

Hormonrezisztenciák 2-es típusú cukorbetegségben

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Verébi-Kertész Melinda



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

Doktori iskola vezetője: Dr. Bogár Lajos

Doktori program vezetője: Prof. Dr. Wittmann István

Témavezetők: Prof. Dr. Wittmann István, Dr. Laczy Boglárka

2025

1. Bevezetés

A cukorbetegség napjaink egyik népbetegsége. Világszerte mintegy 537 millió embert érint jelenleg, tehát hozzávetőleg tízből egy embert. [1].

A 2-es típusú diabétesz patogenezise összetett [2,3], egyik legfőbb jellemzője a perifériás, krónikus inzulin-rezisztencia, ahol csökken a zsírszövet glükózfelvétele [4]. Az inzulin-rezisztencia kiváltó oka az oxidatív stressz, amit szisztémás szubklinikus gyulladás és hormon interakciók váltanak ki a NAD(P)H oxidáz enzim aktivációjával [5].

Az aromás gyűrűje miatt a reaktív oxigén-származékok hatásának különösen kitett fenilalaninból enzimatikus úton, nagy mennyiségben para-tirozin alakul ki. Hidroxil szabadgyök hatására para-tirozin mellett meta- és orto-izomerek kialakulását is látjuk. Munkacsoportunk kimutatta, hogy a nem fiziológiás tirozin izomerek (m- és o-Tyr) a hidroxil szabadgyök markerei lehetnek 2-es típusú diabéteszes betegekben [6].

Azokban a betegségekben, amik az hidroxil szabadgyök hatásával összefüggésbe hozhatók, kimutathatóan magasabb a plazma és vizelet m-Tyr és o-Tyr koncentrációja. A krónikus vesebetegséggel élő betegekben a p-Tyr szintje csökkent, míg az o-Tyr exkréciója megnövekedett [7].

Dializált betegekben a p-Tyr szintje csökkent, az o-Tyr és o-Tyr/p-Tyr arány szignifikánsan magasabb volt. Az o-Tyr/p-Tyr arány az eritropoetin-rezisztencia független prediktorának bizonyult, vagyis lehetséges, hogy az o-Tyr/p-Tyr arány felborulása lehet felelős az eritropoesis-stimuláló ágensekkel szembeni rezisztenciáért dializált betegekben [8].

Az o-Tyr vizelet-exkréciója már rezveratrol rövid idejű alkalmazásával is csökkenthető 2-es típusú cukorbetegségben. Ezzel egyidőben javul a protein kináz B (Akt) foszforilációja, az inzulin-érzékenység megnő, ami az inzulin-rezisztencia marker (HOMA-IR) értéke mutat [9].

Munkánk során a módosult Phe származékok fehérjékbe történő beépülését, a glükózfelvételre és az inzulin-jelátvitelre, nevezetesen az inzulin-receptor-szubsztrát-1 (IRS-1) és az Akt foszforilációjára gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Tudjuk, hogy inzulin-rezisztens betegekben más hormon-rezisztenciák is előfordulhatnak (pl.: leptin, eritropoetin, acetilkolin, trijód-tironin és glükagonszerű peptid-1) [10]. Általánosan elfogadott tény az is, hogy az inzulin-rezisztencia fő oka a hibás jelátvitel. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a hasonló jelátviteli útvonallal működő más hormonoknál ugyanúgy előfordulhat meghibásodás posztreceptorális szinten.

A metformint prediabetesben és 2-es típusú cukorbetegség inzulin-rezisztenciájának kezelésére használják, csökkenti a plazma glükóz és triglicerid szintjét, így a glükotoxicitás és lipotoxicitás csökkenéséhez vezet. A gyorsan csökkenő glükotoxicitás fontos hatással van a sejtek anyagcseréjére. Ez a folyamat állhat az „áttörés jelenség” hátterében, ami már egy jól ismert fogalom az inzulin-rezisztenciával kapcsolatban [11].

Ha a metformin képes érzékenyíteni a szervezetet az inzulinra, feltételezhetjük, hogy hasonló érzékenyítő hatása lehet a trijód-tironin rezisztenciára is 2-es típusú cukorbetegségben. Célunk a metformin T3-rezisztenciára gyakorolt hatásának vizsgálata volt eutireóta, metforminnal még nem kezelt, frissen diagnosztizált 2-es típusú diabéteszes betegekben, mérve az inzulin-rezisztenciát, a pajzsmirigyhormonokat, glükóz- és lipid metabolizmust, TSH-szintet, vérnyomást és pulzusszámot.

