

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az inzulinrezisztencia farmakológiai befolyásolhatóságának
lehetőségei**

Kovács Diána

Témavezető: Dr. Peitl Barna



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK.....	1
BEVEZETÉS	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
A DIABÉTESZ KÉT TÍPUSA	7
AZ INZULIN ÉS INZULINREZISZTENCIA	7
AZ OBEZITÁS	10
A METABOLIKUS SZINDRÓMA	10
KAPCSOLAT AZ ELHÍZÁS, AZ INZULINREZISZTENCIA ÉS A 2-ES TÍPUSÚ DIABETES KÖZÖTT	11
AZ INZULINREZISZTENCIA MOLEKULÁRIS MECHANIZMUSA	14
A ZSÍRSZÖVETI PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR (PPAR) RENDSZER SZEREPE.....	16
A TÁPLÁLKOZÁS SZABÁLYOZÁSÁT LEÍRÓ MODELLEK.....	17
A PERIFÉRIÁS ÉTVÁGYSZABÁLYZÁS	17
<i>Zsírszöveti szignálok.....</i>	<i>17</i>
A GASZTROINTESTINÁLIS (GI) ÉTVÁGYSZABÁLYZÓ RENDSZER	20
<i>Éhség szignál</i>	<i>20</i>
<i>Jóllakottsági szignálok.....</i>	<i>20</i>
AZ ENDOGÉN INZULINÉRZÉKENYÍTŐ MECHANIZMUS	21
GYÓGYSZEREK ÁLTAL KIVÁLTOTT INZULIN REZISZTENCIA ÉS DIABÉTESZ	22
<i>Az atípusos antipszichotikum kezelés.....</i>	<i>22</i>
A DIABÉTESZ GYÓGYSZERES KEZELÉSE ÉS ANNAK KORLÁTAI.....	25
<i>Inzulinkészítmények.....</i>	<i>26</i>
<i>Antidiabetikumok</i>	<i>27</i>
ÚJ LEHETŐSÉGEK A GYÓGYSZERFEJLESZTÉSBEN	32
A DRUG PROFILE MATCHING (DPM) MÓDSZER	34
CÉLKITŰZÉSEK	36
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	37
ETIKAI ENGEDÉLYEK	37
KÍSÉRLETI ÁLLATOK, KEZELÉSI CSOPORTOK.....	37
„MEAL-SIZE” MÉRÉS.....	38
MŰTÉTI ELJÁRÁS	38
RAPID INSULIN SENSITIVITY TEST (RIST).....	39
HOMA-IR.....	39
HORMON SZINTEK MEGHATÁROZÁSA VÉRMENTÁBÓL	40
STATISZTIKA.....	40
ONE DIMENSIONAL DPM.....	40

<i>Mintagyűjtés</i>	41
<i>Dokkolási előkészületek és számítások</i>	41
<i>Referencia készlet</i>	42
<i>IP hasonlósági számítások</i>	42
<i>Szomszédságon alapuló bioaktivitási predikció (szomszédsági analízis)</i>	42
IN VITRO TANULMÁNY – GÉNEXPRESSZIÓS VIZSGÁLATOK	44
IN VIVO TANULMÁNY	44
<i>Kísérleti állatok</i>	44
<i>Állatmodell és kezelési protokoll</i>	45
<i>Dózis választás</i>	46
<i>Az inzulinérzékenység meghatározása</i>	46
STATISZTIKA.....	48
EREDMÉNYEK	49
EGYSZERI OLANZAPIN DÓZIS HATÁSA A BAZÁLIS ÉS POSZTPRANDIÁLIS TELJES TEST INZULINÉRZÉKENYSÉGRE.....	49
EGYSZERI OLANZAPIN DÓZIS HATÁSA A METABOLIKUS HORMON SZINTEKRE	49
EGYSZERI OLANZAPIN DÓZIS HATÁSA A FIRST MEAL SIZE-RA	50
ONE-DIMENSIONAL DPM EREDMÉNYEI	51
IN VITRO TANULMÁNY EREDMÉNYEI.....	53
<i>A FABP4/aP2 gén expressziójára gyakorolt hatás</i>	53
IN VIVO VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI	57
<i>A teljes test inzulinérzékenységének meghatározása</i>	57
MEGBESZÉLÉS	60
ÖSSZEFOGLALÁS	66
SUMMARY	67
IRODALOM	68
SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	78
TÁRGYSZAVAK	80
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	81
FÜGGELÉK	HIBA! A KÖNYVJELZŐ NEM LÉTEZIK.

Rövidítések

5-HT	5-hidroxi-triptamin
AAP	atípusos antipszichotikum
Akt (PKB)	protein-kináz B
AMPK	adenozin-monofoszfát aktivált kináz
BMI	Body Mass Index
C/EBP- β , $-\delta$	CCAAT/enhancer binding protein (transzkripció faktor)
Cbl	Casitas B-lineage Lymphoma (jelátviteli fehérje)
CCK	kolecisztokinin
CRP	C-reaktív protein
D ₂ receptor	dopamin receptor-2
DM	diabetes mellitus
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	deoxiribonukleinsav
DOVIS 2.0	DOcking-based VIRTUAL Screening
DPM	Drug Profile Matching
EDTA	etilén-diamin-tertraecetsav
FABP4/aP2	fatty acid-binding protein 4/adipocyte protein2
FBG	fasting blood glucose
FDA	Food and Drug Administration
FFA	free fatty acid
FPI	fasting plasma insulin
Gab-1	GRB2-associated-binding protein 1
GHS-R	growth hormone secretagogue receptor

GI	gasztrointesztinális
GIP	glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GIR	glükóz infúziós ráta
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GLUT-1,-4	glucose transporter-1,-4
H ₁ receptor	hisztamin receptor-1
HDL	high-density lipoprotein
HEGC	hiperinulinémiás euglikémiás glükóz clamp
HFD	high fat diet
HISS	Hepatic Insulin Sensitizing Substance
HOMA-IR	homeostatic model assessment-inzulin rezisztencia
IL-1,-6	interleukin-1,-6
IP	interaction pattern
IRS-1,-2,-3,-4	inzulin receptor-szubsztrát-1,-2,-3-4
ISI	insulin sensitivity index
JAK	Janus kinase
KVB	kardiovaszkuláris betegség
LDL	low density lipoprotein
L-NAME	L-NG-Nitroarginine Methyl Ester
M ₁ receptor	muszkarin receptor-1
MAPK	mitogén aktivált protein-kináz
MCRI	metabolic clearance rate of insulin
MIS	meal-induced insulin sensitization
MM6	Mono Mac 6 (monoblasztos monocita sejtvonál)
mRNS	messenger RNS (ribonukleinsav)

mTOR	mammalian target of rapamycin
n.	nervus
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
NPY	neuropeptid Y
NSAID	NonSteroidal Anti-Inflammatory Drug
NTS	nucleus tractus solitarii
NTX	nitazoxanide
Ob-Rb	Obese Receptor (leptin receptor)
oDPM	One-dimensional Drug Profile Matching
PDE	phosphodiesterase enzyme
PHA	plexus hepaticus anterior
PI	phosphatidylinositol
PI3K	phosphatidylinositol triphosphate-hydroxyl kinase
PKC	protein-kináz C
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PP	pankreász polipeptid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPRE	peroxisome proliferator hormone response elements
PTP1B	protein tirozin foszfatáz 1B
PYY	peptide tyrosine-tyrosine
RIST	Rapid Insulin Sensitivity Test
RNS	ribonukleinsav

RT PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
RT QPCR	real-time reverse transcription polymerase chain reaction
RXR	retinoid X receptor
SD	Sprague-Dawley
SH2	Src homológia domén
Shc	Src homology 2 domain containing transforming protein 1
SOCS1,-3	suppressor of cytokine signaling-1,-3
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription (protein)5
STZ	streptozotocin
T1DM	Type 1 diabetes mellitus
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
TTI	testtömeg index
TZD	thiazolidéndion
UCP	uncoupling protein

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 diabetes mellitus (DM) vezető helyet foglal el a nem fertőző ún. „civilizációs” betegségek sorában (Kolovou és mtsai 2007). Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) becslése szerint a cukorbetegek száma 2030-ra 552 millió före fog emelkedni, (Whiting és mtsai 2011, Zimmet és mtsai 2001) 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 (Wolf és Colditz 1998). A cukorbetegek 90%-át a felnőtt korban manifesztálódó, 2-es típusú diabétesz mellitusban szenvedő betegek alkotják. A jelenlegi prevalencia adatok és a várható incidencianövekedés korrelál a manapság metabolikus szindróma néven ismert tünetegyüttes „járványszerű” terjedésével, melyben központi szerepet játszik az inzulin rezisztencia (Lann és LeRoith 2007) és az elhízás (obezitás). 1997-ben a WHO az elhízást hivatalosan is világjárvánnyá nyilvánította (Caballero 2007). 2008-ban világszerte már 1,4 milliárd felnőtt számított túlsúlyosnak, 500 millió fő pedig elhízottnak (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en). 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 ezek a mellékhatások nem jelentkeznek, azonban e gyógyszerek tartós szedése során a betegek elhízhatnak, a szénhidrát háztartásuk felborul, súlyos esetben cukorbeteggé válhatnak, vagy a meglévő cukorbetegségük romlik (Coccurello és Moles 2010). 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 már régóta nem kerültek forgalomba erre a célra kifejlesztett új originális és szájon át szedhető gyógyszerkészítmények. 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.

Irodalmi áttekintés

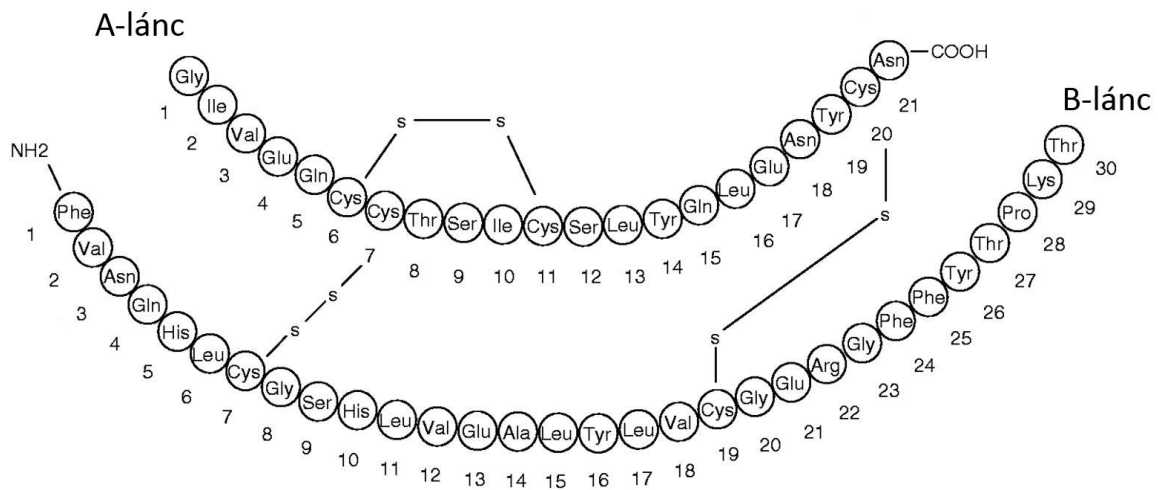
A diabétesz két típusa

A cukorbetegség korunk népbetegsége. Két fő típusát különítjük el, az 1-es típus (Type 1 diabetes mellitus, T1DM) esetében a hasnyálmirigy (pancreas) inzulintermelő béta sejtjei ismeretlen, gyakran autoimmun okból elpusztulnak, emiatt az inzulin abszolút hiánya áll fenn, ez vezet a kórosan magas vércukorértékhez, mely a cukorbetegség diagnózisának felállításának elengedhetetlen kritériuma. A T2DM esetében a helyzet némileg más. Itt az első lépés a perifériás szövetek inzulinérzékenységének csökkenése. Ez figyelhető meg elhízás kapcsán is. Az inzulin rezisztencia kialakulása évekkal megelőzheti a cukorbetegség klinikai diagnózisát, ugyanakkor azt is kimutatták, hogy nem az inzulin rezisztencia súlyossága változik az évek során, csak a béta sejtek fokozatos kimerülése és pusztulása az, ami végül a cukorbetegség kialakulásához vezet (Cnop és mtsai 2005). A hasnyálmirigy inzulin termelése (kezdetben) nem károsodott, sőt, fokozott, de az inzulin rezisztencia következtében a perifériás inzulin érzékeny szövetek (főként a máj, harántcsíkolt izom és a zsírszövet) fokozatosan érzéketlenné válnak az inzulinnal szemben (relatív inzulinhiány), amit később már a fokozott inzulintermelés sem tud kompenzálni. A béta sejtek túlzott igénybevétele, majd az elégtelen perifériás inzulinhatás következtében fellépő tartósan kóros magas vércukorszint (hiperglikémia) és az elégtelen lipolízis gátlás következtében tartósan magas vérlipid szint (hiperlipidémia) eredményeként a béta sejtek fokozatosan kimerülnek és elpusztulnak (glükotoxicitás, lipotoxicitás) és a relatív inzulinhiány abszolúttá válik.

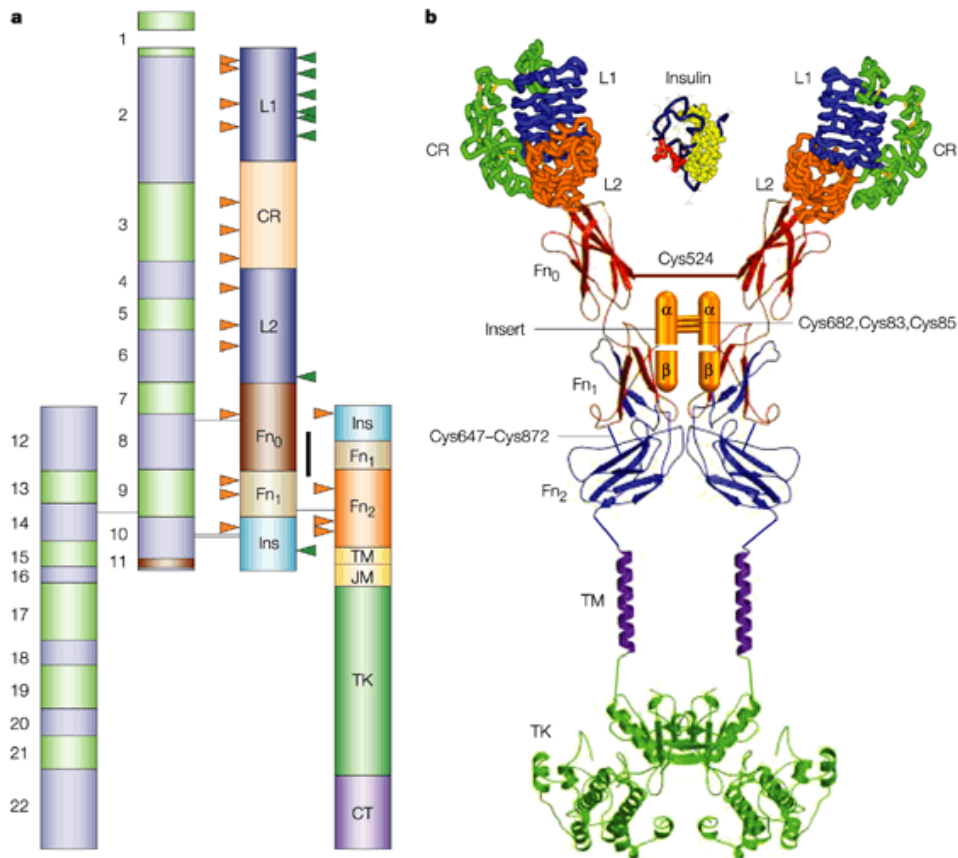
Az inzulin és inzulinrezisztencia

Az inzulin két polipeptid láncból felépülő hormon (1. ábra). Alapvető fiziológiai szerepe a sejtek glükóz felvételének biztosítása, ami a szövetek számára az energiatermeléshez szükséges alapanyag-ellátást jelenti, illetve ennek eredményeként kialakuló normál vércukorszint (euglikémia) fenntartása. Inzulin hiányában hiperglikémia, inzulin túlsúly esetén hipoglikémia alakul ki. Az inzulin vércukorszint csökkentő hatásában többféle tényező játszik szerepet. Facilitálja az izom-és zsírszövet cukor felvételét, illetve a máj glikogén szintézisét. Gátolja a zsírszövetben a hormon-szenzitív lipáz enzim aktivitását. Ezáltal csökken a zsírbontás, gátlódik a zsírmobilizáció, fokozódik a zsírsav szintézis és nő a triglicerid raktározása. Gátolja a glükoneogenezist a máj-és izomsejtekben. Inzulin

hiányában nő a májban a protein-glükóz átalakulás. Ugyanakkor elősegíti az aminosavak sejtbe történő transzportját és ezáltal a proteinképződést. Fokozza a máj, valamint az izom- és zsírsejtek K^+ és foszfátfelvételét, és a sejten belüli akkumulációját. Az inzulin termelődés csökkenése vagy hiánya, esetleg a sejtek inzulinérzékenységének csökkenése a diabetes mellitus tüneteit hozza létre, tehát magas vércukorszintet, cukorvizelést, ketontest képződést, ketoacidózist, acetonuriát, felborult zsír- és fehérje- anyagcserét, folyadék- és elektrolit vesztést, amely komatózus állapothoz és halálhoz is vezethet.



1. ábra Az inzulin molekula szerkezete.



Nature Reviews | Drug Discovery

2. ábra. Az inzulin receptor szerkezete (De Meyts és Whittaker 2002)

Az inzulin receptor (2. ábra) a sejtmembrán felületén elhelyezkedő glikoprotein. Két A és két B alegységből áll, az alegységeket diszulfid hidak kötik össze. Tirozin kináz aktivitással rendelkezik. A receptorok 10%-ának elfoglalása már maximális inzulinhatást eredményez. Az inzulin kötődésének következtében a receptor autofoszforilációja megy végbe, majd a hormon-receptor komplex aggregálódik és internalizálódik a sejt belsejébe (Carpentier és mtsai 1985). Az inzulin kötődés hatására elsősorban a zsír- és izomszövetben nő a glükóz beáramlás, GLUT-1 és GLUT-4 transzportereken keresztül. Az inzulin receptorok száma és az inzulin mennyisége között szoros összefüggés van, egyes feltételezések szerint az inzulinkoncentráció csökkenése a receptorok számát növeli (upreguláció), az inzulinkoncentráció növekedése pedig csökkenti (downreguláció). (Okabayashi és mtsai 1989) Többek között ez utóbbi jelenség is szerepet játszhat az idős, elhízott, T2DM-es megbetegedések kialakulásában, amikor a bőséges táplálékfelvétel miatt inzulin hiperszekréció, majd inzulin rezisztencia jön létre, azaz olyan állapot, amikor a normális mennyiségű inzulin szubnormális választ vált ki. Az inzulinrezisztenciának nemcsak a 2-es

típusú diabetes patogenezisében, hanem a szövődmények kialakulásában is jelentős szerepe van. A szekunder hiperinzulinémia felelős lehet a hiperlipidémia, sőt a hiperglikémia fenntartásáért, esetleg a hipertóniáért és az endotél sejteket érintő változásokért.

Az obezitás

Az elhízás olyan kórállapot, amelynek során a túlzott zsírraktározás oly mértékű, hogy az káros lehet az egészségre, a várható élettartam csökkenéséhez, és számos egészségi problémához vezethet (Haslam és James 2005). Az elhízás krónikus és recidiváló betegség, mely tartós kezelést igényel, elsősorban az állapotot kísérő betegségekkel kapcsolatban. Az elhízás következtében számos betegség - különösen a szív- és érrendszeri betegségek, más néven kardiovaszkuláris betegségek (KVB) (Calle és Thun 2004), a T2DM (Poirier és mtsai 2006), az obstruktív alvási apnoe, egyes rákbetegségek (Kahn és mtsai 2006), a csont-ízületi gyulladás és az asztma- kialakulásának valószínűsége megnő (Poulain és mtsai 2006). Elhízottnak tekintjük azt a személyt, akinek testtömegindexe (rövidítve TTI, angolul body mass index, BMI) 30 kg/m^2 felett van (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en). A testtömegindex a kilogrammban megállapított testtömeg és a méterben mért testmagasság négyzetének hányadosa. Az elhízás hátterében az anyagcsere folyamatok olyan genetikai, központi idegrendszeri vagy endokrin és környezeti hatásokra létrejövő zavara áll, amely az energiaháztartás egyensúlyának módosulását okozza. Ez a folyamat a táplálékfelvétel növekedésében és/vagy az energia leadás csökkenésében nyilvánul meg, majd fokozott zsírraktározáshoz vezet. Az elhízást leggyakrabban több tényező együttesen okozza: a túlzott energia-fogyasztás, a testmozgás hiánya és genetikai hajlam, habár néhány esetben elsődlegesen gének, endokrin rendellenességek, gyógyszerek vagy pszichiátriai betegségek a kiváltó okok (Bleich és mtsai 2008).

