

**AZ ERYTHROPOETIN SZÉNHIDRÁT-ANYAGCSERÉRE
KIFEJTETT HATÁSA ÉS AZ ERYTHROPOETIN-REZISZTENCIA**

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Mikolás Esztella Zsóka



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum

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

Programvezető: Prof. Dr. Wittmann István

Témavezető: Prof. Dr. Wittmann István

Pécs, 2014

Tartalomjegyzék

1.	RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK.....	6
2.	ÖSSZEFOGLALÁS	8
3.	BEVEZETÉS	10
3.1.	Krónikus vesebetegség	10
3.2.	Az erythropoetin	11
3.3.	Az EPO-receptor és jelátvittele.....	13
3.4.	Renális anaemia	15
3.4.1.	EPO-terápia	16
3.5.	EPO-rezisztencia	17
3.6.	Az EPO pleiotrop hatásai	20
3.7.	A diabetes mellitus epidemiológiája és pathogenezise	21
3.8.	Az oxidatív stressz	22
3.8.1.	Oxidatív stressz krónikus vesebetegségben.....	23
3.8.2.	Oxidatív stressz diabetes mellitusban	24
3.9.	Tirozin-módosulatok képződése	26
4.	CÉLKITŰZÉSEK.....	28
5.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	29
5.1.	Az EPO szénhidrát-anyagcserére kifejtett hatásai.....	29
5.1.1.	Kötőszöveti glukózmonitorozás (CGMS)	29
5.1.2.	Állatkísérletek.....	29

5.1.3.	A 3T3-L1 sejtvonal	30
5.1.4.	Western blot analízis	31
5.1.5.	GLUT4 plazma membrán frakcionálása	32
5.1.6.	Az izotóp-jelzett glukózfelvétel vizsgálata.....	32
5.1.7.	Immuncytokémia	33
5.1.8.	Statisztikai analízis.....	33
5.2.	EPO-rezisztencia in vitro vizsgálata	34
5.2.1.	TF-1 erythroblasztok	34
5.2.2.	Sejtproliferációs vizsgálatok	34
5.2.3.	Fehérje-koncentráció meghatározása	35
5.2.4.	Nagyteljesítményű folyadék-kromatográfia (HPLC).....	35
5.2.5.	Western blot analízis.....	36
5.2.6.	Statisztikai analízis.....	36
6.	EREDMÉNYEK	37
6.1.	Az EPO szénhidrát-anyagcserére kifejtett hatásai.....	37
6.1.1.	Humán vizsgálat alapján az EPO csökkenti az intersticiális glukózsztintet	37
6.1.2.	Akut vércukorszint-csökkentő hatás állatkísérletben	38
6.1.3.	EPO hatására növekszik a zsírsejtek izotóp-jelzett glukózfelvétele	39
6.1.4.	EPO függő Akt-és ERK-aktiváció	41
6.1.5.	Az EPO fokozza a GLUT4 plazmamembránba történő kihelyeződését ..	45
6.1.6.	3T3-L1 adipocytákban EPO-receptor mutatható ki.....	47

6.2.	Az EPO-rezisztencia modellezése zsírsejteken.....	48
6.2.1.	Orto-tirozin hatására csökken az EPO indukált glukózfelvétel.....	48
6.3.	EPO-rezisztencia in vitro vizsgálata TF-1 sejteken.....	49
6.3.1.	Orto- vagy meta-tirozin jelenlétében csökken az EPO indukált proliferáció	49
6.3.2.	HPLC-analízis alapján az adott tirozin-módosulat beépül a sejtet alkotó fehérjékbe.....	51
6.3.3.	Az orto- vagy meta-tirozin jelenléte csökkent STAT5- és ERK-aktivációt eredményez.....	54
6.3.4.	Az orto- és meta-tirozin stabilitásának vizsgálata HPLC-vel.....	56
7.	MEGBESZÉLÉS.....	58
7.1.	Az EPO hatása a szénhidrát-anyagcserére.....	58
7.1.1.	Az EPO és a testsúly.....	58
7.1.2.	Az EPO testsúlytól függetlenül is javítja a cukoranyagcserét.....	59
7.1.3.	Az EPO-receptor jelen van a zsírsejtek felszínén.....	60
7.1.4.	Az EPO anyagcsere-hatása dializáltakban.....	60
7.1.5.	Az EPO anyagcsere-hatásában szerepet játszik a GLUT4 transzlokációja	61
7.1.6.	Az EPO csak hyperglikémiában hat a cukoranyagcserére.....	62
7.1.7.	Az EPO mitogén hatása nem nő hyperglikémiában.....	62
7.2.	Az EPO-rezisztencia mechanizmusai és az oxidatív stressz lehetséges szerepe.....	63
7.2.1.	Az EPO-rezisztencia.....	63
7.2.2.	A diabetes mellitus és az EPO-rezisztencia kapcsolata.....	65

7.2.3.	A β -sejtek lehetséges jelentősége.....	65
7.2.4.	A szabadgyökök hatása az EPO szintézisére és az erythropoezisre.....	66
7.2.5.	Az oxidatív stressz markerei	67
7.2.6.	Az oxidált aminosavak, mint a károsodások mediátorai.....	69
8.	KÖVETKEZTETÉSEK	72
9.	A DOLGOZAT TÉZISEI	74
10.	A DISSZERTÁCIÓHOZ CSATLAKOZÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	75
11.	PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	76
11.1.	Tudományos cikkek	76
11.2.	Absztraktok.....	78
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	81
13.	IRODALOMJEGYZÉK	82

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AGE: előrehaladott glikációs végtermék (advanced glycation end product)

ASA: acetil-szalicilsav

ATP: adenzin-trifoszfát

BSA: marha szérumbalbumin (bovine serum albumin)

CERA: continuous erythropoietin receptor activator

CGMS: folyamatos kötőszöveti glukózmonitor (continuous glucose monitoring system)

CIS: citokin-indukált SH2-tartalmú fehérje (cytokine-inducible SH2-containing protein)

CKD: krónikus vesebetegség (chronic kidney disease)

CRP: C-reaktív protein

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNP: diabeteses nephropathia

eNOS: endothelialis nitrogén-monoxid-szintáz (nitric oxide synthase)

EPO: erythropoietin

EPO-R: erythropoietin-receptor

ERI: erythropoietin rezisztencia index

ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz (extracellular signal regulated kinase)

ESA: erythropoiesis stimulating agent

FBS: főtális borjú szérumbalbumin

GFR: glomerulus filtrációs ráta (glomerular filtration rate)

GLUT4: glukóz-transzporter 4 (glucose transporter 4)

GTP: guanozin-trifoszfát

HCP: hematopoietikus sejt foszfatáz (hematopoietic cell phosphatase)

HIF: hypoxia indukált faktor (hypoxia-inducible factor)

HPLC: nagyteljesítményű folyadék-kromatográfia (high performance liquid chromatography)

IFN: interferon

IL: interleukin

IRS: inzulin-receptor szubsztrát (insulin-receptor substrate)

JAK2: Janus kináz 2 (Janus kinase 2)

LDL: alacsony sűrűségű lipoprotein (low-density lipoprotein)

MAP: mitogén-aktivált protein (mitogen-activated protein)

MAPK: mitogén-aktivált protein kináz (mitogen-activated protein kinase)

NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NF κ B: nukleáris faktor kappa B (nuclear factor kappa B)

pAkt: foszfo-Akt

pERK: foszfo-ERK

pSTAT5: foszfo-STAT5

PI3K: foszfatidil-inozitol 3 kináz (phosphatidylinositol 3 kinase)

PKC: protein kináz C (protein kinase C)

ROS: reaktív oxigén termékek (reactive oxygen species)

rh-EPO: rekombináns humán EPO

r-mo-EPO: rekombináns egér EPO

SH2: Src homology 2 domain

SOCS: suppressor of cytokine signaling

STAT5: signal transducer and activator of transcription 5

TCA: triklór-ecetsav

TGF: transforming growth factor

TNF: tumor necrosis factor

2. ÖSSZEFOGLALÁS

Előzmények: Az erythropoetin (EPO) egy citokin, mely a vörösvértest-képzés szabályozásáért felelős. Napjainkban egyre több adat van arra vonatkozóan, hogy EPO-receptor (EPO-R) nem csupán az erythroid progenitor sejtek felszínén, hanem többek közt a központi idegrendszerben és egyes tumor sejteken is megtalálható. Mindaddig nem írták le azonban EPO-R jelenlétét zsírszövetben. Az EPO pleiotrop hatásain kívül vitatott téma az EPO-rezisztencia is, mely a krónikus vesebetegekben tapasztalt anaemia kezelésében jelent megoldatlan problémát. Oxidatív stressz állapotban, hidroxil-szabadgyök jelenlétében, fenilalaninból a fiziológias para-tirozinon túl orto- és meta-tirozin is képződik. Munkánk során az orto- és meta-tirozin fehérjékbe történő beépülését és annak hatását vizsgáltuk a sejten belüli jelátvitelre, valamint az EPO indukálta sejtosztódásra.

Célkitűzések: Célul tűztük ki az EPO szénhidrát-anyagcserére kifejett hatásának vizsgálatát *in vivo* állatmodellben, valamint *in vitro* 3T3-L1 zsírsejteken. Ezen kívül célunk volt az EPO-rezisztencia egy lehetséges mechanizmusának vizsgálata TF-1 erythroblasztokon végzett kísérletek során.

Módszerek: Folyamatos intersticiális glukózmonitor (CGMS) regisztrátumán, két beteg esetén hasonlítottuk össze az étkezések után mért vércukor-szinteket az EPO-készítmény beadása előtt és után. A 3T3-L1 sejtek glukózfelvételét inzulin és EPO hatására, deoxi-D-glukóz izotóp segítségével vizsgáltuk normál és magas glukóztartalmú médiumban tenyésztve. Munkánk során Western blottal tanulmányoztuk EPO-kezelés hatására az Akt- és extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK)-foszforiláció változását zsírsejtekben, magas és normál glukóz mellett. A glukóz-transzporter 4 (GLUT4) plazma membránba történő kihelyeződését immuncytokémiával és a membrán frakcionálását követően Western blottal vizsgáltuk. Az EPO-receptor jelenlétét 3T3-L1 sejtekben immunoblottal bizonyítottuk be.

Az EPO-rezisztenciát vizsgáló kísérleteink során TF-1 humán erythroblaszt sejtvonalat használtunk. Proliferációs vizsgálataink EPO jelenlétében vagy hiányában (kontroll) 3 napig tenyésztett, para- orto- vagy meta-tirozinnal kezelt TF-1 sejtkultúrákon történtek. A sejtszámokat két független vizsgáló naponta határozta meg Bürker-kamra segítségével. A fehérjekoncentráció méréséhez kolorimetriás módszert

használtunk. Fluorescens nagyteljesítményű folyadék-kromatográfiás (HPLC) méréseink során a sejtekben fehérjéhez kötött tirozin izomerek össz-tirozinhoz viszonyított relatív mennyiségét határoztuk meg. Western blot módszerrel vizsgáltuk az orto- és meta-tirozin kezelés hatását – az EPO hatásának kialakulásához nélkülözhetetlen jelátvivő – STAT5 (signal transducer and activator of transcription)- és ERK1/2-foszforilációra.

Eredmények: A CGMS-mérés alapján, az EPO beadását követően szignifikánsan alacsonyabb kötőszöveti glukózértékeket mértünk, mint az EPO beadása előtt ($p < 0,05$). A 3T3-L1 zsírsejtek glukózfelvétele már 0,15 ng/ml, 0,3 ng/ml és 0,625 ng/ml EPO-koncentráció mellett növekedett ($p < 0,05$). Az inzulin-indukált glukózfelvétel EPO hatására emelkedett ($p < 0,05$). Western blot vizsgálattal, EPO hatására, a zsírsejtekben szignifikáns Akt- és ERK1/2-foszforiláció-növekedést találtunk ($p < 0,05$). Immuncitokémiával látható GLUT4-kihelyeződés történt a plazma membránba. Elsőként sikerült az EPO receptorát kimutatni a zsírsejtek felszínén.

Az EPO hatását TF-1 erythroblasztokon vizsgálva, orto- és meta-tirozin kezelés hatására, csökkent proliferatív aktivitást észleltünk a para-tirozin jelenlétében tenyésztett sejtekhez viszonyítva ($p < 0,05$). Ennek megfelelően az orto- vagy meta-tirozinnal kezelt sejt kultúrák szignifikánsan kevesebb fehérjét tartalmaztak, mint a para-tirozin jelenlétében tenyésztettek ($p < 0,05$). A kóros tirozin-izomerek gátló hatása para-tirozinnal koncentrációfüggő módon kivédhető volt. HPLC-módszer segítségével megállapítottuk, hogy a tenyésztőoldathoz adott orto- és meta-tirozin beépül a sejtet alkotó fehérjékbe (az összes tirozin 0,15%-át lehetett kicserélni meta- és 0,1%-át orto-tirozinnal végzett tenyésztés során). Western blot vizsgálataink igazolták, hogy orto-tirozin jelenlétében a STAT5 foszforilációja 1213%-ról 194%-ra ($p < 0,05$), az ERK1 foszforilációja 240%-ról 76%-ra, az ERK2 253%-ról 100%-ra csökkent. Meta-tirozin jelenlétében a STAT5 foszforilációja 213%-ra ($p < 0,05$), az ERK1-foszforiláció 89%-ra, az ERK2 foszforilációja pedig 100%-ra csökkent.

Megbeszélés: EPO hatására zsírsejtekben olyan változások mennek végbe, melyek magyarázhatják a hormon hatására tapasztalt vércukorszint-csökkenést. Vizsgálataink alapján a sejtet alkotó fehérjékbe beépült orto- és meta-tirozin gátolja az EPO függő jelátvitelt, ennek eredményeképpen csökken az EPO indukált proliferatív aktivitás. Para-tirozinnal a meta- és orto-tirozin EPO-hatásra gyakorolt gátlása koncentrációfüggő módon kivédhető.

3. BEVEZETÉS

3.1. *Krónikus vesebetegség*

A krónikus vesebetegség (chronic kidney disease, CKD) egy heterogén betegségcsoport, mely a vesék tartósan fennálló (min. 3 hónap) funkcionális – pl. kiválasztó és/vagy endokrin működésének – vagy strukturális rendellenességét jelenti. Az Amerikai Egyesült Államokban készített becslések szerint a populáció megközelítőleg 12%-a szenvedhet krónikus vesebetegségben, ez hozzávetőlegesen 25 millió embert jelent csak az Államok területén [1]. Hazánkban ebből kiindulva közel 1 millió emberről beszélhetünk. A krónikus vesebetegség súlyosságát a glomerulus filtrációs ráta (GFR) kiszámításával jellemezhetjük, melynek normál értéke testfelszínre vonatkoztatva 90-120 ml/perc/1,73 m². A GFR értéke 40 éves kor felett kb. évi 1 ml/perc/1,73 m²-rel csökken. A GFR mérése történhet 24 órás gyűjtött vizeletből vagy számolható a nem, életkor, szérum kreatinin-szint, testtömeg alapján is. Ez utóbbi esetben becsült (estimated) GFR-ről, eGFR-ről beszélünk. A GFR alapján a krónikus vesebetegeket stádiumokba sorolhatjuk (1. táblázat).

A krónikus veseelégtelenséget okozó kórképek közül a leggyakoribb a diabeteses nephropathia (DNP), mely a betegek mintegy 40%-át teszi ki. A hipertonia talaján kialakuló nephrosclerosis az összes megbetegedés 27%-áért felelős. Harmadik leggyakoribb kórokként a glomerolunephritisek szerepelnek. További krónikus veseelégtelenséghez vezető okként tartjuk számon az interstitialis nephritiseket, az obstruktív uropathiát és a kongenitális vesebetegségeket. Körülbelül 10%-ban a veseelégtelenség oka ismeretlen [2].

1. táblázat: A krónikus vesebetegség stádiumai [1]

Stádium	Definíció (GFR; ml/min/1,73m²)	Prevalencia (USA; a népesség százalékában)
CKD1	>90, a vesebetegség más tünetének jelenlétében	3,7
CKD2	60 – 89	3,4
CKD3a	45 – 59	4,7
CKD3b	30 – 44	1
CKD4	15 – 29	0,2
CKD5	<15	0,0

3.2. Az erythropoetin

Az orvostudomány története során 1906-ban merült fel először, hogy a vörösvértest-képzés humorális irányítás alatt állhat. Carnot és Deflandre vizsgálataikat nyúl modellben végezték; kivézetetett állatok plazmáját egészséges állatokba fecskendezve azok vörösvértest számának kismértékű emelkedését észlelték [3]. A hatásért felelős anyagnak a „hemopoietin” nevet adták. A kevés, a hipotézist cáfoló kísérlet mellett [4] számos azt alátámasztó eredmény született. 1950-ben Reissmann parabiotikus patkánymodellt használt (két külön lélegző és táplálkozó állat, közös keringéssel), ahol az egyik állatot hypoxiás, a másikat fiziológiás környezetben tartva, mindkét állatban normoblasztos vörösvértest hyperplasia alakult ki [5]. A normál levegőt lélegző állat vérében nem csökkent az oxigén szaturáció. Ezzel bizonyította, hogy vörösvértest-expanzióért nem közvetlenül a vér alacsony oxigén tenziója, hanem egy, a hypoxiás állat szervezetében termelődő humorális faktor a felelős. Erslev 1953-ban, a korábbi ellentmondásos eredményeket követően, egyértelműen bizonyította, hogy létezik a plazmában egy erythropoesist stimuláló faktor, mely később terápiás jelentőségre tehet szert [6]. A vese szerepét az EPO-szintézisben 1957 óta, Jakobson

és munkatársai kísérletei nyomán ismerjük [7]. A humán erythropoetin molekulát 1977-ben azonosították vizeletből, azonban a gént klónozni csak 1983-ban sikerült [8]–[10].

Az EPO egy 30,4 kDa méretű, 166 aminosavból álló glikoprotein hormon. Négy antiparallel hélix, valamint két β -lemez építi fel, melyeket diszulfid-hidak kötnek össze. Közelítőleg 40% a molekula szénhidrát-tartalma, mely három N-, valamint egy O-glikánt tartalmaz. Az N-glikán régió játszik szerepet a molekula proteázokkal szembeni védelmében, valamint a receptorhoz való affinitásában. Ez utóbbi tulajdonságot a módosított rekombináns humán EPO (rh-EPO) készítmények esetében használjuk ki (lásd alább). A molekula két receptor-kötő hellyel rendelkezik - egy kis és egy nagy affinitásúval - melyek két identikus receptorhoz kapcsolódnak.

Az EPO-termelésért magzatkorban elsősorban a máj sejtjei felelősek. Születés után a szerepet a vese kéregállományának peritubuláris fibroblasztjai veszik át. Ezek módosult periarteriolaris simaizomsejtek, melyeknek sokáig csak renin-termelő szerepük volt ismert. 1965 óta tudjuk, hogy hypoxia hatására - függetlenül a renalis hypovolaemiától – a juxtaglomeruláris sejtek EPO-t termelnek [11]. Az EPO mRNS-e megtalálható az agyban, májban, lépben, tüdőben és a herékben is, azonban a fő termelő apparátus kiesése esetén nem képesek annak szerepét átvenni [12]. Az EPO génjének egyik enhancer régiója az ún. hypoxia-indukált transzkripció faktorok (HIF) által aktiválódik. A folyamatban kezdetben csak a HIF-1 szerepét sikerült bizonyítani, azonban létezik egy HIF-2 is, mely primer transzkripció faktorként szerepel az EPO-gén átírási folyamatában [13]. Vesében az indukció hypoxia hatására mindent vagy semmit alapon működik és azonnali EPO-transzlációt indít el. Az EPO-termelés kiváltásában nem csak a vér O_2 -szállító kapacitásának csökkenése, hanem a plazma parciális O_2 -nyomásának csökkenése, vagy a vér O_2 -affinitásának növekedése is szerepet játszik.

Jelenlegi tudásunk szerint az EPO elsődleges élettani szerepe a vörösvértest-képzés regulációjában van. A vörösvértestek a CFU-GEMM (granulocyt, erythrocyta, monocyt, megakariocyt képző „colony forming unit”) típusú, CD34+ hematopoetikus őssejtektől származtathatók [14]. A legéretlenebb erythroid formát BFU-E-nek nevezzük (burst-forming units-erythroid). Ezt sorrendben a szintén a csontvelőben található CFU-E kérés stádiumú erythroblasztok követik, melyek nagy denzitással expresszálják az EPO-receptort (EPO-R). EPO jelenlétében a CFU-E blasztok és leszármazottaik 3-5 alkalommal osztódnak, így 7-8 napon belül 8-64 új erythroblasztot

képeznek. Amint a sejtek elérik a normoblaszt stádiumot, a sejtmagjuk kilökődik, így válnak reticulocytákká. Ettől a kiérési stádiumtól az EPO-R expressziója megszűnik [15].

3.3. Az EPO-receptor és jelátvittele

Az EPO-R egy 464 aminosavból álló, 60 kDa méretű glikoprotein, mely az I-es típusú citokin receptorcsaládhoz tartozik. Rendelkezik egy transzmembrán doménnel, mely a receptort egyenlő hosszúságú cytoplazmatikus és extracelluláris doménre osztja. A szerkezeti elemzés alapján úgy tűnik, hogy a ligand nélküli receptor egy preformált homodimerként létezik, nyitott ollóhoz hasonló konformációban [16]. A transzmembrán domén által megvalósított dimerizáció ilyen állapotban inaktívan tartja a molekulát. A receptort az EPO-kötés aktiválja. Amint a ligandkötés létrejön, aktiváló dimerizáció megy végbe, mely sejten belüli jelátviteli kaszkádot indít el. A receptorból hiányzik egy cytoplazmatikus kináz alegység, ezért a receptor tirozin-foszforilációját egy külső faktor, a Janus kináz 2 (JAK2) végzi el [17]. A JAK2 fehérjét kódoló gén deléciója egerekben az embrió korai elhalásához vezet [18]. A két receptor-asszociált JAK2 molekula a dimerizáció következtében egymás közelébe kerül, transz-foszforilálják egymást, miközben a receptor akár összes nyolc intracelluláris tirozin-doménje aktiválódik. A foszforilált EPO-R dokkoló régiókat hoz létre SRC homológia 2 (SH2) domének számára, és jelátviteli kaszkádokat indít el. A folyamat olyan további intracelluláris jelátviteli utak aktivációjával folytatódik, mint a JAK/STAT, a protein kináz B (Akt), valamint a p44/42 ERK útvonal [19].

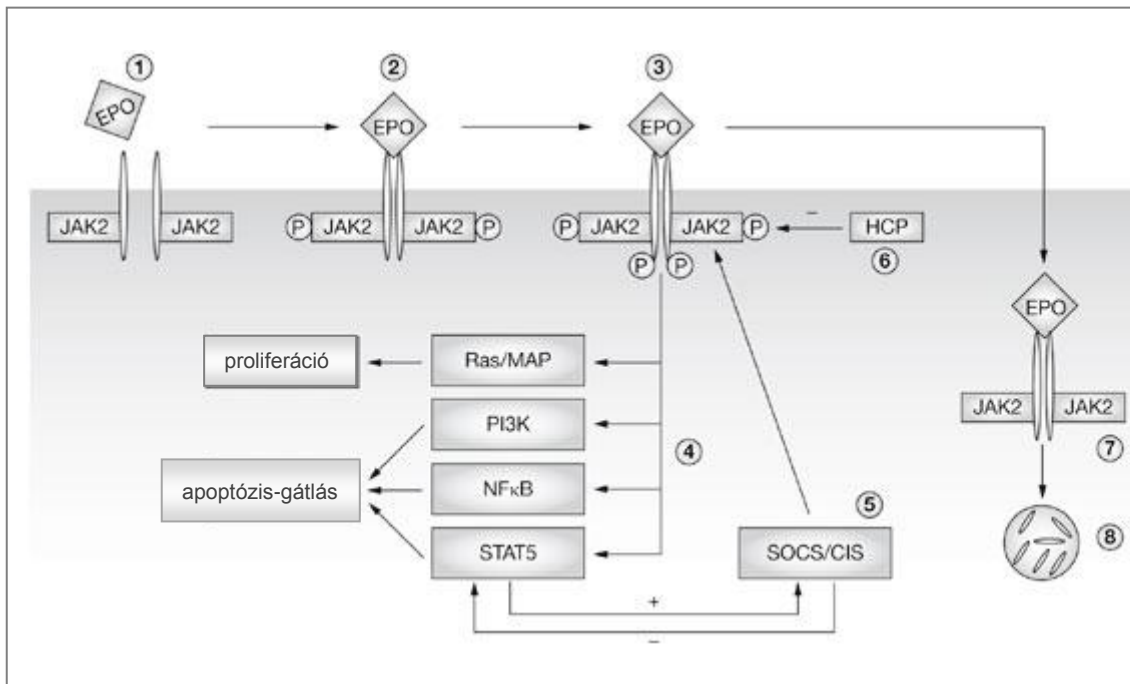
A STAT fehérjecsald eddig 5 ismert tagból áll, melyeket 1-5-ig terjedő arab számokkal jelölünk. A STAT5 az EPO-R 343-as, valamint 401-es foszfo-tirozinjához kötődik és a JAK2 által maga is foszforilálódik. Másrészről, a STAT1 és STAT3 aktivációja a receptor 432-es foszfo-tirozinján történik. A foszforilált STAT5 a receptorról való disszociációt követően dimereket formál, melyek a sejtmagba transzlokálódva célgéneket aktiválnak. A STAT5 különösen a magzati fejlődés során folyó élénk erythropoesishez szükséges, emellett a Bcl-xL gén expresszió indukcióján keresztül anti-apoptotikus hatást fejt ki az EPO-R fehérjére. Socolovsky vizsgálatai alapján a STAT5a és STAT5b deficiens egerekben a csontvelői erythroblasztok aktív

proliferaációja ellenére súlyos vérszegénység alakul ki. A jelenséget a differenciáció elégtelenségével magyarázzák [20]. A JAK/STAT kaszkád szerepének vizsgálatához rendelkezünk olyan gátlószerekkel, melyekkel blokkolni tudjuk a jelátvitelt. Az AG490 egy bizonyítottan specifikus JAK2 gátló [21], mely *in vitro* és *in vivo* képes gátolni a leukémiás sejtnövekedést, anélkül, hogy a fiziológias hemopoiesisre hatással lenne [22].

Az EPO-R ligandkötése továbbá a guanozin-trifoszfát- (GTP)-áz kapcsoló fehérje, a Ras aktivációjával is jár. Ez a folyamat két citoszol fehérje, a Grb2 és Sos közreműködéséhez kötött. A Grb2 adapter SH2-doménje vagy közvetlenül, vagy SHP2 és Shc tirozin-foszfatazokon keresztül kötődik a receptor foszfo-tirozinjához. Ez utóbbi EPO függő módon, JAK2 által foszforilálódik, indukálva az EPO-R - Grb2 - Sos komplex létrejöttét [23]. A Sos ezután transzlokálódik a plazma membránba, ahol aktiválja a Ras fehérjét, mely raf-1 és mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) aktivációt eredményez. Ezt a folyamatot a köldökzsinórvérből izolált CD34+ sejtek vizsgálatával igazolták. Lu és munkacsoportja h-ras és EPO-R cDNS-t juttatott retrovírus transzdukcióval a sejtekbe, melyek EPO és egyéb növekedési faktorok jelenlétében élénk proliferációval és erythroid differenciációval reagáltak [24]. A MAPK-ok közül ismert az ERK, mely a sejtek túlélésében, migrációjában, valamint proliferációjában játszik szerepet [25].

A foszfatidil-inozitol 3 kináz (PI3K) - Akt kaszkád szerepét bizonyítja, hogy a LY294002 (egy szelektív PI3K-inhibitor [26]) függetlenül tudja gátolni az EPO-dependens kolóniák létrejöttét *in vitro* [27]. A PI3K-kaszkád aktivációja az Akt jelátvivő fehérje szerin/treonin foszforilációját eredményezi, mely közvetlenül foszforilálja a FKHRL1 fehérjét. Az FKHRL1 a Forkhead transzkripció család tagja, a sejtciklus szabályozásában játszik fontos szerepet. Az Akt számos sejtben és szövetben jelen van, szerepet játszik többek között a sejtek túlélésének szabályozásában, a metabolizmusban, az angiogenesisben, valamint kulcsszerepe van az erythroid sejtek kiérési folyamatában is [28].

Digicayliohlu és Lipton tanulmánya alapján, az idegsejteken található EPO-R aktivációja kölcsönhatást hoz létre a JAK2 és az NF- κ B (nuclearis factor- κ B) jelátviteli utak között [29]. Ismert, hogy az EPO neuroprotektív hatását az NF- κ B aktivációján keresztül fejti ki [30] (1. ábra).



1. ábra EPO-R aktivációja és intracelluláris jelátvittele [31] (1) A receptor preformált homodimer formában létezik. (2) A ligandkötés JAK2 foszforilációhoz vezet, (3) majd az EPO-R cytoplazmatikus doménje foszforilálódik. (4) Ez a STAT5, Ras/MAP/ERK, PI3K and NF κ B jelátviteli utak aktivációjához vezet. (5) A STAT5 aktivációja A SOCS/CIS indukcióján keresztül a JAK2 gátlásával visszahat a jelátvitelre. (6) A HCP fehérje defoszforilálja a JAK2-t, így a jelátvitelt terminálja. (7) A receptor defoszforilációját követően a dimer internalizálódik, majd (8) egy proteozómában degradálódik vagy visszakerülve a sejtfelszínre hasznosul újra (9).

