

## **Az érfunkció redox szabályozása.**

### **Egy új mechanizmus, mely vaszkuláris inzulin-rezisztenciához vezethet.**

Doktori (Ph.D.) tézis

**Dr. Szijártó István András**

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Programvezető: Prof. Dr. Wittmann István

Témavezetők: Dr. Molnár Gergő Attila és Prof. Dr. Wittmann István



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,

II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum

Pécs, 2015.

## 1. Bevezetés

A 2-es típusú diabetes mellitus komplex metabolikus betegség, mely vaszkuláris szövődeményekkel is jár, az elégtelen vércukor-beállítás mikro- és makrovaszkuláris szövődemények kialakulásához vezet. Az inzulin-rezisztencia a cukorbetegség patogenezisének és az érszövődeményeknek központi tényezője. A vaszkuláris inzulin-rezisztencia a magasvérnyomás-betegség kialakulásának ugyancsak egy korai eleme, mely magyarázhatja a cukorbetegség és a hipertónia gyakori társulását.<sup>1</sup> Az endotél-diszfunkció inzulin-rezisztenciával és az érfal merevségének (stiffness) megnövekedésével jár. Az inzulinra adott vazorelaxáció csökkenése megelőzi az acetilkolinra adott vazorelaxáció csökkenését, tovább erősítve a hipotézist, hogy a vaszkuláris inzulin-rezisztencia korai folyamat a hipertónia kialakulásában.<sup>1</sup>

Az inzulin meghatározó hormonális tényező az anyagcsere szabályozásában, mindemellett fontos szerepet játszik az érfunkció szabályozásában.<sup>2, 3</sup> Az inzulin mind vazorelaxációt, mind vazokonstriktiót képes kiváltani.<sup>4</sup> A vazodilatátor hatásokért elsősorban a foszfatidilinozitol 3-kináz/Akt (PI3K/Akt) jelátviteli úton keresztül felszabaduló endoteliális nitrogénmonoxid (NO) felelős.<sup>5, 6</sup> Ezzel szemben az ERK jelátviteli útvonal aktiválása révén az inzulin az endothelin-1 felszabadulásához vezet, mely vazokonstriktiót vált ki.<sup>7</sup> Mindemellett a reaktív oxigén- (ROS) és nitrogénszármazékok (RNS) is fontos szerepet játszanak a fiziológias inzulin jelátvitelben; példának okáért a hidrogén-peroxid inzulinszerű hatásokat közvetít és az inzulin ROS és RNS felszabaduláshoz vezet.<sup>8</sup>

A ROS diabéteszes érkárosodásban betöltött szerepének jelentős irodalma van. A ROS különböző jelátviteli utak aktiválása révén befolyásolják az érfunkciót, a proinflammatorikus mediátorok expresszióját és az érfal strukturális átépüléséhez vezetnek.<sup>9</sup> A ROS felgyülemelése, a nitrogén-monoxid koncentrációjának csökkenése, a sérült inzulin-jelátvitel és a gyulladásos folyamatok aktivációja a vaszkuláris inzulin-rezisztencia legfőbb jellemzői.<sup>10, 11</sup>

A 2-es típusú cukorbetegség vércukor-háztartásának korai és megfelelő beállítása és a normoglikémia elérése jelentősen javítja az inzulin-érzékenységet, sőt egy rövid és intenzív inzulin-terápia a glikémiás kontroll, valamint az endotél-funkció javulásához és az inzulin-rezisztencia csökkenéséhez vezethet, mely akár a betegség remisszióját is okozhatja.<sup>12, 13</sup> Ezen

átmeneti intenzív inzulinkezelés pozitív élettani hatásainak mechanizmusa a mai napig nem teljesen tisztázott.

Jelentős kísérletes adat igazolja az oxidatív stressz szerepét az inzulin-rezisztencia kialakulásában. Az oxidatív károsodás fő célpontjai a fehérjék, mely folyamat végül a fehérjefunkció károsodásához vezethet. Azonban a direkt károsodáson kívül léteznek egyéb, szintén a fehérjefunkció károsodásához vezető mechanizmusok, melyek eddig kevés figyelmet kaptak. Ismert, hogy a szuperoxid anion hidrogén-peroxiddá továbbalakulva még reakcióképebb oxigén gyökök képződéséhez vezethet, mint például a hidroxil szabad gyök.<sup>14</sup> A hidroxil gyök hatására a fenilalaninból para-, meta- és orto-tirozin képződik.<sup>15-18</sup>

Ezek az oxidatíván módosult aminosavak mind fehérjéhez kötött,<sup>15</sup> mind szabad aminosav formában képződhetnek. Az utóbbiak később a fehérjeszintézis folyamán épülhetnek be egy fehérjemolekulába. Ez utóbbi folyamat tehát direkt, a fehérjemolekulára ható oxidatív károsodás nélkül képes citotoxikus hatásokat kiváltani.<sup>19-21</sup>

Hiperglikémiás makákók aortájában emelkedett orto- és meta-tirozin koncentrációt mértek.<sup>15</sup> Továbbá az orto- és meta-tirozin beépülése a fehérjemolekulákba a sejtfunkció zavarához vezethet, mint például az erythroblasztok erythropoietin érzékenységének csökkenéséhez, vagy – *in vivo* körülmények között – a tumornövekedés gátlásához, valószínűleg az MAP/ERK jelátviteli útvonal befolyásolása révén.<sup>22,23</sup>

A kívülről bejuttatott orto-tirozin beépülése az érfali fehérjékbe és ennek hatása az érfunkcióra még nem képezte kutatás tárgyát.

## 2. Célkitűzések

Feltételezésünk szerint az érfali redox szint a periféria felé csökken és ennek megfelelően az inzulin kiváltotta – NO mediált – vazodilatáció mértéke növekszik a periféria irányában. Ezen kívül *in vivo* körülmények között vizsgáltuk exogén, oxidatív módon módosított aminosav (orto-tirozin) érfunkcióra gyakorolt hatását.

Hipotéziseink igazolásához:

- Meghatároztuk az artériás rendszer három egymást követő szegmensének (mellkasi, hasi aorta és femorális artéria) oxidatív szintjét kontroll körülmények között, illetve az érfali oxidatív állapot farmakológiai és sebészeti (az aorta operatív szűkítése révén, ún. aortic banding) befolyásolása után.
- Megmértük az inzulinra adott vazorelaxáció mértékét ugyanezen érszegmensekben kontroll körülmények között.
- Majd az érfali oxidatív állapot farmakológiai ( $H_2O_2$  + aminotriazol) vagy sebészi (aortic banding) módosítása után.
- Ezen felül megvizsgáltuk az ERK jelátviteli útvonal jelentőségét az inzulin által kiváltott érválaszban.
- Továbbá elsőként vizsgáltuk az exogén orto- és para-tirozin hatását a vaszkuláris inzulinérzékenységre és
- Ennek hatásmechanizmusát *in vitro* körülmények között endotélsejteken és különböző érszegmensekben akut és krónikus körülmények között.