A metabolikus szindróma

A magas vérnyomás (hipertónia), a magas húgysavszint (hiperurikémia) és a magas vércukor szint (hiperglikémia) gyakori együttes előfordulását Kylin már 1923-ban leírta. A metabolikus szindróma történetének fordulópontja az 1988-as év volt, amikor Reaven a korábban is ismert, de egymástól függetlennek tartott kardiovaszkuláris kockázati tényezőket megpróbálta oki egységbe tömöríteni. Az általa X-szindrómának nevezett tünetegyüttes

(glükóz-intolerancia, diszlipidémia, hipertónia) háttérében feltételezése szerint inzulinrezisztencia és ennek következtében létrejövő hiperinzulinémia áll (Nadas és mtsai 2007). Az ezredfordulóra az X-szindróma helyett a metabolikus szindróma elnevezés vált elfogadottá, utalva annak szemléletének és definíciójának folyamatos változására. Az abdominális obezitást 1989-ben Kaplan tette a tünet együttes részévé és a „halálos négyes” elnevezést adta (Kaplan 1989). Az inzulinrezisztencia metabolikus szindrómában betöltött szerepe mind a mai napig megmaradt. Az inzulinhatás gyengülésének pontos mechanizmusa nem ismert, de feltételezhető, hogy a sejtfelszíni inzulin receptorok és/vagy az intracelluláris jelátviteli rendszer működésének zavara áll a háttérben. Az inzulinérzékenység csökkenése tapasztalható elsősorban a vázizomzatban, a zsírszövetben és a májban, melynek következménye a glükóz-intolerancia, a diszlipidémia és a fokozott szabadzsírsav (free fatty acid, FFA) kiáramlás. Ugyanakkor azt is igazolták több tanulmányban, hogy a metabolikus szindrómás betegeknek csak mintegy 50-70%-a inzulinrezisztens, és sok esetben a kimutatható inzulinrezisztencia ellenére sem fedezhető fel a metabolikus szindróma klinikai kórképe.

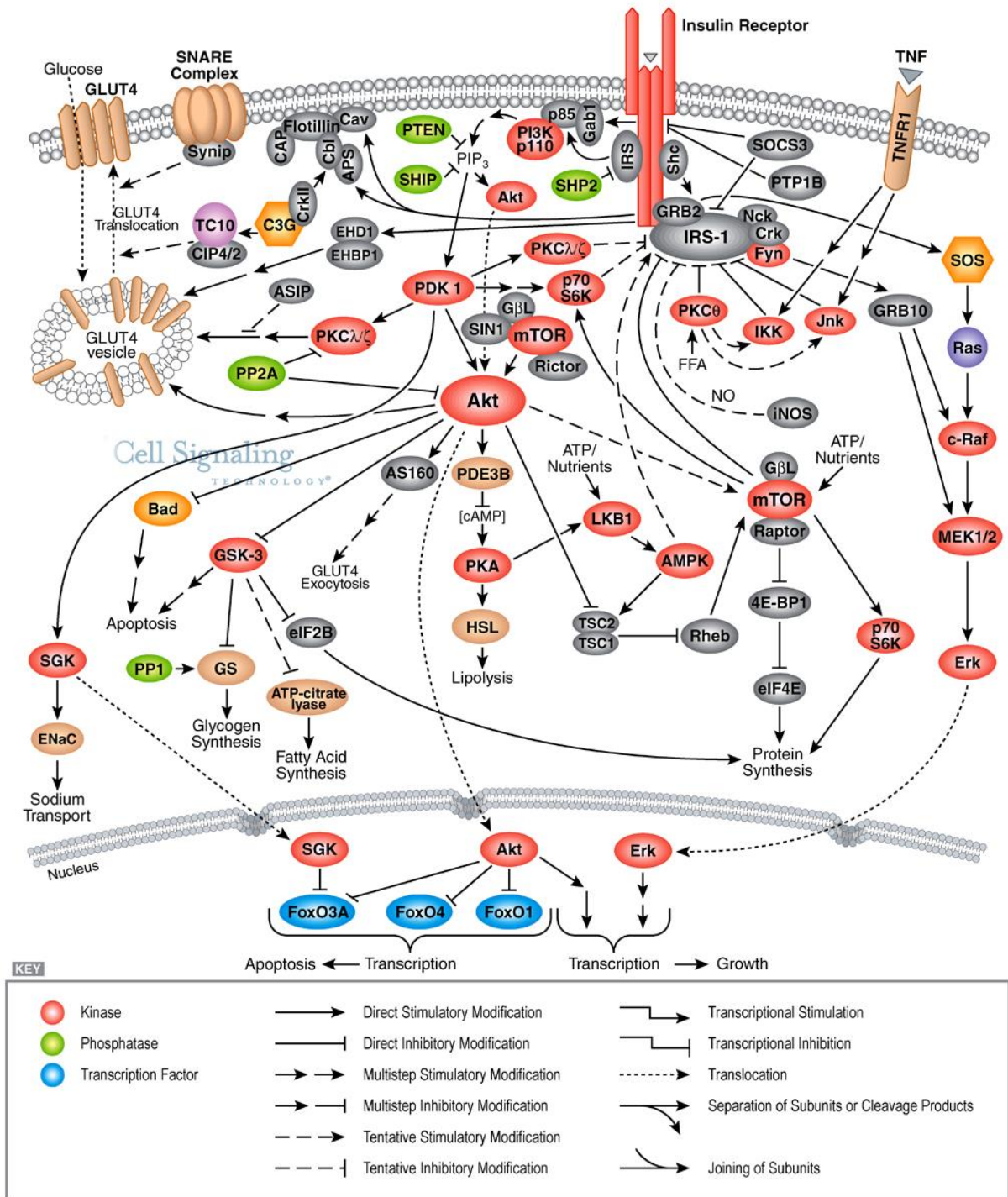
Kapcsolat az elhízás, az inzulinrezisztencia és a 2-es típusú diabetes között

Obezitásban gyakoribb az inzulinrezisztencia és végül a 2-es típusú diabetes kialakulása. Ezekhez gyakran társulnak még olyan eltérések is, mint diszlipidémia vagy hipertónia. E tünetegyüttes fokozott makrovaszkuláris rizikóhoz vezet amit metabolikus szindrómának nevezünk. E rizikófaktorok kiindulópontja a haskőrfogattal jellemezhető centrális obezitás. A 2-es típusú diabetes kialakulásának esélye a testtömeg index-szel arányos, de még szorosabb az összefüggés a haskőrfogattal és a viscerális zsírszövet mennyiségével. A megnövekedett mennyiségű zsírszövetből a keringésbe jutnak hormonok, pl. gyulladáskeltő ún. proinflammatorikus citokinek, szabad zsírsavak, melyek aztán az inzulinrezisztencia kialakulását segítik elő. Amennyiben az inzulin rezisztenciához a β -sejtek diszfunkciója is társul, vagyis a szigetsejtek nem képesek olyan mennyiségű inzulint szekretálni, mellyel a vércukorszintet fiziológiás tartományban tudnák tartani, manifesztálódik a T2DM. A β -sejt diszfunkció kialakulása alapján véve genetikai tényezőktől függ, de életmódbeli tényezőkkel befolyásolható, tehát egyfajta környezet-gén interakció. A zsírszövetben termelődő faktorok egy részét az adipociták termelik, más részüket viszont a zsírszöveti makrofágok. Ezek száma arányosan nő a BMI-vel, az adipociták

méretével és az inzulin rezisztencia mértékével. A makrofágok aktiválódása és a megváltozott citokin termelés a szervezet válaszreakciója a környezeti károsító tényezőkkel szemben, ami ez esetben nem más, mint a túlzott kalória- és tápanyagbevitel. Ez a válasz kezdetben a szervezet integritásának megőrzése céljából alakul ki, ha azonban ez a reakció túlzott mértékű és tartósan fennáll, akkor képes már önmagát a szervezetet is károsítani. A Toll-like receptoroknak (TLRs) fontos szerepük van a krónikus gyulladásos folyamatok patomechanizmusában. Obezitásban megfigyelhető e receptorok expressziójának fokozódása az adipociták felszínén, melyet a megemelkedett FFA szint vált ki. Ez a receptor NfκB-t aktivál, melyen keresztül számos olyan citokin szabadul föl melyek csökkentik az inzulinérzékenységet. A kiváltott immunválasz részben genetikailag meghatározott. Akiknél a tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) fokozott transzkripciója figyelhető meg, azoknál nem csak az immunválasz fokozottabb, de a 2-es típusú diabetes kialakulásának a valószínűsége is nagyobb. Azonban az inzulinrezisztencia kialakulásának szempontjából nem mindegy a zsírszövet elhelyezkedése sem. A viscerális elhízás esetén a zsír a szervekre (máj, hasnyálmirigy, vázizom) rakódik le, így károsíthatja annak működését, ezzel hozzájárul a perifériás inzulinrezisztencia kialakulásához, illetve a hasnyálmirigy esetében a β-sejtek inzulin szekréciójának csökkenéséhez, így a manifest diabétesz kialakulásához. Túlzott energia-bevitel esetén nem a zsírsejtek száma nő (hiperplázia), hanem a méretük (hipertrófia), és ezáltal a funkciójuk is módosul. Egyrészt a megváltozott citokin termelés hozzájárul a centrális elhízáskor megfigyelhető metabolikus eltérések megjelenéséhez, másrészt pedig a megnövekedett zsírsejt rezisztenssé válhat az inzulin antilipolitikus hatására, melynek következtében megnő a FFA kiáramlás a sejtekből, mely megnövekedett plazma szintje összefügg az obezitással és az inzulinrezisztenciával. A szabad zsírsavak gátolják a sejtek inzulin-mediált glükóz felvételét, a glikogén szintézist és a glikolízist, míg fokozzák a máj glikogén lebontását, és ezáltal glükóz keringésbe történő kibocsájtását. Aktiválják a TLR4 receptorokat, melyek a SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling-3) protein aktiváción keresztül gátolhatják az inzulin receptor jelátvitelét. Ezen kívül a felszaporodott intracelluláris metabolitok serin/threonin kinázokon keresztül serkentik IRS-1 és-2 foszforilációját, így azok aktivitása lecsökken. Ha az IRS-2 aktiváció nem elégséges, az β-sejt diszfunkcióhoz vezet. A β-sejt rezerv kialakulásában szerepet játszhat még a ceramid is, melynek képződését elősegíti a magas telített zsírsavszint és TNF-α. Azonkívül, hogy a ceramid részt vesz az inzulinrezisztencia kialakulásában, gátolja a GLUT-4 transzlokációt, az inzulin génjének átírását, és elősegíti a β-sejtek apoptózisát.

Obezitásban megváltozik számos zsírszöveti hormon illetve citokin aránya. A zsírszövet mennyiségének növekedésével egyes faktorok mennyisége fokozódik (pl. TNF- α , leptin, rezisztin, IL-6), míg másoké csökken (pl. adiponektin). A klinikumban e kórfolyamat megállapításának a legjobb markere a C-reaktív protein (CRP) szintjének mérése, ami nem más, mint egy gyulladási marker a szervezetben. Több tanulmány is beszámolt arról, hogy a T2DM joggal tekinthető gyulladási betegségnek, hiszen az immunrendszer több komponensében változások figyelhetők meg. A legjelentősebb változások a zsírszövetet, a májat, a hasnyálmirigy szigetsejtjeit, az érrendszert és a leukocitákat érintik. Megváltozik a citokin és kemokin termelés, a fehérvérsejt szám és azok aktivitási állapota, fokozódnak az apoptotikus folyamatok és a fibrózis. Mindezek azt sugallják, hogy a gyulladási folyamatok részt vesznek a T2DM patogenezisében (Donath és Shoelson 2011). Ezt erősíti még az a megfigyelés, hogy az inzulinérzékenység javul egyes gyulladáscsökkentő gyógyszerek hatására (Yuan és mtsai 2001).

Az inzulinrezisztencia molekuláris mechanizmusa



3. ábra. Az inzulin intracelluláris jelátviteli mechanizmusa Forrás: www.cellsignet.com

Az inzulin hatására létrejövő receptor aktiváció első lépése a β alegység autofoszforylációja. Az ezt követő konformáció változást további molekulák tirozin foszforylációja követi, melynek szubsztrátjai az inzulin receptor szubsztrátok IRS-1,-2,-3,-4, Shc, Gab-1, Cbl illetve STAT5 fehérjék (3. ábra). Ezek dokkoló helyeket tartalmaznak olyan molekulák számára, melyek SH2 csoportot tartalmaznak. Az IRS fehérjék típusainak előfordulása szövetenként eltérő. IRS-1 a vázizomban található, míg az IRS-2 a β sejtekben, ahol fontos szerepet töltenek be a β sejt működésében, osztódási folyamataiban. Inzulinrezisztencia állapotában azonban az aktivációjuk nem tökéletes, így hozzájárulnak a β sejtek funkciózavarának kialakulásához és a T2DM kifejlődéséhez. IRS-2 ezen kívül megtalálható még a májban is.

A phosphatidylinositol triphosphate-hydroxyl kinase (PI3K) egy heterodimer fehérje, mely aktivációjának gátlása hozzájárul az inzulinrezisztencia kialakulásához. Ez az enzim phosphatidylinositolt (PI) foszforylál, mely serin/threonin kinázokat és Akt-ot aktivál. Ez utóbbi fehérje aktiválódása szabályozza a GLUT-4 glukóztanszportert és a protein kináz C (PKC)-t, melyek az inzulin metabolikus hatásának közvetítésében játszanak szerepet. A GLUT-4 transzporteren keresztül történik a glükóz inzulin-függő felvétele a vázizom és a zsírszövet sejtjeibe, ahol az átalakulást és raktározást szabályozó enzimek működése is az inzulin hatásának következménye. A jelátvitelt gátló proteinek közül a protein tirozin foszfatáz 1B (PTP1B), SOCS-1 és -3 is jelen van a sejtekben, expressziójukat a TNF- α és más gyulladási citokinek fokozni képesek.

A rezisztin zsírszöveti hormon mennyisége egyenesen arányos az inzulinrezisztencia mértékével, de annak patomechanizmusában betöltött szerepe még nem tisztázott (Meier és Gressner 2004). Ugyanakkor a TNF- α szerepet játszik mind az inzulin receptor jelátvitelének károsodásában mind az inzulin rezisztencia patomechanizmusában is (Hotamisligil és mtsai 1995). Elősegíti IRS-2 szerin foszforylációját, mely gátolja PI3K kapcsolódását az IRS-hez. Emelkedő szérumszintje korrelál PTP1B és SOCS-3 fehérjék expressziójának fokozódásával a vázizom és zsírszövet sejtjeiben. A TNF- α inzulinérzékenység csökkentő hatása SOCS-3 expressziójának fokozásán keresztül azért is jelentős, mert tartós éhezés során hasonló mechanizmussal alakul ki inzulin rezisztencia, mely a hipoglikémia kivédésére szolgál az éhezési periódusban (Samuel és Shulman 2012). A TNF receptor aktiváció szfingomielidáz aktivációhoz is vezet, a keletkező ceramid több ponton befolyásolja az inzulin receptor jelátvitelét: IRS-1, PI3K és Akt fehérjék aktivitását csökkenti.

A rezisztinell ellentétes a szintén zsírszöveti eredetű adiponektin és inzulinrezisztencia közötti kapcsolat. Az adiponektin plazmaszintje ugyanis fordítottan arányos az inzulinrezisztencia mértékével, vagyis a magas adiponektin szint javítja az inzulin receptor jelátvitelét illetve a májban és vázizomzatban MAPK és mTOR aktiváción keresztül serkenti IRS-1 foszforilációját. A perifériás inzulinrezisztencia kialakulásában fontos szerepe van a zsírszöveten kívül még a májnak és a vázizomzatnak is. A zsírdús étrend hatására a májban nő az NFκB aktivációja, ami további gyulladási citokinek IL-6, TNF-α expressziójának fokozódásához vezet.

A zsírszöveti peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) rendszer szerepe

A zsírszövet többféle sejtől épül föl: legnagyobb számban az adipociták, ezen kívül fibroblasztok, makrofágok, endotél sejtek és preadipociták alkotják. Amennyiben a szervezet több energiát vesz fel, mint amennyit elhasznál, akkor a feleslegbe kerülő energiatöbblet zsír formájában a zsírszövetben elraktározódik. Ilyenkor először jelentősebb a zsírsejtek méretének, mintsem számának növekedése. Az ún. hipertrofizált zsírsejteknek megváltozik a szekréciós tevékenysége, továbbá fokozódik a preadipociták adipocitákká történő átalakulása (adipogenezis), mely folyamat során válnak képessé inzulin-függő glükóz felvételre, trigliceridek tárolására és citokinek expressziójára. Ezen érési folyamatot főként a C/EBP és PPAR fehérje család irányítja. Először a C/EBP-β, majd -δ termelődése kezdődik meg, melynek hatására PPARγ expresszálódik. A táplálékunkból bekerülő zsír kémiai tulajdonságai meghatározzák e fehérjék indukcióját. A többszörösen telítetlen zsírsavak PPARγ ligandként viselkednek, így képesek elindítani a preadipociták differenciációját és az inzulinérzékenységért felelős gének expresszióját (Sessler és Ntambi 1998). A gyulladási citokinek – IL-1, IL-6, TNF-α – viszont gátolni tudják ezt a folyamatot, hatásukra diszfunkcionális zsírszövet jön létre, amely ektópiás zsírlerakódáshoz és inzulinrezisztencia kialakulásához vezet.

A PPAR receptorok a magreceptor fehérjék családjába tartoznak. Szerepük sokféle, részt vesznek a sejt differenciációjában, lipid-, szénhidrát- és fehérje anyagcseréjében és tumorok kialakulásában. Heterodimerként fordul elő retinoid X receptorhoz (RXR) kapcsolódva. A sejtmagban gének promóter régióiban található speciális szekvenciákhoz PPREs (peroxisome proliferator hormone response elements) kapcsolódik és indukálja a

megfelelő génszakaszok átíródását. A PPAR α inkább a vázizomban és a barna zsírszövetben található, míg a PPAR γ többnyire a fehér zsírszövetben expresszálódik, ahol irányítja az adipogenezist, a triglicerid-raktározást, az inzulin receptor jelátvitelét, a GLUT-4 expresszióját. Befolyásolja az inzulinrezisztenciát is, mert elősegíti a kisméretű adipociták fejlődését és gátolja a nagyméretű rezisztens zsírsejtek kialakulását, melyek sok FFA-t bocsájtanak ki, hozzájárulva ezzel a perifériás inzulin érzékenység csökkenéséhez.

A táplálkozás szabályozását leíró modellek

Lipostatikus modell (1953): a zsírraktárak megnövekedése hatására a zsírszövet szignálokat bocsát ki, melyek gátolják a hipotalamikus szignálok táplálékfelvételt fokozó hatását. Az elmélet megmagyarázza a táplálékfelvétel hosszú távú szabályozását, de nem ad választ a táplálékfelvétel mennyiségének szabályozására (Kennedy 1953).

Jóllakottság faktorok szerepe (1973): A táplálékfelvétel hatására a gyomor-bél traktusból felszabaduló hormonok gátolják a táplálékfelvételt. Ez a modell kizárólag a táplálékfelvétel rövidtávú szabályozását magyarázza (Gibbs és mtsai 1973).

A perifériás étvágy szabályozás

Zsírszöveti szignálok

Inzulin

Az elhízás kialakulásának vizsgálatakor a központi idegrendszeri szabályozást, az adaptív termogenezis szerepét és a zsírszövet endokrin reguláló működését kell figyelembe venni. A táplálékfelvétel folyamata szigorúan szabályozott. Afferenciájában mind humorális, mind neurogén komponensek szerepet játszanak. A humorális tényezők közül az inzulin és a leptin a legjelentősebb. Mindkét hormon csökkenti a táplálékfelvételt, szekréciójuk szoros kapcsolatban áll a szervezet energia homeosztázisával, a test zsírraktáraival. Az inzulin jelátvitel a központi idegrendszer táplálékfelvételt szabályzó területein részben az IRS-1 foszforiláció, részben a *tub* gén proteinjének tirozin foszforilációján keresztül meg végbe. Ez utóbbi jelátviteli út vehet részt az étvágy szabályozó fehérjék szabályozásában. Ennek bizonyítéka az, hogy mutációja az ún. *tubby* (*tub/tub*)

egerekben elhízáshoz és diabeteshez vezet (Maffei és mtsai 1995). Humán vizsgálatok is igazolták, hogy a *tub* polimorfizmusok befolyásolják a testösszetételt és a táplálékfelvételt, így feltehetően embereknél is szerepe van az étvágy szabályozásban (van Vliet-Ostapchouk és mtsai 2008). Az inzulin a hipotalamuszban gátolja a táplálékfelvételt, ugyanakkor pedig képes aktiválni a mezolimbikus dopaminerg hálózatokat. Ez a pályarendszer a felelős pl. a finom étel kiváltotta jutalmazási és megerősítési reakciókért. Laboratóriumi patkányokat, ha a megszokottnál ízletesebb táplálékkal etetik, az állatok kb. 50%-kal többet eszik, mint a normál táplálékból, és elhízik. Ez a jelenség nagyon hasonlít az emberi elhízásra (Schwartz és mtsai 2000). Ez a folyamat fontos lehet a nyugati társadalmakban az obezitás és inzulinrezisztencia robbanásszerű terjedésében.

Leptin

A leptin is a zsírszövet által termelt hormon, a vérben keringő szintje a zsírszövet mennyiségével korrelál. Termelődését elsősorban az zsírraktárak helyzete határozza meg, de a nemek között is van különbség, nőkben magasabb a szintje, ami magyarázható azzal is, hogy termelődését az ösztrogének serkentik, az androgének gátolják. Emellett megfigyelhető cirkadián ritmus is. A leptin plazmakoncentrációja egyenes arányban van nemcsak a teljes zsírmennyiséggel, hanem a zsírsejtek méretével és triglicerid szintjével is (Hamilton és mtsai 1995, Maffei és mtsai 1995). A zsírsejtekben a leptin termelődését a glükóznak a hexózamin úton végbemenő metabolizmusa során képződő termékei indítják el (Wang és mtsai 1998). Bár a leptinszint csökken éhezés hatására és megemelkedik étkezés után, mégsem tekinthető a táplálkozással kapcsolt „jóllakottsági faktornak”, inkább az energiaegyensúly indikátorának (Ahima és Flier 2000). A leptin szekréció átmenetileg függetlenné válhat a testzsír mennyiségétől, így táplálékmegevonás hatására gyorsabban tud a leptinszint lecsökkenni, mint a zsír tömege.

