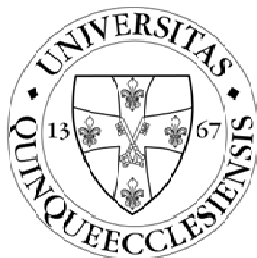


**A glukagon, glukagon-szerű peptid-1 és a GLP-1 receptor agonisták
vazodilatációs hatása, valamint az oxidatív stressz hatása a vazoaktivitásukra**

Doktori (Ph.D.) tézisei

Dr. Sélley Eszter



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,

II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum

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

Programvezető: Prof. Dr. Wittmann István

Témavezető: Dr. Molnár Gergő Attila

Pécs, 2016

1. Bevezetés

A 160 aminosavból álló proglukagonból termelődik a hasnyálmirigy α -sejtjeiben a glukagon, egy polipeptid hormon, valamint a vékonybél L-sejtjeiben az inkretin hormonok, a glukagon-szerű peptid-1 és -2 (GLP-1 és GLP -2) (1). A glukagon ellensúlyozza a vércukorszintet csökkentő inzulin metabolikus hatását, azonban az étkezés hatására termelődő aktív GLP-1 serkenti az inzulin elválasztását (1).

A glukagon a vércukorszintet növelő hatáson kívül több extrahepatikus hatással is rendelkezik (1). A szívben pozitív kronotróp és inotróp hatású, a gasztrointesztinális rendszerben simaizom relaxáns, valamint számos szervben csökkenti az érellenállást (1). Habár korábban is felvetették a glukagon vazodilatátor hatását például nyulak veseartériájában (2), mostanáig nem bizonyították közvetlenül, hogy a glukagon bizonyos erekben vazodilatációt vált ki, valamint annak pontos mechanizmusa sem került leírásra.

A vércukorszintet csökkentő tulajdonsága miatt a natív GLP-1 hosszú élettartamú analógjait a 2-es típusú cukorbetegség gyógyításban széleskörűen alkalmazzák (3). A GLP-1 mimetikumoknak antidiabetikus hatásuk mellett előnyös kardiovaszkuláris tulajdonságaik is közismertek (4). Kevésbé bizonyított azonban, hogy a natív GLP-1 relaxál bizonyos artériákat, mely jelenség magyarázhatja a GLP-1 mimetikumok vérnyomáscsökkentő hatását (5).

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a natív GLP-1 dóziszfüggő módon vazodilatációt vált ki a patkányok mellkasi aortájában, valamint a tüdő- és comb artériájában. Leírták, hogy a vazodilatációban a nitrogén monoxid, ciklikus adenosin- monofoszfát (cAMP), és az ATP-szenzitív kálium csatornák vesznek részt, ugyanakkor a pontos mechanizmus nem tisztázott (5,6,7).

A GLP-1 receptor agonista exendin-4-ről (exenatid) már korábban kimutatták, hogy a patkány aortában dóziszfüggő módon vazodilatációt vált ki, mindazonáltal a pontos mechanizmus nem került leírására (6).

Egy másik GLP-1 mimetikum, a liraglutid, a pitvari nátriuretikus peptid (ANP) szekréciójának fokozásával jelentős vérnyomáscsökkenést vált ki kísérletes körülmények között (8). Bizonyított, hogy nitrogén-monoxid képződést indukál vaszkuláris endotélsejtekben (9), azonban a direkt vazodilatátor képességéről korábban nem volt adat.

Az oxidatív stressz folyamatok szerepet játszanak többek között a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásában és progresszójában (10).

Hidroxil szabad gyök hatására fenilalaninból a fiziológiás para-tirozin mellett meta- és orto-tirozin is képződik. A para-tirozin a szabadgyökös útnál jóval nagyobb mennyiségben képződik enzimatis úton, míg a meta- és orto-tirozin kizárólag szabadgyökös úton keletkezik. A fiziológiás- és a kóros tirozin-izomerek megváltozott aránya szerepet játszhat az inzulin- az acetilkolin- és az eritropoietin-rezisztencia kialakulásban (11, 12).

Munkacsoportunk korábbi eredményei arra utaltak, hogy az érfalban az oxidatív stressz hatására felhalmozódó oxidált aminosavak (meta-es orto-tirozin) fontos szerepet játszhatnak a különböző artériaszakaszok károsodott inzulin indukálta vazoaktív képességben (13).

Bizonyított, hogy ezen aminosavak sejtfehérjékbe képesek beépülni, jelátviteli utakat módosíthatnak, ezáltal hormonrezisztenciákat okozhatnak, mely kivédhető lehet a fiziológiás izoforma, a para-tirozin szupplementációjával (14).

2. Célkitűzések

2.1 A glukagon, a GLP-1 valamint a GLP-1 mimetikumok vazoaktivitásának vizsgálata

- Célul tűztük ki, hogy közvetlen bizonyítékot szolgáltatassunk arra, hogy a glukagon *in vitro* vazodilatációt vált ki a patkány aortában.
- Célunk volt meghatározni a glukagon-által indukált vazodilatáció mediátorait.
- Össze kívántuk hasonlítani a glukagon, a GLP-1 és az inzulin vazodilatációs potenciálját.
- Célunk volt igazolni, hogy az exenatid és a liraglutid patkány mellkasi aortában *in vitro* vazodilatációt okoz.
- Célul tűztük ki annak bizonyítását, hogy az exenatid és a liraglutid által kiváltott vazodilatációban szerepe van három gázotranszmitternek, név szerint a nitrogén-monoxidnak (NO), a szén-monoxidnak (CO) és a kén-hidrogénnek (H₂S).
- Tisztázni kívántuk az exenatid és a liraglutid által kiváltott vazodilatáció további mediátorait.

