

**TRANSZLÁCIÓS FEHÉRJE-MÓDOSULÁSOK CUKORBETEGSÉGBEN**

**DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**DR. MOHÁS-CSEH JUDIT**



**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,**

**II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum**

**A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos**

**Programvezető: Prof. Dr. Wittmann István**

**Témavezető: Prof. Dr. Wittmann István**

**Pécs, 2022**

**TRANSZLÁCIÓS FEHÉRJE-MÓDOSULÁSOK CUKORBETEGSÉGBEN**

**DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**DR. MOHÁS-CSEH JUDIT**



**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,**

**II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum**

**A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos**

**Programvezető: Prof. Dr. Wittmann István**

**Témavezető: Prof. Dr. Wittmann István**

**Pécs, 2022**

## 1. Bevezetés

2013-ban 382 millióra becsülték a Földön élő, diabétesz mellituszban szenvedők számát, mely 2035-re, egyes becslések szerint 592 millióra fog emelkedni [1]. Az 1-es (T1DM) és 2-es (T2DM) típusú DM eddig ismert 1:20-hoz aránya is változni látszik annak következtében, hogy egyre magasabb a 2-es típusú DM előfordulása a gyermekek körében [2]. T2DM során számtalan metabolikus eltérés figyelhető meg, melyek egy része a csökkent inzulin-szekréción, más része az inzulinra adott csökkent válasz, esetleg egyszerre mindkettő következménye [3]. A T2DM-ben megfigyelhető emelkedett mortalitás hátterében többek között az inzulin-rezisztencia áll. Ebben az állapotban, az inzulin biológiai hatása károsodott, melynek következtében az inzulinszint patológiás mértékben megnövekszik. Legtöbb esetben a perifériás inzulin-rezisztencia, vagyis a máj-, zsír- és izomszövetben kialakult károsodott inzulinválasz, már jóval a hiperglikémia kialakulása előtt létrejön [4]. A vázizomban létrejött inzulin-rezisztencia csökkent glükózfelvételhez vezet, a májból fokozódik a glükózképződés, a zsírszövetben fokozódik a lipolízis és a szabad zsírsavak (free fatty acids-FFA) kiáramlása a keringésbe. Az FFA krónikusan megnövekedett szintje a pankreasz  $\beta$ -sejtjeinek pusztulásához vezethet (lipotoxicitás).

Ismert az is, hogy a fenilalaninból (Phe) enzimatikus úton para-tirozin (p-Tyr) képződik, de a Phe átalakulása p-Tyr-ná kisebb mértékben ugyan, de nem enzimatikus úton is végbemehet. Oxidatív stressz mellett, hidroxil szabad gyökök jelenlétében a fiziológiás p-Tyr mellett orto-tirozin (o-Tyr) és meta-tirozin (m-Tyr) is képződik. Munkánk során ezen módosult Phe származékok fehérjékbe történő beépülését, a glükózfelvételre és az inzulin-jelátvitelre, nevezetesen az inzulin-receptor-szubsztrát-1 (IRS-1) és az Akt foszforilációjára gyakorolt hatását vizsgáltuk.

## 2. Célkitűzés

Az oxidált fenilalanin-származékok inzulin-rezisztenciában játszott szerepének bizonyítása.

## 3. Anyagok és módszerek

3T3-L1 egér fibroblasztokat, HEK-293 immortalizált epiteliális sejteket és BALB/C monocitoma makrofág sejteket tenyésztettünk p-, o- és m-Tyr tartalmú, 5- és 25 mmol/l glükózkoncentrációjú médiumon. Vizsgáltuk az adipociták glükózfelvételét izotópjelölt glükóz segítségével, annak idő- és koncentrációfüggését, továbbá mindhárom sejtvonalban a tirozinok sejtekbe történő felvételét, mind a sejtekben a fehérjékhez kötött, mind a szabad tirozinkoncentrációt HPLC módszerrel. Majd a p-, o- és m-Tyr, valamint az 5- és 25 mmol/l glükózkoncentráció Akt és IRS-1 foszforilációjára gyakorolt hatását Western-blot módszer segítségével. A statisztikai analízishez az SPSS Statistics 27-t és a GraphPad Prism 8-as szoftverjét használtuk (IBM Company, IL, USA). A kísérleteket n=5-10 darabszámban ismételtük minden kísérlet esetén. Az adatok eloszlásának normalitását Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével állapítottuk meg. A normális eloszlású eredményeket parametrikus tesztekkel, míg a nem-normális eloszlású adatokat nem-parametrikus tesztekkel analizáltuk. Többszörös összehasonlítás során, normál eloszlású adatok esetén, varianciaanalízis (ANOVA) történt, míg nem-normál eloszlású adatok esetén Kruskal-Wallis tesztet használtunk, szignifikáns eredmény esetén a páronkénti összehasonlítás Mann-Whitney U

teszttel történt. A normál eloszlású eredmények páronkénti összehasonlítása független mintás t-próbával történt. Abban az esetben, ha a kontroll-minta értéket vettük 100%-nak és a változást ehhez hasonlítottuk, egymintás t-próbát használtunk.