3.4. Renális anaemia

Krónikus veseelégtelenségben a betegek életminőségét, kardiovaszkuláris rizikóját, valamint kognitív funkciójának megtartását nagyban befolyásoló tényező a renális anaemia. Tudománytörténeti adatok szerint először 170 évvel ezelőtt, Richard Bright kötötte az anaemiát a vesebetegség fennállásához. A World Health Organization definíciója szerint férfiakban és nők esetében posztmenopauzában 130 g/l alatti hemoglobinszintnél, fertilis korú nők esetén a 120 g/l alatt beszélünk vérszegénységről. A kritériumok alapján a súlyos veseelégtelenek (GFR<30

ml/min/1,73 m²) 90%-a vérszegény. A renális anaemia klinikailag tipikusan normocyter, normokróm megjelenésű. A vesebetegség előrehaladásával az anaemia prevalenciája is növekszik; CKD5-ös stádiumban, valamilyen súlyossági fokban, szinte minden beteg érintett [32].

A renális anaemia etiológiájaként a vese juxtaglomeruláris sejtjeinek progresszív pusztulása valószínűsíthető. Egyéb okként – többek között – a rövidebb vörösvértest-élettartam, az uraemiás toxinok felszaporodása, a vas-, B12- és folsavhiány, az anorexia és az EPO-rezisztencia szerepelnek.

3.4.1. EPO-terápia

Természetes EPO-termelés hiányában szükségessé válik az exogén szubsztitúció, melyre az ún. ESA (erythropoiesis stimulating agent)-terápia áll rendelkezésünkre. Először 1989-ben alkalmaztak rh-EPO készítményt a renális anaemia kezelésére, epoetin alfa néven [33]. Az azóta eltelt évek során az intravénásan adható, Inj. Epogen (vagy Inj. Eprex) gyári név alatt forgalomba hozott rh-EPO milliós nagyságrendű beteg életminőségét javította. Az 1990-es évek közepén az intravénás alkalmazásról áttértek az anyagilag és klinikai eredmény tekintetében is előnyösebb szubkután alkalmazásra. 1998-ban kezdték alkalmazni a poliszorbát-80 stabilizálószerrel módosított epoetin alfát, mintegy visszaszorítva az albumin-kötött forma elterjedtségét, melyre a Creutzfeldt-Jakob-kór átvitelétől való félelem miatt volt szükség. Ez a módosulat, a tűt borító gumi anyagával kölcsönhatásban immunreakciót indított be, mely az ún. pure red cell aplasia egyik gyógyszer indukált formájához vezetett [34]. A problémát a tű borításának teflonnal való bevonásával orvosolták.

Azóta különböző hatástartammal és adagolási lehetőséggel rendelkező vegyületek állnak rendelkezésünkre. A hazánkban is forgalomban lévő készítmények közül heti egyszer, intravénásan és szubkután is adható szer az epoetin béta (pl. Inj. NeoRecormon), egy nagy tisztaságú EPO-molekula, melyet az emberi hormon klónozásával állítanak elő. Intravénás beadás során 4-12 órás féleletidővel rendelkezik, bőr alá adva az időtartam 13-28 órára nyúlik meg. Biohasznosulása szubkután beadás esetén az intravénás adagolás 23-42%-a. Dózisát nemzetközi egységekben adják meg, 1 IU megközelítőleg 8,4 ng rh-EPO-nak felel meg.

Rendelkezésünkre áll még egy szialsav-tartalmában módosított, elhúzódó hatású készítmény is, a darbepoietin alfa (pl: Inj. Aranesp). Az epoetin bétában található 3 oligoszacharid helyett ötöt tartalmaz, ezzel mólsúlyát 37 kDa-ra növelve. Köszönhetően a magasabb szialsav-tartalomnak, a darbepoietin féléletideje 3-szorosa a rh-EPO-énak, ennek következtében nagyobb *in vivo* biológiai aktivitással rendelkezik. Inj. Aranesp néven van hazánkban is forgalomban és az epoetin bétához hasonlóan intravénásan és bőr alá is adagolható.

Leghosszabb hatástartammal a metoxi-polietilén-glikol epoetin béta (pl: Inj. Mircera) rendelkezik. Ez utóbbi készítmény az első folyamatos erythropoietin receptor aktivátor (continuous erythropoietin receptor activator, CERA), melynek mólsúlya a molekula N-terminális aminosavára kapcsolt metoxi-polietilén-glikol-butanoátnak köszönhetően 60 kDa-ra nőtt, féléletideje hosszabb, így akár havi egyszeri injekció is elegendő lehet a cél haemoglobin szint eléréséhez.

A renális anaemia miatt ESA-kezelésben részesülő krónikus veseelégtelen betegekben meghatározott hemoglobin célérték az évek folyamán jelentős változáson ment át. Mai álláspontunkat nagymértékben befolyásolta a 2005-ben, idő előtt lezárt CHOIR tanulmány (Correction of Hemoglobin and Outcomes in Renal Insufficiency). A klinikai vizsgálatba hemodialízis kezelés alatt nem álló, krónikus veseelégtelen egyéneket vontak be, majd egy alacsony és egy magas hemoglobin célértékre beállított csoportot különítettek el. Eredményként azt találták, hogy a magasabb, 135 g/l-es hemoglobin célérték nem eredményezett jelentősebb javulást az életminőségben az alacsonyabb, 110 g/l-es célértékre állított csoporthoz viszonyítva. Azonban a magasabb célértékre kezelt betegek között gyakoribbnak adódtak az olyan események, mint a szívinfarktus, a szívelégtelenség miatti hospitalizáció, a stroke vagy a halál [35]. A Food and Drug Administration jelenleg is hatályos álláspontja szerint a krónikus vesebetegekben az ESA-kezelést 100 g/l-es hemoglobin érték alatt kell elkezdni.

3.5. EPO-rezisztencia

Fontos paraméter a renális anaemia kezelésében az az ESA-dózis, melynek alkalmazásával a megadott terápiás cél elérhető. Ez epoetin béta esetében heti 300-

1200 IU/kg között mozoghat. A szükséges dózis az esetleges járulékos vérvesztéstől, a beteg gyulladáshoz való állapotától, a vesebetegség természetétől, a vasraktárak telítettségétől és még számos tényezőtől függhet. Amennyiben a szokásos dózissal ESA-kezelés ellenére a hemoglobin célérték nem érhető el, csökkent EPO-válaszról beszélünk. EPO-rezisztenciáról akkor beszélünk, amikor több mint 3 hónapos kezelés után, 400 IU/kg vagy 20 000 IU/hét EPO-dózis hatására sem érhető el a megfelelő hemoglobinszint [36]. Más források szerint már 300 IU/kg/hét feletti epoetin béta vagy 1,5 µg/kg/hét darbepoietin-alfa igény esetén is rezisztensnek számít a beteg [37]. Megközelítőleg az exogén EPO-kezelésben részesülő betegek 15%-a nem reagál megfelelően a terápiára [38].

Az EPO-rezisztencia kifejezésére rendelkezésünkre áll egy ún. EPO rezisztencia index (ERI), melyet a testtömeg kg-ra megadott heti rh-EPO dózis (µg/kg/hét) és a hemoglobin-szint (g/l) hányadosa képez. Amennyiben az ERI értéke meghaladja a 0,02-t, rezisztenciáról beszélünk [39].

Fontos itt megjegyezni, hogy véleményünk szerint a nem megfelelő EPO-válasz okait két fő csoportra oszthatjuk. Az ismert és gyakran tárgyalt okok között szerepel a vashiány, a L-karnitin-hiány, az alultápláltság, a B₁₂-vitamin- vagy folsavhiány, a krónikus vérszegénység, a „pure red cell aplasia”, a mellékpajzsmirigy túlműködés, a terhesség, a nem effektív vesepótló kezelés, a csontvelő betegségei, valamint bizonyos esetekben az ACE-gátlók szedése. Nem elhanyagolható okként az adherencia hiánya is megemlíthető. Ezekben az esetekben a hiányállapot megszüntetése, a gyógyszer felfüggesztése, az adherencia javítása vagy az alaptergő kezelés megoldást hozhat. A másik csoport a valódi EPO-rezisztencia, amikor egy endogén okból kifolyólag az EPO hatása közvetlenül, jelátviteli szinten gátolt, tehát a háttérben komplexebb probléma állhat. Ilyen ismert kórok lehet a szubklinikus gyulladáshoz, valamint az oxidatív stressz okozta csökkent hormonválasz is (2. táblázat).

Leggyakoribb hiányállapotként a vashiányt kell említenünk. Abszolút vashiányról beszélünk, ha a szérumban a ferritin-szint 100 mg/l alatti. A vashiány lehet funkcionális, amikor normális ferritin mellett a transferrin szaturációja esik 20% alá.

Továbbá gyakori ok a szisztémás gyulladáshoz kapcsolódó citokin felszabadulással, melyek közül elsősorban a TNF (tumor necrosis factor)-alfa, interferon (IFN)-gamma, interleukin (IL)-10 és IL-13 emelendő ki [40]. Shinzato és

munkacsoportja vizsgálataik során az EPO-rezisztens csoportban magasabb C-reaktív protein (CRP), IL-6 és ferritin szintet találtak a kontroll, valamint a vashiányos csoporthoz képest [41]. Wagner és mtsai 2-es típusú diabeteses, krónikus veseelégtelen betegeket átlagosan 4,1 évig követtek; vizsgálták a kezeletlen anaemia összefüggését egyes klinikai paraméterekkel, a vesefunkció alakulásával, valamint a gyulladásos paraméterekkel. Ezen kívül a résztvevők túlélését is elemezték. A tanulmány során a magasabb endogén EPO-szinttel alacsonyabb szérum albumin, ferritin és koleszterin-szint, azonban magasabb életkor, CRP és kardiovaszkuláris kockázat járt. Ezen kívül fontos megjegyezni, hogy a magasabb EPO-szint emelkedett mortalitással is társult [42].

A szisztémás gyulladás anaemiára kifejtett hatásával összefüggésben a hepcidin szerepe is felmerül. Ez egy kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag polipeptid, mely a ferroportin nevű fehérjéhez kötődve csökkenti annak szintjét, ezzel csökkentve az extracelluláris vaskiáramlást. Ennek megfelelően a hepcidin a vas-felszabadulás, valamint a vékonybélből történő vasszívódás gátlásával funkcionális vashiányt okoz, ami csökkent EPO-válaszhoz vezet [43].

2. táblázat: Az EPO-kezelésre adott csökkent válasz okai

EPO hatástalanságának okai	
Csökkent válaszkészség	EPO-rezisztencia
Krónikus vérvesztés Abszolút vagy relatív vashiány Iatrogén okok (pl: ACE-gátlók vagy nem-szteroid gyulladásgátlók szedése) egyéb hiányállapotok (pl: B ₁₂ - vagy folsav-hiány) Csontvelő-elégtelenség Rossz adherencia Terhesség	Posztreceptorális jelátviteli zavarok

3.6. Az EPO pleiotrop hatásai

Bár az EPO – elnevezésének megfelelően – elsősorban az erythroid vérképzésért felelős, hatása rendkívül szerteágazó. Receptorát különböző sejtek felszínén azonosították [44]. Fu és munkatársainak kutatásai alapján humán emlőcarcinoma sejteinek felszínén sejtosztódást és migrációt serkentő hatású, MAPK-rendszert aktiváló, folyamatosan aktív EPO-R található [45]. Ezen kívül emlőtumor-sejtekben, Akt útvonalon keresztül, apoptózisgátló hatását is kimutatták [46]. Fenjves és kutatócsoportja a hasnyálmirigy szigetsejteinek felszínén azonosította a receptort [47]. Az idegrendszerben több sejtcsoportban mutatták ki jelenlétét, az agy kapillárisrendszerének endothelsejtjein [48], a hippokampuszban [49], valamint a kérgi neuronok [50], astrocyták, mikrogliaák felszínén [51].

Gyakran tárgyalt téma napjaink irodalmában az EPO ischaemia-reperfúziós károsodást kivédő hatása is [52]. Az EPO-R vesében való jelenlétének tisztázása vetette fel a lehetőséget, hogy az EPO autokrin-parakrin módon nephroprotektív hatást fejthet ki [53]. A receptort kimutatták a mezangiális sejtek, a proximális és disztális tubuláris sejtek, valamint a gyűjtőcsatornák sejteinek felszínén, de megtalálták a vesesejtes rák és a policystás vesebetegség cystáinak epitelsejtjein is [54]. A vese EPO-termelésének kiesése mind az akut, mind a krónikus veseelégtelenség kimenetelére hatással lehet. Adatokkal rendelkezünk arra vonatkozóan, hogy ischaemiás eredetű akut veseelégtelenség esetén a renális EPO-termelés jelentősen csökken, míg az EPO-R denzitás változatlan marad, tehát exogén EPO bevitelével a citoprotektív hatás kiváltható marad [53]. Mivel az észlelt citoprotektív hatás olyan rövid hatásidővel is kiváltható, hogy a hemoglobin-szintben nincs szignifikáns emelkedés [55], arra következtethetünk, hogy a mechanizmus nem kötött az erythropoetikus aktivitáshoz.

Kutatásaink témájára való tekintettel külön kiemelendők az EPO zsíryanycserére kifejtett hatásai. Egyre több bizonyíték van arra, hogy az EPO védő faktorként működik a kardiovaszkuláris megbetegedések esetében. Ennek hátterében felmerült lipid-akkumulációra, valamint β -oxidációra kifejtett hatása is. Kuo-Yun és mtsai bizonyították, hogy EPO hatására csökken az oxidált alacsony sűrűségű

lipoprotein (LDL)-indukált lipid akkumuláció – a habos sejt képződés – egér makrofágokban, így az EPO atherosclerosis gátló hatást fejt ki [56]. Hojman és mtsai kutatásai alapján harántcsíkolt izomban az EPO serkenti a zsírok oxidációját, ez által kivédi a táplálkozás okozta túlsúlyt [57]. Ez és számos más megfigyelés alapján felmerült a lehetőség, hogy az EPO-kezelés valamilyen módon hatással lehet a vércukor-anyagcserére is. Rendelkezésünkre állnak olyan adatok is, miszerint az akut EPO-kezelés nincs hatással a szénhidrát-anyagcserére, azonban a tartós kezelés csökkentette az inzulin-rezisztenciát, ezzel javítva a perifériás glukóz-felhasználást [58]. Bianchi és mtsai nem találtak összefüggést az EPO-kezelés és a vércukor-szint között, azonban kiemelték a kezelés hatásosságát diabeteses neuropathiában [59].

3.7. A diabetes mellitus epidemiológiája és pathogenezeise

A cukorbetegség, vagy diabetes mellitus népbetegség. Egyes becslések szerint a diabetes mellitus prevalenciája a 2010-ben ismert 6,4%-ról 2030-ra 7,7%-ra fog nőni, mely világszerte 439 millió felnőtt beteget jelent [60]. A szerzők szerint a fő problémát a fejlődő országok fogják jelenteni, ahol a fejlett országokban várható 20%-os prevalencia-növekedéssel szemben 69%-os becsült növekedéssel számolnak. Ezen kívül aggasztó a tény, hogy a 2-es típusú cukorbetegség egyre fiatalabb életkorban jelentkezik [61].

Az 1-es típusú cukorbetegség a betegek körülbelül 5-10%-át teszi ki. Ritkább a gesztációs diabetes, a pankreoprív diabetes, az endokrin kórképekhez társuló vagy a malnutríciós diabetes.

A diabeteses betegek 90%-a 2-es típusú diabetes mellitusban szenved. A betegek nagy része 45 és 65 év közötti, és a diagnózis pillanatában már számos egyéb kísérő betegségben szenvednek. Ennek megfelelően heterogén betegcsoportról beszélünk. Általában azonban jellemző rájuk az abdominális típusú elhízás, a dyslipidaemia, a hypertonia, valamint a hiperinzulinémia és az inzulinrezisztencia fennállása [62]. Pathomechanizmusának alapját is, jelen tudásunk szerint, az inzulin-érzékenység csökkenése jelenti, amely a pancreas β -sejtjeit fokozott inzulintermelésre

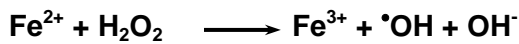
kényszeríti. A fiziológiásnál nagyobb szintézis a β -sejtek progresszív pusztulásához vezet, amely inzulinhiányt eredményez. Ezeken túl a β -sejtek tömegére és funkciójára maga a hyperglükémia is visszahat, mivel ezek a sejtek fokozottan érzékenyek a plazma glukóz-koncentrációjára, valamint annak változására. Ennek megfelelően, ha a β -sejtek hosszú ideig kórosan magas glukóz-koncentrációnak vannak kitéve, annak visszafordíthatatlan hatásai vannak az inzulin-szekréciónak, a sejtek túlélésére valamint az inzulin-érzékenységre. A folyamatot glukotoxícitásnak nevezzük és mivel maga a folyamat is hyperglükémiához vezet, a β -sejt pusztulás „ördögi köre” jön létre [63]. A β -sejt deszenzitizáció, kimerülés és apoptózis akár egy időben is jelen lehet, ezért a szénhidrát-anyagcsere rendezése, tehát a glukotoxícitás akár átmeneti csökkentése, inzulin-szekréciónak javulást eredményezhet [64].

Továbbiakban a vizsgálataink szempontjából meghatározó inzulin-jelátviteli irányokat mutatjuk be. A PI3K-Akt út a metabolikus hatásokért, a MAPK, vagy ERK útvonal az inzulin növekedési faktor- szerű, mitogén hatásáért is felelős. Cusi és munkacsoportja megfigyelte, hogy az inzulinrezisztencia különbözően érinti e két különböző jelátviteli irányt. Humán, inzulinrezisztens betegekből vett izombiopsziás mintákban kimutatták, hogy a magas inzulinszint hasonló mértékben aktiválja a MAPK útvonalat a beteg, mint a kontroll szövetekben. Azonban az Akt útvonalban a beteg egyének sejteiben rezisztencia alakult ki. Tekintve, hogy cukorbetegben az inzulin-receptor szubsztrát (IRS)-1 foszforilációja jelentősen csökkent, valószínűbb, hogy a megtartott ERK útvonal aktivációja diabetesben az Shc rendszeren keresztül történik. Felvetik az IRS-1 kiesése esetén az IRS-2 helyettesítő szerepének lehetőségét [65]. Régóta kutatott terület az IRS normális, tirozin helyetti szerin-foszforilációjának szerepe az inzulin-rezisztencia kialakulásában. Ez csökkenti az IRS PI3K-hoz való kötődését, ez által nagymértékű aktiváció csökkenést eredményez [66]. Ezen kívül a szerin-foszforiláció gyorsult IRS degradációhoz is vezet [67].

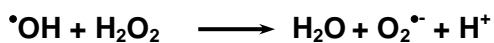
3.8. Az oxidatív stressz

Oxidatív stresszben a pro-oxidáns és antioxidáns folyamatok egyensúlyának megbomlása figyelhető meg, ami szabadgyökök és más nem gyök természetű molekulák felszaporodásával és/vagy az antioxidáns hatások csökkenésével jár.

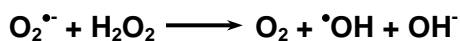
A szabad gyökök mindenütt előforduló, nagy reakcióképességgel rendelkező molekulák. Fenton már 1894-ben publikálta, hogy bizonyos fémek hidrogén peroxid (H₂O₂) jelenlétében hidroxil szabad gyök (•OH) keletkezését képesek katalizálni [68]. A szabad gyökök, élő szervezetekben való jelenlétét először az előző század második harmadában igazolták [69]. Szabad gyöknek az olyan molekulát nevezzük, amelyben párosítatlan spinű elektron van jelen. A párosítatlan elektron révén rendkívül reakcióképesek, így féléletidejük nagyon rövid. A szabad gyökök közé tartozik a szuperoxid (O₂^{•-}), a hidroxil (•OH), a nitrogén-monoxid (•NO). Nem szabad gyök, hanem erélyes oxidálószer a H₂O₂, valamint a peroxinitrit. Szabad gyökök mind az élő mind az élettelen világban lejátszódó folyamatok során keletkeznek. Ilyen reakció, pl. a H₂O₂ bomlása vas jelenlétében:



Az egyenletet leírója után Fenton reakciónak nevezünk. A keletkezett •OH és H₂O₂ reakciója során szuperoxid szabad gyök jön létre.



Az így létrejött O₂^{•-}, hidrogén-peroxid jelenlétében hidroxil szabad gyökké alakul át.



A fenti láncreakciót - Haber és Weiss leírása nyomán - Haber-Weiss reakciónak nevezzük [70].

3.8.1. Oxidatív stressz krónikus vesebetegségben

A krónikus veseelégtelenség az egész szervezetet érintő, komplex kórállapot. Szövődményeinek kialakulásában szerepet játszik az immunrendszer diszfunkciója, következményes krónikus gyulladással, a szervezet csökkent antioxidáns kapacitása, valamint az uraemiás toxinok felszaporodása [71]. Vaziri és munkacsoportja a krónikus veseelégtelenséghez asszociált hipertóniában bizonyította a fokozott reaktív oxigén termékek (ROS) termelődésének kóroki szerepét [72]. A vesefunkció zavara esetén a redox egyensúly eltolódására olyan markerek megnövekedett plazma szintje is utal,

mint az F₂-izoprosztánok, előrehaladott oxidációs végtermékek, valamint a malondialdehid [73]–[75]. Ezek mellett veseelégtelen betegekben emelkedett oxidált LDL-szint mutatható ki, mely kedvez az atherosclerosis kialakulásának [76]. Úgy tűnik, hogy a ROS-túltermelés a vesefunkció romlásával szinkronban nő, mivel több vizsgálat során inverz korrelációt találtak a GFR és az oxidatív stressz markerek között [73][77]. A szénhidrátok, valamint a lipidek fokozott oxidációja a karbonil-származékok elégtelen semlegesítésével (karbonil-stressz) együtt fontos szerepet játszhat a veseelégtelenség hosszútávú szövődményeinek kialakulásában [78].

A szervezet ROS-termelésében lényeges szerepet kap a mitokondriális elektrontranszport-lánc. Mivel a belélegzett oxigén redukciójához négy elektronra van szükség, az esetleges inkomplett reakció következtében lehetségessé válik a köztes, csak részben redukált O₂-származékok felszabadulása. Egyes források szerint ennek aránya 1-4% között van [79]. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy krónikus veseelégtelen patkányokban csökken a citrát-szintáz enzim expressziója, ezzel eltolódik a harántcsikolt izmok mitokondriális energia metabolizmusa a nem oxidatív adenosin-trifoszfát (ATP)-termelés felé [80][81]. Yazdi és munkacsoportja csökkent mitokondriális légzést, az izmokban csökkent mitokondrium-számot, ezért csökkent energiatermelő kapacitást, valamint felgyorsult ROS-képződést talált krónikus veseelégtelenség esetén [82]. Ahogy a fokozott ROS-képződés, úgy a csökkent antioxidáns kapacitás is az egyensúly eltolódását okozhatja [83], mely a legsúlyosabb fokú végstádiumú veseelégtelenségben előfordul. A fokozott ROS-képződés olyan gyulladásszerű kaszkádok aktivációját okozhatja, mint az NF-κB út vonal. Kosmidou és munkacsoportjának vizsgálatai alapján a ROS az IL-6 termelését végstádiumú veseelégtelenségben NF-κB függő módon stimulálja [84].

3.8.2. Oxidatív stressz diabetes mellitusban

Diabetes mellitusban a pro-oxidáns és az antioxidáns folyamatok egyensúlyának eltolódása miatt a szabad gyökök kóros mértékű felszaporodása figyelhető meg. A ROS-képződés felgyorsulásához többek között a tartós hyperglikémia, a glukóz autooxidációja, valamint a mitokondriális elektron transzport-lánc működésének megváltozása vezetnek. A tartós hyperglikémia sejtkárosító hatása több, párhuzamosan zajló, de egymással kölcsönhatásban álló mechanizmuson

keresztül következik be. Az olyan szövetek pedig, mint például az endothelium, védtelenek az extracelluláris hyperglükémia ellen, mivel nem képesek intracelluláris glukózsintjük szabályozására, ez pedig endothel-diszfunkciót eredményez [85].

A ROS túltermelődése egyrészt a poliol-anyagcsereúton keresztül, az aldóz-reduktáz enzim által katalizált reakció eltolódásából adódik. Fiziológiásan az enzim a toxikus aldehidek inaktív alkoholokká való redukcióját, valamint a glukóz szorbitolon át történő fruktózzá alakítását végzi, egy nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) függő reakcióban. A magas intracelluláris glukózsint a NADPH fokozott felhasználódásához vezet, ezért annak sejten belüli szintje csökken [86]. Mivel a glutation redukciójához a NADPH nélkülözhetetlen, a folyamat az antioxidáns kapacitás csökkenéséhez vezet.

Diabetesben a fehérjék poszttranszlációs módosulása megy végbe. Ilyen módosulás a nem enzimátikus glikáció, amely a hemoglobint, a vörösvértestek membránfehérjéit, a szérum albumint, az immunglobulinokat, magát az inzulint és minden más fehérjét érint. A protein-károsodás végbemehet nem enzimátikus glikációval, oxidációval, nitrációs termékek képződésével. A folyamat eredményeképpen előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycated end products; AGE) képződnek. A korábbi nézettel ellentétben, miszerint a glikációs károsodás elsősorban a hosszú életidejű, extracelluláris fehérjéket érinti, ma már úgy tartjuk, hogy a nem enzimátikus glikációnak a rövid életidejű fehérjék is ki vannak téve. A folyamat hátterében *in vivo* leginkább a reaktív karbonil-termékeknek van szerepe (pl: glioxál, metilglioxál). Az AGE sejtkárosító hatásait nem receptorális és receptorális csoportba oszthatjuk. A nem receptorális hatás alatt a fehérjék közvetlen funkciókárosodását értjük. A módosulás következtében ún. neoantigénképződés is megfigyelhető [87]. A receptorális hatásokat különböző fehérje-interakciókhoz köthetjük, ezek közül a legtöbbet kutatott a felszíni receptoron keresztüli hatás. Az AGE-receptorokon keresztül (receptor for AGEs; RAGE) olyan jelátviteli utak aktiválódnak, mint a protein kináz C (PKC)-útvonal vagy az NF- κ B [88].

A hyperglükémia okozta intracelluláris diacil-glicerol-szintézis fokozódás, a fokozott ROS-termelődés a PKC-aktivációjához és ezzel számos kóros jelátviteli útvonal aktivációjához (pl: vaszkuláris endotheliális növekedési faktor; NF- κ B; NADPH-oxidáz, endothelin-1), valamint a fiziológiás útvonalak gátlásához (endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz; eNOS) vezet [89].

Fiziológias körülmények között az intracelluláris glukóz glikolízis útján metabolizálódik. A folyamat egy közti terméke, a fruktóz-6-foszfát ezen kívül a glutamin-fruktóz-6-foszfát-amidotranszferáz enzimmel is kölcsönhatásba léphet, mely reakció eredményeképpen uridin-difoszfó-N-acetil-glukózamin képződik. A magasabb intracelluláris uridin-difoszfó-N-acetil-glukózamin koncentráció a fehérjék fokozott O-glikozilációjához vezet. Számos bizonyítékkal rendelkezünk arra, hogy a fehérjék ilyen típusú módosulása szerepet játszik az inzulinrezisztencia és a diabetes szövődményeinek pathogenezisében [90][91]. Megváltoztathatja olyan gének expresszióját, mint például a TGF- β (transforming growth factor- β), ezzel szerepet játszva a DNP pathogenezisében is [92].

3.9. Tirozin-módosulatok képződése

A tirozin egy nem esszenciális aminosav, mivel fenilalaninból hidroxiláció révén képződik. Attól függően, hogy melyik pozícióban történik a hidroxiláció para-, orto-, vagy meta-tirozinról beszélünk. Enzimatikusan, a fenilalanin-hidroxiláz nevű enzim katalizálta reakcióban a hidroxiláció mindig para pozícióban történik, azonban $^{\circ}\text{OH}$ jelenlétében nem-enzimátikus módon, orto- és meta-tirozin is képződik [93]. A három izomer kizárólag a hidroxil-csoport helyzetében különbözik egymástól.

Ehrlich 1906-ban figyelte meg először, hogy rosszindulatú daganatban szenvedő betegekben létezik egy jelenség, miszerint a szervezet képes gátolni a szekunder tumor képződését. A jelenség egyértelműen a primer tumor meglétéhez köthető, mivel annak sebészi eltávolítását követően, gyorsult metasztázis-képződés figyelhető meg [94]. Két fázisa ismert; az első fázis főleg immunológiai természetű, kisebb méretű malignomák esetében megfigyelhető, T-sejt dependens folyamat. A második azonban nem thymus-dependens folyamat, főleg nagyobb méretű tumorok esetén figyelhető meg. A második fázis immunrendszertől való függetlenségét az a tény is alátámasztja, hogy a jelenség splenectomizált, adrenalectomizált, gyakorlatilag működő immunválasszal nem rendelkező - „nude” - egerekben is megfigyelhető [95]. Ruggiero kísérletei alapján a tumor rezisztenciát közvetítő ágens aminosav-természetű, kis molekulásúlyú anyag. Tömegspektrométeres és kromatográfias vizsgálataik alapján a jelenségért 90%-ban a meta-; 10%-ban az orto-tirozin tehető

felelőssé. Western blot vizsgálatokkal az orto- és meta-tirozin akut ERK- és STAT3-foszforiláció-gátló hatását bizonyították, melynek szerepe lehet a metasztázis-képződés ellenes aktivitás mechanizmusában. A hatás kivédhető volt fenilalaninnal, glutaminnal, aszpartáttal, hisztidinnel vagy glutamáttal is, mely molekulák nagy mennyiségben vannak jelen a primer tumor környezetében [96].

Mára ismert, hogy az orto- és meta-tirozin képződés diabetes mellitusban és krónikus vesebetegségben fokozott mértékű az egészségesekhez képest [97]. Továbbá a két betegség együttes fennállása esetén a termelődés tovább nőhet [97]. Ennek megfelelően feltételezhető, hogy a kóros tirozin-módosulatok fehérjékbe történő beépülése szerepet játszhat a hormon rezisztenciák, többek között az inzulin- és EPO-rezisztencia kialakulásában.