2.2 A oxidatív stressz szerepe a liraglutid- és az inzulin- kiváltotta vazodilatációban

- Bizonyítani kívántuk, hogy a fiziológias aminosav para-tirozin képes a hiperkoleszterinémia és oxidatív stressz hatására megnövekedett érfali patológias tirozin tartalmat helyreállítani, ezáltal csökkentve a funkcionális vaszkuláris károsodást.

3. Módszerek

3.1 Vazoreaktivitási kísérletek

A glukagon, az inzulin, a glukagon-szerű peptid-1, az exenatid és a liraglutid vasoaktív hatását felnőtt patkányok izolált mellkasi aortáján vizsgáltuk. Az állatkísérletek elvégzését a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. A liraglutid vasoaktív hatását patkány femorális artérián is vizsgáltuk. Az állatokat éternarkózisban dekapitáltuk, majd a mellkasi aortát illetve a femorális artériát izoláltuk és jéghideg, oxigenizált (95% O₂/5% CO₂) Krebs oldatba helyeztük (119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM MgSO₄, 11,1 mM glucose, 1,6 mM CaCl₂*2H₂O, pH 7,4). Két milliméteres érszakaszokat fűztünk fel egy miográf celláiba, majd a normalizálási folyamatot követően inkubáltuk azokat a vazodilatáció feltételezett mediátorainak gátlóival. Ezt követően 100 nM epinefrinnel összehúztuk az ereket, majd növekvő koncentrációban adagoltunk a miográf kamrájába a vazodilatátort, az inzulint, a glukagont, a GLP-1-et, az exenatidot vagy a liraglutidot. A glukagon által kiváltott vazodilatáció mechanizmusának megállapítása céljából vizsgáltuk a glukagon-receptor és a GLP-1-receptor szerepét is. A glukagon, az exenatid és a liraglutid által kiváltott vazodilatáció mechanizmusának tisztázása céljából előinkubáltuk az érszakaszokat a gáztranszmitterek, a nitrogén-monoxid (NO), a szén-monoxid (CO), valamint a kén-hidrogén (H₂S) képződését gátló anyagokkal (L-NAME, Tin-protoporphyrin, D-L-propargylglycin); reaktív oxigéntermékek képződésének gátlóival (szuperoxid-dizmutáz, kataláz); NADPH-oxidásgátlóval (diphenyleneiodonium klorid), prosztaglandinszintézis-gátlóval (indimetacin); proteinkinázok gátlóival (H89 és 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one); káliumcsatornák (tetraethylammonium, glibenklamid, XE991) valamint a Na⁺/Ca²⁺-cseretranszporter gátlójával (SEA0400).

3.1.1. Statisztikai analízis

Az eredményeket a Myodaq 2.01 M610+ program segítségével jelenítettük meg. Az inzulin, a GLP-1, a glukagon, az exenatid, illetve a liraglutide által kiváltott vazorelaxációt az epinefrin által kiváltott kontrakció százalékában adtuk meg.

Statisztikai analízis céljából az SPSS 22.0-ás verzióját, valamint GraphPad Prism 6.0-ás verzióját használtuk. Az összehasonlítást repeated measures ANOVA-val illetve Bonferroni post hoc teszttel végeztük. Az eredmények átlag±SE formájában szerepelnek. A 0,05 alatti P értékeket tekintettük szignifikánsnak.

3.2 Metabolikus állatmodell

3.2.1. Állatok

Az állatkísérletek elvégzését a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. Oxidatív stressz vizsgálatunkat négyhetes Sprague-Dawly patkányokkal kezdtük. Az állatokat három csoportba osztottuk.

A kontrol csoportban hagyományos tápot kaptak az állatok (n=10), a koleszterin-táplált csoportban (n=10) magas zsírtartalmú diétában részesültek (70 kalória% zsír), míg a harmadik csoportban (n=10) az állatok a magas zsírtartalmú diéta mellett para-tirozin szupplementációban (1,76 mg/die) részesültek 16 héten keresztül.

A kísérlet napján az állatokat éterrel elkábítottuk, majd szívpunkció segítségével vért vettünk, a mellkasi aortát izoláltuk majd eltávolítottuk.

3.2.2. Vazoreaktivitási kísérletek

Az inzulin és a liraglutid kiváltotta érválaszt DMT multi-miográf segítségével vizsgáltuk. Normalizációt követően epinefrinnel kontrakciót váltottunk ki az ereken, majd növekvő dózisu inzulint vagy liraglutidot adagoltunk a kamrába.

3.2.3. Metabolikus paraméterek vizsgálata

A koleszterin koncentrációját enzimatikus módszerrel, spektrofotometriásan határoztuk meg. A plazmainzulin-szintet ELISA módszerrel (Rat Ultrasensitive Insulin ELISA kit, Alpcó), mikro-plate spektrofotométerrel mértük.