#### 4. Eredmények

##### 4.1. *Az orto- (o-Tyr) és meta-tirozin (m-Tyr) gátolja az inzulin-indukálta glükózfelvételt*

Az 5 mmol/l glükózt és p-Tyr-t tartalmazó médiumban tenyésztett 3T3-L1-adipociták inzulin-indukálta deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvétele minden alkalmazott inzulin-koncentráció (2, 20, 200, 400 nmol/l) esetén szignifikánsan magasabb volt a kontrollhoz (kezeletlen, paratirozin, 5 mmol/l glükóz) képest és az inzulin-koncentráció növelésével növekedett. A 25 mmol/l glükózt és p-Tyr-t tartalmazó médiumban tenyésztett sejtek, továbbá a p-Tyr mellett equimoláris mennyiségű o- vagy m-Tyr-t tartalmazó sejtek inzulinrezisztenssé váltak, nem tapasztaltunk szignifikáns glükózfelvételt egyetlen alkalmazott inzulin-koncentráció esetén sem a saját kontrollhoz képest

##### 4.2. *Az o- és m-Tyr deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvételre gyakorolt gátló hatása, időfüggő módon valósul meg*

A 3T3-L1-adipocitákat különböző ideig (1, 2, 3, 4, 5, 12 nap) tenyésztettük 0,39 mmol/l hozzáadott o-, vagy m-Tyr-t tartalmazó médiumon. Az o- és m-Tyr-on nőtt sejtek esetén minden esetben szignifikánsan alacsonyabb inzulin-indukálta glükózfelvételt tapasztaltunk, mint a p-Tyr-on tenyésztett sejtek esetén.

##### 4.3. *Az o- és m-Tyr deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvételre gyakorolt gátló hatása, koncentráció-függő módon valósul meg*

Megvizsgáltuk az inzulin-indukálta glükózfelvételt olyan sejtekben, ahol a médiumba 0,39 mmol/l o- vagy 0,39 mmol/l m-Tyr-t oldottunk, a már benne lévő 0,39 mmol/l p-Tyr mellé. Eredményeink szerint az o-Tyr-on nőtt sejtek esetén a bazális (# p<0,05 vs para kontroll) és az inzulin-indukálta glükózfelvétel (\*p<0,05 vs para inzulin) is szignifikánsan alacsonyabb, a csak p-Tyr-on nőtt sejtekhez képest, továbbá nem nő szignifikánsan a glükózfelvétel 400 nmol/l inzulin hatására ezekben a sejtekben. Ez a hatás, emelkedő koncentrációjú p-Tyr hozzáadásával kivédhető volt.

##### 4.4. *A zsírsejtek mind az o- mind a m-Tyr-t képesek percek alatt felvenni és azokat sejtfehérjéikbe beépíteni.*

Az oxidatív stressz által megváltoztatott aminosavak úgy károsíthatják az inzulin-jelátvitelt, hogy a sejtek a transzláció során azokat fehérjéikbe beépítik. Ehhez értelemszerűen ezen aminosavak celluláris felvétele szükséges. Emiatt megvizsgáltuk azt, hogy az abnormális aminosavakat képesek-e a zsírsejtek felvenni. Ennek érdekében megmértük a sejtek intracelluláris, fehérjéhez nem kötött p-Tyr tartalmát, továbbá megmértük az oTyr/p-Tyr és m-Tyr/p-Tyr arányokat. Eredményeink szerint a sejtek az aminosavakat felveszik, mely folyamat

független a médium glükóz-koncentrációjától (5 vagy 25 mmol/l) és inzulin-tartalmától egyaránt

4.5. *Mind az o-, mind az m-Tyr beépülhet a 3T3-L1-sejtek intracelluláris fehérjéibe*

Megvizsgáltuk, hogy az o- és m-tyr beépül-e a sejtfehérjékbe. Tizenkét napos p-, o-, vagy m-Tyr-on való tenyésztést követően megmértük az intracelluláris, fehérjéhez kötött tirozinok mennyiségét 3T3-L1-adipocitákban. Az o-, és az m-Tyr-on nőtt sejtekben csökkent a p-Tyr/Phe arány, míg a fehérjéhez kötött o-Tyr/p-Tyr és m-Tyr/p-Tyr szignifikánsan nőtt annak megfelelően, hogy a médium m- vagy o-Tyr-t tartalmazott

4.6. *Mind az o-, mind az m-Tyr beépülhet a HEK-sejtek intracelluláris fehérjéibe*

Fenti vizsgálatunkat HEK sejtvonalon is elvégeztük és azt találtuk, hogy o- és m-Tyr tartalmú médiumokon tenyésztett sejtek fehérjékhez kötött p-Tyr/Phe tartalma nem tér el szignifikánsan a p-Tyr-on tenyésztett sejtektől, míg az o-Tyr/p-Tyr arány az o-Tyr-on nőtt sejtekben volt szignifikánsan a legtöbb, az m-Tyr/p-Tyr arány pedig a m-Tyr-on nőtt sejtekben bizonyult szignifikánsab magasabbnak a másik kettőhöz képest

