

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

Doktori (PhD) tézis

**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

# 1. Bevezetés

Az erythropoetin (EPO) egy glikoprotein hormon, melynek termelésért elsősorban a vese kéregállományának peritubuláris fibroblasztjai felelősek. Ezeknek progresszív pusztulása krónikus vesebetegségben az EPO-termelés kiesését, ez által hypoproliferatív anaemiához vezet. Bár az EPO elsősorban az erythroid vérképzésért felelős, hatása rendkívül szerteágazó. Az EPO-receptort (EPO-R) több különböző sejttípus felszínén azonosították. A receptor aktivációja olyan további intracelluláris jelátviteli utak aktivációját idézi elő, mint a JAK/STAT, a protein kináz B, valamint a p44/42 ERK útvonal. Egyes kutatások alapján humán emlőcarcinoma sejteinek felszínén sejtosztódást és migrációt serkentő hatású, MAPK-rendszert aktiváló, folyamatosan aktív EPO-R található [1]. Az idegrendszerben több sejtcsoportban mutatták ki jelenlétét, az agy kapillárisrendszerének endothelsejtjein, a hippokampuszban, valamint a kérgi neuronok, astrocyták, mikrogliaák felszínén [2][3][4][5][6]. Ennek hátterében felmerült lipid-akkumulációra, valamint  $\beta$ -oxidációra kifejtett hatása is [7]. Egyes tanulmányok alapján harántcsíkolt izomban az EPO serkenti a zsírok oxidációját, ez által kivédi a táplálkozás okozta túlsúlyt [8].

Vizsgálataink alapját humán megfigyeléseink képezték, mivel két, Klinikánkon gondozott diabeteses beteg esetén is azt találtuk, hogy az EPO-terápia bevezetését követő 2-4 hónapban a fruktózamin 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. Bár a hosszútávú EPO-kezelés hatásai jól dokumentáltak, kevés adattal rendelkezünk a rövid távú, akut hatásokra vonatkozóan. Feltételeztük, hogy az EPO közvetlenül hatással lehet a zsírsejtek metabolikus jelátviteli útvonalaira, így közvetlenül a glukózfelvételre is.

Krónikus veseelégtelenségben a betegek életminőségét, kardiovaszkuláris rizikóját, valamint kognitív funkciójának megtartását nagyban befolyásoló tényező a renális anaemia. Egyes források szerint azonban az exogén EPO-kezelésben részesülő betegek 15%-a nem reagál megfelelően a terápiára [9]. Az ismert és gyakran tárgyalt okok között szerepel a vashiány, a L-karnitin-hiány, az alultápláltság, a B<sub>12</sub>-vitamin- vagy folsavhiány, a krónikus vérzés, a „pure red cell aplasia”, a mellékpajzsmirigy túlműködés, a terhesség, a nem effektív vesepótló kezelés, a csontvelő betegségei, valamint bizonyos esetekben az angiotenzin-konvertáló enzim gátlók szedése.

Ehrlich 1906-ban figyelte meg először, hogy rosszindulatú daganatban szenvedő betegekben létezik egy jelenség, miszerint a szervezet képes gátolni a szekunder tumor képződését. Ruggiero kísérletei alapján a tumor rezisztenciát közvetítő ágens aminosav-természetű, kis molekulású anyag. Tömegspektrométeres és kromatográfiás 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 [10][11].

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 <sup>3</sup>OH jelenlétében nem-enzimatis módon, orto- és meta-tirozin is képződik. Eddigi ismereteink alapján 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.

Ennek megfelelően feltételezhető, hogy a kóros tirozin-módosulatok fehérjékbe történő beépülése szerepet játszhat a hormon rezisztenciák, többek között az inzulin- és EPO-rezisztencia kialakulásában.

## 2. Célkitűzések

- 2.1. 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 zsírsejtek 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.
- 2.2. 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 (nagyteljesítményű folyadék kromatográfia) segítségével.
  - Célkitűzésünk volt a jelenség jelátviteli háttérének tisztázása Western blot módszerrel.