### 3. Metodika

#### 3.1 Állatkísérletek

Az állatkísérleteket a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével hajtottuk végre. Kifejlett (11-13 hetes, 320-380g súlyú), hím Sprague-Dawley, szokványos ad libitum diétán tartott patkányokat használtunk a nem-intervenciós kísérleteinkhez. A kísérletek előtt az állatokat intraperitoneális ketamin injekcióval (50 mg/ttkg, i.p.; Richter Gedeon, Budapest, Magyarország) altattuk, majd dekapitáltuk.

Ahogy korábbi kísérleteink során is<sup>24</sup>, az aorta operatív szűkítését (aortic banding) hím Sprague-Dawley patkányokon (8 hetes, átlagos súly: 220 gramm) végeztük. Általános érzéstelenítés és ketamin/diazepam narkózis (50, ill. 5 mg/ttkg, i.p.) alatt felnyitottuk a hasüreget, majd a bifurcatio iliaca felett kipreparáltuk a hasi aortát. Ezután egy 21G méretű tűt rögzítettünk egy 2-0 varrófonal segítségével a felszabadított aortaszakaszhoz, úgy, hogy a varrat az aortát és a vele párhuzamosan tartott tűt fogta át. Ezután finoman és lassan eltávolítottuk a tűt, így előidézve egy megközelítőleg 21G lumenű mesterséges koarktációt az ilikális artériáktól proximális irányban.<sup>24</sup>

A tirozin izomer beépülésének vizsgálatához hím (5-6 hetes, 100-140g-os) Sprague-Dawley patkányokat kezeltünk (a hét 6 napján) 4 héten keresztül 2 órás éhezés után gyomorszondán keresztül 1,76 mg / nap para- illetve orto-tirozin oldattal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vagy oldószerrel (kontroll). A négy hetes kezelés végeztével a patkányok egy csoportját a fenti módon ketaminnal elaltattuk, dekapitáltuk, majd az erek orto-tirozin tartalmát és vazomotor válaszát vizsgáltuk. A patkányok másik csoportjában a 4 hét tirozin szupplementációt követően megszakítottuk a kezelést, majd 4 hét kimosási periódus után („washout”) vizsgáltuk az érfali orto-tirozin-koncentrációt és a vazomotor választ.

Kísérleteinkben a mellkasi és a hasi aortát, valamint a femorális artériát távolítottuk el, majd miután megtisztítottuk az ereket az azokat körülvevő kötőszövettől, két egyenlő hosszúságú szegmenst képeztünk az egyes szakaszokból. A proximális szakaszokat azonnal hidrolizáltuk a HPLC-s kísérletekhez, a disztális szakaszokat használtuk az izometriás kontrakciós mérésekhez.

### **3.2 Az oxidatív státusz és a tirozin izomer inkorporációjának vizsgálata az egymást követő artériás szegmensekben**

Mivel a hidroxil gyök féléletideje nagyon rövid és kimutatása metodikailag kifejezetten körülményes <sup>25</sup>, egy alternatív megoldást alkalmaztunk, mely segítségével az oxidatív reakció egy stabil végtermékét vizsgáltuk: a természetes fenilalanin izomerjét, az orto-tirozin molekulát. <sup>15-18</sup> Az adott érszakasz proximális szakaszát O-gyűrűvel lezárt polipropilén csövekben hidrolizáltuk. A mintákhoz dezferroxiamint és butilált hidroxitoluént (végkoncentráció 3,6 ill. 45 mM) adtunk a hidrolízis alatti szabadgyök képződés gátlása végett, majd 200 µl 12N-es sósavval hidrolizáltuk a fehérjéket egy éjszakán át 120°C-on. <sup>17</sup> A hidrolizátumot egy 0,2 µm szűrőn át tisztítottuk (Millipore Co., Billerica, MA, USA), végül az így kapott oldatból egy Rheodyne manuális injektor segítségével 20 µL-t injektáltunk a Shimadzu Class LC-10 ADVP HPLC rendszerbe (Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA). Az aminosavak kvantitatív analízisét autofluoreszcenciájuk alapján végeztük, LiChroCHART 250-4 oszlopon (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 1%-os ecetsav és nátrium-acetát mobil fázison való izokratikus futtása után. A tirozin izomereket autofluoreszcenciájuk alapján 275 nm-es excitációs és 305 nm emissziós hullámhosszokon, míg a fenilalanin szintjét 258 nm-es excitációs és 288 nm-es emissziós hullámhosszokon mértük Shimadzu RF-10 AXL fluorescens detektor (Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA) segítségével, így nem volt szükség a futtatás előtti vagy utáni, ún. pre- vagy post-column festésre vagy derivatizációra. <sup>17, 18</sup> Az egyes aminosavak esetében meghatároztuk a görbe alatti területet (area-under-the-curve, AUC) és külső standard segítségével pontosan meghatároztuk a koncentrációjukat. Néhány esetben az elúciós időt a „peak-addition” módszer alapján hitelesítettük. Az aminosavak koncentrációját fenilalaninra normalizáltuk.

### **3.3 Az érszegmensek vazomotor funkciójának meghatározása**

Kísérleteink során Fésüs és mtsai. <sup>26</sup> módosított metodikáját használtuk. Az érszegmensek disztális részét – jéghideg KREBS oldatban – 2 mm hosszú szakaszokra vágtuk, majd egy Danish Multimyograph Model 610M készülékben (DMT-USA Inc., Atlanta, GA, USA) két (egyenként 40 µm átmérőjű) rozsdamentes acéldróra rögzítettük.

A készülék kamráiban az ereket 5% CO<sub>2</sub> és 95% O<sub>2</sub> állandó áramoltatása alatt 37°C-os KREBS pufferben (pH 7,4) inkubáltuk, melynek pontos összetétele a következő volt (mM-ban): NaCl 119,0, KCl 4,7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 25,0, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2, glükóz 11,1 és CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 1,6. Minden egyes kísérlet során meghatároztuk az adott érszegmens nyugalmi feszülés/átmérő viszonyát, majd az érfal belső átmérőjét 0,9 x L100-ra állítottuk be, ahol az L100 azt a belső érátmérőt jelöli, ahol az adott vaszkuláris szegmens *in vivo* körülmények között 100 Hgmm transzmurális nyomás alatt lenne elernyedett állapotban. Ezen normalizálási folyamat után 30 percig hagytuk stabilizálódni az ereket. Ezután folyamatosan regisztráltuk az érfal feszülését. Az ereket 100 nM adrenalinral kontraháltuk. Miután a kontrakció elért egy stabil platót, növekvő koncentrációjú acetilkolin (ACh), inzulin illetve nátrium-nitroprusszid (SNP) oldatok hozzáadásával teszteltük a vazorelaxáns választ. Az ACh-ra, inzulinra és SNP-re adott vazorelaxációt az adrenalinra adott kontrakció százalékában fejeztük ki.

Az antioxidáns kapacitást kataláz (CAT; 1000 U/l) és szuperoxid-dizmutáz (SOD; 200 U/l) hozzáadásával emeltük. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50µM) pro-oxidáns hatását a CAT-gátló aminotriazollal fokoztuk (AT; 1mM).<sup>27</sup> Továbbá az endogén kataláz aktivitás gátlása révén lehetőségünk volt – indirekt módon – az egyéb peroxidázok hatását vizsgálni.<sup>28</sup> A SOD-ot és CAT-ot (SOD+CAT) és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t és AT-t (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT) 20 perccel az adrenalin indukálta kontrakció előtt adtuk az érkamrákhoz. Az ERK jelátviteli út H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT indukálta vazokonstrikcióban és vaszkuláris inzulinrezisztenciában betöltött szerepének vizsgálatához a mitogén aktivált protein kináz kináz (MAPKK) gátló PD98059-t (PD; 10 µM és 50 µM) használtuk.<sup>29</sup> A PD-t 30 perccel az adrenalin hozzáadása előtt adtuk az érkamrákhoz.