4.7. *Mind az o-, mind az m-Tyr beépülhet a makrofágok intracelluláris fehérjéibe*

Vizsgálatunkat makrofágokon végezve azt találtuk, hogy míg a lizátumok p-Tyr/Phe tartalma nem tér el szignifikánsan a p-, o- és m-Tyr-on nőtt sejtekben, a m-Tyr /p-Tyr arány a meta-Tyr-on nőtt sejtekben volt szignifikánsan több a másik két kezeléshez képest. Érdekes módon az o-Tyr/p-Tyr arány nem az o-Tyr-on, hanem a m-Tyr-on nőtt sejtekben bizonyult a legnagyobbak, tehát ezekben a sejtekben a m-Tyr kezelés az o-Tyr/p-Tyr emelkedéshez vezetett

4.8. *Az inzulinreceptor-szubsztrát-1 (IRS-1) aktiváló (Tyr612) foszforilációja megváltozik o-, m-Tyr-t vagy 25 mmol/l glükózt tartalmazó médiumon nőtt 3T3-L1-sejtekben*

Az 5 mmol/l glükóz koncentrációjú, p-Tyr-on tenyésztett 3T3-L1-adipocitákban az IRS-1 inzulin-indukálta foszforilációja, több, mint 300%-a az inzulin nélküli, bazális foszforilációnak, mely statisztikailag szignifikánsnak bizonyul ( $p < 0,05$ ). Az m-Tyr-on nőtt sejtekben az IRS-1 foszforilációja nem nő szignifikánsan 400 nmol/l inzulinvaló kezelés hatására, tehát nincs inzulinhatás. Az o-Tyr-on nőtt sejtek esetén az IRS-1 foszforilációja szintén nem nő 400 nmol/l inzulin hatására

4.9. *Az Akt (Ser 473) foszforilációja inzulinkezelés hatására, normál- és magas glükóz-koncentráció esetén valamint p-, o- vagy m-Tyr-t tartalmazó médiumon tenyésztett 3T3-L1-adipocitákban*

Normál, 5 mmol/l glükóz-koncentrációjú médiumon nőtt sejtekben az Akt (Ser-473) foszforilációja szignifikánsan nőtt 400 nmol/l inzulinkezelés hatására ( $p < 0,05$ ). A növekedés hozzávetőlegesen négyszeres volt.

Sem o- sem m-Tyr-on nőtt sejtek esetén, sem pedig 25 mmol/l glükóztartalmú médiumon nőtt sejtek esetén nem váltott ki az inzulinkezelés szignifikáns Akt (Ser-473) foszforiláció

növekedést, ugyanakkor mindhárom esetben a bazális, inzulinkezelés nélküli Akt (Ser-473) foszforiláció, szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll, p-Tyr-on nőtt sejtek esetén

*4.10. Az inzulinreceptor-szubsztrát-1 (IRS-1) aktiváló (Tyr612) foszforilációja megváltozik o-, m-Tyr-t vagy 25 mmol/l glükózt tartalmazó médiumon nőtt HEK-sejtekben*

Az 5 mmol/l glükóz koncentrációjú, p-Tyr-on tenyésztett HEK-sejtekben az IRS-1 inzulin-indukálta aktiváló (Tyr612) foszforilációja, több, mint 200%-a az inzulin nélküli, bazális foszforilációnak, mely statisztikailag szignifikánsnak bizonyul ( $p < 0,05$ ). Az m-Tyr-on nőtt sejtekben az IRS-1 aktiváló (Tyr612) foszforilációja nem nő szignifikánsan 400 nmol/l inzulinnal való kezelés hatására, tehát nincs inzulinhatás. Az o-Tyr-on nőtt sejtek esetén az IRS-1 aktiváló (Tyr612) foszforilációja szintén nem nő 400 nmol/l inzulin hatására.

*4.11. Az Akt (Ser 473) foszforilációja inzulinkezelés hatására, normál- és magas glükóz-koncentráció esetén valamint p-, o- vagy m-Tyr-t tartalmazó médiumon tenyésztett HEK-sejtekben*

Fiziológiás, 5 mmol/l glükóz-koncentrációjú médiumon nőtt sejtekben az Akt (Ser-473) foszforilációja szignifikánsan nőtt 400 nmol/l inzulinkezelés hatására ( $p < 0,05$ ). A növekedés hozzávetőlegesen kétszeres volt.

Sem o- sem m-Tyr-on nőtt sejtek esetén, sem pedig 25 mmol/l glükóztartalmú médiumon nőtt sejtek esetén nem váltott ki az inzulinkezelés szignifikáns Akt (Ser-473) foszforiláció növekedést, ugyanakkor mindhárom esetben a bazális, inzulinkezelés nélküli Akt-(Ser-473) foszforiláció, szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll, p-Tyr-on nőtt sejtek esetén

*4.12. Az inzulinreceptor-szubsztrát-1 (IRS-1) aktiváló (Tyr612) foszforilációja megváltozik o-, m-Tyr-t vagy 25 mmol/l glükózt tartalmazó médiumon nőtt makrofágokban.*