3.2.4. Tirozin izoformák mennyiségének mérése a patkány mellkasi aortában

A vizsgálatot megelőző éjszaka az ér azonos hosszúságú szakaszait 120°C-on sósavban hidrolizáltuk, majd a precipitátumot centrifugáltuk, leszűrtük. Az ér para-, és meta-tirozin tartalmát reverz-fázisú magasnyomású folyadékkromatográfia (rpHPLC) segítségével, fluoreszcens detekcióval vizsgáltuk ($\lambda_{EX}=275$ nm; $\lambda_{EM}=305$ nm).

3.2.5. Statisztikai analízis

A statisztikai vizsgálatokat az SPSS program 22.0 verziójával, valamint a GraphPad Prism 6.0-ás verziójával végeztük. A normalitás vizsgálatára Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. A csoportok között összehasonlítást Student's t-teszttel vagy ANOVA-val, Bonferroni post hoc teszttel végeztük. Nem normál eloszlású adatok esetén Kruskal-Wallis

tesztet követően Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk, míg a tendencia megállapítására Jonckheere-Terpstra tesztet használtunk. Az eredmények átlag \pm SE vagy medián (interkvartilis érték) formájában szerepelnek. A 0,05 alatti P értékeket tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. A glucagon és a glukagon-szerű peptid analógok vazóaktív hatása

4.1.1. Glukagon

A glukagon tágítja a patkány mellkasi aortát

A glukagon dóziszfüggő vazodilatációt okoz a patkány mellkasi aortában, mely hasonló nagyságú az inzulin által kiváltott vazodilatációhoz, ugyanakkor nagyobb, mint a GLP-1(7-36) amid által okozott.

Receptorális kölcsönhatás a glukagon, a GLP-1, a glukagon-receptor valamint a GLP-1 receptor között

A GLP-1 által okozott vazodilatáció részben a glukagon receptorán keresztül jön létre. A glukagon indukálta vazodilatáció főleg a glukagon-receptoron, de kisebb részben a GLP-1 receptorán keresztül alakul ki, az ér endotéliumától függetlenül.

A glukagon által előidézett vazodilatáció további közvetítői

Jelentős szerepet játszanak még a vazodilatációban a gáztranszmitterek, a prosztaglandinok, a NADPH-oxidáz enzim, szabad gyökök, káliumcsatornák és a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseretranszporter.

4.1.2. Exenatid

Az exenatid a GLP-1 receptoron keresztül okoz vazodilatációt

Az exenatid szintén dóziszfüggő vazodilatációt okoz a patkány mellkasi aortában, mely eredményeink alapján a GLP-1-receptor közvetítésével jön létre.

Az exenatid által kiváltott vazodilatáció mediátorai

Az exenatid elsősorban kén-hidrogén, kisebb részben nitrogén-monoxid és szén-monoxid közvetítésével relaxálja az ereket. A vazodilatációban szerepe van még a prosztaglandinoknak és a szuperoxid szabad gyöknek is. A szolubilis guanilát cikláz enzim (sGC) gátlása kivédte a vazodilatációt. Azt találtuk, hogy a vazodilatációban az ATP-szenzitív- a feszültség-függő- valamint a nagy vezetőképességű, kalcium aktiválta káliumcsatornáknak is van szerepe, de láthatólag a KCNQ- típusú feszültség-függő kálium csatornák gátlása vezetett a legnagyobb arányú csökkenéshez az exenatid által kiváltott

vazodilatációban. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseretranszporter gátlása szinte teljesen kivédte a vazodilatációt.

4.1.3. Liraglutid

A liraglutid vazóaktív hatása

Kísérleteink alapján a liraglutid szintén relaxálja a patkány mellkasi aortát és a femorális artériát *in vitro*. A relaxáció dóziszfüggő módon jött létre.

A liraglutid által kiváltott vazodilatáció hatásmechanizmusa

Eredményeink alapján a liraglutid aktiválja az endotélsejteket és a vaszkuláris simaizomsejteket, ezáltal NO, CO, H_2S , szuperoxid szabad gyök és hidrogén-peroxid termelődést okoz. Ezen mediátorok megnövekedett képződése hozzájárul a protein kináz-A és -G (PKA és PKG) aktivációjához, mely káliumcsatornák (ATP-szenzitív-, feszültségfüggő-, és nagy vezetőképességű, kalcium aktiválta) aktivációját eredményezi, ami pedig végül aktiválja a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseretranszportert, ezáltal kalcium kiáramláshoz, simaizom relaxációhoz illetve vazodilatációhoz vezetve.

4.2. Az oxidatív stressz hatása koleszterinnel etetett patkányokban

Metabolikus paraméterek a koleszterinnel etetett, valamint a para-tirozin szupplementációban részesülő patkányokban

Oxidatív stressz vizsgáltunk során a koleszterinnel etetett csoportban szignifikánsan magasabb plazma-koleszterin szintet mértünk, ugyanakkor a plazma-koleszterin szint nem különbözött szignifikánsan a koleszterinnel etetett és a koleszterinnel etetett és para-tirozin szupplementációban részesülő csoportok között. A glukóz-stimulációt követő inzulin-szekréció csökkent volt a koleszterinnel etetett csoportban, míg a para-tirozin szupplementációban is részesülő csoportban nem különbözött a kontrolokétól.

