

A T 042699 sz. zárójelentése

A pályázat megvalósult célkitűzései, és az eredmények rövid összefoglalása

Részjelentéseinkben beszámoltunk arról, hogy a nitrogén monoxid (NO) donorok orális alkalmazásával jelentős – a kongesztív szívelégtelenséget ill. miokardium iszkémiát csökkentő hatások mellett - insulin szenzitizáló hatás is elérhető, mely a hyperkoleszterinémiához társult insulin rezisztenciában jelentősen megnöveli a nitrátok terápiás értékét, főként, ha egyidejű iszkémiás szívbetegség (ISZB) is fennáll. Ráadásul, a nitrátok ezen hatása függetlennek tűnt a vaszkuláris hatásoktól, ugyanis – legalábbis orális adagolás mellett – az insulin érzékenyítő hatás alacsonyabb dózisok mellett jelentkezett, mint bármilyen vaszkuláris, ill. myocardium ischaemia elleni hatás. Sikerült tisztáznunk azt is, hogy az orálisan adagolt nitrátok szelektív insulin érzékenyítő hatása hogyan alakul ki. A kísérletek alapján egyértelműen bebizonyosodott, hogy a NO donorok insulin érzékenyítő hatása egy újonnan felfedezett endogén insulin érzékenyítő mechanizmus farmakológiai kiaknázásának felel meg. Ennek lényege, hogy a májat ellátó plexus hepaticus ant. szenzoros rostjai a post-prandiális hyperinsulinaemia hatására aktiválódnak, és a rostokból egy HISS-nek nevezett anyag kerül a szisztémás keringésbe, ami érzékenyíti a perifériás szöveteket az insulin hypoglycaemizáló hatásával szemben. Erről az anyagról mi derítettük ki, hogy feltehetően neurális eredetű szomatosztatin, ill. ahhoz nagyon hasonló szenzoros neurális eredetű peptid. A HISS mechanizmus aktiválásához vezető kulcslépés a post-prandiális hepatikus NO felszabadulás, ahol a NO a májhoz futó capsaicinre érzékeny szenzoros rostokból származik. A folyamat következő lépése a klasszikus, NO-ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) út aktiválódása, ahol a cGMP-függő folyamatok vezetnek a szisztémásan ható insulin érzékenyítő hatású szenzoros neuropeptid felszabaduláshoz. Utóbbi megállapítás nyomán végeztünk vizsgálatokat arra vonatkozóan, hogy a cGMP metabolizmust gátló specifikus cGMP foszfodiészteráz (cGMP-PDE) gátlók alkalmazásával el tudunk-e érni gyógyszerfejlesztési szempontból hasznosítható insulin érzékenyítő, ill. antidiabetikus hatást. Bebizonyosodott, hogy a cGMP-PDE I-V gátló cicletanine, melyet korábban antihipertenzív szerként törzskönyvezték vasodilatátor hatása alapján, igen jelentős insulin érzékenyítő hatást indukál, melynek mechanizmusa a nitrátokhoz hasonlóan a „HISS” folyamat farmakológiai aktiválása. Ráadásul, a cicletanine alkalmazása a nitrátokhoz képest több előnnyel is jár i) a szer krónikus adagolása során nem fejlődik ki tolerancia ii) nincsenek markáns hemodinamikai

hatások, valamint (iii) az insulin érzékenyítő hatást jelentékeny szívritmuszavarokkal, ill. myocardium iszkémiával szembeni védő hatás kíséri. Ezen felismerésekhez kötődik a program legfontosabb eredménye, ti. lezárult egy olyan periódus, melynek során alapkutatásokat végeztünk a HISS mechanizmus farmakológiai kiaknázhatósága irányában. A jelen eredmények birtokában – úgy érezzük – a további fejlesztésekhez nem szükséges további alapkutatás; feltártuk egy új insulin szenzitiváló mechanizmus több olyan részletét, mely farmakológiai támadáspontként szolgálhat. Redelkezünk a kérdéses támadáspontokon ható típusvegyületekkel, ill. ezen anyagok mellé találtunk olyan „követő” molekulákat, melyekkel egy új típusú orális antidiabetikum molekulacsaládot építettünk fel, és az egész programot be tudtuk léptetni egy második – a szakmai befektetők számára vonzó, ill. a gazdaság számára kalkulálható hasznot jelentő – u.n. *no research development only* fázisba.