Étvágy szabályozó hatásának jelátviteli mechanizmusában az Ob-Rb (receptor) játszik vezető szerepet. Ez a receptor az afferens impulzusokat részben a receptor intracelluláris részéhez kötődő JAK-dokkoló fehérjén keresztül, részben pedig a sejtek ATP-érzékeny káliumcsatornáinak aktiválása (nyitása) útján közvetíti. A leptin intracelluláris jelátvitelénél során aktiválódik a citokin jelátvitelt gátló SOCS-3 protein is, amely a leptinrezisztencia létrejöttének egyik feltételezett résztvevője. A leptin központi idegrendszeri szabályzásban betöltött szerepe az inzulinnál lényegesebbnek tűnik a jelenlegi kutatások alapján. 1-es típusú

diabetes mellitusban a fokozódó étvágy és táplálékfelvétel mellett a testsúly és a plazma leptin szint alacsony marad, míg kisállat kísérletekben a leptin infúzió megszüntette a diabeteses hiperfágiát. (Schwartz és mtsai 2000) Elhízásban, illetve az inzulinrezisztencia szindróma más formáiban a perifériás leptinszint magas (Maffei és mtsai 1995), a táplálékfelvétel gátlása mégsem megfelelő. Ez magyarázható a leptin vér-agy gáton történő bejutásának a csökkenésével, illetve leptinrezisztencia kialakulásával, melynek mechanizmusa még nem tisztázott. A legújabb kutatások szerint a trigliceridek magas szintje megakadályozza a leptin áthaladását a vér-agy gáton, ami annyit jelent, hogy a magas trigliceridszinttel élők (inzulin rezisztencia) esetében nem érvényesül a leptinnek az étvágycsökkentő hatása, és az érintettek akkor is éhséget éreznek, amikor egyébként jóllakottak.

A leptin- és az inzulinszint arányos a testzsír mennyiségével, de elválasztásukat befolyásolja a táplálék összetétele is. A zsír és fruktóz például nem stimulálja e szignálok expresszióját, így a magas zsír- vagy fruktóz tartalmú étrend (mely jellemző a modern táplálkozásra), nem növeli kellően a leptin és az inzulinszintet, és ez könnyen hiperfágiához és elhízáshoz vezethet (Jequier 2002).

Adiponektin

A zsírsejtek által termelt adiponektin csökkenti az inzulinnal szembeni rezisztenciát és csökkenti a vércukorszintet anélkül, hogy az étvágyat befolyásolná. Ezek a perifériás hatások már régebb óta ismertek. Azonban nemrég kiderült, hogy az adiponektinnek centrális étvágy és energia-leadást befolyásoló szerepe is van. Hatása a hipotalamuszban a leptinével épp ellentétes. Az adiponektin az AMPK (AMP aktivált kináz) útján képes fokozni a táplálékfelvételt és csökkenteni az energia-leadást. Viscerális obezításban gyakran megfigyelhető az adiponektin szint csökkenése, ez főként a vér-agy gáton át nem jutó ún. multimer forma csökkenését jelenti. Az adiponektin koncentrációja a központi idegrendszerben nem csökken jelentősen, így annak orexigén hatása megmaradhat, (Kadowaki és mtsai 2008) viszont csökkent perifériás mennyisége az inzulinérzékenység romlásához vezet.

A gasztrointesztinális (GI) étvágy szabályzó rendszer

Éhség szignál

Ghrelin

A ghrelint 1999-ben fedezték fel (Kojima és mtsai 1999). Legnagyobb mennyiségben a gyomor nyálkahártyájának sejtjei termelik, de termelődik még a hasnyálmirigyben, vesében, májban, hipotalamuszban is. Fokozza a növekedési hormon szekrécióját, ugyanis természetes ligandja a growth hormone secretagogue receptor-nak (GHS-R). Orexigén hatást közvetít a hipotalamusz felé, ezáltal növeli a táplálékfelvételt, de ugyanakkor csökkenti az energia leadást. Ez a hormon összeköti a növekedés szabályzást az energiaszabályozással. Meghatározza a táplálék preferenciáját is, eltolja azt a zsírban dúsabb ételek irányába. Emellett elősegíti az energia tárolását is. A ghrelin szintje étkezés előtt a legmagasabb, majd étkezést követően lecsökken, így szerepe lehet a táplálkozás megkezdésében illetve befejezésében egyaránt. Az éhomi vérben keringő mennyisége negatívan korrelál a testzsír mennyiségével és a BMI-vel. Obezitásban az étkezés hatására bekövetkező ghrelin szint csökkenés kevésbé kifejezett, és ez hozzájárulhat a fokozott energia-felvételhez. Hatása és elválasztásának cirkadián ritmusa is épp ellentétes a leptinével, de mindkét hormon a NPY-on keresztül fejti ki étvágy szabályzó hatását. A ghrelin tehát részt vesz a szénhidrát- és zsírsanyagcsere szabályozásában és valószínűleg közvetlenül is befolyásolja az inzulinszekréciót, ennek mechanizmusa még nem pontosan tisztázott (Korbonits és mtsai 2004).

Jóllakottsági szignálok

A gyomor- és béltraktusból mechanikai vagy kémiai inger hatására szabadulnak föl, és szerepet játszanak az étkezések mennyiségének valamint időtartamának meghatározásában. Ezek a hormonok a peptid tyrosine tyrosine (PYY), a cholecystokinin (CCK), a pancreas polypeptid (PP), az amylin, a glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), a glucagon-like peptide 1 (GLP-1) és az oxyntomodulin. Elválasztásuk különböző tápanyagok hatására történik, szekréciójuk étkezés után nő, éhezéskor lecsökken. A gyomor- és bélfal feszülésének ingere a nervus vagus afferens rostjain keresztül érkezik a nyúltvelőbe, ahol egyébként ezeknek a hormonoknak a receptorai is megtalálhatóak. A nucleus tractus solitarii (NTS) neuronjait az inzulin és leptin hormonok is stimulálják, fokozva ezzel a jóllakottság

érzetét. A PYY anorexigén hormon, hatása hasonló a hasnyálmirigyben termelődő PP-hez. Az amylin az inzulinnal együtt szekretálódik, önmagában éhségcsökkentő hatása van. Hasonlóan étvágy szupresszálo hatását fedezték fel az oxyntomodulinnak, jelenleg is vizsgálatok folynak a testsúly csökkentő kezelésekből történő alkalmazhatóságáról. A CCK hormon a vékonybélben termelődik. Szabályozza az epehólyag működését, de a táplálkozás szabályzásban betöltött szerepét csak később fedezték föl. Étkezés után szintje megemelkedik és a n. vaguson keresztül csökkenti a további táplálékfelvételt. Az inzulintrop inkretinek két fontos képviselője a GIP és a GLP-1. Ez utóbbi centrális étvágycsökkentő hatással is bíró fontos inkretin, fokozza az inzulin szekrécióját. Analógjai, és a lebontását gátló szerek (DPP-4 inhibitorok) szerepet kaptak a 2-es típusú diabetes kezelésében.

Az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus

Az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus (meal-induced insulin sensitizing mechanism), továbbiakban MIS egy kanadai munkacsoport (Lautt és mtsai) munkájának eredményeként került felfedezésre. Az 1990-es évek közepén írták le, melynek lényege, hogy az étkezést követően a szervezet inzulinérzékenysége átmenetileg fokozódik, majd két étkezés között fokozatosan újra lecsökken. Úgy találták, hogy a n. vagus plexus hepaticus anteriorban (PHA) futó paraszimpatikus idegeinek aktiválódása a posztprandiálisan emelkedett inzulinszint következtében a májból egy endogén inzulinérzékenyítő anyag, úgynevezett „Hepatic Insulin Sensitizing Substance” vagy röviden HISS felszabadulásához vezet. Lautt és mtsai felfedezése szerint az inzulinszint posztprandiális emelkedése aktiválja a májhoz futó n. vagus PHA ágát, mely aktiváció eredményeként a májból felszabadul egy, ez idáig kémiaiilag nem azonosított vegyület, a HISS, mely hatására a perifériás szövetek inzulin iránti érzékenysége fokozódik. Úgy találták, hogy a reflex acetilkolin által mediált, és szerepet játszik a májból felszabaduló nitrogén monoxid (NO) is a folyamatban (Sadri és mtsai 1997). Az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus farmakológiai (muszkarin receptor gátlás atropinnal, az NO szintáz ezim gátlása /NOS/ L-NAME-val), vagy sebészi átmetszés útján történő felfüggesztése egyaránt inzulinrezisztenciához vezet (Sadri és Lautt 1998, Xie és Lautt 1994, 1995, 1996). Mivel a denerváció okozta inzulinrezisztencia visszaállítható intravénásan adott acetilkolinnal, vagy az NO donor SIN-1 adásával, így azt a következtetést vonták le, hogy a reflex muszkarin receptoron keresztül mediált. Összehasonlítva az éheztetett állapotban kapott inzulinérzékenység meghatározás eredményeit a posztprandiális állapotban

kapottakkal, megállapították, hogy ez a mechanizmus felelős az étkezés utáni állapotban az inzulin vércukor eltávolító hatásának mintegy 55%-áért. Elsődleges szerepe van az étkezés utáni, izomban történő glükóz tárolásában, glikogén formában.

Intézetünk munkacsoportja ezen endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus vizsgálata során megerősítette a májból felszabaduló NO szerepét a folyamatban (Porszasz és mtsai 2002, Porszasz és mtsai 2003). Kimutatták továbbá, hogy a folyamatban lévő NO idegi eredetű, hiszen nem csak a nem szelektív NOS gátló L-NAME-val, hanem az idegi eredetű NOS gátló 7-nitronidazollal (7-NI) is blokkolható az inzulinérzékenység posztprandiális fokozódása. Porszasz és munkatársai igazolták azt is, hogy a májhoz futó PHA-ban lévő kapszaicin-érzékeny szenzoros idegrostok azok, amelyek a MIS-mechanizmusban központi szerepet játszanak, hiszen a PHA lokális kapszaicin kezelése úgynevezett neurogén inzulinrezisztenciát hoz létre a kísérleti állatokban (Porszasz és mtsai 2002). További vizsgálataink feltárták, hogy a posztprandiális inzulinérzékenység fokozódásban nem az átmeneti hiperinzulinémiának (Peitl és mtsai 2009), sokkal inkább a táplálkozás hatására felszabaduló gasztrointesztinális hormonoknak, azokon belül is legalább részben a kolecisztokinin (CCK)-nek van szerepe a posztprandiális endogén inzulinérzékenyítő mechanizmusban (Peitl és Szilvassy 2007).

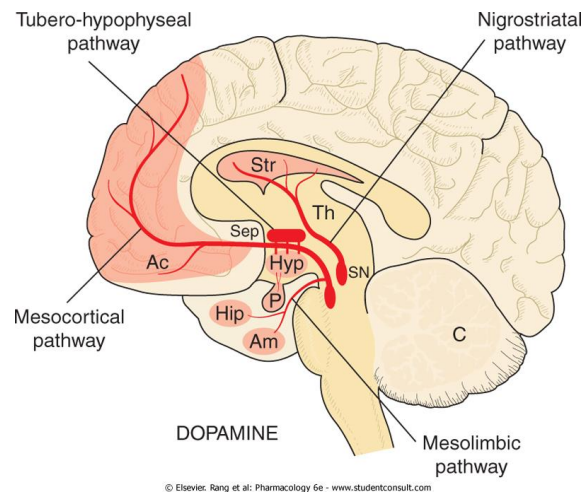
A MIS klinikai jelentőségét kiemelik azok a megfigyelések, hogy a MIS mechanizmus tartós károsodása nyúlban olyan állapotot eredményez, mely hasonlít a humán 2-es típusú diabéteszhez (Herczeg és mtsai 2007) illetve ennek gyógyszeres aktivációjával fokozható ez az inzulin érzékenyítő mechanizmus kísérleti diabéteszben (Lautt és mtsai 2011, Peitl és mtsai 2006). Ezek a megállapítások azt sugallják, hogy a MIS egy potenciális farmakológiai célpontként szolgálhat, melynek befolyásolásával az inzulinrezisztens betegek inzulinérzékenységét lehetne fokozni.

Gyógyszerek által kiváltott inzulin rezisztencia és diabétesz

Az atípusos antipszichotikum kezelés

Az atípusos antipszichotikumok (AAP) különböző pszichotikus állapotok, főleg skizofrénia kezelésére alkalmas gyógyszerek. A „második generációs szerek”-nek is nevezett gyógyszer-csoport fontosabb képviselői az olanzapin és clozapin, amelyeket azért fejlesztettek ki, mert a korábban forgalomban lévő antipszichotikus gyógyszerek (első generációs szerek

vagy „típusos” antipszichotikumok) olyan kedvezőtlen mellékhatás spektrummal rendelkeztek (extrapiramidális mozgáskoordinációs zavar), mely jelentősen rontotta a beteg compliance-ét, így a terápia eredményét. Ilyen „típusos” szer a haloperidol, mely egy nagy potenciálú neuroleptikum, centrális dopamin receptor antagonist. Igen hatásos az érzécsalódások (hallucinációk) kezelésében. Főként mezokortikális, mezolimbikus területeken fejti ki hatását, de minden olyan területen hat, ahol dopamin receptorok fordulnak elő (4. ábra). A dopamin 2-es receptor (D₂) gátló tulajdonságuk megmagyarázza nem csak az antipszichotikus hatékonyságukat, hanem a bazális ganglionokban kifejtett gátlásuk révén az extrapiramidális mellékhatásaikat (dystonia, akathisia, parkinsonizmus) is.



4. ábra. A dopaminerg pályák a központi idegrendszerben. Forrás: Rang & Dale Pharmacology.

A clozapine már a második generációs szerek közé sorolható. 1971-ben vezették be, de agranulocitózis kialakulásának veszélye miatt, már csak terápiarezisztens és a többnyire a skizofrénia negatív tüneteit mutató betegeknél alkalmazzák. Pedig a skizofrénia kezelésében egyedülállóan hatékony szernek bizonyul, mert nem csak annak pozitív, hanem a negatív tüneteit is képes kedvező irányba befolyásolni. Megpróbálták hasonló vegyületeket keresni, és az intenzív kutatások eredményeképpen az 1990-es években több új a skizofrénia kezelésére alkalmas gyógyszer is piacra került, mint amilyen az olanzapin, risperidon vagy épp a quetiapin. E farmakonok nemcsak hatékonyak, de nem rendelkeztek a típusos antipszichotikumokra jellemző extrapiarmidális mellékhatásokkal. Ugyanakkor egyre több tanulmány számolt be a kezelése során tapasztalt testsúlygyarapodásról, T2DM kialakulásáról, főként az olanzapin és clozapin esetében (Allison és mtsai 1999), ezzel

megnövelve a skizofrén betegek amúgy is magasabb kardiovaszkuláris rizikóját és diabetes incidenciáját. Az AAP kezelés első évében a páciensek 70%-nál jelentős (>7%) testsúlygyarapodás figyelhető meg. Az AAP okozta elhízás patogenezisének pontos háttere nem ismert, ugyanakkor számos transzmitter szerepét bizonyították már, így igen valószínű az adrenerg (α_2 -receptor), szerotoninerg (5-HT_{2a}, 5-HT_{2c}, 5-HT₆ receptor), muszkarinerg (M₁-receptor), hisztaminerg (H₁-receptor), valamint a dopaminerg (D₂-receptor) rendszer szerepe. A különböző antipszichotikumok receptor affinitását és a testtömegre gyakorolt mellékhatásának kapcsolatát az 1. táblázat foglalja össze.

Ugyanakkor egyre valószínűbbnek tűnik, hogy az AAP-ok obezitogén hatásukat a szervezet éhség-jóllakottság finoman szabályozott rendszerén keresztül fejtik ki. Az eddigi kutatások rávilágítanak arra is, hogy nem befolyásolják sem az adipogenezist, sem a zsírsejtek leptin szekrécióját (Melkersson és mtsai 2004). Ugyanakkor kérdéses még az inzulin szekréciójára és jelátvitelére gyakorolt hatásuk. Tisztázásra vár még az a kérdés is, hogy az inzulinrezisztencia és diabetesz kizárólag az elhízás következménye-e, vagy attól függetlenül is kialakulhat? Egyre több jel utal arra, hogy az AAP-ok az inzulin rezisztenciát és a 2-es típusú diabeteszt elhízás nélkül is előidézik (Newcomer és mtsai 2002), hiszen mind állatkísérletek, mind a klinikai gyakorlat azt mutatja, hogy a clozapin és az olanzapin is képes akutan, elhízás nélkül csökkenteni az inzulinérzékenységet (Albaugh és mtsai 2011, Houseknecht és mtsai 2006).

Mivel az AAP-ok diabetogén tulajdonsága részben köthető a muszkarin (M) receptor blokkoló sajátosságukhoz (Matsui-Sakata és mtsai 2005) és a darifenacin, ami egy M3 receptor altípus antagonista, gátolja a glükóz stimulált inzulin kiáramlást a hasnyálmirigy β sejtjeiből, ezáltal azonnali károsodást okoz a glükóz toleranciában, ezért feltételezhető, hogy az olanzapin beadása akutan gátolhatja a MIS aktivációját, mint ahogy az atropin beadásnál is megfigyelhető volt. Az AAP-ok okozta elhízás kialakulásának hátterében az étvágy szabályozásban történő változások is valószínűsíthetőek, melyek a vagus ideg megváltozott működésével hozhatóak kapcsolatba. A vagus idegnek központi integráló szerepe van az éhség-jóllakottság szabályzásában. Az olanzapin károsítja a jóllakottság érzést kiváltó folyamatot mind kísérleti állatokban, mind emberben, ami megváltozott étkezési szokásokhoz vezet. Az étvágyat és jóllakottságot centrális és perifériás szignálok komplex kölcsönhatása szabályozza, melyeket a hipotalamusz integrál és végül a táplálkozás elkezdését vagy befejezését váltja ki. Ezen szignálok közül az inzulin és a leptin képes átjutni

a vér-agy gáton, viszont a ghrelin nem, így ez utóbbi hormon a nucleus arcuatusra fejt ki hatását a vagus afferens aktivációján keresztül. Az olanzapiról és a clozapinról köztudott, hogy csökkentik a vagus aktivitását és növelik a ghrelin szintet, az ezért a hatásért felelős mechanizmus azonban mindez ideig ismeretlen.

Gyógyszer	Osztály	Testsúly- változás* (kg/10 hét)	K _i (nM)											
			5-HT _{2C}	5-HT _{2A}	D ₂	H ₁	M ₃	α _{1A}	α _{2A}	α _{2B}	α _{2C}	5-HT _{1A}	5-HT _{1A}	5-HT ₇
Aripiprazole	A	0,71	22,4	8,7	0,66	29,7	4677	26	74	102	37	5,57	783,2	9,6
Chlorpromazine	T	2,1	25	8	4	6	47	0,28	184	27	46	116,4	20,1	35,8
Clozapine	A	4	17	5,4	256	1,2	25	1,64	142	26	34	104,8	17	17,9
Fluphenazine	T	0,43	1386	30	0,54	21	1441	6,5	314,1	81,6	28,8	145,7	38	8
Haloperidol	T	0,48	10000	53	4	1800	10000	12	1130	480	550	1202	3666	377,2
Loxapine	A	0,75	9,5	7,7	12	7	122	31	150,8	107,6	79,9	2456	32,9	87,2
Molindone	T	-1,06	10000	320	63	2130	10000	2612	1097	557,8	172,6	3797	1008	3053
Olanzapine	A	3,51	6,8	2	34	2	105	115	314,1	81,6	28,8	2063	6,28	105,4
Perphenazine	T	2,79	132	5,6	1,4	8	1848	10	810,5	104,9	85,2	421	17	23
Pimozide	T	-3,53	3350	19	0,65	692	1955	197,7	1593	821,1	376,5	650	71	0,5
Quetiapine	A	2,61	2502	101	245	11	10000	22	3630	746,6	28,7	431,6	1865	307,2
Risperidone	A	1,67	35	0,17	6,5	15	10000	5	150,8	107,6	1,3	427,5	1188	6,6
Sertidole	A	2,94	0,9	0,58	9,1	130	2692	1,8	640	450	450	280	5,4	28
Thioridazine	T	2,81	60	10	11	19	43	5	134,3	341,3	74,8	180,7	57,1	99
Thiothixene	T	2,81	1400	50	0,63	4	10000	11	79,9	50,2	51,9	410,4	208,4	15,5
Trifluoperazine	T	0,34	378	13	1,3	63	1001	24	653,7	163,6	391,5	950	118	290,8
Ziprasidone	A	0,28	13	0,3	9,7	43	10000	18	160	48	59	76	60,9	6,62

1. táblázat. Típusos és atípusos antipszichotikumok receptor affinitásának és testtömegre gyakorolt mellékhatásának kapcsolata. A: atípusos antipszichotikum; T: típusos antipszichotikum Forrás:(Kroeze és mtsai 2003).

