

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Krónikus atípusos antipszichotikum kezelés hatásának
vizsgálata a szervezet metabolikus háztartására**

Hegedűs Csaba

Témavezető: Dr. Peitl Barna



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

Krónikus atípusos antipszichotikum kezelés hatásának vizsgálata a szervezet metabolikus háztartására

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

Írta: Hegedűs Csaba okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Peitl Barna, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Hortobágyi Tibor, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem GYTK,
Gyógyszerhatástani Tanszék Könyvtára
2016. április 28., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Csonka Csaba, PhD
Dr. Remenyik Judit, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Csonka Csaba, PhD
Dr. Hortobágyi Tibor, PhD
Dr. Remenyik Judit, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2016. április 28., 13 óra

1. BEVEZETÉS

Az elhízás az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb méreteket ölt a nyugati társadalmakban, és jelentősen megnöveli számos megbetegedés, úgymint a kettes típusú diabétesz, a hipertónia, különböző kardiovaszkuláris elváltozások, és egyes tumorok kialakulásának kockázatát. Ezen betegségek ellátása óriási terhet ró az egészségügyre és a gazdaságra, azonfelül nagymértékben hozzájárulnak az elhízott betegek emelkedett halálozási arányához.

Elhízás úgy alakulhat ki, ha a szervezet energiaháztartása zavart szenved, és a lebontó folyamatokkal szemben a raktározó mechanizmusok kerülnek előtérbe, és emiatt nettó súlygyarapodás következik be. A központi idegrendszer a perifériával együttműködve hatékony, és bonyolult rendszert alkot, mely a táplálékfelvétel és a termoreguláció szabályozása révén biztosítja az állandó testsúlyt, ám úgy tűnik, hogy a nyugati társadalmakra jellemző táplálékbőség és életvitel megzavarja ezt az egyensúlyt, és túlevés, inzulinrezisztencia alakul ki, mely idővel számos szövődmény kifejlődéséhez vezet.

A súlyos mentális zavarokkal, például skizofréniával küzdő betegek körében az elhízás még a normál populációhoz viszonyítva is magas, ezzel együtt fokozottabb kockázatnak vannak kitéve a diabétesz, a szív- és érrendszeri megbetegedések és szövődményeik szempontjából. Tovább rontja a helyzetet, hogy a skizofrén betegek kezelésére terápiásan legalkalmasabb gyógyszeres készítmények súlyos metabolikus mellékhatásokkal rendelkeznek, tovább emelik a testsúlyt, és inzulinrezisztenciát, valamint diszlipidémiát válthatnak ki. A mellékhatások patomechanizmusa máig nem tisztázott, és ez nagymértékben akadályozza a megfelelő intervenciók lehetőségeinek kifejlesztését.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az atípusos antipszichotikumok metabolikus mellékhatásainak patomechanizmusát kutató erőfeszítések elsősorban azok központi idegrendszeri támadáspontjait vizsgálták, míg a perifériás hatásokról, különösen a gasztrointesztinális peptidek lehetséges szerepéről nagyon keveset tudunk. Az olanzapin és klozapin kezeléssel kapcsolatos táplálkozásmintázati eltérések nagyon hasonlóak a CCK-1 receptor deficiens patkányokban megfigyelhető változásokhoz.

Első célkitűzésünk annak vizsgálata volt, hogy vajon a CCK-1 mediált folyamatok szerepet játszanak-e a krónikus klozapin kezeléssel kapcsolatos elhízásban és inzulinrezisztenciában. Kísérletünkhöz genetikailag CCK-1 receptor hiányos patkányokat alkalmaztunk, és azok egészséges párjait használtuk kontrollként. Tudomásunk szerint ezeken a vonalakon eddig atípusos antipszichotikum tanulmány nem készült.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai igazolták a CCK hatását a posztprandiális inzulinérzékenyítő mechanizmusban. Megfigyeléseink azt is bizonyították, hogy egyszeri olanzapin kezelés hatására a MIS nem károsodik, valamint azt, hogy a táplálékfelvétel során felszabaduló gasztrointesztinális peptidek szintje nem változik. Második célkitűzésünk annak vizsgálata volt, hogy vajon az egyszeri dózissal szemben a krónikus kezelés alatt is megtartott marad-e az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus, továbbá, hogy milyen módon változik a gasztrointesztinális peptidek éhgyomri és posztprandiális szintje a kezelés végére. Kísérletünket izotópos technikával kiegészítve a hepatikus inzulinrezisztencia mértékét is meg kívántuk határozni.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Etikai engedélyek

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

Krónikus klozapin kezelés metabolikus hatásainak vizsgálata CCK-1 receptor hiányos Otsuka Long Evans Tokushima Fatty patkányon

Kísérleti állatok

A kísérleteket him Long Evans Tokushima Otsuka (LETO) és Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) patkányokon végeztük (az állatok a japán Tokushima Institute ajándékai voltak). A patkányokat intézetünk kísérleti állatházában tartottuk, 22-24°C közötti hőmérséklet és 50-70% relatív páratartalom mellett. A megvilágítás 12 óránként váltakozó világos/sötét periódusokból állt. Az állatokat egyedileg elkülönítve metabolikus ketrecekbe helyeztük (3701M081, Tecniplast Corp., Buguggiate, Olaszország), és a 25 napos kísérleti periódus alatt ad libitum szabvány laboratóriumi tápot (S8106-S011 SM R/M-Z+H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Németország) és csapvizet kaptak.

Kezelési protokoll

Egy hetes akklimatizációs időszak után a LETO és OLETF állatokat két-két csoportba osztottuk (csoportonként n=8). Egy LETO és egy OLETF csoport napi 10 mg/kg klozapint (Sigma-Aldrich Magyarország Kft., Budapest, Magyarország) kapott száján át 25 napon keresztül, a másik két csoport kontrollként szolgált, és a klozapin oldószerét kapta. A napi gyógyszer/oldószer beadás a sötét periódus kezdete előtt egy órával történt. A klozapint 25 µl 1.2 M-os HCl-ban oldottuk fel, majd 0.9%-os NaCl oldattal tovább hígítottuk. Az oldat pH-ját 1 M-os NaOH-dal 5.5 körüli értékre állítottuk be. A klozapin oldatot 1 ml/kg végtérfogatban, orális szondán keresztül adtuk be.

Metabolikus mérések

A kísérleti állatok testsúlyát, táp- és vízfogyasztását, valamint a széklet- és vizeletürítést metabolikus ketrec segítségével, hétköznapokon naponta mértük, a hétvégi változásokat a pénteki és hétfői adatok különbségét átlagolva határoztuk meg.

A napi tápfogyasztás mellett a gyógyszerbeadást követő első étkezés (first meal) időtartamát, illetve az az alatt elfogyasztott táp mennyiségét is meghatároztuk. Erre a kezelés 21. napján került sor. Az állatok elől elvettük a tápot, és 6 óra múlva szájon át klopapint/oldószert kaptak a kísérleti protokollnak megfelelően. 2 órával a gyógyszerbeadás után a tápot visszaadtuk, és video megfigyelő rendszeren keresztül figyeltük a táplálkozási viselkedést és a tápfogyasztást. A first meal során elfogyasztott táp tömegét (first meal size, FMS) és a first meal időtartamát (first meal duration, FMD) van der Zwaal ajánlása alapján határoztuk meg: egy étkezésnek vettük, amelyben az állat legalább 1 kcal tápot fogyasztott, és a táplálkozási mintázatban nem volt öt percnél hosszabb szünet. A 6 órás éheztetés miatt a 21. napi metabolikus méréseket mellőztük.

A first meal mérést követően a kezelési protokollt tovább folytattuk a kísérleti időszak végéig. Az utolsó metabolikus mérés az inzulinérzékenység meghatározást megelőző napon történt (24. nap), ugyanis a kísérlethez szükséges 16 órás éheztetés miatt az állatok körülbelül 20 g testsúlyt veszítettek a kísérleti napra.