Az eddigieket összegezve kimondható, hogy az említett tirozin-módosulatok sejtek túlélésére, valamint működésére kifejtett hatása két fő mechanizmusra különíthető el. Létezik egy közvetlen cytotoxikus hatás, mely nagy koncentrációban, rövid idő alatt okoz sejtelhalást. Azonban létezik egy krónikus hatás is, melynek során a meta- és orto-tirozin – strukturális hasonlóság alapján – a para-tirozin vagy fenilalanin helyére a sejtfehérjékbe épülve, élettani működéseket változtat meg.

4. CÉLKITŰZÉSEK

4.1. Az EPO glukóz-anyagcserére kifejtett hatásainak vizsgálata *in vivo* és *in vitro* kísérletekben

- Célul tűztük ki az akut *in vivo* vércukorcsökkentő hatás bizonyítását.
- Célunk volt *in vitro* a zsíresejtek EPO függő glukóz-felvételének vizsgálata, valamint ennek háttérében álló intracelluláris jelátviteli folyamatok tisztázása.
- A jelenség magyarázataként bizonyítani terveztük az EPO-R jelenlétét a 3T3-L1 sejtek felszínén.

4.2. Az orto- és meta-tirozin EPO-rezisztenciában játszott szerepének tisztázását terveztük *in vitro* kísérletek során

- Célunk volt a tirozin-módosulatok EPO indukálta sejtproliferációra kifejtett hatásainak vizsgálata, TF-1 erythroblaszt sejtvonal felhasználásával.
- Célul tűztük ki a kóros tirozin-módosulatok sejtalkotó fehérjékbe történő beépülésének bizonyítását HPLC segítségével.
- Célkitűzésünk volt a jelenség jelátviteli háttérének tisztázása Western blot módszerrel.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Az EPO szénhidrát-anyagcserére kifejtett hatásai

5.1.1. Kötőszöveti glukózmonitorozás (CGMS)

A CGMS (Continuous Glucose Monitoring System) folyamatos cukormonitorozó készülék, amely négy részből áll: egy elektroenzimatikus glukóz szenzorból, mely vezetékkel kapcsolódik a cukormonitorhoz, amely a számítógéphez csatlakoztatható adatfeltöltő egységgel vezeték nélkül kommunikál. A készüléket a beteg a derekára rögzítve viseli a nap 24 órájában. A tárolt adatokat számítógépes program értékeli és dolgozza fel, majd a mért értékekből a program segítségével grafikonok és statisztikai számítások készülnek. A készüléket felhelyezéskor és a vizsgálat alatt is folyamatosan naponta, több alkalommal ujjbegyi vércukorméréssel kalibrálni kell. Az eredményekből a beteg cukorháztartásáról a hagyományos ujjbegyi mérésnél pontosabb képet kapunk. A készüléket a betegek jól tolerálják, a CGMS-t klinikánkon a rendezetlen szénhidrát-háztartású diabetesesek körében rutinszerűen használjuk a cukorháztartás monitorozására.

5.1.2. Állatkísérletek

Az állatkísérletek elvégzését a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. Három-öt hónapos, 300 ± 30 g tömegű, hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatokat véletlenszerűen osztottuk egy kontroll ($n=5$) és egy diabeteses ($n=5$) csoportra. A diabeteses csoportba sorolt patkányokat egy alkalommal intraperitoneális 60 mg/ttkg streptozotocinnal oltottuk be, oldószerként 0,05 mol/l-es koncentrációjú steril citrát-puffert használtunk. Az injekció utáni vércukor-értékeket teljes vérből, a vért az állatok fark-vénájából nyerve, Accu-Check Active glukózmérővel határoztuk meg (Roche Magyarország, Budaörs, Magyarország). A

diabetes mellitus diagnózisát 2 egymást követő napon mért 13 mmol/l feletti vércukorszint esetén mondtuk ki. Az ezt követő 2-3 hétben az állatokat szorosán obszerváltuk. A diabeteses csoportban a ketoacidózist szubkután inzulin (NPH, 2,0 E/ttkg; Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA) alkalmazásával kerültük el, melyet 48 órával a kísérletek megkezdése előtt függesztettünk fel. Egy éjszakai éhezést követően 10 mg/ttkg, szondán át, per os adagolt klorál-hidrátos bódítást követően a farokvénába kanül-behelyezés történt. A kanülon át 35, 50 vagy 100 NE epoetin bétát; kontrollként pedig 0,2; 0,5 vagy 1,0 ml fiziológiás sóoldatot juttatunk be, 15 perces időközönként. A vércukorszintet egy másik farokvénából, 5 percenként határoztuk meg. Adataink megerősítése érdekében 2 állat esetében intersticiális glukóz-monitorozást végeztünk CGMS készülék segítségével (n=2; Paradigm 522, Medtronic, Minneapolis, MS, USA).

5.1.3. A 3T3-L1 sejtvonal

In vitro vizsgálatainkhoz 3T3-L1, egér zsírsejtvonalat használtunk (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). A preadipocita formában érkező sejtvonalat 75 cm²-es flaskákon osztottuk szét, majd a kísérletekhez 60 mm-es Petri-csészéken szélesztettük. Két napon át tartó indítást követően [DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium; 10% BSA (marha szérum albumin); antibiotikum keverék] izobutilmetilxantint (0,5 mmol/l), dexametazont (0,25 µmol/l), inzulint (1,0 µg/ml), antibiotikumokat és 10% főtális borjú szérumot (FBS) tartalmazó médiumban a sejteket differenciáltuk. Ezt követően inzulint tartalmazó tenyésztő médiumban további 6 napon át növesztettük a sejteket. A normál és a magas glukózsintet kétféle tenyésztő médiummal modelleztük, így összesen a sejtek 10 napot töltöttek egyik vagy másik glukóz-koncentrációban. A kísérletet akkor végeztük el, amikor a sejtek több mint 90%-a zsírsejt fenotípust mutatott (kerek sejtforma, a plazmában lipid-cseppek). Tizenkét órás szérum-deprivációt követően a foszforilációs kísérletekhez 5, a GLUT4 kihelyeződés vizsgálatához 30, az izotóp felvétel meghatározásához 100 perces inkubációkat végeztünk 2, 20, 200 vagy 400 nmol/l inzulin vagy a jelzett koncentrációjú r-mo-EPO jelenlétében. Az Akt aktiváció gátlásához a PI3K-inhibitor, LY294002-t használtuk (50 µmol/l, 30 percig; Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Németország).

A zsírsejtek indító- differenciáló- és tenyésztőmédiumának elkészítéséhez használt médium gyárilag 72 mg/l para-tirozint tartalmaz. Az EPO-rezisztencia vizsgálatához ezzel megegyező mennyiségű para- vagy orto- tirozint adtunk a médiumhoz, így a sejtek 10 napig valamelyik izoformát túlsúlyban tartalmazó médiumban tenyésztettük. Ezt a fentihez hasonló kivitelezésű kezelés követte.

5.1.4. Western blot analízis

A kísérletek során – amennyiben külön nem jelezzük – a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) reagenseit használtuk. Az inzulin- vagy r-mo-EPO kezelést követően a sejteket Trisz-Triton extrakciós pufferben lizáltuk jégen, 30 percig. [1 mmol/l Trisz-HCl, pH 7,4; 1,15 térf% Triton X-100, 500 mmol/l EDTA, 200 mmol/l EGTA, 100 mmol/l dithiothreitol, 100 mmol és 0,5%-os PMSF, leupeptin, aprotinin, valamint gyári foszfatáz inhibitor koktél 1 és 2]. Ezt követően a lizált sejteket egy éjszakán át -80 °C-on tároltuk, majd a mintákat +4 °C-on centrifugáltuk (14 000 g, 10 percig). Majd a fehérjekoncentrációt a „Bio Rad protein assay kit” segítségével, módosított Bradford-módszer alapján határoztuk meg. Standardként BSA-t használtunk. A mintákat 2x-es Laemli-pufferrel kevertük, a fehérjéket 90 °C-on denaturáltuk, majd 10%-os SDS-PAGE során szeparáltuk őket. A transzfer polivinilidene difluoride membránra történt (Millipore, Billerica, MA, USA). A lane-ek egyforma fehérjetartalmát Ponceau-S festéssel erősítettük meg (75–100 µg). A membránokat 5%-os BSA-t és 0,1% Tween-t tartalmazó trisz-NaCl oldatban blokkoltuk, majd a primer antitestekben (1:1000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA) egy éjszakán át, 4 °C-on inkubáltuk [anti-foszfoSer(473)-Akt; anti-Akt; anti-foszfoThr(202)/Tyr(204)ERK és anti-ERK ellen]. Mosást követően a membránokat az elsődleges antitesthez kompatibilis másodlagos, torna-peroxidáz (HRP) jelölt antitesttel inkubáltuk (1:2000; anti-nyúl IgG, Cell Signaling), 60 percig szobahőmérsékleten. További mosást követően a blotokat felerősített immunlumineszcenciával tettük láthatóvá (Super-Signal West Pico, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), majd röntgenfilmen előhívtuk (Kodak XAR). Strippelést követően az össz Akt és ERK jelölést végeztük el. A denzitometriás analízist Scion Image program használatával (Frederick, MD, USA) végeztük.

Az EPO-R jelölés esetén kezeletlen 3T3-L1 sejteket vittünk fel, pozitív kontrollként K-562 sejtek szolgáltak (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Az immunoblotot követően anti-EPO-R antitesttel, inkubáltuk őket. (1:200, Santa Cruz Biotechnology) 4 °C-on, egy éjszakán át. A másodlagos jelölést követően az előzőekhez hasonlóan végeztük az előhívást.

5.1.5. GLUT4 plazma membrán frakcionálása

A zsírsejteket biotinizációt követően lizáltuk [98]. A sejteket a csészékről felkapartuk, centrifugáltuk, majd a felülúszó fehérjetartalmát a korábban részletezett módszerrel meghatároztuk. Standard 10 µg teljes sejtizátumot vittünk fel pozitív kontrollként. A mintákból 200 µg-ot Pierce Streptavidin mágneses gyöngyökkel inkubáltunk folyamatos rázással 4 °C-on, egy éjszakán át (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A biotinizált fehérjéket mágnes segítségével lehúztuk, majd háromszor Trisz-Triton extrakciós pufferrel mostuk. A mintákat 7,5%-os SDS-PAGE során szétválasztottuk, anti-GLUT4 elsődleges antitesttel jelöltük (1:1000; egy éjszakán át; 4 °C-on), majd másodlagos antitest-oldatban egy órán át inkubáltuk (1:2000; anti-nyúl IgG). Az előhívás a fent részletezett módon történt.

5.1.6. Az izotóp-jelzett glukózfelvétel vizsgálata

A zsírsejteket 12 órás faktor-megvonást követően 30 percig glukózmentes médiumban inkubáltuk. A médiumot lecserélve minden tenyészetre 2 ml glukózmentes médium került, melybe 1-1 µCi/ml deoxi-D-[³H]glukózt adtunk (American Radio-labeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA). A sejteket növekvő koncentrációjú r-mo-EPO-val (0; 0,15; 0,3; 0,625; 1,25; 2,5 ng/ml), vagy inzulinnal (0; 2; 20; 200; 400 nmol/l) kezeltük. A felvételt – az időfüggés vizsgálata alapján legkedvezőbbnek ítélt - 100 perc után állítottuk meg. A sejteket a Petri-csészéről kaparással távolítottuk el, majd a médiumot centrifugáltuk (3000 g; 5 perc; 4 °C). Harminc perces lízist követően (70 µl; Trisz-Triton extrakciós puffer) a mintákból 30 µl-t vettünk ki szcintillációs számlálás céljából (Beckman LS 5000). Ezt követően a minták fehérje-tartalmát Bio-Rad kit

segítségével (Hercules, California, CA, USA), spektrofotométerrel (Hitachi U1100) határoztuk meg. A glukózfelvételt 5 perces mérés átlagos radioaktivitása és a fehérje-koncentráció hányadosával adtuk meg [percenkénti beütés/ μg (counts per minute; CPM)/ μg].

5.1.7. Immuncytokémia

Tripszines emésztést követően a zsírsejteket poly-L-lizinnel borított fedőlemez darabokra tapasztottuk (20000 sejt/lemez; Nunc, Roskilde, Denmark), majd 0,5% FBS-t tartalmazó, normál, vagy magas glukózsintű DMEM-ben tenyésztettük őket 24 órán át. Hatvan perces szérum-megvonást követően a tenyészeteket inzulinnal vagy r-mo-EPO-val kezeltük 30 percig. A kezelés végén a sejteket 4%-os para-formaldehiddel 60 percig, szobahőn fixáltuk. A blokkolás nagy sótartalmú foszfát-pufferben történt (PBS; pluszban hozzáadott 23,38 g NaCl; 10% (wt/vol) BSA és 0,1% Triton-X 100). Ezt követően az így permeabilizált sejteket GLUT4 elsődleges antitesttel inkubáltuk (1:1000; 3%-os BSA/PBS oldatban; egy éjszakán át; 4°C-on). A magas sótartalmú PBS-sel mostuk, majd másodlagos antitestként Cy3-konjugált anti-nyúl IgG-vel inkubáltuk (1:4000; 3% BSA/PBS) egy éjszakán át, 4 °C-on. További mosási köröket követően 0,5 mg/ml Hoechst 33 342-vel festettük (Calbiochem, Gibbstown, NJ, US). A fedőlemezeket fedtük (Slow Fade, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) és lézer konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk (Olympus FV-100, foton számláló mód).

5.1.8. Statisztikai analízis

Az adatokat $\text{átlag} \pm \text{SE}$ formában fejeztük ki. A statisztikai elemzést egymintás Student-féle T-próbával, valamint párosított vagy párosítatlan T-próbával végeztük el, az SPSS 17.0-s verziójának használatával (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Szignifikáns különbségnek a 0,05 alatti p-értéket vettük, melyeket az ábrák és táblázatok alatt jelöltünk.

5.2. EPO-rezisztencia in vitro vizsgálata

5.2.1. TF-1 erythroblasztok

A kísérleteinkhez TF-1 (CRL-2003) erythroblasztokat használtunk (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). A tenyésztés RPMI-1640 médiumban történt (2 ng/ml granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor; 10% FBS; antibiotikumok). A kísérleteket megelőzően 3 napig a sejteket 20-20 mg/l para- orto- vagy meta-tirozint tartalmazó médiumban tenyésztettük. A proliferációs kísérletekhez a 3 IU/ml rh-EPO-t adtuk az erythroblasztokhoz hasonló körülmények között. A Western blot kísérletek előtt, 12 órás faktor megvonást követően 10 perces kezeléseket végeztünk 3 IU/ml rh-EPO-val.

5.2.2. Sejtproliferációs vizsgálatok

A Petri-csészékre (60 mm) standard sejtszámot vittünk fel (2×10^5 /ml), a tenyésztőmédiumhoz 20 mg/l para-, orto- vagy meta-tirozint adtuk. A sejteket ez után rh-EPO-val vagy hiányában tenyésztettük 3 napig. A sejtproliferációs vizsgálatokhoz naponta, steril körülmények között vettünk mintát. A sejtszámokat Bürker-kamrás számlálással, két független vizsgáló határozta meg, majd a kapott eredményeket átlagoltuk. Végül a tenyészeteket lizáltuk, majd egy éjszakás $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történt tárolást követően a fehérjekoncentrációt meghatároztuk.

A koncentráció-függés vizsgálatához a médiumhoz szintén 20 mg/l para- orto- vagy meta-tirozint, valamint a két utóbbihoz még 0; 20; 40 vagy 80 mg/l para-tirozint adtuk, majd a sejteket 3 napig tenyésztettük. Az RPMI-1640 médium eredetileg 20 mg/l para-tirozint tartalmaz.

5.2.3. Fehérje-koncentráció meghatározása

A fehérjék koncentrációját módosított Bradford-módszerrel, Bio Rad protein assay kit segítségével határoztuk meg. Az eredményeket $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -ben számoltuk, az eredményeket az EPO-kezelt és a kontroll sejtek fehérjetartalmának arányában adtuk meg.

5.2.4. Nagyteljesítményű folyadék-kromatográfia (HPLC)

A különböző tirozin-izoformák fehérjékbe történő beépülésének bizonyításához fluoreszcens HPLC-módszert alkalmaztunk. Három napos inkubálást követően a sejt kultúrákról a médiumot centrifugálással távolítottuk el (1000 rpm; 10 perc). Ezt követően a sejteket 1 ml fiziológiás sóoldattal háromszor mostuk, mosások közben pedig 1000 rpm-en, 5 percig centrifugáltuk. Végül 200 μl desztillált vizet adtunk a sejt mintákhoz, újraszuszpendáltuk, majd ultrahanggal kezeltük őket. Ezt követően 100 μl 60%-os triklórecetsavat (TCA) adtunk hozzájuk. A mintákat vortexeltük és centrifugáltuk (4000 rpm; 10 perc). A felülúszó eltávolítását követően 200 μl 1%-os TCA-t adtunk a mintákhoz, ismét szuszpendáltuk, vortexeltük őket, majd 100 μl 60%-os TCA-t adtunk hozzájuk. Ezt ismét centrifugálás követte (4000 rpm, 10 perc), a felülúszót ismét leszívtuk és 200 μl 1%-os TCA-t adtunk hozzájuk. Újraszuszpendálást követően ultrahanggal kezeltük a mintákat, majd ismét 100 μl 60%-os TCA-t adtunk hozzájuk vortexelés mellett. Végül a precipitátumot centrifugálással szeparáltuk (4000 rpm, 10 perc), 40 μl butilált hidroxitoluol (500 mmol/l), 4 μl dezferrioxamin (400 mmol/l) és 400 μl 12 normális HCl hozzáadásával. Ezt követően a mintákat egy éjszakán át hidrolizáltuk 120 °C-on, majd centrifugáltuk (5000 rpm; 15 perc). A HPLC analízis előtt a mintákat 0,2 μm pórusméretű fecskendővel szűrtük. Végül a para-, orto- és meta-tirozin szinteket reverz fázisú HPLC segítségével határoztuk meg (C_{18} szilikon oszlop, 250 x 4 mm), fluoreszcens detekcióval ($\lambda_{\text{EX}} = 275 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{EM}} = 305 \text{ nm}$) [97]. A koncentrációkat külső standard segítségével határoztuk meg, az eredményeket a para-, orto-, vagy meta-tirozin és az össz-tirozin arányában fejeztük ki.

5.2.5. Western blot analízis

A r-hu-EPO-val történt kezelést követően az immunoblot a 3T3-L1 sejtek esetében részletezett módon zajlott (5.1.4. pont). A használt elsődleges antitestek a következők voltak: anti-foszfo-Thr(202)/Tyr(204)-ERK; anti-foszfo-Tyr(694)-STAT5; anti-ERK; anti-STAT5 valamint anti- β -aktin (1:1 000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA). A másodlagos antitest jelölés, az előhívás is a fentiek szerint zajlott. Az eredményeket az aktivált és az össz ERK 1/2 és STAT5 arányában, a β -aktinra korrigálva adtuk meg.

5.2.6. Statisztikai analízis

Az adatokat $\text{átlag} \pm \text{SE}$ formában fejeztük ki. Az elemzést az SPSS program 17.0-s verziójának használatával végeztük el. A szignifikáns különbségeket az ábrák magyarázatában jelöltük. A normál eloszlást Kolmogorov-Smirnov teszttel bizonyítottuk. A sejtproliferációs kísérletek, a HPLC-s mérések, valamint a fehérjemérések esetén ANOVA-t végeztünk Bonferroni post-hoc tesztjének használatával. A Western blot eredményeinek esetén a kezeletlen kontroll sejtekben mért foszforilációt vettük 100%-nak, majd egymintás T-próbát végeztünk. A csoportok közötti összehasonlításhoz ANOVA-t használtunk.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Az EPO szénhidrát-anyagcserére kifejtett hatásai [1.]

6.1.1. Humán vizsgálat alapján az EPO csökkenti az intersticiális glukózsintet

Két diabeteses betegünk felborult szénhidrátanyagcsere-egyensúlya miatt CGMS felhelyezése vált szükségessé. A betegek renális anaemiájuk miatt EPO (epoetin béta) kezelésben részesültek. A CGMS-készülék által mért adatokat feldolgozva azt találtuk, hogy mindkét beteg esetén a posztprandiális cukorértékek átlagai között szignifikáns eltérés van. Az EPO injekció beadása utáni napokon a készülék szignifikánsan alacsonyabb glukózértékeket detektált (3. táblázat).

3. táblázat Az EPO-beadás hatása az intersticiális cukorszintre.

étkezések után 2 órával mért cukorértékek átlaga		
	EPO kezelés előtt (mmol/l \pm SE)	EPO kezelés után (mmol/l \pm SE)
1. beteg (120 mérés átlaga)	13,8 \pm 0,4*	12,3 \pm 0,2*
2. beteg (135 mérés átlaga)	7,8 \pm 0,3*	6,8 \pm 0,2*

*Két inzulin- és EPO-kezelt cukorbeteg CGMS-sel mért intersticiális cukorszintjeinek átlaga. A statisztikai analízis során összehasonlítottuk a beteg EPO-adás előtti és utáni étkezéseit követő két órában rögzített glukózértékeit. * $p < 0,001$*

6.1.2. Akut vércukorszint-csökkentő hatás állatkísérletben

A vizsgált diabeteses állatok kiindulási vércukorszintje 24 ± 10 mmol/l volt, míg az egészséges patkányokban 5 ± 3 mmol/l-es kiindulási vércukorszintet mértünk. Az intravénásan beadott rh-EPO minden használt dózis esetén szignifikánsan csökkentette az állatok glukózsintjét a kontroll kísérletekben tapasztaltakhoz képest (35, 50, vagy 100 IU; $p < 0,05$). A legintenzívebb, 1,32 mmol/l-es csökkenést a legnagyobb, 100 IU dózisonál észleltük. Eredményeinket a 2. táblázatban részletezzük. Látható, hogy az egyes EPO-adagok hatására dóziszfüggő vércukorszint-csökkenést értünk el ($p < 0,05$). Egészséges állatokban nem találtunk szignifikáns, koncentrációfüggő hatást. Hypoglikémiát, vagy bármilyen egyéb mellékhatást a kísérletek során egyik csoportban sem észleltünk.

4. táblázat Az intravénás rh-EPO hatása streptozotocin-diabeteses patkányok vércukorszintjére.

	35 IU EPO		50 IU EPO		100 IU EPO	
	előtte	utána	előtte	utána	előtte	utána
Oldószer kontroll	21,6 ± 1,3	22,0 ± 1,4	22,2 ± 1,6	22,1 ± 1,6	22,2 ± 1,6	22,6 ± 1,7
Epoetin béta	23,6 ± 5,13	22,8 ± 5,0*	24,5 ± 2,3	23,6 ± 2,4*	24,6 ± 2,7	23,3 ± 2,7*
Oldószer kontroll	Δ 0,5 ± 0,2		Δ -0,1 ± 0,0		Δ 0,3 ± 0,3	
Epoetin béta	Δ -0,8 ± 0,3 †		Δ -0,9 ± 0,3 †		Δ -1,3 ± 0,3 †	

A vércukorszint-változásokat átlag \pm SE formában fejeztük ki 5 perccel a 35, 50 vagy 100 E EPO-beadása előtt és után. Kontrollként vivőanyagot használtunk (0,2; 0,5 vagy 1,0 ml fiziológiás sóoldat). Az adatokat mmol/l-ben adtuk meg. ($n = 5$ /csoport) * $p < 0,05$ vs. EPO beadás előtti érték; † $p < 0,05$ vs. a vivőanyag hatására észlelt változás.

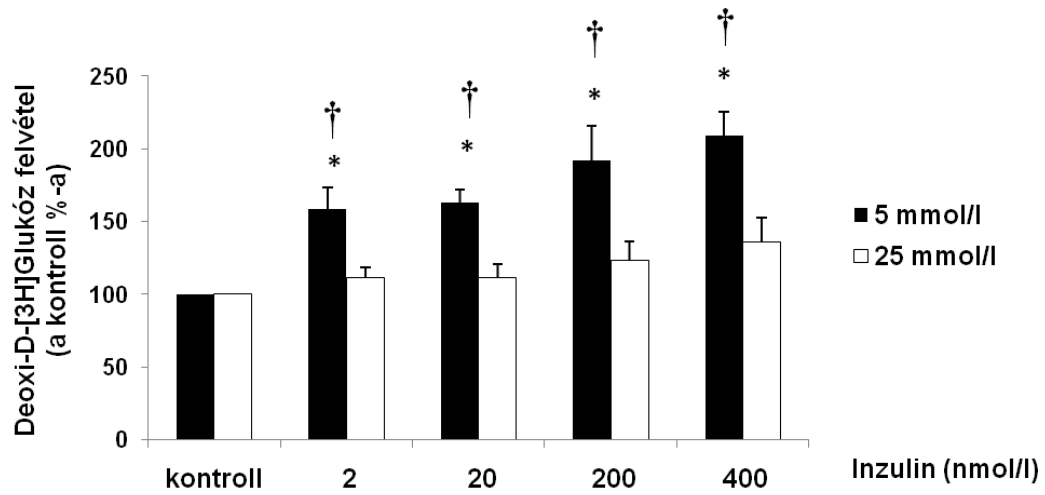
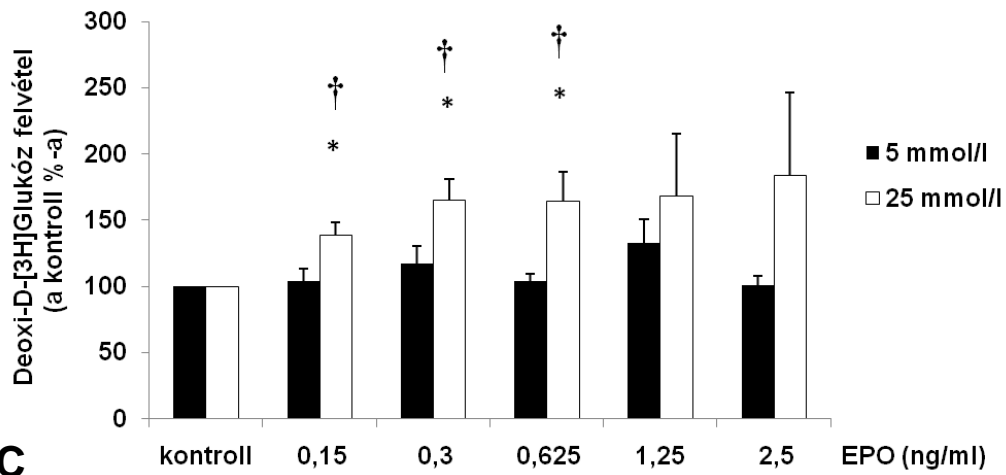
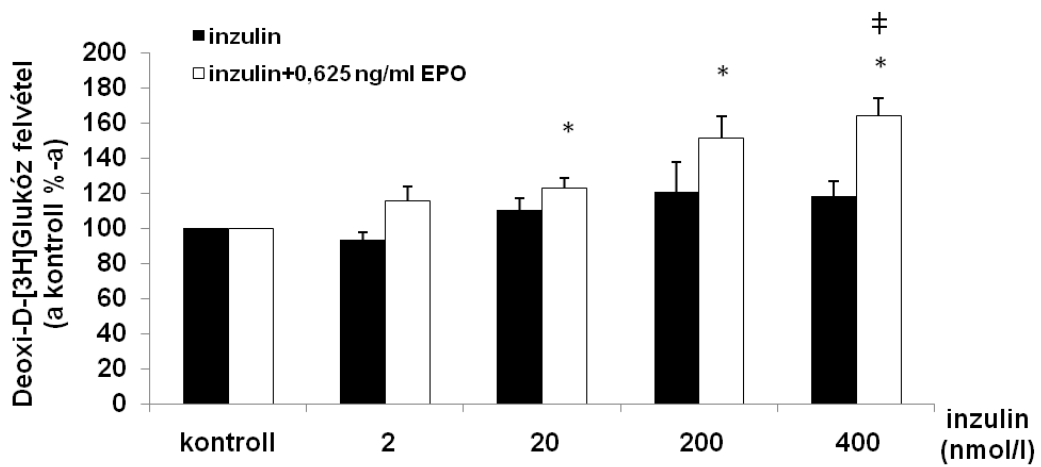
6.1.3. EPO hatására növekszik a zsírsejtek izotóp-jelzett glukózfelvétele

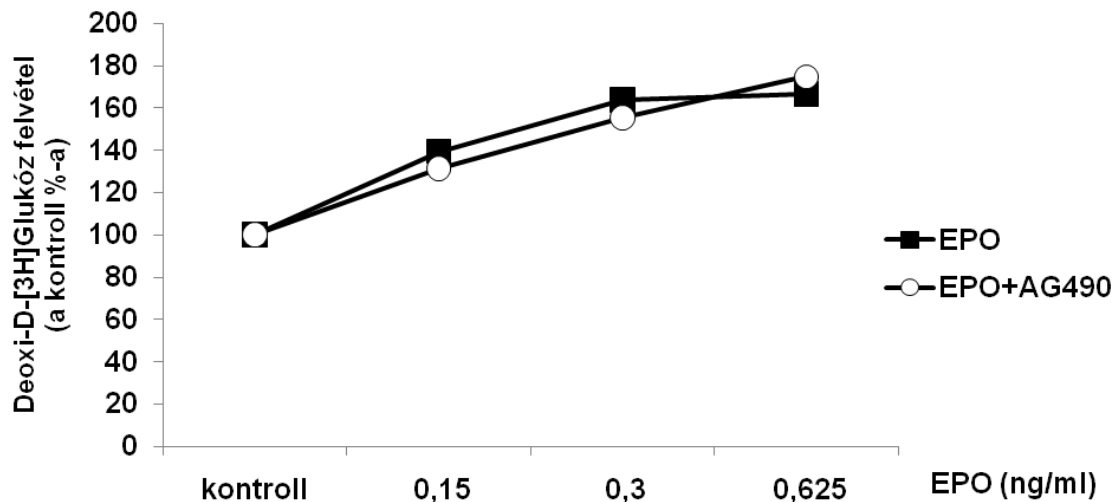
A normál glukózsztint (5 mmol/l) mellett tenyésztett zsírsejtekben szignifikáns deoxi-D-[³H]glukóz felvételt mértünk a kezeletlen kontrollokhöz képest, az összes alkalmazott inzulin-koncentráció esetén (2, 20, 200 vagy 400 nmol/l; $p < 0,05$; 2. ábra, A panel). A magas glukóz (25 mmol/l) jelenlétében tenyésztett sejtek glukózfelvételét az inzulin nem növelte. Ebből arra következtethetünk, hogy a magas glukóz jelenlétében növesztett sejt kultúrákban inzulin-rezisztencia alakult ki (2. ábra, A panel).