A diabétesz gyógyszeres kezelése és annak korlátai

A cukorbetegség mintegy 10%-a tartozik a T1DM, míg 90%-a a T2DM csoportba. A prognosztizált emelkedés elsősorban a T2DM-et érinti és mind a fejlett, mind a fejlődő országok érintettek (Zimmet és mtsai 2001). Ugyanakkor a jelenleg elérhető farmakoterápiás kezelések egyike sem nyújt minden szempontból kifogástalan megoldást a cukorbetegség kezelésére. Általánosságban megállapítható, hogy a cukorbetegség kezelésére használt gyógyszerek (2. táblázat) mindegyike csak tüneti kezelést jelent, némelyik alkalmas a betegség progressziójának lassítására, de a betegség visszafordítására, oki terápiát biztosító gyógyszer mindez ideig nem került piaci bevezetésre. Mindemellett mindegyik jelenleg alkalmazott gyógyszer csoport rendelkezik valamilyen olyan mellékhatással, mely korlátozza az alkalmazhatóságukat bizonyos betegpopulációkban.

Inzulin	„Sensitizer”-ek	Biguanidínok	Metformin#, Buformin‡, Phenformin‡		
		TZD-s/”glitazonok”	Pioglitazone, Rivoglitazone†, Rosiglitazone†, Troglitazone‡		
		Kettős PPAR agonisták	Aleglitazar†, Muraglitazar§, Saroglitazar, Tesaglitazar§		
	Szekretagógok	ATP-függő K ⁺ -csatorna gátlók	Szulfonil-urea származékok	I. generáció	Acetohexamide, Carbutamide, Chlorpropamide, Metahexamide, Tolbutamide, Tolazamide
				II. generáció	Glibenclamide, Glibornuride, Glipizide, Gliquidone, Glisoxepide, Glycocypramide, Glimepiride, Gliclazide
				Meglitinidek/”glinidek”	Nateglinide, Repaglinide, Mitiglinide
		GLP-1 agonisták	Exenatide, Liraglutide, Taspoglutide†, Albiglutide†, Lixisenatide		
		DPP-4 gátlók	Alogliptin, Anagliptin, Gemigliptin, Linagliptin, Saxagliptin, Sitagliptin, Teneigliptin, Vildagliptin		
	GPR40 FFA receptor1	Fasiglifam†			
	Analógok/egyéb inzulinok	hosszú hatású (Insulin lisproInsulin aspartInsulin glulisine), gyors hatású (Regular insulin), hosszú hatású (Insulin glargineInsulin detemirNPH insulin) ultra gyors hatású (Insulin degludec†), inhalable Exubera‡			
Egyéb	Alfa-glükozidáz gátlók	Acarbose, Miglitol, Voglibose			
	Amylin analógok	Pramlintide			
	SGLT2 gátlók	Canagliflozin, Dapagliflozin, Empagliflozin†, Remogliflozin§, Sergliflozin§, Tofogliflozin†			
	Egyéb	Bromocriptine, Benfluorex‡, Tolrestat‡			

2. táblázat. A diabétesz terápiájában alkalmazható gyógyszerek csoportosítása (‡Gyógyszerpiacról visszavont, Klinikai vizsgálat: †fázis II, §Nem jutott el fázis III-ig).

Inzulinkészítmények

Az inszulinkészítmények eredetük szerint lehetnek marha vagy sertés hasnyálmirigyből kivont, szemisintetikus előállított (dealanilálás) illetve rekombináns DNS technikával E. coli baktériumokkal vagy élesztőgombákkal termeltetett inzulinok. Az inzulin oldódásától és szuszpendálásától függően különböző hatáskezdetű, hatásmaximumú és hatástartamú preparátumok állíthatók elő. A készítmények ennek alapján ultragyors, gyors, közepes és hosszú hatású csoportra oszthatók (2. táblázat). Az inzulin dózisa nemcsak a beteg endogén inzulintermelésétől, hanem a beteg életmódjától, szénhidrátfogyasztásától stb. függ és egyénileg állítandó be. Leggyakoribb és legfontosabb mellékhatása a hipoglikémia, amely létrejöhet túladagolás, étkezési hiba, alkoholfogyasztás, esetleg erős fizikai megterhelés miatt. Kialakulhat allergia a szennyező anyagokkal, cinkkel és magával az inzulinnal szemben is. Ilyenkor helyi bőrreakció, ritkábban generalizált allergiás reakció jelentkezik. A rezisztencia kialakulása is megnehezíti az inzulin pontos adagolásának beállítását. Ez esetben megkísérelhető a deszenzitizálás, esetleg glükokortikoid kezelés (de ez alatt tovább nőhet az inzulinigény). Az inzulinos cukorbetegség gyakran tapasztalnak testsúly-gyarapodást, mert az inzulin anabolikus hatása érvényesül, ezért a fokozott lipogenezis miatt a zsírszövet hipertrófiája fordulhat elő (bár az inzulin beadás helyén épp ennek az ellenkezője,

lipodisztrófia alakulhat ki, ami miatt a beadás helyét minden nap változtatni kell). Ez további terheket ró a beteg károsodott anyagcseréjére, előidézve állapotuk fokozatos, lassú romlását.

Antidiabetikumok

Orálisan illetve parenterálisan alkalmazható szintetikus készítményekkel (2. táblázat) a T2DM-es betegek jelentős részének cukorháztartása egyensúlyban tartható. A terápiában jelenleg felhasznált és fejlesztés alatt álló antidiabetikumok a hatásjelleg alapján három csoportra oszthatók. Megkülönböztetjük az inzulin felszabadulást fokozó, ún. szekretagógokat (szulfanil-urea származékok, GLP-1 agonisták, GPR40 receptor agonisták, meglitinid származékok); az inzulinérzékenyítő „sensitizer”-eket (biguanidin származékok, thiazolidéndionok, dual PPAR γ agonisták) és egyéb, nem közvetlen az inzulin működését befolyásoló gyógyszereket (alfa-glükozidáz gátlók, amylin analógok, SGLT2 gátlók).

Szulfonil-urea származékok

1942-ben Janbon és mtsai fedezték fel a szulfonamid antibiotikumok vércukorszint-csökkentő hatását, majd a szulfonil-urea származékok, mint orálisan alkalmazható szerek, 1955-től fokozatosan bevonultak a cukorbetegség terápiájába. Első generációs a tolbutamid, tolazamid, chlorpropamid, acetohexamid, második generációs a glibenclamid, glipizid, glimepirid, gliquidon. Hatásuk a hasnyálmirigy inzulin-termelő képességéhez kötött, hiszen a keringő inzulin mennyiségét azáltal növelik, hogy a hasnyálmirigy β -sejtjeinek az ATP-szenzitív K^+ csatornáit gátolják és így fokozzák az inzulin felszabadulását. Azonban nem megfelelő diéta mellett könnyen hipoglikémiát idéznek elő. Emellett számos extrapancreatikus mellékhatást is okozhatnak. Például gátolják az iszkémiás prekondicionálás anti-iszkémiás hatását, ami egyébiránt a leghatékonyabb kardioprotektív mechanizmus, amit eddig ismerünk (Gross és Auchampach 1992, Murry és mtsai 1986). Tekintve, hogy az iszkémiás szívbetegség a cukorbetegség fő komplikációja, az endogén kardioprotekció szulfonil-urea kiváltotta megszűnése a prekondicionálás felfüggesztése következtében kérdésessé teszi a K_{ATP} csatorna-blokkolók terápiás használhatóságát. Emellett egy másik fontos kardioprotektív mechanizmust is károsítanak a K_{ATP} csatorna-blokkoló szulfonil-ureák. Daut és munkatársai kimutatták, hogy a szív koszorús ereinek hipoxiás dilatációja a vaszkuláris K_{ATP} csatornához kötődik (Daut és mtsai 1990). De nemcsak kardiovaszkuláris zavarokhoz vezethet a szulfonil-urea terápia, hanem a cukorbetegsége amúgy is jellemző

gasztrointesztinális motilitási zavarok felerősödését is okozhatja, ugyanis az Oddi spinchter relaxációjában is szerepet játszik a K_{ATP} csatornák aktivációja (Szilvassy és mtsai 1997).

GLP-1 agonisták és DPP-4 gátlók

Az inkretinek, mint antidiabetikumok új, innovatív kezelési lehetőséget jelentenek a T2DM terápiájában. Ezen csoporton belül két alcsoport különíthető el: inkretin mimetikumok és inkretin-hatás érzékenyítők (DPP-4 gátlók vagy gliptinek). A GLP-1 a bélrendszer disztális részében termelődik, a nyálkahártya specifikus L-sejtjeiben. Elválasztásának ingerét a táplálékbevitel, döntően annak szénhidráttartalma jelenti, aminek következtében az éhgyomri állapotban megfigyelhető plazma szint közel háromszorosára emelkedik. A GLP-1 glükóz dependens módon fejt ki hatását, azaz a plazma glükóz emelkedésével összefüggésben fokozódik hatása, süllyedésekor pedig csökken. Ebből a tulajdonságából adódik, hogy terápiás alkalmazásakor cukorbetegekben nem kell számítani hipoglikémia kialakulására. A GLP-1 az inzulinszekréció serkentésén túlmenően stimulálja az inzulin-bioszintézis minden lépését, fokozza az inzulin génjének expresszióját, gátolja a glukagon szekréciót, lassítja a gyomorürülést és csökkenti az étvágyat. A kettős hormonális támadáspont (inzulinszekréció fokozása, glukagonszekréció gátlása) pedig további előnyt jelent az eddigi hatástani csoportokkal szemben (Garber 2011).

GPR40 FFA receptor agonisták

A szabad zsírsavakról (FFA) ismert, hogy elősegítik az inzulin szekrécióját akut fázisban, de ennek folyamata még nem tisztázott. A G-fehérjéhez kötött GPR40 receptor nagy mennyiségben expresszálódik a hasnyálmirigyben, az FFA-k receptoraként funkcionál. A hosszúláncú zsírsavak erősítik a glükóz stimulált inzulin szekréciót a hasnyálmirigy β sejtjeiből a GPR40 receptor aktivációján keresztül. A szintetikus kis molekulájú GPR40 agonisták fokozzák a glükóz dependens inzulin szekréciót *in vitro* és *in vivo*, hasonló mechanizmussal, mint a zsírsavak. A GPR40 agonisták hatásosan növelik az inzulin szekréciót és csökkentik a vércukor szintet T2DM-es rágesáló állatmodellben. Jelenleg fázis I. és fázis II. humán vizsgálatok folynak, melyekben a GPR40 agonista TAK-875 csökkenti az éhgyomri és posztprandiális vércukor szintet és a HbA1c értékét. Hatása megegyezik a szulfonil-ureákhoz tartozó glimepiriddel, anélkül hogy hipoglikémiát váltana ki (Burant 2013).

Meglitinid származékok

A csoportból elsőként törzskönyvezett készítmény a repaglinid, újabb vegyület a nateglinid. A szulfonil-urea vegyületekhez hasonlóan, de feltehetően azoktól eltérő receptoron keresztül serkenti a hasnyálmirigy β -sejtjeiből az inzulin elválasztását, hatását azonban döntően a posztprandiális inzulinszekrécióra fejti ki.

Biguanidin származékok

A középkorban a diabétesz kezelésére alkalmazott növény, a kecskeruta (*Galea officinalis*) aktív hatóanyagát, a guanidint az 1900-as évek elején izolálták, azonban ez a vegyület toxikusnak bizonyult. 1953-tól kezdték a származékokat a gyógyászatban alkalmazni. Az előbbi két vegyületcsoporttól eltérően működő β -sejtek hiányában is hatékonyak, ugyanis nem az inzulin elválasztást fokozzák, hanem elősegítik az inzulin-receptor kötődést, növelik a vázizom sejtek, és kisebb mértékben a májsejtek glükóz felvételét. A biguanidok (metformin) alkalmazása ritkán laktát acidózist képes kiváltani, így használatuk szívelégtelenségben, illetve légzési elégtelenségben kontraindikált (Sirtori és Pasik 1994).

Alfa-glikozidáz gátlók

E szerek az alfa-glükozidáz enzimek (maltáz, glukoamidáz, izomaltáz, szacharáz) reverzibilis kompetitív antagonistái. A bélsatornában gátolják az alfa-glükozidáz enzimek működését, ezáltal csökkentik a keményítő, a dextrin és a diszacharidok elbontását, lassítják a glükóz felszívódását, ezáltal pedig mérséklik a posztprandiális vércukorszint-emelkedést. Az alfa-glikozidáz gátlók gasztrointesztinális intoleranciát okoznak, részben azért, hogy ozmotikus hatással bírnak, részben pedig az emészthetetlen szénhidrátok bakteriális fermentációja következtében.

Amylin analógok

Az amylin a másik β -sejt hormon, mely együtt választódik el az inzulinnal az étkezésre adott válaszban. A glukagon szekréció elnyomásával kiegészíti az inzulin posztprandiális glükóz kontrollra kifejtett hatását. A T2DM-es betegekben étkezéskor beadott humán amylin analóg, a pramlintide, mérsékli a posztprandiális vércukorszint emelkedést. A pramlintide csökkenti a glukagon szintet étkezés közben, lassítja a gyomor ürülési sebességét és csökkenti az étvágyat (Schmitz és mtsai 2004). Gyakori mellékhatásai az émelygés,

hányás, alacsony vércukorszint. A terápiát alacsony dózissal kell kezdeni, hogy a szervezetnek ideje legyen alkalmazkodni ehhez az új gyógyszerhez.

SGLT2 gátlók

A nátrium-glükóz kotranszporterek (SGLT-k) a fehérjék egyik családját képezik, amelyek aktív transzporttal juttatnak át glükózt és nátriumot a sejtek membránján. Az SGLT2-molekulák csaknem kizárólag a proximális vesetubulusok sejtjeinek kefeszegély membránján expresszálódnak és a teljes renális glükóz-visszaszívódás 90%-áért felelősek. Cukorbetegknél az SGLT2 túlzott expressziója figyelhető meg, és a vese általi glükóz-visszaszívás még fokozottabb lehet. Az SGLT2 gátlása mérsékli a glükóz visszaszívódását a vesetubulusokból, ez a vizelettel történő glükóz kiválasztáshoz, kalóriavesztéshez és ozmotikus diurézishez vezet. Az SGLT-2 gátlók csoportjának új képviselője, az empagliflozin. Az eddig elvégzett II. és III. fázisú klinikai vizsgálatok adatai a vércukorszintek szignifikáns javulását igazolták, emellett szignifikáns testsúlycsökkenést és a szisztolés vérnyomás jelentős csökkentését is. A biztonságossági eredmények a genitális fertőzéssel kapcsolatos nemkívánatos események fokozódását mutatták (főként nőknél), a húgyúti fertőzésekkel kapcsolatos mellékhatások előfordulása hasonló volt a placebóéhoz (Haas és mtsai 2014).

A thiazolidéndionok (TZD) vagy „insulin szenzitizer”-ek hatásmechanizmusa

A PPAR γ receptorhoz kötődő TZD-k fokozzák az harántcsíkolt izom és a máj glükóz felhasználását. A PPAR γ aktiválása az izomban is növeli az inzulinérzékeny glükóztranszporter, a GLUT4 szintjét és hatására az izomzatban fokozódik a glükózfelvétel, a glikogénszintézis és a glikolízis (el-Kebbi és mtsai 1994). Az aktivált PPAR γ elősegíti a mitokondriális szétkapcsoló fehérjék /uncoupling proteins/ (UCPs) szintézisét is. Segíti az inzulinhatást azáltal, hogy növeli a zsírszövet zsírsavfelvételét, de ugyanakkor a vázizmoknál nincs ilyen hatása. A β -sejtek inzulin szekréciója is normalizálódik, ez volt a PPAR γ inzulinrezisztenciát csökkentő hatásának az első fontos bizonyítéka (Cavaghan és mtsai 1997). A TZD-k képesek csökkenteni a zsírszövet által termelt és a rezisztencia mértékével korreláló rezisztin hormon termelését. Kiderült az is, hogy a β -sejtek TNF- α hatására megnövekedett nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS) szintjét normalizálni képesek. Ezzel a mechanizmussal a TNF- α /iNOS-aktiváció által rezisztenssé tett inzulinfüggő jelátviteli mechanizmusokat újra érzékenyíteni lehetett a β -sejtekben (Kwon és mtsai 1999). A már korábban említett PPAR γ adipocita differenciációban betöltött szerepe is nagymértékben

hozzájárul az inzulinérzékenység fokozásához, azáltal, hogy a kisebb, inzulinérzékenyebb adipociták kialakulásának kedvez, nagyobb méretű rezisztens formával szemben. A PPAR γ receptor aktivációja a TNF- α szekréciójának és szabad zsírsavak termelődésének csökkentését és így módon a zsíryanycsere javulását eredményezi. A triglicerid- és az LDL-koleszterin-szintet csökkentik, a HDL-koleszterin-szintet emelik.

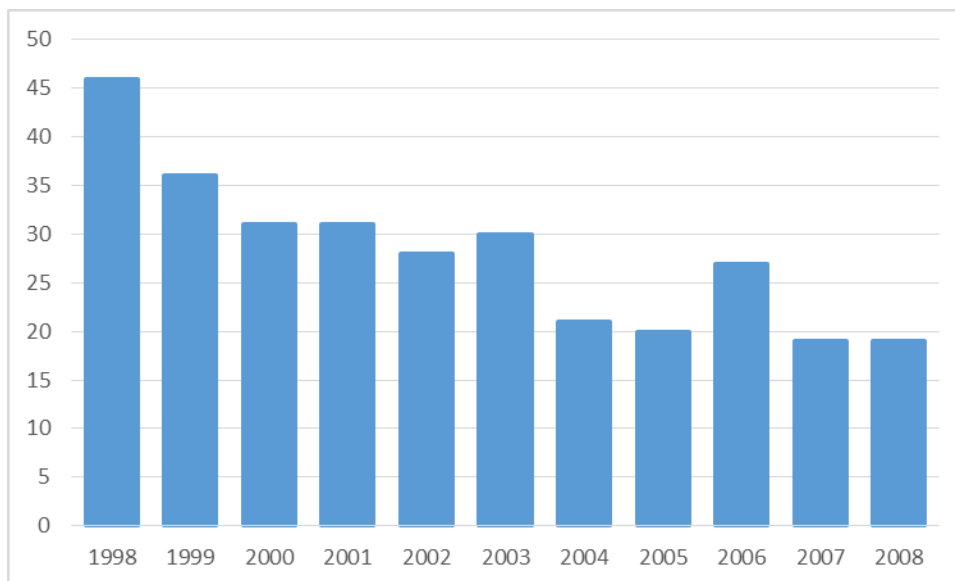
Az utóbbi években leggyakrabban felírt antidiabetikumok az inzulinérzékenyítő hatású TZD-k voltak. A fő hátrányuk, hogy anémiát és májkárosodást okozhatnak. A gyógyszercsoport elsőként forgalomba került képviselőjét, a troglitazont súlyos hepatotoxikus mellékhatása miatt vonták ki a forgalomból (Kohlroser és mtsai 2000). A rosiglitazont az európai piacról visszavonták, míg amerikai forgalmazását szigorították a kardiovaszkuláris mellékhatások nagyszámú előfordulása miatt, ami szedése során jelentkezett. Egy metaanalízis elvégzése után megállapították, hogy a rosiglitazon 43%-kal növeli a szívinfarktus, 64%-kal pedig a szív-érrendszeri halálozás gyakoriságát (Graham és mtsai 2010). A csoport utolsó képviselője a pioglitazon maradt, melynek eladását felfüggesztették a francia és német gyógyszerpiacon húgyhólyagrák fokozott kialakulásának gyanúja miatt (Neumann és mtsai 2012).

Kettős PPAR agonisták (glitazárok)

Kettős (dual) PPAR $\alpha\gamma$ aktivátor tulajdonságuk révén egyszerre fejtenek ki hatást a zsír- és szénhidrát anyagcserére. A terápiába korábban bevonult TZD-k (vagy glitazonok) mellett évek óta folytatnak állatkísérleteket és humán megfigyeléseket kettős, α/γ -receptor-agonistákkal. A mura-, raga- és tesaglitazárral végzett vizsgálatok ugyan kedvező terápiás eredményeket mutattak, de számos mellékhatás (elsősorban kardiovaszkuláris és karcinogén) miatt egyelőre a humán vizsgálatokat felfüggesztették (Nissen és mtsai 2005) A glitazárok kérdése még nincs lezárva, további erőfeszítések szükségesek biztonságos és hatásos vegyületek kifejlesztéséhez, a T2DM és a metabolikus szindróma korszerűbb kezeléséhez vagy akár megelőzéséhez.