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1. Az EPO szénhidrát-anyagcserére kifejtett hatásai

**Kötőszöveti glukózmonitorozás:** CGMS (Continuous Glucose Monitoring System) folyamatos cukormonitorozó készüléket használtunk, mely a nap 24 órájában képes a beteg vércukorértékeit rögzíteni. A készüléket a betegek jól tolerálják, a CGMS-t klinikánkon a rendezetlen szénhidrát-háztartású diabetesesek körében rutinszerűen használjuk a cukorháztartás monitorozására.

**Állatkísérletek:** Az állatkísérletek elvégzését a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. Három-öt hónapos,  $300 \pm 30$  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 farok-vénájából nyerve, Accu-Check Active glukózmérővel határoztuk meg. 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) 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).

**Sejtvonal:** *In vitro* vizsgálatainkhoz 3T3-L1, egér zsírsejtvonalat használtunk. A preadipocyta formában érkező sejtvonalat  $75 \text{ cm}^2$ -es flaskákon osztottuk szét, majd a kísérletekhez 60 mm-es Petri-csészéken szélesztettük. 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 foszfatidilinozitol-3-kináz PI3K-inhibitor, LY294002-t használtuk (50  $\mu$ mol/l, 30 percig).

A zsírsejtek indító- differenciáló- és tenyésztőmédiümának 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.

**Western blot analízis:** Az inzulin- vagy r-mo-EPO kezelést követően a sejteket Trisz-Triton extrakciós pufferben lizáltuk. A fehérjekoncentrációt a „Bio Rad protein assay kit” segítségével, módosított Bradford-módszer alapján határoztuk meg. 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. A membránokat 5%-os BSA-t és 0,1% Tween-t tartalmazó trisz-NaCl oldatban blokkoltuk, majd a primer antitestekben (1:1000) 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, torma-peroxidáz (HRP) jelölt antitesttel inkubáltuk (1:2000; anti-nyúl IgG). További mosást követően a blotokat felerősített immunluminescenciával tettük láthatóvá, majd röntgenfilmen előhívtuk (Kodak XAR). Strippelést követően az össz Akt és ERK jelölést végeztük el. A denzitometriás analízist Scion Image program használatával végeztük.

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

**GLUT4 plazma membrán frakcionálása:** A zsírsejteket biotinizációt követően lizáltuk. A sejteket a csészékről felkapartuk, centrifugáltuk, majd a felülúszó fehérjetartalmát a korábban részletezett módszerrel meghatároztuk. Standard 10  $\mu$ g teljes sejtizátumot vittünk fel pozitív kontrollként. A mintákból 200  $\mu$ g-ot Pierce Streptavidin mágneses gyöngyökkel

inkubáltunk folyamatos rázással 4 °C-on, egy éjszakán át. 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.

**Az izotóp-jelzett glukózfelvétel vizsgálata:** Izotópos kísérleteink során 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-[<sup>3</sup>H]glukózt adtunk. A sejteket növekvő koncentrációjú r-mo-EPO-val, vagy inzulinnal kezeltük. A felvételt 100 perc után állítottuk meg. A sejteket a Petri-csészéről kaparással távolítottuk el, majd a médiumot centrifugáltuk. Harminc perces lízist követően (70 µl; Trisz-Triton extrakciós puffer) a mintákból 30 µl-t vettünk ki szcintillációs számlálás céljából. Ezt követően a minták fehérje-tartalmát Bio-Rad kit segítségével, spektrofotométerrel határoztuk meg. A glukózfelvételt 5 perces mérés átlagos radioaktivitása és a fehérje-koncentráció hányadosával adtuk meg [percenkénti beütés/µg (counts per minute; CPM)/µg)].

**Immuncytokémia:** GLUT4-transzlokációs vizsgálataink során tripszines emésztést követően a zsírsejteket poly-L-lizinnel borított fedőlemez darabokra tapasztottuk, majd 0,5% FBS-t tartalmazó, normál, vagy magas glukózsintű DMEM-ben tenyésztettük 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. 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. A fedőlemezeket fedtük és lézer konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

**Statisztikai analízis:** Az adatokat átlag±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. Szignifikáns különbségnek a 0,05 alatti p-értéket vettük, melyeket az ábrák és táblázatok alatt jelöltünk.

## 3.2. EPO-rezisztencia in vitro vizsgálata

**TF-1 erythroblasztok:** Kísérleteinkhez TF-1 (CRL-2003) erythroblasztokat használtunk. A tenyésztés RPMI-1640 médiumban történt. 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.