Másrészt, a normál glukóz jelenlétében tenyésztett adipocytákban nem volt kimutatható növekedés a deoxi-D-[³H]glukóz felvételben egyik alkalmazott EPO-koncentrációnál sem (0,15; 0,3; 0,625; 1,25 vagy 2,5 ng/ml; 2. ábra B panel). Azonban a magas glukózon növesztett sejtek esetén már 0,15 ng/ml EPO-koncentráció szignifikánsan megnövelte a glukózfelvételt, a kezeletlen kontrollsejtekhez képest ($p < 0,05$). A maximális, mintegy 65%-os glukózfelvétel-növekedést, a 0,625 ng/ml-es EPO-koncentrációnál találtuk (2. ábra, B panel).

A két hormon kombinációjával is végeztünk kezeléseket (2. ábra, C panel) az EPO inzulin-hatásra kifejtett hatásának vizsgálatára, magas (25 mmol/l) glukóz jelenlétében. A zsírsejteket 2, 20, 200 vagy 400 nmol/l inzulinnal EPO nélkül vagy 0,625 ng/ml EPO-val kezeltük 100 percen át. Csupán inzulin-kezelés hatására nem észleltünk szignifikáns glukózfelvételt a kontroll csoporthoz képest, azonban - a 3. ábrán jelzett koncentrációk esetén - a hozzáadott EPO szignifikáns deoxi-D-[³H]glukózfelvételt indukált ($p < 0,05$).

A JAK/STAT útvonal gátlása a szelektív JAK2-inhibitor AG490-nel nem volt hatással a zsírsejtek EPO indukálta glukóz-felvételére (2. ábra, D panel). Tehát az észlelt hatás nem a klasszikus EPO-R aktivált útvonalon keresztül valósul meg.

A**B****C**

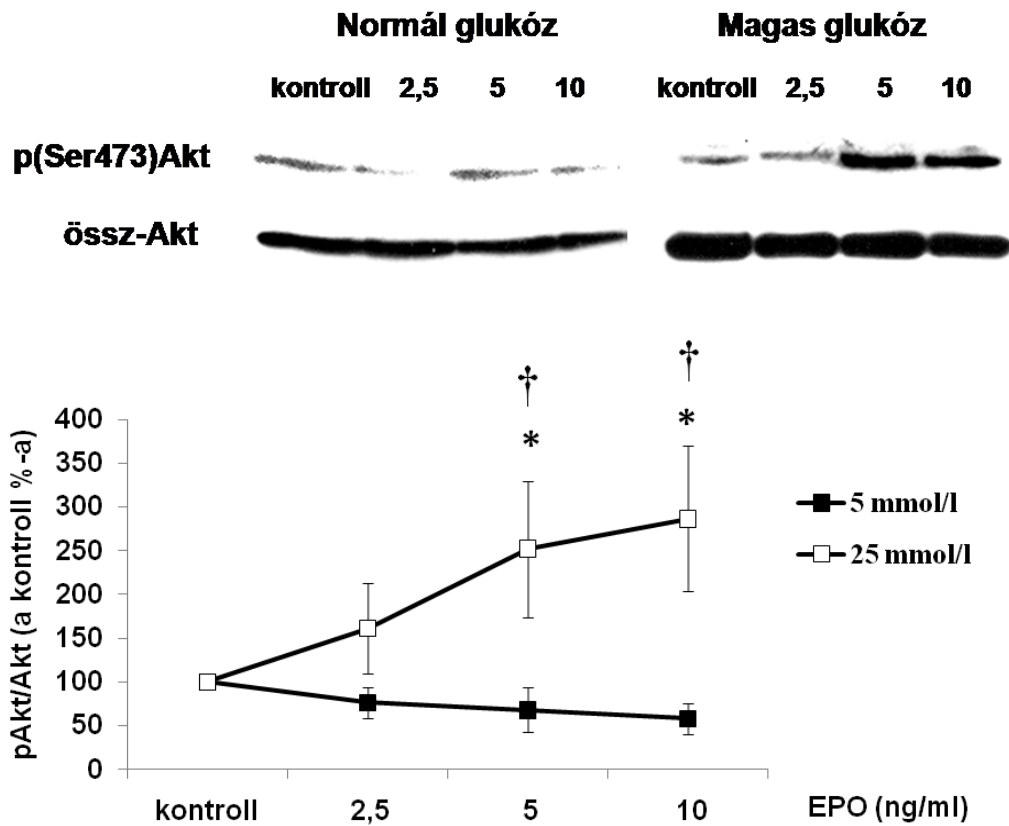
D

2. ábra Az *r-mo-EPO*- és az *inzulinkezelés* hatása a *3T3-L1 adipocyták deoxi-D-³H]glukóz felvételére*. Az izotóp-felvételt normál (5 mmol/l) vagy magas (25 mmol/l) glukózon történő tenyésztést követően [inzulin esetén: n=8 és n=6 (A); *r-mo-EPO* esetén: n=6 and n=5 (B)]. C: Magas glukózon tenyésztett zsírszövetek glukózfelvétele, együttes inzulin és *EPO* (0,625 ng/ml) kezelés hatására, magához az inzulinhoz, valamint a kontrollhoz képest. A kezeletlen, kontroll sejtek glukóz-izotópfelvételét vettük 100%-nak. * p<0,05 vs. kontroll; † p<0,05 5 mmol/l vs. 25 mmol/l ‡ p < 0,05 vs. inzulin. A *JAK2*-gátló *AG490*-kezelés a glukózfelvételekre nem volt hatással (D; n=2).

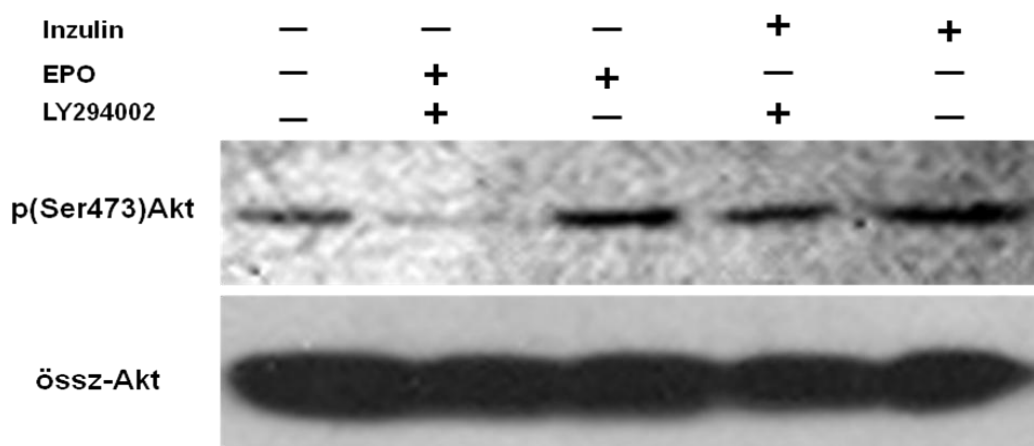
6.1.4. *EPO* függő Akt-és ERK-aktiváció

Normál glukóz-koncentráció (5 mmol/l) mellett tenyésztett sejteken az *EPO*-kezelés nem volt hatással az Akt-aktivációra egyik használt *EPO*-koncentráció mellett sem (3. ábra, A panel). Ezzel szemben magas glukózon tenyésztett zsírszövetek esetén az *EPO*-kezelés hatására jelentős Akt-foszforiláció-indukció következett be (p<0,05; 3. ábra, A panel). Maximális hatást 10 ng/ml-es kezelési koncentráció esetén tapasztaltunk. Magasabb koncentrációk esetén a foszforiláció nem fokozódott tovább, de emelkedett maradt. Bizonyítottuk azt is, hogy a *PI3K*-inhibitor *LY294002* teljesen meggátolta az inzulin és az *EPO* indukált Akt-foszforilációt, ezzel nyilvánvalóvá vált, hogy a talált *EPO* hatás a *PI3K*/Akt útvonalon jön létre (3. ábra, B panel).

A



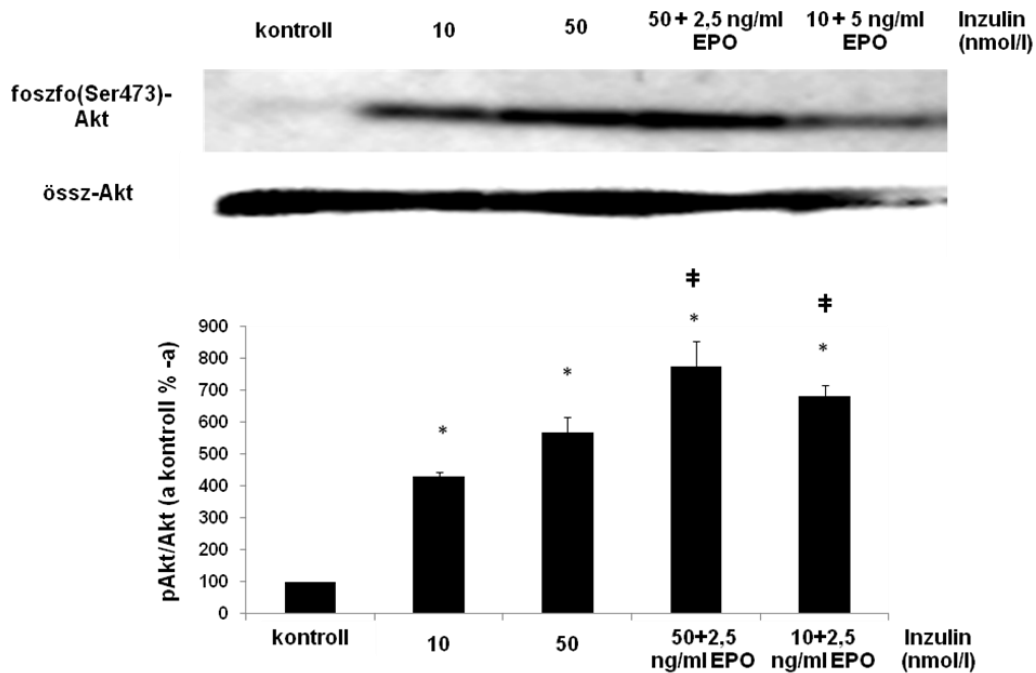
B



3. ábra: Akt-aktiváció vizsgálata 3T3-L1 sejteken Az EPO-kezelés hatása az Akt-foszforilációra (A) normál (5 mmol/l; n=6) és magas (25 mmol/l; n=8) glukózon tenyésztett zsírsejtekben. A pAkt szinteket össz-Akt szintre korigáltuk, az

eredményeket a kezeletlen kontrollsejtek %-ában fejeztük ki. B: A PI3K-inhibitor (LY294002, 30 percig) hatása az EPO (10 ng/ml)- és inzulin (400 nmol/l) – indukálta Akt foszforilációra. *, $p < 0,05$ vs. kontroll; †, $p < 0,05$ 5 mmol/l vs. 25 mmol/l

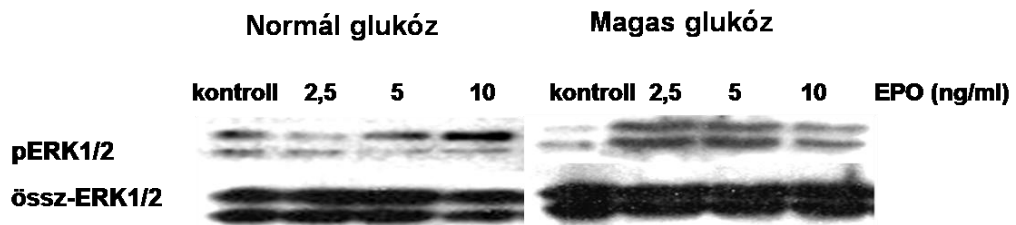
A zsírsejtek együttes inzulin- és EPO-kezelése megnövekedett Akt-aktivációval járt, a csupán inzulinnal történő kezeléshez képest (4. ábra). Ez arra utal, hogy magas glukóz esetén a csökkent inzulin-érzékenység EPO segítségével javítható lehet.



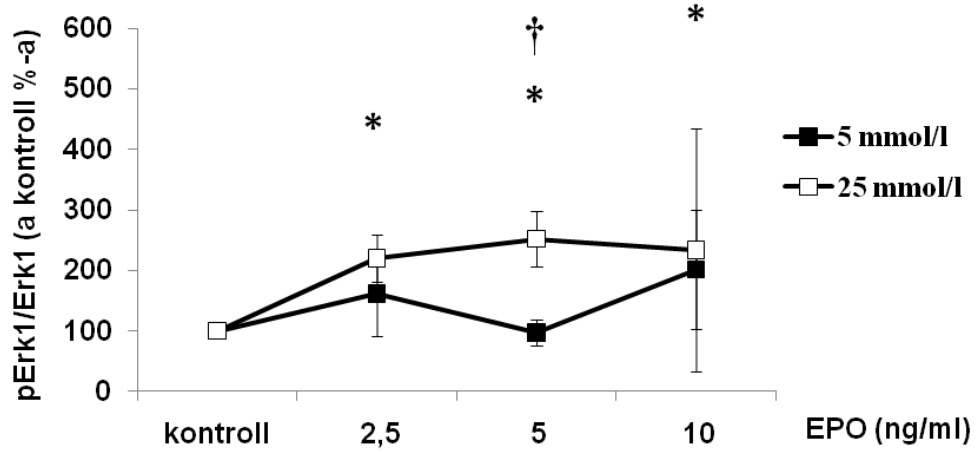
4. ábra Az EPO és az inzulin együttes hatásának vizsgálata 3T3-L1 sejtekben. A detektált Akt foszforiláció 10 vagy 50 nmol/l inzulin vagy inzulin 2,5 vagy 5 ng/ml r-mo-EPO jelenlétében, magas glukózon tenyésztett sejteken. ‡, $p < 0,05$ vs. csak inzulinnal kezelt sejtek

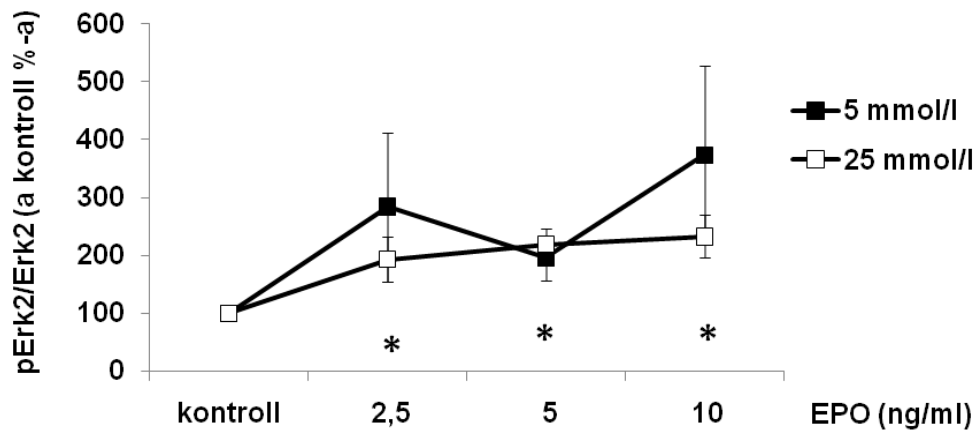
Az ERK1- és ERK2-foszforiláció vizsgálata esetén az EPO kezelés hatástalannak bizonyult normális glukóz-szint mellett, még a magasabb kezelési koncentrációk esetén is (5. ábra). Magas glukóz koncentráció esetén azonban szignifikáns ERK-foszforiláció növekedést találtunk minden koncentráció esetén, a kontroll sejtekhez képest ($p < 0,05$).

A



B

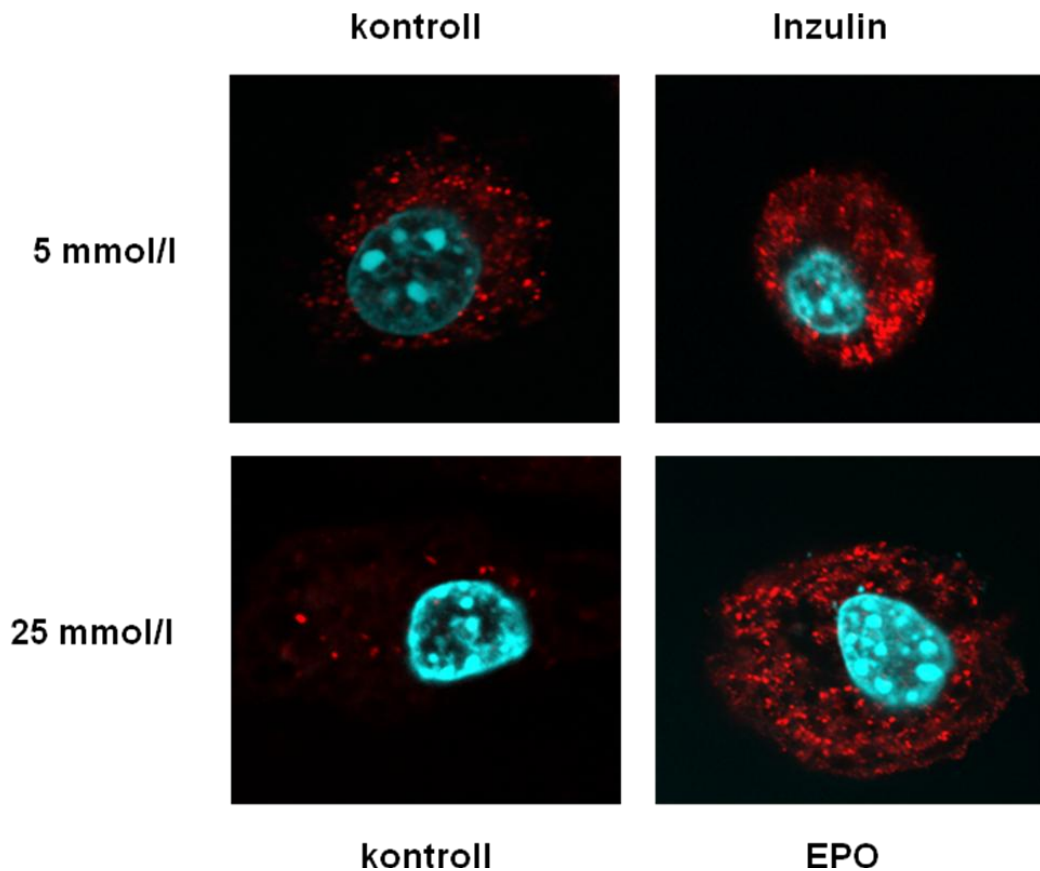


C

5. ábra Az ERK1 és 2-aktiváció vizsgálata 3T3-L1 sejteken. Az EPO-kezelés hatása az ERK-foszforilációra normál (5 mmol/l; n=6) és magas (25 mmol/l; n=8) glukózon tenyésztett zsírsejtekben (A). Az ERK1-és 2-foszforiláció változásai r-mo-EPO hatására normál (5 mmol/l; n=6; fekete négyzettel jelölve) vagy magas glukózon (25 mmol/l; n=8; üres négyzettel jelölve) tenyésztett zsírsejtekben (B, C). Az pERK1- és 2-szinteket össz-ERK1/2-szintre korrigáltuk, az eredményeket a kezeletlen kontrollsejtek %-ában fejeztük ki. (*, $p < 0,05$ vs. kontroll; †, $p < 0,05$ 5 mmol/l vs. 25 mmol/l)

6.1.5. Az EPO fokozza a GLUT4 plazmamembránba történő kihelyeződését

Ismert, hogy a GLUT4 sejtmembránba történő transzlokációja inzulin-dependens és Akt mediált folyamat. Bizonyítottuk, hogy EPO hatására a zsírsejtekben Akt-aktiváció és megnövekedett glukózfelvétel zajlik, ezért immuncytokémiai és Western blot vizsgálatokat végeztünk annak felderítésére, hogy ezen hatások együttjárnak-e a GLUT4 kihelyeződés fokozódásával. Ahogy a 6. ábrán látható, EPO hatására egyértelmű GLUT4 kihelyeződés történt magas glukózon tenyésztett zsírsejtek esetén. Pozitív kontrollként normális glukózon tenyésztett, inzulin-kezelt sejteket használtunk.



6. ábra GLUT4-transzlokáció vizsgálata immuncytokémiával A GLUT4-transzlokáció (vörös fluoreszcencia) 30 perces inzulin (400 nmol/l) vagy r-mo-EPO (40 ng/ml) hatása 3T3-L1 sejtekben, magas (25 mmol/l) vagy normál (5 mmol/l) glukózon tenyésztve, valamint a kezeletlen kontroll sejtekben. A sejtmagokat kék fluoreszcenciával (Hoechst) jelöltük. Mind az EPO-, mind az inzulin-kezelés hatására látványos GLUT4-transzlokáció ment végbe, mely nem figyelhető meg a kontroll sejtekben. A szemléltető képek 3 független kísérlet eredményét mutatják.

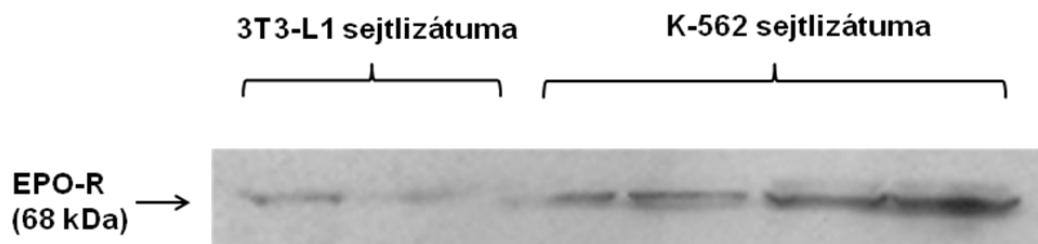
A transzporter kihelyeződést immunoblot vizsgálattal objektivizáltuk. A 7. ábrán látható, hogy EPO hatására – az inzulinhoz hasonlóan – a minták membránfrakciójában határozott jelölődést tapasztaltunk, míg a kezeletlen kontroll mintákban nem volt detektálható GLUT4-jelölődés.



7. ábra. A GLUT4-transzlokáció vizsgálata plazmamembrán frakcionálással A 3T3-L1 sejtek membránjának GLUT4-tartalma kezeletlen zsírsejtekben, EPO-(40 ng/ml) és inzulin-(400 nmol/l) kezelés hatására.

6.1.6. 3T3-L1 adipocytákban EPO-receptor mutatható ki

Eddig nem volt ismert az EPO-R jelenléte adipocyták felszínén, azonban kísérleteink során EPO-R-t sikerült kimutatnunk a 3T3-L1 sejvonalon. Pozitív kontrollként növekvő koncentrációban K-562 sejtizátumot használtunk (8. ábra).

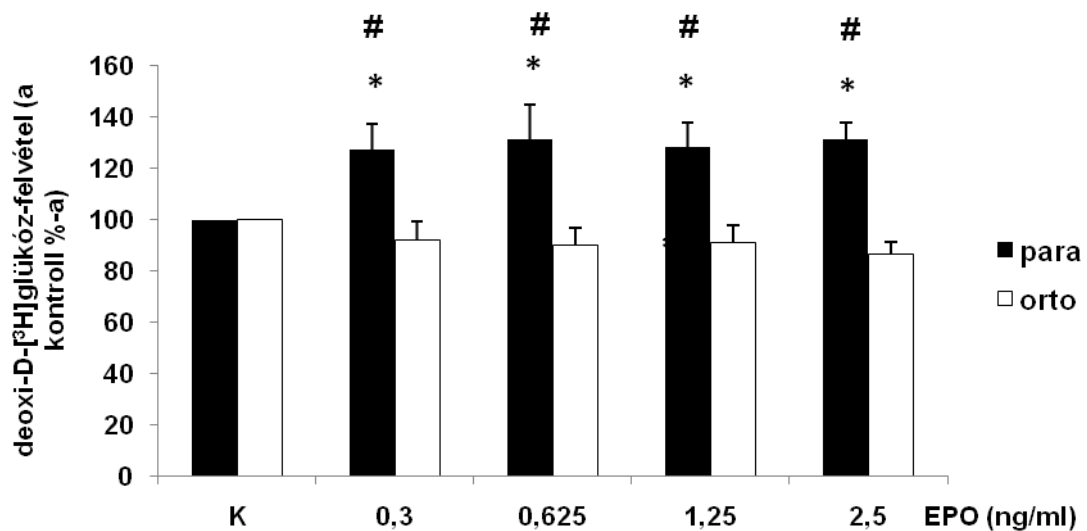


8. ábra. Kezeletlen 3T3-L1 zsírsejtekben EPO-receptor mutatható ki. A teljes sejtizátumokat duplikátumban mutatjuk, pozitív kontrollként K-562 teljes sejtizátumokat használtunk, kétszereződő koncentráció-sorban. Az eredményt 2 független kísérletben erősítettük meg.

6.2. Az EPO-rezisztencia modellezése zsírsejteken

6.2.1. Orto-tirozin hatására csökken az EPO indukált glukózfelvétel

3T3-L1 sejteket orto-tirozin jelenlétében tenyésztve, csökken a sejtek EPO indukált deoxi-D- ^3H glukózfelvétele. Míg a para-tirozinon tenyésztett sejtekben minden vizsgált EPO-koncentrációnál szignifikáns glukózfelvétel-növekedést észleltünk, addig orto-tirozin jelenlétében az EPO-kezelés hatástalan maradt (9. ábra).



9. ábra. Az EPO indukált izotóp-jelzett glukózfelvétel vizsgálata 3T3-L1 sejteken
Az *r-mo*-EPO kezelés hatása a 3T3-L1 adipocyták deoxi-D- ^3H glukóz felvételére, magas (25 mmol/l) glukózon történő tenyésztés során, a médiumhoz hozzáadott 72 mg/l para- vagy orto-tirozin jelenlétében. (*, $p < 0,05$ vs kontroll; #, $p < 0,05$ vs orto-tirozin; $n=6$)

6.3. EPO-rezisztencia in vitro vizsgálata TF-1 sejteken [II.]

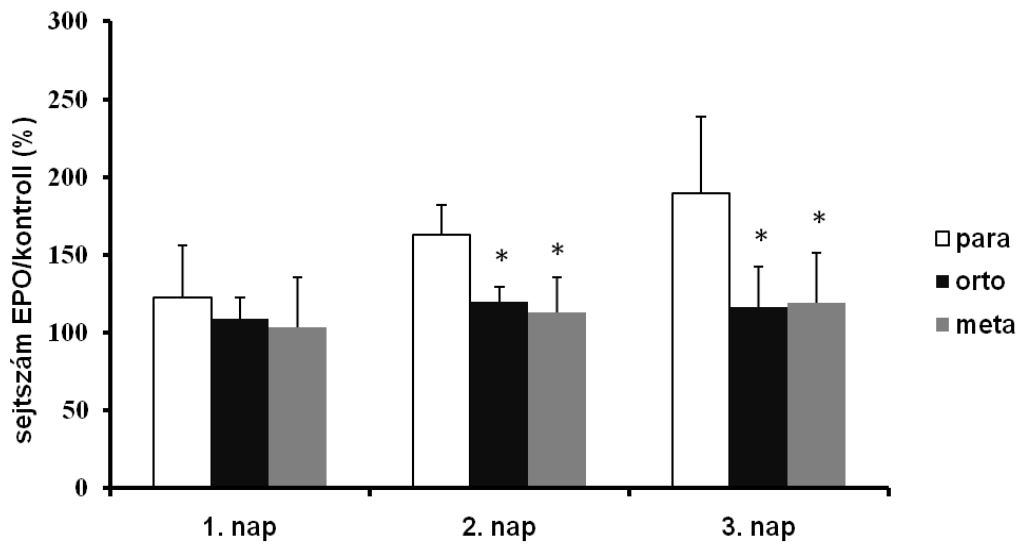
6.3.1. Orto- vagy meta-tirozin jelenlétében csökken az EPO indukált proliferáció

Az EPO proliferatív hatásának vizsgálatára para-, orto- vagy meta-tirozin tartalmú médiumban tenyésztettük a TF-1 erythroblasztokat, EPO jelenlétében vagy hiányában (10. ábra). Eredményeink alapján kimondhatjuk, hogy a para-tirozinon tenyésztett sejtek esetében a sejtszám EPO jelenlétében időfüggő módon nőtt. Orto- vagy meta-tirozin jelenlétében az EPO-ra adott proliferációs válasz szignifikánsan kisebb volt, mint a para-tirozin esetében tapasztalt ($p < 0,05$). A legnagyobb különbséget a tenyésztés 3. napján észleltük (10. ábra, A panel).

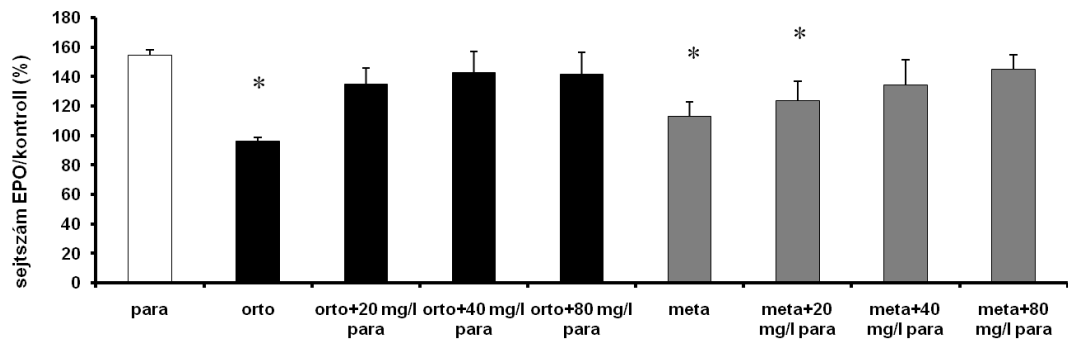
Ezt követően megvizsgáltuk, hogy mekkora az a para-tirozin koncentráció, mely ellensúlyozni tudja az orto- és meta-tirozin-kezelés EPO-rezisztenciát okozó hatását (koncentráció-függés). Az orto-tirozin jelenlétében elmaradt EPO-választ már 40 mg/l-es para-tirozin visszaállította, azonban a meta-tirozin hatásának kivédésére 60 mg/l para-tirozinra volt szükség (10. ábra, B panel).