Az acetilkolint, nátrium-nitroprusszidot, inzulint, adrenalint (epinefrin), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t, aminotriazol, szuperoxid-dizmutázt, katalázt, PD98059-t és Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ot a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) szereztük be. A NaCl-ot, KCl-ot, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-ot, NaHCO<sub>3</sub>-ot, CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O-ot és glükózt a Merck-től (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) vásároltuk.

### 3.4 Sejtkultúra

Kísérleteinkhez egér endothelióma sejtek (LGC Promochem, Taddington, UK) (endotélsejtek, ECs) primer kultúráit használtuk. Az endotélsejteket 10% főtális marha

szérummal (FBS, Gibco) és 2%-os penicillin-streptomycinnel (Gibco) kiegészített Dulbecco's modified Eagle mediumon (DMEM; Gibco, Csertex, Budapest, Hungary) tenyésztettük 37°C-on és 5% CO<sub>2</sub> alatt. A médiumot minden másnap cseréltük. Az endotélsejt-kultúrákat véletlenszerűen három csoportra osztottuk, és 1) 400 µM para-tirozint (kontroll); 2) 800 µM para-tirozint (p-Tyr) és 3) 400-400 µM para-tirozint és orto-tirozint (o-Tyr) tartalmazó médiumokban inkubáltuk 8 napig, illetve 30 percig a krónikus illetve akut hatások vizsgálatához. Az endotélsejteket inzulinnal (400 µM, 5 perc) stimuláltuk az inzulin mediálta eNOS-foszforiláció vizsgálatához. A kezelések végeztével az endotélsejteket a további analízisekhez mechanikusan eltávolítottuk.

### **3.5 A tirozin izomer beépülésének vizsgálata az endoteliális sejtekben**

A fehérjekötött tirozin-izomer mennyiségét Molnár és mtsai. módszerével vizsgáltuk.<sup>17</sup> Miután 200 µl desztillált vizet adtunk a mintákhoz, ultrahanggal 2 percig homogenizáltuk azokat, majd 100 µl 60%-os triklórecetsavat adtunk a mintákhoz. Ezután centrifugáltuk (4000 rpm, 10 perc) az oldatot, majd az üledéket 100 µl 1% triklórecetsavas oldattal reszuszpendáltuk, miután ismét 100 µl 60% triklórecetsavat adtunk a mintákhoz, amit egy második centrifugálás követett. Ezután még egyszer megismételtük az utóbbi folyamatot. Végül a hidrolízis alatti szabadgyök képződés megelőzése végett 4 µl 400 mM-os dezferroxamint és 40 µl 500 mM butilált hidroxitoluent adtunk az üledékhez. Ezután 400 µl 6N-es sósavval hidrolizáltuk a mintákat, így előkészítve őket a HPLC-s vizsgálatokhoz.

### **3.6 Western Blot vizsgálatok**

Az eNOS-foszforiláció meghatározását az általunk már korábban alkalmazott immunoblot eljárással végeztük.<sup>30</sup> Az endotélsejteket jégen 30 percig kezeltük Tris-Triton pufferrel. A sejtlyátumot centrifugáltuk (13000 rpm, 10 perc), majd a Bio-Rad protein esszé segítségével (Hercules, CA, USA) meghatároztuk a felülúszó fehérje koncentrációját, marha szérum albumin (BSA) alkalmazva standardként. Ezután egyenlő mennyiségű fehérjét oldottunk SDS-PAGE-vel, majd PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA) membránra transzferáltuk



őket. A fehérjemennyiséget Ponceau-S festéssel ellenőriztük. A membránokat 60 percig blokkoltuk 0,1 v/v%-os Tween-t és 5 v/v%-os BSA-t (TBS-T-5% BSA) tartalmazó Tris bázissal szobahőmérsékleten. Ezután a blotokat TBS-T 5% BSA-ban hígított foszfo-(Ser1177)-eNOS antitestekkel kezeltük (1:1000; CellSignaling, Beverly, MA, USA) 4°C-on egy éjszakan keresztül, melyet egy mosási fázis követett. Végül az oldatot másodlagos torna-peroxidáz (HRP) jelölt, anti-nyúl IgG antitesttel (1:2000; CellSignaling) inkubáltuk 60 percen át szobahőmérsékleten. További mosást követően a blotokat felerősített immun-lumineszcenciával (ECL; Super-Signal West Pico, ThermoFisherScientific, MA, USA) tettük láthatóvá, majd röntgenfilmen előhívtuk (Kodak XAR). A denzitometriás vizsgálatokhoz a Scion Image for Windows szoftvert (Frederick, MD, USA) használtuk. A foszfo-(Ser1177)-eNOS szinteket az össz-eNOS szintre korrigáltuk, melyet a blotok strippelése utáni ismételt jelöléssel határoztunk meg.<sup>30</sup>

### **3.7 Statisztikai analízis**

Az adatokat átlag  $\pm$  SE formában fejeztük ki. Minden eloszlást a Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével teszteltünk. A statisztikai elemzést ANOVA-val, valamint extra sum-of-squares F test és egyéb nem-parametrikus tesztek segítségével végeztük el, az SPSS 15.0-s verziójának valamint a GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) használatával. Szignifikáns különbségnek a 0,05 alatti p-értéket vettük, melyeket az ábrák és táblázatok alatt jelöltünk.

## **4. Eredmények**

### **4.1 A vaszkuláris redox státusz, az érfali orto-tirozin-szint alapján, a kezeletlen patkányok különböző érszakaszain**

A legmagasabb orto-tirozin-szintet a mellkasi, majd ezt követően a hasi aortában mértük, míg a legalacsonyabb szintet a femorális erekben mutattuk ki. Ez alapján elmondható, vagy az orto-tirozin érfali koncentrációja alapján mért vaszkuláris redox státusz csökken a periféria irányában. Továbbá, az erek  $H_2O_2+AT$  való kezelése után megnövekedett az érfali orto-tirozin mennyisége a mellkasi aortában, azonban változatlan maradt a hasi aortában és a femorális artériában a kontrollokhoz viszonyítva. Az aortic banding esetében kapott eredmények igencsak hasonlóan adódtak a  $H_2O_2+AT$  kezelés után kapott eredményekhez, vagyis itt is jelentős orto-tirozin emelkedést figyeltünk meg a mellkasi aortában, míg nem változott az orto-tirozin szintje a hasi aortában és a femorális artériában a kontrollokhoz képest. A SOD+CAT kezelés hatására szignifikánsan csökkent az orto-tirozin szintje a mellkasi aortában és a femorális artériában, míg változatlan maradt a hasi aortában a kontroll erekhez képest.