**Sejtproliferációs vizsgálatok:** A Petri-csészékre (60 mm) standard sejtszámot vittünk fel ( $2 \times 10^5$ /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  $-80^\circ\text{C}$ -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.

**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.

**Nagyteljesítményű folyadék-kromatográfia (HPLC):** A különböző tirozin-izoformák fehérjékbe történő beépülésének bizonyításához fluoreszcens HPLC-módszert alkalmaztunk. A para-, orto- és meta-tirozin szinteket reverz fázisú HPLC segítségével határoztuk meg ( $\text{C}_{18}$  szilikon oszlop, 250 x 4 mm), fluoreszcens detekcióval ( $\lambda_{\text{EX}} = 275 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{EM}} = 305 \text{ nm}$ ). A koncentrációkat külső standard segítségével határoztuk meg, az eredményeket a para-, orto-, vagy meta-tirozin és az össz-tirozin arányában fejeztük ki.

**Western blot analízis:** A r-hu-EPO-val történt kezelést követően az immunoblot a 3T3-L1 sejtek esetében részletezett módon zajlott. 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- $\beta$ -aktin (1:1 000). 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  $\beta$ -aktinra korrigálva adtuk meg.

**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.

## **4. Eredmények**

### **4.1. Az EPO szénhidrát-anyagcserére kifejtett hatásai**

#### **Humán vizsgálat alapján az EPO csökkenti az intersticiális glukózsztintet**

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.

#### **Akut vércukorszint-csökkentő hatás állatkísérletben**

A vizsgált diabeteses állatok kiindulási vércukorszintje  $24 \pm 10$  mmol/l volt, míg az egészséges patkányokban  $5 \pm 3$  mmol/l-es kiindulási vércukorszintet mértünk. Az intravénásan beadott rh-EPO minden használt dózis esetén szignifikánsan csökkentette az állatok glukózsztinjét 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. 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.

#### **EPO hatására növekszik a zsírsejtek izotóp-jelzett glukózfelvétele**

A normál glukózsztint (5 mmol/l) mellett tenyésztett zsírsejtekben szignifikáns deoxi-D- $[^3\text{H}]$ glukóz felvételt mértünk a kezeletlen kontrollokhoz képest, az összes alkalmazott inzulin-koncentráció esetén (2, 20, 200 vagy 400 nmol/l). 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.

Másrésről, a normál glukóz jelenlétében tenyésztett adipocytákban nem volt kimutatható növekedés a deoxi-D- $^3\text{H}$ glukóz felvételben egyik alkalmazott EPO-koncentrációnál sem (0,15; 0,3; 0,625; 1,25 vagy 2,5 ng/ml). 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.

A két hormon kombinációjával is végeztünk kezeléseket 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 hozzáadott EPO szignifikáns deoxi-D- $^3\text{H}$ glukóz-felvételt indukált ( $p < 0,05$ ).

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

## **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. Ezzel szemben magas glukózon tenyésztett zsírsejtek esetén az EPO-kezelés hatására jelentős Akt-foszforyláció-indukció következett be ( $p < 0,05$ ). Maximális hatást 10 ng/ml-es kezelési koncentráció esetén tapasztaltunk. Magasabb koncentrációk esetén a foszforyláció nem fokozódott tovább, de emelkedett maradt. Bizonyítottuk azt is, hogy a PI3K-inhibitor LY294002 teljesen megátolta az inzulin és az EPO indukált Akt-foszforylációt, ezzel nyilvánvalóvá vált, hogy a talált EPO hatás a PI3K/Akt útvonalon jön létre.

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

Az ERK1- és ERK2-foszforyláció vizsgálata esetén az EPO kezelés hatástalannak bizonyult normális glukóz-szint mellett, még a magasabb kezelési koncentrációk esetén is.

Magas glukóz koncentráció esetén azonban szignifikáns ERK-foszforiláció növekedést találtunk minden koncentráció esetén, a kontroll sejtekhez képest ( $p < 0,05$ ).

### **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. EPO hatására egyértelmű GLUT4 kihelyeződés történt magas glukózon tenyésztett zsírsejtek esetén. Pozitív kontrollként normális glukózon tenyésztett, inzulin-kezelt sejteket használtunk.

