31
31. Laursen JB, Mulsch A, Boesgaard S, *et al.* In vivo nitrate tolerance is not associated with reduced bioconversion of nitroglycerin to nitric oxide. *Circulation* 1996; 94: 2241-2247
32. Lutt WW, Wang X, Sadri P, *et al.* Rapid insulin sensitivity test (RIST). *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76: 1080-1086
33. Lutt WW. The HISS story overview: a novel hepatic neurohumoral regulation of peripheral insulin sensitivity in health and diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77: 553-562
34. Lutt WW. Practice and principles of pharmacodynamic determination of HISS-dependent and HISS-independent insulin action: methods to quantitate mechanisms of insulin resistance. *Med Res Rev* 2003; 23: 1-14
35. Lutt WW. Postprandial insulin resistance as an early predictor of cardiovascular risk. *Ther Clin Risk Manag* 2007; 3: 761-770
36. Luke R, Sharpe N, Coxon R. Transdermal nitroglycerin in angina pectoris: efficacy of intermittent application. *J Am Coll Cardiol* 1987; 10: 642-646
37. May DC, Popma JJ, Black WH. In vivo induction and reversal of nitroglycerin tolerance in human coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 317: 805-809
38. McGowder D, Ragoobirsingh D, Dasgupta T. The hyperglycemic effect of S-nitrosoglutathione in the dog. *Nitric Oxide* 1999; 3: 481-491

39. Moore MC, Satake S, Baranowski B, *et al.* Effect of hepatic denervation on peripheral insulin sensitivity in conscious dogs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E286-E296
40. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, *et al.* Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev* 2007; 28: 463-491
41. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136
42. Needleman P, Johnson EM. Mechanism of tolerance development to organic nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; 184: 709-715
43. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; 334: 661-665
44. Noble F, Wank SA, Crawley JN, *et al.* International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystinin receptors. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 745-781
45. Olefsky JM. The insulin receptor. A multifunctional protein. *Diabetes* 1990; 39: 1009-1016
46. Oroszi G, Szilvássy Z, Németh J, *et al.* Interaction between capsaicin and nitrate tolerance in isolated guinea-pig heart. *Eur J Pharmacol* 1999a; 368: R1-R3
47. Oroszi G, Szilvássy Z, Németh J, *et al.* Interplay between nitric oxide and CGRP by capsaicin in isolated guinea-pig heart. *Pharmacol Res* 1999b; 40: 125-128
48. Packer M, Lee WH, Kessler PD, *et al.* Prevention and reversal of nitrate tolerance in patients with congestive heart failure. *N Engl J Med* 1987; 317: 799-804
49. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526

50. Pálvölgyi A, Sári R, Németh J, *et al.* Interplay between nitric oxide and VIP in CCK-8-induced phasic contractile activity in the rabbit sphincter of Oddi. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3264-3266
51. Papapetropoulos A, Marczin N, Catravas JD. Cross-tolerance between endogenous nitric oxide and endogenous nitric oxide donors. *Eur J Pharmacol* 1998; 344: 313-321
52. Parker JD, Farrell B, Fenton T, *et al.* Counter-regulatory responses to continuous and intermittent therapy with nitroglycerin. *Circulation* 1991; 84: 2336-2345
53. Parker JD, Parker JO. Effect of therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor on hemodynamic and counterregulatory responses during continuous therapy with nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21: 1445-1453
54. Parker JD, Parker AB, Farrell B, *et al.* Intermittent transdermal nitroglycerin therapy. Decreased anginal threshold during the nitrate-free interval. *Circulation* 1995; 91: 973-978
55. Parker JD, Parker JO. Nitrate therapy for stable angina pectoris. *N Engl J Med* 1998; 338: 520-531
56. Parker JO, Fung HL. Transdermal nitroglycerin in angina pectoris. *Am J Cardiol* 1984; 54: 471-476
57. Peitl B, Döbrönte R, Németh J, *et al.* The prandial insulin sensitivity-modifying effect of vagal stimulation in rats. *Metabolism* 2005; 54: 579-583
58. Peitl B, Szilvássy Z. The inhibitory effect of proglumide on meal-induced insulin sensitization in rats. *Metabolism* 2007; 56: 863-864
59. Peitl B, Döbrönte R, Németh J, *et al.* Meal-induced enhancement in insulin sensitivity is not triggered by hyperinsulinemia in rats. *Metabolism* 2009; 58: 328-332

