

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A NITROGÉN MONOXID SZEREPÉNEK TANULMÁNYOZÁSA AZ
INZULINREZISZTENCIA KIALAKULÁSÁBAN**

Bajza Ágnes

Témavezető: Prof. Dr. Szilvássy Zoltán, az MTA doktora



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2013

A NITROGÉN MONOXID SZEREPÉNEK TANULMÁNYOZÁSA AZ INZULINREZISZTENCIA KIALAKULÁSÁBAN

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

Írta: Bajza Ágnes okleveles biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Szilvássy Zoltán, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tótsaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Pataricza János, PhD
Dr. Balogh Zoltán, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet könyvtára.
2014. február 21., 13 óra

Az értekezés bírálói: Dr. Vecsernyés Miklós, PhD
Dr. Török Zsolt, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tótsaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Vecsernyés Miklós, PhD
Dr. Török Zsolt, PhD
Dr. Pataricza János, PhD
Dr. Balogh Zoltán, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

DE ÁOK Orvosi Laboratóriumi és Képalkotó Diagnosztikai Tanszék II. sz. szemináriumi
terme
2014. február 21. 14 óra

1. Bevezetés

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

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

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

Fontos megjegyezni, hogy az inzulinrezisztencia a valódi cukorbetegség nélkül is számos, legfőképpen szív-érrendszeri szabályozási zavar kiindulópontja, éppen ezért az inzulin rezisztenciát a koszorúér-betegség független kockázati tényezőjének tekinthetjük.

Az inzulin mennyiségének meghatározása

Mint ismeretes, az inzulin három legfontosabb célszerve a zsírszövet, az izomszövet és a máj, következésképpen az inzulinrezisztencia is e szövetekben, illetve szervben alakul ki.

Centrális inzulinrezisztencia

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

Perifériás inzulinrezisztencia

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

A perifériás inzulinhatás mérési módszerei

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

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

A nitrátok

A szerves nitrát vegyületek, több mint egy évszázada a kardiovaszkuláris betegségek széles körben alkalmazott szereit. Leggyakrabban az angina pectoris és a kongesztív szívelégtelenség terápiájában használják. Ezenkívül az utóbbi években már számos nem kardiovaszkuláris eredetű megbetegedés gyógyszeres, mint például a gasztrointesztinális motilitászavarok, glaucoma vagy a potenciazavarok kezelésében is egyre hangsúlyosabb szerephez jutnak a nitroglicerinnel és származékai. Sőt, inzulinszenzitivizáló hatással is rendelkeznek, amelyet állatkísérletekben és egészséges felnőtt önkéntesekben is kimutattak. Annak ellenére, hogy a nitrát terápia hatékonysága egyedülálló és megkérdőjelezhetetlen, alkalmazása során számos buktatóval kell számolni, melyek közül elsősorban a nitrát tolerancia és a nitroglicerinnel „rebound” a gyakorlati jelentőségük miatt emelendők ki.

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

Nyilvánvalóvá vált, hogy a hemodinamikai nitrát tolerancia gátol néhány endogén adaptív mechanizmust, mint pl. a miokardiális prekondíció antiischemiás hatását, a gasztrointesztinális sphincterek non-adrenerg, non-kolinerg relaxációját, ezenkívül inzulinrezisztenciát is eredményez. Ezt követően feltételezték, hogy a hemodinamikai nitrát tolerancia valamilyen módon összefüggésben áll a táplálék-indukált inzulinérzékenység fokozódással. E feltételezésüket később széles körben elfogadták, mint a leghatékonyabb NO-függő endogén inzulinérzékenyítő mechanizmust.

A kolecisztokinin

A kolecisztokinin (CCK) a gyomor-bélrendszer gastrin-családjába tartozó peptid. Szekréciója a duodenumban és a jejunum proximális részén levő ún. I-sejtekből történik. Ezenkívül a CCK jelen van a szervezet egyéb idegi struktúráiban is, valamint a hasnyálmirigy Langerhans-szigetei körül, ahol valószínűleg szerepe van a β - és az α -sejtek működésének szabályozásában, mivel az inzulin és a glukagon felszabadulását fokozza.