Az érfali tirozin-izomerek koncentrációjának változása koleszterin etetés valamint para-tirozin-szupplementáció hatására

A koleszterinnel etetett állatoknál tapasztalt emelkedett érfali meta-tirozin/para-tirozin arány kivédhető volt para-tirozin szupplementációjával.

Liraglutidra- és inzulinra adott vaszkuláris válasz koleszterin etetés valamint para-tirozin-szupplementáció hatására

A koleszterin etetés hatására létrejött vaszkuláris inzulin- és liraglutid-rezisztencia szintén kivédhető volt para-tirozinnal.

5. Megbeszélés

5.1. A glukagon indukálta vazodilatáció mechanizmusa

A glukagon dóziszfüggő vazodilatációt okoz a patkány mellkasi aortában *in vitro*, mely a glukagon-receptoron és a GLP-1 receptoron keresztül valósul meg. Metabolikus hatásairól ismert, hogy a glukagon-receptoron keresztül alakulnak ki (1), azonban mostanáig nem vizsgálták a receptor szerepét a glukagon indukálta vazodilatációban. Ugyanakkor a GLP-1 által okozott vazodilatáció szintén részben a glukagon-receptoron keresztül jön létre. Így tehát, lehetséges, hogy a két hormon és a receptoraik között átfedés van.

Ahogy már korábban említettük, a 2-es típusú cukorbetegség kezelésében széleskörűen használják a natív GLP-1 hosszú élettartamú analógjait, valamint az inkretin hormonokat lebontó dipeptidyl peptidáz-4 enzim gátlóit (3). Ezen gyógyszerek a GLP-1 szintjének emelése által hatnak, ugyanakkor a glukagon szintjét csökkentik (15). A natív GLP-1-hez hasonlóan, annak analógjai is vazodilatációt okoznak (6). Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a GLP-1 szintjét növelő gyógyszerek esetleg előidézhettek vazodilatációt a glukagon receptorán keresztül is. Sőt, a glukagon, valamint a receptora lehetséges célpontok a 2-es típusú cukorbetegség és annak szövődményeinek kezelésében (16).

A nitrogén- monoxid valamint a prosztaglandinok szerepét már korábban felvetették a glukagon által előidézett vazodilatációban (17), azonban mi tovább mentünk, és bemutatjuk, hogy a másik két gáztanszmitter, a szén-monoxid és a kén-hidrogén, valamint a szuperoxid anion és a hidrogén-peroxid is részt vesznek benne. A NADPH oxidáz enzim által mediált szabadgyök képzés befolyásolása révén a glukagon a szolubilis guanilát cikláz- cGMP-protein kináz-G útvonalon keresztül is indukálhat érelernyedést, valamint a káliumcsatornák, és a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - cseretranszporter aktivációja által is vazodilatációt válthat ki.

5.2. Az exenatid és a liraglutid által indukált vazodilatáció mechanizmusa

Mind a GLP-1-ről, valamint a hozzá hasonló molekulákról ismert, hogy centrális és perifériás erekben is okoznak vazodilatációt, ugyanakkor nem tisztázott a GLP-1 receptor szerepe az értágulat kiváltásban, mivel mind GLP-1 receptor-függő, mind GLP-1 receptor-független mechanizmusokat leírtak (18). *Glp1r*^{-/-} egerekben a natív GLP-1 csökkentette az iszkémia-reperfúziós károsodást, valamint cGMP termelődés fokozása révén növelte a koronária-áramlást (18). Azonban ugyanezen vizsgálat mutatta ki azt is, GLP-1 glikémiás és kardioprotektív hatása GLP-1 receptor-függő (18).

Olyan eredmények is születtek már, melyek felvetik, hogy a GLP-1 a receptorától függetlenül okoz vazodilatációt, legalábbis a patkány mellkasi aortában, mely hatás azonban független a metabolikus hatásaitól (6).

Saját vizsgálatunkban, az exenatid GLP-1 receptor-függő módon okozott vazodilatációt, míg a liraglutid esetében nem vizsgáltuk a receptor szerepét. Kimutattuk, hogy a liraglutid a femorális artériában sokkal erőteljesebb vazodilatátor, mint a mellkasi aortában.

Az exenatid és a liraglutid jelen vizsgálatainkban részben endotéliumtól-függő vazodilatációt okoztak, mely azonban ellentétes egy korábbi vizsgálattal, amelyben a GLP-1 vasoaktív hatása endotéliumtól független volt (6). Míg korábban csak a nitrogén-monoxid szerepét vetették fel a GLP-1 mimetikumok által okozott vazodilatációban (6), vizsgálataink során kimutattuk, hogy mindhárom gáztranszmitter szerepet játszik benne. Elsőként mutattuk ki továbbá azt is, hogy a szabadgyököknek, prosztaglandinoknak, protein kináz A-nak és G-nek valamint a káliumcsatornáknak és a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - cseretranszporternek is szerepe van a GLP-1 mimetikumok által előidézett vazodilatáció létrejöttében.