### **4.2 A vazomotor válasz a kezeletlen patkányok különböző érszakaszain**

Az inzulinra adott vazorelaxációban jelentős különbségeket észleltünk az anatómiailag egymást követő érszakaszok között. Az inzulin  $EC_{50}$  értéke a femorális artériában lényegesen alacsonyabb volt a két aortaszakaszhoz viszonyítva. Továbbá az inzulin  $EC_{50}$  értéke a hasi aortában alacsonyabbnak adódott a mellkasi aortához képest. Mindezt összefoglalva elmondható, hogy az inzulin által kiváltott vazorelaxáció mértéke nő a vaszkuláris periféria irányában. Hasonló különbségeket találtunk az acetilkolinra és az SNP-re adott vazorelaxáció esetén is. Az inzulinfüggő vazorelaxáció döntő részt a PI3K/AKT/eNOS jelátviteli úton keresztül mediált. Az eNOS L-NAME-vel történő gátlása csaknem teljes mértékben gátolta az inzulinra adott vazorelaxációt. Mindazonáltal az inzulinra adott relaxációban jelentősen csökken az eNOS mediálta NO-függő relaxáció részaránya a periféria irányában, sőt a femorális artériában inkább endotélium független faktorok játsszák a főszerepet az inzulinfüggő vazodilatációban.

#### **4.3 A redox státusz SOD+CAT és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT-al való befolyásolásának hatása az inzulinfüggő vazorelaxációra**

A vaszkuláris redox státusz inzulinfüggő vazorelaxációban betöltött szerepének további vizsgálatához különböző, egymást követő artériás érszakaszokat inkubáltunk SOD+CAT-al (a redox státusz csökkentéséhez), vagy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT-vel (a redox státusz emeléséhez). A mellkasi aortában a SOD+CAT kezelés jelentősen növelte az inzulinra adott vazorelaxáció mértékét. A mellkasi aortában a SOD+CAT kezelés nem változtatta meg az inzulinfüggő relaxáció mértékét, míg a femorális artériában csökkentette azt. Mindazonáltal a SOD+CAT-al kezelt mellkasi aortában mért inzulin okozta vazorelaxáció mértéke nem érte el a kezeletlen femorális artériában mért szintet.

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT kezelés jelentősen csökkentette az inzulinra adott vazorelaxációt a mellkasi aortában, míg nem változtatott a hasi aortában mért vazorelaxáción. Ezzel szemben a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT kezelés növelte az inzulin kiváltotta vazorelaxációt a femorális artériában.

#### **4.4 Az aortaszűkítés által okozott redox állapotváltozás hatása az inzulinra adott vazorelaxációra kezeletlen patkányokban**

A következőkben megvizsgáltuk az aortaszűkítés által kiváltott érfali orto-tirozin-koncentráció változását, így következtetve a redox státusz módosulására. Korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy az aortaszűkítés növeli az artériás vérnyomást a lekötéstől proximális irányban lévő érszegmensekben.<sup>24, 31</sup> Jelen kísérleteink során azt találtuk, hogy az aortaszűkítés csökkentette az inzulinfüggő vazorelaxációt a mellkasi és a hasi aortában, azonban nem változtatta meg az inzulinra adott vazorelaxáció mértékét a lekötéstől disztális irányban, a femorális artériában.

#### **4.5 Az ERK jelátviteli útvonal gátlásának hatása az inzulinfüggő vazomotor válaszra a kezeletlen patkányok különböző artériás érszakaszaiban**

Az ERK jelátviteli útvonal inzulin okozta vazorelaxációban betöltött szerepének vizsgálatához az ereket az ERK inhibitor PD98059-el (PD; 10 $\mu$ M, 30 perc) inkubáltuk. A mellkasi aortában a PD98059 kezelés teljesen visszafordította az inzulin okozta vazorelaxációban a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT által kiváltott csökkenést. Hasonlóképp fordította vissza a PD98059-kezelés az aortaszűkítés általi inzulin indukálta vazorelaxáció-csökkenést. A hasi aortában a PD98059 kezelés nem változtatta meg az inzulin okozta vazorelaxáció mértékét H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT jelenlétében, de az aortaszűkítéses modellben részlegesen visszafordította a csökkent inzulin általi vazorelaxációt. Ezzel ellentétben a PD98059 teljes mértékben gátolta az adrenalin kiváltotta vazokonstriktiót a femorális artériában, így metodikai okoknál fogva nem tudtuk vizsgálni az ERK jelátviteli útvonal jelentőségét ezen artériás szegmensben.

#### **4.6 A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT és az ERK jelátviteli útvonal gátlásának szerepe a kezeletlen patkányok különböző érszakaszainak vazomotor válaszában**

A következő kísérletsorozatban a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT okozta átmeneti vazokonstriktiót vizsgáltuk a különböző artériás szegmensekben inzulin hozzáadása nélkül. A legnagyobb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT okozta vazokonstriktiót a mellkasi, majd a hasi aortában mértük, míg a femorális artériában kisebb mértékű vazokonstriktiót találtunk. Az ERK inhibitor PD98059-el történő inkubálás azonban jelentősen csökkentette a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT okozta vazokonstriktió mértékét.

#### **4.7 A krónikus orális orto-tirozin kezelés hatása az érfali orto-tirozin koncentrációra**

Egy hónapos per os para-, orto-tirozin vagy kontroll (oldószer) kezelés után megmértük az orto-tirozin koncentrációját a mellkasi és hasi aortában valamint a femorális artériában. Az orto-tirozin kezelés hatására szignifikánsan nőtt az érfali orto-tirozin koncentráció mindhárom artériás szegmensben a kontroll és para-tirozinnal kezelt csoporthoz képest. Négy héttel a tirozin kezelés abbahagyása után (tehát a 8. héten) ismét meghatároztuk az érfali orto-tirozin

koncentrációt ugyanezekben az érszakaszokban és nem találtunk különbséget a három kezelési csoport között (orto-, para-tirozin, kontroll).

#### **4.8 A krónikus orto- és para-tirozin kezelés hatása az inzulin kiváltotta vazorelaxációra**

Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja az *in vivo* krónikus orto-tirozin kezelés az inzulin okozta *ex vivo* vazorelaxációt. A hasi aortában és femorális artériában jelentősen csökkent az inzulin okozta vazorelaxáció mértéke az orto-tirozinnal etetett patkányokban a para-tirozin és kontroll csoporthoz képest. A mellkasi aorta esetében azonban nem találtunk különbséget az inzulin okozta vazorelaxációban az orto-tirozin és a kontroll csoport között. Ellenben szignifikánsan nagyobb inzulinfüggő relaxációt mértünk a para-tirozin kezelt csoportban a másik két csoporthoz képest. Négy héttel a tirozin izomer kezelés abbahagyása után (tehát a 8. héten) mért inzulin kiváltotta vazorelaxáció mértéke nem különbözött szignifikánsan egyik érszakasz esetében sem a különböző csoportok között (orto-, para-tirozin és kontroll).

#### **4.9 A különböző tirozin izomerek akut hatásainak vizsgálata az inzulinfüggő vazorelaxációra**

Kísérleteink során nem találtunk különbséget a 30 perces (akut) orto- vagy para-tirozinnal illetve kontroll körülmények közötti inkubálás után a különböző artériás szegmensek inzulinra adott vazorelaxációjában.