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

### **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 sejvonalban. Pozitív kontrollként növekvő koncentrációban K-562 sejtizátumot használtunk. Az EPO-rezisztencia modellezése zsírsejteken

### **Orto-tirozin hatására csökken az EPO indukált glukózfelvétel**

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

## **4.2. Az ortho- és meta-tirozin kezelés EPO-rezisztenciát okoz**

### **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. 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.

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.

Eredményeink megerősítésére meghatároztuk a sejtlizátumok fehérje-koncentrációját para-, orto- vagy meta-tirozinnal, EPO-val vagy EPO nélkül, 3 napig tenyésztve. 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.

### **HPLC-analízis alapján az adott tirozin-módosulat beépül a sejtet alkotó fehérjékbe**

Az erythroblasztok fehérjéinek 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 para-tirozint tartalmaztak, mint a para-tirozinnal kezelték ( $p = 0,003$ ).

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

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 ( $p < 0,001$ ). Továbbá az orto-tirozinnal és EPO-val kezelt sejtek 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 ( $p < 0,001$ ).

### **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 ( $p < 0,05$ ).

EPO hatására a para-tirozinon tenyésztett, kontroll sejteken szignifikáns ERK1- és 2-foszforiláció-növekedést figyeltünk meg. Azonban orto- és meta-tirozin jelenlétében az aktiváció szignifikánsan kisebb mértékű, tehát az EPO-kezelés hatástalannak bizonyult ( $p < 0,05$ ). Ebből arra következtethetünk, hogy orto- és meta-tirozin hatására a sejtekben EPO-rezisztencia alakul ki.

### **Az orto- és meta-tirozin stabilitásának vizsgálata HPLC-vel**

Az RPMI-1640 médium eredetileg 110,4  $\mu\text{mol/l}$  para-tirozint tartalmaz. 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. Nem tapasztaltunk szignifikáns változást az orto- vagy meta-tirozin tartalomban a 3 napos kísérlet során.

## 5. Megbeszélés

A közelmúltban az EPO számos nem-erythroid hatására derült fény. 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 [12], mi állatkísérletben akut vércukorszint-csökkentő hatást tapasztaltunk. Mások a HbA<sub>1c</sub>-szint jelentős csökkenése ellenére sem találtak EPO hatására különbséget az átlagos vércukorszintekben [13]. Mi, ezzel szemben, humán megfigyeléseink során, határozott glukózszint-csökkentő hatást láttunk CGMS-sel. 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.

Bizonyítottuk, hogy az r-hu-EPO dóziszfüggő módon csökkenti állatkísérletben a vércukorszintet már 5 perc után, mely arra utal, hogy az EPO akut glukózszintcsökkentő hatással rendelkezik *in vivo*. A rövid hatásidő pedig gyors molekuláris mechanizmusok szerepére utal. *In vitro* kísérleteket végeztünk a háttérben álló jelátviteli utak és glukózfelvétel-változások felderítése céljából.

Izotópos méréseink eredményeiből kiindulva azt feltételeztük, hogy a patkányokban tapasztalt vércukorszint-csökkenés GLUT4-transzlokációhoz köthető. Ennek alátámasztására immuncytokémiai kísérleteket végeztünk, melyeket plazmamembrán-frakcionálással erősítettünk meg. Bizonyítottuk, hogy magas glukózon tenyésztett sejtekben, EPO hatására – az inzulin hatásához hasonlóan – nőtt a membrán frakció GLUT4 tartalma, tehát transzporter kihelyeződés történt, míg a kezeletlen, kontrollcsoportban ez elmaradt. Specifikus JAK2 gátló jelenlétében az izotóp-felvételi vizsgálatot elvégezve azt láttuk, hogy a zsírsejtek EPO indukált glukóz-izotóp felvétele megtartott maradt. 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. Tekintve, hogy az EPO-kezelés csak magas glukóz mellett volt hatásos, arra következtetünk, hogy az EPO glukózcsökkentő hatása leginkább hyperglükémia esetén érvényesül. Továbbá az EPO fokozta magas glukózszint mellett az inzulin Akt-aktiváló hatását.

Mivel a diabeteses vesebetegek 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.