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

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

2. Célkitűzések

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

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

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

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

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

3. Anyagok és módszerek

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

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

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

Műtéti beavatkozás

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

Intravénás glükóz felhasználás

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

Hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC)

Az egyik vénás katéteren keresztül humán inzulint (NOVO Nordisk, Copenhagen, Denmark) infundáltunk 13 mU/kg dózisban 120 percen keresztül. Ez az inzulin infúzió a plazma inzulin immunoreaktivitást körülbelül 100 ± 5 μ U/ml-re állítja be. A vér glükózkonzentrációjának meghatározásához a vérmintákat (0.3 ml) az artériás kanülből vettük 10 perces időintervallumokban. A második vénás kanülon keresztül, a glükóz infúzió sebességének megváltoztatásával a vér glükózkonzentrációját 5.5 ± 0.5 mmol/l értéken tartottuk fenn (euglikémia). Amikor a vér glükózsztintje stabilizálódott kb. 30 percre, ezt az állapotot tekintettük a steady state állapotnak. Ez többnyire az inzulin infúzió megkezdését követő 100 percen belül kialakult. A steady state állapotban további vérmintákat vettünk (0.5 ml) 10

percenként plazma-inzulin meghatározásához. A a steady state ideje alatt mért glükóz infúziós sebességet (mg/kg/min) az inzulin szenzitivitás jellemzésére használtuk.

Hemodinamikai nitrát tolerancia indukciója

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

A kísérlet leírása

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

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

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

transzdermális nitroglicerinnel jelenlétében, toleráns állapotban). A két kontroll csoport pedig placebo tapaszokat kapott a megfelelő kezelési periódus alatt.

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

Statisztikai analízis

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

3.2. A nitrát tolerancia hatásának és a CCK potenciális szerepének vizsgálata a táplálék-indukált inzulin szenzitivizáció jelenségére nyulakban.

A kísérlet leírása

A nyulakat 7 napos akklimatizációs periódus után a nitroglicerinnel 1 perc alatt beadott intravénás teszt dózisának (30 µg/kg) alkalmazásával teszteltük hipotenzív válaszaikra. A vérnyomás maximális csökkenése képezte az értékelés adatait. Azokat a nyulakat, amelyeknél a nitroglicerinnel teszt dózisára nem mutatkozott szignifikáns csökkenés a vérnyomásban, kizártuk a további vizsgálatokból. Az állatokat ezt követően randomizáltuk 3 fő kísérleti csoportba.

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

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

A kísérletsorozat 3. csoportján vizsgáltuk az intraportális CCK infúzió hatását az inzulinérzékenységre. A kísérletet altatott nyulakon (thiopental 25 mg/kg i.v.) végeztük 24 órás éheztetést követően. A nyulak portális vénájába CCK oktapeptid szulfátot (CCK8) infundáltunk 0.3; 1.0 és 3.0 µg/kg/h kumulatív dózisban 20 percen keresztül a HEGC steady state ideje alatt. A CCK legmagasabb infúziós dózisának végén máj mintákat vettünk cGMP meghatározáshoz. E sorozat kontrolljaiként nitrát toleráns (4 db) és nem-toleráns (4 db)

nyulak szolgáltak, amelyek CCK8 vivőanyag infúziót követően nem kaptak CCK8 infúziót. A kísérletek e sorozata igazolta, hogy az intraportális CCK8 infúzió okozhat inzulinérzékenység fokozódást éheztetett nyulakban.