Az 5 mmol/l glükóz koncentrációjú, p-Tyr-on tenyésztett makrofágokban az IRS-1 inzulin-indukálta aktiváló (Tyr612) foszforilációja, több, mint kétszerese a bazális foszforilációnak, mely statisztikailag szignifikánsnak bizonyul ( $p < 0,05$ ). Az m- és o-Tyr-on valamint 25 mmol/l koncentrációjú glükózt tartalmazó médiumon nőtt sejtekben az IRS-1 aktiváló (Tyr612) foszforilációja nem nő szignifikánsan 400 nmol/l inzulinnal való kezelés hatására, tehát nincs inzulinhatás. Minhárom esetben az IRS-1 bazális, inzulinkezelés nélküli (Tyr612) foszforilációja szignifikánsan magasabb, mint a p-Tyr-on, 5 mmol/l glükózon nőtt sejtek bazális (Tyr612) foszforilációja

*4.13. Az Akt (Ser 473) foszforilációja inzulinkezelés hatására, normál- és magas glükóz-koncentráció esetén valamint para-, orto- vagy metatirozint tartalmazó médiumon tenyésztett makrofágokban.*

Fiziológiás, 5 mmol/l glükóz-koncentrációjú médiumon nőtt makrofágokban az Akt (Ser-473) foszforilációja szignifikánsan nőtt 400 nmol/l inzulinkezelés hatására ( $p < 0,05$ ). A növekedés körülbelül kétszeres volt.

Sem o- sem m-Tyr-on nőtt sejtek esetén, sem pedig 25 mmol/l glükóztartalmú médiumon nőtt sejtek esetén nem váltott ki az inzulinkezelés szignifikáns Akt (Ser-473) foszforiláció

növekedést, ugyanakkor az o-Tyr-on növesztett makrofágok esetén a bazális, inzulinkezelés nélküli Akt-(Ser-473) foszforiláció, szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll, p-Tyr-on nőtt sejtek esetén

## 5. Megbeszélés

Munkánk során elsőként mutattuk ki, hogy az oxidatív stressz során képződött abnormális aminosavak, az o- és m-Tyr, képesek a zsírsejtek glükózfelvételét meggátolni. Kimutattuk azt is, hogy az o- és m-Tyr tartalmú médiumban nőtt sejtek inzulin-jelátvitel megváltozhat. Ezt a jelenséget három különböző sejtvonalon mutattuk be, továbbá ugyanezek a sejtvonalakon megfigyeltük, hogy az o- és m-Tyr-t a sejtek képesek felvenni és azokat sejtfehérjéikbe beépíteni.

Az irodalomban széles körben vizsgált jelenség az oxidatív stressz és az inzulin-rezisztencia összefüggése. Véleményünk szerint- az inzulin-rezisztencia során megfigyelt kóreltani változások nem csupán a háttérben meghúzódó oxidatív stressz következményeként jönnek létre, hanem a kóros aminosavak fehérjékbe történő beépülése által, melyek eltérő szerkezetük révén vezetnek a jelátviteli folyamatok megváltozásához.

A Phe, az oxidatív stressz egyik legreaktívabb célmolekulája és számos, klinikailag releváns, módosult aminosav-biomarker képződésében szerepet játszik [5]. Ismert tény, hogy a szuperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében hidroxil szabad gyökké alakul át [6]. A hidroxil szabad gyökök közreműködése révén, valamint ionizáló sugárzást követően a fehérjék Phe oldalláncaiból, nem enzimatis úton afiziológiás szerkezetű o- és m-tyr keletkezhetnek [7]. Így az o- és m-Tyr izomerek a hidroxil szabad gyök, egyben az oxidatív stressz markereinek tekinthetők [8] és autofluoreszcenciájuknak alapján, megfelelő minta előkészítést követően, a módosult mennyiségük közvetlenül mérhető fluoreszcens detektor segítségével [9]. Mivel kísérleteink nélkülöztek bármilyen nyilvánvaló oxidáló ágénst. Ennek fényében felmerül a lehetőség, hogy az o- és m-tyr, nem pusztán a a hidroxilgyök által indukált károsodás markerei, hanem önálló biológiai aktivitással rendelkező molekulák. Munkánk során azt találtuk, hogy mind az o-, mind a m-tyr-t az adipociták felveszik méghozzá az inzulin-kezeléstől független módon, ezt követően pedig a módosult aminosavakat a celluláris fehérjékbe beépítik.

Kísérleteink során, az adipociták csökkent glükózfelvételét már a tenyésztés 1. napjától kezdve észleltük, mind o-, mind m-Tyr-t tartalmazó médiumon. Ezek a megfigyelések, egy gyors hatásról árulkodnak és arra utalnak, hogy az o-, és m-Tyr direkt hatásáról van szó. A glükózfelvétel, már egy napos o- vagy m-Tyr-t tartalmazó médiumon való tenyésztést követően szignifikánsan csökkent és ez a szignifikancia a hosszabb időtartamú tenyésztési idők alatt változatlanul fennállt. Ebből arra következtethetünk, hogy a kóros Tyr izomerek már egy nap alatt is képesek a fiziológiás p-Tyr helyére beépülni, ezáltal pedig a jelátvitelt megváltoztatni. Ezen eredményekkel összhangban, munkánk során azt találtuk, hogy a orto- és metatirozin-izomereket tartalmazó médiumon nőtt adipocitákban károsodik az inzulin-indukálta glükózfelvétel, hasonlóan a magas glükóztartalmú médiumon nőtt sejtekhez, tehát a sejtekben inzulin-rezisztencia alakul ki. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a zsírsejtek glükózfelvétel csökkenésének háttérben az o- és m-tyr közvetlen hatása áll.