Új lehetőségek a gyógyszerfejlesztésben

Szervezetünk molekuláris mechanizmusai jórészt fehérjék működésén és azok egymással, illetve különböző kismolekulákkal való kölcsönhatásain alapulnak. Az ideális gyógyszer olyan kismolekula, mely az adott fehérjéhez kötődve képes célirányosan befolyásolni annak működését és más molekulákkal kialakított kölcsönhatásait, míg más fehérjékkel kialakított kölcsönhatásai nem váltanak ki nemkívánatos mellékhatásokat. A ma ismert és jóváhagyott hozzávetőlegesen ezer gyógyszermolekula túlnyomórészt a klasszikus gyógyszerfejlesztés tapasztalati tudományának eredménye. Ennek során a biológiai tesztrendszerekben véletlenszerűen kipróbált, hatékonyak talált gyógyszerjelölt molekulákat hosszadalmas szemiempirikus továbbfejlesztés után szigorú klinikai tesztekben vizsgálják tovább, míg végül a jelöltek egy töredéke gyógyszerként piacra kerülhet. Az engedélyezésnek nem feltétele a gyógyszer hatásmechanizmusának pontos ismerete, ezért az esetek egy részében a célfehérjék azonosíthatatlanok. Ugyanakkor a célfehérjék szerkezetének ismerete nagyban segíti a hatékonyabb és kevesebb mellékhatást kiváltó új gyógyszerek *in silico* módszerekkel történő fejlesztését. A specifikusabban kötődő molekulák, vagyis hatékonyabb gyógyszerek kutatásában az utóbbi évek bioinformatikai fejlődése új megközelítést hozott, azonban az évente engedélyezésre kerülő újfajta gyógyszermolekulák száma csökkenő tendenciát mutat (Trusheim és mtsai 2010) (5. ábra), a sikeres gyógyszerek kifejlesztési költsége pedig egyre nő (Ciociola és mtsai 2014, DiMasi és mtsai 2003). Ennek egyik oka, hogy míg a gyógyszeripar hatalmas energiákat fektet az újfajta gyógyszermolekulák kifejlesztésébe, egyre nehezebb új célpontokat találni, a megtérülés pedig számos esetben elmarad. A késői tesztfázisokban ugyanis még a legígéretesebb gyógyszerjelölt molekulák is mutathatnak olyan nem kívánt mellékhatásokat, melyek miatt a fejlesztést végül le kell állítani. Ezzel függ össze a fejlesztési költségek növekedésének másik oka, az engedélyezési folyamat szigorodása. A nemkívánatos mellékhatások kiszűrésére egyre kiterjedtebb vizsgálatokat és magasabb követelményeket írnak elő, ezért a gyógyszerfejlesztés újabban a kockázatokat csökkentve, a korábban engedélyezett, ma kapható generikus gyógyszerek lehetséges új hatásaira, illetve a létező gyógyszerek továbbfejlesztésére fókuszál.



5. ábra. Az évente engedélyezésre került újfajta gyógyszermolekulák száma, 1998-2008. (Trusheim és mtsai 2010)

Napjainkban egy originális molekula piacra kerüléséhez szükséges anyagi ráfordítás akár az 1.2 milliárd US dollárt is elérheti (Ciociola és mtsai 2014) (magába foglalva azt a kb. 50-100 további molekulát, melyeket a fejlesztés különböző fázisaiban valamilyen oknál fogva le kellett állítani), miközben évről évre egyre kevesebb originális gyógyszer bevezetése történik meg. A gyógyszerfejlesztés költségeinek csökkentésére egy kiváló lehetőség, hogy a régóta piacon lévő, szabadalmi oltalmát elveszített molekula (generikum) vonatkozásában új indikációban érünk el szabadalmi védeltséget (un. „second medical use patent”). Generikus molekuláról lévén szó, a gyógyszerfejlesztés idő- és költség igénye jelentősen lecsökkenthető, így a gyorsabb piacra kerülés következtében gyorsabb megtérüléssel lehet számolni. A fejlesztés ideje egy originális molekula esetében 10-12 év, míg generikumoknál ez az idő 5-8 évre is lecsökkenthető. Az *in silico* fejlesztés során az újdonságot az jelenti, hogy rendelkezésünkre álló számítástechnikai „know how”-t és generikus molekula adatbázist felhasználva számítógépes „screening”-et alkalmazunk azon generikumok kiválogatására, melyek a későbbiek során a gyógyszerfejlesztés folyamatában a vezérmolekulákká válnak.

A Drug Profile Matching (DPM) módszer

A fent említett tendenciákat felismerve a cél tehát olyan gyógyszerek kifejlesztése, amelyek amellet, hogy hatékonyak, biztonságosak is. Ezért olyan új módszerek létrehozásának lehetőségeit keresik, mellyekkel a gyógyszerjelöltek terápiás és nem kívánt mellékhatásai is megjósolhatók. Egy lehetséges megközelítés a molekuláris dokkolás alkalmazása, amivel a gyógyszerek és a molekuláris receptorok közötti interakció tanulmányozható. Egy másik széles körben elterjedt módszer, hogy a dokkolási eredményeket virtuális affinitási ujjlenyomatként és interakciós mintázatként (interaction pattern, IP) használják, ami leírja a molekula általános interakciós jellemzőit. Itt a mintára jellemző összes információt felhasználják, nemcsak az egyéni interakciókból származókat. Egyik ilyen módszer a DPM, melynek célja, hogy összevesse a kb. 1200 FDA által engedélyezett kis molekulájú gyógyszernek a gyógyhatás profilját és cél molekula profilját, azok virtuális affinitási ujjlenyomataival (azaz a molekula dokkolási eredményének egy sorozatát vetik össze a 149 fehérjéből álló, előre meghatározott halmaz ligandkötő helyeivel) (Simon és mtsai 2012). A legalacsonyabb dokkolási energiákat egy mátrixba rendezve megállapítható, hogy a kismolekulák kölcsönhatási energiái minden esetben jellegzetes, egyedi mintázatot alkotnak. Az említett mátrixban az egy ligandumhoz tartozó energiaérték alkotta vektor adja a molekuláris interakciós ujjlenyomatot, melynek egyedisége elméletileg annál nagyobb, minél többféle fehérjére történő dokkolással állították elő, hiszen ezek a fehérjék egy diszkriminátor felületet alkotnak, mely minél nagyobb, annál alkalmasabb lehet az igen hasonló szerkezetű kismolekulák elkülönítésére. Az ujjlenyomatok hasonlósága arra utal, hogy azok a kismolekulák potenciálisan hasonló paraméterekkel rendelkeznek, amiből pedig a várható hatásokra és mellékhatásokra lehet következtetni. Ez a predikció során használt egyik ujjlenyomat. Többféle ujjlenyomat adatbázis integrálása a későbbiekben lehetővé tenné a gyógyszerjelölt molekulák pontosabb jellemzését, illetve az adatbázisok korreláltatásával új potenciális hatással bíró generikus gyógyszerek felfedezésére nyílna lehetőség. A DPM mögött álló kezdő hipotézis tehát az, hogy a hasonló affinitási ujjlenyomatok hasonló bioaktivitási profilra utalnak (receptor-gyógyhatás összefüggések). Vizsgálatok alapján szoros kapcsolat figyelhető meg a gyógyhatások, a célfehérjék és a gyógyszerek virtuális affinitási ujjlenyomatai között (Peragovics és mtsai 2013). A módszer megbízható és az affinitási ujjlenyomatok elegendő információt nyújtanak a gyógyszerek hatásprofiljának megalkotásához. A módszer kiszámíthatóságának megállapítására végeztünk egy tanulmányt, mely disszertációm egyik részét képezi. A vizsgálat eredményeként megállapításra került,

hogy a DPM túlszárnyalja a hagyományos 2 és 3 dimenziós szerkezeti hasonlóságon alapuló predikciós módszereket (Peragovics és mtsai 2012), melyben minden egyes molekula 2D és 3D szerkezetét hasonlítják össze az adatbázisban szereplő összes többi molekuláéval. A DPM módszer alkalmas arra is, hogy a már meglévő gyógyszerek ismert hatásain kívül az eddig még fel nem fedezett bioaktivitásokat (gyógyhatás, célmolekulák, stb.) is meg lehessen jósolni. Ezeket a predikciókat hitelesíteni (vagy megcáfolni) lehet *in vitro* és-/vagy *in vivo* tesztek elvégzésével.

Bár egyre nő a 2-es típusú diabéteszes betegek száma, az elérhető gyógymódok csak egy behatárolt gyógyszercsoportra korlátozódnak. A leggyakrabban felírt gyógyszercsoport a T2DM kezelésére az előbb ismertetett TZD-k csoportja (Patel és mtsai 2006). A gyógyszerek ezen osztálya a PPAR γ receptorokon keresztül hat, és ez a hatás kihasználható az inzulinérzékenység fokozására inzulin rezisztens állatokban és embereken egyaránt (Saltiel és Olefsky 1996). Annak ellenére, hogy ez a gyógyszercsoport „kasszasikernek” bizonyult, a piacra kerülésüket követően, jelenleg a TZD-k mindhárom képviselőjével kapcsolatban aggodalom merült föl a biztonságosságukat illetően, ezekre a súlyos mellékhatásokra már korábban kitértem. Ugyanakkor elmondható, hogy ezek a gyógyszer mellékhatások nem tűnnek az osztályra jellemző általános hatásnak. Jó lehetőség látszik arra, hogy a TZD-k inzulinérzékenyítő hatását és a nem kívánt mellékhatásokat elválasszuk egymástól egy olyan PPAR γ agonista hatású molekula megtalálása révén, mely inzulinérzékenyítő hatásának megtartása mellett nem rendelkezik a fent említett mellékhatásokkal.

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* predikciós 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 γ aktiváló tulajdonságának megjósolása céljából. Az *in silico* módszerrel kiválasztott molekulákat *in vitro* PPAR γ receptort expresszáló sejt kultúrákon teszteltük tovább, hogy valóban képesek-e PPAR γ 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 γ receptorhoz kapcsolódó inzulinérzékenyítő hatást.

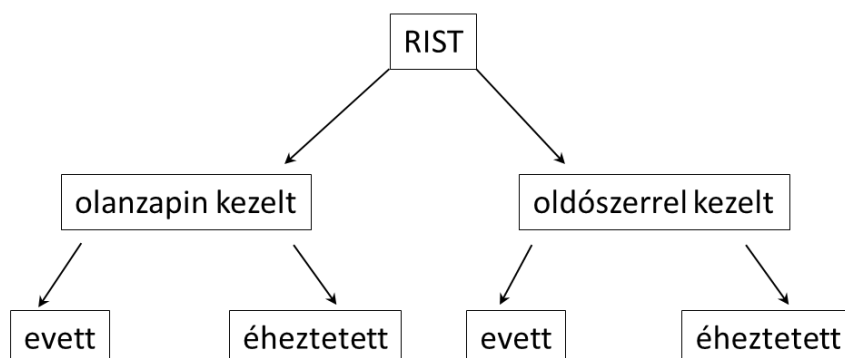
Anyagok és módszerek

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 oldószerrel kezelt kontroll (n=12) és az olanzapin kezelt (n=12) csoportokra. Mindkét csoporton belül random létrehoztunk éheztetett (n=6) és evett (n=6) alcsoportokat (6. ábra). 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.)



6. ábra. Kezelési csoportok kialakítása

Az olanzapint (Sigma-Aldrich, Magyarország) vagy az oldószerrel 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-os orális dózisban adtuk, mely bizonyítottan elhízást okozott nőstény SD patkányoknál (Arjona és mtsai 2004, Cooper és mtsai 2005).

„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 Zwaal és mtsai (van der Zwaal és mtsai 2012) által leírt protokollt. Az állatokat éhezettük 16 órán keresztül a kísérlet megkezdése előtt (7. ábra). 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 megfigyelőrendszerrel 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.

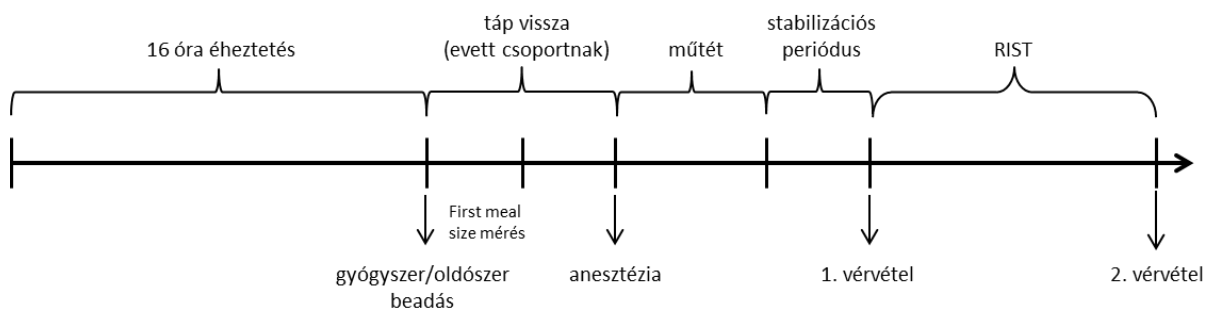
Műtéti eljárás

Az éjszakai éheztetést 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 kanülön 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 kanülön keresztül történt az inzulin és a 20%-os glükóz infúzió beadása. A véralvadás 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 tiopentállal (100mg/kg) túlaltattuk.

Rapid Insulin Sensitivity Test (RIST)

A RIST-et a korábban leírtak szerint hajtottuk végre (Peitl és mtsai 2009), 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 percenként 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 percenként 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 (Peitl és mtsai 2009).



7. ábra. A kísérlet sematikus folyamatábrája

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 állapítottuk meg, mint az éhgyomri vércukor koncentrációjának (mmol/l) és az inzulin (mU/ml)

mennyiségének szorzata, osztva 22,5-el. 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, pankreász polipeptid (PP), peptid YY, ghrelin, leptin és amylin. A mintákat centrifugáltuk (10000g 2 perc, 4°C), majd a felülúszó 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 el. A hormonok Luminex-szel történő meghatározását a Molekuláris Medicina Kutató Központ végezte.

Statisztika

Az eredményeinket átlag \pm SD-val fejeztük ki, valamint két utas variancia analízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni szerint módosított t-teszttel kiegészítve (Wallenstein és mtsai 1980).

One dimensional DPM

A potenciális PPAR γ agonista jelöltek kiválasztására az előbb ismertetett DPM egyszerűbb verzióját használtuk, ami egy szisztematikus, mintázaton alapuló, bioaktivitási predikciós módszer (Simon és mtsai 2012). Ez a módszer kis molekulájú vegyületek virtuális affinitási ujjlenyomatát használja, hogy megjósolja azok gyógyhatását és célfehérjéit (Peragovics és mtsai 2013, Simon és mtsai 2012). A DPM-ben az affinitási ujjlenyomatot IP-nek hívják, mely a vegyületek dokkolási értékeinek halmazából és egy előre meghatározott nem célfehérjékből álló készletből áll, 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, (Simon és mtsai 2012) és kevesebb, mint 10 tag esetén egy alternatív értékelési módszerre van szükség, mint amilyen az oDPM (8. ábra).

Mintagyűjtés

Gyógyszer adatbázis felhasználásával (Wishart és mtsai 2008) összegyűjtöttük az FDA által elfogadott 1255 molekulát és kiválasztottunk hozzá 149 fehérjét a Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (Berman és mtsai 2000) adatbázisából, ahogy azt korábbi munkánk során tettük (Simon és mtsai 2012). A mintagyűjtést Dr. Simon Zoltán és munkacsoportja végezte.

Dokkolási előkészületek és számítások

A dokkolási előkészületeket és számításokat az AutoDockTools-al (Morris és mtsai 2008) (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 (Jiang és mtsai 2008) segítségével végeztük, és az AutoDock4 (Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute) dokkoló programban található pontozó függvényvel (Huey és mtsai 2007, Morris és mtsai 2009). Az előkészületek a korábban leírtak szerint történtek (Simon és mtsai 2012). 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 vezérlőegységű (CPU) (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, USA) Hewlett-Packard csoporton futtattuk le. Összesen $1255 \cdot 149 = 186995$ dokkolás történt, 200-szor ismételve minden egyes gyógyszer-molekula-célfehérje 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 γ 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 (Qian és mtsai 2004) használtuk, hogy meghatározzuk a két vektor közti szöget ebben a 149 dimenziós térben, mely a következő képlettel számítható ki:

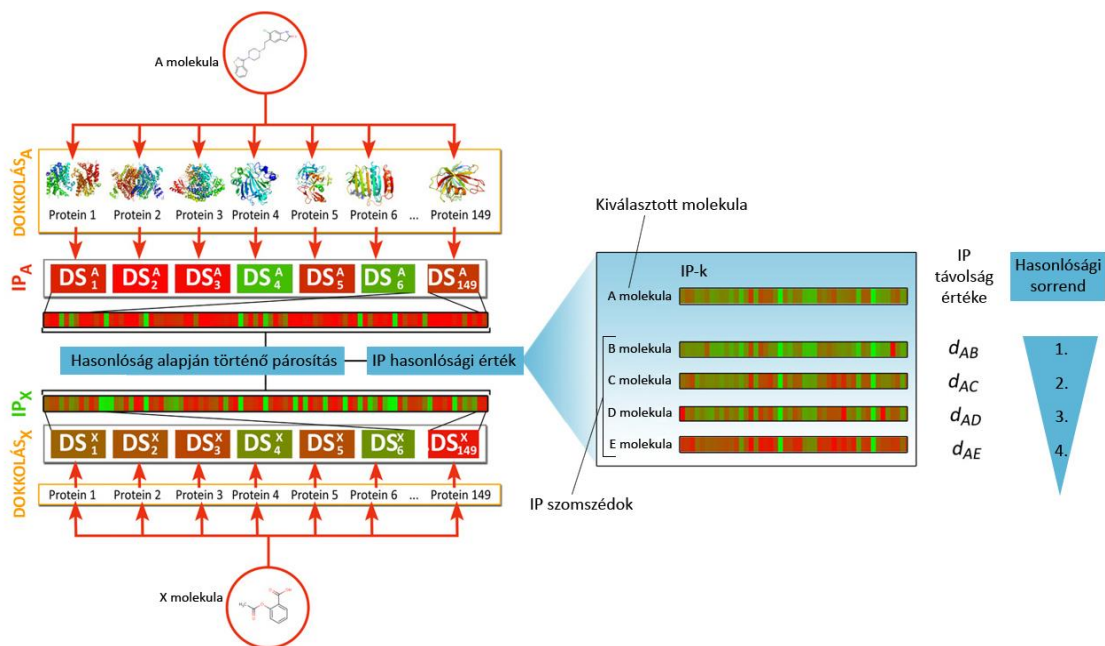
$$d_{AB} = \arccos \left(\frac{\sum_{i=1}^n a_i b_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n a_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n b_i^2}} \right) \frac{180}{\pi}$$

1. egyenlet. Az IP távolság értékének kiszámítása

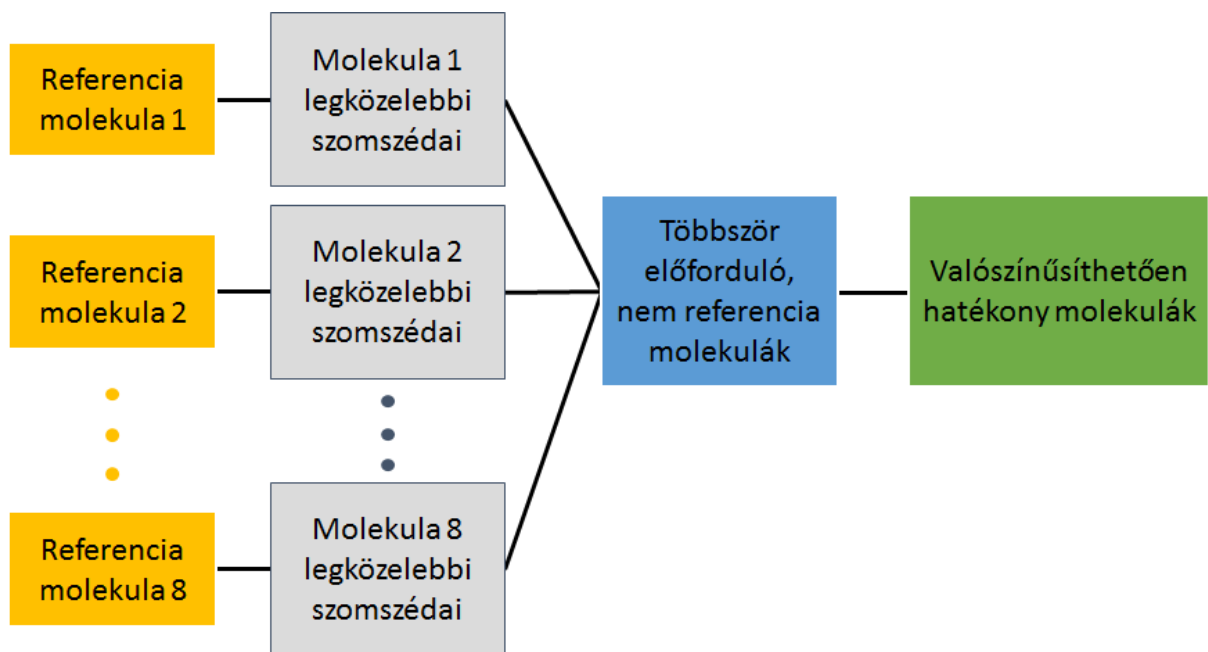
ahol, d_{AB} az IP távolság értéke A és B molekula között, és a_i és b_i a dokkolási értékei A és B molekulának az i -edik fehérjére a 149-ből.

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. (9. ábra) (Dr. Simon Zoltán és mtsai.)



8. ábra. Az oDPM áttekintése. IP-k generálása és IP hasonlóság kiszámítása. A és X molekula 149 tagból álló fehérje készletre történő dokkolása. A saját IP-jük (a színkódokkal jelölt energia értékük a zöldtől pirosig terjednek, azaz az alacsonyabb Ds-tól a magasabb Ds értékekig) lett összehasonlítva és a párosítás hasonlósági értéke kiszámítható. Ezen értékek alapján, hasonlósági listákat alkottak molekulánként, mely a megmaradt molekulákból álló készletet hasonlóságuk szerinti csökkenő sorrendben tartalmazza. (Az oDPM elvégzése külső megbízással történt.)



9. ábra. Az effektív predikciós érték, azaz a hasonlósági együttható (d) meghatározása összefoglalva. A kiválasztott listán többszöri előfordulással megjelenő molekulákat összegyűjtötték. Minden egyes hasonlósági listán megjelenő referencia molekulát eltávolítottak. A megmaradt molekulák valószínűsíthetően rendelkeznek a vélt hatással. (Az oDPM elvégzése külső megbízással történt.)