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 [14]. Vanasse és Berliner lehetséges magyarázataként a rövidebb vörösvértest élettartamot nevezi meg [15]. Másrészt, Dai és munkacsoportja felvetette, hogy az öregedés a mitokondriális elektron-transzportlánc elektron-csorgásán keresztül megnőtt ROS-produkcióhoz vezet [16]. 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 hemoglobin-szinttől függetlenül [17]. 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 kóreltani folyamat, az orto- és meta-tirozin sejtalkotó fehérjékbe történő beépülésének eredménye. Ez hasonló ahhoz a tényhez, hogy a halálozás nem az inzulin-dózissal, hanem magával az inzulin-rezisztenciával függ össze [18].

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.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján ismert, hogy krónikus veseelégtelen betegekben a plazma para-tirozin szintje alacsonyabb, mint az egészséges kontroll személyekben [19]. Ezzel szemben a krónikus veseelégtelen csoportban szignifikánsan magasabb vizelet orto-tirozin szintet találtunk, mint a kontrollcsoportban. A diabeteses és a diabeteses-veseelégtelen csoportban a vizelet orto-tirozin szint még magasabbnak adódott [20]. Bár egyes tanulmányok szerint nincs összefüggés az orto-tirozin szint, valamint a biológiai kor között, munkacsoportunk az orto- és meta-tirozin felhalmozódását mutatta ki cataractás szemlencsékben [21].



Míg a fenilalanin  $\alpha$ -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 az EPO - melynek eddig is sok arcát ismerhettük meg - vércukorszint-csökkentő hatással is rendelkezik. Másrészt talán magyarázatot találtunk az EPO-rezisztencia pathomechanizmusára is.

## 6. A dolgozat tézisei

### 6.1. Az EPO szénhidrát-anyagcsere hatásai

- 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-foszforiláció 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

### 6.2. Az orto- és meta- tirozin sejtfehérjékbe történő beépülése EPO-rezisztenciát okoz

- 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-foszforilációt.

## 7. Irodalomjegyzék

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] J. Rossert, C. Gassmann-Mayer, D. Frei, and W. McClellan, "Prevalence and predictors of epoetin hypo-responsiveness in chronic kidney disease patients.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 22, no. 3, pp. 794–800, Mar. 2007.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] D.-F. Dai, P. S. Rabinovitch, and Z. Ungvari, "Mitochondria and cardiovascular aging.," *Circ. Res.*, vol. 110, no. 8, pp. 1109–24, Apr. 2012.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.

## 8. A disszertációhoz csatlakozó közlemények jegyzéke

Mikolás E, Cseh J, Pap M, Szijártó I A, Balogh A, Laczy B, Bekő V, Fisi V, Mérei A, Molnár G A, Szeberényi J, Wittmann I

Effects of erythropoietin on glucose metabolism

**HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 44:**(4) pp. 279-285. (2012) IF: 2,145

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: 1,820 (2013)

Összesített impakt faktor: 3,965

Citációk száma: 3

## 9. Publikációs lista

1. Szijarto IA, Molnar GA, Mikolas E, Fisi V, Cseh J, Laczy B, Kovacs T, Boddi K, Takatsy A, Gollasch M, Koller A, Wittmann I  
Elevated Vascular Level of ortho-Tyrosine Contributes to the Impairment of Insulin-Induced Arterial Relaxation.  
*HORMONE AND METABOLIC RESEARCH* 46:(11) pp. 749-752. (2014) IF: 2,038 (2013)
2. 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: 2,989 (2013)
3. 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: 1,710 (2013)
4. 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)
5. 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: 3,013
6. 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

7. Markó L, Mikolás E, Molnár G A, Wagner Z, Kőszegi T, Szijártó I A, Mohás M, Matus Z, Szabó Z, Böddi K, Mérei Á, Wittmann I  
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)
8. Vas T, Markó L, Mohás M, Cseh J, Mikolás E, Szijártó I, Wittmann I  
Cardiovascularis rizikócsökkenés vesebetegekben  
**GRANUM** 11:(4) pp. 17-22. (2008)
9. 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)
10. 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
11. 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: 12,988

Citációk száma: 179

## 10. 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: Fábián 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 Andrást, 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.