A táplálkozási hatékonyságot úgy határoztuk meg, hogy a testsúlyváltozást elosztottuk az utolsó 24 órában elfogyasztott táp tömegével.

A kísérletek végén az állatokat az arteria carotison keresztül elvéreztettük. A vérmintákat centrifugálás (10000g 2 percig 4°C-on) után -70°C-on tároltuk további mérésekig. Az adipozitás meghatározásához a perirenális, intraabdominális és epididimális fehér zsírszövetet eltávolítottuk, súlyukat lemértük, és százalékos formában, a testsúlyhoz viszonyítva ábrázoltuk.

Az inzulinérzékenység meghatározása

A teljes test inzulinérzékenységének meghatározására hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC) technikát alkalmaztunk. Az állatokat egy éjszakán át

éheztettük, majd 50 mg/kg intraperitoneálisan adott tiopentállal elaltattuk őket (Thiopental Sandoz®, Sandoz Pharmaceutical PLC, Svájc). A műtét és a kísérlet alatt az állatokat fűthető műtőasztalon tartottuk, mely 37-37.5°C maghőmérsékletet biztosított. A nyak ventrális oldalán hosszirányú bemetszés után feltárt tracheába polietilén csövet vezettünk a spontán légzés biztosítása érdekében. A bal vena jugularis két ágába és arteria carotisba kanült helyeztünk.

30 perc stabilizációs periódust követően az egyik intravénás kanülon keresztül inzulin (Humulin R®, Eli Lilly, Indianapolis, IN, Egyesült Államok) infúziót indítottunk 6 mU/kg/min sebességgel, a másik kanülon keresztül 20 %-os glükóz infúziót kezdtünk adagolni. A kísérlet folyamán a glükóz infúzió sebességét úgy szabályoztuk, hogy a vércukorszint az euglikémiás tartományban (5.5 ± 0.5 mmol/l) maradjon. A vércukorszintet vércukormérővel (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Budaörs, Magyarország) határoztuk meg az artériás kanülon keresztül 5-10 percenként vett vérmintákból. Az éhgyomri és az egyensúlyi inzulinszint meghatározásához vérmintákat gyűjtöttünk az inzulin infúzió indítása előtt, és az egyensúlyi állapotban (0.5 ml, 20 µl EDTA és 10 µl Trasylol; Bayer, Leverkusen, Németország). A mintákat centrifugáltuk (Centrifuge 5415R, Eppendorf GmbH, Németország, 10000g 2 percig 4°C-on), és a felülúszókat -70°C-on tároltuk a későbbi mérésig.

Számított paraméterek

Glükóz infúziós ráta

A HEGC során, általában az inzulin infúzió indítását követő 90. perc körül beáll egy legalább 30 percig tartó egyensúlyi (steady state) állapot, mely alatt a vércukorszint stabilizálódik, és a glükóz infúziós sebességet nem, vagy csak minimális mértékben kell változtatni az euglikémia fenntartásához. A steady state állapot alatti átlagos glükóz infúziós sebességgel (GIR) jellemezhetjük a teljes test inzulinérzékenységét. Feltételezve, hogy a külső inzulinbevétel leállítja a máj glükóztermelését, a GIR az inzulinszenzitív perifériás szövetek – elsősorban a vázizom és a zsírszövet – glükózfelvételével egyenlő.

Inzulinérzékenységi index

Ha a külső inzulin infúzió nem képes teljesen lecsökkenteni a máj glükóztermelését (pl. hepatikus inzulinrezisztencia esetén), akkor steady state alatt a perifériás szövetek nemcsak a külsőleg beadott, hanem a májból felszabaduló glükózt is felveszik. Ez esetben a GIR nem jellemzi megfelelően a teljes test inzulinérzékenységét, ezért az inzulinérzékenységi indexet (ISI) helyesebb alkalmazni. Az ISI-t a GIR és a steady state plazma inzulin koncentráció hányadosaként számítjuk:

$$ISI = \frac{\text{glükóz infúziós ráta}}{\text{steady state plazma inzulinszint}}$$

Az inzulin metabolikus clearance rátája

Inzulinrezisztencia esetén kompenzatórikus hiperinzulinémia fejlődik ki. Ez úgy lehetséges, hogy vagy megemelkedik az inzulinszekréció, vagy az inzulin szervezetből történő eltávolítása (metabolic clearance rate of insulin, MCRI) csökken. Az MCRI-t úgy számoljuk, hogy az inzulin infúzió sebességét elosztjuk a steady state és az éhgyomri plazma inzulinszint különbségével:

$$MCRI = \frac{\text{inzulin infúziós ráta}}{\text{steady state plazma inzulinszint} - \text{éhszint plazma inzulinszint}}$$

HOMA-IR

A HOMA-IR index az éhgyomri inzulinrezisztenciát jellemző adat. Úgy képezzük, hogy a mmol/l-ben megadott éhgyomri vércukorszint és a mU/ml-ben megadott éhgyomri plazma inzulinszint szorzatát elosztjuk 22.5-tel:

$$HOMA - IR = \frac{\text{éhszint plazma glükózsztint} * \text{éhszint plazma inzulinszint}}{22.5}$$

RNS extrakció és reverz transzkripció

A HEGC végeztével a patkányokat elvégeztettük, koponyájukat felnyitottuk, agyukat eltávolítottuk, és a hipotalamuszt kimetszettük. Az RNS-t RNEasy Mini Kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország) vontuk ki a hipotalamuszból a gyártó leírása szerint. Az RNS-minták tisztaságát etídium-bromiddal festett agaróz gélelektroforézissel

ellenőriztük, a 18S és 28S sűrűségű rRNS sávokat UV-fény alatt azonosítottuk. A teljes RNS koncentrációt SmartSpec™ Plus Spectrophotometer-rel (Bio-Rad, Hercules, Egyesült Államok) határoztuk meg. A DNázissal kezelt teljes RNS (2 µg) reverz transzkripciója random primerek és Superscript™ II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Németország) segítségével történt.

TaqMan® assay alapú real-time PCR

A target gének (CCK1- és CCK2-receptor) mRNA expresszióját real-time PCR technikával, TaqMan® Gene Expression Assays és ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Egyesült Államok) segítségével határoztuk meg. A próbák 6-karboxi-fluorescein foszforamiditet tartalmaznak az 5' végen, a 3' végen pedig egy minor groove binderrel kapcsolódó nem fluoreszcens quencher. A CCK1 receptor TaqMan® Gene Expression azonosítója Rn00562164_m1 volt, a CCK2 receptoré Rn00565867_m1. A 18S rRNS háztartási gén expressziója szolgált belső kontrollként. A 18S rRNS-specifikus primert QPCRPrimer 1.2-vel készítettük. A 18S rRNS primer és a TaqMan próba szekvenciák a Structural Biology and Bioinformatics Group honlapján találhatóak (<http://fuel1.biochem.dote.hu/SBBG/>). A 18S rRNS oligonukleotid szekvenciáit a Bio-Science-től rendeltük meg (Budapest, Magyarország). A TaqMan PCR-t ABI 7900 Sequence Detectoron végeztük, a ciklusok beállításainál a gyártó ajánlását követve (50 °C 2 percig, 95 °C 10 percig, majd 40 ciklus: 15 másodperc 95 °C és 1 perc 60 °C). Egy wellben 10 µl PCR keverék volt, mely 2 x TaqMan Gene Expression Master Mix-ből, 4,5 µl cDNS templátból és vagy 0,5 µl TaqMan assay-ből (CCK1 vagy CCK2 receptorra), vagy 18S rRNS oligóból állt (500-500 nM forward és reverse primer és 100 nM próba). A TaqMan próba ugyanazon RT reakción belül történt a target (CCK1 és CCK2 receptor) és referencia génre (18S rRNS). Minden minta minden vizsgált génjét három példányban mértük, 384 lyukú plate-en. A reagensek esetleges kontaminációját nem ellenőriztük külön templátokkal. Az adatokat az ABI Sequence Detector programmal gyűjtöttük össze. A relatív expresszió meghatározása $\Delta\Delta CT$ módszerrel történt. Ennek megfelelően az adatokat a 18S rRNS referencia gén szintjére normalizálva, a kezeletlen LETO patkányokhoz viszonyítva fejeztük ki. Így a relatív expresszió mértéke a kontroll LETO állatokban 1 (100%) volt.