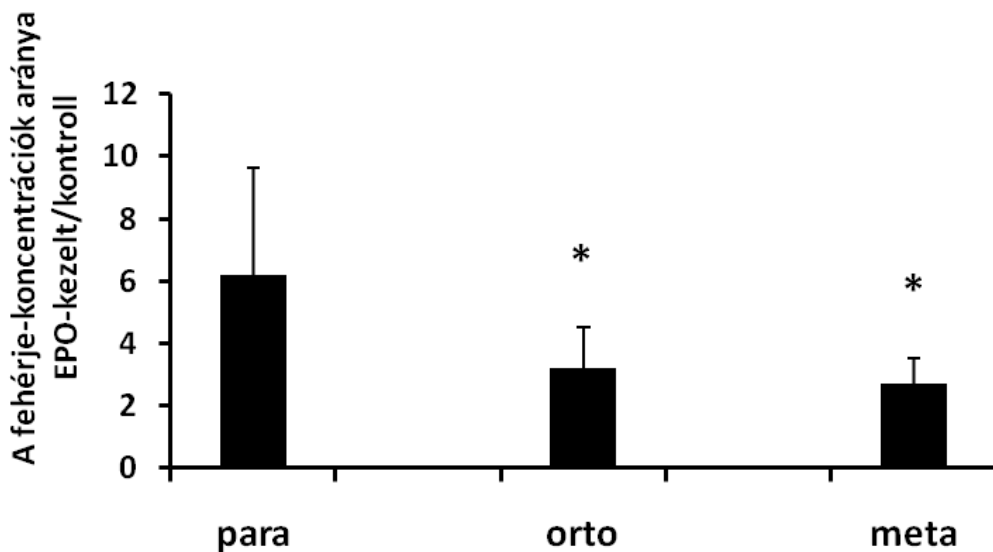
Eredményeink megerősítésére meghatároztuk a sejtlizátumok fehérje-koncentrációját para-, orto- vagy meta-tirozinnal, EPO-val vagy EPO nélkül, 3 napig tenyésztve. Ahogy a 10. ábra C panele mutatja, a meta- vagy orto-tirozinnal kezelt sejtek lizátuma szignifikánsan kevesebb fehérjét tartalmazott, mint a para-tirozinnal kezelt sejteké ($p < 0,05$). A fehérje-koncentráció változását az EPO-kezelt/kezeletlen minták fehérjetartalmának arányával fejeztük ki.

A



B



C

10. ábra. A para-, orto- és meta-tirozin szupplementációjának hatása az erythroblaszt-proliferációra. Az A panel üres oszlopai mutatják a para-, a fekete oszlopok az orto-, a szürke oszlopok a meta-tirozin jelenlétében tenyésztett sejtek EPO függő osztódási ütemét (*, $p < 0,05$ vs. para-tirozinon tenyésztett sejtek; azonos napon; $n=10$). A B panel mutatja a különböző tirozin-módosulatokon tenyésztett sejtek proliferációs aktivitását a 3. napon, valamint a növekvő koncentrációban hozzáadott para-tirozin hatását (*, $p < 0,001$ vs. para-tirozin médium; $n=5$). Az ábra C panele mutatja a kezeletlen és EPO-kezelt, lizált sejt minták fehérje-tartalmának arányát (*, $p < 0,05$ vs. para-tirozinon tenyésztett sejtek; $n=10$).

6.3.2. HPLC-analízis alapján az adott tirozin-módosulat beépül a sejtet alkotó fehérjékbe

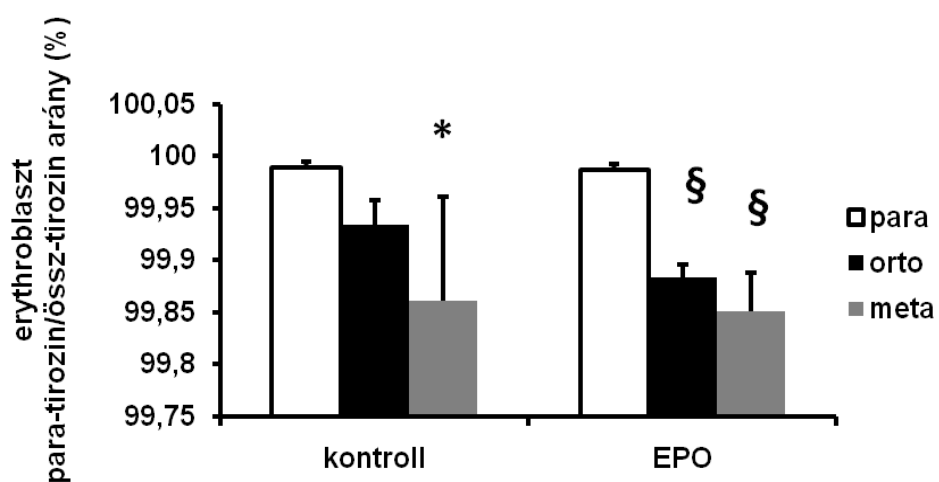
Az erythroblasztok fehérjéhez kötött tirozin tartalmát HPLC-vel határoztuk meg. Az orto-tirozinnal kezelt sejtek para-tirozin tartalma EPO-mentes médiumban nem különbözött a kontroll sejtekben mért para-tirozin mennyiségtől. A meta-tirozinnal kezelt sejtek – EPO-mentes médiumban tenyésztve - kevesebb kötött para-tirozint tartalmaztak, mint a para-tirozinnal kezelték ($p=0,003$; 11. ábra, A panel).

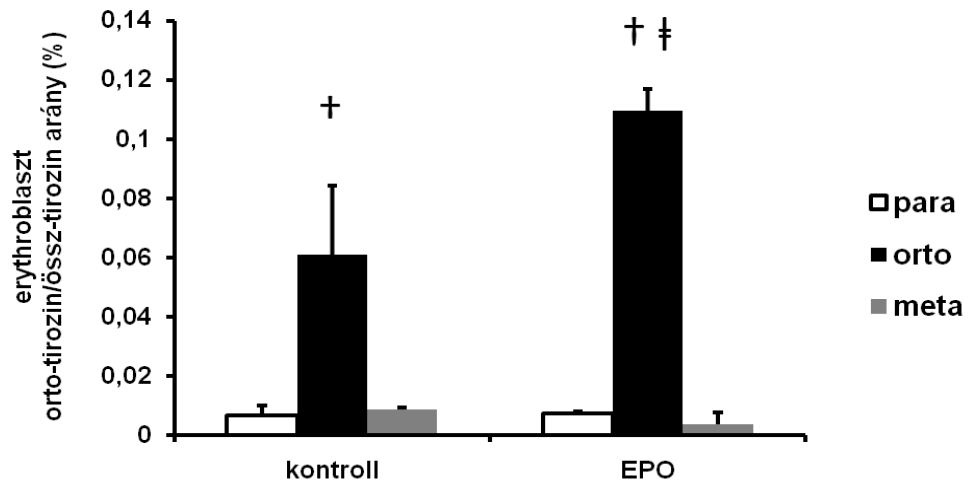
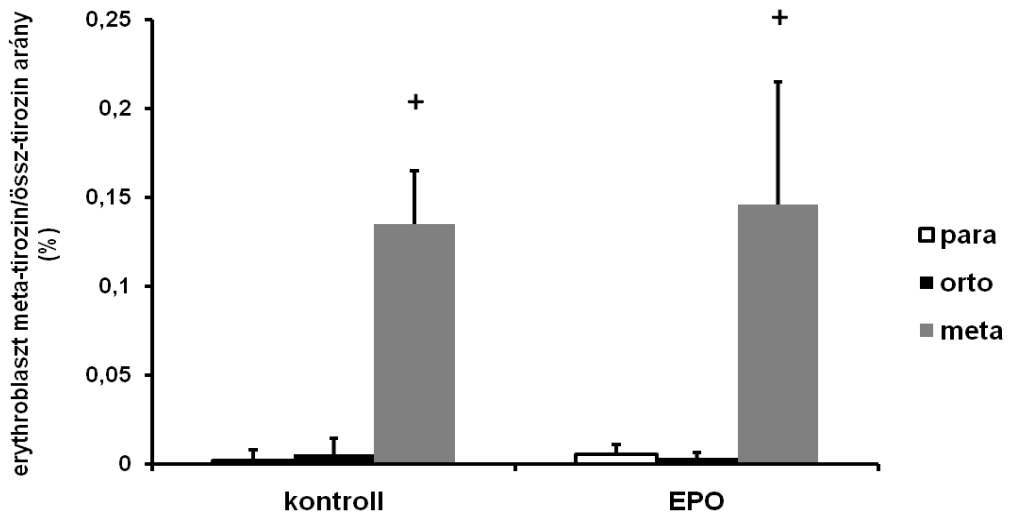
Azok a sejtek, melyeket EPO jelenlétében orto- vagy meta-tirozinnal kezeltünk, kevesebb kötött para-tirozint tartalmaztak, mint a para-tirozinon tenyésztett erythroblasztok ($p < 0,001$, 11. ábra, A panel).

A 11. ábra B paneljén látható, hogy az orto-tirozin a sejtfehérjékbe nagyobb arányban épült be az orto-tirozinnal kezelt, mint a para- vagy meta-tirozinnal kezelt sejtekben. A különbség mind EPO jelenlétében, mind nélküle megtartott volt ($p < 0,001$; 11. ábra, B panel). Továbbá az orto-tirozinnal és EPO-val kezelt sejtek kötött orto-tirozin tartalma nagyobb volt, mint az EPO nélkül tenyésztett sejteké ($p < 0,001$).

A meta-tirozinnal tenyésztett sejtek fehérjéi több meta-tirozint tartalmaztak, mint a para- vagy orto-tirozinnal tenyésztett sejteké mind az EPO jelenlétében, mind az EPO jelenléte nélküli tenyésztés hatására (11. ábra, C panel).

A



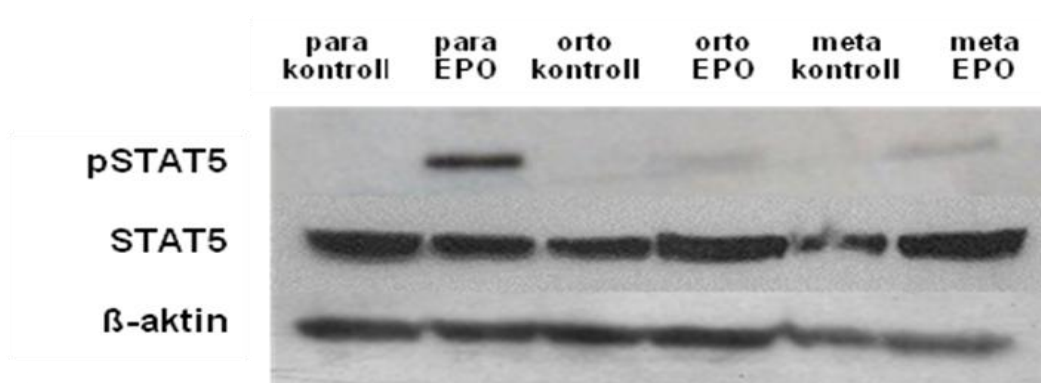
B**C**

11. ábra. A tirozin-izomerek sejtalkotó fehérjékben való megjelenésének vizsgálata. A TF-1 sejtek relatív tirozin-tartalma, para-, orto- vagy meta-tirozin jelenlétében tenyésztve. A panel: para-tirozin/össz-tirozin arány (*, $p=0,003$ vs para-tirozinon tenyésztett sejtek; ‡, $p<0,001$ vs para-tirozinon tenyésztett sejtek); B panel: orto-tirozin/össz-tirozin arány (†, $p<0,001$ vs. para-és meta-tirozinon tenyésztett sejtek; ‡, $p<0,001$ vs. orto-tirozinon tenyésztett kontroll sejtek); C panel: meta-tirozin/össz-tirozin arány (+, $p<0,001$ vs. para- és orto-tirozinon tenyésztett sejtek; $n=10$).

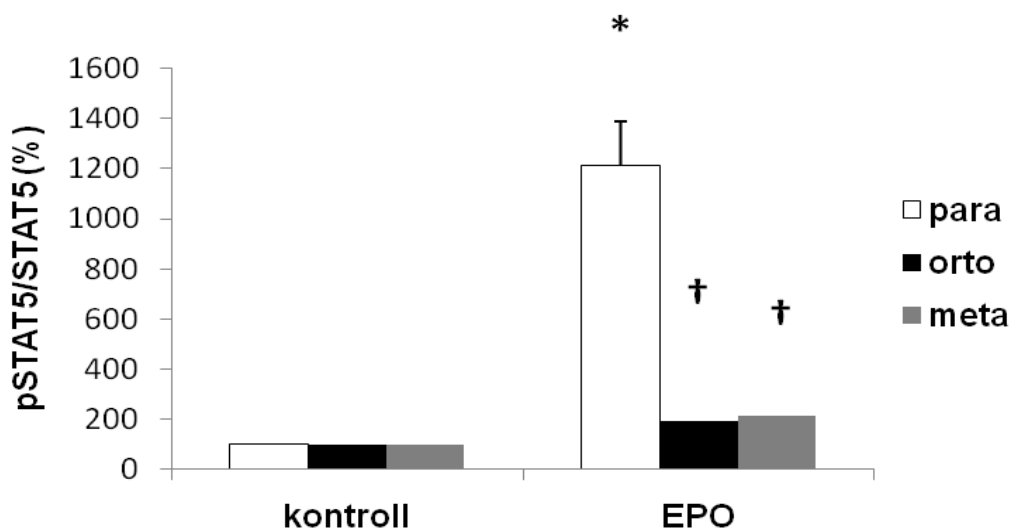
6.3.3. Az orto- vagy meta-tirozin jelenléte csökkent STAT5- és ERK-aktivációt eredményez

Western blot kísérleteink során az EPO indukált STAT5- és ERK1/2-aktivációt vizsgáltuk. Para-tirozinon tenyésztett sejtekben, szignifikáns, több mint tízszeres STAT5-foszforiláció-növekedést tapasztaltunk, melyet a 3 napos orto- és meta-tirozin kezelés gátolt (12. ábra, A és B panel). Látható, hogy orto- és meta-tirozin jelenlétében alig következik be detektálható aktiváció (12. ábra, A panel).

A



B

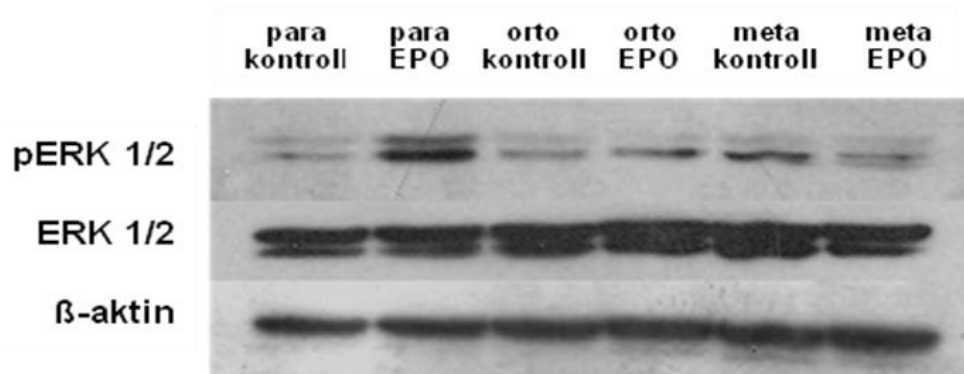


12. ábra : Az orto- és meta-tirozin gátolja az EPO függő STAT5-aktivációt Szemléltető immunoblot (A panel) és a denzitometriás analízis eredménye (B panel) az EPO indukált STAT5 foszforiláció vizsgálatáról (n=3). Az adatokat a kezeletlen kontroll

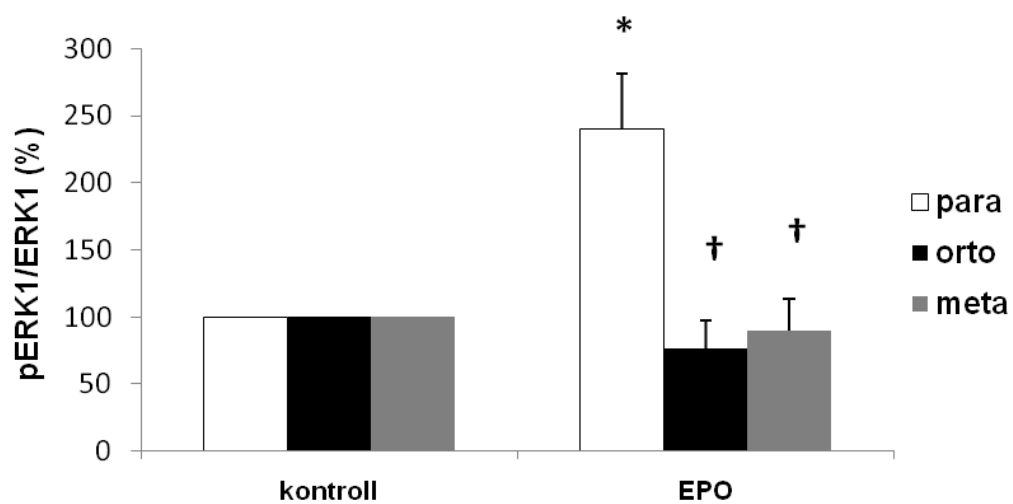
sejtek százalékában mutatjuk, ahol a kontroll 100%. (*, $p < 0,05$; EPO vs. kontroll; †, $p < 0,05$ vs. para EPO)

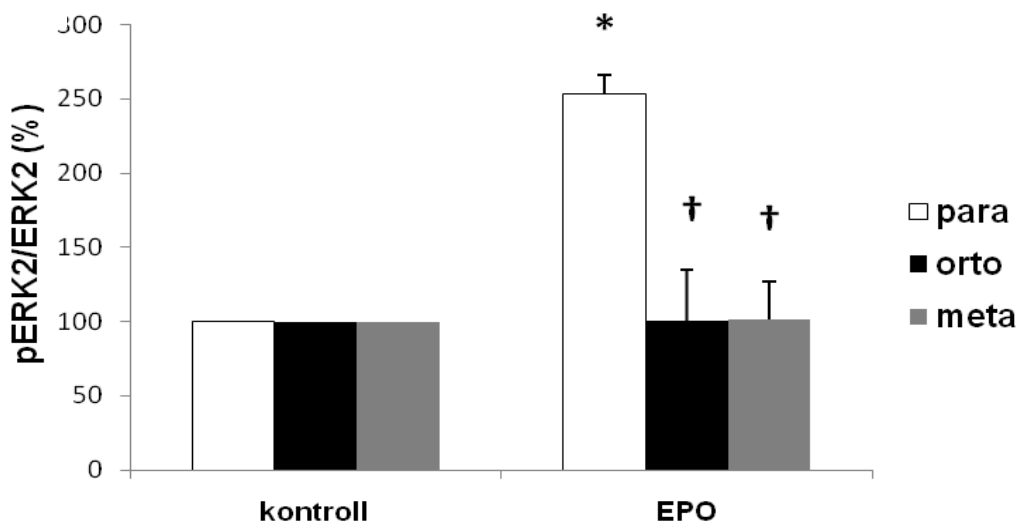
EPO hatására a para-tirozinon tenyésztett, kontroll sejteken szignifikáns ERK1- és 2-foszforyláció-növekedést figyeltünk meg. Azonban orto- és meta-tirozin jelenlétében az aktiváció szignifikánsan kisebb mértékű, tehát az EPO-kezelés hatástalannak bizonyult. Ebből arra következtethetünk, hogy orto- és meta-tirozin hatására a sejtekben EPO-rezisztencia alakul ki (13. ábra).

A



B



C

13. ábra. Az orto- és meta-tirozin gátolja az EPO függő ERK1/2-aktivációt. Szemléltető Western blot (A panel) és a denzitometriás analízis eredménye (B és C panel) az EPO indukált ERK1- és 2-foszforiláció vizsgálatáról. Az adatokat a kezeltetlen kontroll sejtek százalékában mutatjuk, ahol a kontroll 100%. (*, $p < 0,05$; EPO vs kontroll; †, $p < 0,05$ vs. para EPO; $n=4$).

6.3.4. Az orto- és meta-tirozin stabilitásának vizsgálata HPLC-vel

Az RPMI-1640 médium eredetileg 110,4 $\mu\text{mol/l}$ para-tirozint tartalmaz, ami megközelítőleg 20 mg/l-nek felel meg. Kísérleteink során a TF-1 erythroblasztokat 3 napig olyan médiumban tenyésztettük, melyhez még 20 mg/l para-, orto- vagy meta-tirozint adtunk. A kontroll médium szennyezettségének kizárására HPLC-méréseket végeztünk. A kísérlet kiindulási, vagyis 0. napján a para-tirozint tartalmazó médiumban 0,03 $\mu\text{mol/l}$ orto- és meta-tirozin tartalmat mértünk, mely a teljes para-tirozin koncentráció 0,02%-ának felel meg. Ezt követően, naponta végeztünk méréseket. Az 5. táblázatban ábrázoljuk az orto- és meta-tirozin szintek változását a csak para-tirozint tartalmazó médiumban, az egyes napokon. Az adatokat a para-tirozin százalékában fejeztük ki. Nem tapasztaltunk szignifikáns változást az orto- vagy meta-tirozin tartalomban a 3 napos kísérlet során.

5. táblázat: Az RPMI-1640 médium orto- és meta-tirozin tartalma nem változott a 3 napos kísérlet során

	0. nap	1. nap	2. nap	3. nap
orto-tirozin				
a para-tirozin %-a ugyanazon a napon	0,018±0,010	0,015±0,003 ^{NS}	0,014±0,006 ^{NS}	0,023±0,005 ^{NS}
meta-tirozin				
a para-tirozin %-a ugyanazon a napon	0,017±0,003	0,014±0,003 ^{NS}	0,012±0,003 ^{NS}	0,014±0,002 ^{NS}

n=3; párosított t-próba vs. 0. napon mért koncentráció; NS: nem szignifikáns

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. *Az EPO hatása a szénhidrát-anyagcserére [I.]*

Újabban az EPO számos nem-erythroid hatására is fény derült. Munkánk során ezek közül a szénhidrát-anyagcserében betöltött szerepére koncentráltunk. Bár Rigalleau és munkacsoportja két beteg esetén is a szénhidrát-háztartás felborulását észlelték az EPO-terápia bevezetését követően [99], mi állatkísérletben akut vércukorszint-csökkentő hatást tapasztaltunk. Mások a HbA_{1c}-szint jelentős csökkenése ellenére sem találtak EPO hatására különbséget az átlagos vércukorszintekben [100]. Mi ezzel szemben humán megfigyeléseink során határozott glukózsztint-csökkentő hatást láttunk CGMS-sel. Két, Klinikánkon gondozott diabeteses beteg esetén is azt figyeltük meg, hogy az ESA-terápia bevezetését követő 2-4 hónapban a fruktózsztin érték jelentősen csökkent (372-ről 321 és 464-ről 428 $\mu\text{mol/l}$ -re). Ebből arra következtettünk, hogy az EPO-terápia bevezetésével javult a glikémiás státusz.

7.1.1. Az EPO és a testsúly

Eredményeinkből kiindulva arra következtettünk, hogy az EPO kedvező hatással lehet a szénhidrát-anyagcserére. Habár számos tanulmány támasztja alá, hogy az EPO kedvező hatással rendelkezik elhízás és metabolikus szindróma esetén, a pontos mechanizmus eddig ismeretlen. Teng és munkacsoportja bizonyította, hogy az összes nem erythroid szövetben az EPO-R inaktiválása obezitáshoz vezet. Ezen kívül a vad típusú, kontroll egereket magas zsírtartalmú diétán tartva azt találták, hogy EPO-kezelés mellett a súlynövekedés töredéke a nem EPO-kezelt állatokéhoz képest [101]. Wang és munkacsoportja egy évvel cikkünk megjelenését követően – hozzánk hasonlóan – azt találta, hogy a fehér zsírszövet nagy denzitással (a hemopoetikus szövet 60%-ában) expresszálja az EPO-R-t. Ez alapján arra következtettek, hogy az EPO másodlagosan szerepet játszhat az obezitás és a metabolikus zavarok szabályozásában. Kísérleteik során EPO-receptor „knock-out” állatokat használtak és

azt tapasztalták, hogy az EPO-kezelt, kontroll (vad típusú) állatok soványabbak voltak, kevesebbet táplálkoztak, kevesebb zsírszövetet akkumuláltak és fizikailag aktívabbak voltak. Ezzel szemben a receptor deléciója alacsonyabb szöveti oxigénfelhasználáshoz, kisebb fizikai aktivitáshoz vezetett, a táplálékfelvétel megváltozása nélkül. A különbség kontrollált etetés mellett is megmaradt [102]. Az pedig bizonyította, hogy a fehér zsírszövetnek a szervezet energia egyensúlyának fenntartásában központi szerepe van [103]. Ezzel szemben Luk és munkacsoportja kísérletei alapján arra a következtetésre jutott, hogy az EPO-hatás nem feltétlenül szükséges a zsírszövet anyagcseréjének irányításához [104].

7.1.2. Az EPO testsúlytól függetlenül is javítja a cukoranyagcserét

Toba és munkacsoportja patkány vesesejteken végzett kísérletei során azt figyelte meg, hogy a streptozotocin okozta csökkent pAkt és eNOS szintet a rh-EPO kezelés visszaállította [105]. Bár Nakao és mtsai az EPO-kezelés hatására bekövetkező HbA_{1c}-csökkenést a fiatal vörösvértetek számának emelkedésével magyarázzák [106], rendelkezésünkre áll olyan megfigyelés is, mely szerint EPO hatására közvetlen vércukorszint-csökkenés következett be. Katz és munkacsoportja mind a folyamatosan EPO-t termelő tg6, mind a rh-EPO-val kezelt egerekben alacsonyabb vércukorszinteket talált, mint a kontroll állatokban. Eredményeiket orális glukóz tolerancia teszttel is megerősítették. Inzulin tolerancia teszt során a magasabb EPO-szinttel rendelkező állatok érzékenyebbek voltak inzulinra, mint a kontroll állatok [107].

Foskett és munkacsoportja *in vivo* vizsgálta az EPO szénhidrát-anyagcserére kifejtett hatását. Kísérleteik során 150-1000 U/kg dózisú EPO-készítményt használtak. Azt találták, hogy az EPO már a legkisebb dózisban is csökkentette a testtömeg növekedését, míg a 300 U/kg feletti dózissal glukóz-tolerancia javulás is megfigyelhető volt [108]. Ezzel szemben egy, a közelmúltban publikált, állatkísérletes tanulmány során, a szénhidrát-háztartás javulását figyelték meg EPO hatására, a testtömeg vagy zsírszövet-mennyiség változása nélkül is. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a mechanizmus túlmutat az EPO zsírszövet-növekedésének regulációján

is. Ezen kívül kedvező hatást írtak le az elhízáshoz kötött szubklinikus gyulladás esetében is, közvetlenül a makrofág-migráció befolyásolásán keresztül [109].

7.1.3. Az EPO-receptor jelen van a zsírsejtek felszínén

Yu Pan és munkacsoportja EPO hatására – a vizsgálatunkat követő évben – az inzulin-rezisztencia csökkenését, a glukózfelvétel fokozódását találta zsírsejtekben. Ők az Akt, valamint a STAT5 jelátviteli kaszkád aktivációját feltételezték a háttérben. Hozzánk hasonlóan EPO-R jelenlétét bizonyították a 3T3-L1 sejtek felszínén [110]. Ezzel szemben mi specifikus JAK2 gátló jelenlétében az izotóp-felvételi vizsgálatot elvégezve azt láttuk, hogy a zsírsejtek EPO indukált glukóz-izotóp felvétele megtartott maradt (2. ábra, D panel). Ezzel bizonyítottuk, hogy az EPO metabolikus hatása nem a JAK/STAT útvonalon érvényesül. Immunoblot vizsgálataink során azonban az Akt-foszforilációt a PI3K-gátló LY294002 segítségével sikeresen ki tudtuk védeni (3. ábra, B panel).

7.1.4. Az EPO anyagcsere-hatása dializáltakban

Számos klinikai tanulmány foglalkozik a rh-EPO metabolikus hatásaival hemodializált betegekben is. Tuzcu és munkacsoportja végstádiumú vesebetegekben EPO-kezelés mellett alacsonyabb HOMA-indexet talált, mint a nem EPO-kezelt egyéneknél, mely az inzulin-érzékenység javulására utal [111]. Eredményeink egybevágóak azzal, amit Rasic-Milutinovic és munkacsoportja talált, miszerint nem diabeteses, krónikusan hemodializált betegek esetén, 6 hónapos EPO-kezelés hatására javult az inzulin-érzékenység [112]. Mak dializált betegekben, EPO hatására, szintén az inzulin-érzékenység javulását tapasztalta, melyet ő közvetlenül az anaemia-korrekciónak következményének tartott [113]. Tekintve, hogy a krónikus vesebetegek esetén fellépő renális anaemia kezelésére EPO-terápia szükséges, ebben a betegcsoportban jelentősége van a járulékos hatások – így a szénhidrát-anyagcserére kifejtett hatás – megismerésének is.

