

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az inzulinrezisztencia farmakológiai befolyásolhatóságának  
lehetőségei**

Kovács Diána

Témavezető: Dr. Peitl Barna



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

## **Az inzulinrezisztencia farmakológiai befolyásolhatóságának lehetőségei**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: **Kovács Diána Klára** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája  
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Peitl Barna, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora  
Dr. Csiki Zoltán, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem GYTK,  
Gyógyszerhatástani Tanszék Könyvtára  
(Elméleti Tömb 5. emelet)  
2015. szeptember 8., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Csonka Csaba, PhD  
Dr. Káplár Miklós, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora  
Dr. Csonka Csaba, PhD  
Dr. Csiki Zoltán, PhD  
Dr. Káplár Miklós, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,  
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2015. szeptember 8. 13 óra

## 1. BEVEZETÉS

Az obezitás prevalenciájának gyors növekedése, az ehhez társuló inzulin rezisztencia, majd ennek következtében kialakuló 2-es típusú diabétesz, (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) és szövődményei világméretű egészségügyi problémát jelentenek. A XXI. század fő népegészségügyi problémájává vált diabétesz mellitus (DM) vezető helyet foglal el a nem fertőző ún. „civilizációs” betegségek sorában. Az egészségügyi Világszervezet (WHO) becslése szerint a cukorbetegek száma 2030-ra, 552 millió före fog emelkedni, és ez a szám még nem tartalmazza a nem diagnosztizált eseteket. Ennek ismeretében nem meglepő, hogy az elhízással összefüggő egészségügyi kiadások között a következményesen kialakuló diabetes mellitus kezelésének a költségei a legmagasabbak. Az Egyesült Államokban ezek a kiadások elérik a 32,4 milliárd dollárt! A cukorbetegek 90%-át a felnőtt korban manifesztálódó, 2es típusú diabétesz mellitusban szenvedő betegek alkotják. A jelenlegi prevalencia adatok és a várható incidencia-növekedés korrelál, a manapság metabolikus szindróma néven ismert tünet együttes „járványszerű” terjedésével, melyben központi szerepet játszik az inzulin rezisztencia és az elhízás (obesitas, obezitás). 1997-ben a WHO az elhízást hivatalosan is világjárvánnyá nyilvánította. 2008-ban világszerte már 1,4 milliárd felnőtt számított túlsúlyosnak, 500 millió fő pedig elhízottnak. Ugyanakkor az obezitást az első megelőzhető halálozási okként tartják számon. Kialakulásában a genetikai háttér mellett szerepet játszanak a környezeti tényezők, a kevés mozgással jellemezhető életmód, de ugyanígy szerepe lehet egyes gyógyszerek tartós használatának is. Tipikus példája ez utóbbinak az atípusos antipszichotikumok (AAP) (pl: clozapine, olanzapine) alkalmazása, melyeket azért fejlesztették ki, mert az eddig forgalomban lévő gyógyszerek kedvezőtlen mellékhatás spektrummal rendelkeztek. Az új típusú szereknél ez a hatás megszűnt, azonban e gyógyszerek tartós szedése során a betegek elhíznak, a szénhidrát háztartásuk felborul, súlyos esetben cukorbeteggé válhatnak, vagy a meglévő cukorbetegségük romlik. Ez a folyamat jelentősen rontja a beteg compliance-ét és így a terápia eredményét, valamint hozzájárulnak az egyre nagyobb számban diagnosztizált T2DM-os betegek számának növekedéséhez. Értekezésem egyik fő témája tehát az AAP-ok okozta metabolikus eltérések vizsgálata.

A cukorbetegség és az inzulinrezisztencia új kezelési lehetőségei pedig azért kerültek vizsgálataim középpontjába, mert az erre a célra kifejlesztett új originális és szájon át szedhető gyógyszerkészítmények már régóta nem kerültek forgalomba. Ugyanakkor pedig a jelenleg elérhető farmakoterápiás (gyógyszeres) kezelések egyike sem nyújt minden szempontból kifogástalan megoldást a cukorbetegség kezelésére. Az originális gyógyszermolekulák fejlesztése költséges és hosszú időt vesz igénybe. Céлом generikus molekulák számítógépes algoritmusok alapján történő keresése, valamint *in vitro* és *in vivo* hatástani jellemzése, különös tekintettel az inzulinérzékenyítő mechanizmusra. Értekezésem másik fő témája az inzulin rezisztencia farmakológiai befolyásolhatóságának tanulmányozása.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Első célkitűzésem az egyszeri szájon át adott olanzapin endogén inzulinérzékenyítő mechanizmusra gyakorolt hatásának vizsgálata volt. Továbbá célom volt, hogy felfedjük a kiinduló pontját annak a folyamatnak, mely az étvágy fokozódásához és megnövekedett táplálékfelvételhez vezet. Egyszeri orális olanzapin dózis hatását vizsgáltuk a bélhormonokra (ghrelin, inzulin, leptin, GLP-1, GIP, peptid YY, amylin és PP) melyek részt vesznek az inzulinérzékenység és az étvágy szabályozásában. Ahhoz hogy tanulmányozni tudjuk, hogy az olanzapin miként befolyásolja az inzulinérzékenységet és az étvágyat, ki kell zárni olyan zavaró faktorokat melyek a zsírszövet gyarapodásából és/vagy a testsúly növekedéséből származnak, ezért egy egyszeri 1 mg/kg-s orális adásmódot választottunk, mely bizonyítottan elhízást indukál nőstény Sprague-Dawley (SD) patkányokban hosszú távú alkalmazása során.
2. További célom volt annak vizsgálata, hogy vajon az általunk használt *in silico* predikációs metodika használható-e generikus gyógyszerek szűrésére új terápiás indikációk azonosítása érdekében? Ahhoz, hogy teszteljük ezt a módszertani megközelítést, az 1255 generikus gyógyszert tartalmazó FDA adatbázisban molekula szűrést végeztünk, azok lehetséges PPAR $\gamma$  aktiváló tulajdonságának

megjósolása céljából. Az *in silico* módszerrel kiválasztott molekulákat *in vitro* PPAR $\gamma$  receptort expresszáló sejt kultúrákon teszteltük tovább, hogy valóban képesek-e PPAR $\gamma$  receptor aktiválására. Az *in vitro* legígéretesebbnek tűnő jelöltön elvégeztünk egy sor *in vivo* kísérletet 2-es típusú diabéteszes patkány állatmodell segítségével, hogy igazoljuk vagy megcáfoljuk a feltételezett PPAR $\gamma$  receptorhoz kapcsolódó inzulinérzékenyítő hatást.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### *Etikai engedélyek*

Vizsgálataink során minden állatkísérletet a laboratóriumi állatok védelméről és használatáról szóló rendelkezések és az ezzel összhangban lévő, a Debreceni Egyetem helyi etikai irányelveinek a betartásával végeztük (08/2007/DE MÁB&16/2007 DE MÁB).

#### *Kísérleti állatok, kezelési csoportok*

A kísérlethez 24 db 175-200g súlyú nőstény SD patkányt (Innovo Kft, Isaszeg Magyarország) használtunk. Az állatokat az érkezésüket követően egy hétig szoktattuk az új környezetükhöz. A patkányokat standard állatházi körülmények között tartottuk azaz, biztosítottuk számukra a 12-12 órás világos/sötét periódust, 22-24°C hőmérsékletet és az 50-70%-os relatív páratartalmat. Az állatokat egymástól elkülönítve (metabolikus ketrec) (3701M081, Techniplast, Olaszország) helyeztük el, standard laboratóriumi táppal (S8106-S011 SM R/M-Z+H; ssniff Spezialdiäten GmbH, Németország) etettük és csapvízzel itattuk *ad libitum*, az akklimatizációs adaptációs periódus alatt. Egy héttel később, az állatokat 2 fő csoportra osztottuk, az oldószerezrel kezelt kontroll (n=12) és az olanzapin kezelt (n=12) csoportokra. Mindkét csoporton belül random létrehoztunk éheztetett (n=6) és evett (n=6) alcsoportokat. Mindkét alcsoporttól a tápot elvettük a kísérlet megkezdése előtt 16 órával, de az evett csoportnak 2 órára visszaadtuk az altatás megkezdése előtt. A műtét előtt az állatokat elaltattuk (tiopentál, 50 mg/kg, i.p.)