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

A nitrát tolerancia meglétének igazolása

A nyulakon folyamatos, 7 napon keresztül tartó transzdermális nitroglicerint tapaszos, illetve placebo tapaszos kezelést alkalmaztunk, melynek célja az volt, hogy kialakuljon a gliceril trinitrátra (GTN) adott vaszkuláris tolerancia. A GTN vaszkuláris tolerancia kialakulásáról a 7. napon bizonyosodtunk meg, az endotélium-mentes arteria carotis gyűrű preparátum izometrikus tenziójának tesztelésével. Az 5 mm hosszú, izolált arteria carotis gyűrű preparátumon beállítottuk a nyugalmi tenziót (10 mN előfeszítés), majd a norepinephrine EC₅₀ koncentrációjával előfeszítettük. A gyűrűket ezt követően a GTN kumulatív koncentrációjának tettük ki fél-logaritmikus növekedéssel. A fél-maximális relaxáció kiváltásához szükséges GTN koncentráció 0.091 ± 0.012 mM volt a vivőanyaggal kezelt, non-toleráns gyűrűn, míg 1.72 ± 0.19 mM a GTN-kezelt, toleráns gyűrű esetében ($P < 0.05$).

RIST (Rapid Insulin Sensitivity Test)

A korábban Lautt által leírt "rapid insulin sensitivity test"-en (RIST) kisebb módosítást hajtottunk végre, hogy a nyúlkísérleteinkben alkalmazhassuk. A kísérlet során az artériás és a vénás kanült (Vygonüle V G22, Vygon GmbH & Co., Aachen, Germany) bevezettük az arteria illetve a vena auricularisba, majd az állatokat pihenni hagytuk körülbelül 30 percig, hogy az élettani paraméterek stabilizálódjanak. Ezt követően, 5 percenként az artériás vérből meghatároztuk a vércukorszintet. A három egymást követő vércukorszint mérésének átlaga jelentette a kontroll értéket; majd a vénás kanülon keresztül 5 percig tartó folyamatos 50 mU/kg inzulin (NOVO Nordisk, Copenhagen, Denmark) infúziót adagoltunk infúziós pumpa

segítségével (Syringe Pump 11 Plus – Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA). Az inzulin hipoglikémiás hatásának ellensúlyozására glükóz infúziót (TEVA, Debrecen, Hungary) is elkezdünk adagolni, oly módon, hogy a fent említett átlagolt kontroll érték fenntartását biztosítani tudjuk. Az a teljes glükózmennyiség (mg/testsúly kg –ban kifejezve), amely az inzulin hipoglikémiás hatásának ellensúlyozásához szükséges, illetve hogy fenntartsa a kontroll vércukor szintet, az ún. RIST index, amely a teljes test inzulin érzékenységének a mutatója.

HEGC (hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp módszer)

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

A máj cGMP szintjének mérése

A máj cGMP szintjét RIA módszerrel, Amesham kit használatával, májmintákból határoztuk meg, amelyeket a CCK8 infúzió befejezése után azonnal kivettünk. Az inter- és intra-assay

eltérések nem haladták meg az 5 %-ot. A mintákat nitrát toleráns és nem-toleráns állatokból vettük.

Statisztikai analízis

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

4. Eredmények

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

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

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

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

A nitrát tolerancia hatása a glükózfelhasználásra

Az intravénás glükóz terhelés (0.5 mg/kg) a toleráns és a kontroll állatokban egyaránt hasonló mértékben megnövelte a vér glükózsintjét, bár a plazma inzulinszintek szignifikánsan magasabbak voltak a toleráns nyulakban, mint a kontroll nyulakban.

A nitrát tolerancia hatása az inzulinérzékenységre

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

A transzdermális nitroglicerín hatása az inzulinérzékenységre nitrát toleranciában vagy annak hiányában

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

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

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

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

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

A transzdermális NG hatására kialakult hemodinamikai nitrát tolerancia

A transzdermális NG alkalmazása az 1. tapasz után szignifikáns csökkenést okozott az artériás középnyomásban, a szívfrekvenciában bekövetkező változások nélkül. A 3. és a 7. tapasz nem

okozott semmilyen változást e paraméterekben. Harminc perccel az utolsó tapasz eltávolítása után sem volt tapasztalható változás a vérnyomásban és a szívfrekvenciában sem.