#### **4.10 A para- és orto-tirozin beépülése az endoteliális sejtek fehérjéibe**

A különböző tirozin izomerek fehérjékbe történő beépülésének vizsgálatához megmértük az endotél sejtekben a fehérjéhez kötött orto-tirozin koncentrációját kontroll körülmények között, illetve para- illetve orto-tirozinnal történő 30 perces (akut kísérlet) vagy 8 napos (krónikus kísérlet) kezelés után. Az akut kísérletekben nem találtunk különbséget az endotél sejtek fehérjéhez kötött orto-tirozin tartalmában a különböző csoportok között (para-

, orto-tirozin, kontroll). A krónikus kísérletek esetében az orto-tirozinnal kezelt endotél sejtekben magasabb fehérjéhez kötött orto-tirozin mennyiséget mértünk a kontroll és para-tirozinnal kezelt csoportokhoz képest.

#### **4.11 A különböző tirozin izomerek hatása az inzulin indukált eNOS foszforilációra endotél sejtekben**

A megemelkedett érfali orto-tirozin koncentrációval járó csökkent inzulin okozta vazorelaxáció pathomechanizmusának további vizsgálatához megmértük az endoteliális sejtekben az eNOS aktiváló foszforilációjának mértékét 8 napos para- és orto-tirozin izomerrel történő kezelése után illetve kontroll körülmények között. Az immunoblot analízis alapján az aktiváló eNOS-foszforiláció jelentősen csökkent az orto-tirozinnal kezelt endoteliális sejtekben a kontrollhoz képest.

## 5. Megbeszélés

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az erek redox állapota jelentősen befolyásolja a vazomotor funkciót.<sup>32</sup> A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> által aktivált ERK jelátviteli útvonal csökkenti az inzulinfüggő vazorelaxáció mértékét.<sup>33</sup> Eredményeink egyértelműen mutatják, hogy az artériás érrendszeren belül a periféria irányában csökkenő érfali redox státusz a felelős az egyes érszakaszok közötti vaszkuláris inzulin válaszban fellelhető különbségekért. Elsőként igazoltuk, hogy a hetekig tartó orto-tirozin kezelés csökkentette az inzulinfüggő vazorelaxációt, részben endoteliális diszfunkciót kiváltva, ahogyan azt az endotélisejtekben krónikus orto-tirozin kezelésére csökkenő inzulin indukált aktiváló eNOS foszforiláció alapján feltételezzük.

### 5.1 Az inzulinra adott vazomotor válasz az artériás érrendszeren belül: a vaszkuláris redox státusz szerepe

Kísérleteink során a legmagasabb orto-tirozin szintet a mellkasi aortában találtuk a disztális érszakaszokhoz képest. Ezen felül az aortic banding, vagy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT kezelés jelentősen növelte a mellkasi aorta orto-tirozin tartalmát, de nem növelte az hasi aortáét vagy a femorális artériáét. Kísérletes adataink alapján arra következtethetünk, hogy a hasi aortában és különösképpen a femorális artériában lényegesen magasabb az antioxidáns kapacitás a mellkasi aortához képest.<sup>34</sup>

Eredményeink alapján elmondható, hogy az érfali redox státusz csökken, míg az inzulinra adott vazorelaxáció nő a periféria felé. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT által kiváltott vazokonstriktió dózisfüggően gátolható az ERK inhibitor PD98059-el, ami alapján valószínű, hogy az ERK jelátviteli útvonal főszerepet játszik a ROS kiváltotta vazomotor válaszban. Ezek a kezelések az érfali orto-tirozin szintjét is növelték, ami csökkent inzulin kiváltotta vazorelaxációval járt, amit az ERK inhibitor PD98059-el való előkezelés teljes mértékben kivédett. Összefoglalva kísérletes adataink alapján elmondható, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> által kiváltott ERK aktiváció valószínűleg fontos szerepet játszik a vaszkuláris inzulin-rezisztencia kialakulásában. Mivel a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AT kezelés nem befolyásolta az inzulinfüggő vazorelaxációt a hasi aortában, sőt növelte azt a femorális artériában, valószínű, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a kisebb átmérőjű erekben vazorelaxációt vált ki, ahogyan azt már korábban bemutattuk.<sup>35</sup>

A mellkasi aortában a redox állapot csökkentése a SOD+CAT-kezelés hatására növelte az inzulin kiváltotta relaxációt, ami L-NAME kezelés hatására majdnem teljes mértékben gátolható volt. Ezek alapján feltételezhető, hogy az NO jelátviteli útvonal befolyásolása magyarázza a SOD+CAT kezelés hatását, mivel az NO szuperoxid általi inaktivációja gátolható a SOD+CAT-al. <sup>36-38</sup> Érdekes, hogy a femorális artériában az antioxidáns kezelés SOD+CAT-tal éppen ellenkező hatást váltott ki – tehát csökkentette az inzulin kiváltotta vazorelaxációt – ugyancsak megerősítve a hipotézist, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> növeli az inzulinfüggő vazorelaxációt ezen érszakaszon. <sup>32, 39, 40</sup>

## **5.2 Az orto-tirozin beépülése az *in vivo* érfalba és *ex vivo* az endoteliális sejtekbe károsítja az endoteliális funkciót.**

A krónikus orális orto-tirozin kezelés szignifikánsan megnövelte az érfali orto-tirozin koncentrációt. Továbbá a krónikus orális orto-tirozin kezelés jelentősen csökkentette az inzulinfüggő vazorelaxációt a mellkasi aortában és a femorális artériában. Ezek az eredmények megerősítik a hipotézisünket, mely szerint a megnövekedett vaszkuláris redox státusz általi emelkedett orto-tirozin képződés károsítja az inzulin kiváltotta vaszkuláris választ, mely a vaszkuláris inzulin rezisztencia egy nagyon korai jele. <sup>34</sup>

A mellkasi aorta esetében azonban nem találtunk különbséget az orto-tirozinnal kezelt patkányokban az inzulinfüggő vazorelaxációban a kontroll csoporthoz képest. Ez a jelenség a mellkasi aortában mért „fiziológiásan” magas bazális orto-tirozin koncentrációval magyarázható, mely a nem kezelt kontroll patkányokban is csökkenti az inzulin okozta vaszkuláris relaxáció mértékét.

Továbbá az orto-tirozinnal kezelt endotél sejtekben megfigyelhető csökkent aktiváló eNOS foszforiláció mértéke arra enged következtetni, hogy az orto-tirozin beépülése az endoteliális fehérjékben endotél diszfunkciót vált ki. Kísérleteink során igazoltuk, hogy az orto-tirozin által kiváltott vaszkuláris diszfunkció nem akut mechanizmuson alapul.



### 5.3 Klinikai jelentőség

A vaszkuláris inzulin-rezisztencia pontos molekuláris mechanizmusának mélyebb megismerése óriási jelentőséggel bír a diabéteszben megfigyelhető vaszkuláris diszfunkció és a mikro- és makroangiopáthiás szövődmények kezelési stratégiáinak kidolgozásában. Vizsgálataink arra a kérdésre is választ adnak, hogy miért jár oly gyakran együtt a 2-es típusú cukorbetegség és a magasvérnyomás-betegség. A diabéteszben megfigyelhető megnövekedett oxidatív stressz hatására emelkedett érfali orto-tirozin akkumuláció valószínűleg az NO képződésének gátlásával károsítja az inzulin vazorelaxációhoz vezető jelátviteli útvonalát, mely végeredményben artériás hipertóniához vezet.