60. Peitl B, Döbrönte R, Drimba L, *et al.* Involvement of cholecystokinin in baseline and post-prandial whole body insulin sensitivity in rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 644: 251-256
61. Petrie JR, Ueda S, Webb DJ, *et al.* Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation* 1996; 93: 1331-1333
62. Piatti PM, Monti LD, Zavaroni I, *et al.* Alterations in nitric oxide/cyclic-GMP pathway in nondiabetic siblings of patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2416-2420
63. Porszász R, Légvári G, Németh J, *et al.* The sensory nitrenergic nature of the hepatic insulin sensitizing substance mechanism in conscious rabbits. *Eur J Pharmacol* 2002; 443: 211-212
64. Porszász R, Légvári G, Pataki T, *et al.* Hepatic insulin sensitizing substance: a novel 'sensocrine' mechanism to increase insulin sensitivity in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 1171-1179
65. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607
66. Reaven GM. Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and hypertension. Parallels between human disease and rodent models. *Diabetes Care* 1991; 14: 195-202
67. Reaven GM, Chen YDI. Insulin resistance, its consequences, and coronary heart disease. *Circulation* 1996; 93: 1780-1783
68. Rehfeld JF, Larsson LI, Goltermann NR, *et al.* Neural regulation of pancreatic hormone secretion by the C-terminal tetrapeptide of CCK. *Nature* 1980; 284: 33-38

69. Reid MA, Latour MG, Legare DJ, *et al.* Comparison of the rapid insulin sensitivity test (RIST), the insulin tolerance test (ITT), and the hyperinsulinemic euglycemic clamp (HIEC) to measure insulin action in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 811-818
70. Roettger BF, Reuntsch RU, Pinon D. Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J Cell Biol* 1995; 128: 1029-1041
71. Sadri P, Legare DJ, Lutt WW. Insulin resistance caused by nitric oxide synthase inhibition. *Proc West Pharmacol Soc.* 1997; 40: 19-20
72. Sadri P, Lutt WW. Blockade of hepatic nitric oxide synthase causes insulin resistance. *Am J Physiol* 1999; 277: G101-G108
73. Sári R, Szilvássy Z, Jakab I, *et al.* Cross tolerance between nitroglycerin and neural relaxation of the rabbit sphincter of Oddi. *Pharmacol Res* 1998; 37: 505-512
74. Sári R, Peitl B, Kovács P, *et al.* Cyclic GMP-mediated activation of a glibenclamide-sensitive mechanism in the rabbit sphincter of Oddi. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 514-520
75. Shankar R, Zhu JS, Ladd B, *et al.* Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. *J Clin Invest* 1998; 102: 1403-1412
76. Shankar RR, Wu Y, Shen HQ, *et al.* Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* 2000; 49: 684-687
77. Silver PJ, O'Connor B, Cumiskey WR, *et al.* Inhibition of low Km cGMP phosphodiesterases and Ca<sup>+</sup>(+)-regulated protein kinases and relationship to vasorelaxation by cicletanine. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257: 382-391
78. Sternini C, Wong H, Pham T, *et al.* Expression of cholecystokinin A receptors in neurons innervating the rat stomach and intestine. *Gastroenterology* 1999; 117: 1136-1146

79. Stokes GS, Ryan M, Brnabic A, *et al.* A controlled study of the effects of isosorbide mononitrate on arterial blood pressure and pulse wave form in systolic hypertension. *J Hypertens* 1999; 17: 1767-1773
80. Stumvoll M, Jacob S. Multiple sites of insulin resistance: muscle, liver and adipose tissue. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107: 107-110
81. Szilvássy Z, Ferdinandy P, Bor P, *et al.* Loss of preconditioning in rabbits with vascular tolerance to nitroglycerin. *Br J Pharmacol* 1994; 112: 999-1001
82. Szilvássy Z, Ferdinandy P, Bor P, *et al.* Ventricular overdrive pacing-induced anti-ischemic effect: a conscious rabbit model of preconditioning. *Am J Physiol* 1994; 266: H2033-H2041
83. Szilvássy Z, Ferdinandy P, Nagy I, *et al.* The effect of continuous versus intermittent treatment with transdermal nitroglycerin on pacing-induced preconditioning in conscious rabbits. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 491-496
84. Thadani U, Fung HL, Darke AC, *et al.* Oral isosorbide dinitrate in the treatment of angina pectoris. Dose-response relationship and duration of action during acute therapy. *Circulation* 1980; 62: 491-502
85. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 1980; 47: 1-9
86. Winniford MD, Kennedy PL, Wells PJ, *et al.* Potentiation of nitroglycerin-induced coronary dilation by N-acetylcysteine. *Circulation* 1986; 73: 138-142

## 10. Saját közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁR

Iktatószám: DEENKÉTK/399/2013.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Bajza Ágnes