Radioimmunoassay (RIA) mérések

A plazma inzulinszintet radioimmunoassay eljárással, kereskedelmi forgalomban kapható inzulin RIA kit (RK 400 M, Izotóp Intézet Kft., Budapest, Magyarország) segítségével határoztuk meg. Az egy RIA-n belüli, illetve RIA-k közötti variabilitás kisebb volt, mint 5%.

Krónikus olanzapin kezelés hatása az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmusra és a gasztrointesztinális peptidek szintjére nőstény Sprague-Dawley patkányon

Kísérleti állatok

A kísérlet során 36 nőstény Sprague-Dawley patkányt használtunk (Innovo Kft., Gödöllő, Magyarország). Az állatok érkezésük időpontjában 170-200 g súlyúak voltak. Intézetünk kísérleti állatházában 22-24 °C hőmérséklet és 50-70% relatív páratartalom mellett tartottuk őket, a megvilágítás 12 óránként váltakozó sötét/világos periódusokból állt. Az állatokat egyedileg elkülönítve, metabolikus ketrecben tartottuk (3701M081, Tecniplast Corp., Buguggiate, Olaszország), ad libitum szabvány laboratóriumi tápot (S8106-S011 SM R/M-Z+H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Németország) és csapvizet kaptak.

Csoportkiosztás

Egy hét akklimatizációs időszakot követően az állatokat két fő csoportba osztottuk. 18 patkány a kontroll csoportba került, az állatok másik fele olanzapin kezelést kapott. A kezelési időszak végén a csoportokat véletlenszerűen további két-két alcsoportra osztottuk. Az egyik alcsoport állatai HEGC kísérletben kerültek felhasználásra (n=6), a többi állatot (n=12) gyors inzulinérzékenység tesztnek (rapid insulin sensitivity test, RIST) vetettük alá. A RIST alcsoportot még két részre osztottuk aszerint, hogy a kísérlet előtt kaptak-e enni, vagy nem (éheztetett és evett csoport, n=6-6). A két csoport közötti különbség az volt, hogy míg az éheztetett állatok a RIST-et megelőző 16 órában már nem kaptak enni, az evett állatok a RIST előtti két órában ad libitum ehettek.

Kezelési protokoll

Mivel az olanzapin (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) felezési ideje patkányban rövidebb, mint az emberben, a folyamatos, stabil plazmaszintet napi egyszeri, vagy kétszeri gyógyszerbeadással nem tudjuk biztosítani. Stabilitási okok miatt az ozmotikus minipumpa sem megfelelő erre a célra, ezért az olanzapint az itatóvízben oldottuk fel van der Zwaal módszere alapján. Az olanzapint minimális mennyiségű, 1 M koncentrációjú sósavban oldottuk fel, és csapvízzel hígítottuk tovább. Az oldat pH-ját 1 M-os NaOH-dal állítottuk be 5.5 értékre. Az ivóvízben oldott olanzapin mennyiségét folyamatosan változtattuk a napi vízfogyasztás és a testsúly alapján, hogy a napi olanzapin bevitel 2 mg/kg legyen, a kontroll csoport csapvizet kapott. A kezelést 24 napig folytattuk. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy ez a viszonylag alacsony olanzapin dózis hatékonyan növeli a testsúlyt nőstény Sprague-Dawley patkányokban, továbbá bizonyították, hogy ez az olanzapin dózis és beviteli mód a plazma olanzapin szintet a humán terápiás sávban tartja.

Metabolikus mérések

A napi táp- és vízfogyasztást, valamint a széklet- és vizeletürítést metabolikus ketec segítségével mértük (3701M081, Tecniplast Corp., Buguggiate, Olaszország).

Az állatok testsúlyát naponta mértük a pontos olanzapin adagolás érdekében. Az első testsúlymérés alapján történt a csoportkiosztás, az utolsó napi testsúly adatok alapján állapítottuk meg az olanzapin kezelés hatását.

A kísérlet végén az állatokat az arteria carotison keresztül elvéreztettük, majd az intraabdominális és inguinális fehér zsírszövetet kimetszettük, azok súlyát lemértük. A teljes adipozitást a lemért zsírpárnák grammban megadott abszolút súlyaként, valamint a testsúlyhoz viszonyított százalékos adatként is kifejeztük.

Az inzulinérzékenység meghatározása

A teljes test inzulinérzékenységét izotópos HEGC módszerrel határoztuk meg. Az állatokat egy éjszakán át éhezettük, majd 50 mg/kg intraperitoneálisan adott tiopentállal elaltattuk őket (Thiopental Sandoz®, Sandoz Pharmaceutical PLC, Svájc). A műtét és a

kísérlet alatt az állatokat fűthető műtőasztalon tartottuk, mely 37-37.5°C maghőmérsékletet biztosított. A nyak ventrális oldalán hosszirányú bemetszést követően feltárt tracheába a spontán légzés biztosítása érdekében polietilén csövet vezetünk. A vérmintavételhez a bal oldali arteria carotisba egy, az intravénás infúziókhoz jobb és bal oldali vena jugularisok ágaiba összesen három kanült helyeztünk.

30 perc stabilizációs periódust követően ($t=-60$. perc) intravénásan tríciummal jelzett glükózt (3-[3H]-glükóz, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) kezdtünk el folyamatos infúzióban adagolni az éhgyomri hepatikus glükózprodukción (HGP) meghatározásához (5 μ Ci bolus 1 perc alatt, majd 0.075 μ Ci/min a teljes kísérlet alatt). A $t=0$. percben indítottuk az inzulin (Humulin R®, Eli Lilly, Indianapolis, IN, Egyesült Államok) infúziót 3 mU/kg/min sebességgel, egy másik kanülon keresztül pedig 20 %-os glükóz infúziót kezdtünk adagolni. A kísérlet folyamán a glükóz infúzió sebességét úgy szabályoztuk, hogy a vércukorszint az euglikémiás tartományban (5.5 ± 0.5 mmol/l) maradjon. A vércukorszintet vércukormérővel (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Budaörs, Magyarország) határoztuk meg az artériás kanülon keresztül 5-10 percenként vett vérmintákból. Az éhgyomri és az egyensúlyi inzulinszintet a $t=-60$. és a $t=120$. percben vett vérmintákból, az éhgyomri és az inzulin stimulált HGP-t a $t=0$. és a $t=120$. percben vett vérmintákból (0.5 ml, 20 μ l EDTA és 10 μ l Trasylol; Bayer, Leverkusen, Németország) határoztuk meg. A mintákat centrifugáltuk (Centrifuge 5415R, Eppendorf GmbH, Németország, 10000g 2 percig 4°C-on), és a felülúszókat -70°C-on tároltuk a későbbi mérésig.

Számított paraméterek

A GIR, ISI, MCRI és HOMA-IR számítása a fentebb ismertetett módon történt.