A miénket támogató tanulmányok mellett, a mi következtetéseinkkel ellentétes eredmények is születtek. Allegra hemodializált betegeken intravénás glukóz-tolerancia tesztet hajtott végre az EPO beadása előtt, majd 16-20 órával utána. Rövid távon nem tapasztalt a szénhidrát-anyagcserében semmilyen változást [58]. Ezzel szemben, mi állatkísérleteink során már az EPO injekciót követő 5 percben glukóz-szint csökkenést láttunk (4. táblázat).

7.1.5. Az EPO anyagcsere-hatásában szerepet játszik a GLUT4 transzlokációja

Tudjuk, hogy az inzulinnak zsírszövetben a glukózfelvételre gyakorolt hatása a GLUT4-nek az intracelluláris kompartmentből a plazmamembránba történő transzlokációja útján következik be. A vércukorszintet pedig nagymértékben befolyásolja a szövetek perifériás glukóz-felhasználása. Inzulin-rezisztencia esetén csökken a GLUT4 plazmamembránba történő intracelluláris szállítódása. Mind a β -sejt károsodás, mind az inzulin-rezisztencia a szervezetben a betegség manifesztációját megelőzően már jelen van. Az izomszövet szénhidrát-anyagcseréjéről tudjuk, hogy 2-es típusú diabetesben szenvedő betegekben a receptor szubsztrátja, az IRS-1 tirozinszulfonilációja csökken, mely megközelítőleg 50%-os PI3K aktivitással jár [114]. A hosszútávú és nagymértékű hyperglükémia *in vitro* csökkent IRS-1 aktivitással jár [115]. Krook és munkacsoportja bizonyította, hogy hyperglükémiában az Akt foszforilációja is csökkenést mutat [116]. Az IRS-2 molekula szerepe hasonló: a gén kiütése inzulinrezisztenciát és β -sejt elégtelenséget is okoz [117]. Zsírszövetben az IRS-1, valamint a GLUT4 expressziója csökkent, mind 2-es típusú diabetes, mind a nagy százalékban pozitív családi anamnézisű egészségesek esetén. Az intracelluláris jelátvitel szintén csökkent ezekben a csoportokban. Cayla és munkacsoportja kísérletei alapján, nagy dózisú EPO-kezelés hatására olyan anyagcsere-változások mennek végbe a patkány simaizomban, melyek GLUT4 transzlokációhoz köthetők [118].

Az izotópos mérések eredményeiből kiindulva mi is azt feltételeztük, hogy a patkányokban tapasztalt vércukorszint-csökkenés GLUT4-transzlokációhoz köthető. Ennek alátámasztására immuncytokémiai kísérleteket végeztünk, melyeket plazmamembrán-frakcionálással erősítettünk meg. Bizonyítottuk, hogy EPO hatására –

az inzulin hatásához hasonlóan – nőtt a membrán frakció GLUT4 tartalma, tehát transzporter kihelyeződés történt.

7.1.6. Az EPO csak hyperglikémiában hat a cukoranyagcserére

Tekintve, hogy az EPO-kezelés csak magas glukóz mellett volt hatásos, arra következtetünk, hogy az EPO glukózcsökkentő hatása leginkább hyperglikémia esetén érvényesül. Hasonló eredményre jutott Hojman és munkacsoportja, akik EPO hatására, magas zsírtartalmú diétán tartott patkányokkal végzett kísérleteik során, inzulin-érzékenység javulást értek el [57]. Az EPO-hatásának leginkább metabolikus szindrómában lehet jelentősége. Ismert, hogy az EPO jelátviteli mechanizmusában fontos szerepet kap az IRS-2 aktivációja. Burén és munkacsoportja a zsírsejteket 25 és 5 mmol/l glukózt tartalmazó médiumban tenyésztette. Eredményeik alapján hyperglikémiában az IRS-1 mennyisége csaknem feleződött, míg az IRS-2 mennyisége jelentősen nőtt [119]. Rondidone vizsgálataiban a diabeteses betegekből származó adipocitákban az IRS-1 szintje csökken, az IRS-2 szintje viszont nő [120]. Mindezek magyarázattal szolgálhatnak arra, hogy kísérleteink során az EPO-kezelés csak magas glukóz mellett volt hatásos. Western blottal végzett kísérleteinkben normál glukózon tartott sejtekben nem volt mérhető ERK- vagy Akt-aktiváció, míg magas glukóz mellett jelentős mértékű foszforiláció-növekedést tapasztaltunk. Ennek megfelelően a 25 mmol/l-es glukózon tenyésztett sejtek izotóp-jelzett glukózfelvétele EPO hatására nőtt, míg az 5 mmol/l-en tenyésztett sejtekben nem volt hatás. Tehát kísérleteink arra utalnak, hogy a vénásan adott EPO akutan csökkenti a vércukorszintet. *In vivo* kísérleteink során – *in vitro* eredményeinkkel összhangban - nem észleltünk hypoglikémiát.

7.1.7. Az EPO mitogén hatása nem nő hyperglikémiában

Ismert, hogy az inzulin szénhidrátanyagcsere-hatásai főleg az Akt, míg a proliferatív hatások leginkább az ERK útvonalon keresztül érvényesülnek. Inzulin-rezisztencia esetén a metabolikus útvonal válasza csökkent, míg a proliferatív útvonal

megtartott marad [121]. Ez a jelenség hyperinzulinémiában fokozott proliferatív aktivitáshoz vezet. Feltételezzük, hogy az EPO is hasonló módon fejtheti ki a hatását, így Western blot vizsgálataink alapján kiszámoltuk az Akt és ERK foszforiláció arányát (pAkt/Akt/pERK/ERK). Az arány nem mutatott eltérést az EPO-kezelés hatására, tehát a mitogén aktivitás nem emelkedett a metabolikus hatáshoz képest. Ezzel szemben, az inzulin esetén, a normál glukózon tenyésztett sejtekben az arány jelentősen magasabb volt a magas glukózon tenyésztett sejtekhez képest. Ez alátámasztja a korábban is tárgyalt jelenséget, miszerint inzulinrezisztencia esetén elsősorban a PI3K/Akt útvonal érintett, míg a MAPK/ERK-útvonal jelátvittele sokkal inkább megtartott marad [65].

In vivo kísérleteink bizonyították, hogy az intravénásan adott, nagy dózisu EPO hatására nem következett be hypoglikémia. Ez a megfigyelés, valamint a tény, hogy az EPO *in vitro* hatásosabb volt a magas glukózon tenyésztett sejteken, azt támasztják alá, hogy az EPO olyan hatású szer lehet, mely nem okoz hypoglikémiát. Mivel a diabeteses betegek jelentős része részesül ESA-kezelésben, a citokin metabolikus hatásait kutató tanulmányok nyilvánvaló klinikai jelentőségre tehetnek szert. Ígéretes kutatási irány lehet ez egy olyan EPO-variáns kifejlesztése, amely alacsony proliferatív hatás mellett rendelkezik a glukózcsökkentő tulajdonsággal.

7.2. Az EPO-rezisztencia mechanizmusai és az oxidatív stressz lehetséges szerepe [II.]

7.2.1. Az EPO-rezisztencia

Nagy érdeklődésre tart számot a nephrológiai szakirodalomban az EPO-rezisztencia és annak lehetséges etiológiája. Klasszikus okokként, többek között, a krónikus vérvesztés, a vashiány, a hemolízis, valamint a krónikus gyulladás szerepel. A számos ismert pathomechanizmus ellenére az EPO-rezisztencia kezelése nem megoldott probléma. Terápiás próbálkozások történnek sztatinokkal, L-karnitin-pótlással, pentoxifillinnel, valamint többek között a vas-felszívódást javító C-vitaminnal

is. Érdekes tény, hogy az antioxidáns hatású E-vitamin is effektívnek bizonyult az EPO-rezisztencia kezelésében [122]. Ebből kiindulva lehetségesnek tűnik, ahogy számos más betegségben is, az oxidatív stressz kóroki szerepe. [123].

Mivel az EPO-kezelést kiterjedten használják a renális anaemia kezelésére, a csökkent válaszkészség komoly probléma. A Baltimore Longitudinal Study on Aging során egészséges, nem anaemiás egyéneket vizsgáltak. Azt találták, hogy az EPO-szint változatlan hemoglobinszint mellett az életkorral nő [124]. Vanasse és Berliner lehetséges magyarázatoként a rövidebb vörösvértest élettartamot nevezi meg [125]. Másrészt, Dai és munkacsoportja felvetette, hogy az öregedés a mitokondriális elektron-transzportlánc elektron-csorgásán keresztül megnőtt ROS-termeléshez vezet [126]. Eredményeik – hasonlóan a mieinkhez – támogatják azt az elméletet, miszerint a korral növekvő ROS-termelés szerepet játszhat az EPO-érzékenység csökkenésében. Emellett, McCullough és munkacsoportja azt találták, hogy a növekvő ESA-dózissal együtt nő a betegek kardiovaszkuláris kockázata, az elért hemoglobinszinttől függetlenül [127]. Solomon és kutatócsoportja által kivitelezett vizsgálat szerint a kezelés első 4 hetében ESA hatására tapasztalt gyenge hemoglobin válasz nagyobb kardiovaszkuláris kockázattal és halálózással járt. Cikkükben felvetik az ESA-ra adott hemoglobin válasz kórjelző értékét [128]. Bár a magasabb EPO-dózis több nem kívánt mellékhatás kialakulását is eredményezi, feltételezzük, hogy ez egy epifenomén, tehát a kardiovaszkuláris események megnövekedett száma nem a magasabb EPO-dózis, hanem a mögötte álló kórélettani folyamat, az orto- és meta-tirozin sejtalkotó fehérjékbe történő beépülésének eredménye. Ez hasonló ahhoz a tényhez, hogy a halálózás nem az inzulin-dózissal, hanem magával az inzulin-rezisztenciával függ össze [129].

Vizsgálataink során megváltozott a szemléletünk a csökkent EPO-válaszkészség okait illetően. Úgy gondoljuk, hogy a különböző hiányállapotokban, gyógyszerhatások esetén és társbetegségekben az EPO csökkent hatékonysága nem igazi EPO-rezisztencia. EPO-rezisztencia alatt véleményünk szerint a jelátviteli károsodások értendők. Ennek egyik okára kíséreltünk meg jelen munka során fényt deríteni.

7.2.2. A diabetes mellitus és az EPO-rezisztencia kapcsolata

Cukorbetegekben megfigyelhető egy korai – a vesebetegség kialakulását megelőző – anaemia, melynek elsődleges okaként az EPO-hiány feltételezhető. A jelenséget többnyire súlyos neuropathia esetén írták le [130][131]. Úgy tartjuk, hogy az EPO termelésének szabályozásában a vese beidegzésének jelentős szerepe van, mivel állatmodellben a vese denervációja az EPO hypoxia indukált termelésének elmaradásával jár [132]. Autonóm neuropathia esetén humán betegekben is hasonló jelenség figyelhető meg, habár a vizsgált betegek DNP-ben is szenvedtek. Tekintve, hogy a DNP nem csak a glomerulusokat, hanem az intersticiumot is érinti, lehetséges, hogy az EPO-hiányos állapot egyszerűen az EPO-termelő fibroblasztok pusztulásának következményeként alakul ki [133].

Ezzel szemben Bosman és munkacsoportja megtartott vesefunkciójú, 1-es típusú diabeteses betegeket vizsgálva, számos esetben talált mással nem magyarázható normocyter normokróm anaemiát [134]. Feltételezéseink szerint a normális vesefunkció mellett diabetesben fellépő normocyter, normochrom anaemia hátterében EPO-rezisztencia állhat.

Akárhogyan is, a korai – részben neuropathiához köthető – vérszegénységben szenvedő diabeteses betegek esetén, valamint az egyre gyakoribb DNP esetén is, ESA-kezelésre kényszerülünk.

7.2.3. A β -sejtek lehetséges jelentősége

Az EPO-kezelt cukorbeteg nagy számát figyelembe véve, az EPO-kezelés szénhidrát-anyagcserére kifejtett hatása fontos kérdés. Igaz, hogy az 1-es és 2-es típusú diabetes pathomechanizmusa alapvetően különbözik, közös kórokként szerepel mindkettőben – igaz döntően más betegségszakaszban – a β -sejtek pusztulása. Habár mi munkánk során nem az inzulin-termelés, hanem közvetlenül a célsejthatás változását vizsgáltuk, a cukorbeteg szénhidrát-háztartása más módon is érintett lehet. Ahogy pedig korábban is tárgyaltuk, EPO-R számos nem erythroid szövet sejtjeinek felszínén megtalálható, így jelen van a pancreas β -sejtjein is [47]. Továbbá

azt is bizonyították, hogy az EPO szisztémás túlexpressziója megelőzi a citokin-indukált sejthalált a szigetsejtekben [135]. Tény az is, hogy az EPO receptora az I. típusú citokin receptorcsaládhoz tartozik és hatása a növekedési hormonhoz és a prolaktinhoz hasonló jelátviteli utakon megy végbe. A két utóbbi hormon receptorának deléciója β -sejt-hiányhoz és funkciózavarhoz vezet [136][137]. Choi és kollégái bizonyították azt is, hogy a rh-EPO direkt biológiai hatással, saját receptoron keresztül, JAK2 függő módon segíti elő a β -sejtek túlélését [138].

7.2.4. A szabadgyökök hatása az EPO szintézisére és az erythropoezisre

A kezdeti álláspont, miszerint a szabad gyökök élő szervezetben betöltött szerepe feltétlenül káros lenne, hibásnak bizonyult. Felismerésre került, hogy a szervezetben keletkező szabad gyökök hasznosak is lehetnek, az immunvédekezés területén, valamint intracelluláris hírvivőként többek között a vaszkuláris rendszer szabályozása és a trombocytá aggregáció területén. Egyre több bizonyítékunk van arra vonatkozóan is, hogy a szabad gyökök szerepet játszhatnak a tumor elleni védekezésben is [139] [95].

A ROS-nak fontos szerepe van az EPO-termelődés szabályozásában is. A hypoxiának kitett sejtek – a HIF-1 aktivációján keresztül – olyan transzkripciós válaszokkal reagálnak, mint az erythropoezis vagy az angiogenezis [140]. Korábban ismertettük, hogy oxigén jelenlétében a HIF-1 α degradációja következik be, ezzel szemben hypoxiában a degradáció gátlódik. A ROS szerepe ebben a folyamatban ellentmondásos.

A hypoxiás sejtek növelik a mitokondriális ROS-termelést, mely oxidatív stresszhez vezet. Ennek oka a mitokondriális redox potenciál csökkenése miatti ROS-felszabadulás az elektrontranszport-láncból, a citokróm III szintjén [141]. Emellett, hypoxiás körülmények között, ROS-felszabadulás történik a xantin-oxidáz [142], valamint a NADPH-oxidáz útján is [143].

Másrésről a ROS fontos szerepet játszik a HIF-1 α működését befolyásoló folyamatok irányításában. Amíg súlyos hypoxiában vagy anoxiában a HIF-1 α

degradációja gátolt, úgy tűnik, hogy enyhe hypoxiában a ROS jelenléte is szükséges a HIF-1 α stabilizálásához [144]. Habár a ROS-t, mint oxigén-szenzort azonosították a HIF-1 α stabilizálásának mechanizmusában *in vitro* kísérletek során [145], a ROS-termelődés pontos kinetikája és szerepe az EPO-termelődés szabályozásában ismeretlen.

Az oxidatív stressz erythropoezisre kifejtett egyik lehetséges mechanizmusát munkacsoportunk egy korábbi vizsgálata tárgyalta. A fentiek szerint, a hidroxil szabadgyök-fogó acetyl-szalicilsav (ASA), a HIF-1 alfa degradáció gátlásán keresztül, az EPO-transzkripció aktivitását növelheti. Ezt alátámasztja, hogy egyszeri, nagy dózisú ASA beadását követően a betegekben magasabb EPO-szintet mértek. A szabad gyökök szerepe azonban nem merül ki az EPO-szintet befolyásoló tényezőkben. Másik lehetséges mechanizmusként az EPO által regulált neocytolysis gátlását vetik fel [146]. A neocytolysis a keringésben jelen lévő legéretlenebb erythrocyták szabályozott pusztulását jelenti. Jelentősége van a polycythaemiás újszülöttek születést követő adaptációjában [147], nagy magasságból való visszatérést követően [148], valamint a renális anaemia kialakulásában is [149].

7.2.5. Az oxidatív stressz markerei

Az oxidatív stressz számos megbetegedésben kulcsszerepet játszik. Ilyen a DNP, az atherosclerosis vagy az ischaemiás szívbetegség is [150]–[152]. Az oxidatív állapot jellemzésére rendelkezésünkre állnak ún. biomarkerek, melyeknek szintje utal a károsodás mértékére. Az oxidatív stressz biomarkereinek tekinthetők egyrészt azok az molekulák, melyeket a ROS-sal való interakció valamilyen módon szerkezetileg módosít. Másrészt markerként szerepelhetnek az antioxidáns rendszer tagjai is, melyek a megnőtt oxidatív stressz következtében szerkezetben vagy mennyiségben módosulnak. A fokozott ROS-termelés ismert módon lipid-peroxidációhoz, protein- és aminosav-oxidációhoz és DNS degradációhoz vezet [153].

A lipidek közül, említést érdemelnek az izoprosztánok, valamint a malondialdehid. Az izoprosztánok az arachidonsav peroxidációjával jönnek létre, mely a prosztaglandin-szintézist katalizáló ciklooxygenáz enzimtől függetlenül megy végbe [154]. Szöveti és plazmaszintjük egyaránt meghatározható, vizeletből koncentrációjuk

szintén mérhető. Szintjüket a vese- vagy májfunkció nem befolyásolja [155]. A malondialdehid többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációjával jön létre, önmagában és más fehérjékkel való kölcsönhatása révén is atherogén vegyület. Plazmából jó effektivitással határozható meg kolorimetriás módszerrel.

Ahogy korábban is említettük, a fokozott ROS-aminosav kölcsönhatás következtében az aminosavak oxo-, hidroxil-, kloro- és nitro-derivátumai jönnek létre. Az elágazó láncú aminosavak (leucin, valin, izoleucin) fontos szerepet játszanak a hasnyálmirigy β -sejtek inzulin-szekréciójának szabályozásában. Ezen kívül hatással vannak a szénhidrát anyagcserére is [156][157]. Marchesini és munkacsoportja elhízás esetén magasabb oxidált leucin szintet talált, mint normál testalkat esetén [158]. Holecek és munkacsoportja fokozott proteolízist, magasabb oxidált leucinszintet talált 5/6-od nephrectomizált patkányokban [159].

Munkánk szempontjából a fenilalanin módosulatai érdemelnek külön említést. A fehérje- vagy aminosav-természetű biomarkerek körül széles körben használt a tirozin reaktív nitrogénszármazék (pl: peroxinitrit) általi módosulata, a nitrotirozin. A szabad nitrotirozin mennyisége tömegspektrometriával kombinált HPLC módszerrel mérhető és össz-tirozinra korrigálva fejezhető ki [160]. Ha a szarkoplazmatikus retikulumban a Ca-ATPáz enzim [161], a szuperoxid dizmutáz, a prosztaciklin-szintáz [162] vagy a tirozin-hidroxiláz enzim [163] nitrotirozin módosulása jön létre, az a normális funkció elvesztésével járhat. Ezzel szemben a fibrinogén esetén növekedett aktivitás, tehát fokozott rögzépződés figyelhető meg [164].

A nitrotirozin mellett az orto- és meta-tirozin és a tirozin oxidált formák (pl. dihidroxifenilalanin, DOPA) is biomarkerként használható. Az orto- és meta-tirozin a fenilalanin hidroxilált származékai, melyek emelkedett szöveti vagy plazma-szintje, vagy fokozott vesén át történő exkréciója korrelál az oxidatív stressz állapottal. Ennek megfelelően oxidatív stressz markerként szerepelnek. Onorato és munkacsoportja azt találta, hogy a kor előrehaladtával nő a bőr kollagéniájának orto-tirozin tartalma [165]. Saravanabhavan és munkacsoportja bizonyította, hogy a tirozin oxidatív módosulatainak – köztük az orto- és meta-tirozinnak - HPLC-vel történő meghatározása megfelelően alkalmazható az oxidatív stressz mérésére [166].

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján ismert, hogy krónikus veseelégtelen betegekben a plazma para-tirozin szintje alacsonyabb, mint az egészséges kontroll személyekben. Ezzel szemben a krónikus veseelégtelen

csoporthoz képest magasabb vizelet orto-tirozin szintet találtunk, mint a kontrollcsoportban. A diabeteses és a diabeteses-veseelégtelen csoportban a vizelet orto-tirozin szint még magasabbnak adódott [97]. Bár egyes tanulmányok szerint nincs összefüggés az orto-tirozin szint, valamint a biológiai kor között [167][168], munkacsoportunk az orto- és meta-tirozin felhalmozódását mutatta ki cataractás szemlencsékben [169].

Ezen kívül munkacsoportunk eredményei alapján mára bizonyítékkal rendelkezünk arra vonatkozóan is, hogy krónikus veseelégtelen, hemodializált betegek szérumszintje, valamint plazma orto-tirozin/para-tirozin aránya magasabb a kontroll csoportéhoz képest [170].

7.2.6. Az oxidált aminosavak, mint a károsodások mediátorai

Gurer-Orhan hörcsög ovárium sejteken végzett vizsgálatai során bizonyította, hogy a meta-tirozin sejtfehérjékbe történő koncentrációfüggő beépülése sejtjelhaláshoz vezet [171]. Szintén ismert, hogy az L-tirozin olyan strukturális módosulatai, mint a 3-jodotirozin, 3-fluorotirozin és a 3,4-dihidroxi-L-fenilalanin posztranszlációs módosulás során beépül a szöveti fehérjékbe, például az α -tubulin fehérjébe [172]. Vivekanadan-Giri és kutatócsoportja a cukorbeteg majmok aortáját felépítő fehérjékben magasabb orto- és meta-tirozin szintet talált, mint egészséges társaikéban [173]. Bertin fűféléken kutatta azt a jelenséget, hogy bizonyos fajok képesek arra, hogy cytotoxikus anyagok termőföldbe történő kibocsátása segítségével a konkurens szomszédos növények növekedését gátolják. Vizsgálataik során azt találták, hogy a kérdéses cytotoxikus ágens nagy százalékban meta-tirozinból áll [174]. Felvetik a meta-tirozin a növények strukturális fehérjéibe való beépülésének lehetőségét [174].

Munkánk során bebizonyítottuk, hogy az oxidatív stressz az EPO célsejthatásaira is befolyással van. Kísérleteink során igazoltuk, hogy az orto- és meta-tirozin sejtalkotó fehérjékbe beépül és gátolja az antiapoptotikus és mitogén jelátviteli utakat. A gátolt STAT5- és ERK-foszforiláció csökkent proliferációs válaszhoz vezet, mely EPO-rezisztencia kialakulását eredményezheti. Korábban Ruggiero és munkacsoportja bizonyította, hogy az orto- és meta-tirozin lassítja a tumor-proliferációt ERK- és STAT3-

gátláson keresztül [95]. Ehhez hasonlóan, mi is csökkent ERK- és STAT5-aktivációt tapasztaltunk orto- és meta-tirozin jelenlétében.

Kitamura eredményeihez hasonlóan [175], a TF-1 erythroblasztok 3 napos tenyésztése rh-EPO jelenlétében 1,7-szeres sejtszám-növekedést okozott. A meta- és orto-tirozin médiumhoz való hozzáadása jelentősen csökkentette a proliferációs aktivitást, kisebb EPO indukált sejtszámnövekedést eredményezve. A különböző tirozinokkal módosított médiumban tenyésztett sejtek proliferációs aktivitása már 2 nap után szignifikáns különbséget mutatott (12. ábra). Ruggiero kutatásai alapján, a meta-tirozin gátló hatását nagyobb koncentrációjú fenilalaninnal, glutaminnal, aszpartáttal, hisztidinnel vagy glutamáttal fel lehetett függeszteni, azonban para-tirozinnal nem [95]. Ezzel szemben nekünk sikerült az EPO-rezisztenciát para-tirozinnal, koncentrációfüggő módon áttörni (10. ábra, B panel). Eredményeink arra utalnak, hogy a para-tirozin kompetitíven gátolja az orto- és meta-tirozin beépülését a sejtalkotó fehérjékbe. Az orto-tirozin esetén 1:1,8-hoz arányú para-tirozinra volt szükség az EPO-érzékenység 50%-ának visszaállításához. A meta-tirozin esetén ez az arány 1:2,6-hoz volt.

A humán plazma orto- és meta-tirozin koncentrációja egy kevésbé vizsgált területe az orvosi szakirodalomnak. A szövetek vagy testváladékok orto- vagy meta-tirozin tartalmát legtöbbször relatív koncentrációban adják meg, pl. meta-tirozin/fenilalanin vagy orto-tirozin/fenilalanin arány vagy ehhez hasonlóan össztirozinra korrigálva; nagyon ritkán szerepelnek pontos koncentrációk [176]. Munkacsoportunk egy korábbi tanulmánya során a szérumban para-tirozin koncentrációja megközelítőleg 55 $\mu\text{mol/l}$ -nek adódott egészséges, 28 $\mu\text{mol/l}$ -nek adódott CKD3 stádiumú krónikus vesebetegekben. Az orto-tirozin szérumban koncentrációja 22 vs. 50 nmol/l volt [97]. Dandona és munkacsoportja kísérleteik során a szérumban meta- és orto-tirozin tartalmát 20-40 nmol/l -nek mérték [177]. Az RPMI-1640 médium eredetileg kétszeres koncentrációban tartalmaz para-tirozint a normál humán szérumban képest. Ebből következik, hogy hasonló orto- és meta-tirozin koncentrációra volt szükség az EPO-válasz teljes gátlásához. Továbbá a három tirozin-izomer szöveti vagy sejten belüli koncentrációja sem ismert. Tekintetbe véve a tényt, hogy a pro-oxidáns és metabolikus folyamatok főleg az intracelluláris térben mennek végbe, a plazma koncentráció kevésbé tekinthető minden szempontból relevánsnak.

Vizsgálataink során kísérletet tettünk a teljes jelátviteli blokádnak létrehozására, ezért magas tirozin-izomer koncentrációkat használtunk (110,4 $\mu\text{mol/l}$). Bertin és munkacsoportja hasonló koncentrációjú meta-tirozint használt a növények gyökérszövetek növekedésének gátlását vizsgálva (20-260 $\mu\text{mol/l}$) [174]. Rodgers és munkacsoportja a meta-tirozin sejtfehérjékbe történő beépülését, valamint protein degradációban betöltött szerepét tanulmányozta. Vizsgálatai során a használt meta-tirozin koncentráció elérte a 2000 $\mu\text{mol/l}$ -t [178]. Ruggiero és munkacsoportja a tumor rezisztencia modellezésekor 827 $\mu\text{mol/l}$ -es meta- és orto-tirozin koncentrációkat használt [95].

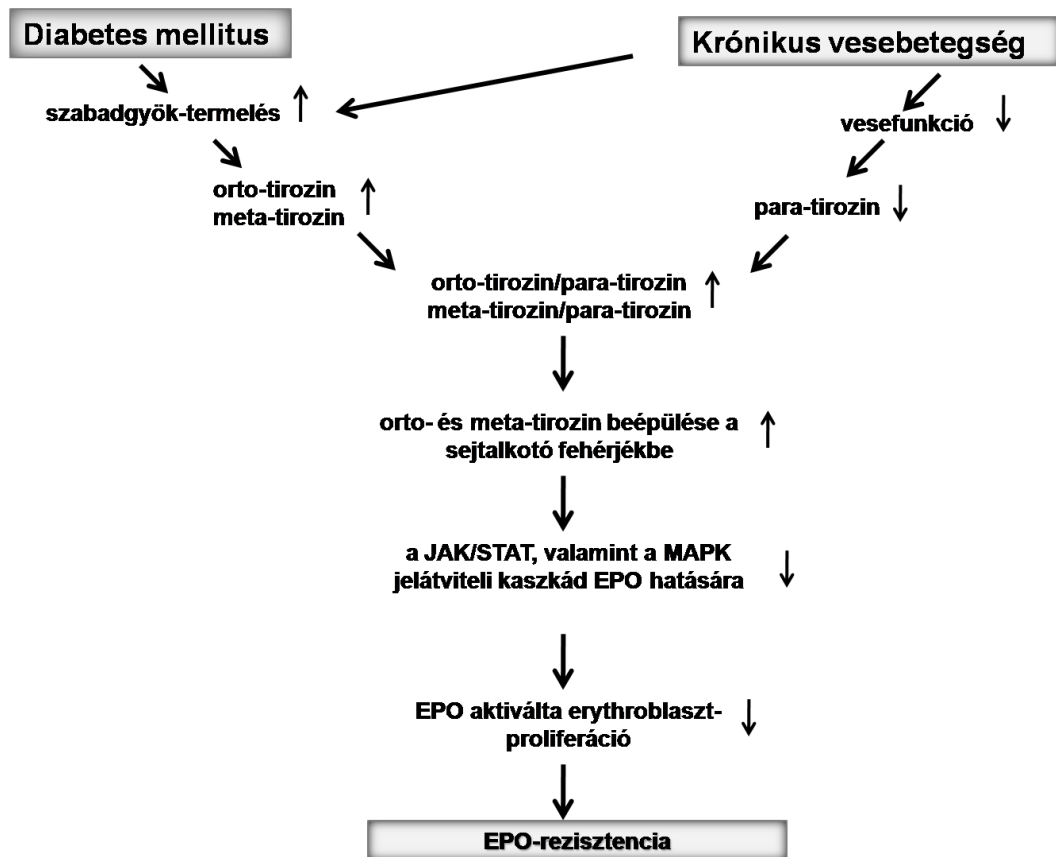
Míg a fenilalanin -OH hatására létrejövő tirozin-izomerjeit mindeddig kizárólag biomarkerként tartották számon, eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy oki szerepet játszanak a hormon-rezisztenciák kialakulásában. Tehát nem passzív markerként, hanem a pathomechanizmus aktív résztvevőiként tekinthetünk rájuk. Feltételezzük, hogy a kóros tirozin-izomerek fehérjékbe történő beépülése nem csupán az EPO-rezisztenciát okozhatja. Abból következően, hogy az orto- és meta-tirozin hatására létrejött csökkent proliferációs aktivitás, para-tirozin kezelés hatására visszaállíthatónak bizonyult, a para-tirozin szupplementáció hatékony lehet későbbiekben a hormon-rezisztencia kezelésében. Ez utóbbi hipotézisünk egy beadott szabadalom alapját is képezi [European/US patent application (reference number: 01319EP-13773E/)].