In vitro tanulmány – génexpressziós vizsgálatok

Az in silico módszerrel kiválasztott vegyületek PPAR γ aktiváló hatását Mono Mac 6 (MM6) sejtvonalon teszteltük. Az MM6 monoblasztos leukémia eredetű monocita sejtvonal, amelyről ismert, hogy expresszálja a PPAR γ -t. A PPAR γ aktivációja számos gén aktiválódását eredményezi, ezek között vannak olyanok, melyek kizárólag PPAR γ működéséhez kötött. Ilyen a FABP4/aP2 (fatty acid-binding protein 4/adipocyte protein) gén (Graves és mtsai 1992), mely expresszióját vizsgáltuk.

A kísérletet 48 lyukú sejtenyésző plate-en 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 γ 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 γ 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 γ aktivitását az FABP4/aP2 gén (a PPAR γ 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 $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmazva normalizáltuk. 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-től (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; sniff 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 (Reed és mtsai 2000). A harmadik fő csoport első alcsoportjában az állatok oldószert 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 kezelési csoportokat a 3. táblázatban foglaltam össze. 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.

1. fő csoport	2. fő csoport	3. fő csoport			
		1. alcsoport	2. alcsoport	3. alcsoport	4. alcsoport
egészséges	inzulin rezisztens	2-es típusú diabéteszes			
normál táp	HFD	HFD+STZ			
oldószer	oldószer	oldószer	NTX 50 mg/kg	NTX 100 mg/kg	NTX 200 mg/kg
n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8

3. táblázat. Kezelési csoportok kialakítása

Dózis választás

Ebben a vizsgálatban a célunk az volt, hogy olyan generikus gyógyszert találjunk, 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 hatékonynak 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 immunszupresszált cryptosporidosisos patkány modellben az oocysták vedlését (Li és mtsai 2003).

Az inzulinérzékenység meghatározása

A teljes test inzulinérzékenységének meghatározása hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC) módszerrel történt (Peitl és mtsai 2010). 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 középen egy vágást ejtettünk, feltártuk a légsövet, 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 kanülön 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 3mU/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 ± 0.5 mmol/l maradjon, tehát az euglikémia fenntartása volt a cél. A vércukor szintet glükométerrel (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 μ L EDTA és 10 μ 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 (DeFronzo és mtsai 1979). 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 (Sherwin és mtsai 1974).

Statisztika

Az eredményeinket átlag \pm SD-val fejeztük ki, és ahol lehetséges volt, páros t- tesztet végeztünk, egyébként két utas variancia analízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni szerint módosított t-teszttel kiegészítve (Wallenstein és mtsai 1980).

Eredmények

Egyszeri olanzapin dózis hatása a bazális és posztprandiális teljes test inzulinérzékenységre

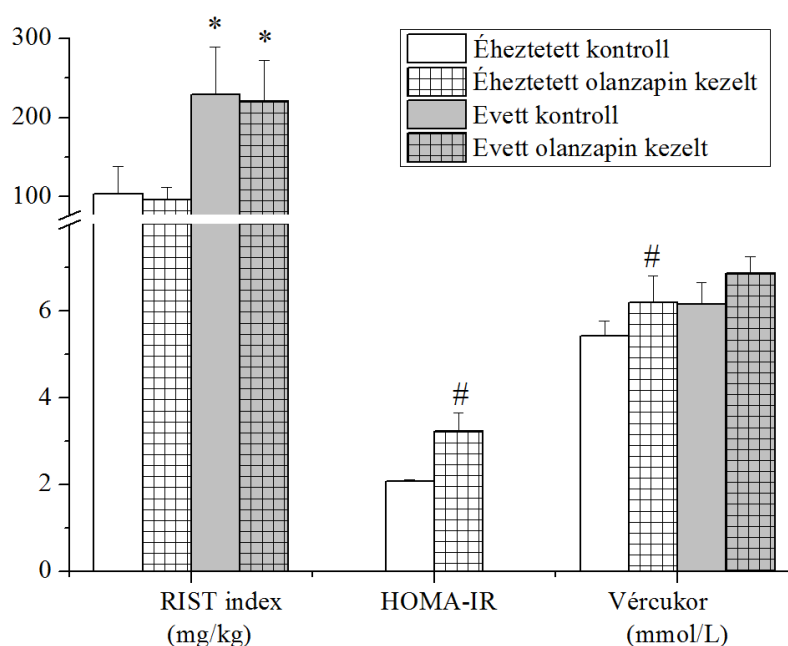
A bazális, azaz éhgyomri inzulinérzékenységet a HOMA képlettel számoltuk ki. Az olanzapin kezelés növelte, mind az éhgyomri plazma inzulin szintet, mind pedig a vércukor szintet, mely a HOMA-IR indexben növekedést eredményezett, és ez éhgyomri inzulin rezisztenciát jelez (10. ábra). A posztprandiális 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 fokozódására (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. (4. táblázat). 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.

	Inzulin	Leptin	Ghrelin	GIP	Amylin	GLP-1	PYY	PP
Éheztetett kontroll	351±8	1097±129	106±7	557±69	21,1±0.4	15.9±1.3	86.6±2.7	60.3±1.5
Éheztetett olanzapin	701±66#	732±81	92±8	624±56	20.5±0.8	14.7±0.7	89.6±1.2	69.9±9.7
Evelt Kontroll	813±78*	2363±273*	29±7*	1024±105*	24.25±1.1	16.7±0.9	91.0±7.5	62.1±4.5
Evelt olanzapin	886±89	2428±242*	55±10*	1167*±101	22.9±1.5	16.5±2.0	97.6±7.5	61.4±2.7

4. táblázat. Az egyszeri orális olanzapin dózis (1mg/kg) hatása a plazma inzulin, leptin, ghrelin, GIP, amylin, GLP-1, PYY és PP szintekre, éheztetett (n=12) és evett (n=12) patkányokban. A csillag (*) statisztikailag szignifikáns különbséget jelent (p<0.05) az éheztetett és evett csoportok között, a kettős kereszt (#) statisztikailag szignifikáns különbséget mutat (p<0.05) az oldószerrel és az olanzapinnal kezelt csoportok esetében. (A hormonok Luminex-szel történő meghatározását a Molekuláris Medicina Kutató Központ végezte.)



10. ábra Az egyszeri orális olanzapin dózis (1 mg/kg) hatása a posztprandiális –RIST index által jelzett- és a bazális –HOMA-IR által jelzett- inzulin érzékenységre és a vércukor szintre éheztetett (n=12) és evett (n=12) patkányokban. A csillag (*) statisztikailag szignifikáns eltérést mutat (p<0.05) a hozzá tartozó kontrollhoz (éheztetett vs evett) képest, a kettős kereszt (#) statisztikailag szignifikáns eltérést mutat (p<0.05) az oldószerrel és az olanzapinnal kezelt csoportok között.

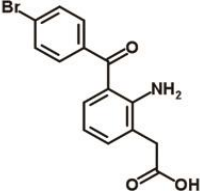
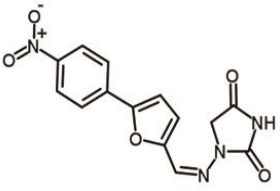
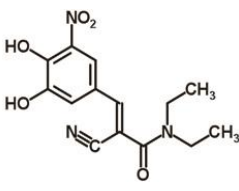
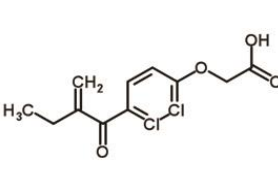
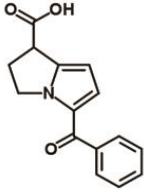
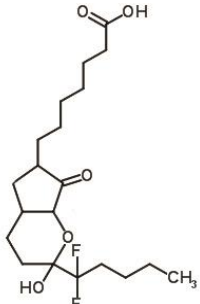
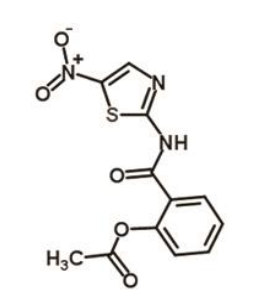
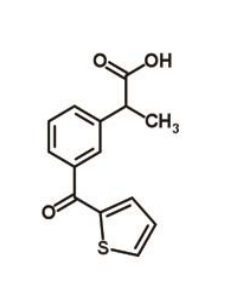
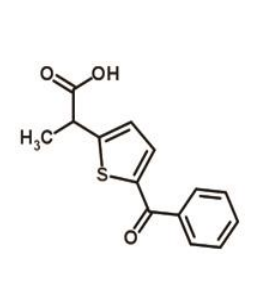
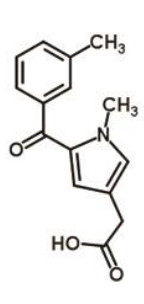
Egyszeri olanzapin dózis hatása a first meal size-ra

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 ± 0.5 g és 2.82 ± 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 ± 1.1 és 16.5 ± 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 ± 0.5 és 4.05 ± 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 egydimenziós. 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 (Simon és mtsai 2012). Meg kell jegyezni azonban, hogy kevesebb, mint 10 taggal rendelkező csoport esetén a DPM nem alkalmazható a túlilleszkedés nagy valószínűsége miatt (Simon és mtsai 2012). Ezért a PPAR γ 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 ± 0.12 , míg a DPM pontossága 0.97 ± 0.03 (Peragovics és mtsai 2013). 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 (5. táblázat). (Dr. Simon Zoltán és munkacsoportja eredményei.)

Bromfenac	Dantrolene	Enthacapone	Etakrin sav	Ketorolac
				
NSAID	Rianodin receptor antagonist	COMT gátló	Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ kotranszport gátló	NSAID
Lubiprostone	Nitazoxanide	Suprofen	Tiaprofén sav	Tolmetin
				
PGE-1 analóg	Antiprotozoon szer	NSAID	NSAID	NSAID

5. táblázat. A kiválasztott 10 generikus molekula és azok már ismert farmakológiai hatásai/indikációi. (A molekula szűrést a pesti munkacsoport végezte.)

Ebben a táblázatban feltüntettem a molekulák eredeti indikációit. A talált PPAR γ ligandok között feltűnően sok a nem-szteroid gyulladáscsökkentő (NSAID), prosztaglandin, prosztaciklin. Ez utóbbiaknak szintén gyulladáscsökkentő hatásuk van. Ez a megfigyelés azért is érdekes a találatok szempontjából, mert a diabéteszt gyulladáscsökkentő betegségnek tekintik (Donath és Shoelson 2011).

A listán kétszeres előfordulást mutatott további 44 vegyület, míg 116 gyógyszer egyszer jelent meg, ezeket a jelen vizsgálatnál figyelmen kívül hagytuk. A kiválasztott 10 vegyület IP hasonlósági mátrixa az 6. táblázatban látható. 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 ± 0.85 és 1.30 ± 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.

Ketorolac	Entacapone	Tolmetin	Nitazoxanide	Suprofen	Etakrin sav	Bromfenac	Lubiprostone	Dantrolene	Tiaprofén sav	
0	1.389	1.004	1.550	1.045	1.188	1.181	2.520	1.775	1.031	Ketorolac
	0	1.258	1.516	1.157	1.103	1.418	2.320	1.483	1.343	Entacapone
		0	1.504	0.867	1.197	1.199	2.348	1.619	0.914	Tolmetin
			0	1.639	1.458	1.676	2.756	2.066	1.492	Nitazoxanide
				0	1.228	1.174	2.384	1.668	0.939	Suprofen
					0	1.516	2.545	1.517	1.298	Etakrin sav
						0	2.380	1.958	1.328	Bromfenac
							0	2.326	2.534	Lubiprostone
								0	1.917	Dantrolene
									0	Tiaprofén sav

6. táblázat. A 10 generikus molekula prediktált IP mintázatának távolsági értékei. (A távolsági értékeket a pesti munkacsoport határozta meg.)

In vitro tanulmány eredményei

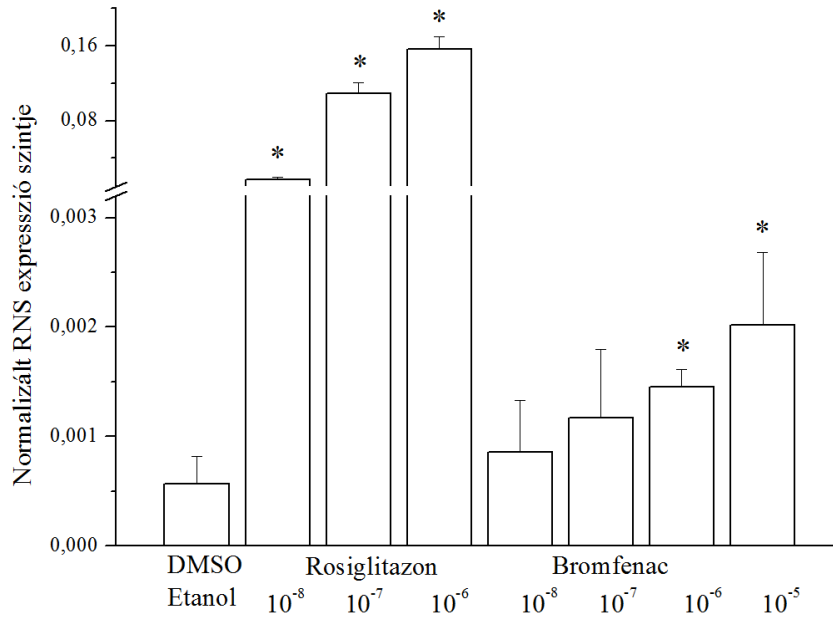
A FABP4/aP2 gén expressziójára gyakorolt hatás

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 megfigyelhető további mRNS expresszió fokozódás, kivétel a legnagyobb koncentrációban (10^{-5} M), de ez az érték nem volt szignifikáns az alacsonyabb koncentrációknál mért aktivitásfokozódáshoz képest (13.ábra). 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,

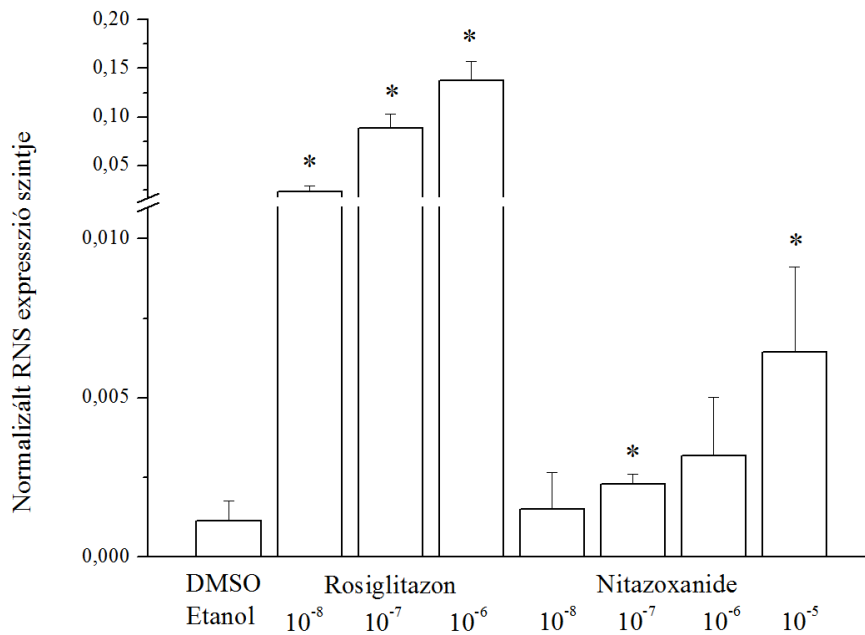
tehát az mRNS expresszió fokozódás ennél a szernél sem volt koncentrációfüggő (14. ábra). A két másik vegyület, a bromfenac és a nitazoxanide esetében tűnt az aktivitásfokozódás koncentrációfüggő változásnak. A bromfenac a két legnagyobb koncentrációjában (10^{-6} M, 10^{-5} M) váltott ki szignifikáns mRNS expresszió növekedést (11. ábra), míg a nitazoxanide már a legkisebb koncentrációjában (10^{-7}) jelentős mRNS expressziót okozott (8. ábra) 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 (15. ábra). 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.

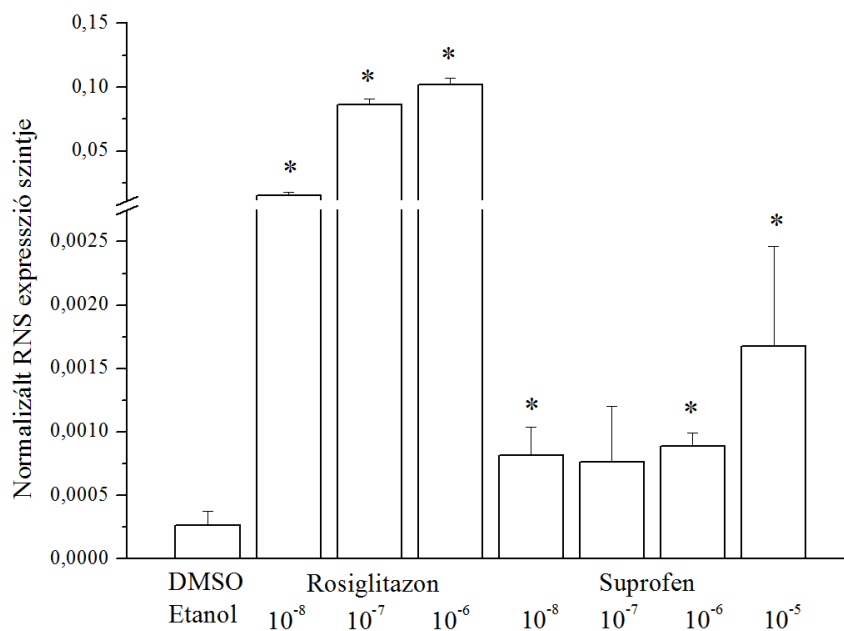
A roziglitazon, mint referencia szer, koncentrációfüggő módon fokozta a FABP4/aP2 gén expresszióját MM6 sejtvonalon. Ráadásul ez a stimuláló hatás a FABP4/aP2 gén kifejeződésére a többi szerhez képest lényegesen nagyobb volt. Ugyanakkor elmondható, hogy az oldószerek önmagukban nem hoztak létre semmilyen változást a FABP4/aP2 gén expressziójában (11,12,13,14. ábra). A génexpressziós vizsgálatokat az ELTE Biokémiai Tanszékén végezték.



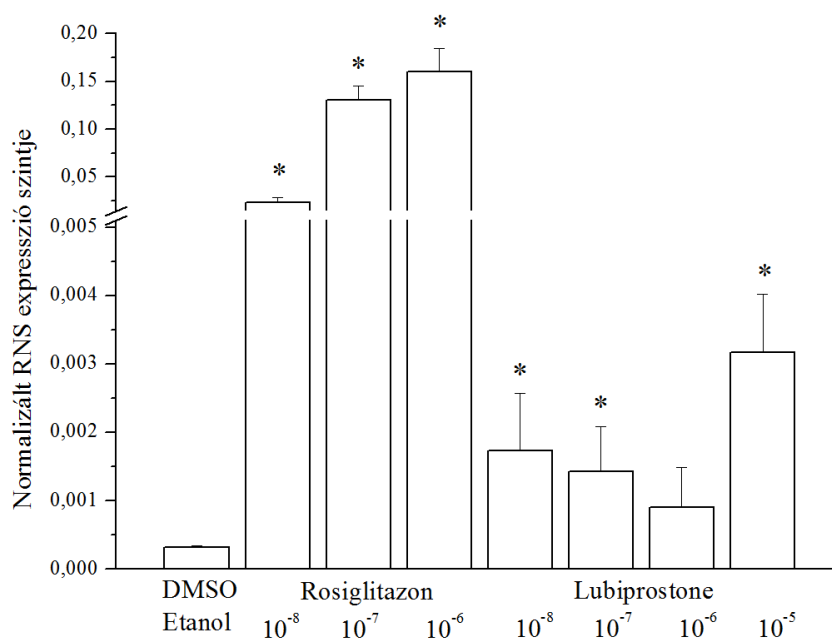
11. ábra. A bromfenac (10^{-8} – 10^{-5} M) hatása a FABP4/aP2 gén expressziójára MM6 sejtvonalon. A csillag (*) szignifikáns eltérést jelent az oldószeres kontrollhoz képest ($p < 0.05$). (ELTE Biokémia Tanszék)



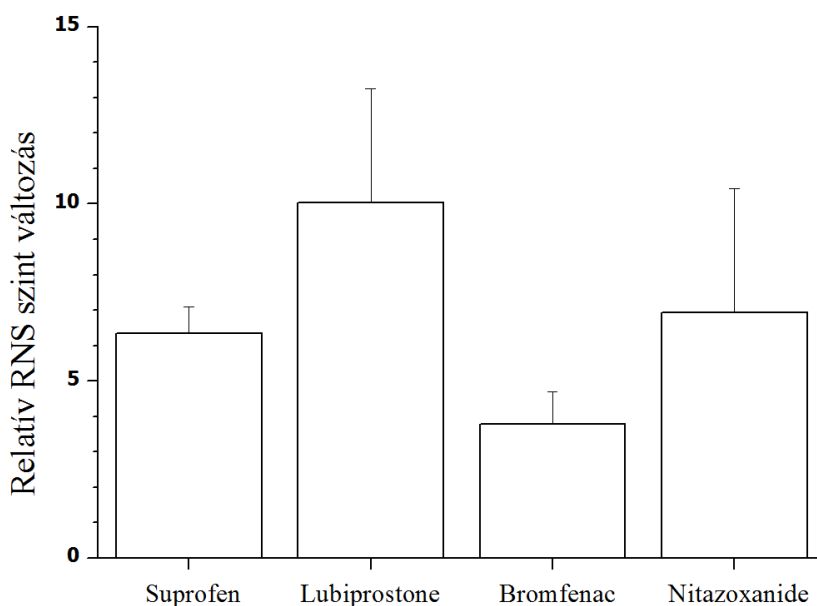
12. ábra. A nitazoxanide (10^{-8} – 10^{-5} M) hatása a FABP4/aP2 gén expressziójára MM6 sejtvonalon. A csillag (*) szignifikáns eltérést jelent az oldószeres kontrollhoz képest ($p < 0.05$). (ELTE Biokémia Tanszék)