Hepatikus glükózprodukción

Az éhgyomri HGP-t (bHGP) a $t=0$. percben vett vérmintákból határoztuk meg. Bazális állapotban a vérbe kerülő glükóz mennyisége (rate of appearance, Ra) egyenlő a vérkeringésből távozó glükóz mennyiségével (rate of disappearance, Rd). A bazális HGP-t úgy számítjuk, hogy a dpm/min-ben megadott 3-[3H]glükóz infúzió sebességét elosztjuk a plazma 3-[3H]glükóz specifikus aktivitásának és a testsúllynak a szorzatával:

$$\text{bHGP} = \frac{3 - [^3\text{H}] - \text{glükóz infúziós ráta}}{3 - [^3\text{H}] - \text{glükóz specifikus aktivitás} * \text{testsúly}}$$

Az inzulin stimulált HGP (iHGP) meghatározása hasonló módon történt, de ilyenkor a Ra nem csak a máj glükóztermeléséből, hanem az intravénásan adott glükóz mennyiségéből is adódik. Emiatt a t=120. percben vett vérmintákból az iHGP-t úgy számítjuk, mint az éhgyomri HGP esetében, de levonjuk belőle a steady state állapotban adott GIR-t:

$$\text{iHGP} = \frac{3 - [^3\text{H}] - \text{glükóz infúziós ráta}}{3 - [^3\text{H}] - \text{glükóz specifikus aktivitás} * \text{testsúly}} - \text{GIR}$$

A plazma 3- $[^3\text{H}]$ -glükóz aktivitást Ba(OH)₂-dal és ZnSO₄-dal precipitált mintákból mértük a $[^3\text{H}]$ -mal jelzett víz elpárologtatása után.

Gyors inzulinérzékenység teszt (RIST)

A RIST-et a posztprandiális inzulinérzékenység meghatározására alkalmaztuk a korábbi cikkeinkben leírt módon. Az anesztézia indukció után (50 mg/kg tiopentál ip.) az állatokat fűthető műtőasztalra helyeztük. A tracheát feltártuk és a behelyezett kanüllel biztosítottuk a szabad légzést. A vena jugularis ágaiba vezetett kanülon keresztül adtuk az inzulin és glükóz infúziót, az artériás kanül vérvételre szolgált.

30 perc stabilizációs időszakot követően az arteria carotison keresztül 5 percenként vett vérből vércukorszinteket határoztunk meg. Amikor három egymást követő vércukormérés eredménye stabil plazma glükózszintet mutatott, azt az átlagértéket kezdeti vércukorszintnek vettük. Ezután 50 mU/kg bolus inzulint (Humulin R®, Eli Lilly, Indianapolis, Indiana, Egyesült Államok) adtunk be 5 perc alatt intravénásan. Ezzel egyidőben indítottuk a 20%-os glükóz infúziót. A vércukorszintet 2 percenként ellenőriztük, és a glükóz infúziós sebességet úgy szabályoztuk, hogy tartsuk a korábban meghatározott kezdeti vércukorszintet. A beadott inzulin hatásának ellensúlyozásához szükséges összes glükózmennyiség (mg/kg-ban megadva) adta a RIST indexet, mely a teljes test inzulinérzékenységét jellemzi.

Hormonszintek meghatározása

A lefagyasztott vérmintákból MILLIPLEX MAP Rat Metabolism Panel (RGT-88K-08, EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA) segítségével határoztuk meg az inzulin, aktív GLP-1, teljes GIP, PP, teljes PYY, aktív ghrelin, aktív amilin és leptin plazmaszintjét.

Statistikai számítások

Az eredményeket átlag $\pm$ SD formátumban ábrázoltuk. A kiértékelés során, ahol lehetséges volt, páros, vagy kétmintás t-tesztet végeztünk, egyébként egyszempontos varianciaanalízist alkalmaztunk, melyet Bonferroni t-teszttel egészítettünk ki.

4. EREDMÉNYEK

Krónikus klozapin kezelés metabolikus hatásainak vizsgálata CCK-1 receptor hiányos Otsuka Long Evans Tokushima Fatty patkányon

A társszerzők hozzájárulása az eredményekhez

Dr. Szilvássy Zoltán és Dr. Peitl Barna állította össze a kísérleti protokollt.

A klozapin kezelést, a metabolikus méréseket, a first meal és az inzulinérzékenység meghatározását önállóan végeztem.

Dr. Kovács Diána segített a HEGC műtéti előkészítésében.

Dr. Drimba László Péter segített az adatok statisztikai kiértékelésében.

Dr. Sári Réka segített az ábrák elkészítésében.

Dr. Varga Angelika végezte az mRNS expressziós vizsgálatokat.

Dr. Németh József végezte az inzulin RIA méréseket.

A krónikus klozapin kezelés hatása a testsúlyra és test zsírtartalmára

A vizsgálat végén nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és klozapin kezelt csoportok testsúlya között sem a LETO, sem az OLETF állatoknál. A LETO patkányok kezdő súlya 367 ± 23 g volt a kontroll, és 367 ± 15 g a klozapin kezelt csoportban. A várakozásnak megfelelően a funkcionális CCK-1 receptor hiányos

OETF állatok kezdő súlya valamivel magasabb volt a LETO állatok súlyánál, 388 ± 7 g-ot mértünk a kontroll, és 402 ± 9 g-ot a klozapin kezelt csoportban. A kezelési időszak végére az OETF állatok szignifikánsan többet nyomtak, mint a megfelelő LETO társaik, viszont a klozapin kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a súlygyarapodást.

A fehér zsírpárnák abszolút súlyát összehasonlítva látható volt, hogy az OETF patkányok szignifikánsan több fehér zsírt halmoztak fel, mint a LETO állatok, és ez a különbség akkor is szignifikáns maradt, ha az adipozitást a testtömeghez viszonyítva, százalékos formában adtuk meg. A krónikus klozapin kezelés szignifikánsan megemelte a fehér zsírszövet mennyiségét mind a LETO, mind az OETF állatokban.

A krónikus klozapin kezelés hatása a táplálkozásra

A napi tápfogyasztás tekintetében nem volt szignifikáns különbség a LETO és OETF állatok között, és a krónikus klozapin kezelés csak kismértékű, de nem szignifikáns emelkedő tendenciát okozott. Következésképp a klozapin a kumulatív táplálékfelvételre sem volt hatással a LETO és OETF patkányokban. Viszont a FMS-t és FMD-t összehasonlítva azt találtuk, hogy a klozapin kezelés mind a LETO, mind az OETF állatokban jelentősen növelte a FMS-t és a FMD-t. A klozapin másfelől nem befolyásolta a táplálkozási hatékonyságot.

A krónikus klozapin kezelés hatása a glükóz metabolizmusra és az inzulinérzékenységre

Az éhgyomri vérmintákat a HEGC indítása előtt vettük, ezekből mértünk éhgyomri vércukor- és inzulinszintet, és az adatokból HOMA-IR indexet számoltunk. Az éhgyomri vércukor- és plazma inzulinszint szignifikánsan magasabb volt az OETF, mint a LETO állatokban. A klozapin kezelés nem okozott szignifikáns változást ezekben a paraméterekben. Ennek megfelelően a HOMA-IR index magasabb volt az OETF, mint a LETO állatokban, de nem láttunk különbséget a kontroll és kezelt csoportok között.

A HEGC steady state állapotában az átlagos glükóz infúziós ráta a kontroll LETO patkányokban szignifikánsan magasabb volt, mint a megfelelő OETF csoportban. A

klozapin kezelés azonban nem csökkentette a GIR-t egyik kezelt csoportban sem (16. ábra). A GIR-hoz hasonlóan az inzulinérzékenységi index a kontroll OLETF állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll LETO csoportban. Ezen felül mindkét klozapin kezelt csoportban az ISI szignifikáns csökkenést mutatott, ami inzulinrezisztenciára utal. A MCRI hasonló volt a LETO és OLETF kontroll csoportok között, azonban a klozapin kezelt állatok MCRI-ja szignifikánsan alacsonyabb volt a megfelelő kontroll csoportokhoz képest.