Az olanzapint (Sigma-Aldrich, Magyarország) vagy az oldószert szájon át szondán keresztül adtuk be a táp visszaadása előtt az evett csoportnak vagy a táp visszaadása

nélkül az éheztetett csoportnak, 2 órával az altatás megkezdése előtt. Az olanzapint egyszeri 1 mg/kg-s orális dózisban adtuk, mely bizonyítottan elhízást okozott nőstény SD patkányoknál.

### „Meal-size” mérés

Ahhoz, hogy meghatározzuk a gyógyszer vagy oldószer beadása utáni első étkezésnek az időtartamát és az elfogyasztott tápnak a mennyiségét, követtük van der Zaal és mtsai által leírt protokollt. Az állatokat éhezettük 16 órán keresztül a kísérlet megkezdése előtt. Azokban a csoportokban, ahol az állatok visszakapták a tápot, mind az oldószeres, mind pedig az olanzapinnal kezelt állatoknál biztosítva volt a táptartó edényekhez való korlátlan hozzáférés, *ad libitum* ehettek. Közben video megfigyelőrendszert használtunk, hogy a távolból figyelhessük a táplálkozási viselkedésüket miközben a táptartó edény súlyát a benne lévő táppal együtt folyamatosan rögzítettük. Az első étkezés alkalmával elfogyasztott táp mennyiségét (first meal size) és időtartamát (meal duration) a következőképpen határoztuk meg: egy étkezésnek számít, amikor a táplálékfelvétel időtartama alatt legalább 1 kcal mennyiségű táp fogy el, illetve a két étkezés között eltelt időintervallum legalább 5 perc. Miután lemértük a first meal size-t, az altatás megkezdéséig hátralévő időben hagytuk az állatokat *ad libitum* enni. Ezalatt a 2 órás periódus alatt összesen elfogyasztott táp mennyiségét szintén meghatároztuk.

### Műtéti eljárás

Az éjszakai éhezést követően az állatokat elaltattuk intraperitonealis tiopentál (Trapanal) injekcióval (50 mg/kg). A tracheába egy polietilén kanült vezetünk be, hogy ezen keresztül biztosítsuk az állat számára a szabadon átjárható légutakat. A kísérlet során a folyamatos anesztézia érdekében szükség van további tiopentál adásra, mely a jobb femorális vénába helyezett kanülon keresztül történik. A jobb artéria carotisba szintén kanült vezetünk be. Ezen keresztül történt a vérvétel és a vérnyomás mérése. (Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) A bal juguláris vénába elhelyezett kanülon keresztül történt az inzulin és a 20%-os glükóz infúzió beadása. A vérárvadás elkerülése érdekében az állatok heparint (100 IU/kg i.v.) kaptak. A testhőmérsékletüket folyamatosan  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  körül tartottuk fűthető műtőasztal (Type 872H, Type 861, Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Németország) segítségével. A kísérlet végén az állatokat intravénásan beadott thiopentállal (100mg/kg) túlaltattuk.

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

A RIST-et a korábban leírtak szerint hajtottuk végre, hogy megvizsgáljuk a posztprandiális teljes test inzulin érzékenységében bekövetkező változásokat egyszeri orális (1 mg/kg) olanzapin adás hatására. A műtét utáni 30 perces stabilizációs periódust követően, 5 percnként vért vettünk az artéria carotisból, vércukor szint ellenőrzés céljából. Amikor egymást követő három mérés során stabil vércukor értékeket mértünk, azt tekintettük a továbbiakban kontroll értéknek. Ezután 50 mU/kg bólus inzulint (Humulin R, Eli Lilly, USA) adtunk be 5 perc alatt infúziós pumpával i.v., majd elindítottunk egy folyamatos glükóz infúziót, és a vércukor szintet 2 percnként ellenőriztük, és a cukorinfúzió sebességét aszerint állítottuk, hogy az előzőleg meghatározott kontroll értéket elérjük. Az összesen beadott glükóz infúzió mennyisége (mg/kg-ban meghatározva), amely ellensúlyozni képes az 50 mg/kg inzulin hipoglikemizáló hatását, adja meg a RIST indexet, amely a teljes test inzulinérzékenységének a mutatója.

### *HOMA-IR*

A HOMA-IR index kiszámítását azért végezzük el, hogy meghatározzuk az bazális inzulinérzékenységet éhgyomri állapotban. Az éhgyomri plazma inzulin szint (FPI) és az éhgyomri vércukor szint (FBG) alapján a teljes test inzulinrezisztenciája (HOMA-IR) kiszámítható. A HOMA-t széles körben alkalmazzák klinikai kutatásokban (Cutfield és mtsai 2003, Matthews és mtsai 1985, Wallace és Matthews 2002). A HOMA-IR-t úgy állapították meg, mint az éhgyomri vércukor koncentrációjának (mmol/l) és az inzulin (mU/ml) mennyiségének szorzata, osztva 22,5-el. A legnagyobb előnye a HOMA-IR –nek a FPI vagy a FBG/FPI arányhoz képest, hogy figyelembe veszi az éhgyomri hiperglikémiát. A megnövekedett HOMA-IR érték inzulin rezisztenciára utal.

### *Hormon szintek meghatározása vérmintából*

A RIST megkezdése előtt vérmintát (0.1 ml) vettünk az artéria carotisból, amiből a következő hormonokat határoztuk meg: inzulin, GLP-1, pankreasz polipeptid (PP), peptid YY, ghrelin, leptin és amylin. A mintákat centrifugáltuk (10000g 2 perc, 4°C), majd a felülülő plazmát leválasztottuk és -70°C-on tároltuk a hormonok meghatározásáig. A plazma hormon szintek méréséhez ún. Rat Metabolism Panelt (RGT-88K-08, EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA) használtunk és az alábbi hormonok meghatározását:

inzulin, GLP-1 (aktív), GIP (teljes), PP, peptid YY (teljes), ghrelin (aktív), leptin, amylin (aktív) a gyártó előírása szerint végeztük. Molekuláris Medicina Kutató Központ végezte.

### *One dimensional DPM*

A potenciális PPAR $\gamma$  agonista jelöltek kiválasztására az előbb ismertetett DPM egyszerűbb verzióját használtuk, ami egy szisztematikus, mintázaton alapuló, bioaktivitási predikációs módszer. Ez a módszer kis molekulájú vegyületek virtuális affinitási ujjlenyomatát használja, hogy megjósolja azok gyógyhatását és célfehérjéit. A DPM-ben az affinitási ujjlenyomatot IP-nek hívják, mely áll a vegyületek dokkolási értékeinek halmazából és egy előre meghatározott nem célfehérjékből álló készletből, melyek diszkriminátor felületet alkotnak a molekulák számára. A fő különbség a DPM és az itt bemutatott oDPM között, az hogy az utóbbi módszer az egydimenziós távolságszerű mértéket alkalmaz ahhoz, hogy összehasonlítsa az IP-eket, melyeket vektoroknak tekint egy többdimenziós térben, míg a DPM hipersíkot generál, hogy elválassza az aktív és az inaktív vegyületeket a többdimenziós térben. A legfőbb ok, hogy az oDPM-et alkalmazzuk a DPM helyett, hogy a referencia halmazban behatárolt a vegyületek száma. Egy korábbi megállapításunk szerint legalább 10 tagú csoportra van szükség ahhoz, hogy megbízhatóan működjön a DPM többváltozós statisztikai módszere, és kevesebb, mint 10 tag esetén egy alternatív értékelési módszerre van szükség, mint amilyen az oDPM.

### *Mintagyűjtés*

Gyógyszer adatbázis felhasználásával összegyűjtöttünk az FDA által elfogadott 1255 molekulát és kiválasztottunk hozzá 149 fehérjét a Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank adatbázisából, ahogy azt korábbi munkánk során tettük. A mintagyűjtést Dr Simon Zoltán és munkacsoportja végezte.