Neptun kód: YDS8KF

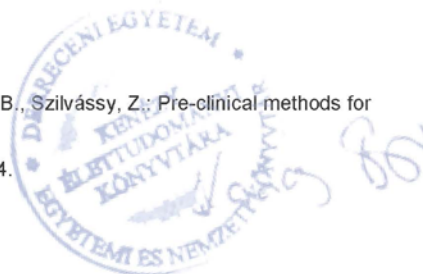
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bajza, Á.**, Németh, J., Peitl, B., Szilvássy, Z.: Block by nitrate tolerance of meal-induced insulin sensitization in conscious rabbits.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 58 (5), 508-513, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0b013e31822bf556>  
IF:2.287
2. **Bajza, Á.**, Peitl, B., Németh, J., Pórszász, R., Rablóczky, G., Literati-Nagy, P., Szilvássy, J., Szilvássy, Z.: Development of insulin resistance by nitrate tolerance in conscious rabbits.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 43 (3), 471-476, 2004.  
IF:1.576

### További Közlemények

3. Literati-Nagy, Z., Tory, K., Literati-Nagy, B., **Bajza, Á.**, jr. Vigh, L., Vigh, L., Mandl, J., Szilvássy, Z.: Synergetic Insulin Sensitizing Effect of Rimonabant and BGP-15 in Zucker-Obese Rats.  
*Pathol. Oncol. Res.* 12253, 1-5, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-013-9620-6>  
IF:1.555 (2012)
4. Zsuga, J., Tory, K., Jaszlits, L., **Bajza, Á.**, Németh, J., Peitl, B., Szilvássy, Z.: Pre-clinical methods for the determination of insulin sensitivity.  
*J. Biochem. Biophys. Methods.* 61 (1-2), 253-258, 2004.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.06.006>  
IF:1.302



5. Gesztelyi, R., Zsuga, J., Cseppentő, Á., **Bajza, Á.**, Varga, A., Szabó, J.Z., Szentmiklósi, J.A.: Special sensitization pattern in adenosine-induced myocardial responses after thyroxine-treatment. *J. Pharmacol. Sci.* 91 (4), 295-304, 2003.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.91.295>

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6.72**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3.863**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.12.14



## 11. Tárgyszavak

Magyarul: inzulin rezisztencia, nitrát tolerancia, nitrogén monoxid, nitrogén monoxid donor, nitroglicerín, (3-morpholinosydnonimine), hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp, rapid insulin sensitivity test (RIST), II-típusú diabetes, kolecisztokinin

Angolul: insulin resistance, nitrate tolerance, nitric oxide, nitric oxide donor, nitroglycerin, (3-morpholinosydnonimine), hyperinsulinaemic euglycaemic glucose clamp, rapid insulin sensitivity test (RIST), type 2 diabetes mellitus, cholecystokinin

## 12. Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Szilvássy Zoltánnak, a DEOEC Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet intézetvezető egyetemi tanárának, hogy időt és energiát nem sajnálva, a munkámat hasznos elméleti és gyakorlati tanácsaival maximálisan támogatta, lehetővé tette, hogy a dolgozatom alapját képező laboratóriumi kísérleteket az intézetben elvégezzem, valamint a munkám anyagi feltételeit is biztosította.

Továbbá, köszönettel tartozom Dr. Peitl Barna egyetemi adjunktusnak, aki értékes szakmai és gyakorlati tapasztalataival, útmutatásaival, és nem utolsósorban biztatásaival járult hozzá a disszertációm létrejöttéhez.

Szeretnék köszönetet mondani a munkacsoport tagjainak, Dr. Sári Rékának, Dr. Németh Józsefnek, Dr. Drimba Lászlónak, akik az egyes részfeladatok elvégzésében-megoldásában nyújtottak nélkülözhetetlen segítséget.

És végül megköszönöm Molnárné Hatvani Ilona és Szegváriné Erdős Andrea segítőkész, precíz munkáját, amellyel hozzájárultak a kísérletek sikeréhez.

A munkám elkészüléséhez, illetve a kísérletek kivitelezéséhez nyújtott anyagi támogatásért köszönetemet fejezem ki a Richter Gedeon Nyrt.-nek.

A munka anyagi fedezetét az alábbi témátámogatások biztosították:

(NKFP\_07-A2-2008-0260; GOP-1.1.2-07/1-2008-0004; TÁMOP-4.2.2.-08/1-2008-0014, OM-00174/2008, GOP-1.1.1-07/1-2008-0032, GOP-1.2.1-08-2009-0023) és az OTKA (75965).

## **13. Fűggelék**