Ismert, hogy GLP-1 mimetikumok mind a szisztolés mind a disztolés vérnyomást csökkentik, vizsgálatainkban azonban *in vitro* bizonyítottuk, hogy az exenatid és a liraglutid csökkentheti a centrális vérnyomást is. Eredményeinknek a klinikai kontextusban is jelentősége van, hiszen a centrális vérnyomás jó előjelzője a kardiovaszkuláris eseményeknek (19).

5.3. Az oxidatív stressz hatása a liraglutid- és az inzulin által kiváltott vazodilatációra

A 2-es típusú cukorbetegség kezelése a patomechanizmus megismerése által sokat fejlődött az elmúlt évtizedekben (20).

Az ominózus oktettként szokás emlegetni a glükóz-intolerancia kialakuláshoz vezető faktorokat: inzulinrezisztencia a hasnyálmirigy β -sejteiben, az izmokban, a májban valamint az agyban, inkretin-rezisztencia vagy hiány, hiperglukagonémia, megnövekedett glükóz reabszorpció, felgyorsult lipolízis (20). Ezen faktorok felismerésének hatására paradigmaváltás következett be a kezelésben, ugyanakkor a betegség megelőzésének fontosságát továbbra sem lehet eléggé hangsúlyozni.

A háttérben zajló molekuláris folyamatok pontosabb megértése révén hatékonyabb megelőzésre lenne lehetőség.

A magas zsírtartalmú diéta által indukált túlsúly világszerte a legnépszerűbb állatmodell a 2-es típusú cukorbetegség vizsgálatában (21). Vizsgálatunkban az állatok nem lettek túlsúlyosak, ugyanakkor hiperkoleszterinémiásak lettek, valamint rendelkeztek egy 2-es

típusú cukorbetegségre jellemző tulajdonsággal, a csökkent glukóz stimulálta inzulinszekréció jelenségével. Vizsgálatainkban a koleszterinnel előidézett csökkent glukóz-stimulálta inzulinszekréció javítható volt a fiziológiás aminosav, para-tirozin szupplementációjával. Ez alátámasztja a feltételezésünket, mely szerint a para-tirozin hatékony lehet az oxidatív stressz indukálta károsodott inzulin válasz javításában.

Ismert, hogy az oxidatív stressz marker orto-tirozin szintje emelkedett 2-es típusú cukorbetegségben, valamint azt is leírták, hogy diabéteszes majmok aortájának fehérjében is emelkedett az orto-tirozin koncentrációja (22, 23). Szintén ismert a reaktív oxigén termékek szerepe a cukorbetegséghez társuló endoteliális diszfunkció kialakulásában (24).

Jelen vizsgálat egy kísérletsorozat része, melyben a patológiás és fiziológiás tirozin izoformák lehetséges szerepét vizsgáltuk. Korábbi, legelső vizsgálatunkban a centrális erekben magasabb orto-tirozin koncentrációt találtunk, míg ennek koncentrációja a perifériás erek felé haladva csökkent. Ezzel ellentétesen változott az inzulin-indukálta relaxáció mértéke, ez a periféria felé nőtt (25). Második vizsgálatunkban 4 hetes orális orto-tirozin kezeléssel emelkedett vaszkuláris orto-tirozin koncentrációt idéztünk el, ezzel együtt megfigyeltük az erek csökkent válaszkészségét inzulinra (13).

Jelen vizsgálatunkban a hiperkoleszterinémia által kiváltott vaszkuláris liraglutid- és inzulinrezisztenciához vezető emelkedett érfali meta-tirozin tartalom helyreállítható volt a fiziológiás aminosav, para-tirozin szupplementációjával. A klinikai jelentősége ennek abban rejlik, hogy egy fiziológiás anyag alkalmas lehet az oxidatív stressz indukálta funkcionális vaszkuláris károsodás kivédésére.

6. A dolgozat tézisei

1. A glukagon a glukagon- és a GLP-1 receptor közvetítésével dóziszfüggő vazodilatációt okoz *in vitro*.
2. A glukagon által kiváltott vazodilatáció további közvetítői a NADPH-oxidáz enzim, szabad gyökök, gáztranszmitterek, prosztaglandinok, protein kináz-A, szulubilis guanilát cikláz enzim, kálium csatornák valamint a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseretranszporter.
3. A natív GLP-1 által kiváltott vazodilatáció is részben a glukagon-receptoron keresztül valósul meg.
4. A GLP-1 mimetikum exenatid és liraglutid dóziszfüggő vazodilatációt okoznak a patkány mellkasi aortában *in vitro* H_2S , valamint NO, CO, $\text{O}_2^{\cdot-}$ és prosztaglandinok közvetítésével, mely hatást a protein kináz-A és a protein kináz –G is mediálhatja. Ezen jelátvivők gerjesztése által az exenatid és a liraglutid befolyásolja még káliumcsatornák valamint a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseretranszporter működését.
5. A liraglutid a femorális artériában nagyobb mértékű vazodilatációt idéz elő, mint a mellkasi aortában.
6. Koleszterinnel való táplálás hatására megnövekszik a patkány mellkasi aorta falának meta-tirozin tartalma, mely csökkent vaszkuláris válaszkészséggel jár liraglutid illetve inzulin hatására.
7. A fiziológias aminosav para-tirozin szupplementációja helyreállítja a hiperkoleszterinémia által előidézett emelkedett érfali meta-tirozin koncentrációt, ezáltal csökkentve a funkcionális vaszkuláris károsodást.