Összefoglalva eredményeinket kimondhatjuk, hogy a citokin - melynek eddig is sok arcát ismerhettük meg - vércukorszint-csökkentő hatással is rendelkezik. Másrészt talán magyarázatot találtunk az EPO-rezisztencia pathomechanizmusára is.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink bizonyítékkal szolgálnak arra, hogy az EPO, számos más nem erythroid hatásán kívül, a szénhidrát-anyagcserére is közvetlen hatással van. Elsőként találtunk EPO indukált jelátviteli kaszkád-aktivációt zsírsejtekben, mely következményes glukózfelvétel-növekedéssel jár. Az EPO leginkább a kóros, magas glukózsint mellett bizonyult hatékonynak. Ezt *in vivo* kísérleteink is alátámasztják, mivel egészséges állatokban nem találtunk vércukorszint-csökkentő hatást. Bizonyítottuk, hogy az EPO saját receptorral rendelkezik a zsírsejtek felszínén, mely arra utalhat, hogy a citokin fiziológiás szerepet játszik a perifériás glukózfelhasználás szabályozásában. JAK2-, valamint PI3K-gátlóval végzett kísérleteink pedig arra utalnak, hogy az EPO glukózfelvételt serkentő hatása nem a JAK/STAT, hanem sokkal inkább a PI3K/Akt úton érvényesül. Ezen kívül eredményeink azt is mutatják, hogy a zsírsejteken tapasztalt EPO-hatás orto- és meta-tirozin hozzáadásával gátolható.

TF-1 erythroblasztokon végzett kísérleteinkkel rávilágítottunk arra, hogy az orto- és meta-tirozinnak szerepe lehet az EPO-rezisztencia kialakulásában. Mind diabetesben, mind krónikus vesebetegségben a fokozott oxidatív stressz megnövekedett orto- és meta-tirozin szinttel jár (14. ábra). A vesekárosodás pedig ezzel egyidőben csökkent para-tirozin szintézishez vezet (14. ábra). Ez a tirozin-izomerek arányát a kóros módosulatok javára tolja el. Ennek következtében az orto- és meta-tirozin beépül a sejtalkotó fehérjékbe, mely funkció-károsodással jár. Ez pedig a sejten belüli jelátviteli kaszkád enzimeit is érintheti, mely az EPO függő aktiváció-csökkenéséhez vezet (14. ábra). Ebből következik, hogy a kóros tirozin-módosulatok jelenlétében csökkent az EPO proliferatív és differenciálódást serkentő hatása, tehát EPO-rezisztencia alakulhat ki (14. ábra). Az a megfigyelés pedig, hogy hatásaik a fiziológiás para-tirozinnal kivédhetők, így megőrizve a megfelelő proliferatív aktivitást, egy jövőbeli terápiás lehetőséget rejthet magában.



14. ábra. Az EPO-rezisztencia mechanizmusa A feltételezett sejtszintű mechanizmus folyamatábrája arról, ahogy az orto- és meta-tirozin sejtfehérjékbe történő beépülése változásokat idéz elő a jelátviteli folyamatokban, ezzel az erythroid sejtek EPO-rezisztenciáját hozva létre.

9. A DOLGOZAT TÉZISEI

9.1. Az EPO szénhidrát-anyagcsere hatásai [I.]

- Az EPO *in vivo* akut vércukorszint-csökkentő hatással rendelkezik.
- Az EPO *in vitro*, a GLUT4 plazmamembránba történő transzportja révén, növeli a zsírsejtek glukózfelvételét.
- Zsírsejtekben EPO-kezelés hatására Akt- és ERK-aktiváció megy végbe, mely saját receptoron keresztül valósul meg. Az Akt-foszforyláció PI3K-gátlóval kivédhető.
- Az EPO *in vitro* növeli az inzulin glukózfelvételre és Akt-aktivációra kifejtett hatását.
- Az orto-tirozin *in vitro* gátolja a zsírsejtek EPO függő glukózfelvételét

9.2. Az orto- és meta- tirozin sejtfehérjékbe történő beépülése EPO-rezisztenciát okoz [II.]

- Az orto- és meta-tirozin *in vitro* időfüggően gátolja az EPO kiváltotta sejtproliferációt, mely hatás para-tirozinnal gátolható.
- Az erythroblasztokat orto- vagy meta-tirozin jelenlétében tenyésztve a kóros tirozin módosulat a para-tirozin helyébe beépül, tehát csökken a sejtek para-tirozin tartalma, miközben orto- és meta-tirozin tartalmuk nő.
- Az orto- és meta-tirozin gátolja az EPO indukált ERK1/2- és STAT5-foszforylációt.

10. A DISSZERTÁCIÓHOZ CSATLAKOZÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

- [I.] 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: 2,188
- [II.] Mikolás E, Kun S, Laczy B, Molnár GA, Sélley E, Kőszegi T, Wittmann I
Incorporation of Ortho- and Meta-Tyrosine Into Cellular Proteins Leads to Erythropoietin-Resistance in an Erythroid Cell Line.
KIDNEY & BLOOD PRESSURE RESEARCH 38:(2-3) pp. 217-225. (2014) IF: 1,596

Összesített impakt faktor: 3,784

Citációk száma: 3

11. PUBLIKÁCIÓS LISTA

11.1. Tudományos cikkek

1. Szijártó IA, Molnár GA, Mikolás E, Fisi V, Laczy B, Gollasch M, Koller A, Wittmann I
Increase in insulin-induced relaxation of consecutive arterial segments toward the periphery: Role of vascular oxidative state.
FREE RADICAL RESEARCH 48:(7) pp. 749-757. (2014) IF: 3,279 (2013)
2. Kun S, Mikolás E, Molnár GA, Sélley E, Laczy B, Csiky B, Kovács T, Wittmann I.
Association of plasma ortho-tyrosine/para-tyrosine ratio with responsiveness of erythropoiesis-stimulating agent in dialyzed patients
REDOX REPORT 19:(5) pp. 190-198. (2014) IF: 1,662 (2013)
3. 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)
4. 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
BRITISH JOURNAL OF NUTRITION 106:(3) pp. 383-389. (2011) IF: 3,342
5. Mohás M, Kísfali 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
EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 118:(3) pp. 209-212. (2010) IF: 1,826

6. 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
Normo- és microalbuminuriás cukorbetegekben a HPLC-vel mért vizeletalbumin-fluoreszcencia a vesefunkciós paraméterekkel függ össze, nem a glikémiás értékekkel
DIABETOLOGIA HUNGARICA 17:(3) pp. 229-238. (2009)

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

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

9. Tamaskó M, Nagy L, Mikolás E, Molnár GA, Wittmann I, Nagy G
An approach to in situ detection of hydrogen peroxide: Application of a commercial needle-type electrode
PHYSIOLOGICAL MEASUREMENT 28:(12) pp. 1533-1542. (2007) IF: 1,412

10. Kovács T, Mikolás E, Szijártó I, Boros A G, Wittmann I
Vérnyomáscsökkentő gyógyszerek metabolikus hatásai és mellékhatásai
GRANUM 10:(3) pp. 21-24. (2007)

Összesített impakt faktor: 11,521

Citációk száma: 142

11.2. Absztraktok

1. Mikolás EZ, Fisi V, Cseh J, Pap M, Szijártó IA, Molnár GA, Bekő V, Wittmann I
Effects of Erythropoietin on Glucose Metabolism
KIDNEY & BLOOD PRESSURE RESEARCH 35:(6) pp. 425-426. (2010) IF: 1,500
2. Mikolás E Zs, Fisi V, Cseh J, Papp M, Szijártó I A, Molnár G A, Bekő V, Wittmann I
Az eritropoietin szénhidrát-anyagcserére gyakorolt hatásai
DIABETOLOGIA HUNGARICA 18:(S1) pp. 166-168. (2010)
3. Szijártó IA, Mérei A, Fisi V, Fésüs G, Cseh J, Mikolás EZ, Molnár GA, Wittmann I
Does Oxidative Stress Affect the Vasoactive Effect of Insulin?
KIDNEY & BLOOD PRESSURE RESEARCH 35:(6) p. 42. (2010) IF: 1,500
4. Szijártó I A, Mérei Á, Fisi V, Fésüs G, Cseh J, Mikolás E Zs, Molnár G A, Wittmann I
Az oxidatív stressz befolyásolhatja az inzulin vazoaktív hatását?
DIABETOLOGIA HUNGARICA 18:(S1) pp. 205-206. (2010)
5. 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
EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 118:(3) pp. 209-212. (2010) IF: 1,826
6. Brasnyó P, Molnár G A, Mérei Á, Cseh J, Mikolás E, Halmai R, Mészáros G L, Sümegi B, Wittmann I
Rezveratrol hatása 2-es típusú diabeteses betegekben. Új eredményeink
DIABETOLOGIA HUNGARICA 18:(S1) pp. 63-64. (2010)
7. 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
Effect of resveratrol on insulin sensitivity, oxidative stress and Akt pathway in humans

DIABETOLOGIA : CLINICAL AND EXPERIMENTAL DIABETES AND METABOLISM 53: p. 755. (2010) IF: 6,973

8. 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
Normo- és microalbuminuriás cukorbetegekben a HPLC-vel mért vizeletalbumin-fluoreszcencia a vesefunkciós paraméterekkel függ össze, nem a glikémiás értékekkel
DIABETOLOGIA HUNGARICA 17:(3) pp. 229-238. (2009)
9. Vas T, Markó L, Mohás M, Cseh J, Mikolás E, Szijártó I, Wittmann I
Cardiovascularis rizikócsökkenés vesebetegekben
GRANUM 11:(4) pp. 17-22. (2008)
10. Vágási K, Molnár G A, Mikolás E, Szijártó I, Wittmann I
NPH inzulinról detemir inzulinra történő átállítás a vérnyomástól függetlenül csökkenti a mikroalbuminuriát diabeteses betegekben
HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 12:(S5) p. 228. (2008)
11. Szigeti N, Markó L, Molnár G A, Cseh J, Mohás M, Mikolás E, Kőszegi T, Fábíán Gy, Figler M, Király Á, Wittmann I
Microalbuminuria vizsgálata nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) és ImmunTurbidimetriás (IT) módszerrel gyulladáisos bélbetegekben
HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 12:(S5) p. 238. (2008)
12. Wittmann I, Laczy B, Mikolás E, Markó L, Mohás M, Cseh J, Wagner L
A dohányzás inzulinrezisztenciát okoz és növeli a 2-es típusú diabetes mellitus, illetve a metabolikus syndroma kialakulásának kockázatát
DIABETOLOGIA HUNGARICA 15:(4) pp. 305-311. (2007)
13. Wagner L, Laczy B, Boros A G, Tamaskó M, Mikolás E, Szijártó I A, Markó L, Mohás M, Cseh J, Fekete A, Wittmann I
Kivédhető-e a dohányzás nitrogén monoxid-termelést csökkentő hatása?
FOLIA HEPATOLOGICA 11:(S3) pp. 40-41. (2007)

14. Tamaskó M, Nagy L, Mikolás E, Nagy G, Wittmann I
H₂O₂ mérése egy elektroenzimatikus szenzor segítségével
FOLIA HEPATOLOGICA 11:(S3) p. 37. (2007)
15. Markó L, Molnár G A, Szijártó I A, Mikolás E, Wagner Z, Kőszegi T, Matus Z, Boros A
G, Wittmann I
Összefüggés a vizelet hidroxil szabad gyök marker o-/p-Tyr hányados és a
vörösvértestképzés között diabeteses és/vagy azotaemiás betegekben
FOLIA HEPATOLOGICA 11:(S3) p. 28. (2007)

Összesített impakt faktor: 11,799

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőmnek, Prof. Dr. Wittmann István professzor úrnak szeretnék köszönetet mondani, aki kutatásaimat lehetővé tette, szakmai tevékenységemet segítő figyelemmel kísérte, irányította, hasznos tanácsokkal és útmutatással látott el.

Köszönettel tartozom Dr. Mohás-Cseh Judit, Dr. Szijártó István, Dr. Laczy Boglárka, valamint Dr. Sélley Eszter kollégáimnak, valamint a II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum Kutatólabor összes dolgozójának, akik nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Molnár Gergő Attila adjunktus úrnak és Dr. Kun Szilárd kollégámnak a munkámhoz adott segítségért és bátorításért. Továbbá köszönet illeti az asszisztensi segítséget nyújtó kollégáimat: Fábíán Ildikót, Bertusz Józsefnét, Szalma Krisztinát, Lendvai Anikót, Dobos Tündét, valamint dr. Sámikné Varga Ilonát, akik nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg.

Köszönet illeti a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Biológiai Intézetét, külön kiemelve Dr. Szeberényi József professzor urat, Dr. Pap Marianna tanárnőt, valamint Dr. Balogh Andrászt, akik munkámban közreműködtek, valamint hasznos és értékes tanácsokkal láttak el. A Pécsi Tudományegyetem Laboratóriumi Medicina Intézetéből Dr. Kőszegi Tamásnak tartozom hálával útmutatásáért.

Köszönettel tartozom még a II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum Professzori Titkárságán dolgozó kolléganőimnek, Bodor Enikőnek, Horváth Klaudiának, valamint Horváth Viktóriának, valamint a Klinika összes olyan dolgozójának, akik munkámhoz segítséget vagy háttérrel nyújtottak.

Végül köszönöm családom és Párom megértő türelmét, szeretetét és bátorítását.

13. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] A. S. Levey, P. E. de Jong, J. Coresh, M. El Nahas, B. C. Astor, K. Matsushita, R. T. Gansevoort, B. L. Kasiske, and K.-U. Eckardt, "The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report.," *Kidney Int.*, vol. 80, no. 1, pp. 17–28, Jul. 2011.
- [2] G. Kakuk, *Klinikai nephrológia*. 2004, pp. 625–763.
- [3] P. M. Cotes, "Erythropoietin and the physiological control of erythropoiesis.," *Proc. R. Soc. Med.*, vol. 54, pp. 371–4, May 1961.
- [4] "Pathological Physiology and Clinical Description of the Anemias," *J. Am. Med. Assoc.*, vol. 108, no. 8, p. 669, Feb. 1937.
- [5] K. R. Reissmann, "Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia.," *Blood*, vol. 5, no. 4, pp. 372–80, Apr. 1950.
- [6] A. Erslev, "Humoral regulation of red cell production.," *Blood*, vol. 8, no. 4, pp. 349–57, Apr. 1953.
- [7] L. O. Jacobson, E. Goldwasser, W. Fried, and L. F. Plzak, "Studies on erythropoiesis. VII. The role of the kidney in the production of erythropoietin.," *Trans. Assoc. Am. Physicians*, vol. 70, pp. 305–17, Jan. 1957.
- [8] T. Miyake, C. K. Kung, and E. Goldwasser, "Purification of human erythropoietin.," *J. Biol. Chem.*, vol. 252, no. 15, pp. 5558–64, Aug. 1977.
- [9] K. Jacobs, C. Shoemaker, R. Rudersdorf, S. D. Neill, R. J. Kaufman, A. Mufson, J. Seehra, S. S. Jones, R. Hewick, and E. F. Fritsch, "Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin.," *Nature*, vol. 313, no. 6005, pp. 806–10.
- [10] F. K. Lin, S. Suggs, C. H. Lin, J. K. Browne, R. Smalling, J. C. Egrie, K. K. Chen, G. M. Fox, F. Martin, and Z. Stabinsky, "Cloning and expression of the human erythropoietin gene.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, no. 22, pp. 7580–4, Nov. 1985.
- [11] H. B. Demopoulos, B. Highman, P. D. Altland, M. A. Gerving, and G. Kaley, "Effect of high altitude on granular juxtaglomerular cells and their possible role in erythropoietin production.," *Am. J. Pathol.*, vol. 46, pp. 497–509, Mar. 1965.
- [12] W. Jelkmann, "Regulation of erythropoietin production.," *J. Physiol.*, vol. 589, no. Pt 6, pp. 1251–8, Mar. 2011.
- [13] C. Warnecke, Z. Zaborowska, J. Kurreck, V. A. Erdmann, U. Frei, M. Wiesener, and K.-U. Eckardt, "Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference:

- erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells.," *FASEB J.*, vol. 18, no. 12, pp. 1462–4, Sep. 2004.
- [14] S. M. Hattangadi, P. Wong, L. Zhang, J. Flygare, and H. F. Lodish, "From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications.," *Blood*, vol. 118, no. 24, pp. 6258–68, Dec. 2011.
- [15] W. Jelkmann, "Physiology and pharmacology of erythropoietin.," *Transfus. Med. hemotherapy Off. Organ der Dtsch. Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, vol. 40, no. 5, pp. 302–9, Oct. 2013.
- [16] K. F. Kubatzky, W. Ruan, R. Gurezka, J. Cohen, R. Ketteler, S. S. Watowich, D. Neumann, D. Langosch, and U. Klingmüller, "Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor.," *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 2, pp. 110–5, Jan. 2001.
- [17] B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, O. Silvennoinen, T. Yi, B. Tang, O. Miura, and J. N. Ihle, "JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin.," *Cell*, vol. 74, no. 2, pp. 227–36, Jul. 1993.
- [18] E. Parganas, D. Wang, D. Stravopodis, D. J. Topham, J. C. Marine, S. Teglund, E. F. Vanin, S. Bodner, O. R. Colamonici, J. M. van Deursen, G. Grosveld, and J. N. Ihle, "Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors.," *Cell*, vol. 93, no. 3, pp. 385–95, May 1998.
- [19] D. M. Wojchowski, P. Sathyanarayana, and A. Dev, "Erythropoietin receptor response circuits.," *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 17, no. 3, pp. 169–76, May 2010.
- [20] M. Socolovsky, H. Nam, M. D. Fleming, V. H. Haase, C. Brugnara, and H. F. Lodish, "Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts.," *Blood*, vol. 98, no. 12, pp. 3261–73, Dec. 2001.
- [21] F. Neria, C. Caramelo, H. Peinado, F. R. González-Pacheco, J. J. P. Deudero, A. J. de Solis, R. Fernández-Sánchez, S. Peñate, A. Cano, and M. A. Castilla, "Mechanisms of endothelial cell protection by blockade of the JAK2 pathway.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 292, no. 3, pp. C1123–31, Mar. 2007.
- [22] N. Meydan, T. Grunberger, H. Dadi, M. Shahar, E. Arpaia, Z. Lapidot, J. S. Leeder, M. Freedman, A. Cohen, A. Gazit, A. Levitzki, and C. M. Roifman, "Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor.," *Nature*, vol. 379, no. 6566, pp. 645–8, Feb. 1996.
- [23] H. Odai, Y. Hanazono, K. Sasaki, A. Iwamatu, Y. Yazaki, and H. Hirai, "The signal transduction through Grb2/Ash in hematopoietic cells.," *Leukemia*, vol. 11 Suppl 3, pp. 405–7, Apr. 1997.
- [24] L. Lu, Y. Ge, Z. H. Li, M. S. Dai, and H. E. Broxmeyer, "Enhancement of proliferation and differentiation of erythroid progenitors by co-transduction of erythropoietin receptor and H-ras cDNAs into single CD34(3+) cord blood cells.," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 26, no. 8, pp. 817–22, Oct. 2000.

- [25] L. Chang and M. Karin, "Mammalian MAP kinase signalling cascades.," *Nature*, vol. 410, no. 6824, pp. 37–40, Mar. 2001.
- [26] C. J. Vlahos, W. F. Matter, K. Y. Hui, and R. F. Brown, "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002).," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 7, pp. 5241–8, Feb. 1994.
- [27] Y. Kubota, T. Tanaka, A. Kitanaka, H. Ohnishi, Y. Okutani, M. Waki, T. Ishida, and H. Kamano, "Src transduces erythropoietin-induced differentiation signals through phosphatidylinositol 3-kinase.," *EMBO J.*, vol. 20, no. 20, pp. 5666–77, Oct. 2001.
- [28] S. Ghaffari, C. Kitidis, W. Zhao, D. Marinkovic, M. D. Fleming, B. Luo, J. Marszalek, and H. F. Lodish, "AKT induces erythroid-cell maturation of JAK2-deficient fetal liver progenitor cells and is required for Epo regulation of erythroid-cell differentiation.," *Blood*, vol. 107, no. 5, pp. 1888–91, Mar. 2006.
- [29] M. Digicaylioglu and S. A. Lipton, "Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades.," *Nature*, vol. 412, no. 6847, pp. 641–7, Aug. 2001.
- [30] C. Toth, J. A. Martinez, W. Q. Liu, J. Diggle, G. F. Guo, N. Ramji, R. Mi, A. Hoke, and D. W. Zochodne, "Local erythropoietin signaling enhances regeneration in peripheral axons.," *Neuroscience*, vol. 154, no. 2, pp. 767–83, Jun. 2008.
- [31] K. van der Putten, B. Braam, K. E. Jie, and C. A. J. M. Gaillard, "Mechanisms of Disease: erythropoietin resistance in patients with both heart and kidney failure.," *Nat. Clin. Pract. Nephrol.*, vol. 4, no. 1, pp. 47–57, Jan. 2008.
- [32] "KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease.," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 47, no. 5 Suppl 3, pp. S11–145, May 2006.
- [33] E. Sundal and U. Kaeser, "Correction of anaemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin: safety and efficacy of one year's treatment in a European multicentre study of 150 haemodialysis-dependent patients.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 4, no. 11, pp. 979–87, Jan. 1989.
- [34] C. L. Bennett, K. M. Starko, H. S. Thomsen, S. Cowper, O. Sartor, I. C. Macdougall, Z. P. Qureshi, P. B. Bookstaver, A. D. Miller, L. B. Norris, S. Xirasagar, A. Trenergy, I. Lopez, A. Kahn, A. Murday, S. Luminari, D. Cournoyer, F. Locatelli, P. Ray, and D. R. Mattison, "Linking drugs to obscure illnesses: lessons from pure red cell aplasia, nephrogenic systemic fibrosis, and Reye's syndrome. a report from the Southern Network on Adverse Reactions (SONAR).," *J. Gen. Intern. Med.*, vol. 27, no. 12, pp. 1697–703, Dec. 2012.
- [35] A. K. Singh, L. Szczech, K. L. Tang, H. Barnhart, S. Sapp, M. Wolfson, and D. Reddan, "Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 355, no. 20, pp. 2085–98, Nov. 2006.

- [36] O. Bamgbola, "Resistance to erythropoietin-stimulating agents: etiology, evaluation, and therapeutic considerations.," *Pediatr. Nephrol.*, vol. 27, no. 2, pp. 195–205, Feb. 2012.
- [37] F. Locatelli, P. Aljama, P. Bárány, B. Canaud, F. Carrera, K.-U. Eckardt, W. H. Hörl, I. C. Macdougall, A. Macleod, A. Wiecek, and S. Cameron, "Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 19 Suppl 2, pp. ii1–47, May 2004.
- [38] J. Rossert, C. Gassmann-Mayer, D. Frei, and W. McClellan, "Prevalence and predictors of epoetin hyporesponsiveness in chronic kidney disease patients.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 22, no. 3, pp. 794–800, Mar. 2007.
- [39] M. Kanbay, M. A. Perazella, B. Kasapoglu, M. Koroglu, and A. Covic, "Erythropoiesis stimulatory agent-resistant anemia in dialysis patients: review of causes and management.," *Blood Purif.*, vol. 29, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2010.
- [40] A. C. Cooper, A. Mikhail, M. W. Lethbridge, D. M. Kemeny, and I. C. Macdougall, "Increased expression of erythropoiesis inhibiting cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10, and IL-13) by T cells in patients exhibiting a poor response to erythropoietin therapy.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 14, no. 7, pp. 1776–84, Jul. 2003.
- [41] T. Shinzato, K. Abe, A. Furuu, T. Harada, K. Shinzato, M. Miyazaki, and S. Kohno, "Serum pro-hepcidin level and iron homeostasis in Japanese dialysis patients with erythropoietin (EPO)-resistant anemia.," *Med. Sci. Monit.*, vol. 14, no. 9, pp. CR431–7, Sep. 2008.
- [42] M. Wagner, A. Alam, J. Zimmermann, K. Rauh, A. Koljaja-Batzner, U. Raff, C. Wanner, and L. Schramm, "Endogenous erythropoietin and the association with inflammation and mortality in diabetic chronic kidney disease.," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 6, no. 7, pp. 1573–9, Jul. 2011.
- [43] E. Canavesi, C. Alfieri, S. Pelusi, and L. Valenti, "Hepcidin and HFE protein: Iron metabolism as a target for the anemia of chronic kidney disease.," *World J. Nephrol.*, vol. 1, no. 6, pp. 166–176, Dec. 2012.
- [44] M. O. Arcasoy, "The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin.," *Br. J. Haematol.*, vol. 141, no. 1, pp. 14–31, Apr. 2008.
- [45] P. Fu, X. Jiang, and M. O. Arcasoy, "Constitutively active erythropoietin receptor expression in breast cancer cells promotes cellular proliferation and migration through a MAP-kinase dependent pathway.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 379, no. 3, pp. 696–701, Feb. 2009.
- [46] M. E. Hardee, Z. N. Rabbani, M. O. Arcasoy, J. P. Kirkpatrick, Z. Vujaskovic, M. W. Dewhirst, and K. L. Blackwell, "Erythropoietin inhibits apoptosis in breast cancer cells via an Akt-dependent pathway without modulating in vivo chemosensitivity.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 2, pp. 356–61, Feb. 2006.

- [47] E. S. Fenjves, M. S. Ochoa, O. Cabrera, A. J. Mendez, N. S. Kenyon, L. Inverardi, and C. Ricordi, "Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors.," *Transplantation*, vol. 75, no. 8, pp. 1356–60, Apr. 2003.
- [48] R. Yamaji, T. Okada, M. Moriya, M. Naito, T. Tsuruo, K. Miyatake, and Y. Nakano, "Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 239, no. 2, pp. 494–500, Jul. 1996.
- [49] P. Lewczuk, M. Hasselblatt, H. Kamrowski-Kruck, A. Heyer, C. Unzicker, A. L. Sirén, and H. Ehrenreich, "Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin.," *Neuroreport*, vol. 11, no. 16, pp. 3485–8, Nov. 2000.
- [50] E. Morishita, S. Masuda, M. Nagao, Y. Yasuda, and R. Sasaki, "Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death.," *Neuroscience*, vol. 76, no. 1, pp. 105–16, Jan. 1997.
- [51] A. Nagai, E. Nakagawa, H. B. Choi, K. Hatori, S. Kobayashi, and S. U. Kim, "Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture.," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 60, no. 4, pp. 386–92, Apr. 2001.
- [52] M. Moeini, M. Nematbakhsh, M. Fazilati, A. Talebi, A. A. Pilehvarian, F. Azarkish, F. Eshraghi-Jazi, and Z. Pezeshki, "Protective role of recombinant human erythropoietin in kidney and lung injury following renal bilateral ischemia-reperfusion in rat model.," *Int. J. Prev. Med.*, vol. 4, no. 6, pp. 648–55, Jun. 2013.
- [53] W. M. Bernhardt and K.-U. Eckardt, "Physiological basis for the use of erythropoietin in critically ill patients at risk for acute kidney injury.," *Curr. Opin. Crit. Care*, vol. 14, no. 6, pp. 621–6, Dec. 2008.
- [54] C. Westenfelder, "Unexpected renal actions of erythropoietin.," *Exp. Nephrol.*, vol. 10, no. 5–6, pp. 294–8, Jan. 2002.
- [55] F. H. Bahlmann and D. Fliser, "Erythropoietin and renoprotection.," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 18, no. 1, pp. 15–20, Jan. 2009.
- [56] K.-Y. Lu, L.-C. Ching, K.-H. Su, Y.-B. Yu, Y. R. Kou, S.-H. Hsiao, Y.-C. Huang, C.-Y. Chen, L.-C. Cheng, C.-C. Pan, and T.-S. Lee, "Erythropoietin suppresses the formation of macrophage foam cells: role of liver X receptor alpha.," *Circulation*, vol. 121, no. 16, pp. 1828–37, Apr. 2010.
- [57] P. Hojman, C. Brolin, H. Gissel, C. Brandt, B. Zerahn, B. K. Pedersen, and J. Gehl, "Erythropoietin over-expression protects against diet-induced obesity in mice through increased fat oxidation in muscles.," *PLoS One*, vol. 4, no. 6, p. e5894, Jan. 2009.