Munkánk során három különböző sejtvonal esetén is azt figyeltük meg, hogy a tenyésztőmédiumok o- és m-Tyr-nal való szupplementációja inzulin-rezisztenciához vezet, a magas glükóztartalmú milióhöz hasonlóan. Az o- és m-Tyr-t tartalmazó médiumon nőtt sejtek IRS foszforilációja inzulin jelenléte nélkül is nőtt, azonban ezt a növekedést inzulin nem volt képes tovább fokozni, tehát a tulajdonképpeni inzulinhatás ezekben a sejtekben elmaradt, míg kontroll sejtekben az inzulin szignifikánsan növelte az IRS-1 foszforilációját, minden sejtvonal esetén. A foszforiláció az Akt esetén is hasonlóan változott.

Összességében, munkánk során összefüggést mutattunk ki az o- és m-Tyr fehérjékbe való beépülése és az inzulin-jelátvitelre gyakorolt hatása között. Sajnálatos módon, a mai napig nem áll rendelkezésre olyan, a kereskedelemben elérhető antitest, mely specifikusan kötődne az o- és m-Tyr-hoz, vagy az o- és m-Tyr-t tartalmazó fehérjékhez, emiatt nem mutatható ki direkt módon a jelátviteli fehérjékben -így az IRS-1-ban, vagy Akt-ben való megjelenésük. Ugyanígy, mivel nem elérhető izotóp-jelölt o- és m-Tyr, nem lehetséges ezen aminosavak direkt kimutatása.

Mindezen limitációk ellenére vizsgálataink nagymértékben arra utalnak, hogy az o- és m-Tyr képes beépülni a zsírsejtek fehérjéibe. Majd a beépülést követően megzavarják az inzulin-jelátvitelét és gátolják az inzulin-stimulálta glükóz felvételt, tehát metabolikus inzulin-rezisztencia kialakulásához vezetnek, pontosan úgy, ahogy az kialakul hiperglikémiás körülmények között.

## 6. Következtetések

3T3-L1-adipocitákon történt vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy módosított fenilalanin-származékokat –nevezetesen o- és m-Tyr– tartalmazó médiumban nőtt sejtekben szignifikánsan csökken az inzulin-indukálta glükózfelvétel, következtetésképpen a sejtek inzulin-rezisztenssé válnak. Ennek háttérében feltételeztük, hogy az o- és m-Tyr-t a sejtek felveszik és fehérjékbe beépítik, mely hipotézisünket bebizonyítottuk, továbbá láttuk azt is, hogy mindezek a transzportfolyamatok inzulintól függetlenül zajlanak le a sejtekben. A kóros tirozinok fehérjékbe való beépülése, még pontosabban a jelátviteli fehérjék kritikus, tirozin-foszforilációs pontjaira való beépülése az inzulin-rezisztencia egy új, lehetséges magyarázata lehet. Ezt eredményeink is alátámasztották, miszerint megváltozott fehérje-foszforilációt észleltünk az inzulin-jelátvitelben szerepet játszó Akt és IRS-1 fehérjék esetén, melyet három sejtvonalon is bebizonyítottuk. Az o- és m-Tyr-hatás időfüggésének vizsgálati eredményeiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az inzulin-rezisztencia már az egy napos kezelés esetén kialakul és az egész tenyésztési idő alatt megmarad. Ez a hatás o-Tyr esetén háromszoros, m-Tyr esetén négyszeres mennyiségű p-Tyr-al kiküszöbölhető volt, melyből arra következtethetünk, hogy a p-Tyr kompetícióban áll a m-, és o-Tyr-al. Ez a tény a jövőben klinikai jelentőséggel bírhat, amennyiben a p-Tyr szupplementáció hatékony lehet az inzulin-rezisztencia kezelésében. Ez utóbbi feltételezésünk egy szabadalom alapját is képezi [10].



## 7. A dolgozat tézisei

- Az o- és m-Tyr-t a sejtek felveszik
- Az o- és m-Tyr-t a sejtek beépítik fehérjéikbe
- Az o- és m-Tyr hatására csökken a 3T3-L1-adipociták inzulin-függő glükózfelvétele
- Az o- és m-Tyr glükózfelvitelre gyakorolt hatását a p-Tyr képes kiküszöbölni
- Az o- és m-Tyr hatására csökken a 3T3-L1-adipocitákban, HEK-sejtekben és makrofágokban az Akt inzulin hatására történő aktiváló foszforilációja
- Az o- és m-Tyr hatására 3T3-L1-adipocitákban, HEK-sejtekben és makrofágokban az IRS-1 bazális foszforilációja nő, de inzulin hatására nem következik be a foszforiláció szignifikáns fokozódása, tehát az inzulinhatás elmarad