A 2-es típusú cukorbeteggekben és a krónikus vesebeteggekben igazoltan megnövekedett orto-tirozin terhelés jelentősen közre játszhat a vaszkuláris komplikációk kialakulásában.<sup>15, 16, 39, 40</sup> Továbbá ismert, hogy az átmeneti, 2-3 hétig tartó intenzív inzulin-terápia növeli az inzulin-érzékenységet. Ez a hatás a csökkent oxidatív stressz és az így csökkent orto-tirozin-képződéssel magyarázható. Az általunk felvázolt jelátviteli útvonal befolyásolása egy ígéretes új terápiás stratégia lehet a cukorbetegség vaszkuláris komplikációjának megelőzésében és kezelésében.

## 6. A dolgozat tézisei:

1. Az orto-tirozin érfali koncentrációja alapján mért oxidatív állapot a mellkasi aortában a legmagasabb, majd a hasi aortában, végül femorális artériában a legalacsonyabb.<sup>(A)</sup>
2. Az inzulin kiváltotta vazorelaxáció mértéke növekszik az artériás rendszerben a periféria felé.<sup>(A)</sup>
3. A hidrogén-peroxid/aminotriazol kezelés valamint az aortaszűkítés növeli az oxidatív állapotot a mellkasi aortában.<sup>(A)</sup>
4. A mellkasi aortában mért megnövekedett oxidatív állapot az ERK jelátviteli útvonal aktivációjával és csökkent inzulinfüggő vazorelaxációval jár együtt.<sup>(A)</sup>
5. Az oxidatív állapot akut csökkentése a szuperoxid-dizmutáz/kataláz kezelés hatására növeli az inzulinfüggő vazorelaxáció mértékét a mellkasi aortában.<sup>(A)</sup>
6. A femorális artéria esetében a magasabb oxidatív állapotban növekedett, míg az oxidatív állapot csökkentése után csökkent az inzulinfüggő vazorelaxáció mértéke.<sup>(A)</sup>
7. A patkányok krónikus orális orto-tirozin kezelése a vaszkuláris orto-tirozin koncentrációjának növekedésével és az inzulinfüggő vazorelaxáció mértékének csökkenésével jár.<sup>(B)</sup>
8. Az orto-tirozin beépülése az endoteliális sejtekbe *in vitro* körülmények között csökkenti az inzulin által kiváltott eNOS foszforilációt.<sup>(B)</sup>

## **7. A disszertációhoz csatlakozó közlemények:**

**A.** **István András Szijártó**, Gergő A. Molnár, Esztella Mikolás, Viktória Fisi, Boglárka Laczy, Maik Gollasch, Akos Koller, István Wittmann. Increase in insulin-induced relaxations of consecutive arterial segments toward the periphery. Role of vascular oxidative state. Free Radical Research 48(7):749-57 (2014), **IF: 2,976**

**B.** **István András Szijártó**, Gergő A. Molnár, Esztella Mikolás, Viktória Fisi, Judit Cseh, Boglárka Laczy, Tibor Kovács, Katalin Böddi, Anikó Takátsy, Maik Gollasch, Ákos Koller, István Wittmann. Elevated vascular level of ortho-tyrosine contributes to the impairment of insulin-induced arterial relaxation. Hormone and Metabolic Research 46(11):749-752 (2014), **IF: 2,121**

**Kumulatív impakt faktor: 5,097**

## Publikációs lista:

1. Kovács T., Mikolás E., **Szijártó I.**, Boros A. G., Wittmann I.: Vérnyomáscsökkentő gyógyszerek metabolikus hatásai és mellékhatásai. Gránum 2007: 10(3): 21-24.
2. Degrell P., Wagner Z., **Szijártó I. A.**, Wagner L., Markó L., Mohás M., Cseh J., Wittmann I.: Morphology of Glomerular Hematuria Is Reproduced in vitro by Carbonyl Stress. Nephron Exp Nephrol 2008;18:110(1):e25-e30. **IF: 1.596**
3. Markó L., Molnár G.A., Wagner Z., Kőszegi T., Matus Z., Mohás M., Kuzma M., **Szijártó I. A.**, Wittmann I.: (Analysis of microalbuminuria with immunonephelometry and high performance liquid chromatography. Evaluation of new criteria) – Hungarian Orvosi Hetilap 2008;149(2):59-67.
4. Molnár G.A., **Szijártó I.**, Wittmann I.: (Inhaled insulin therapy – pros and cons) – Hungarian LAM 2008:18(3):230–234
5. Csiky B., Markó L., Mohás M., Cseh J., Mikolás E., **Szijártó I.**, Wittmann I.: A losartan pleiotrop hatásai. LAM 2008: 18(10): 663-666.
6. Vas T., Markó L., Mohás M., Cseh J., Mikolás E., **Szijártó I.**, Wittmann I.: Cardiovascularis rizikócsökkenés vesebetegekben. Gránum 2008: 11(4): 17-22.
7. Markó L., Mikolás E., Molnár G.A., Wagner Z., Kőszegi T., **Szijártó I. A.**, Mohás M., Matus Z., Szabó Z., Böddi K., Mérei Á., Wittmann I.: (Fluorescence of urinary albumin determined by HPLC is associated with renal function and not with glycemia in normo- and microalbuminuric patients) – Hungarian Diabetologia Hungarica 2009: 17(3):229-238.
8. Markó L., **Szijártó I. A.**, Cseh J., Kőszegi T., Szabó Z., Molnár G.A., Matus Z., Mérei Á., Wittmann I.: (The concentration of HPLC-detected urinary albumin decreases at -80 °C storage. Possible mechanisms and consequences) – Hungarian Hypertonia Nephrologia 2009: 13(2): 88-93.
9. Markó L., Molnár GA., Wagner Z., Böddi K., Kőszegi T., Szabó Z., Matus Z., **Szijártó I.**, Mérei A., Nagy G., Wittmann I.: Measurement of the modification and interference rate of urinary albumin detected by size-exclusion HPLC. Physiol Meas. 2009: 30(10): 1137-50. **IF: 1,43**