### *Dokkolási előkészületek és számítások*

A dokkolási előkészületeket és számításokat az AutoDockTools-al (Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) és DAVIS2.0 (DOcking-based VIRTUAL Screening, Biotechnology High Performance Computing Software Applications Institute, Department of Defense, Frederick, MD, USA) szoftver segítségével végeztük, és az AutoDock4 (Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute) dokkoló programban található pontozó függvényvel. Az előkészületek

a korábban leírtak szerint történtek. Az egyes molekulákat, az előre meghatározott különböző fehérjékre dokkoltuk, és az affinitási értéket a dokkolt szerkezet szabadenergia értékéből származtatjuk, amit azután egy adatbázisba importáltuk. A dokkolásokat egy 104 központi vezérlőegységes (CPU) (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, USA) Hewlett-Packard csoporton futtattuk le. Összesen 1255\*149=186995 dokkolás történt, 200-szor ismételve minden egyes gyógyszermolekula-célféhérje párra, melyet AutoDock4 (Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute) programmal végeztünk és értékeltünk. A dokkolási előkészületeket és a számításokat Dr Simon Zoltán és munkacsoportja végezte el.

### Referencia készlet

Gyógyhatás adatbázis használata helyett, egy 8 különböző vegyületből álló referencia készletet használtunk, melynek minden tagja ugyanazon receptoron hat. Ezek az ismert PPAR $\gamma$  agonisták az alábbi vegyületek voltak: roziglitazon, bexaroten, gemfibrozil, alfa-linolsav, fenofibrát, bezafibrát és clofibrát.

### IP hasonlósági számítások

Az IP vektorok által bezárt szög alapján meghatározott hasonlósági együtthatót ( $d$ ) használtuk az IP hasonlósági mátrix létrehozásához. Az IP vektorokat a dokkolási értékeik határozzák meg, melyek koordinátáknak tekinthetők egy 149 dimenziós térben, melyet a 149 féle fehérjéből álló készlet hoz létre. A szög cosinusának távolsági együtthatóját használtuk, hogy meghatározzuk a két vektor közti szöget ebben a 149 dimenziós térben, mely a következő képlettel számítható ki:

$$d_{AB} = \arccos \left( \frac{\sum_{i=1}^n a_i b_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n a_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n b_i^2}} \right) \frac{180}{\pi}$$

ahol,  $d_{AB}$  az IP távolság értéke A és B molekula között, és  $a_i$  és  $b_i$  a dokkolási értékei A és B molekulának az  $i$ -edik fehérjére a 149-ből.

### Szomszédságon alapuló bioaktivitási predikció (szomszédsági analízis)

Az IP hasonlósági mátrix alapján hasonlósági listákat alkottunk a referencia készlet minden egyes elemére. A 8 szomszédsági listán a maximális 3 átfedő előfordulással ( $d=3$ ) szereplő vegyületeket választottuk ki további elemzésre. (Dr Simon Zoltán és mtsai.)

### *In vitro tanulmány – génexpressziós vizsgálatok*

Az in silico módszerrel kiválasztott vegyületek PPAR $\gamma$  aktiváló hatását Mono Mac6 (MM6) sejtvonalon teszteltük. Az MM6 monoblasztos leukémia eredetű monocita sejtvonal, amelyről ismert, hogy expresszálja PPAR $\gamma$ -t. A PPAR $\gamma$  aktivációja számos gén aktiválódását eredményezi, ezek között vannak olyanok, melyek kizárólag PPAR $\gamma$  működéséhez kötött. Ilyen a FABP4/aP2 (fatty acid-binding protein 4/adipocyte protein) gén, mely expresszióját vizsgáltuk.

A kísérletet 48 lyukú sejtenyészítő plate-n végeztük, az egyes lyukakba 200000 sejt került, és minden kezelés triplikában történt. A sejteket előkezeltük PMA-val (Phorbol 12-myristate 13-acetate). A PMA makrofág jellegűvé teszi a sejteket és érzékenyíti a PPAR $\gamma$  választ. 24 óra után a PMA-t kimostuk és friss tápfolyadékot adtunk, majd elindítottuk a kezelést a kiválasztott vegyületekkel, melyeket a következő koncentrációkban adtunk ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ), hogy koncentráció-válasz görbéket kapjunk. Pozitív kontrollként a PPAR $\gamma$  ismert agonistáját a roziglitazont ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ), negatív kontrollként a vegyületek oldószerét ((DMSO) dimetil-szulfoxid, etanol vagy víz) alkalmaztuk. A 24 óra inkubációs idő után a sejteket lizáltuk TRIzol reagenssel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) és a ribonukleinsavat (RNS) izoláltuk. Az RNS mintákat RT PCR-ral (reverse transcription polymerase chain reaction) cDNS-sé konvertáltuk és a PPAR $\gamma$  aktivitását az FABP4/aP2 gén (a PPAR $\gamma$  ismert célgénje) mRNS expressziójának RT QPCR-ral (real-time reverse transcription polymerase chain reaction) történő mérésével határoztuk meg. Az FABP4/aP2 gén mellett meghatároztuk a Cyclophilin A, egy ún. „housekeeping” gén mRNS expresszióját is a mintákban. Az FABP4/aP2 génre kapott értékeket a Cyclophilin A értékeivel  $\Delta\Delta Ct$  módszert alkalmazva normalizáltuk. A normalizált értékeket ábráztuk. Az in vitro vizsgálatokat az ELTE Biokémiai Tanszékén végezték.

## *In vivo tanulmány*

### Kísérleti állatok

A vizsgálatokhoz hím 5 hetes (175-200g súlyú) Wistar patkányokat használtunk, melyeket a Charles-Rivers Laboratories (Innovo Kft, Isaszeg, Magyarország) szereztünk be. Az állatokat standard állatházi körülmények között ketrecekben (1500 U Techniplast, Olaszország) tartottuk, biztosítottuk számukra a 12-12 órás világos/sötét periódust, 22-24°C-os hőmérsékletet és az 50-70%-os relatív páratartalmat. Az állatok standard tápot ettek és csapvizet ittak ad libitum.

### Állatmodell és kezelési protokoll

A kísérlethez 48 állatot használtunk, melyeket 3 fő csoportra osztottunk. A Wistar patkányok első fő csoportja az egészséges, oldószerrel kezelt kontroll csoport volt. Ezeket az állatokat standard laboratóriumi táppal (ssniff, EF R/M Control; sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország) etettük és csapvízzel itattuk ad libitum. A második fő csoportban a patkányokat zsírdús táppal (HFD, ssniff, EF R/M with 20% fat; ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország) etettük 3 héten át. Ezek az állatok alkották az inzulin rezisztens, nem diabéteszes, oldószerrel kezelt csoportot. A két fő csoportból 8-8 patkányt használtunk. A harmadik fő csoportot 4 alcsoportra osztottuk. Minden alcsoportban 8 patkány volt. Ezeket az állatokat zsírdús táppal (HFD) etettük 2 héten keresztül, majd streptozotocinnal (STZ; 50 mg/kg i.p.) kezeltük. Egy hét után az állatokban éhgyomri hiperglikémia volt mérhető. Ez az állatmodell utánozza a 2-es típusú diabétesz mellitus két sajátos vonását. A perifériás inzulinrezisztenciát, melyet a HFD-vel történő etetés indukál, és a károsodott glükóz-stimulált inzulin szekréciót, melyet az STZ kezeléssel hoztuk létre. Ennek a 2-es típusú diabéteszes állatmodellnek a létrehozója és hitelesítője a metabolikus szindróma úttörő kutatója, Gerald Reaven és munkacsoportja volt. A harmadik fő csoport első alcsoportjában az állatok oldószerrel kaptak és a maradék három alcsoportban levő állatokat a nitazoxanide (NTX) három dóziséval (50, 100 és 200 mg/kg) kezeltük, naponta egyszer, per os. A teljes kezelési idő 8 nap volt. Az utolsó kezelési napon 2 órával a legutolsó gyógyszeres/oldószeres kezelést követően az állatokat elaltattuk, azért hogy HEGC módszerrel meghatározzuk a teljes test inzulinérzékenységét.