7. Irodalomjegyzék

1. Mayo KE, Miller LJ, Bataille D et al. International Union of Pharmacology. XXXV. The Glucagon Receptor Family. *Pharmacol Rev* 2003; 55:167–194.
2. Gagnon G, Regoli D, Rioux F: Studies on the mechanism of action of glucagon in strips of rabbit renal artery. *Br J Pharmacol* 1980; 69: 389–396.
3. Verspohl EJ: Novel therapeutics for type 2 diabetes: incretin hormone mimetics (glucagon-like peptide-1 receptor agonists) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Pharmacol Ther* 2009; 124:113-138.
4. Petrie JR: The cardiovascular safety of incretin-based therapies: a review of the evidence. *Cardiovasc Diabetol* 2013; 12:130.
5. Nyström T, Gonon AT, Sjöholm A, Pernow J.: Glucagon-like peptide-1 relaxes rat conduit arteries via an endothelium-independent mechanism. *Regul Pept* 2005; 125:173-177.
6. Green BD, Hand KV, Dougan JE, McDonnell BM, Cassidy RS, Grieve DJ: GLP-1 and related peptides cause concentration-dependent relaxation of rat aorta through a pathway involving KATP and cAMP. *Arch Biochem Biophys* 2008, 478:136–142.
7. Golpon HA, Puechner A, Welte T, Wichert PV, Feddersen CO: Vasorelaxant effect of glucagon-like peptide-(7-36)amide and amylin on the pulmonary circulation of the rat. *Regul Pept* 2001; 102:81-86.
8. Kim M, Platt MJ, Shibasaki T, Quaggin SE, Backx PH, Seino S, Simpson JA, Drucker DJ: GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nat Med* 2013; 19:567-575.
9. Hattori Y, Jojima T, Tomizawa A, Satoh H, Hattori S, Kasai K, Hayashi T: A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia* 2010; 53:2256-2263.
10. Molnár GA, Mikolás E, Szijártó IA, Kun Sz, Sélley E, Wittmann I.: Tyrosine isomers and hormonal signaling: A possible role for the hydroxyl free radical in insulin resistance. *World J Diabetes* 2015; 6: 500–507.
11. Rudich A, Kozlovsky N, Potashnik R, Bashan N. Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol* 1997; 272:935–940.
12. 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 Rep.* 2014.
13. Szijártó I. A., Molnár G. A., Mikolás E., Fisi V., Cseh J., Laczy B., Kovács T., Böddi K., Takátsy A., Gollasch M., Koller Á., Wittmann I.: Elevated Vascular Level of ortho - Tyrosine Contributes to the Impairment of Insulin-Induced Arterial Relaxation. *Horm Metab Res.* 2014; 46(11):749-752.
14. Mikolás E., Kun Sz., Laczy B., Molnár G. A., 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 Press Res* 2013;38:217-225.
15. Drucker DJ: The biology of incretin hormones. 2006; 3:153–165.
16. XC. Li, JL. Zhuo: Targeting glucagon receptor signalling in treating metabolic syndrome and renal injury in Type 2 diabetes: theory versus promise. *Clin Sci* 2007

113: 183–193.

17. Tolins JP: Mechanisms of glucagon-induced renal vasodilation: role of prostaglandins and endothelium-derived relaxing factor. *J Lab Clin Med* 1992; 120:941-948.
18. Ban K, Noyan-Ashraf M.H, Hoefler J, Bolz S-S, Drucker DJ, Husain M: Cardioprotective and Vasodilatory Actions of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Are Mediated Through Both Glucagon-Like Peptide 1 Receptor–Dependent and –Independent Pathways. *Circulation* 2008; 117:2340-2350.
19. Williams B, Lacy PS, Thom SM, Cruickshank K, Stanton A, Collier D, Hughes AD, Thurston H, O'Rourke M; CAFE Investigators; Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial Investigators; CAFE Steering Committee and Writing Committee: Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation* 2006, 7; 113.
20. DeFronzo RA: From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes* 2009; 58: 773–795.
21. Peyot ML, Pepin E, Lamontagne J, Latour MG, Zarrouki B, Lussier R et al. Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass. *Diabetes* 59:2178-87; 2010.
22. Pennathur S , Wagner J D , Leeuwenburgh C , Litwak K N , Heinecke J W .A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease . *J Clin Invest* 2001; 107 : 853–860
23. Molnár GA, Wagner Z, Markó L, Kőszegi T, Mohás M, Kocsis B, Matus Z, Wagner L, Tamaskó M, Mazák I, Laczy B, Nagy J, Wittmann I: Urinary ortho-tyrosine excretion in diabetes mellitus and renal failure: Evidence for hydroxyl radical production. *Kidney Int* 2005; 68:2281-2287.
24. Pieper GM, Langenstroer P , Siebeneich W . Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 145–156.
25. 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 Radic Res* 2014; 48:749-757.