10. Szigeti N., Molnár G.A., Markó L., Fábrián Gy., Cseh J., Mérei Á., **Szijártó I.**, Wittmann I.: (Microalbuminuria in colorectal cancer) – Hungarian Magyar Belorvosi Archívum 2009: 6: 460-465.
11. Mohás M., Kisfali P., Baricza E., Mérei A., Maász A., Cseh J., Mikolás E., **Szijártó I. A.**, 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. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2010: 118(3):209-12. **IF: 1,826**
12. Halmai R, **Szijártó I. A.**, Fehér E, Fésüs G, Molnár GA, Brasnyó P, Fülöp F, Gollasch M, Koller A, Wittmann I: Water-soluble components of cigarette smoke elicit relaxation of renal arteries *Eur J Clin Invest*. 2011 Feb;41(2):195-202. **IF: 3,018**
13. Nagy G, **Szijártó IA**, Gaszner B, Lányi É, Markó L, Mérei Á, Molnár GA, Németh K, Betlehem J, Wittmann I.: Effects of Mono- and Dual Blockade of the Renin-Angiotensin System on Markers of Cardiovascular Status in Hypertensive Patients with Mild and Moderate Renal Failure. *Kidney Blood Press Res* 2011;34:150-15. **IF: 1,464**
14. Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei A, Halmai R, Mészáros LG, Sümegi B, Wittmann I.: Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr*. 2011 Aug;106(3):383-9. **IF: 3,013**
15. Mikolás E, Cseh J, Pap M, **Szijártó IA**, Balogh A, Laczy B, Bekő V, Fisi V, Molnár GA, Mérei A, Szeberényi J, Wittmann I. Effects of Erythropoietin on Glucose Metabolism. *Horm Metab Res*. 2012 Apr;44(4):279-85. **IF: 2,145**
16. Köhn C, Schleifenbaum J, **Szijártó IA**, Markó L, Dubrovská G, Huang Y, Gollasch M. Differential effects of cystathionine- $\gamma$ -lyase-dependent vasodilatory H<sub>2</sub>S in periadventitial vasoregulation of rat and mouse aortas. *PLoS One*. 2012;7(8):e41951. **IF: 3,73**
17. Halmai R, Degrell P, **Szijártó IA**, Mátyás V, Molnár GA, Kovács T, Wittmann I. Smoking as the potential link between Kimmelstiel-Wilson lesion and non-diabetic nodular glomerulosclerosis in male patients - a single center retrospective study. *Clin Nephrol*. 2013 Jul;80(1):23-8. **IF: 1,232**
18. Haase N, Herse F, Spallek B, Haase H, Morano I, Qadri F, **Szijártó IA**, Rohm I, Yilmaz A, Warrington JP, Ryan MJ, Gollasch M, Müller DN, Dechend R, Wallukat G. Amyloid- $\beta$

- Peptides Activate  $\alpha$ 1-Adrenergic Cardiovascular Receptors. *Hypertension*. 2013 Nov;62(5):966-72. **IF: 7,632**
19. Christoph Heinze, Anika Seniuk, Maxim Sokolov, Antje K. Hübner, Agnieszka Klementowicz, **István A. Szijártó**, Johanna Schleifenbaum, Maik Gollasch, Heimo Ehmke, Björn C. Schroeder, Christian A. Hübner. Disruption of vascular Ca<sup>2+</sup> activated chloride currents identifies Tmem16a as a new regulator of arterial blood pressure. *J Clin Invest*. 2014 Feb 3;124(2):675-86. **IF: 13,215**
  20. Sélley E, Kun S, **Szijártó IA**, Laczy B, Kovács T, Fülöp F, Wittmann I1, Molnár GA. Exenatide induces aortic vasodilation increasing hydrogen sulphide, carbon monoxide and nitric oxide production. *Cardiovasc Diabetol*. 2014 Apr 2;13:69. **IF: 4,02**
  21. Johanna Schleifenbaum, Mario Kassmann, **István András Szijártó**, Hantz C. Hercule, Stefanie Weinert, Matthias Heidenreich, Asif R. Pathan, Yoland-Marie Anistan, Natalia Alenina, Nancy J. Rusch, Michael Bader, Thomas J. Jentsch, Maik Gollasch. Stretch-Activation of Angiotensin II type 1a Receptors Contributes to the Myogenic Response of Mouse Mesenteric and Renal Arteries. *Circ Res*. 2014 Jul 7;115(2):263-72. **IF: 11,019**
  22. Louise Bjørkholt Andersen, MD, Lukasz Przybyl, MSc, Nadine Haase, PhD, Frauke von Versen-Höyneck, MD, Fatimunnisa Qadri, PhD, Jan Stener Jørgensen, PhD, Grith Lykke Sorensen, PhD, Palle Fruekilde, MSc, Marko Poglitsch, PhD, **István Szijarto, MD**, Maik Gollasch, PhD, Joerg Peters, MD, Dominik N. Muller, PhD, Henrik Thybo Christesen, PhD, Ralf Dechend, MD. Vitamin D depletion aggravates hypertension and target-organ damage. *J Am Heart Assoc*. 2015 Jan 28;4(2). **IF: 2,882** (in 2014)
  23. Ursula Kassner, Bastian Salewsky, Marion Wühle-Demuth, **Istvan Andras Szijarto**, Thomas Grenkowitz, Priska Binner, Winfried März, Elisabeth Steinhagen-Thiessen, Ilja Demuth. Severe Hypertriglyceridemia in a Patient Heterozygous for a Lipoprotein Lipase Gene Allele with two Novel Missense Variants. *Eur J Hum Genet*. 2015 Jan 14. **IF: 4,349** (in 2014)
  24. Molnár GA, Mikolás EZ, **Szijártó IA**, Kun S, Sélley E, Wittmann I. Tyrosine isomers and hormonal signaling: A possible role for the hydroxyl free radical in insulin resistance. *World J Diabetes*. 2015 Apr 15;6(3):500-7.

25. Eszter Sélley, Gergő A. Molnár, Szilárd Kun, **István András Szijártó**, Boglárka Laczy, Tibor Kovács, Ferenc Fülöp, István Wittmann Complex vasoactivity of liraglutide. Contribution of three gasotransmitters. Artery Research 05/2015.

**Kumulatív impakt faktor: 67,643**

## Referenciák

1. Aroor AR, Demarco VG, Jia G, Sun Z, Nistala R, Meininger GA, Sowers JR. The role of tissue renin-angiotensin-aldosterone system in the development of endothelial dysfunction and arterial stiffness. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4:161
2. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414:799-806
3. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev*. 2007;28:463-491
4. Eringa EC, Stehouwer CD, van Nieuw Amerongen GP, Ouwehand L, Westerhof N, Sipkema P. Vasoconstrictor effects of insulin in skeletal muscle arterioles are mediated by erk1/2 activation in endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H2043-2048
5. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest*. 1994;94:1172-1179
6. Lee JH, Ragolia L. Akt phosphorylation is essential for insulin-induced relaxation of rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291:C1355-1365
7. Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and diabetes: Roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell and tissue research*. 2009;335:165-189
8. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev*. 2009;89:27-71
9. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2006;71:247-258
10. Houston N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006;440:944-948
11. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*. 2010;107:1058-1070
12. Weng J, Li Y, Xu W, Shi L, Zhang Q, Zhu D, Hu Y, Zhou Z, Yan X, Tian H, Ran X, Luo Z, Xian J, Yan L, Li F, Zeng L, Chen Y, Yang L, Yan S, Liu J, Li M, Fu Z, Cheng H. Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: A multicentre randomised parallel-group trial. *Lancet*. 2008;371:1753-1760
13. Li Y, Xu W, Liao Z, Yao B, Chen X, Huang Z, Hu G, Weng J. Induction of long-term glycemic control in newly diagnosed type 2 diabetic patients is associated with improvement of beta-cell function. *Diabetes care*. 2004;27:2597-2602
14. Pieper GM, Langenstroer P, Siebeneich W. Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: Role of hydroxyl radicals. *Cardiovasc Res*. 1997;34:145-156
15. Pennathur S, Wagner JD, Leeuwenburgh C, Litwak KN, Heinecke JW. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J Clin Invest*. 2001;107:853-860
16. Biondi R, Ambrosio G, Liebgott T, Cardounel AJ, Bettini M, Tritto I, Zweier JL. Hydroxylation of d-phenylalanine as a novel approach to detect hydroxyl radicals: Application to cardiac pathophysiology. *Cardiovasc Res*. 2006;71:322-330
17. Molnar GA, Nemes V, Biro Z, Ludany A, Wagner Z, Wittmann I. Accumulation of the hydroxyl free radical markers meta-, ortho-tyrosine and dopa in cataractous lenses is accompanied by a lower protein and phenylalanine content of the water-soluble phase. *Free Radic Res*. 2005;39:1359-1366