13. ábra. A suprofen (10^{-8} – 10^{-5} M) hatása a FABP4/aP2 gén expressziójára MM6 sejtvonalon. A csillag (*) szignifikáns eltérést jelent az oldószeres kontrollhoz képest ($p < 0.05$). (ELTE Biokémia Tanszék)



14. ábra. A lubiprostone (10^{-8} – 10^{-5} M) hatása a FABP4/aP2 gén expressziójára MM6 sejtvonalon. A csillag (*) szignifikáns eltérést jelent az oldószeres kontrollhoz képest ($p < 0.05$). (ELTE Biokémia Tanszék)



15. ábra. A suprofen, lubiprostone, bromfenac, nitazoxanide alkalmazott legnagyobb koncentrációjára létrejött mRNS expresszió mértéke ($p < 0.05$). (ELTE Biokémia Tanszék)

In vivo vizsgálat eredményei

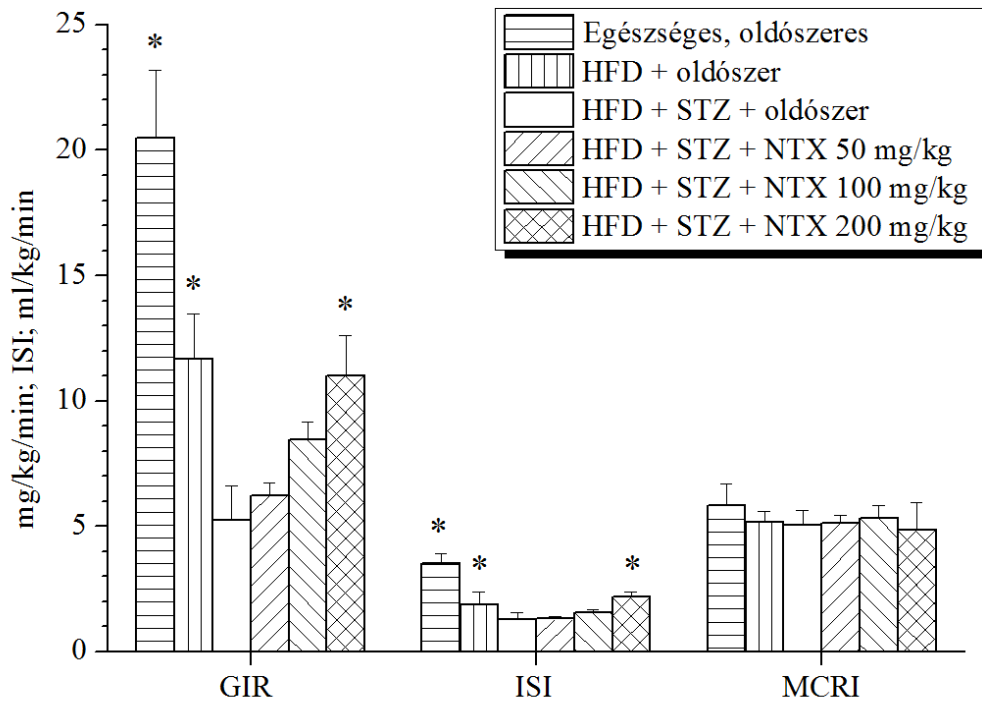
A teljes test inzulinérzékenységének meghatározása

A generikus gyógyszerekről fellelhető irodalmi információk és az *in vitro* tesztünk eredményeként az *in vivo* kísérlethez a NTX-ot választottuk ki, hogy meghatározzuk az inzulinérzékenyítő hatását T2DM-es patkányokon. A különböző kezelési módok glikémiás kontrollra kifejtett hatását a 6. táblázatban foglaltam össze. A zsírdús tápon tartott állatok inzulin rezisztenssé váltak, de nem alakult ki náluk cukorbetegség a 3. hét végére. Az intraperitoneális 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 (16. ábra). 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-ot kaptak (16. ábra). Az éhgyomri vércukorszint az oldószeres

HFD+STZ csoportban jelentősen nőtt, összehasonlítva az oldószerrel kezelt egészséges vagy a HFD-vel etetett állatokkal (7. táblázat). A NTX kezelés az éhgyomri vércukor értékeket minden dózisban csökkentette, és a legnagyobb vizsgált dózisban elérte a statisztikailag szignifikáns szintet ($p < 0.05$) (6. táblázat). 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 az STZ kontrollhoz képest (7. táblázat). Végül nem találtunk szignifikáns eltérést a MCRI-ben egyik kezelési csoportban sem (16. ábra). A nyugalmi átlag artériás középnyomásban nem volt változás a csoportok között (7. táblázat).

	Éhgyomri glükóz (mmol/l)	Éhgyomri plazma inzulin (μ U/ml)	Átlag artériás középnyomás (Hgmm)	Testsúly (g)
Egészséges, oldószeres	4.3 \pm 0.3*	5.8 \pm 0.4*	124 \pm 11	341 \pm 22
HFD+oldószer	4.37 \pm 0.7*	5.3 \pm 0.3*	129 \pm 12	384 \pm 26
HFD+STZ+oldószer	8.7 \pm 1.3	17.5 \pm 5.5	129 \pm 8	345 \pm 35
HFD+STZ+NTX 50 mg/kg	8.5 \pm 1.5	14.3 \pm 4.7	122 \pm 12	366 \pm 21
HFD+STZ+NTX 100 mg/kg	8.1 \pm 1.4	17.2 \pm 4.4	126 \pm 13	372 \pm 33
HFD+STZ+NTX 200 mg/kg	7.3 \pm 1.2*	18.7 \pm 5.2	127 \pm 10	370 \pm 30

7. táblázat. A 8 napos NTX kezelés (50mg/kg/nap, 100mg/kg/nap és 200mg/kg/nap) hatása az éhgyomri vércukor- és plazma inzulin szintre, a nyugalmi artériás középnyomás és a testsúly mért értékei. A csillag (*) szignifikánsan különböző értékeket jelöl az STZ kontrollhoz képest ($p < 0.05$).



16. ábra. A 8 napon át tartó NTX kezelés (50 mg/nap, 100 mg/nap, 200 mg/nap, per os adagolva naponta kétszer) hatása a GIR, ISI és az MCRI értékekre. A csillag (*) statisztikailag szignifikáns eltérést jelent a HFD+STZ és oldószerrel kezelt csoporthoz képest.

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 (Lautt 1999). 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 (Latour és Lautt 2002) valamint a szenzoros effektor útvonalak részvételét (Porszasz és mtsai 2003), azok farmakológiai befolyásolhatóságát (Sadri és mtsai 1997) és a posztprandiálisan felszabaduló CCK feltételezett fokozó hatását (Peitl és Szilvassy 2007). A MIS mechanizmusnak a klinikai jelentőségét kiemeli az a megfigyelés, hogy annak hosszabb távú károsodása az emberi T2DM-hoz hasonló állapotot eredményez (Herczeg és mtsai 2007), ugyanakkor a MIS gyógyszerrel történő aktivációja javíthatja a kísérletes diabéteszt (Lautt és mtsai 2011). 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 (Allison és mtsai 1999, Newcomer 2005, Rummel-Kluge és mtsai 2010). Preklinikai és klinikai vizsgálatok bizonyították, hogy az olanzapin már a testsúlynövekedést megelőzően is képes metabolikus működési zavarokat okozni egyéb pszichés megbetegedés jelenléte nélkül is (Hahn és mtsai 2011, Houseknecht és mtsai 2007, Newcomer és mtsai 2002, Teff és mtsai 2013). 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 (Porszasz és mtsai 2003, Weston-Green és mtsai 2013, Xie és Lutt 1994). Meglepő módon azonban az olanzapin egyszeri per os dózisa vizsgálatunkban nem befolyásolta a MIS-t. Mindebből az olanzapin receptor affinitási profiljának (Matsui-Sakata és mtsai 2005) és a MIS atropin-érzékenysége (Lutt 1999, Peitl és mtsai 2005) 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 féléletideje jelentősen rövidebb rágcsálókban, mint emberekben (Aravagiri és mtsai 1999, Choi és mtsai 2007) és körülbelül 2 óra telt el a gyógyszerbeadástartól 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 táp összmenyiségében sem találtunk különbséget a gyógyszeres illetve kontroll csoportok között. Ezek a megállapításaink egyeznek korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint az olanzapin nem befolyásolta a táplálékfelvétel mennyiségét (Chintoh és mtsai 2008, Weston-Green és mtsai 2011, Weston-Green és mtsai 2012), de csökkentheti az étkezések között eltelt időt, így okozva ezáltal hiperfágiát (Lee és Clifton 2002). 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 elfogyasztott táplálék összmenyiségének növekedését.

Egyetlen tanulmány vizsgálta az olanzapin táplálkozáshoz kötődő hormonokra gyakorolt hatását (van der Zwaal és mtsai 2012). 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 oldószerrel és az olanzapinnal kezelt csoportoknál. A mi kísérletünkben nem találtunk

jelentős különbséget a first meal size és a preprandiális ghrelin szintek között az oldószerral 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 (van der Zwaal és mtsai 2012). 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 (Chen és mtsai 2010). Ez megmagyarázhatja, hogy miért nem tudtunk 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 (Vidarsdottir és mtsai 2010).

Másik tanulmányunk célja volt, hogy olyan generikus gyógyszereket találjunk, melyek PPAR γ 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 γ ligandot oDPM módszerrel. Az *in silico* módszerrel kiválasztott 10 molekula közül 4 volt képes az FABP4/aP2 gén expresszióját fokozni, melynek kifejeződése PPAR γ aktivációhoz kötött. A 4 generikum közül a NTX-ot választottuk ki az *in vitro* eredmények alapján és a feltételezett PPAR γ aktiváló hatását HEGC módszerrel vizsgáltuk tovább *in vivo* diabéteszes patkány modellben, hogy felderítsük annak inzulinérzékenyítő tulajdonságát (DeFronzo és mtsai 1979, Reed és mtsai 2000).

A gyógyszerfejlesztés folyamata igen költségessé vált az utóbbi évtizedben. Számos kísérletet tettek arra, hogy lerövidítsék a gyógyszerek piacra kerüléshez szükséges idejét

(„time to market”) és csökkentse 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 azt eredeti indikációjukban meghatározták, a gyógyszerfejlesztés számos lépése megspórolható, de legalábbis is lerövidíthető, mint amilyenek például az idő- és költségigényes toxikológiai vizsgálatok. Erre példaként említem meg munkacsoportom egy korábbi publikációját (Peitl és mtsai 2006), melyben bizonyítottuk, hogy a cicletanine – egy phosphodiesterase enzyme (PDE) 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 (Peitl és mtsai 2006).

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 (Danaei és mtsai 2011). Másfelől a diabétesz kezelésére alkalmas gyógyszerek száma behatárolt, a leggyakrabban felírt gyógyszereknek, a TZD-knek pedig számos mellékhatása van, mint például: perifériás és centrális ödémák, kongesztív szívelégtelenség vagy épp csonttörések (Loke és mtsai 2009, Mudaliar és mtsai 2003, Nesto és mtsai 2004). Noha ezek a mellékhatások a PPAR γ receptor aktivációjának következtében jönnek létre, a receptor konformációja a kulcs, mely meghatározza a korepresszorok és koaktivátorok affinitását a ligand kötött PPAR γ receptorhoz, mely által létrejön a géntranszkripció és a biológiai válasz a PPAR γ aktiváció után (Higgins és Depaoli 2010, Zhang és mtsai 2007). A PPAR γ receptor aktivációjának sokrétű szabályozása és a szignáltranszdukciós útvonalak lehetővé teszik, hogy egy olyan szelektív PPAR γ modulátor molekulát tervezzünk, mely inzulinérzékenyítő hatásának megtartása mellett nem rendelkezik az előbb említett mellékhatásokkal.

Ebben a tanulmányban a receptor-ligand kölcsönhatást számítógép segítségével modelleztük, mely nagy molekulakönyvtárak eredményes szűrését biztosítja. 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 célfehérjének 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 válassz 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 megjóslása 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 γ receptort. Végül, az *in vivo* kísérletet azért hajtottuk végre, hogy megvizsgáljuk, vajon a PPAR γ 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 (DeFronzo és mtsai 1979). Miután a PPAR γ receptor aktiváció által létrejött inzulinérzékenyítő hatás kifejlődéséhez néhány nap szükséges, az állatokat 8 napig kezeltük, mely elégnék bizonyult az inzulinérzékenyítő hatás kifejlődéséhez rágcsálókban (Chakrabarti és mtsai 2003, Kramer és mtsai 2001). 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[®]), generikus gyógyszer inzulinérzékenyítő hatását vizsgáltuk, mely a thiazolide gyógyszer-csoport elsőként forgalomba került képviselője, protozoon ellenes hatással rendelkezik. E hatásnak feltételezett mechanizmusa a piruvát:ferredoxin oxidoreduktáz

enzim-függő elektron transzfer gátlása (Hoffman és mtsai 2007). Az antiprotozoon hatás mellett antivirális hatását is feltételezik, mely a virális hemagglutinin gátlásán keresztül valósul meg, így gátolva a vírus gazdaszervezet plazmamembránján történő megtapadását és károsítva annak intracelluláris jelátvitelét (Rossignol és mtsai 2009). Másfelől a PPAR γ receptor aktiváló hatásáról nincsenek irodalmi adatok, és a nyilvános adatbázisok sem említik.

Immunszuppresszált cryptosporidosisos patkány modellben a NTX gátolni képes az oocyták vedlését 50-200 mg/kg/nap dózisban (Li és mtsai 2003). Ezét választottuk mi ezt a dózis tartományt, a kezelési időt pedig 8 napban állapítottuk meg, mert ennyi idő szükséges a PPAR γ 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 (Murphy és Friedmann 1985). 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 γ 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 γ 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 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 γ stimuláció után várunk. Nem tapasztaltunk változást sem a testsúlyban, sem a szisztémás vérnyomásban a NTX kezelés hatására. Megjegyzendő azonban, hogy a kezelési periódus csupán 8 nap volt, tehát nem zárható ki, hogy egy hosszabb távú kezelés, változásokat idézhet elő az említett két paraméterben. Egy átfogóbb tanulmány, melyben a krónikus NTX kezelés szervrendszerekre gyakorolt hatását vizsgálnánk, választ adna erre a kérdésre.

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 mechanizmust (MIS) 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 szerepet játszik 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 γ 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 γ 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.

Summary

Olanzapine, which is one of the AAP, can acutely induce insulin resistance and metabolic derangement according to previous preclinical and clinical observations. But we do not know (there is no data in the literature) whether it is able to modulate the meal-induced insulin sensitization (MIS). Here we corroborated that olanzapine can induce insulin resistance in the absence of increased adiposity or obesity and these changes are in agreement with previous observations. However, the changes in ghrelin levels observed in olanzapine treated rats suggest an acute impairment in the regulation of feeding behaviour, which can play a role in the chronic olanzapine treatment induced weight gain. It was proven that the MIS was preserved in response to a single oral dose of olanzapine, which is the major original finding of our study (against the effect on the basal insulin sensitivity). The importance of this finding is that pharmacological activation of the MIS can improve insulin sensitivity in patients with olanzapine-induced insulin resistance.

Using *in silico* computational molecular database screening and reintroduction of generic drugs by second medical use patents helps to decrease the time and resources needed for drug development. In this study we combined these two methods (ways) in order to identify a generic molecule, which is able to improve insulin sensitivity through its PPAR γ receptor activation property. The main discovery of the present study is the demonstration of the predictive value of the oDPM method in searching for PPAR γ ligands. Our results presented the usefulness of this method in the screening of the molecule database for lead selection, and we discovered and supported the insulin sensitizing effect of nitazoxanide, in both *in vivo* and *in vitro* experiments. This generic drug can be a prototype chemical structure of the new generation of insulin sensitizers.

Irodalom

AHIMA R. S., FLIER J. S. (2000) Leptin. *Annu Rev Physiol* 62 413-437

ALBAUGH V. L., SINGAREDDY R., MAUGER D., LYNCH C. J. (2011) A double blind, placebo-controlled, randomized crossover study of the acute metabolic effects of olanzapine in healthy volunteers. *PLoS One* 6 8, e22662

ALLISON D. B., MENTORE J. L., HEO M., CHANDLER L. P., CAPPELLERI J. C., INFANTE M. C., WEIDEN P. J. (1999) Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am J Psychiatry* 156 11, 1686-1696

ARAVAGIRI M., TEPER Y., MARDER S. R. (1999) Pharmacokinetics and tissue distribution of olanzapine in rats. *Biopharm Drug Dispos* 20 8, 369-377

ARJONA A. A., ZHANG S. X., ADAMSON B., WURTMAN R. J. (2004) An animal model of antipsychotic-induced weight gain. *Behav Brain Res* 152 1, 121-127

BERMAN H. M., WESTBROOK J., FENG Z., GILLILAND G., BHAT T. N., WEISSIG H., SHINDYALOV I. N., BOURNE P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28 1, 235-242

BLEICH S., CUTLER D., MURRAY C., ADAMS A. (2008) Why is the developed world obese? *Annu Rev Public Health* 29 273-295

BURANT C. F. (2013) Activation of GPR40 as a therapeutic target for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 36 Suppl 2 S175-179

CABALLERO B. (2007) The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev* 29 1-5

CALLE E. E., THUN M. J. (2004) Obesity and cancer. *Oncogene* 23 38, 6365-6378

CARPENTIER J. L., FEHLMANN M., VAN OBERGHEN E., GORDEN P., ORCI L. (1985) Insulin receptor internalization and recycling: mechanism and significance. *Biochimie* 67 10-11, 1143-1145

CAVAGHAN M. K., EHRMANN D. A., BYRNE M. M., POLONSKY K. S. (1997) Treatment with the oral antidiabetic agent troglitazone improves beta cell responses to glucose in subjects with impaired glucose tolerance. *J Clin Invest* 100 3, 530-537

CHAKRABARTI R., VIKRAMADITHYAN R. K., MISRA P., HIRIYAN J., RAICHUR S., DAMARLA R. K., GERSHOME C., SURESH J., RAJAGOPALAN R. (2003) Ragaglitazar: a novel PPAR alpha PPAR gamma agonist with potent lipid-lowering and insulin-sensitizing efficacy in animal models. *Br J Pharmacol* 140 3, 527-537

CHEN L., McNULTY J., ANDERSON D., LIU Y., NYSTROM C., BULLARD S., COLLINS J., HANDLON A. L., KLEIN R., GRIMES A., MURRAY D., BROWN R., KRULL D., BENSON B., KLEYMENOVA E., REMLINGER K., YOUNG A., YAO X. (2010) Cholestyramine reverses hyperglycemia and enhances glucose-stimulated glucagon-like peptide 1 release in Zucker diabetic fatty rats. *J Pharmacol Exp Ther* 334 1, 164-170

CHINTOH A. F., MANN S. W., LAM T. K., GIACCA A., REMINGTON G. (2008) Insulin resistance following continuous, chronic olanzapine treatment: an animal model. *Schizophr Res* 104 1-3, 23-30

CHOI S., DiSILVIO B., UNANGST J., FERNSTROM J. D. (2007) Effect of chronic infusion of olanzapine and clozapine on food intake and body weight gain in male and female rats. *Life Sci* 81 12, 1024-1030

CIOCIOLA A. A., COHEN L. B., KULKARNI P., GASTROENTEROLOGY F. D.-R. M. C. O. T. A. C. O. (2014) How drugs are developed and approved by the FDA: current process and future directions. *Am J Gastroenterol* 109 5, 620-623

CNOP M., WELSH N., JONAS J. C., JORNS A., LENZEN S., EIZIRIK D. L. (2005) Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2 S97-107

COCCURELLO R., MOLES A. (2010) Potential mechanisms of atypical antipsychotic-induced metabolic derangement: clues for understanding obesity and novel drug design. *Pharmacol Ther* 127 3, 210-251

COOPER G. D., PICKAVANCE L. C., WILDING J. P., HALFORD J. C., GOUDIE A. J. (2005) A parametric analysis of olanzapine-induced weight gain in female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 181 1, 80-89

CUTFIELD W. S., JEFFERIES C. A., JACKSON W. E., ROBINSON E. M., HOFMAN P. L. (2003) Evaluation of HOMA and QUICKI as measures of insulin sensitivity in prepubertal children. *Pediatr Diabetes* 4 3, 119-125

DANA EI G., FINUCANE M. M., LU Y., SINGH G. M., COWAN M. J., PACIOREK C. J., LIN J. K., FARZADFAR F., KHANG Y. H., STEVENS G. A., RAO M., ALI M. K., RILEY L. M., ROBINSON C. A., EZZATI M., GLOBAL BURDEN OF METABOLIC RISK FACTORS OF CHRONIC DISEASES COLLABORATING G. (2011) National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378 9785, 31-40

DAUT J., MAIER-RUDOLPH W., VON BECKERATH N., MEHRKE G., GUNTHER K., GOEDELMEINEN L. (1990) Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science* 247 4948, 1341-1344