8. A disszertációhoz csatlakozó közlemények jegyzéke

Sélley E, Kun S, Szijártó IA, Laczy B, Kovács T, Fülöp F, Wittmann I, Molnár GA: Exenatide induces aortic vasodilation increasing hydrogen sulphide, carbon monoxide and nitric oxide production. *Cardiovasc Diabetol* 2014, 13:69. doi: 10.1186/1475-2840-13-69. IF: 3,67

Sélley E, Molnár GA, Kun S, Szijártó IA, Laczy B, Kovács T, Fülöp F, Wittmann I: Complex vasoactivity of liraglutide. Contribution of three gasotransmitters. *Art Res* 2015, doi:10.1016/j.artres.2015.04.001. IF:-

Selley E, Kun S, Kürthy M, Kovacs T, Wittmann I, Molnar GA: Para-Tyrosine Supplementation improves insulin- and liraglutide- induced vasorelaxation in cholesterol-fed rats. *Protein Pept Lett* 2015, 22:736-742. IF: 1,06

Selley E, Kun S, Szijártó IA, kertész M, Wittmann I, Molnar GA: Vasodilator effect of glucagon. Receptorial crosstalk among glucagon, GLP-1 and receptor for glucagon and GLP-1. *Horm Metab Res* 2016;48: 1–8. IF: 2,12

8.1. A disszertációhoz nem csatlakozó közlemények listája

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 Rep* 2014 Apr 3. IF: 1,52

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 Press Res* 2014 Apr 9;38(2-3):217-225. IF: 1,82

Molnár GA, Laczy B, **Sélley E**, Kun S, Wittmann I: Az antidiabeticumok és a cardiovascularis kockázat. *Diabetol Hungarica* 22, 103-110, 2014. 03. IF:-

Gergő A Molnár, Esztella Zsóka Mikolás, István András Szijártó, Szilárd Kun, **Eszter Sélley** and István Wittmann. Tyrosine isomers and hormonal signaling. Possible role of hydroxyl free radical in insulin resistance. *World J Diab* 2015. IF:-

Kun S, Molnár GA, **Sélley E**, Szélig L, Bogár L, Csontos C, Miseta A., Wittmann I. Insulin therapy of non-diabetic septic patients is predicted by para-tyrosine/phenylalanine ratio and by hydroxyl radical-derived products of phenylalanine. *Oxidative Med* 2015. IF: 3,51

Molnár GA, Kun S, **Sélley E**, Kertész M, Szélig L, Csontos C, Böddi K, Bogár L, Miseta A, Wittmann I: Role of Tyrosine Isomers in Acute and Chronic Diseases Leading to Oxidative Stress - a review. *Curr Med Chem*. 2016 Jan 18. IF: 3,85

Brasnyó P, Kovács T, Molnár GA, **Sélley E**, Kun Sz, Vas T, Laczy B, Fekete K, Kovács K, Meszáros GL, Winkler G, Sümegi B and Wittmann I.: Resveratrol Causes Gender-dependent and Bardoxolone Methyl-like Effects in Patients with IgA Nephropathy: Pilot Study. *J Nutr Food Sci* 2016, 6: 442. DOI: 10.4172/2155-9600.1000442. IF: 1,2

Összesített impakt faktor: 18,66

Független hivatkozások száma: 14

8.2. Konferencia-prezentációk

Kun Szilárd, Mikolás E., Sélley E., Wittmann I.: Az oxidált aminosav, orto-tirozin szerepe az erythropoetin-rezisztencia kialakulásában. I. MATHINÉ Budapest, 2013.03.21.

Sélley Eszter, Kun Sz., Molnár G., Degrell P., Kürthy M., Kovács T., Wittmann I.: Para-tirozin szupplementáció javítja az inzulin- és a liraglutide-kiváltotta vazorelaxációt koleszterinnel etetett patkányokban. II. MATHINÉ Budapest, 2014.03.14.

Mikolás Esztella Zsóka, Kun Sz., Laczy B., Molnár G.A., Sélley E., Kőszegi T., Wittmann I.: A cukorbetegben tapasztalt korai anaemia lehetséges oka. II. MATHINÉ Budapest, 2014.03.14.

Sélley Eszter, Molnár G.A., Kun Sz., Szijártó I.A., Laczy B., Kovács T., Fülöp F., Wittmann I. A liraglutid komplex vasoaktív hatása. Három gázmolekula jelátvivő szerepe. MDT XXII. Kongresszusa Szeged, 2014.04.26.

Kun Szilárd, Sélley E., Szijártó I.A., Laczy B., Kovács T., Fülöp F., Wittmann I., Molnár G.A. Az exenatid a kén-hidrogén, a szén-monoxid és a nitrogén-monoxid termelődésének fokozása révén kelthet centrális vasodilatációt. MDT XXII. Kongresszusa Szeged, 2014.04.26.

Mikolás Esztella, Kun Sz., Laczy B., Molnár G.A., Sélley E., Kőszegi T., Wittmann I. A cukorbetegségben tapasztalt korai anaemia lehetséges oka. MDT XXII. Kongresszusa Szeged, 2014.04.26.