## Dózis választás

Ebben a vizsgálatban a célunk az volt, hogy a találjunk olyan generikus gyógyszert, melyet új klinikai indikációban mutathatunk be. A gyógyszerfejlesztés során fontos szempontnak tartottuk, hogy a gyógyszer olyan dózisban is növelni tudja az inzulinérzékenységet, ami az eredeti indikációban mind állatkísérletekben, mind humán vizsgálatban hatékonyan mutatkozott, s amire a törzskönyvi dossziéja is vonatkozik. Esetünkben ez a nitazoxanide volt, amelyet eredetileg antiprotozoon szerként hoztak forgalomba. A fenti gondolatmenetnek megfelelően olyan nitazoxanide dózistartományt alkalmaztunk (50-200 mg/kg/nap), mely hatásosan csökkentette immunszuppresszált cryptosporidosisos patkány modellben az oocysták vedlését.

## Az inzulinérzékenység meghatározása

A teljes test inzulinérzékenységének meghatározása hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC) módszerrel történt. A kísérletet megelőzően az állatokat 16 órán át éhezettük, majd intraperitoneális tiopental (Thiopental Sandoz; Sandoz Pharmaceutical PLC, Basel, Svájc) injekcióval elaltattuk. Az altatószert 50 mg/kg dózisban adtuk. A nyak ventrális oldalán közepén egy vágást ejtettünk, feltártuk a légcsövet, amibe egy polietilén kanült vezetünk be, hogy ezen keresztül biztosítsuk a levegő szabad áramlását a légutakban a HEGC alatt. Ezután a bal juguláris véna két ágát és a bal artéria carotist feltártuk, megtisztítottuk a rajtuk lévő kötőszövettől és mindegyikbe egy-egy kanült helyeztünk be. Az egyik vénás kanülon keresztül az inzulin, a másikon a glükóz infúziót adtuk. Az artériás kanül a szisztémás vérnyomás mérésére szolgált, illetve innen vettünk vért vércukorszint mérésekhez és plazma inzulin szint meghatározásához. A műtétet követően biztosítottunk egy 30 perces stabilizációs periódust az állatok számára, hogy az esetlegesen a műtét során fellépő stressz hatása lecsillapodjon. Ezután folyamatos inzulin infúziót (Humulin R; Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA) indítottunk 3U/kg/perc sebességgel 20%-os glükóz infúzióval együtt. Az inzulin infúziót 120 percen keresztül adtuk, ez alatt az idő alatt a vércukorszintet 5-10 percenként ellenőriztük és a párhuzamosan elindított cukorinfúzió sebességét úgy változtattuk, hogy a vércukor értéke folyamatosan  $5.5 \pm 0.5$  mmol/l maradjon, tehát az euglikémia fenntartása volt a cél. A vércukor szintet glükómméterrel (Accu-Check; Hoffmann La-Roche Ltd, Basel, Svájc) ellenőriztük, az első 80 percben 5 percenként, az utolsó 40 percben 10 percenként. Ahhoz, hogy meghatározzuk az éhgyomri és a steady state plazma inzulin szintet, vérmintát

vettünk (0,5 ml, 20  $\mu$ L EDTA és 10  $\mu$ L Trasylol; Bayer AG, Leverkusen, Németország) az artéria carotisból közvetlen az inzulin infúzió megkezdése előtt és a HEGC végén a steady state kialakulását követően. A vérmintákat 2 percig (4°C, 10 000 rpm) centrifugáltuk (Centrifuge 5415R; Eppendorf AG, Hamburg, Németország), majd a plazmát levettük és -70°C-on tároltuk a későbbi meghatározásig. A plazma inzulinszintet kereskedelmi forgalomban kapható RIA kit (RK-400CT, MTA Izotópkutató Intézet, Budapest, Magyarország) segítségével határoztuk meg. Az inzulin meghatározást Dr Németh József végezte.

A glükóz infúziós ráta (GIR; mg/kg/perc) átlaga, amely az euglikémia fenntartásához szükséges a HEGC utolsó 30 percében, jellemzi a perifériás inzulin érzékeny szövetek glükóz felvételét. Az éhgyomri és a HEGC során kialakuló steady state állapotban nyert vércukor és plazma inzulin szintekből számíthatók olyan értékek, mellyel az inzulinhatás jól jellemezhető. Ilyen például a perifériás szövetek inzulinérzékenységét kifejező ISI (insulin sensitivity index) mely a perifériás szövetek által felvett glükóz mennyiségéből és a plazma inzulin koncentrációjából számított érték. Továbbá az inzulin metabolikus clearance (MCRI) az inzulin szervezetből történő eltávolításának a jelzője. Kiszámítása a következőképpen történik: az inzulin infúziós ráta (mU/kg/perc) osztva a steady state és az éhgyomri plazma inzulin szint különbségével, ennek mértékegysége mL/kg/perc-ben adható meg.

### *Statisztika*

Az eredményeinket átlag  $\pm$  SD fejeztük ki, és ahol lehetséges volt páros t- tesztet végeztünk, egyébként két utas variancia analízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni szerint módosított t-teszttel kiegészítve.

## **4. EREDMÉNYEK**

### *Egyszeri olanzapin dózis hatása a bazális és posztprandiális teljes test inzulinérzékenységre*

A bazális, azaz éhgyomri inzulinérzékenységet a HOMA képlettel számoltuk ki. Az olanzapin kezelés növelte, mind az éhgyomri plazma inzulin szintet, mind pedig a vércukor szintet, mely a HOMA-IR indexben növekedést eredményezett, és ez éhgyomri inzulin rezisztenciát jelez. A posztprandiális inzulinérzékenység a RIST index-el

jellemezhető. Az éheztetett, oldószerrel kezelt állatok RIST indexe alacsonyabb, a szintén oldószerrel kezelt tápot visszakapott (evett) csoporthoz képest. Az olanzapin kezelés nem befolyásolta a RIST indexet sem az éheztetett, sem pedig az evett csoportoknál, tehát az egyszeri orális olanzapin adásnak nincs hatása a posztprandiális teljes test inzulinérzékenységének fokozódásra (azaz az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmusra).

#### *Egyszeri olanzapin dózis hatása a metabolikus hormon szintekre*

A posztoperatív stabilizációs periódus alatt levettünk 0.1 ml artériás vért, hogy hormonok szintjét vizsgáljuk, éheztetett (n=12) és posztprandiális (n=12) állapotban. Az amylin, GLP-1, PYY és PP plazma szintjeiben nem volt szignifikáns különbség az éheztetett és evett csoportokban, sem az oldószerrel, sem pedig az olanzapinnal kezelt állatok esetében. Az oldószerrel kezelt állatokban a plazma inzulin, leptin és GIP értékek szignifikánsan nőttek étkezést követően. Ez a posztprandiális növekedés a plazma leptin és GIP szintekben szintén megfigyelhető volt az olanzapinnal kezelt állatok esetében. Az olanzapin beadást követően az éhgyomri plazma inzulin szint nőtt az oldószerrel kezelt csoporthoz képest, ugyanakkor a posztprandiális inzulin válasz csökkent az olanzapinnal kezelt patkányokban az oldószeres kontroll állatokhoz viszonyítva. Étkezés után a plazma ghrelin szintje szignifikánsan csökkent az oldószerrel és az olanzapinnal kezelt állatokban, viszont az utóbbi csoportban ez a ghrelin válasz kisebb mértékű volt, vagyis nem csökkent le annyira, mint a kontroll állatokban.

#### *Egyszeri olanzapin dózis hatása a first meal size-ra*

Az evett csoportokban nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a first meal size-ban az oldószeres és az olanzapinnal kezelt csoportok között. Az átlagos meal size  $2.66 \pm 0.5$  g és  $2.82 \pm 0.4$  g az oldószeres és az olanzapinnal kezelt csoportokat illetően. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést a first meal duration időtartamát tekintve, a kontroll és a gyógyszeres csoportnál ezek az értékek a következők voltak:  $13.9 \pm 1.1$  és  $16.5 \pm 1.2$  perc. Végül a teljes táplálkozási periódust nézve sem találtunk jelentős különbséget az elfogyasztott táp összmenyiségében, az oldószerrel és az olanzapinnal kezelt csoportok között, melyeknek értékei:  $4.33 \pm 0.5$  és  $4.05 \pm 0.5$  g voltak.