A CCK receptor mRNS expresszió változásai a hipotalamuszban

A CCK-1 receptor mRNS relatív expresszió változása jelentősen nagyobb volt a klozapin kezelt, mint a kontroll LETO csoportban. Az OLETF állatokban CCK-1 receptor expressziót nem sikerült kimutatni. A kontroll OLETF patkányokban a CCK-2 receptor mRNS szint szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll LETO csoportban. Másfelől a klozapin kezelés jelentős emelkedést okozott a LETO állatokban, azonban az OLETF patkányoknál szignifikáns csökkenés következett be.

Krónikus olanzapin kezelés hatása az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmusra és a gasztrointesztinális peptidek szintjére nőstény Sprague-Dawley patkányon

A társszerzők hozzájárulása az eredményekhez

Dr. Peitl Barna segítette a kísérleti protokoll összeállításában és a kézirat megírásában.

Az olanzapin kezelést, a metabolikus méréseket önállóan végeztem.

Dr. Kovács Diána segítette a HEGC és RIST műtéti előkészítésében és kivitelezésében.

Dr. Kiss Rita végezte a peptid szintek (ghrelin, GLP-1, GIP, leptin, amilin, PYY, PP) meghatározását és segítette a statisztikai kiértékelésben.

Dr. Németh József végezte az inzulin RIA méréseket, és az izotópos HEGC vérmintákból a glükóz aktivitás meghatározását.

Dr. Sári Réka közreműködött az adatok kiértékelésében és a kézirat piszkolatának elkészítésében.

Dr. Szilvássy Zoltán ellenőrizte a kéziratot és közreműködött a végleges változat elkészültében.

A krónikus olanzapin kezelés hatása a napi táp- és vízfogyasztásra, széklet- és vizeletürítésre

A krónikus olanzapin kezelés nem okozott szignifikáns változást a napi táp- és vízfogyasztásban. Hasonlóképp a napi széklet- és vizeletürítés tekintetében sem volt szignifikáns különbség a kontroll és kezelt állatok között. Az ürített széklet 19.4 ± 1.4 g és 18.9 ± 1.7 g, a termelt vizelet 16.7 ± 1.0 ml és 17.1 ± 1.1 ml volt a kontroll és olanzapin kezelt csoportban.

A krónikus olanzapin kezelés hatása a testsúlyra és test zsírtartalmára

A vizsgálat kezdetén a két fő csoport között nem volt szignifikáns eltérés a kezdeti testsúly tekintetében, a vizsgálat végén azonban a krónikus olanzapin kezelt állatok súlya szignifikánsan nőtt a kontroll állatokhoz képest. A kezelés szignifikáns növekedést okozott az adipozitásban is.

Az olanzapin kezelés hatása az inzulinérzékenységre

A krónikus olanzapin kezelés inzulinrezisztenciát váltott ki az egészséges nőstény patkányokban. A HOMA-IR szignifikánsan nőtt, a GIR, ISI és MCRI jelentősen csökkent a kezelt állatokban a kontroll csoporthoz viszonyítva. A bazális HGP szignifikánsan magasabb volt a kezelt, mint a kontroll állatokban, ami hepatikus inzulinrezisztenciára utal éhgyomri állapotban. Az inzulin stimulált HGP jelentősen csökkent mindkét csoportban, azonban a kezelt állatok iHGP-ja szignifikánsan nagyobb volt a kontroll csoporthoz képest.

Az olanzapin kezelés hatása a posztprandiális inzulinérzékenységre

Az éheztetett állatok alacsony RIST indexe éhgyomri inzulinrezisztenciára utal, mely mindkét csoportban jelentősen javult evés után. A kontroll és olanzapin kezelt csoportokat összehasonlítva sem az éhgyomri, sem a posztprandiális inzulinérzékenység között nem találtunk szignifikáns eltérést.

Az olanzapin kezelés hatása vércukorra és metabolikus hormonszintekre

Az olanzapin kezelt csoport éhgyomri vércukorszintje szignifikánsan magasabb volt a kontroll állatokhoz képest. Az éhgyomri plazma inzulinszint szintén jelentősen emelkedett. Ennek megfelelően a HOMA-IR a kezelt állatokban éhgyomri inzulinrezisztenciát mutatott. Az éhgyomri leptin szint magasabb, a ghrelin szint alacsonyabb volt a kezelt állatokban, a többi hormon (GIP, amilin, GLP-1, PYY, PP) szintje nem mutatott eltérést a kontrollhoz viszonyítva.

Evés után 2 órával a kontroll és olanzapin csoport plazma inzulin, leptin és GIP szintje szignifikáns emelkedést mutatott a megfelelő éheztetett állatokhoz képest. A posztprandiális plazma ghrelin szint csak a kontroll állatokban csökkent jelentősen. Az amilin, GLP-1, PYY és PP szint nem változott evés után.

5. MEGBESZÉLÉS

Krónikus klozapin kezelés metabolikus hatásainak vizsgálata CCK-1 receptor hiányos Otsuka Long Evans Tokushima Fatty patkányon

Vizsgálatunk során kimutattuk, hogy bár a klozapin kezelés nem okozott elhízást sem a LETO, sem az OLETF állatokban, mindkét fajtában jelentősen növelte a test zsírtartalmát (a perirenális, intraabdominális és epididimális zsírpárnák súlyát). A klozapin nem volt hatással a táplálék- és vízfelvételre, ez magyarázhatja, hogy nem találtunk változást a testsúlygyarapodásban sem. Ugyanakkor a klozapin befolyásolta a táplálkozás mintázatát, hiszen mind a LETO, mind az OLETF csoportban megnőtt a FMS és FMD. Emellett a klozapin kezelés csökkentette az inzulinérzékenységi indexet és az inzulin metabolikus clearance-ét. Végül igazoltuk, hogy a krónikus klozapin kezelés növeli a CCK-1 és CCK-2 receptor hipotalamikus expresszióját a LETO állatokban, míg az OLETF patkányokban jelentős CCK-2 receptor expresszió csökkenés következett be.

Több tanulmány eredményei támogatják a feltevést, hogy az AAP-k a táplálkozás stimulálásán keresztül okoznak elhízást. A nagyszámú neurotranszmitter és receptor közül, melyek szerepet játszhatnak az AAP-k indukálta hiperfágiában a kolecisztokinin

vizsgálatát tűztük ki célul. A CCK volt az első gasztrointesztinális peptid, amelynek étvágy szabályzó hatását felfedezték. Mind a kívülről beadott, mind – az étkezés után – endogén módon felszabaduló CCK csökkenti a táplálékbevitelt azáltal, hogy a meal size-t és az étkezés időtartamát csökkenti. Az atípusos antipszichotikum kezelés során a CCK hatásaihoz hasonló táplálkozásmintázati változások figyelhetők meg. Másfelől egy, az olanzapint vizsgáló tanulmány arról számolt be, hogy az akut olanzapin kezelés növelte a FMS-t, de ez a hatása CCK-tól független módon jött létre.

Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a krónikus klopapin kezelés CCK-1 receptortól független módon növelte az adipozitást. Bár a test zsírtartalma jelentősen emelkedett, a klopapin nem volt hatással a testsúlynövekedésre a LETO és OLETF állatokban. Ez a megfigyelés ellentmondani látszik a klinikai adatoknak, melyek szerint a klopapin okozza az egyik legnagyobb mértékű hízást. Másfelől, ha a rágcslókon végzett kísérletek eredményeit nézzük, ellentmondásos eredményekkel találkozunk. A korai vizsgálatok arról számolnak be, hogy az atípusos antipszichotikumok nem okoznak elhízást rágcslókban, míg más tanulmányok azt találták, hogy a hatás ivari különbségeket mutat, és csak nőstényekben figyelhető meg. Shobo és munkatársai szubkután mikroinfúziós pumpával olanzapinnal kezelt him Sprague-Dawley patkányokat vizsgáltak, és megállapították, hogy az olanzapin testsúlygyarapodás és fokozott táplálékfelvétel nélkül növelte az adipozitást. Amellett, hogy a mi eredményeink is ezt a megfigyelést támasztják alá, további betekintést tudunk nyújtani abba, hogy a klopapin milyen hatással van a táplálékfelvételre. Bizonyítottuk, hogy bár a klopapin nem növelte a napi táplálékbevitelt, mind a LETO, mind az OLETF patkányokban növelte a FMS-t és FMD-t, ami arra utal, hogy ebben a tekintetben nincs direkt kapcsolat a klopapin hatás és a CCK-1 receptor mediált jelátviteli útvonalak között. Ezen eredményünk összhangban van van der Zwaal vizsgálatával, mely azt igazolta, hogy az akut olanzapin kezelés CCK-független módon növeli a meal size-t.