Molnár Gergő Attila, Sélley E., Kun Sz., Degrell P., Kürthy M., Kovács T., Wittmann I. Paratirozin szupplementáció javítja az inzulin- és a liraglutid kiváltotta vasorelaxációt koleszterinnel etetett patkányokban. MDT XXII. Kongresszusa Szeged, 2014.04.26.

Mikolás Esztella, Kun Sz., Laczy B., Molnár G.A., Sélley E., Kőszegi T., Wittmann I.: Az orto- és meta-tirozin beépülés in vitro erythropoetin-rezisztenciához vezet. MANET XXXI. Nagygyűlése Eger, 2014.11.07.

Sélley Eszter, Molnár G.A., Kun Sz., Szijártó I.A., Laczy B., Kovács T., Fülöp F., Wittmann I.: A GLP-1 analógok vese artériára gyakorolt hatása. Gázmolekulák jelátvivő szerepe. MANET XXXI. Nagygyűlése Eger, 2014.11.07.

Molnár Gergő Attila, Kun Sz., Mikolás E., Sélley E., Csiky B., Wittmann I.: Az erythropoetin-rezisztencia és az oxidált aminosav, az orto-tirozin összefüggése. MANET XXXI. Nagygyűlése Eger, 2014.11.07.

Eszter Sélley, Sz. Kun, I.A. Szijártó, B. Laczy, T. Kovács, F. Fülöp, I. Wittmann, G.A. Molnár: Vasodilatation by lixisenatide in the rat thoracic aorta, mediated by an unknown receptor. Third International Symposium on Hypertension, Translational Medicine in Hypertension. Osijek, 2014. 11. 28.

Kun Szilárd, Molnár G.A., Sélley E., Szélig L., Bogár L., Csontos Cs., Miseta A., Wittmann I.: Nem-diabéteszes szeptikus betegek inzulininterápiájának független prediktora a paratirozin/fenilalanin hányados és a fenilalanin oxidált származékai. MDT XXIII. Kongresszusa Budapest, 2015.05.15.

Sélley Eszter, Kun Szilárd, Szijártó I.A., Laczy B., Kovács T., Fülöp F., Wittmann I., Molnár G.A.: A lixisenatid vazodilatációt okoz cGMP közvetítésével ismeretlen receptoron keresztül. MDT XXIII. Kongresszusa Budapest, 2015.05.14.

Resveratrol hatásának vizsgálata IgA nephropathiában. (Pilot vizsgálat)
Kovács Tibor, Brasnyó P., Molnár G.A., Sélley E., Kun Sz., Vas T., Laczy B., Fekete K., Kovács K., Mészáros G.L., Winkler G., Sümegi B., Wittmann I. MANET XXXII. Nagygyűlése és Továbbképző Tanfolyama Siófok, 2015.11.12.

Sélley Eszter, Kun Szilárd, Szijártó István András, Kertész Melinda, Wittmann István, Molnár Gergő Attila: A glukagon vazodilatációs hatása. Receptorális szintű kölcsönhatás a glukagon és a GLP-1 között. MDT XXIV. Kongresszusa Debrecen, 2016. 04. 28.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Wittmann Istvánnak, aki bevezetett a tudományos gondolkodás világába, megszerettette velem a kutatói munkát. Köszönettel tartozom a rengeteg hasznos gondolatért és ötletért, munkám megvalósításához nyújtott korlátlan segítségért, a sok rám fordított időért és energiáért. Hálás vagyok, amiért megismerhettem példaértékű gondolkodásmódját, amiért munkacsoportja része lehetek.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Molnár Gergő Attilának, az inspiráló ötletekért, értékes tanácsokért, tudományos gondolkodásmódom fejlesztéséhez nyújtott támogatásáért, munkám koordinálásért.

Nagy segítség volt számomra Fábán Ildikó szakértelme és barátsága, aki az állatházban töltött idő során nap, mint nap igyekezett lehetetlent nem ismerve a legváltozatosabb nehézségekre megoldást találni.

Hálával tartozom Dr. Kürthy Máriának, örök optimizmusáért, tudásának megosztásáért.

Köszönettel tartozom közvetlen laboros kollégáimnak, Szalma Krisztinának, Dr. Sámikné Varga Ilonának és Kertész Melindának, támogatásukért, akik az évek során bizonyított állandó készenlétükkel kiemelkedően hasznos segítséget nyújtottak számomra. Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Kun Szilárdnak, barátságáért, a jó kedélyű közös munkanapokért, a tudományos vitákért, a problémák közös megoldásáért. Köszönet illeti Dr. Mikolás Esztellát és Dr. Szijártó Istvánt, amiért már TDK hallgatóként megismertették velem munkájukat, később pedig utat mutattak munkám megkezdéséhez, a technika elsajátításához.

Hálás vagyok a II. sz. Belgyógyászati Klinika itt fel nem sorolt dolgozóinak, akik mindig segítettek munkámat.

Köszönet illeti a barátaimat is támogatásukért, ösztönzésükért.

Végül, ami számomra a legfontosabb, szeretném ezúton is kifejezni hálámat családomnak - *szüleim, nagyszüleim, testvéreim, valamint kedvesem* szeretetteljes támogatása, biztatása felbecsülhetetlen értékű segítség volt számomra a jelen tanulmány létrejöttében is.