## 8. Publikációk

### 8.1. A disszertációhoz csatlakozó közlemények jegyzéke

Judit Mohás-Cseh, Gergő Attila Molnár, Marianna Pap, Boglárka Laczy, Tibor Vas, Melinda Kertész, Krisztina Németh, Csaba Hetényi, Orsolya Csikós, Gábor K. Tóth, Attila Reményi and István Wittmann. Incorporation of Oxidized Phenylalanine Derivatives into Insulin Signaling Relevant Proteins May Link Oxidative Stress to Signaling Conditions Underlying Chronic Insulin Resistance

BIOMEDICINES 2022 Apr 22;10(5):975. IF: 4,757

Összesített impakt faktor: 5,612

### 8.2. A disszertációhoz nem csatlakozó közlemények jegyzéke

Degrell P, Cseh J, Mohás M, Molnár GA, Pajor L, Chatham JC, Fülöp N, Wittmann I. Evidence of O-linked N-acetylglucosamine in diabetic nephropathy. Degrell P és Cseh J ekvivalens első szerzők. A cikk, disszertációban való felhasználásához Degrell Péter írásban hozzájárult. LIFE SCIENCES. 2009 Mar 27;84(13-14):389-93. IF : 2,56

Szijarto IA, Molnar GA, Mikolas E, Fisi V, Cseh J, Laczy B, Kovacs T, Boddi K, Takatsy A, Gollasch M, Koller A, Wittmann I Elevated Vascular Level of ortho-Tyrosine Contributes to the Impairment of Insulin-Induced Arterial Relaxation HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 46:(11) pp. 749-752. (2014) IF: 2,121

Mikolás E, Cseh J, Pap M, Szijártó I A, Balogh A, Laczy B, Bekő V, Fisi V, Mérei A, Molnár G A, Szeberényi J, Wittmann I Effects of erythropoietin on glucose metabolism HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 44:(4) pp. 279-285. (2012) IF: 2,145

Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Halmai R, Mészáros GL, Sümegi B, Winkler G, Wittmann I Rezveratrol hatása 2-es típusú diabeteses betegek anyagcseréjére MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 65:(2) pp. 75-81. (2012)

Brasnyó P., Molnár G.A., Mohás M., Laczy B., Cseh J., Mikolás E., Szijártó I.A., Mérei Á., Halmai R., Mészáros L.G., Sümegi B., Wittmann I.: Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. BRITISH JOURNAL OF NUTRITION 106(3): 383-389 (2011), IF: 3,072

Nagy G, Gaszner B, Lányi E, Markó L, Fehér E, Cseh J, Kőszegi T, Betlehem J, Sulyok E, Cziráki A, Wittmann I. Selective association of endogenous ouabain with subclinical organ damage in treated hypertensive patients. JOURNAL OF HUMAN HYPERTENSION 25(2):122-129 (2011), IF: 2,176

Mohás M, Kisfali P, Baricza E, Mérei A, Maász A, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Melegh B, Wittmann I. A polymorphism within the fructosamine-3-kinase gene is associated with HbA1c Levels and the onset of type 2 diabetes mellitus. EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 118(3):209-212 (2011), IF: 1,596

Brasnyó P., Molnár G.A., Mohás M., Laczy B., Cseh J., Mikolás E., Szijártó I.A., Mérei Á., Halmai R., Mészáros L.G., Sümegi B., Wittmann I.: Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. BRITISH JOURNAL OF NUTRITION 106(3): 383-389 (2011), IF: 3,072

Marosvolgyi T, Horvath G, Dittrich A, Cseh J, Lelovics Zs, Szabo E, Decsi T, Figler M. Fatty acid composition of plasma lipid classes in chronic alcoholic pancreatitis. PANCREATOLOGY 10(5):580-585 (2010), IF: 2,128

Mohás M, Kisfali P, Jaromi L, Maász A, Fehér E, Csongei V, Polgár N, Safrany E, Cseh J, Sümegi K, Hetyesy K, Wittmann I, Melegh B GCKR gene functional variants in type 2 diabetes and metabolic syndrome: do the rare variants associate with increased carotid intima-media thickness? CARDIOVASCULAR DIABETOLOGY 9:(1) Paper 79. 7 p. (2010) IF: 2,72

Nagy Gábor, Gaszner Balázs, Lányi Éva, Markó Lajos, Fehér Eszter, Cseh Judit, Kőszegi Tamás, Betlehem József, Sulyok Endre, Cziráki Attila, Wittmann István Az endogén ouabain összefügg a hypertóniás betegek kardiovaszkuláris állapotával MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 6:(63. évf.) pp. 435-442. (2010)

Wagner L, Laczy B, Cseh J, Tamaskó M, Mazák I, Markó L, Molnár G A, Wagner Z, Mohás M, Fekete A, Wittmann I Cigarettafüst okozta elváltozások az endothelsejtekben HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 14:(3) pp. 153-158. (2010)