Az lezárult alapkutatási program részletezett eredményei

A nitrátok insulin szenzitiváló mechanizmusa

Első megfigyelésünk nyomán azt gondoltuk, hogy a nitrovazodilatátorok insulin érzékenyítő hatása alapvetően arra épül, hogy az insulin érzékeny perifériás szövetek keringése javul. Ennek a hipotézisnek az alátámasztását célozták azok a kísérletek, melyek során hemodinamikai nitrát toleranciát alakítottunk ki, és ebben az állapotban vizsgáltuk az insulin érzékenység alakulását hyperinsulinaemiás euglycaemiás glucose clamp technikával, mely módszer az egész test insulin érzékenység meghatározásának „arany standardja” mind az állatkísérletes, mind pedig a klinikai gyakorlatban. Annyiban igazoltuk feltevésünket, hogy hemodinamikai nitrát toleranciában insulin rezisztencia alakult ki, azonban ennek semmi köze a perifériás nitrát hatás elmaradásához hiszen ebben az esetben legfejlebb arról lehetett volna szó, hogy az insulin érzékenyítő nitrát hatás elmarad vagy csökken, azonban azt láttuk, hogy nitrát tolerancia állapotában mindenféle egyéb hatás nélkül „sui generis” insulin rezisztencia alakul ki. A kísérletek eredményeként kiderült az is, hogy a nitrát tolerancia állapotában jelentkező insulin rezisztencia oka a HISS mechanizmus működésében bekövetkező akadály. Az insulin rezisztencia nitrát toleranciában való kifejlődése azzal magyarázható, hogy a mechanizmus aktiválódásának kulcslépése hatástalanná válik, azaz a plexus hepaticus ant. rostjaiból felszabaduló NO elveszti hatását *i.e.* nem képes a cGMP rendszer aktiválására. Ezen eredményeinket, ill. a hozzá vezető kísérleteket nemzetközi tudományos közleményekben leírtuk (1,2).

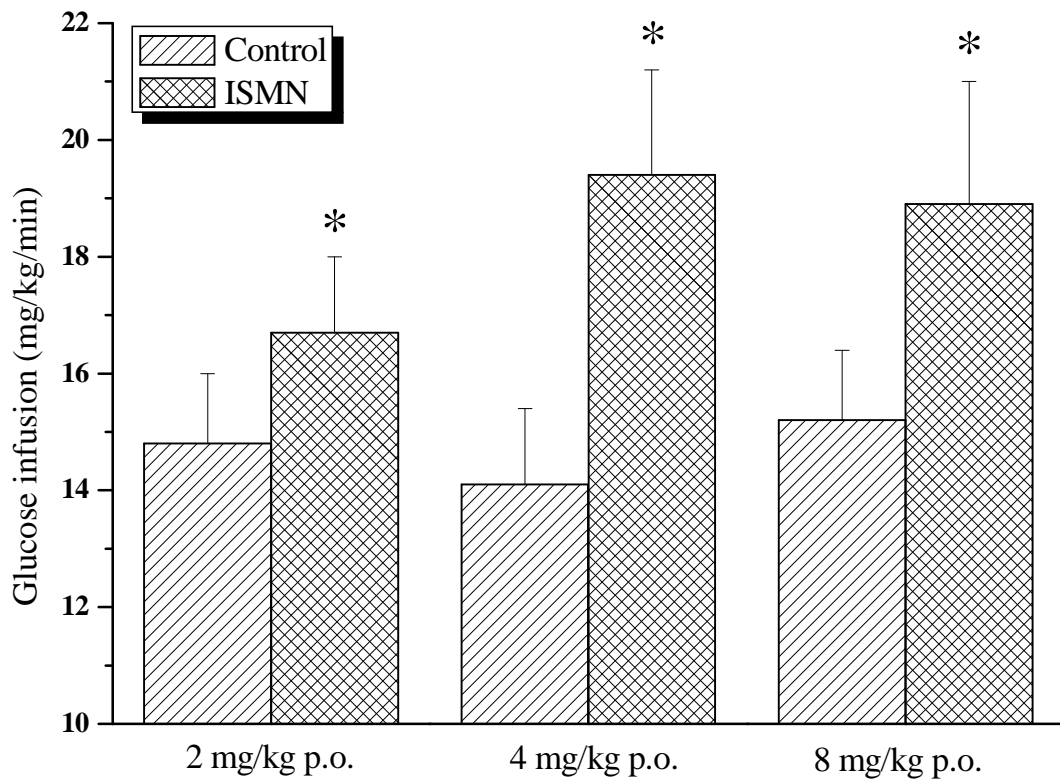
A HISS mechanizmus farmakológiai kiaknázása különböző állatfajokon

Gyógyszerfejlesztési szempontból igen lényeges, hogy a farmakoterápia számára kiaknázni kívánt mechanizmus mennyire fajspecifikus. Kiderült, hogy – legalábbis a saját adatok szerint - a mechanizmus, ill. annak reakciója különféle gyógyszeres beavatkozásokra teljesen hasonló patkányban, nyúlban, ill. tengerimalacon (4-6).