- DE MEYTS P., WHITTAKER J. (2002) Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* 1 10, 769-783
- DEFRONZO R. A., TOBIN J. D., ANDRES R. (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237 3, E214-223
- DIMASI J. A., HANSEN R. W., GRABOWSKI H. G. (2003) The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 22 2, 151-185
- DONATH M. Y., SHOELSON S. E. (2011) Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 11 2, 98-107
- EL-KEBBI I. M., ROSER S., POLLET R. J. (1994) Regulation of glucose transport by pioglitazone in cultured muscle cells. *Metabolism* 43 8, 953-958
- GARBER A. J. (2011) Long-acting glucagon-like peptide 1 receptor agonists: a review of their efficacy and tolerability. *Diabetes Care* 34 Suppl 2 S279-284
- GIBBS J., YOUNG R. C., SMITH G. P. (1973) Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* 84 3, 488-495
- GRAHAM D. J., OUELLET-HELLSTROM R., MACURDY T. E., ALI F., SHOLLEY C., WORRALL C., KELMAN J. A. (2010) Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly Medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone. *JAMA* 304 4, 411-418
- GRAVES R. A., TONTONOV P., SPIEGELMAN B. M. (1992) Analysis of a tissue-specific enhancer: ARF6 regulates adipogenic gene expression. *Mol Cell Biol* 12 7, 3313
- GROSS G. J., AUCHAMPACH J. A. (1992) Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 70 2, 223-233
- HAAS B., ECKSTEIN N., PFEIFER V., MAYER P., HASS M. D. (2014) Efficacy, safety and regulatory status of SGLT2 inhibitors: focus on canagliflozin. *Nutr Diabetes* 4 e143
- HAHN M., CHINTOH A., GIACCA A., XU L., LAM L., MANN S., FLETCHER P., GUENETTE M., COHN T., WOLEVER T., ARENOVICH T., REMINGTON G. (2011) Atypical antipsychotics and effects of muscarinic, serotonergic, dopaminergic and histaminergic receptor binding on insulin secretion in vivo: an animal model. *Schizophr Res* 131 1-3, 90-95
- HAMILTON B. S., PAGLIA D., KWAN A. Y., DEITEL M. (1995) Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med* 1 9, 953-956
- HASLAM D. W., JAMES W. P. (2005) Obesity. *Lancet* 366 9492, 1197-1209
- HERCZEG L., BUHERENKOVA T., SZILVASSY Z., PEITL B. (2007) Diabetes induced by partial hepatic sensory denervation in conscious rabbits. *Eur J Pharmacol* 568 1-3, 287-288

HIGGINS L. S., DEPAOLI A. M. (2010) Selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) modulation as a strategy for safer therapeutic PPARgamma activation. *Am J Clin Nutr* 91 1, 267S-272S

HOFFMAN P. S., SISSON G., CROXEN M. A., WELCH K., HARMAN W. D., CREMADES N., MORASH M. G. (2007) Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 51 3, 868-876

HOTAMISLIGIL G. S., ARNER P., CARO J. F., ATKINSON R. L., SPIEGELMAN B. M. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95 5, 2409-2415

HOUSEKNECHT K. L., ROBERTSON A. S., ZAVADOSKI W., GIBBS E. M., JOHNSON D. E., ROLLEMA H. (2006) Acute Effects of Atypical Antipsychotics on Whole-Body Insulin Resistance in Rats: Implications for Adverse Metabolic Effects. *Neuropsychopharmacology* 32 2, 289-297

HOUSEKNECHT K. L., ROBERTSON A. S., ZAVADOSKI W., GIBBS E. M., JOHNSON D. E., ROLLEMA H. (2007) Acute effects of atypical antipsychotics on whole-body insulin resistance in rats: implications for adverse metabolic effects. *Neuropsychopharmacology* 32 2, 289-297

HUEY R., MORRIS G. M., OLSON A. J., GOODSSELL D. S. (2007) A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem* 28 6, 1145-1152

JEQUIER E. (2002) Pathways to obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 Suppl 2 S12-17

JIANG X., KUMAR K., HU X., WALLQVIST A., REIFMAN J. (2008) DOVIS 2.0: an efficient and easy to use parallel virtual screening tool based on AutoDock 4.0. *Chem Cent J* 2 18

KADOWAKI T., YAMAUCHI T., KUBOTA N. (2008) The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett* 582 1, 74-80

KAHN S. E., HULL R. L., UTZSCHNEIDER K. M. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444 7121, 840-846

KAPLAN N. M. (1989) The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 149 7, 1514-1520

KENNEDY G. C. (1953) The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140 901, 578-596

KOHLROSER J., MATHAI J., REICHHELD J., BANNER B. F., BONKOVSKY H. L. (2000) Hepatotoxicity due to troglitazone: report of two cases and review of adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *Am J Gastroenterol* 95 1, 272-276

- KOJIMA M., HOSODA H., DATE Y., NAKAZATO M., MATSUO H., KANGAWA K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402 6762, 656-660
- KOLOVOU G. D., ANAGNOSTOPOULOU K. K., SALPEA K. D., MIKHAILIDIS D. P. (2007) The prevalence of metabolic syndrome in various populations. *Am J Med Sci* 333 6, 362-371
- KORBONITS M., GOLDSTONE A. P., GUEORGUIEV M., GROSSMAN A. B. (2004) Ghrelin--a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 25 1, 27-68
- KRAMER D., SHAPIRO R., ADLER A., BUSH E., RONDINONE C. M. (2001) Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. *Metabolism* 50 11, 1294-1300
- KROEZE W. K., HUFSEISEN S. J., POPADAK B. A., RENOCK S. M., STEINBERG S., ERNSBERGER P., JAYATHILAKE K., MELTZER H. Y., ROTH B. L. (2003) H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology* 28 3, 519-526
- KWON G., XU G., MARSHALL C. A., MCDANIEL M. L. (1999) Tumor necrosis factor alpha-induced pancreatic beta-cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and aminoguanidine. A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation and inos expression. *J Biol Chem* 274 26, 18702-18708
- LANN D., LEROITH D. (2007) Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Med Clin North Am* 91 6, 1063-1077, viii
- LATOUR M. G., LAUTT W. W. (2002) The hepatic vagus nerve in the control of insulin sensitivity in the rat. *Auton Neurosci* 95 1-2, 125-130
- LAUTT W. W. (1999) The HISS story overview: a novel hepatic neurohumoral regulation of peripheral insulin sensitivity in health and diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 77 8, 553-562
- LAUTT W. W., SCHAFER J., MACEDO M. P., LEGARE D. J. (2011) Bethanechol and N-acetylcysteine mimic feeding signals and reverse insulin resistance in fasted and sucrose-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 89 2, 135-142
- LEE M. D., CLIFTON P. G. (2002) Meal patterns of free feeding rats treated with clozapine, olanzapine, or haloperidol. *Pharmacol Biochem Behav* 71 1-2, 147-154
- LI X., BRASSEUR P., AGNAMEY P., LEMETTEL D., FAVENNEC L., BALLEST J. J., ROSSIGNOL J. F. (2003) Long-lasting anticryptosporidial activity of nitazoxanide in an immunosuppressed rat model. *Folia Parasitol (Praha)* 50 1, 19-22
- LOKE Y. K., SINGH S., FURBERG C. D. (2009) Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis. *CMAJ* 180 1, 32-39

- MAFFEI M., HALAAS J., RAVUSSIN E., PRATLEY R. E., LEE G. H., ZHANG Y., FEI H., KIM S., LALLONE R., RANGANATHAN S., ET AL. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1 11, 1155-1161
- MATSUI-SAKATA A., OHTANI H., SAWADA Y. (2005) Receptor occupancy-based analysis of the contributions of various receptors to antipsychotics-induced weight gain and diabetes mellitus. *Drug Metab Pharmacokinet* 20 5, 368-378
- MATTHEWS D. R., HOSKER J. P., RUDENSKI A. S., NAYLOR B. A., TREACHER D. F., TURNER R. C. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28 7, 412-419
- MEIER U., GRESSNER A. M. (2004) Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 50 9, 1511-1525
- MELKERSSON K. I., DAHL M. L., HULTING A. L. (2004) Guidelines for prevention and treatment of adverse effects of antipsychotic drugs on glucose-insulin homeostasis and lipid metabolism. *Psychopharmacology (Berl)* 175 1, 1-6
- MORRIS G. M., HUEY R., OLSON A. J. (2008) Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 8 Unit 8 14*
- MORRIS G. M., HUEY R., LINDSTROM W., SANNER M. F., BELEW R. K., GOODSSELL D. S., OLSON A. J. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30 16, 2785-2791
- MUDALIAR S., CHANG A. R., HENRY R. R. (2003) Thiazolidinediones, peripheral edema, and type 2 diabetes: incidence, pathophysiology, and clinical implications. *Endocr Pract* 9 5, 406-416
- MURPHY J. R., FRIEDMANN J. C. (1985) Pre-clinical toxicology of nitazoxanide--a new antiparasitic compound. *J Appl Toxicol* 5 2, 49-52
- MURRY C. E., JENNINGS R. B., REIMER K. A. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74 5, 1124-1136
- NADAS J., PUTZ Z., JERMENDY G., HIDVEGI T. (2007) Public awareness of the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 76 1, 155-156
- NESTO R. W., BELL D., BONOW R. O., FONSECA V., GRUNDY S. M., HORTON E. S., LE WINTER M., PORTE D., SEMENKOVICH C. F., SMITH S., YOUNG L. H., KAHN R. (2004) Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care* 27 1, 256-263

- NEUMANN A., WEILL A., RICORDEAU P., FAGOT J. P., ALLA F., ALLEMAND H. (2012) Pioglitazone and risk of bladder cancer among diabetic patients in France: a population-based cohort study. *Diabetologia* 55 7, 1953-1962
- NEWCOMER J. W., HAUPT D. W., FUCETOLA R., MELSON A. K., SCHWEIGER J. A., COOPER B. P., SELKE G. (2002) Abnormalities in glucose regulation during antipsychotic treatment of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 59 4, 337-345
- NEWCOMER J. W. (2005) Second-generation (atypical) antipsychotics and metabolic effects: a comprehensive literature review. *CNS Drugs* 19 Suppl 1 1-93
- NISSEN S. E., WOLSKI K., TOPOL E. J. (2005) Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 294 20, 2581-2586
- OKABAYASHI Y., MADDUX B. A., MCDONALD A. R., LOGSDON C. D., WILLIAMS J. A., GOLDFINE I. D. (1989) Mechanisms of insulin-induced insulin-receptor downregulation. Decrease of receptor biosynthesis and mRNA levels. *Diabetes* 38 2, 182-187
- PATEL C. B., DE LEMOS J. A., WYNE K. L., MCGUIRE D. K. (2006) Thiazolidinediones and risk for atherosclerosis: pleiotropic effects of PPAR gamma agonism. *Diab Vasc Dis Res* 3 2, 65-71
- PEITL B., DOBRONTE R., NEMETH J., MEZEY G., KOVACS P., PARAGH G., SZILVASSY Z. (2005) The prandial insulin sensitivity-modifying effect of vagal stimulation in rats. *Metabolism* 54 5, 579-583
- PEITL B., NEMETH J., PANKUCSI C., SZILVASSY Z. (2006) Insulin sensitization induced by oral cicletanine in conscious rabbits. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 373 6, 429-439
- PEITL B., SZILVASSY Z. (2007) The inhibitory effect of proglumide on meal-induced insulin sensitization in rats. *Metabolism* 56 7, 863-864
- PEITL B., DOBRONTE R., NEMETH J., PANKUCSI C., SARI R., VARGA A., SZILVASSY Z. (2009) Meal-induced enhancement in insulin sensitivity is not triggered by hyperinsulinemia in rats. *Metabolism* 58 3, 328-332
- PEITL B., DOBRONTE R., DRIMBA L., SARI R., VARGA A., NEMETH J., PAZMANY T., SZILVASSY Z. (2010) Involvement of cholecystokinin in baseline and post-prandial whole body insulin sensitivity in rats. *Eur J Pharmacol* 644 1-3, 251-256
- PERAGOVICS A., SIMON Z., BRANDHUBER I., JELINEK B., HARI P., HETENYI C., CZOBOR P., MALNASI-CSIZMADIA A. (2012) Contribution of 2D and 3D structural features of drug molecules in the prediction of Drug Profile Matching. *J Chem Inf Model* 52 7, 1733-1744
- PERAGOVICS A., SIMON Z., TOMBOR L., JELINEK B., HARI P., CZOBOR P., MALNASI-CSIZMADIA A. (2013) Virtual affinity fingerprints for target fishing: a new application of Drug Profile Matching. *J Chem Inf Model* 53 1, 103-113

- POIRIER P., GILES T. D., BRAY G. A., HONG Y., STERN J. S., PI-SUNYER F. X., ECKEL R. H. (2006) Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 5, 968-976
- PORSZASZ R., LEGVARI G., NEMETH J., LITERATI P. N., SZOLCSANYI J., SZILVASSY Z. (2002) The sensory nitrenergic nature of the hepatic insulin sensitizing substance mechanism in conscious rabbits. *Eur J Pharmacol* 443 1-3, 211-212
- PORSZASZ R., LEGVARI G., PATAKI T., SZILVASSY J., NEMETH J., KOVACS P., PARAGH G., SZOLCSANYI J., SZILVASSY Z. (2003) Hepatic insulin sensitizing substance: a novel 'sensocrine' mechanism to increase insulin sensitivity in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 139 6, 1171-1179
- POULAIN M., DOUCET M., MAJOR G. C., DRAPEAU V., SERIES F., BOULET L. P., TREMBLAY A., MALTAIS F. (2006) The effect of obesity on chronic respiratory diseases: pathophysiology and therapeutic strategies. *CMAJ* 174 9, 1293-1299
- QIAN G., SURAL S., GU Y., PRAMANIK S. (2004) Similarity between Euclidean and cosine angle distance for nearest neighbor queries. 1232-1237
- REED M. J., MESZAROS K., ENTES L. J., CLAYPOOL M. D., PINKETT J. G., GADBOIS T. M., REAVEN G. M. (2000) A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 49 11, 1390-1394
- ROSSIGNOL J. F., LA FRAZIA S., CHIAPPA L., CIUCCI A., SANTORO M. G. (2009) Thiazolidines, a New Class of Anti-influenza Molecules Targeting Viral Hemagglutinin at the Post-translational Level. *Journal of Biological Chemistry* 284 43, 29798-29808
- RUMMEL-KLUGE C., KOMOSSA K., SCHWARZ S., HUNGER H., SCHMID F., LOBOS C. A., KISSLING W., DAVIS J. M., LEUCHT S. (2010) Head-to-head comparisons of metabolic side effects of second generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res* 123 2-3, 225-233
- SADRI P., LEGARE D. J., LAUTT W. W. (1997) Insulin resistance caused by nitric oxide synthase inhibition. *Proc West Pharmacol Soc* 40 19-20
- SADRI P., LAUTT W. W. (1998) Blockade of nitric oxide production in the liver causes insulin resistance. *Proc West Pharmacol Soc* 41 37-38
- SALTIEL A. R., OLEFSKY J. M. (1996) Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 45 12, 1661-1669
- SAMUEL V. T., SHULMAN G. I. (2012) Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148 5, 852-871
- SCHMITZ O., BROCK B., RUNGBY J. (2004) Amylin agonists: a novel approach in the treatment of diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3 S233-238

SCHWARTZ M. W., WOODS S. C., PORTE D., JR., SEELEY R. J., BASKIN D. G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404 6778, 661-671

SESSLER A. M., NTAMBI J. M. (1998) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J Nutr* 128 6, 923-926

SHERWIN R. S., KRAMER K. J., TOBIN J. D., INSEL P. A., LILJENQUIST J. E., BERMAN M., ANDRES R. (1974) A model of the kinetics of insulin in man. *J Clin Invest* 53 5, 1481-1492

SIMON Z., PERAGOVICS A., VIGH-SMELLER M., CSUKLY G., TOMBOR L., YANG Z., ZAHORANSZKY-KOHALMI G., VEGNER L., JELINEK B., HARI P., HETENYI C., BITTER I., CZOBOR P., MALNASI-CSIZMADIA A. (2012) Drug effect prediction by polypharmacology-based interaction profiling. *J Chem Inf Model* 52 1, 134-145

SIRTORI C. R., PASIK C. (1994) Re-evaluation of a biguanide, metformin: mechanism of action and tolerability. *Pharmacological Research* 30 3, 187-228

SZILVASSY Z., LONOVICS J., JAKAB I., NAGY I. (1997) Glibenclamide sensitivity of neural relaxation of the rabbit sphincter of oddi. *Pharmacol Res* 36 2, 129-133

TEFF K. L., RICKELS M. R., GRUDZIAK J., FULLER C., NGUYEN H. L., RICKELS K. (2013) Antipsychotic-induced insulin resistance and postprandial hormonal dysregulation independent of weight gain or psychiatric disease. *Diabetes* 62 9, 3232-3240

TRUSHEIM M., AITKEN M. L., BERNDT E. R. (2010) Characterizing markets for biopharmaceutical innovations : do biologics differ from small molecules?

VAN DER ZWAAL E. M., MERKESTEIN M., LAM Y. K., BRANS M. A., LUIJENDIJK M. C., BOK L. I., VERHEIJ E. R., LA FLEUR S. E., ADAN R. A. (2012) The acute effects of olanzapine on ghrelin secretion, CCK sensitivity, meal size, locomotor activity and body temperature. *Int J Obes (Lond)* 36 2, 254-261

VAN VLIET-OSTAPTCHOUK J. V., ONLAND-MORET N. C., SHIRI-SVERDLOV R., VAN GORP P. J., CUSTERS A., PEETERS P. H., WIJMENGA C., HOFKER M. H., VAN DER SCHOUW Y. T. (2008) Polymorphisms of the TUB gene are associated with body composition and eating behavior in middle-aged women. *PLoS One* 3 1, e1405

VIDARSDOTTIR S., ROELFSEMA F., STREEFLAND T., HOLST J. J., REHFELD J. F., PIJL H. (2010) Short-term treatment with olanzapine does not modulate gut hormone secretion: olanzapine disintegrating versus standard tablets. *Eur J Endocrinol* 162 1, 75-83

WALLACE T. M., MATTHEWS D. R. (2002) The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med* 19 7, 527-534

WALLENSTEIN S., ZUCKER C. L., FLEISS J. L. (1980) Some statistical methods useful in circulation research. *Circ.Res.* 47 1, 1-9

- WANG J., LIU R., HAWKINS M., BARZILAI N., ROSSETTI L. (1998) A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393 6686, 684-688
- WESTON-GREEN K., HUANG X. F., DENG C. (2011) Olanzapine treatment and metabolic dysfunction: a dose response study in female Sprague Dawley rats. *Behav Brain Res* 217 2, 337-346
- WESTON-GREEN K., HUANG X. F., LIAN J., DENG C. (2012) Effects of olanzapine on muscarinic M3 receptor binding density in the brain relates to weight gain, plasma insulin and metabolic hormone levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 22 5, 364-373
- WESTON-GREEN K., HUANG X. F., DENG C. (2013) Second generation antipsychotic-induced type 2 diabetes: a role for the muscarinic M3 receptor. *CNS Drugs* 27 12, 1069-1080
- WHITING D. R., GUARIGUATA L., WEIL C., SHAW J. (2011) IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 94 3, 311-321
- WISHART D. S., KNOX C., GUO A. C., CHENG D., SHRIVASTAVA S., TZUR D., GAUTAM B., HASSANALI M. (2008) DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res* 36 Database issue, D901-906
- WOLF A. M., COLDITZ G. A. (1998) Current estimates of the economic cost of obesity in the United States. *Obes Res* 6 2, 97-106
- XIE H., LAUTT W. W. (1994) Insulin resistance produced by hepatic denervation or muscarinic cholinergic blockade. *Proc West Pharmacol Soc* 37 39-40
- XIE H., LAUTT W. W. (1995) Induction of insulin resistance by cholinergic blockade with atropine in the cat. *J Auton Pharmacol* 15 5, 361-369
- XIE H., LAUTT W. W. (1996) Insulin resistance caused by hepatic cholinergic interruption and reversed by acetylcholine administration. *Am J Physiol* 271 3 Pt 1, E587-592
- YUAN M., KONSTANTOPOULOS N., LEE J., HANSEN L., LI Z. W., KARIN M., SHOELSON S. E. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293 5535, 1673-1677
- ZHANG F., LAVAN B. E., GREGOIRE F. M. (2007) Selective Modulators of PPAR-gamma Activity: Molecular Aspects Related to Obesity and Side-Effects. *PPAR Res* 2007 32696
- ZIMMET P., ALBERTI K. G., SHAW J. (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414 6865, 782-787

Saját közlemények



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR

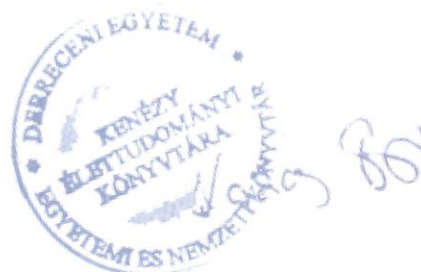


Nyilvántartási szám: DEENK/73/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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 Schmiedebergs 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 PPARγ 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





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 tudományometriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2015.04.02.



Tárgyszavak

Magyarul: receptor-ligand kötődés számítógépes predikciója, in silico kiválasztás, inzulinérzékenyítők, egy dimenziós DPM, peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma (PPAR γ), 2-es típusú cukorbetegség, olanzapin, inzulinérzékenység, ghrelin, bél hormonok

Angolul: computer-aided prediction of receptor-ligand interaction, in silico selection, insulin sensitizers, one-dimensional drug profile matching, peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ), type two diabetes, olanzapine, insulin sensitivity, satiety, ghrelin, gut hormones

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 Professzor 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.