Továbbá a klopapin-indukált CCK-1 és CCK-2 receptor expresszió emelkedése a LETO patkányokban arra utal, hogy a klopapin a hipotalamusz szintjén hatással lehet a táplálékfelvétel szabályozására egészséges állatban. Az OLETF csoportban azonban a CCK-2 receptor expresszió csökkenését figyeltük meg, ellentétben a LETO eredményekkel. Ennek a látszólagos ellentmondásnak egy lehetséges magyarázata lehet, hogy a CCK-1 és CCK-2 receptorok között létezhet egyfajta funkcionális kompenzáció

mechanizmus, és a CCK-1 receptor hiánya facilitálhatja a CCK-2 receptor expressziót. Azonban az éhség-jóllakottság bonyolult módon szabályozott folyamat, melyben számos peptid és neurotranszmitter vesz részt, és egy komponens eltávolítása olyan előre nem látott következményekkel járhat, mint esetünkben a klozapin ellentétes hatása a CCK-2 receptor hipotalamikus expressziójára az OLETF állatokban.

A krónikus klozapin kezelés nem befolyásolta a testsúlyt, ami az alkalmazott dózissal magyarázható. Lehetséges, hogy a 10 mg/kg napi dózis szedációt és következményes aktivitáscsökkenést okozott, így csökkenhetett a táplálékfelvétel is. Továbbá a kisebb aktivitás okozhat izomtömeg-csökkenést is, ami magyarázhatja, miért nem változott a testsúly a megnövekedett adipozitás ellenére. Másfelől a klozapin-indukált súlygyarapodást leggyakrabban a 7.5-12 mg/kg dózistartományban vizsgálták. Egy másik magyarázat az lehet, hogy az állatok kompenzálták a szedáció miatt kieső időt az étkezések nyújtásával vagy az étkezések közti időszakok csökkentésével. Ha pontosan tisztázni akarjuk a klozapin lehetséges szerepét a táplálkozási mintázatban, további kísérletekre lesz szükség. Az ivarspecifikus hatás sem zárható ki, hiszen számos adat azt a feltevést támasztja alá, hogy a nőstény patkányok hajlamosabbak hízni atípusos antipszichotikum kezelés hatására, és a legtöbb AAP rágcslómodellt is nőstény állatokra fejlesztették ki.

Az éhgyomri vércukor- és plazma inzulinszintben nem találtunk változást, ami arra utal, hogy a krónikus klozapin kezelés nem befolyásolta a bazális (éhgyomri) inzulinérzékenységet. Másrészt az inzulinérzékenységi index szignifikáns csökkenését figyeltük meg a HEGC során beállított hiperinzulinémia alatt. Ha a HEGC módszert alkalmazzuk a teljes test inzulinérzékenységének meghatározására, a steady state periódus átlagos glükóz infúziós rátája a leggyakrabban használt paraméter. Viszont hepatikus inzulinrezisztencia esetén a GIR alábecsüli az inzulinérzékenységet, hiszen ebben az esetben nemcsak az exogén, hanem a májból felszabaduló glükóz is felvételre kerül az inzulinszenzitív szövetekbe. Ilyenkor az inzulinérzékenységet akkor jellemezhetjük hitelesen, ha kiszámítjuk, hogy egységnyi inzulin mennyi glükóz felvételre segíti elő. Vizsgálatunkban bizonyítottuk, hogy bár az éhgyomri glükóz- és inzulinszintek nem változtak a 25 napos klozapin kezelés hatására, kísérletesen előállított hiperinzulinémia alatt a klozapin kezelt állatok inzulinszenzitív szövetei kevesebb glükózt vettek fel egységnyi inzulin hatására, mint kontroll társaik, ami

összefügg azzal a klinikai megfigyeléssel, miszerint a kettes típusú diabetesz kifejlődésének első jele inzulinérzékenység-csökkenés az éhgyomri vércukor- vagy plazma inzulinszint változása nélkül. Feltételezzük, hogy a csökkent metabolikus clearance ráta jelentősen hozzájárul a megfigyelt alacsonyabb inzulinérzékenységi indexhez.

Eredményeink azokat a preklinikai és klinikai megfigyeléseket is alátámasztják, melyek szerint az AAP-indukált inzulinrezisztencia elhízás nélkül is kifejlődhet. Másrészt megemlítendő, hogy a klozapin kezelt állatok fehér zsírszövege nagymértékben megnőtt a klozapin kezelés hatására, és a zsírból felszabaduló hormonok (pl. rezisztin, leptin, TNF- α , IL-6, adiponektin) szerepe az inzulinrezisztencia kialakulásában nem kérdéses. Legalább két lehetséges magyarázata lehet annak, hogy a krónikus klozapin kezelés hatására a glükóz infúziós ráta nem változott, viszont az inzulinérzékenységi index és a MCRI csökkent. Az első esetben feltételezzük, hogy a klozapin perifériás inzulinrezisztenciát okoz hepatikus inzulinérzékenység befolyásolása nélkül. Ekkor a HEGC során fenntartott hiperinzulinémia teljesen felfüggeszti a máj glükóztermelését, és a perifériás szövetek (pl. vázizom, fehér zsírszövet) a kontroll és klozapin kezelt állatokban ugyanakkora mennyiségű glükózt vesznek fel. Ebben az esetben a csökkent MCRI egy kompenzatórikus mechanizmusként fogható fel, mely biztosítja a glükózfelvételhez szükséges magasabb inzulinszintet a klozapin kezelt állatokban a perifériás inzulinrezisztencia ellensúlyozására. Az is elképzelhető, hogy a klozapin hepatikus inzulinrezisztenciát okoz, amire több irodalmi adatot találunk. Ebben az esetben a klozapin kezelt állatok perifériás szövetei több glükózt vesznek fel, mivel a glükóz infúziós ráta a kontroll és kezelt csoportok között hasonló volt, de a kezelt állatokban ehhez hozzáadódott a máj felől a keringésbe belépő glükóz is. Ebben az esetben az alacsonyabb MCRI biztosítaná azt a plusz inzulint, amely a többlet glükóz felvételéhez szükséges.

Krónikus olanzapin kezelés hatása az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmusra és a gasztrointesztinális peptidek szintjére nőstény Sprague-Dawley patkányon

Jelen eredményeink kiegészítik azon korábbi megfigyelésünket, mely szerint az egyszeri olanzapin kezelés nem befolyásolja a posztprandiális inzulinérzékenyítő mechanizmust, viszont képes csökkenteni az éhgyomri inzulinérzékenységet. Amellett, hogy eredményeink megerősítik a krónikus olanzapin kezelés kedvezőtlen hatását az éhgyomri inzulinérzékenységre, legjobb tudomásunk szerint elsőként számolunk be a hosszú távú olanzapin kezelés MIS-re gyakorolt hatásáról. Jelen vizsgálatunkban bizonyítottuk, hogy a 24 napos olanzapin kezelés ellenére a MIS változatlan maradt, de éhgyomri inzulinrezisztencia alakult ki. Ez utóbbi a bazális HGP növekedésének és az inzulin metabolikus clearance csökkenésének következménye. Az olanzapin hatására jelentősen gyarapodott a testsúly és a fehér zsírszövet, annak ellenére, hogy a napi táplálékfelvételben nem láttunk változást. Az inzulinrezisztens állapotnak és a megemelkedett zsírtömegnek megfelelően emelkedést láttunk az éhgyomri inzulin és leptin szintekben. Az olanzapin kezelt csoport éhgyomri ghrelin szintje alacsonyabb volt az olanzapin kezelt csoportban, és táplálékfelvétel után nem változott.