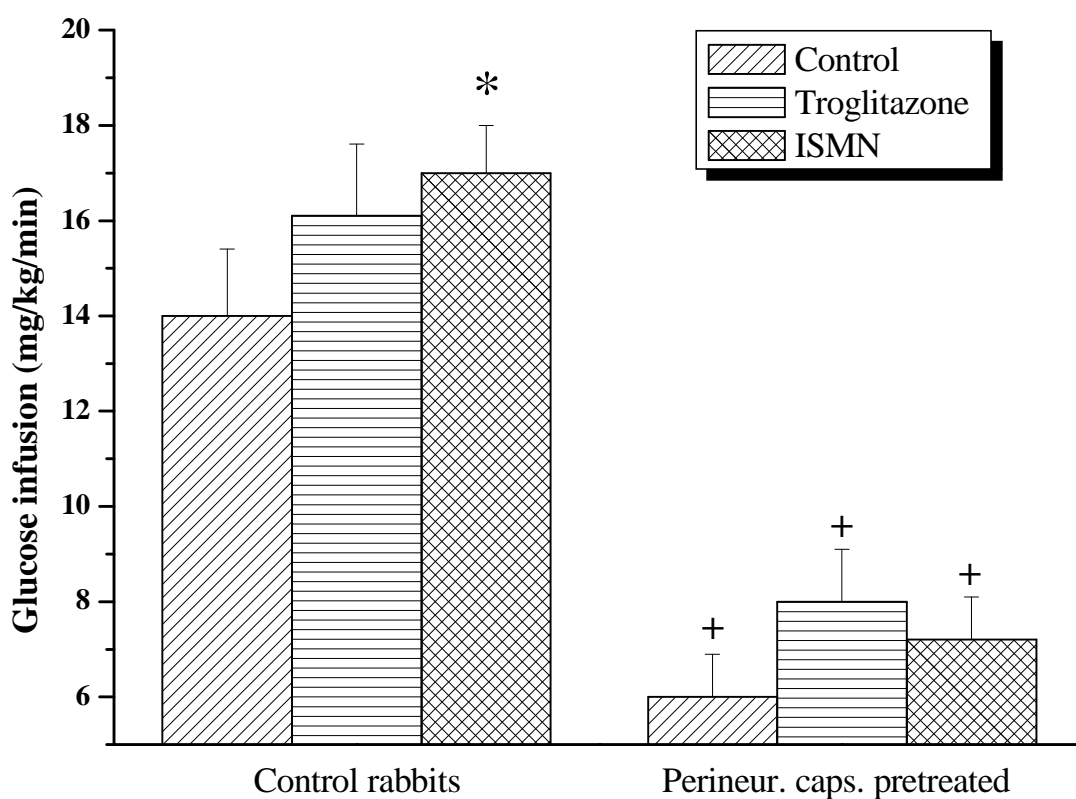
A HISS mechanizmus farmakológiai kiaknázása NO donorokkal és cGMP-PDE inhibitorokkal

Bizonyítottuk, hogy mind a transzdermális nitroglicerint, mind az orálisan alkalmazott isosorbid mononitrát (mint NO donorok) ill. a cicletanine (mint cGMP-PDE I-V gátló insulint érzékenyítő hatással rendelkeznek, melynek kialakulásában döntő a HISS mechanizmussal való interakció. Ezen szerek potenciálisan antidiabetikus hatása a hyperlipidaemiákkal kapcsolatos insulint rezisztenciában is kifejlődik, azonban a plexus hepaticus ant. szenzoros rostjainak funkcionális intaktsága hatás kifejlődésének előfeltétele. Ennek megfelelően mind a tanulmányozott NO donorok, mind a cGMP-PDE gátló cicletanine insulint szenzitivizáció szempontjából hatástalan hepaticus szenzoros denerválás esetén, ill. azon neuropathiákban, amikor az említett rostköteg is érintett (1, 4-7) .

A plexus hepaticus ant. mint gyógyszer támadáspont igen jelentős előnyöket jelent az orális antidiabetikumok fejlesztése terén. Mivel pre-hepaticus támadáspontról van szó, melynek eredménye szisztémás hatás, némi egyszerűsítéssel ez a farmakológiai megközelítés azt jelenti, hogy a gyógyszerhatás targetje a gastrointestinalis felszívódás és a „first pass” effektus helye között van. Ebből az is következik, hogy minded olyan megoldás, ami a HISS mechanizmust aktiválja, elméletileg képes insulint érzékenyítő (közvetve antidiabetikus) hatás kiváltására alacsonyabb dózisok mellett, mint amelyeknél jelentősebb egyéb szisztémás hatások várhatók.