18. Molnar GA, Wagner Z, Marko L, Ko Szegi T, Mohas M, Kocsis B, Matus Z, Wagner L, Tamasko M, Mazak I, Laczy B, Nagy J, Wittmann I. Urinary ortho-tyrosine excretion in diabetes mellitus and renal failure: Evidence for hydroxyl radical production. *Kidney Int.* 2005;68:2281-2287
19. Gurer-Orhan H, Ercal N, Mare S, Pennathur S, Orhan H, Heinecke JW. Misincorporation of free m-tyrosine into cellular proteins: A potential cytotoxic mechanism for oxidized amino acids. *Biochem J.* 2006;395:277-284
20. Bertin C, Weston LA, Huang T, Jander G, Owens T, Meinwald J, Schroeder FC. Grass roots chemistry: Meta-tyrosine, an herbicidal nonprotein amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:16964-16969
21. Klipcan L, Moor N, Kessler N, Safro MG. Eukaryotic cytosolic and mitochondrial phenylalanyl-trna synthetases catalyze the charging of trna with the meta-tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:11045-11048
22. Mikolas E, Kun S, Laczy B, Molnar GA, Selley E, Koszegi T, Wittmann I. Incorporation of ortho- and meta-tyrosine into cellular proteins leads to erythropoietin-resistance in an erythroid cell line. *Kidney Blood Press Res.* 2013;38:217-225
23. Ruggiero RA, Bruzzo J, Chiarella P, Bustuoabad OD, Meiss RP, Pasqualini CD. Concomitant tumor resistance: The role of tyrosine isomers in the mechanisms of metastases control. *Cancer Res.* 2012;72:1043-1050
24. Ungvari Z, Csiszar A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: Involvement of protein kinase c-dependent nad(p)h oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol.* 2004;165:219-226
25. Palmieri B, Sblendorio V. Oxidative stress tests: Overview on reliability and use. Part i. *European review for medical and pharmacological sciences.* 2007;11:309-342
26. Fesus G, Dubrovskaja G, Gorzelniak K, Kluge R, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res.* 2007;75:719-727
27. Suvorava T, Lauer N, Kumpf S, Jacob R, Meyer W, Kojda G. Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo. *Circulation.* 2005;112:2487-2495
28. Mian KB, Martin W. Hydrogen peroxide-induced impairment of reactivity in rat isolated aorta: Potentiation by 3-amino-1,2,4-triazole. *Br J Pharmacol.* 1997;121:813-819
29. Ardanaz N, Beierwaltes WH, Pagano PJ. Comparison of h2o2-induced vasoconstriction in the abdominal aorta and mesenteric artery of the mouse. *Vascul Pharmacol.* 2007;47:288-294
30. Wagner L, Laczy B, Tamasko M, Mazak I, Marko L, Molnar GA, Wagner Z, Mohas M, Cseh J, Fekete A, Wittmann I. Cigarette smoke-induced alterations in endothelial nitric oxide synthase phosphorylation: Role of protein kinase c. *Endothelium.* 2007;14:245-255
31. Ungvari Z, Csiszar A, Huang A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. High pressure induces superoxide production in isolated arteries via protein kinase c-dependent activation of nad(p)h oxidase. *Circulation.* 2003;108:1253-1258
32. Wolin MS. Reactive oxygen species and the control of vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296:H539-549
33. Potenza MA, Marasciulo FL, Chieppa DM, Brigiani GS, Formoso G, Quon MJ, Montagnani M. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between no and et-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H813-822
34. Sindhu RK, Roberts CK, Ehdai A, Zhan CD, Vaziri ND. Effects of aortic coarctation on aortic antioxidant enzymes and nadph oxidase protein expression. *Life Sci.* 2005;76:945-953
35. Koller A, Bagi Z. Nitric oxide and h2o2 contribute to reactive dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H2461-2467
36. Hercule HC, Schunck WH, Gross V, Seringer J, Leung FP, Weldon SM, da Costa Goncalves A, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Interaction between p450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:54-60

37. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*.15:1583-1606
38. Wedgwood S, Lakshminrusimha S, Fukai T, Russell JA, Schumacker PT, Steinhorn RH. Hydrogen peroxide regulates extracellular superoxide dismutase activity and expression in neonatal pulmonary hypertension. *Antioxid Redox Signal*.15:1497-1506
39. Cseko C, Bagi Z, Koller A. Biphasic effect of hydrogen peroxide on skeletal muscle arteriolar tone via activation of endothelial and smooth muscle signaling pathways. *J Appl Physiol*. 2004;97:1130-1137
40. Iesaki T, Gupte SA, Kaminski PM, Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by no and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and h<sub>2</sub>o<sub>2</sub>. *Am J Physiol*. 1999;277:H978-985

## **Köszönetnyilvánítás:**

Köszönöm a Jóistennek, hogy mindvégig velem volt. Köszönöm családom szerető támogatását, mindenekelőtt köszönöm feleségemnek, Katának, hogy mindvégig mellettem állt, bátorított és szeretett, bárhogyan is alakult az életünk.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek és tanáromnak Prof. Dr. Wittmann Istvánnak, amiért bevezetett a kutatómunka rejtelseibe és mindvégig támogatott. Ugyancsak köszönettel tartozom Prof. Dr. Maik Gollasch és Prof. Dr. Koller Ákos professzor uraknak kutatómunkám során nyújtott segítségükért, tanácsaikért és útmutatásaikért.

Köszönet illeti Dr. Molnár Gergő Attila adjunktus urat segítőkészségéért és tanácsaiért. Ugyancsak köszönet illeti a Pécsi Tudományegyetem Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetét, külön kiemelve Dr. Takátsy Anikót és Dr. Böddi Katalint, akik munkámban közreműködtek, valamint hasznos és értékes tanácsokkal láttak el.

Nagyon köszönöm hallgatótársaimnak, Dr. Mikolás Esztellának, Dr. Mohás-Cseh Juditnak, Dr. Markó Lajosnak, Dr. Fisi Viktóriának, Dr. Mohás Mártonnak, Dr. Sélley Eszternek, Dr. Halmai Richárd adjunktus úrnak és Dr. Kun Szilárdnak az eredményes közös munkát, barátságukat és az együtt eltöltött feledhetetlen perceket.

Továbbá köszönet illeti asszisztensi segítséget nyújtó kollégáimat: dr. Sámikné Varga Ilonát, Fábíán Ildikót, Bertusz Józsefnét és Szalma Krisztinát. Köszönet Bodor Enikőnek a szervezésben nyújtott segítségéért. Ugyancsak köszönettel tartozom a II. sz. Belgyógyászati Klinika dolgozóinak a kutatói és klinikai munkám során nyújtott segítségükért.