- [58] V. Allegra, G. Mengozzi, L. Martimbianco, and A. Vasile, "Early and late effects of erythropoietin on glucose metabolism in maintenance hemodialysis patients.," *Am. J. Nephrol.*, vol. 16, no. 4, pp. 304–8, Jan. 1996.
- [59] R. Bianchi, B. Buyukakilli, M. Brines, C. Savino, G. Cavaletti, N. Oggioni, G. Lauria, M. Borgna, R. Lombardi, B. Cimen, U. Comelekoglu, A. Kanik, C. Tataroglu, A. Cerami, and P. Ghezzi, "Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 3, pp. 823–8, Jan. 2004.
- [60] J. E. Shaw, R. A. Sicree, and P. Z. Zimmet, "Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030.," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 87, no. 1, pp. 4–14, Jan. 2010.
- [61] D. W. Dunstan, P. Z. Zimmet, T. A. Welborn, M. P. De Courten, A. J. Cameron, R. A. Sicree, T. Dwyer, S. Colagiuri, D. Jolley, M. Knuiman, R. Atkins, and J. E. Shaw, "The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study.," *Diabetes Care*, vol. 25, no. 5, pp. 829–34, May 2002.
- [62] R. A. DeFronzo, "Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis.," *Neth. J. Med.*, vol. 50, no. 5, pp. 191–7, May 1997.
- [63] R. P. Robertson, J. Harmon, P. O. T. Tran, and V. Poitout, "-Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes," *Diabetes*, vol. 53, no. Supplement 1, pp. S119–S124, Jan. 2004.
- [64] S. Cernea and M. Dobreanu, "Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications," *Biochem. Medica*, pp. 266–280, 2013.
- [65] K. Cusi, K. Maezono, A. Osman, M. Pendergrass, M. E. Patti, T. Pratipanawatr, R. A. DeFronzo, C. R. Kahn, and L. J. Mandarino, "Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle.," *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 3, pp. 311–20, Mar. 2000.
- [66] L. Y. Qiao, J. L. Goldberg, J. C. Russell, and X. J. Sun, "Identification of enhanced serine kinase activity in insulin resistance.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 15, pp. 10625–32, Apr. 1999.
- [67] O. J. Shah, Z. Wang, and T. Hunter, "Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies.," *Curr. Biol.*, vol. 14, no. 18, pp. 1650–6, Sep. 2004.
- [68] H. J. H. Fenton, "LXXIII. Oxidation of tartaric acid in presence of iron," *J. Chem. Soc. Trans.*, vol. 65, p. 899, 1894.
- [69] R. M. Acheson, "The Discovery of Free Radicals," *J. Chem. Educ.*, vol. 73, no. 1, p. 32, Jan. 1996.

- [70] F. Haber and J. Weiss, "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.
- [71] C.-C. Sung, Y.-C. Hsu, C.-C. Chen, Y.-F. Lin, and C.-C. Wu, "Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease.," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2013, p. 301982, Jan. 2013.
- [72] N. D. Vaziri, F. Oveisi, and Y. Ding, "Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension.," *Kidney Int.*, vol. 53, no. 6, pp. 1748–54, Jun. 1998.
- [73] E. Dounousi, E. Papavasiliou, A. Makedou, K. Ioannou, K. P. Katopodis, A. Tselepis, K. C. Siamopoulos, and D. Tsakiris, "Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD.," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 48, no. 5, pp. 752–60, Nov. 2006.
- [74] I. Karamouzis, P. A. Sarafidis, M. Karamouzis, S. Iliadis, A.-B. Haidich, A. Sioulis, A. Triantos, N. Vavatsi-Christaki, and D. M. Grekas, "Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease.," *Am. J. Nephrol.*, vol. 28, no. 3, pp. 397–404, Jan. 2008.
- [75] G. Ferretti, T. Bacchetti, S. Masciangelo, and G. Pallotta, "Lipid peroxidation in hemodialysis patients: effect of vitamin C supplementation.," *Clin. Biochem.*, vol. 41, no. 6, pp. 381–6, Apr. 2008.
- [76] J. Westhuyzen, D. Saltissi, and H. Healy, "Oxidation of low density lipoprotein in hemodialysis patients: effect of dialysis and comparison with matched controls.," *Atherosclerosis*, vol. 129, no. 2, pp. 199–205, Mar. 1997.
- [77] H. Terawaki, K. Yoshimura, T. Hasegawa, Y. Matsuyama, T. Negawa, K. Yamada, M. Matsushima, M. Nakayama, T. Hosoya, and S. Era, "Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin.," *Kidney Int.*, vol. 66, no. 5, pp. 1988–93, Nov. 2004.
- [78] C. Zoccali, F. Mallamaci, and G. Tripepi, "AGEs and carbonyl stress: potential pathogenetic factors of long-term uraemic complications.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 15 Suppl 2, pp. 7–11, Jan. 2000.
- [79] B. Chance, H. Sies, and A. Boveris, "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.," *Physiol. Rev.*, vol. 59, no. 3, pp. 527–605, Jul. 1979.
- [80] G. R. Adams, C.-D. Zhan, F. Haddad, and N. D. Vaziri, "Voluntary exercise during chronic renal failure in rats.," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 37, no. 4, pp. 557–62, Apr. 2005.
- [81] G. J. Kemp, C. H. Thompson, D. J. Taylor, and G. K. Radda, "ATP production and mechanical work in exercising skeletal muscle: a theoretical analysis applied to ³¹P magnetic resonance spectroscopic studies of dialyzed uremic patients.," *Magn. Reson. Med.*, vol. 33, no. 5, pp. 601–9, May 1995.

- [82] P. G. Yazdi, H. Moradi, J.-Y. Yang, P. H. Wang, and N. D. Vaziri, "Skeletal muscle mitochondrial depletion and dysfunction in chronic kidney disease.," *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 6, no. 7, pp. 532–9, Jan. 2013.
- [83] E. Dursun, T. Ozben, G. Süleymanlar, B. Dursun, and G. Yakupoglu, "Effect of hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants.," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 40, no. 10, pp. 1009–13, Oct. 2002.
- [84] D. S. C. Raj, E. A. Dominic, A. Pai, F. Osman, M. Morgan, G. Pickett, V. O. Shah, A. Ferrando, and P. Moseley, "Skeletal muscle, cytokines, and oxidative stress in end-stage renal disease.," *Kidney Int.*, vol. 68, no. 5, pp. 2338–44, Nov. 2005.
- [85] G. Orasanu and J. Plutzky, "The pathologic continuum of diabetic vascular disease.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 53, no. 5 Suppl, pp. S35–42, Feb. 2009.
- [86] A. Y. Lee and S. S. Chung, "Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract.," *FASEB J.*, vol. 13, no. 1, pp. 23–30, Jan. 1999.
- [87] N. A. Ansari, Moinuddin, and R. Ali, "Glycated lysine residues: a marker for non-enzymatic protein glycation in age-related diseases.," *Dis. Markers*, vol. 30, no. 6, pp. 317–24, Jan. 2011.
- [88] S.-Y. Goh and M. E. Cooper, "Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 93, no. 4, pp. 1143–52, May 2008.
- [89] M. Brownlee, "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism.," *Diabetes*, vol. 54, no. 6, pp. 1615–25, Jun. 2005.
- [90] D. A. McClain, W. A. Lubas, R. C. Cooksey, M. Hazel, G. J. Parker, D. C. Love, and J. A. Hanover, "Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 16, pp. 10695–9, Aug. 2002.
- [91] P. Degrell, J. Cseh, M. Mohás, G. A. Molnár, L. Pajor, J. C. Chatham, N. Fülöp, and I. Wittmann, "Evidence of O-linked N-acetylglucosamine in diabetic nephropathy.," *Life Sci.*, vol. 84, no. 13–14, pp. 389–93, Mar. 2009.
- [92] V. Kolm-Litty, U. Sauer, A. Nerlich, R. Lehmann, and E. D. Schleicher, "High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells.," *J. Clin. Invest.*, vol. 101, no. 1, pp. 160–9, Jan. 1998.
- [93] L. I. Woolf, A. Jakubovic, and E. Chan-Henry, "The non-enzymic hydroxylation of phenylalanine to tyrosine by 2-amino-4-hydroxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropteridine.," *Biochem. J.*, vol. 125, no. 2, pp. 569–74, Nov. 1971.
- [94] S. S. A. Qadri, J.-H. Wang, J. C. Coffey, M. Alam, A. O'Donnell, T. Aherne, and H. P. Redmond, "Can surgery for cancer accelerate the progression of secondary tumors within residual minimal disease at both local and systemic

- levels?," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 80, no. 3, pp. 1046–50; discussion 1050–1, Sep. 2005.
- [95] R. A. Ruggiero, J. Bruzzo, P. Chiarella, P. di Gianni, M. A. Isturiz, S. Linskens, N. Speziale, R. P. Meiss, O. D. Bustuoabad, and C. D. Pasqualini, "Tyrosine isomers mediate the classical phenomenon of concomitant tumor resistance.," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 22, pp. 7113–24, Nov. 2011.
- [96] R. A. Ruggiero, J. Bruzzo, P. Chiarella, O. D. Bustuoabad, R. P. Meiss, and C. D. Pasqualini, "Concomitant tumor resistance: the role of tyrosine isomers in the mechanisms of metastases control.," *Cancer Res.*, vol. 72, no. 5, pp. 1043–50, Mar. 2012.
- [97] G. A. Molnár, Z. Wagner, L. Markó, T. Kó Szegi, M. Mohás, B. Kocsis, Z. Matus, L. Wagner, M. Tamaskó, I. Mazák, B. Laczy, J. Nagy, and I. Wittmann, "Urinary ortho-tyrosine excretion in diabetes mellitus and renal failure: evidence for hydroxyl radical production.," *Kidney Int.*, vol. 68, no. 5, pp. 2281–7, Nov. 2005.
- [98] M. D. Fisher and S. C. Frost, "Translocation of GLUT1 does not account for elevated glucose transport in glucose-deprived 3T3-L1 adipocytes.," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 20, pp. 11806–9, May 1996.
- [99] V. Rigalleau, V. Blanchetier, M. Aparicio, L. Baillet, J. Sneed, H. Dabadie, and H. Gin, "Erythropoietin can deteriorate glucose control in uraemic non-insulin-dependent diabetic patients.," *Diabetes Metab.*, vol. 24, no. 1, pp. 62–5, Feb. 1998.
- [100] J. M. Ng, M. Cooke, S. Bhandari, S. L. Atkin, and E. S. Kilpatrick, "The effect of iron and erythropoietin treatment on the A1C of patients with diabetes and chronic kidney disease.," *Diabetes Care*, vol. 33, no. 11, pp. 2310–3, Nov. 2010.
- [101] R. Teng, O. Gavrilova, N. Suzuki, T. Chanturiya, D. Schimel, L. Hugendubler, S. Mammen, D. R. Yver, S. W. Cushman, E. Mueller, M. Yamamoto, L. L. Hsu, and C. T. Noguchi, "Disrupted erythropoietin signalling promotes obesity and alters hypothalamus proopiomelanocortin production.," *Nat. Commun.*, vol. 2, p. 520, Jan. 2011.
- [102] L. Wang, R. Teng, L. Di, H. Rogers, H. Wu, J. B. Kopp, and C. T. Noguchi, "PPAR α and Sirt1 mediate erythropoietin action in increasing metabolic activity and browning of white adipocytes to protect against obesity and metabolic disorders.," *Diabetes*, vol. 62, no. 12, pp. 4122–31, Dec. 2013.
- [103] E. D. Rosen and B. M. Spiegelman, "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis.," *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 847–53, Dec. 2006.
- [104] C. T. Luk, S. Y. Shi, D. Choi, E. P. Cai, S. A. Schroer, and M. Woo, "Erythropoietin Signalling in Adipocytes is Not Essential for Regulation of Metabolism In Vivo.," *Can. J. diabetes*, vol. 37 Suppl 4, p. S67, Oct. 2013.
- [105] H. Toba, N. Sawai, M. Morishita, S. Murata, M. Yoshida, K. Nakashima, Y. Morita, M. Kobara, and T. Nakata, "Chronic treatment with recombinant human erythropoietin exerts renoprotective effects beyond hematopoiesis in

- streptozotocin-induced diabetic rat.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 612, no. 1–3, pp. 106–14, Jun. 2009.
- [106] T. Nakao, H. Matsumoto, T. Okada, M. Han, H. Hidaka, M. Yoshino, T. Shino, C. Yamada, and Y. Nagaoka, "Influence of erythropoietin treatment on hemoglobin A1c levels in patients with chronic renal failure on hemodialysis.," *Intern. Med.*, vol. 37, no. 10, pp. 826–30, Oct. 1998.
- [107] O. Katz, M. Stuible, N. Golishevski, L. Lifshitz, M. L. Tremblay, M. Gassmann, M. Mittelman, and D. Neumann, "Erythropoietin treatment leads to reduced blood glucose levels and body mass: insights from murine models.," *J. Endocrinol.*, vol. 205, no. 1, pp. 87–95, Apr. 2010.
- [108] A. Foskett, M. Alnaeeli, L. Wang, R. Teng, and C. T. Noguchi, "The effects of erythropoietin dose titration during high-fat diet-induced obesity.," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, p. 373781, Jan. 2011.
- [109] M. Alnaeeli, B. M. Raaka, O. Gavrilova, R. Teng, T. Chanturiya, and C. T. Noguchi, "Erythropoietin signaling: A novel regulator of white adipose tissue inflammation during diet-induced obesity.," *Diabetes*, Mar. 2014.
- [110] Y. Pan, J. L. Shu, H. F. Gu, D. C. Zhou, X. L. Liu, Q. Y. Qiao, S. K. Fu, F. H. Gao, and H. M. Jin, "Erythropoietin improves insulin resistance via the regulation of its receptor-mediated signaling pathways in 3T3L1 adipocytes.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 367, no. 1–2, pp. 116–23, Mar. 2013.
- [111] A. Tuzcu, M. Bahceci, E. Yilmaz, S. Bahceci, and S. Tuzcu, "The comparison of insulin sensitivity in non-diabetic hemodialysis patients treated with and without recombinant human erythropoietin.," *Horm. Metab. Res.*, vol. 36, no. 10, pp. 716–20, Oct. 2004.
- [112] Z. Rasic-Milutinovic, G. Perunicic-Pekovic, A. Cavala, Z. Glivic, L. Bokan, and S. Stankovic, "The effect of recombinant human erythropoietin treatment on insulin resistance and inflammatory markers in non-diabetic patients on maintenance hemodialysis.," *Hippokratia*, vol. 12, no. 3, pp. 157–61, Jul. 2008.
- [113] R. H. Mak, "Effect of recombinant human erythropoietin on insulin, amino acid, and lipid metabolism in uremia.," *J. Pediatr.*, vol. 129, no. 1, pp. 97–104, Jul. 1996.
- [114] J. R. Zierath, A. Krook, and H. Wallberg-Henriksson, "Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle.," *Diabetologia*, vol. 43, no. 7, pp. 821–35, Jul. 2000.
- [115] J.-M. Ricort, J.-F. Tanti, E. Obberghen, and Y. Marchand-Brustel, "Alterations in insulin signalling pathway induced by prolonged insulin treatment of 3T3-L1 adipocytes," *Diabetologia*, vol. 38, no. 10, pp. 1148–1156, Oct. 1995.
- [116] A. Krook, R. A. Roth, X. J. Jiang, J. R. Zierath, and H. Wallberg-Henriksson, "Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects.," *Diabetes*, vol. 47, no. 8, pp. 1281–6, Aug. 1998.

- [117] T. Kadowaki, "Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models.," *J. Clin. Invest.*, vol. 106, no. 4, pp. 459–65, Aug. 2000.
- [118] J. Cayla, C. Lavoie, R. Gareau, and A. Duvallet, "Effects of recombinant erythropoietin (r-HuEPO) on plasma glucose concentration in endurance-trained rats.," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 166, no. 3, pp. 247–9, Jul. 1999.
- [119] J. Burén, H.-X. Liu, J. Lauritz, and J. W. Eriksson, "High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase B desensitisation in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes.," *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 148, no. 1, pp. 157–67, Jan. 2003.
- [120] C. M. Rondinone, L. M. Wang, P. Lonroth, C. Wesslau, J. H. Pierce, and U. Smith, "Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 8, pp. 4171–5, Apr. 1997.
- [121] A. Avogaro, S. V. de Kreutzenberg, and G. P. Fadini, "Oxidative stress and vascular disease in diabetes: is the dichotomization of insulin signaling still valid?," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 44, no. 6, pp. 1209–15, Mar. 2008.
- [122] J. P. Cristol, J. Y. Bosc, S. Badiou, M. Leblanc, R. Lorrho, B. Descomps, and B. Canaud, "Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 12, no. 11, pp. 2312–7, Dec. 1997.
- [123] K. Shahrbanoo and O. Taziki, "Effect of intravenous ascorbic acid in hemodialysis patients with anemia and hyperferritinemia.," *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.*, vol. 19, no. 6, pp. 933–6, Nov. 2008.
- [124] W. B. Ershler, S. Sheng, J. McKelvey, A. S. Artz, N. Denduluri, J. Tecson, D. D. Taub, L. J. Brant, L. Ferrucci, and D. L. Longo, "Serum erythropoietin and aging: a longitudinal analysis.," *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 53, no. 8, pp. 1360–5, Aug. 2005.
- [125] G. J. Vanasse and N. Berliner, "Anemia in elderly patients: an emerging problem for the 21st century.," *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2010, pp. 271–5, Jan. 2010.
- [126] D.-F. Dai, P. S. Rabinovitch, and Z. Ungvari, "Mitochondria and cardiovascular aging.," *Circ. Res.*, vol. 110, no. 8, pp. 1109–24, Apr. 2012.
- [127] P. A. McCullough, H. X. Barnhart, J. K. Inrig, D. Reddan, S. Sapp, U. D. Patel, A. K. Singh, L. A. Szczech, and R. M. Califf, "Cardiovascular toxicity of epoetin-alfa in patients with chronic kidney disease.," *Am. J. Nephrol.*, vol. 37, no. 6, pp. 549–58, Jan. 2013.
- [128] S. D. Solomon, H. Uno, E. F. Lewis, K.-U. Eckardt, J. Lin, E. A. Burdmann, D. de Zeeuw, P. Ivanovich, A. S. Levey, P. Parfrey, G. Remuzzi, A. K. Singh, R. Toto, F. Huang, J. Rossert, J. J. V McMurray, and M. A. Pfeffer, "Erythropoietic

- response and outcomes in kidney disease and type 2 diabetes.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, no. 12, pp. 1146–55, Sep. 2010.
- [129] K. J. Ausk, E. J. Boyko, and G. N. Ioannou, "Insulin resistance predicts mortality in nondiabetic individuals in the U.S.," *Diabetes Care*, vol. 33, no. 6, pp. 1179–85, Jun. 2010.
- [130] B. M. Ricerca, L. Todaro, S. Caputo, P. Cotroneo, P. Damiani, A. Manto, D. Pitocco, S. Storti, and G. Ghirlanda, "Blunted erythropoietin response to anemia in type 1 diabetic patients," *Diabetes Care*, vol. 22, no. 4, p. 647b–647, Apr. 1999.
- [131] A. S. Winkler, J. Marsden, K. R. Chaudhuri, H. Hambley, and P. J. Watkins, "Erythropoietin depletion and anaemia in diabetes mellitus.," *Diabet. Med.*, vol. 16, no. 10, pp. 813–9, Oct. 1999.
- [132] F. TAKAKU, K. HIRASHIMA, and S. OKINAKA, "Effect of the Bilateral Section of the Splanchnic Nerve on Erythropoiesis," *Nature*, vol. 191, no. 4787, pp. 500–501, Jul. 1961.
- [133] P. Fioretto, M. Mauer, E. Brocco, M. Velussi, F. Frigato, B. Muollo, M. Sambataro, C. Abaterusso, B. Baggio, G. Crepaldi, and R. Nosadini, "Patterns of renal injury in NIDDM patients with microalbuminuria.," *Diabetologia*, vol. 39, no. 12, pp. 1569–76, Dec. 1996.
- [134] D. R. Bosman, A. S. Winkler, J. T. Marsden, I. C. Macdougall, and P. J. Watkins, "Anemia With Erythropoietin Deficiency Occurs Early in Diabetic Nephropathy," *Diabetes Care*, vol. 24, no. 3, pp. 495–499, Mar. 2001.
- [135] E. S. Fenjves, M. S. Ochoa, C. Gay-Rabinstein, R. D. Molano, A. Pileggi, A. J. Mendez, L. Inverardi, and C. Ricordi, "Adenoviral gene transfer of erythropoietin confers cytoprotection to isolated pancreatic islets.," *Transplantation*, vol. 77, no. 1, pp. 13–8, Jan. 2004.
- [136] M. Freemark, I. Avril, D. Fleenor, P. Driscoll, A. Petro, E. Opara, W. Kendall, J. Oden, S. Bridges, N. Binart, B. Breant, and P. A. Kelly, "Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance.," *Endocrinology*, vol. 143, no. 4, pp. 1378–85, Apr. 2002.
- [137] J.-L. Liu, K. T. Coschigano, K. Robertson, M. Lipsett, Y. Guo, J. J. Kopchick, U. Kumar, and Y. L. Liu, "Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 287, no. 3, pp. E405–13, Sep. 2004.
- [138] D. Choi, S. A. Schroer, S. Y. Lu, L. Wang, X. Wu, Y. Liu, Y. Zhang, H. Y. Gaisano, K.-U. Wagner, H. Wu, R. Retnakaran, and M. Woo, "Erythropoietin protects against diabetes through direct effects on pancreatic beta cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 207, no. 13, pp. 2831–42, Dec. 2010.
- [139] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, Jan. 2007.

- [140] G. L. Semenza, "Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 15, pp. 551–78, Jan. 1999.
- [141] R. D. Guzy and P. T. Schumacker, "Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia.," *Exp. Physiol.*, vol. 91, no. 5, pp. 807–19, Sep. 2006.
- [142] H.-Y. Sohn, F. Krotz, T. Gloe, M. Keller, K. Theisen, V. Krauss, and U. Pohl, "Differential regulation of xanthine and NAD(P)H oxidase by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. Role of nitric oxide and adenosine.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 58, no. 3, pp. 638–46, Jun. 2003.
- [143] R. D. Jones, J. T. Hancock, and A. H. Morice, "NADPH oxidase: a universal oxygen sensor?," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 29, no. 5, pp. 416–24, Sep. 2000.
- [144] J. K. Brunelle, E. L. Bell, N. M. Quesada, K. Vercauteren, V. Tiranti, M. Zeviani, R. C. Scarpulla, and N. S. Chandel, "Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation.," *Cell Metab.*, vol. 1, no. 6, pp. 409–14, Jun. 2005.
- [145] T. Kietzmann and A. Görlach, "Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression.," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 16, no. 4–5, pp. 474–86.
- [146] I. Wittmann, G. A. Molnár, L. Wagner, T. Köszegi, Z. Wagner, B. Laczy, M. Tamaskó, L. Markó, M. Mohás, and J. Nagy, "Single dose of acetylsalicylic acid in patients with Type 2 diabetes mellitus and/or chronic renal failure ameliorates anaemia by decreasing the rate of neocytolysis.," *Acta Physiol. Hung.*, vol. 94, no. 1–2, pp. 159–66, Mar. 2007.
- [147] J. Trial and L. Rice, "Erythropoietin withdrawal leads to the destruction of young red cells at the endothelial-macrophage interface.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 10, no. 2, pp. 183–90, Jan. 2004.
- [148] L. Rice, W. Ruiz, T. Driscoll, C. E. Whitley, R. Tapia, D. L. Hachey, G. F. Gonzales, and C. P. Alfrey, "Neocytolysis on descent from altitude: a newly recognized mechanism for the control of red cell mass.," *Ann. Intern. Med.*, vol. 134, no. 8, pp. 652–6, Apr. 2001.
- [149] L. Rice, C. P. Alfrey, T. Driscoll, C. E. Whitley, D. L. Hachey, and W. Suki, "Neocytolysis contributes to the anemia of renal disease.," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 33, no. 1, pp. 59–62, Jan. 1999.
- [150] A. Mima, "Inflammation and oxidative stress in diabetic nephropathy: new insights on its inhibition as new therapeutic targets.," *J. Diabetes Res.*, vol. 2013, p. 248563, Jan. 2013.
- [151] A. Magenta, S. Greco, C. Gaetano, and F. Martelli, "Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 9, pp. 17319–46, Jan. 2013.

- [152] M. K. Misra, M. Sarwat, P. Bhakuni, R. Tuteja, and N. Tuteja, "Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes.," *Med. Sci. Monit.*, vol. 15, no. 10, pp. RA209–219, Oct. 2009.
- [153] B. Halliwell and J. M. Gutteridge, "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.," *Biochem. J.*, vol. 219, no. 1, pp. 1–14, Apr. 1984.
- [154] J. D. Morrow, K. E. Hill, R. F. Burk, T. M. Nammour, K. F. Badr, and L. J. Roberts, "A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 23, pp. 9383–7, Dec. 1990.
- [155] J. D. Morrow, "Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 2, pp. 279–86, Feb. 2005.
- [156] D. Cota, K. Proulx, K. A. B. Smith, S. C. Kozma, G. Thomas, S. C. Woods, and R. J. Seeley, "Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake.," *Science*, vol. 312, no. 5775, pp. 927–30, May 2006.
- [157] Y. Su, T. K. T. Lam, W. He, A. Pocai, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan, and R. Gutiérrez-Juárez, "Hypothalamic leucine metabolism regulates liver glucose production.," *Diabetes*, vol. 61, no. 1, pp. 85–93, Jan. 2012.
- [158] G. Marchesini, G. Bianchi, B. Rossi, M. Muggeo, and E. Bonora, "Effects of hyperglycaemia and hyperinsulinaemia on plasma amino acid levels in obese subjects with normal glucose tolerance.," *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, vol. 24, no. 5, pp. 552–8, May 2000.
- [159] M. Holecek, L. Sprongl, I. Tilser, and M. Tichý, "Leucine and protein metabolism in rats with chronic renal insufficiency.," *Exp. Toxicol. Pathol.*, vol. 53, no. 1, pp. 71–6, Apr. 2001.
- [160] M. W. Duncan, "A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine.," *Amino Acids*, vol. 25, no. 3–4, pp. 351–61, Dec. 2003.
- [161] A. J. Lokuta, N. A. Maertz, S. V. Meethal, K. T. Potter, T. J. Kamp, H. H. Valdivia, and R. A. Haworth, "Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure.," *Circulation*, vol. 111, no. 8, pp. 988–95, Mar. 2005.
- [162] M. H. Zou, M. Leist, and V. Ullrich, "Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries.," *Am. J. Pathol.*, vol. 154, no. 5, pp. 1359–65, May 1999.
- [163] J. Ara, S. Przedborski, A. B. Naini, V. Jackson-Lewis, R. R. Trifiletti, J. Horwitz, and H. Ischiropoulos, "Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP).," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 13, pp. 7659–63, Jun. 1998.

- [164] C. Vadseth, J. M. Souza, L. Thomson, A. Seagraves, C. Nagaswami, T. Scheiner, J. Torbet, G. Vilaire, J. S. Bennett, J.-C. Murciano, V. Muzykantov, M. S. Penn, S. L. Hazen, J. W. Weisel, and H. Ischiropoulos, "Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 10, pp. 8820–6, Mar. 2004.
- [165] J. M. Onorato, S. R. Thorpe, and J. W. Baynes, "Immunohistochemical and ELISA assays for biomarkers of oxidative stress in aging and disease.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 854, pp. 277–90, Nov. 1998.
- [166] G. Saravanabhavan, E. Blais, R. Vincent, and P. Kumarathasan, "A high performance liquid chromatography-electrochemical array method for the measurement of oxidative/nitrative changes in human urine.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 19, pp. 3269–74, May 2010.
- [167] C. Leeuwenburgh, P. Hansen, A. Shaish, J. O. Holloszy, and J. W. Heinecke, "Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats.," *Am. J. Physiol.*, vol. 274, no. 2 Pt 2, pp. R453–61, Feb. 1998.
- [168] M. C. Wells-Knecht, T. G. Huggins, D. G. Dyer, S. R. Thorpe, and J. W. Baynes, "Oxidized amino acids in lens protein with age. Measurement of o-tyrosine and dityrosine in the aging human lens.," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 17, pp. 12348–52, Jun. 1993.
- [169] G. A. Molnár, V. Nemes, Z. Biró, A. Ludány, Z. Wagner, and I. Wittmann, "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.*, vol. 39, no. 12, pp. 1359–66, Dec. 2005.
- [170] S. Kun, E. Mikolás, G. A. Molnár, E. Sélley, B. Laczy, B. Csiky, T. Kovács, and I. Wittmann, "Association of plasma ortho-tyrosine/para-tyrosine ratio with responsiveness of erythropoiesis-stimulating agent in dialyzed patients.," *Redox Rep.*, Apr. 2014.
- [171] H. Gurer-Orhan, N. Ercal, S. Mare, S. Pennathur, H. Orhan, and J. W. Heinecke, "Misincorporation of free m-tyrosine into cellular proteins: a potential cytotoxic mechanism for oxidized amino acids.," *Biochem. J.*, vol. 395, no. 2, pp. 277–84, Apr. 2006.
- [172] M. Joniau, K. Coudijzer, and M. De Cuyper, "Reaction of alpha-tubulin with iodotyrosines catalyzed by tubulin:tyrosine ligase: carboxy-terminal labeling of tubulin with [125I]monoiodotyrosine.," *Anal. Biochem.*, vol. 184, no. 2, pp. 325–9, Feb. 1990.
- [173] A. Vivekanadan-Giri, J. H. Wang, J. Byun, and S. Pennathur, "Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products identifies oxidative mechanisms of diabetic end-organ damage.," *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 9, no. 4, pp. 275–87, Dec. 2008.

- [174] C. Bertin, L. A. Weston, T. Huang, G. Jander, T. Owens, J. Meinwald, and F. C. Schroeder, "Grass roots chemistry: meta-tyrosine, an herbicidal nonprotein amino acid.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 43, pp. 16964–9, Oct. 2007.
- [175] T. Kitamura, T. Tange, T. Terasawa, S. Chiba, T. Kuwaki, K. Miyagawa, Y. F. Piao, K. Miyazono, A. Urabe, and F. Takaku, "Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 140, no. 2, pp. 323–34, Aug. 1989.
- [176] S. Fu, M. J. Davies, R. Stocker, and R. T. Dean, "Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque.," *Biochem. J.*, vol. 333 (Pt 3, pp. 519–25, Aug. 1998.
- [177] P. Dandona, P. Mohanty, H. Ghanim, A. Aljada, R. Browne, W. Hamouda, A. Prabhala, A. Afzal, and R. Garg, "The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, no. 1, pp. 355–62, Jan. 2001.
- [178] K. J. Rodgers, H. Wang, S. Fu, and R. T. Dean, "Biosynthetic incorporation of oxidized amino acids into proteins and their cellular proteolysis.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 32, no. 8, pp. 766–75, Apr. 2002.