1. ábra Orális isosorbid mononitrát insulin érzékenységre gyakorolt hatása éber nyúlon. Az insulin érzékenységet hyperinsulinaemiás euglycaemiás glucose clamp módszerrel határoztuk meg. Az ordinátán ábrázolt glucose infúzió sebessége az insulin érzékenységgel arányos. Az adatok az átlagot és a standard deviációt mutatják. Minden oszlop 8 állatból nyert adatnak felel meg. A * jelölés a „control”- tól való szignifikáns eltérést mutatja.



2. ábra. Perineurális capsaicin kezelés hatása orális isosorbid mononitrát (4 mg/kg) által indukált insulin szenzitizációra gyakorolt hatása éber nyúlon. Az adatok az átlagot és a standard deviációt mutatják. Minden oszlop 8 állatból nyert adatnak felel meg. A * jelölés a „control”-tól való szignifikáns eltérést mutatja.

A kísérletek során fény derült arra is, hogy az isosorbid mononitrát a 2-4 mg/kg p.os. dózistartományban nem növeli sem a perifériás erekben, sem a szívben a NO, ill. a ciklikus GMP szöveti koncentrációit, ami további bizonyíték amellet, hogy a szer alacsony dózisa mellett elérhető insulin érzékenyítő hatás valóban szelektív (7).

A nitrát terápia egyik közismert komplikációja a nitrát tolerancia, mely alatt általában hemodinamikai toleranciát értenek, azonban mára már tankönyvi adattá vált, terápiás vérszintek mellett is mintegy 24 óra alatt már kialakul tolerancia mind a vazodilatátor hatással, mind pedig a részben vaszkuláris hatásokkal magyarázott antianginás hatással

szemben is. Az ISMN insulin szenzitizáló hatásának ismeretében fontosnak tűnt megvizsgálni, hogy tartós nitroglicerín adagolás kapcsán kialakul-e tolerancia az insulin szenzitizáló hatással szemben is. Tekintettel arra, hogy hosszantartó állandó nitrát plazmaszint legegyszerűbben transzdermális adagolás útján biztosítható, krónikusan instrumentált éber nyulakon transzdermális nitroglicerín több napon át tartó adagolása mellett hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp módszerrel vizsgáltuk meg az insulin érzékenység alakulását.

A kísérletek legmeglepőbb eredménye az volt, hogy a hemodinamikai nitrát tolerancia azon túl, hogy az insulin szenzitizáló hatással szembeni tolerancia kialakulásához is vezetett, „sui generis” insulin rezisztens állapotot hozott létre. Ezek az adatok jó összhangban vannak egészen más kísérleti paradigma mellett kapott korábbi adatainkkal, miszerint a hemodinamikai nitrát tolerancia számos endogén NO dependens folyamattal szembeni „kereszt” toleranciához vezet. Az említett, és a pályázati célkitűzések megvalósításában is kulcsfontosságú eredmények a *J. Cardiovascular Pharmacology*-ban közzétük (1).

Összefoglalva, a program során végzett kísérletek új gyógyszerfejlesztési paradigma mentén új „specialty pharma” projekteket indítottak el, melyek jelentősen hozzájárultak egy Észak Alföldi gyógyszeripari klaszter tudományosan és gazdaságilag megalapozott projektekkal való feltöltéséhez.

A zárójelentéshez kapcsolódó publikációk

- 1) Bajza A, Peitl B, Nemeth J, Porszasz R., Rabloczky, G, Literati, NP, Szilvassy J, **Szilvassy Z.** Development of insulin resistance by nitrate tolerance. *J Cardiovasc Pharmacol* 43, 471-476, 2004.
- 2) Zsuga J, Tory K, Jaszlits L, Bajza A, Németh J, Peitl B, Szilvássy Z. Pre-clinical methods for the determination of insulin sensitivity. *J Biochem Biophys Methods.* 61, 253-8 2004.
- 3) Harangi M, Seres I, Varga Z, Emri G, Szilvássy Z, Paragh G, Remenyik É. Atorvastatin effect on high-density lipoprotein-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *Eur J Clin Pharmacol.*;60, 685-91. 2004.
- 4) Peitl B, Döbrönte R, Németh J, Megey G, Kovács P, Paragh G, Szilvássy Z. The prandial insulin sensitivity modifying effect of vagal stimulation in rats. *Metabolism* 54: 579-583, 2005
- 5) Szilvássy J, Sziklai I, Sári R, Németh J, Peitl B, Pórszász R, Lonovics J, Szilvássy Z. Neurogenic insulin resistance in guinea-pigs with cisplatin-induced neuropathy. *Eur J Pharmacol.* 531:217-225, 2006,
- 6) Zoltán Szilvássy, József Németh & Barna Peitl. Prandial modulation of ventricular refractoriness in conscious rabbits. *Cardiovasc Res* (közlésre elküldve)
- 7) Barna Peitl, József Németh, Csaba Pankucsi, Zoltan Szilvassy. Insulin sensitization induced by oral cicletanine in conscious rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (revízió alatt)