### *One-dimensional DPM eredményei*

Az oDPM analízis alapja a párosítás során észlelt hasonlóság a két IP között, melyekre úgy tekintünk, mint vektorokra egy többdimenziós térben. Az elnevezés azért „egy dimenziós” mert arra utal, hogy a két IP vektor közötti távolság egy dimenziós mértékű. Ennek a mérésnek az előnye, hogy a profilt a dokkolási pontértékekből kapott mintázat jobban tükrözi, mint a tényleges pontérték. Például, ha két gyógyszernek ugyanaz az IP-je, de különböző a dokkolási pontértékük, a  $d$  értékük kicsi lesz, ami nagyfokú hasonlóságra utal. Másfelől az egyszeri dokkolási pontérték elszámolása, jelentős hibát okozna a távolságmérésben. Ezt a hibalehetőséget kiküszöbölték a DPM módszernél. Meg kell jegyezni azonban, hogy kevesebb, mint 10 taggal rendelkező csoport esetén a DPM nem alkalmazható a túlilleszkedés magas valószínűsége miatt. Ezért a PPAR $\gamma$  predikció csak olyan egyszerű módszerekkel érhető el, mint amilyen az oDPM, függetlenül attól, hogy általában gyengébb a predikció pontossága, összehasonlítva a DPM-el. Az átlagos görbe alatti terület értéke az oDPM-nél 157 hatáscsoportra vizsgálva, melynek legalább 10 tagja van,  $0.62 \pm 0.12$ , míg a DPM pontossága  $0.97 \pm 0.03$ . A referencia készlet tagjainak a legközelebbi szomszédjainak a vizsgálata után, megszámloltuk a tagok legnagyobb számban jelenlevő szomszédjait. Így 10 generikus gyógyszer került kiválasztásra, melyek 3-szor jelentek meg a listán, ezek: a dantrolene, entacapone, etakrin sav, ketorolac, tiaprfoén sav, tolmetin, bromfenac, lubiprostone, nitazoxanide és suprofen. ( Dr Simon Zoltán és munkacsoportja eredményei.)

A talált PPAR $\gamma$  ligandok között feltűnően sok a nem-szteroid gyulladáscsökkentő (NSAID), prosztaglandin, prosztaciklin. Ez utóbbiaknak szintén gyulladáscsökkentő hatásuk van. Ez a megfigyelés azért is fontos a találatok szempontjából mert, a diabéteszt gyulladáscsökkentő betegségeknek tekintik.

A listán kétszeres előfordulást mutatott további 44 vegyület, míg 116 gyógyszer egyszer jelent meg, ezeket a jelen vizsgálatnál figyelmen kívül hagytuk. Megjegyzendő hogy a vegyületek közel állnak egymáshoz és úgy tűnik, hogy egy meglehetősen összefüggő csoportot alkotnak, hasonlóak a referencia készlethez (átlag IP távolság értékek és szórása a referencia készletnek és a prediktált vegyületeknek a következők:  $1.37 \pm 0.85$  és  $1.30 \pm 0.77$ ). A lubiprostone az egyetlen vegyület, mely messze van a többitől. Ezen eredmények alapján nem lehet további finomítást végrehajtani a predikción, ezért ezt a 10 vegyületet tovább *in vitro* vizsgáltuk.

### *In vitro tanulmány eredményei*

#### A FABP4/aP2 gén expressziójára gyakorolt hatás

A megvizsgált 10 vegyület közül 6 (dantrolene, entacapone, etakrin sav, ketorolac, tiaprofen, tolmetin) nem növelte a FABP4/aP2 gén expresszióját MM6 sejtvonalon. Másfelől a bromfenac, nitazoxanide, suprofen és lubiprostone jelentősen fokozta a FABP4/aP2 gén átíródását. Mindemellett az indukált mRNS expresszió fokozódás MM6 sejtvonalon egyértelműen látszott a 4 szerrel történő kezelés hatására. A suprofen szignifikáns mRNS szint emelkedést okozott a legalacsonyabb koncentrációban ( $10^{-8}$  M), de a növekvő koncentrációknál már nem volt további mRNS expresszió fokozódás megfigyelhető, kivétel a legnagyobb koncentrációban ( $10^{-5}$  M), de ez az érték nem volt szignifikáns az alacsonyabb koncentrációknál mért aktivitásfokozódáshoz képest. A lubiprostone szintén szignifikáns mRNS szint növekedést okozott a legalacsonyabb koncentrációban ( $10^{-8}$  M) viszont a növekvő koncentrációk és az általuk kiváltott hatás között nem volt összefüggés, tehát az mRNS expresszió fokozódás ennél a szernél sem volt koncentrációfüggő. A két másik vegyület, a bromfenac és a nitazoxanide esetében tűnt az aktivitásfokozódás koncentrációfüggő változásnak. A bromfenac a két legnagyobb koncentrációjában ( $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M) váltott ki szignifikáns mRNS expresszió növekedést, míg a nitazoxanide már a legkisebb koncentrációjában ( $10^{-7}$ ) jelentős mRNS expressziót okozott és ráadásul ez a hatás koncentrációfüggő módon fokozta a FABP4/aP2 gén aktivitását. Viszont  $10^{-6}$  M koncentrációban az eltérés nem volt szignifikáns, de itt a nagyobb SD magyarázhatja a nem szignifikáns eltérést.

A FABP4/aP2 gén expressziójának változásait százalékosan is meghatároztuk, összehasonlítottuk a négy vegyület legmagasabb koncentrációjában mért, és az oldószerek által létrehozott hatást. Ebben az összehasonlításban a lubiprostone bizonyult a leghatékonyabbnak, mintegy 10-szeres aktivitásfokozódást mutatott a normál mRNS szinthez képest, míg ez a nitazoxanide esetében 7-szeres, a suprofen esetében 6-szoros és a bromfenac esetében 3-szoros volt.

A roziglitazon, mint referencia szer, koncentrációfüggő módon fokozta a FABP4/aP2 gén expresszióját MM6 sejtvonalon. Ráadásul ez a stimuláló hatás a FABP4/aP2 gén kifejeződésére a többi szerhez képest lényegesen nagyobb volt. Ugyanakkor elmondható, hogy az oldószerek önmagukban nem hoztak létre semmilyen változást a FABP4/aP2 gén expressziójában. A génexpressziós vizsgálatokat az ELTE Biokémiai Tanszékén végezték.

### *In vivo* vizsgálat eredményei

#### A teljes test inzulinérzékenységének meghatározása

A generikus gyógyszerekről fellelhető irodalmi információk és az *in vitro* tesztünk eredményeként az *in vivo* kísérlethez a NTX-t választottuk ki, hogy meghatározzuk az inzulinérzékenyítő hatását T2DM-es patkányokon. A zsírdús tápon tartott állatok inzulin rezisztenssé váltak, de nem alakult ki náluk cukorbetegség a 3. hét végére. Az intravénás STZ kezelésben részesült patkányok 2 hét zsírdús diétát követően, nemcsak csökkent inzulinérzékenységet mutattak, az egészséges állatokhoz képest, hanem éhgyomri hiperglikémia is mérhető volt náluk, azaz ezek az állatok T2DM-sé váltak. Az oldószerrel kezelt egészséges és HFD-s csoportban lévő állatoknak szignifikánsan alacsonyabb vércukor értékei voltak, ugyanakkor emelkedett GIR és ISI volt jellemző rájuk, összehasonlítva a HFD+STZ-s patkányokkal. A NTX kezelés dóziszfüggően javította a glikémiás állapotot a HFD+STZ-vel kezelt T2DM-es patkányokban. A glikémiás állapotban bekövetkező javulást a szignifikánsan emelkedő GIR (mely az euglikémia fenntartásához szükséges), illetve a HEGC alatt mért ISI növekedése mutatja, azokban az állatokban melyek 8 napon át 200 mg/kg NTX-t kaptak. Az éhgyomri vércukorszint az oldószeres HFD+STZ csoportban jelentősen nőtt, összehasonlítva az oldószerrel kezelt egészséges vagy a HFD-vel etetett állatokkal. A NTX kezelés az éhgyomri vércukor értékeket minden dózisban csökkentette, és a legnagyobb vizsgált dózisban elérte a statisztikailag szignifikáns szintet ( $p < 0.05$ ). Az éhgyomri plazma inzulin szint megemelkedett az összes olyan csoportban, ahol T2DM fejlődött ki (HFD+STZ+oldószer, HFD+STZ+NTX), de a NTX kezelés az inzulin szintben nem okozott jelentős változást. Végül nem találtunk szignifikáns eltérést a MCRI-ben egyik kezelési csoportban sem. A nyugalmi átlag artériás középnyomásban nem volt változás a csoportok között.