Laczy B., Cseh J., Mohás M., Markó L., Tamaskó M., Kőszegi T., Molnár G. A., Wagner Z., Wagner L., Wittmann I.: Effects of pentoxifylline and pentosan polysulphate combination therapy on diabetic neuropathy in type 2 diabetes mellitus. ACTA DIABETOLOGICA 46(2): 105-111 (2009), IF: 1,549

Szigeti N, Markó L, Molnár GA, Fábíán G, Cseh J, Mohás M, Figler M, Király A, Kőszegi T, Wittmann I. Microalbuminuria in inflammatory bowel diseases using immunoturbidimetry and

high-performance liquid chromatography. ACTA GASTRO-ENTEROLOGICA BELGICA 72(4):394-401 (2009), IF: 1,01

Szigeti N, Molnár G A, Markó L, Fábíán Gy, Cseh J, Mérei Á, Szijártó I, Wittmann I Microalbuminuria colorectalis carcinomában MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 6: pp. 460-465. (2009)

Szigeti N, Molnár G A, Markó L, Fábíán Gy, Cseh J, Mérei Á, Szijártó I, Wittmann I Microalbuminuria colorectalis carcinomában MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 6: pp. 460-465. (2009)

Szigeti Nóra, Markó Lajos, Molnár Gergő Attila, Fábíán György, Cseh Judit, Figler Mária, Király Ágnes, Kőszegi Tamás, Wittmann István Microalbuminuria krónikus gyulladással járó bélbetegségekben. Az immunturbidimetriás és a nagy felbontású folyadékkromatográfiás módszer összehasonlítása Crohn-betegekben és colitis ulcerosában szenvedőkben MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 62:(1) pp. 26-33. (2009)

Mohás M., Szigeti N., Markó L., Molnár GA., Cseh J., Laczy B., Tamaskó M., Balla J., Kappelmayer J., Wagner L., Wagner Z., Csiky B., Nagy J., Wittmann I.: Serum total LDH activity and LDH-2 isozyme in nephrotic syndrome. KIDNEY AND BLOOD PRESSURE RESEARCH 31(1):47-54 (2008), IF: 1,268

Degrell P., Wagner Z., Szijártó I. A., Wagner L., Marko L., Mohas M., Cseh J., Wittmann I.: Morphology of glomerular Hematuria Is Reproduced in vitro by Carbonyl Stress. NEPHRON EXPERIMENTAL NEPHROLOGY 18:110(1):e25-e30 (2008), IF: 1,596

Markó L, Cseh J, Kőszegi T, Szabó Z, Molnár GA, Mohás M, Szigeti N, Wittmann Storage at -80 degrees C decreases the concentration of HPLC-detected urinary albumin: possible mechanisms and implications. JOURNAL OF NEPHROLOGY 22(3):397-402 (2008), IF: 1,252

Wagner L., Bekő V., Wagner Z., Cseh J., Boros AG., Wittmann I.: A renalis anaemia jelentősége diabetes mellitusban. DIABETOLOGIA HUNGARICA 16:(1) pp. 51-59. (2008)

Csiky B., Markó L., Mohás M., Cseh J., Mikolás E., Szijártó I., Wittmann I.: A losartan pleiotrop hatásai. LAM 18(10): 663-666. (2008)

Vas T., Markó L., Mohás M., Cseh J., Mikolás E., Szijártó I., Wittmann I.: Cardiovascularis rizikócsökkenés vesebetegekben. GRÁNUM 11(4): 17-22. (2008)

Figler M, Cseh J, Bodrogi P. Az étrendi flavonoidok és hatásaik MEDICUS ANONYMUS 5-6. 9-14. (2008)

Figler M, Major A, Cseh J. Flavonoidtartalmú étrend-kiegészítő fogyasztásának szubjektív hatása az egészségmutatókra. ÚJ DIÉTA 3-4 20-22. (2008)

Wagner L., Laczy B., Tamaskó M., Mazák I., Markó L., Molnár G. A., Wagner Z., Mohás M., Cseh J., Fekete A., Wittmann I.: Cigarette smoke-induced alterations in endothelial nitric oxid synthase phosphorylation: role of protein kinase C. ENDOTHELIUM 14(4):245-255 (2007), IF: 1,740

Figler M, Gasztonyi B, Cseh J, Horváth G, Kisbenedek AG, Bokor Sz, Decsi T.: Association on n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids in plasma lipid classes with inflammatory bowel diseases. *BRITISH JOURNAL OF NUTRITION* 97(6):1154-61 (2007), IF: 2,339

Wittmann I., Wagner L., Markó L., Tamaskó M., Laczy B., Mohás M., Cseh J., Melegh B.: A hereditær haemochromatosis jelentősége a diabeteszes betegek gondozásában. *ORVOSI HETILAP* 148(3):111-115. (2007)

Wagner Z., Wagner L., Tamaskó M., Markó L., Mohás M., Cseh J., Wittmann I.: A renin-angiotenzin-rendszer patogenetikai szerepe az érkárosodás kialakulásában. *HÁZIORVOS TOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE* 12(1): 47-51. (2007)