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

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

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

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

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

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

A CCK8 inzulinérzékenyítő hatása a HEGC steady state állapotának ideje alatt

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

A CCK8 infúzió hatása a hepatikus cGMP-re a nitrát toleráns nyulakban

A 3 $\mu\text{g/kg/h}$ CCK8 infúzióra adott válaszként a hepatikus cGMP szint megemelkedett 0.22 ± 0.07 és 0.13 ± 0.04 pmol/mg nedves szövetsúlyról 1.11 ± 0.09 és 0.19 ± 0.04 pmol/mg nedves szövetsúlyra, non-toleráns és toleráns állatokban egyaránt.

Az eredmények azt mutatják, hogy éber nyulakban a hemodinamikai nitrát tolerancia állapota, amely a transzdermális nitroglicerinnel tapasz 7-napig tartó folyamatos alkalmazása során alakul ki, kapcsolatban áll a táplálék-indukált inzulin érzékenység elvesztésével. E megfigyelésen kívül, a kapott eredmények alátámasztják azon korábbi megfigyelésünket, miszerint a bazális, éhgyomri teljes test inzulinérzékenység jelentősen károsodott krónikus, folyamatos nitrát tapasz viselése révén kiváltott hemodinamikai nitrát tolerancia állapotában. További eredeti megfigyelésünk, hogy az intraportális CCK8 inzulinérzékenyítő hatása károsodik hemodinamikai nitrát tolerancia állapotában.

Jelen munkánk eredményei alapján úgy gondoljuk, hogy a táplálék-indukált inzulinérzékenyítő mechanizmus hemodinamikai nitrát toleranciában károsodik. Ennek jelentőségét a hemodinamikai terápiás hatékonyság elvesztésén túl az adja, hogy amennyiben a postprandiális inzulinérzékenység károsodása hosszú távon fennáll, az manifest 2-es típusú cukorbetegség kialakulásához vezethet.

Bármilyen módszert használtunk az inzulinérzékenység meghatározására, az eredményeink tisztán mutatják, hogy perifériás szövetek inzulinérzékenysége szignifikánsan megnövekszik, amikor az állatokat egy éhezési periódust követően visszaállítjuk a táplálkozásra, s ezen endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus hemodinamikai nitrát toleranciában gátolva van.

A CCK kulcs szerepet játszik a postprandiális inzulinérzékenyítő mechanizmus aktiválásában. A CCK-receptor antagonistá proglumid alkalmazásával az étkezés kiváltotta inzulinérzékenyítő mechanizmus gátolható. Jelen munkánk további bizonyítékul szolgál a CCK inzulinérzékenyítő hatását illetően, hiszen a CCK8 intraportális dózisának fokozatos növelése dózis-függő módon képes fokozni a teljes test inzulin érzékenységet, s amely hatás nitrát toleranciában teljesen gátolt.

5. Összefoglalás

A NO inzulinérzékenyítő szerepe többszörösen igazolt, s mivel ismert, hogy a NO hemodinamikai hatásaival szemben tolerancia fejlődhet ki, így azt a célt tűztük magunk elé, hogy megvizsgáljuk, hogy vajon a nitrát tolerancia az inzulinérzékenyítő hatással szemben is kialakul-e? Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az nitrát tapasz akut, egyszeri alkalmazása az

inzulinérzékenységet javítja, míg a 7 napos, folyamatos (nem intermittáló) kezelés következtében fellépő hemodinamikai nitrát tolerancia állapotában inzulinrezisztencia alakul ki.

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

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

6. Függelék



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁR

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

Jelölt: Bajza Ágnes

Neptun kód: YDS8KF

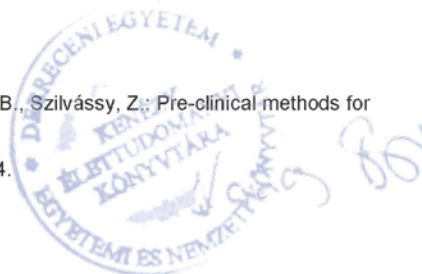
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További Közlemények

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



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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6.72

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

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

Debrecen, 2013.12.14