## **5. MEGBESZÉLÉS**

Első célkitűzésünk az volt, hogy megvizsgáljuk az olanzapin MIS-re gyakorolt hatását nőstény patkányokban anélkül, hogy az a testsúlyban változást idézne elő. Az AAP-ok mellékhatásainak vizsgálatához nehéz megfelelő kísérleti állatot választani, számos esetben nem hozzák a várt metabolikus eltéréseket, viszont ami bevált

állatmodellnek tekinthető ezen szerek vizsgálatához, azok a nőstény Sprague-Dawley patkányok, ezért ezeket választottuk kísérletünkhöz. Azt is célul tűztük ki, hogy feltárjuk az egyszeri orális olanzapin dózis hatását a táplálkozási szokásokra és a táplálkozás során felszabaduló hormonok plazma szintjére, melyek felelősek lehetnek az olanzapin okozta anyagcsere változások biokémiai folyamatainak elindításában. A MIS mechanizmust először egy kanadai kutatócsoport írta le a 90-es évek közepén. Később intenzív kutatások indultak el ezen a területen melyek során számos részét tárták fel e mechanizmusnak, beleértve a n. vagus és a muszkarin receptorok szerepét valamint a szenzoros effektor útvonalak részvételét, azok farmakológiai befolyásolhatóságát és a posztprandiálisan felszabaduló CCK feltételezett fokozó hatását. A MIS mechanizmusnak a klinikai jelentőségét kiemeli az a megfigyelés, hogy annak hosszabb távú károsodása az emberi T2DM-hoz hasonló állapotot eredményez ugyanakkor a gyógyszerrel történő aktivációja javíthatja a MIS-t kísérletes diabéteszben. Ezek pedig arra engednek következtetni, hogy a MIS lehetséges farmakológiai célpont, melynek kiaknázásával javítható lehetne az inzulinérzékenység inzulin rezisztens betegekben. Ezenkívül a kísérletünk eredménye ismét megmutatta a MIS alapjelenségét, azaz a fokozódó inzulin érzékenységet mutattuk ki az evett állatokban összehasonlítva az éheztetett csoporttal.

Az olanzapin az elhízásra leginkább hajlamosító AAP-ok közé tartozik. Preklinikai és klinikai vizsgálatok bizonyították, hogy az olanzapin már a testsúlynövekedést megelőzően is képes metabolikus működési zavarokat okozni egyéb pszichés megbetegedés jelenléte nélkül is. Kísérletünkkel mi is megerősítettük, hogy az olanzapin képes rontani a teljes test inzulinérzékenységet, melyet a megnövekedett HOMA-IR jelez, zsírszövet gyarapodás illetve elhízás nélkül.

A MIS mechanizmus feltételezett működése, az atropinra adott azonnali válasz alapján azt várhattuk volna, hogy az olanzapin a M3 receptor iránti affinitása révén a MIS-t lerontja. Meglepő módon azonban az olanzapin egyszeri per os dózisa vizsgálatunkban nem befolyásolta a MIS-t. Mindebből az olanzapin receptor affinitási profiljának és a MIS atropin-érzékenységének megfelelően arra következtethetünk, hogy az M3 receptor nem játszik jelentős szerepet legalább is az olanzapin MIS-re gyakorolt hatásában. Ugyanakkor nem zárható ki, hogy az olanzapin plazmakoncentrációja nem csökkent-e le a RIST vizsgálat alatt, hiszen a plazma félélet ideje jelentősen rövidebb rácsálókban, mint emberekben és körülbelül 2 óra telt el a gyógyszerbeadáستól az inzulin infúzió elindításáig. Az olanzapin MIS-re gyakorolt hatástalansága kapcsán azt sem zárhatjuk ki, hogy más

dózisban az olanzapin képes ezt az adaptív inzulinérzékenyítő mechanizmust befolyásolni. Az olanzapin hatásának elmaradását az étkezés hatására létrejött teljes test inzulinérzékenység fokozódására nem lehet magyarázni a táplálkozási viselkedés megváltozásával sem, mivel az általunk végzett kísérletben az olanzapin nem befolyásolta az első étkezésnek sem a mennyiségét, sem az időtartamát és az elfogyasztott tápösszmenyiségében sem találtunk különbséget a gyógyszeres illetve kontroll csoportok között. Ezek a megállapításaink egyeznek korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint az olanzapin nem befolyásolta a táplálékfelvétel mennyiségét, de csökkentheti az étkezések között eltelt időt, így okozva ezáltal hiperfágiát. Bár az olanzapinnal kezelt patkányokban megfigyelt, táplálkozáskor felszabaduló hormon szintekben bekövetkező változások utalhatnak az inzulin rezisztencia és a hiperfágia folyamatainak kezdeti lépéseire. Mind a ghrelin (éhség szignál), mind az inzulin (jóllakottság szignál) válasz csökkent posztprandiálisan, ezek azt sugallják, hogy egy akut károsodás léphetett fel a táplálékfelvétel szabályozásában. Ezek a változások előidézhetik a két étkezés között eltelt idő csökkenését, vagyis az étkezés frekvenciájának és így a napi táplálékösszmenyiségének növekedését.

Egyetlen tanulmány vizsgálta az olanzapin táplálkozáshoz kötődő hormonokra gyakorolt hatását. Ebben a tanulmányban megnövekedett first meal size-t és jelentősen megemelkedett preprandiális teljes plazma ghrelin szintet mértek az olanzapinnal kezelt patkányokban. Ugyanakkor a posztprandiális aktív ghrelin szint hasonló volt az oldószerezrel és az olanzapinnal kezelt csoportoknál. A mi kísérletünkben nem találtunk jelentős különbséget a first meal size és a preprandiális ghrelin szintek között az oldószerezrel és az olanzapinnal kezelt patkányok között, de a posztprandiális ghrelin válasz lecsökkent az olanzapinnal kezelt patkányok esetében. A két tanulmány között fellelhető eltérést magyarázhatja a patkányok neme és kora közti különbség, a beadás módja illetve hogy a van der Zwaal-féle tanulmányban a patkányokat betanították az étkezés várható időpontjára. Másrészt a csökkent posztprandiális ghrelin és inzulin válasz szintén alátámasztja a károsodott ghrelin és inzulin hatás feltételezett szerepét az olanzapin által indukált hiperfágia kifejlődésében. Bár nem volt statisztikailag szignifikáns eltérés a többi vizsgált hormon szintjében, ez nem zárhatja ki, hogy az olanzapin kezelés megváltoztathatja ezeket a paramétereket, mivel a tanulmányunkban a hormon meghatározásokhoz a vérmintákat a kb. 2 órával az étkezés illetve olanzapin beadás után vettük le, így nincs információnk ezeknek a hormonoknak a posztprandiális szintjéről az

első 2 órában. Vannak olyan beszámolók melyekben jelzik, hogy patkányoknál 2 órával az OGTT vagy adott teszt-étkezés után, a metabolikusan fontos hormonok plazma szintje visszatér az alap szintre. Ez megmagyarázhatja, hogy miért nem tudunk kimutatni emelkedést a GLP-1, amylin, PYY, PP plazmaszintjeiben étkezést követően. Másrészt az eredményeink megegyeznek azokkal a klinikai adatokkal, amelyek szintén azt sugallják, hogy a rövid távú orális olanzapin kezelés nem befolyásolja a bélhormonok felszabadulását.