A MIS segít alkalmazkodni a posztprandiális glükózterheléshez. Ez az endogén mechanizmus evés után aktiválódik, és tranziens inzulinérzékenység-fokozódást vált ki, ami hozzájárul az inzulinszenzitív szövetek, főként a vázizom fokozott glükózfelvételéhez. Ha ez a folyamat hosszú távon károsodik, kettes típusú diabeteszhez hasonló állapotot eredményezhet. Adataink felvetik annak lehetőségét, hogy a MIS gyógyszeres aktivációja terápiásan kiaknázható lehet az olanzapinnal kezelt betegek inzulinérzékenységének javítására. Ezzel együtt viszont nem tudunk elégséges magyarázatot adni arra, hogy az olanzapin miért nem befolyásolja az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmust. A MIS atropin szenzitív, és mivel az olanzapin nagy affinitással kötődik a muszkarin típusú acetil-kolin receptorokhoz, úgy gondoltuk, hogy akután gátolni fogja ezt a mechanizmust. Meglepő módon az olanzapin sem egyszeri, sem hosszú távú orális kezelés után sem befolyásolta a MIS-t. Elképzeltető, hogy a megfigyelt jelenség hátterében az olanzapin muszkarin receptor altípusok iránti eltérő

szelektivitása áll, de ahhoz, hogy ezt a kérdést megválaszoljuk, további kísérletekre lenne szükség.

Vizsgálatunk további rálátást ad az olanzapin okozta éhgyomri inzulinrezisztenciára. Az állatok éhgyomri glükóz- és inzulinszintje megemelkedett, mely valószínűleg a fokozott hepatikus glükóztermelés következménye. A hiperinzulinémiás clamp alatt mért alacsony GIR és ISI további bizonyítékkal szolgál az éhgyomri inzulinrezisztenciára. A 3-[3H]-glükózzal végzett vizsgálatok eredményei bazális és inzulin stimulált hepatikus inzulinrezisztenciát igazoltak, mely hozzájárulhat a clamp során kapott GIR és ISI értékekhez. Az inzulin csökkent metabolikus clearance szintén szerepet játszhat a kialakuló inzulinrezisztenciában. Eredményeink összhangban állnak azokkal a korábbi tanulmányokkal, melyek a krónikus olanzapin kezeléssel összefüggő éhgyomri inzulinrezisztenciáról számolnak be. Más munkacsoportok gyakran az egyszeri olanzapin hatását vizsgálták a teljes test inzulinérzékenységére, mert úgy néz ki, hogy az akut olanzapin kezelés jól modellezi a krónikus adás hatásait. Azonban úgy tűnik, hogy mind az akut, mind a krónikus kezelés során tapasztalt metabolikus változások, akár olanzapinnal, klopazinnal, vagy egyéb AAP-mal történt a kezelés, elsősorban hepatikus inzulinrezisztencián keresztül jönnek létre.

Az olanzapin testsúlyra gyakorolt hatásait a legtöbb szerző nőstény patkányokon tudta vizsgálni. Az olanzapin féléletideje jelentősen rövidebb patkányban, mint emberben, ezért a napi egy-kétszeri sc., ip. injekció, vagy per os adásmódok nem biztosítanak megfelelő plazmaszintet. Még az olanzapint folyamatosan felszabadító ozmotikus minipumpa sem alkalmas hosszú távú kísérletre, mert az anyag idővel elbomlik benne. Ezen hibák kiküszöbölésére az olanzapint az itatóvízbe kevertük, mely adásmóddal kapcsolatban számos sikeres vizsgálat született, hím és nőstény patkányban egyaránt. Az olanzapin növelte a testsúlyt és az adipozitást, melyet a perirenális, intraabdominális és inguinális zsírszövet tömegével fejeztünk ki. Megfigyeléseink összhangban vannak más kutatócsoportok eredményeivel, akik szintén az intraabdominális zsírszövet gyarapodását mutatták ki patkányban. Meglepő módon, a kezelt csoportban mért testsúlynövekedés és az adipozitás emelkedése nem társult hiperfágiával. Ez a megfigyelés nincs összhangban az irodalmi adatok többségével, azonban vannak olyan tanulmányok is, melyek elhízásról, és a zsírszövet

gyarapodásáról számolnak be hiperfágia hiányában. Ennek a megfigyelésnek egy lehetséges magyarázata az lehet, hogy a kezelt állatok energialeadása lecsökken. A vizsgálatunkban alkalmazott olanzapin dózis valóban okozhat szedációt, mely miatt csökken az izommunka és a felhasznált energia.

Ahhoz, hogy képet kapjunk a krónikus olanzapin kezelés okozta hormonális változásokról, meghatároztuk az éhgyomri inzulin, leptin, ghrelin, GIP, GLP-1, amilin, PYY és PP szinteket. A GLP-1, amilin, PYY és PP szintekben nem láttunk változást, a kezelt állatokban az inzulin is leptin szint jelentősen nőtt, a ghrelin jelentősen csökkent a kontroll csoporthoz képest. A ghrelin szint posztprandiálisan lecsökkent a kezeletlen állatokban, de az olanzapin csoportban nem láttunk változást. Az éhgyomri hiperinzulinémia hepatikus inzulinrezisztenciára utalhat. A HEGC egyensúlyi állapotában az olanzapinnal kezelt állatok plazma inzulinszintje magasabb volt, ami a csökkent ISI-t magyarázza. Az MCRI eredmények arra utalnak, hogy ez a megemelkedett inzulinszint legalább részben az inzulin csökkent eliminációjának következménye. Eredményeinket korábbi közlemények is alátámasztják, melyek olanzapin hatására kialakuló hiperinzulinémiáról számolnak be.

Az olanzapinnal kezelt patkányok éhgyomri leptin szintje szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, de a posztprandiális leptin szintben nem láttunk különbséget. A magas éhgyomri leptin szint a megemelkedett adipozításra utal, hiszen a plazma leptin szintje és a zsírszövet tömege között mind rágcsálókban, mind emberben pozitív összefüggést mutattak ki. Továbbá, humán adatok vannak arra vonatkozóan, hogy az olanzapin okozta elhízás magas leptin szintet hoz létre.

A ghrelin szintekben is kettős változást figyeltünk meg. Az éhgyomri ghrelin szint jelentősen alacsonyabb volt az olanzapinnal kezelt csoportban, posztprandiálisan viszont magasabbnak találtuk, azaz táplálékfelvétel után a kezelt állatokban nem csökkent le a ghrelin szintje. A ghrelin élettani szerepével kapcsolatos vezető elmélet alapján az olanzapinnal kezelt állatokban az éhgyomri ghrelin szint emelkedését vártuk volna. Ennek az ellenkezőjét találtuk, a bazális ghrelin szint alacsonyabb volt, mint a kontroll patkányoknál. Valószínűsíthető, hogy a magas inzulin és leptin szint felelős az alacsony éhgyomri ghrelin szint kialakulásáért. Ezt a feltételezést támogatja egy friss közlemény, mely szerint az atípusos antipszichotikumok háromfázisú hatást

gyakorolnak a ghrelin szintekre: a kezelés első 1-2 hetében kezdeti emelkedés, majd egy emberben 2-6, rácsálókban 1 hétig tartó átmeneti csökkenés figyelhető meg, végül a plazma ghrelin szint újra a kezdeti értékre áll be. Úgy gondoljuk, hogy vizsgálatunkban a metabolikus hormonszintek meghatározása erre a downregulációs szakaszra esett, ez magyarázhatja a mért alacsony ghrelin szinteket. Két órával az evés kezdete után a kezelt állatokban a ghrelin szint nem változott szignifikánsan az éhgyomri értékhez képest. Táplálékfelvétel után a ghrelin szintnek csökkennie kellett volna. Ennek a meglepő eredménynek egy lehetséges magyarázata a plazma inzulin és leptin szint posztprandiális, relatív változásában lehet. Az olanzapinnal kezelt állatok posztprandiális inzulin és leptin szintjének változása mindössze 49% és 88% volt, szemben a kontroll csoportnál mért 166% és 464% értékkel. Másik magyarázat lehet, hogy a plazma ghrelin szint már korábban visszatér az alapértékre a kezelt állatokban a kezeletlen csoporthoz képest. Ahhoz, hogy további információkat kapjunk az olanzapinnal kezelt állatok posztprandiális ghrelin szintjének időbeli változásairól, további kísérletekre lesz szükség.