Laczy B., Markó L., Tamaskó M., Cseh J., Kőszegi T., Wagner L., Wagner Z., Molnár G. A., Mohás M., Wittmann I.: A pentoxifyllin és pentosan polysulphat kombinációs kezelés hatása a diabeteszes neuropathiára 2-es típusú diabetes mellitusban. *DIABETOLOGIA HUNGARICA* 15(1): 21-29. (2007)

Vágási K., Késői I., Kovács t., Molnár B., Degrell P., Wittmann I., Cseh J., Nagy J.: Növényi kivonat okozta akut veseelégtelenség. *ORVOSI HETILAP* 148(9): 421-424. (2007)

Mohás M., Markó L., Molnár G. A., Cseh J., Laczy B., Tamaskó M., Balla J., Kappelmayer J., Wagner L., Wagner Z., Csiky B., Nagy J., Wittmann I.: A szérum LDH-aktivitás és a vese-LDH izoenzim jelentősége nephrosis szindrómában. *MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM* 62: 47-52. (2007)

Bekő V., Mazák I., Markó L., Cseh J., Wagner L., Wittmann I.: A dihydralazin eritropoezisre kifejtett hatásának vizsgálata egy azotaemiás beteg kórtörténetében. *HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA* 11(2): 91-94. (2007)

Wittmann I., Laczy B., Mikolás E., Markó L., Mohás M., Cseh J., Wagner L.: A dohányzás inzulin-rezisztenciát okoz és növeli a 2-es típusú diabetes mellitus, illetve a metabolikus syndroma kialakulásának kockázatát. *DIABETOLOGIA HUNGARICA* 15(4):305-311. (2007)

Wittmann I., Markó L., Molnár G. A., Tamaskó M., Laczy B., Mohás M., Cseh J., Wagner Z., Wagner L.: Az endotheldysfunctio gyógyszeres kezelése. *GRANUM* 9(4):7-10. (2006)

Wittmann I., Molnár G. A., Tamaskó M., Laczy B., Markó L., Mohás M., Cseh J., Wagner Z., Wagner L.: A protein kináz C- $\alpha$  szelektív gátlásának jelentősége a diabeteszes microvascularis szövödmények kezelésében. *DIABETOLOGIA HUNGARICA* 14(Suppl 4):13-18. (felkért összefoglaló) (2006)

Összesített impaktfaktor: 29,714

## 9. Irodalomjegyzék

1. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes research and clinical practice*. 103(2):137-49. 2014.
2. Robertson RP, Harmon JS. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: a case of double jeopardy for the pancreatic islet  $\beta$  cell. *Free Radical Biology and Medicine*, Elsevier. 2006.
3. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus American Diabetes Association *Diabetes Care* 37 (Supplement 1): S81-S90. 2014.
4. Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104:517-29.2001.
5. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 15;272(33):20313-6. Aug 1997.
6. Haber F, Weiss J. The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 147, no. 861, pp. 332– 351, Nov. 1934.
7. Ishimitsu S, Fujimoto S, Ohara A. High-performance liquid chromatographic determination of m-tyrosine and o-tyrosine in rat urine. *J. Chromatogr*. 489(2):377-383. 1989
8. Molnár GA, Kun S, Sélley E, Kertész M, Szélig L, Csontos C, Böddi K, Bogár L, Miseta A, Wittmann I. Role of Tyrosine Isomers in Acute and Chronic Diseases Leading to Oxidative Stress - A Review. *Curr Med Chem*. 2016;23(7):667-85.
9. Karam LR, Simic MG. Detecting irradiated foods: use of hydroxyl radical biomarkers. *Anal Chem*. 1988;60:1117A–1119A
10. Wittmann I, Molnar GA, Mohás-Cseh J, Szijártó IA. Treatment and prevention of diseases related to oxidative stress, *Lajstromszám: US 20140128472 A1*, Közzététel éve: 2014

## **10. Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Wittmann István Professzor Úrnak támogatásáért, útmutatásáért. Azért, hogy lelkesítő szavaival és iránymutatásával átsegített a kudarckok okozta nehézségeken.

Köszönöm Pap Marianna tanárnő szakmai és baráti támogatását, ötleteit, a kísérleteim körüli szervezőmunkáját.

Köszönöm kollégáim, elsősorban Dr. Mikolás Esztella Zsóka, Szijártó István András, Dr. Mohás Márton, Dr. Markó Lajos segítségét, akik munkájukkal hozzájárultak eredményeimhez.

Köszönettel tartozom azért az asszisztensi háttérért, mely lehetőséget teremtett a zavartalan munkavégzéshez és nagymértékben hozzájárult eredményeim létrejöttéhez, Lendvai Anikónak, Bertusz Józsefnének, Sámikné Varga Ilonának, Szalma Krisztinának és Póta Saroltának.

Szeretném megköszönni a II-es Számú Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum professzori titkárságán dolgozó hölgyek –Bodor Enikő, Horváth Claudia és Horváth Viktória-munkáját, továbbá klinikánk összes dolgozójának segítségét, akik munkában támogatást nyújtottak.

Végezetül köszönöm családom és barátaim türelmét, hogy bíztak bennem és minden körülményt biztosítottak annak érdekében, hogy munkámat zavartalanul végezhessem.