Másik tanulmányunk célja volt, hogy olyan generikus gyógyszereket találjunk, melyek PPAR $\gamma$  receptor agonista hatással rendelkeznek, ezért az FDA által elfogadott generikus gyógyszereket tartalmazó adatbázisban molekulaszűrést végeztünk és oDPM-et alkalmaztunk. Munkánk eredményeként, találtunk egy potenciális PPAR $\gamma$  ligandot oDPM módszerrel. Az *in silico* módszerrel kiválasztott 10 molekula közül 4 volt képes az FABP4/aP2 gén expresszióját fokozni, melynek kifejeződése PPAR $\gamma$  aktivációhoz kötött. A 4 generikum közül a NTX-t választottuk ki, az *in vitro* eredmények lapján és a feltételezett PPAR $\gamma$  aktiváló hatását HEGC módszerrel vizsgáltuk tovább *in vivo* diabéteszes patkány modellben, hogy felderítsük annak inzulinérzékenyítő tulajdonságát

A gyógyszerfejlesztés folyamata igen költségessé vált az utóbbi évtizedben. Számos kísérletet tettek arra, hogy lerövidítsék a gyógyszerek piacra kerüléséhez szükséges idejét („time to market”) és csökkentsék a gyártási folyamat az anyagi ráfordításának nagyságát. Az említett nehézségek megoldása érdekében, a gyógyszeripar érdeklődését a generikumok megújítására irányította. Ha a gyógyszereket ugyanabban vagy alacsonyabb dózisban és hasonló kezelési időtartamban kívánjuk használni, mint ahogy az eredeti indikációjukban meghatározták, a gyógyszerfejlesztés számos lépése megspórolható, de legalábbis is lerövidíthető, mint amilyen például az idő- és költségigényes toxikológiai vizsgálatok. Erre példaként említem meg munkacsoportom egy korábbi publikációját, melyben bizonyítottuk, hogy a cicletanine – egy phosphodiesterase enzyme (PDE) enzim 1-5 gátló szer (eredetileg hipertónia kezelésére kifejlesztett gyógyszer) – képes fokozni a teljes test inzulinérzékenységet inzulin rezisztens nyulakban, alacsonyabb dózisban, mint ami a kardiovaszkuláris hatás kiváltásához szükséges.

Jelenlegi kutatásunk aktualitását alátámasztja az a tény, hogy a diabétesz prevalenciája globális növekedést mutat, és ebben a krónikus betegségben szenvedő emberek száma már elérte a 347 milliót. Másfelől a diabétesz kezelésére alkalmas

gyógyszerek száma behatárolt, a leggyakrabban felírt gyógyszereknek a TZDK-nek pedig számos mellékhatása van, mint például: perifériás és centrális ödémák, kongesztív szívelégtelenség vagy épp csonttörések. Noha ezek a mellékhatások a PPAR $\gamma$  receptor aktivációjának következtében jönnek létre, a receptor konformációja a kulcs, mely meghatározza a korepresszorok és koaktivátorok affinitását a ligand kötött PPAR $\gamma$  receptorhoz, mely által létrejön a géntranszkripció és a biológiai válasz a PPAR $\gamma$  aktiváció után. A PPAR $\gamma$  receptor aktivációjának sokrétű szabályozása és a szignál transzdukciós útvonalak lehetővé teszik, hogy tervezzünk egy szelektív PPAR $\gamma$  modulátor molekulát, mely inzulinérzékenyítő hatásának megtartása mellett nem rendelkezik az előbb említett mellékhatásokkal.

Ebben a tanulmányban a receptor-ligand kölcsönhatást számítógép segítségével modelleztük, mely biztosítja nagy molekulakönyvtárak eredményes szűrését. Az FDA által elfogadott generikus molekulákat tartalmazó adatbázis szűrésével kapott eredményeink alátámasztották az eredeti elképzelésünket, miszerint az alkalmazott *in silico* oDMP módszerrel megkönnyíthető a gyógyszerjelölt molekula kiválasztása, ha ismerjük vegyületünk célfehérjéjének molekuláris szerkezetét. Itt most kombináltuk az *in silico* oDPM módszernek és a generikus gyógyszerfejlesztési stratégiának az előnyeit. Az oDPM használata lehetővé teszi, hogy a molekulakönyvtárból viszonylag rövid idő alatt molekula jelölteket szelektáljunk. Generikumok új terápiás indikációban történő felhasználása lerövidíti a gyógyszerfejlesztési folyamatot. Azonban az *in silico* predikciós módszernek korlátai is vannak. Például nem tudja kimutatni, hogy a receptor-ligand kölcsönhatás eredményeként, vajon agonista vagy antagonistá választ jön-e létre? Ahhoz hogy ezt a fontos kérdést a megválaszoljuk *in vitro* és *in vivo* kísérleteket is elvégeztünk. Az oDPM módszer nem alkalmas arra, hogy különbséget tegyen a 4 *in vivo* aktívnak talált vegyület között, és a megjósolt többi molekula szintén alátámasztja az *in vitro* teszt jelentőségét és emlékeztet az *in silico* módszer korlátaira. Valamint az oDPM módszer nem képes előre jelezni a vegyületek lehetséges mellékhatásait sem. A mellékhatások megjósolása sokkal bonyolultabb, mint az itt bemutatott predikciós folyamat, mivel a mellékhatás adatbázisok gyakran hiányosak és számos kérdés még megválaszolásra vár (azaz a kedvezőtlen események kétes terminológiája, az alkalmazott kezeléstől és adagolástól függő kedvezőtlen hatások előfordulási gyakoriságának kezelése stb.) Természetesen egy hatáslistán a közeli IP szomszédságban lévő molekulák targetjei jelezhetik a várható mellékhatásokat. (pl: egy megjósolt angiotenzin-konvertáz enzim

gátló hatás rámutat a vérnyomásban bekövetkező lehetséges változásra.) A jövőbeli kutatásokban lehetőség nyílik a jobb hatásfokú DPM módszer használatára az oDPM helyett, nagyobb csoportok tanulmányozása esetén.

Az *in vitro* kísérletünkből kiderült, hogy a listán megjelenő, általunk kiválasztott generikumok képesek koncentrációfüggően stimulálni a PPAR $\gamma$  receptort. Végül, az *in vivo* kísérletet azért hajtottuk végre, hogy megvizsgáljuk, vajon a PPAR $\gamma$  aktiváció eredményeként létrejön-e inzulinérzékenység fokozódás az inzulinrezisztens cukorbeteg patkány modellben. A teljes test inzulinérzékenységet HEGC módszerrel határoztuk meg, mely az inzulinérzékenység meghatározásának arany standard módszere emberben. Miután a PPAR $\gamma$  receptor aktiváció által létrejött inzulinérzékenyítő hatás kifejlődéséhez néhány nap szükséges, az állatokat 8 napig kezeltük, mely elegendő bizonyult az inzulinérzékenyítő hatás kifejlődéséhez rágcsálókban. Eredeti elképzelésünk szerint a kiválasztott generikus gyógyszerek feltételezett inzulinérzékenyítő hatását abban a dózistartományban akartuk megvizsgálni, ahogy eredeti indikációjukban adták. Ebben a tanulmányban a nitazoxanide (Alinia<sup>®</sup>), generikus gyógyszer inzulinérzékenyítő hatását vizsgáltuk, mely a thiazolide gyógyszercsoport elsőként forgalomba került képviselője, protozoon ellenes hatással rendelkezik. E hatásnak feltételezett mechanizmusa a piruvát:ferredoxin oxidoreduktáz enzim-függő elektron transzfer gátlása. Az antiprotozoon hatás mellett antivirális hatását is feltételezik, mely a virális hemagglutinin gátlásán keresztül valósul meg, így gátolja vírus gazdaszervezet plazmamembránján történő megtapadását és károsítja annak intracelluláris jelátvitelét. Másfelől viszont a PPAR $\gamma$  receptor aktiváló hatásáról, nincsenek irodalmi adatok és nyilvános adatbázisokban sem említik.