A többi metabolikus hormon szintje a GIP-től eltekintve posztprandiálisan nem változott, azonban az olanzapin kezelés nem befolyásolta a GIP szintjét sem. A többi hormont tekintve feltételezhető, hogy az olanzapin metabolikus hatásmechanizmusa független a GLP-1, amilin, PYY és PP jelátviteli útvonalaitól, bár nem zárhatjuk ki, hogy az olanzapin hatással van ezen paraméterekre, hiszen a hormonszintek meghatározása 2 órával a táplálékfelvétel után történt, így nincs információnk a posztprandiális első két óra hormonszint változásairól. Egyes szerzők szerint orális glükózterhelés után két órával a metabolikus hormonok szintje visszaáll az alapértékre, továbbá, eredményeink alátámasztják azokat a klinikai adatokat, melyek szerint az olanzapin nem hat a gasztrointesztinális hormonszekrécióra.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen tanulmány az atípusos antipszichotikum terápiával összefüggő metabolikus elváltozások és a táplálékfelvétel és inzulinérzékenység szabályozásában szerepet játszó, perifériásan felszabaduló hormonok kapcsolatának vizsgálatát tűzte ki célul. További célkitűzésünk annak vizsgálata volt, hogy a krónikus atípusos antipszichotikum kezelés befolyásolja-e a táplálékfelvétel során aktiválódó endogén inzulinérzékenyítő mechanizmust.

Első kísérlet sorozatunkat genetikailag kolecisztokinin-1 (CCK-1) receptor hiányos Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) patkányokon és azok egészséges párjain végeztük. A krónikus klozapin kezelés mindkét vonalban megnövelte a rövid távú táplálékfelvételt, és annak ellenére, hogy a testsúly nem változott, az állatok jelentős zsírtöbbletet halmoztak fel, ami összefüggésben állhat a megfigyelt inzulinrezisztenciával.

Második kísérlet sorozatunkban a krónikus olanzapin kezelés hatását vizsgáltuk a gasztrointesztinális peptidekre és a posztprandiális inzulinérzékenyítő mechanizmusra. Az olanzapin növelte a testsúlyt és a test zsírtartalmát, és jelentős inzulinrezisztenciát alakított ki. A magas éhgyomri inzulin- és leptinszint mellett megfigyelt ghrelin szintek változásai arra utalnak, hogy a leptinérzékenység még valamelyest megtartott, de elképzelhető, hogy hosszabb távú kezelés mellett a ghrelin szintek jelentős emelkedését láttuk volna. Az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus nem károsodott.

Új tudományos eredmények:

- Elsőként vizsgáltuk a krónikus atípusos antipszichotikum kezelés hatását genetikailag CCK-1 receptor deficiens állatmodellben.
- Eredményeink azt támasztják alá, hogy a hosszú távú klozapin kezeléssel összefüggő változások CCK-1 receptortól független útvonalakon alakulnak ki.
- Igazoltuk, hogy az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus a krónikus olanzapin kezelés mellett megtartott marad, ami azért előnyös, mert annak farmakológiai aktiválásával valószínűleg javíthatjuk vagy megelőzhetjük az olanzapinnal kezelt betegek inzulinrezisztenciáját.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként témavezetőmnek, dr. Peitl Barnának szeretnék köszönetet mondani, aki széleskörű ismereteivel támogatott és bevezetett a kísérletes munka gyakorlati folyamatába, lehetővé téve elméleti és módszertani ismereteim folyamatos bővítését, és disszertációm elkészítését.

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

Külön köszönöm a munkáját Dr. Kiss Ritának és Dr. Kovács Diánának a kísérletek során nyújtott segítségükért, és hogy szakmai tanácsaikkal folyamatosan támogattak.

Köszönöm Dr. Varga Angelikának a génexpressziós vizsgálatban nyújtott gyakorlati segítséget, és Dr. Németh Józsefnek az izotópos HEGC elvégzésében és a RIA mérésekben végzett munkáját.

Munkacsoportunk jelenlegi és egykori tagjai a kísérleti munka előkészítésében és az egyes részfeladatok elvégzésében nyújtottak nélkülözhetetlen segítséget: Dr. Sári Rékának, Szegváriné Erdős Andreának, Dr. Drimba Lászlónak, Marics Balázsnak, Tömöri Zsoltnak ezúton szeretnék köszönetet mondani.

Köszönet illeti a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakológiai Intézet valamennyi dolgozóját.

Végül, de nem utolsósorban hálával tartozom szüleimnek és családomnak, akik végtelen szeretettel és áldozatkészséggel támogattak a pályámon a kezdetektől fogva, és biztosították azt a háttérrel, ami nélkül nem juthattam volna el idáig.

8. FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/256/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

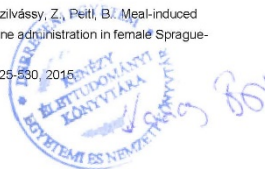
Jelölt: Hegedűs Csaba
Neptun kód: HKBKU7
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hegedűs, C.**, Kovács, D., Kiss, R., Sári, R., Németh, J., Szilvássy, Z., Peitl, B.: Effect of long-term olanzapine treatment on meal-induced insulin sensitization and on gastrointestinal peptides in female Sprague-Dawley rats.
J. Psychopharmacol. 29 (12), 1271-1279, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0269881115602952>
IF:3.593 (2014)
2. **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 OCK-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

További Közlemények

3. Kovács, D., **Hegedűs, C.**, Kiss, R., Sári, R., Németh, J., Szilvássy, Z., Peitl, B.: Meal-induced insulin sensitization is preserved after acute olanzapine administration in female Sprague-Dawley rats.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 388 (5), 525-530, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-015-1091-8>
IF:2.471 (2014)



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



4. Lelesz, B., Tóth, G.K., Peitl, B., **Hegedűs, C.**, Drimba, L., Sári, R., Szilvássy, Z., Németh, J.:
Description and application of a novel glucagon-like peptide-1 (GLP-1) radioimmunoassay.
J. Radioanal. Nucl. Chem. 299, 157-164, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-013-2751-0>
IF:1.415
5. Kovács, D., Simon, Z., Hári, P., Málnási-Csizmadia, A., **Hegedűs, C.**, Drimba, L., Németh, J., Sári, R., Szilvássy, Z., Peitl, B.: Identification of PPAR γ 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
6. Drimba, L., Dobronzte, R., **Hegedűs, C.**, Sári, R., Di, Y., Németh, J., Szilvássy, Z., Peitl, B.: The role of acute hyperinsulinemia in the development of cardiac arrhythmias.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 386 (5), 435-444, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-013-0845-4>
IF:2.36
7. Drimba, L., **Hegedűs, C.**, Yin, D., Sári, R., Németh, J., Szilvássy, Z., Peitl, B.: Beneficial Cardiac Effects of Cioletanine in Conscious Rabbits With Metabolic Syndrome.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 60 (2), 208-218, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0b013e31825c3c4c>
IF:2.383

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,932

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,277

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

Debrecen, 2015.12.09.