Immunszuppresszált cryptosporidosisos patkány modellben a NTX gátolni képes az oocyták vedlését 50-200 mg/kg/nap dózisban. Ezét választottuk mi ezt a dózis tartományt, a kezelési időt pedig 8 napban állapítottuk meg, mert ennyi idő szükséges a PPAR $\gamma$  aktiváló hatás kifejlődéséhez. Ugyan a klinikai gyakorlatban a NTX kezelés 3-5 napig tart protozoon fertőzés esetén, de az elérhető preklinikai toxikológiai vizsgálatok adatai alapján a szer hosszabb távú alkalmazás során is biztonságosnak mondható. Ezek a tulajdonságok teszik a NTX-ot ideális generikus gyógyszerjelöltté, hogy új klinikai indikációban legyen adható, mint inzulinérzékenyítő vegyület.

Jelenlegi munkánk újdonsága, az oDPM módszer prediktív értékének bemutatása egy PPAR $\gamma$  ligand keresése kapcsán. Az oDPM módszer pozitív prediktív értéke

alátámasztható az *in vitro* méréssel, ahol a NTX koncentrációfüggő módon aktiválta a FABP4/aP2 gén kifejeződését MM6 sejtvonalon, mind pedig az *in vivo* kísérletekkel, ahol dóziszfüggő inzulinérzékenyítő hatást mutatott inzulin rezisztens, T2DM-os patkány modellben. Bár nem határoztuk meg a PPAR $\gamma$  mRNS-ének és protein expressziójának mértékét szövetmintákból az *in vivo* kísérletünk során, de az eredményeink azt sugallják, hogy az inzulinérzékenység növekedése a perifériás inzulin érzékeny szövetek fokozott glükóz felvételének eredménye, mivel mind a GIR, mind pedig az ISI értékei nőttek NTX-al történő kezelés hatására. Másfelől az MCRI-t és a steady state plazma inzulin szintet nem befolyásolta a NTX kezelés. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a NTX hatásának vélt mechanizmusa az inzulinérzékenység fokozásában van, ami hasonlít ahhoz a folyamatához, amit PPAR $\gamma$  stimuláció után várunk. Nem tapasztaltunk változást sem a testsúlyban, sem a szisztémás vérnyomásban a NTX kezelés hatására. Megjegyzendő azért, hogy a kezelési periódus csupán 8 nap volt, tehát nem zárható ki, hogy változásokat idézhet elő az említett két paraméterben hosszabb kezelési periódus után. Egy átfogóbb tanulmány, melyben a krónikus NTX kezelés szervrendszerekre gyakorolt hatását vizsgálánánk, választ adna erre a kérdésre.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Preklinikai és klinikai vizsgálatok igazolják, hogy az atípusos antipszichotikumok közé tartozó olanzapin akután képes inzulinrezisztenciát és metabolikus zavart okozni. Arra vonatkozóan azonban nincs az irodalomban fellelhető adat, hogy az étkezésre aktiválódó endogén inzulinérzékenyítő (MIS) mechanizmust is képes-e befolyásolni? Vizsgálataim alátámasztották azokat a korábbi megfigyeléseket, miszerint az olanzapin a testsúlyra gyakorolt hatásától függetlenül is képes inzulinrezisztenciát kiváltani. Emellett a plazma ghrelin szintre gyakorolt hatása arra enged következtetni, hogy a károsodott jóllakottság- illetve éhségérzet is játszik szerepet a tartós olanzapin kezelés során fellépő elhízásban. A legfontosabb eredeti megfigyelésem azonban annak igazolása, hogy az olanzapin (szemben az éhgyomri inzulinérzékenységre gyakorolt hatásától) az étkezésre aktiválódó endogén inzulinérzékenyítő mechanizmust nem károsítja. Ez pedig felveti annak lehetőségét, hogy a MIS farmakológiai aktivációjával az antipszichotikum-okozta inzulinrezisztencia javítható.

Molekula adatbázisok *in silico* szűrésével illetve generikumok új indikációban való alkalmazásával a gyógyszerfejlesztés idő- és költségigénye jelentősen lecsökkenthető. Tanulmányunkban e két módszert ötvöztük annak érdekében, hogy olyan generikus molekulát találjunk, mely PPAR $\gamma$  receptor aktiváló tulajdonsága révén inzulinérzékenyítő hatással bírhat. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az általunk alkalmazott One-dimensional Drug Profile Matching módszer alkalmas a kitűzött cél elérésére. Az *in silico* kiválasztott, potenciálisan PPAR $\gamma$  ligandok *in vitro* és *in vivo* vizsgálataival igazoltuk a módszer alkalmasságát. Ennek eredményeként végül kiválasztásra került a nitazoxanide generikus molekula, mely kémiai szerkezete prototípusként szolgálhat inzulinérzékenyítő gyógyszerek új generációjának kifejlesztéséhez.

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Peitl Barnának, hogy időt és energiát nem sajnálva, munkámat hasznos elméleti és gyakorlati tanácsokkal maximálisan támogatta és lehetővé tette, hogy sikeresen kivitelezsem tudományos munkámat, valamint megírhasam doktori disszertációm.

Kiemelt köszönettel tartozom Szilvássy Zoltán Professor Úrnak, a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra az intézetben végzett munkát.

Köszönettel tartozom a pesti munkacsoportnak: Dr. Simon Zoltánnak, Hári Péternek és Dr. Málnási-Csizmadia Andrásnak a molekulaszűrésért valamint az ELTE Biokémiai Intézetében végzett génexpressziós vizsgálatok elvégzéséért.

Szeretnék köszönetet mondani a munkacsoportunk tagjainak, Dr. Sári Rékának, Dr. Németh Józsefnek, akik áldozatos munkájukkal, szakmai tanácsaikkal, logikus érveléseikkel folyamatosan támogattak.

Külön köszönöm a munkáját Dr. Kiss Ritának és Hegedűs Csabának, akik az egyes részfeladatok elvégzésében-megoldásában nyújtottak nélkülözhetetlen segítséget.

Köszönöm Szegváriné Erdős Andrea segítőkész, precíz munkáját, amellyel hozzájárult a kísérletek sikeréhez, valamint a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi dolgozójának.

Külön köszönettel tartozom családomnak és a páromnak, akik szeretetükkel mindvégig támogattak céljaim elérésében.

## 8. FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/73/2015.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Diána Klára  
Neptun kód: LF1U82  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, D.**, Hegedűs, C., Kiss, R., Sári, R., Németh, J., Szilvássy, Z., Peitl, B.: Meal-induced insulin sensitization is preserved after acute olanzapine administration in female Sprague-Dawley rats.  
*Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Epub ahead of print (2015)*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-015-1091-8>  
IF:2.36 (2013)
2. **Kovács, D.**, Simon, Z., Hári, P., Málnási-Csizmadia, A., Hegedűs, C., Drimba, L., Németh, J., Sári, R., Szilvássy, Z., Peitl, B.: Identification of PPAR $\gamma$  ligands with One-dimensional Drug Profile Matching.  
*Drug Des. Devel. Ther.* 7, 917-928, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S47173>  
IF:3.026



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. • Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. • Tel.: (52) 410-443  
E-mail: [publikacio@lib.unideb.hu](mailto:publikacio@lib.unideb.hu) • Honlap: [www.lib.unideb.hu](http://www.lib.unideb.hu)



---

**További Közlemények**

3. Hegedűs, C., **Kovács, D.**, Drimba, L., Sári, R., Varga, A., Németh, J., Szilvássy, Z., Peitl, B.:  
Investigation of the metabolic effects of chronic clozapine treatment on CCK-1 receptor  
deficient Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats.  
*Eur. J. Pharmacol.* 718 (1-3), 188-196, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.08.034>  
IF:2.684

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,07

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
5,386

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományterial  
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján  
elvégezte.

Debrecen, 2015.04.02.