2. Célkitűzések

1. Eutireóta, 2-es típusú diabéteszes betegekben kívántuk vizsgálni a metformin hatását a pajzsmirigyhormon-rezisztenciára
2. Az o- és m-Tyr szerepét kívántuk vizsgálni az inzulin-rezisztenciában.

3. Módszerek

3./1./1. *T3-rezisztencia vizsgálatának klinikai protokollja*

Első vizsgálatunkba 21 olyan euthyreóta, 40 és 75 év közötti frissen diagnosztizált 2-es típusú cukorbetegét vontunk be, akik gyógyszeres kezelést még nem kaptak. Kizártuk azokat a betegeket, akik a vizsgálatot megelőzően kaptak metformin kezelést, vagy más antidiabetikus szert és azokat, akiknek ismert pajzsmirigybetege van, vagy levotiroxinnal kezeltek. A betegek a vizsgálatot megelőzően részletes tájékoztatást kaptak és beleegyező nyilatkozatot töltöttek ki.

A betegektől vért vettünk a metforminkezelés megkezdése előtt, valamint 4 hét kezelést követően. A 4 hét alatt folyamatosan növeltük a metformin dózist (az első 2 héten 500 mg, és a 4. hétig 1000 mg). Az alábbi paramétereket mértük és számoltuk: TSH, T3, T4, T3/T4 arány, thyrotroph thyroid hormone sensitivity index ($TTSI = 100 \times TSH \text{ (mU/L)} \times fT4 \text{ (pmol/L)} / \text{az } fT4 \text{ koncentráció referencia intervallumának próba-specifikus felső határa (pmol/L)}$), thyroid feedback quantile-based index ($TFQI = \text{az } fT4 \text{ hormon koncentráció populációs tapasztalati halmozott eloszlási függvénye}$), fruktózamin, triglicerid, HOMA-IR ($= \text{éhomizs plazma glükóz (mmol/L)} \times \text{éhomizs plazma inzulin (pmol/L/22,5)}$), plazma glükóz és plazma inzulin.

TTSI: A hormonok hatásának mérésével (pl. a pajzsmirigyhormon-érzékenység) sokkal realisztikusabb képet kapunk a pajzsmirigy állapotáról, mint a szérumszintjének monitorozásával. Ez az index lényegében a tiroxin rezisztenciát méri. Emelkedik azokban az esetekben, ahol a pajzsmirigyhormon-rezisztencia a THRB gén mutációjának tudható be [12].

TFQI: TFQI egy újonnan bevezetett kompozit index, ami tükrözi a hipofízis pajzsmirigyhormonra adott válaszát, tehát a pajzsmirigyhormon-érzékenységet [13]. Több tanulmányban igazolták a kapcsolatot a TFQI és a metabolikus betegségek közt, a TFQI és a kardiovaszkuláris rizikó közt, valamint a TFQI és a magas vérnyomás közt is [14].

A vizsgálat rövid, 4-hetes hossza miatt a HbA_{1C} mérése helyett, amely az elmúlt 3 hónap glikémiás indexét mutatja, a fruktóزامint választottuk, amely egy glikált fehérje és a vércukor szintet 2-3 hétre visszamenőleg mutatja. A szérum mintákat a PTE laboratóriumi medicina intézetében rutin laboratóriumi tesztekkel analizáltuk, teljesen automatizált műszerekkel (Roche). Vérnyomást és pulzusszámot ambuláns vérnyomás monitorral (ABPM04, ABPM Art Ltd.) mértünk. A statisztikai analízisben a következő vérnyomás és pulzusszám paramétereket használtuk: átlag szisztolés vérnyomás, átlag diasztolés vérnyomás, artériás középnyomás, átlag pulzusnyomás, valamint a pulzusszám átlag, maximum, minimum és standard deviáció.

3./1./2. A T3-rezisztencia in vitro vizsgálata

In vitro kísérletet végeztünk, hogy megvizsgáljuk a T3-rezisztencia lehetséges mechanizmusait. Erre a célra humán embrionális vese (HEK293) sejtvonalat használtunk. A sejteket 5 mM glükózt tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's mediumon (DMEM) tartottuk, amit 10% szérummal (FBS), 100 U/ml penicillinnel és 0,1 mg/ml sztreptomocinnel, 2 µg/ml Fluconazollal egészítettünk ki. A sejteket párás inkubátorban 37 °C-on, 5% CO₂ -on növesztettük. Később a médiumot a sejtek egy részén 5 mM vagy 25 mM glükózt tartalmazó médiumra cseréltük és további 5 napig inkubáltuk őket. Egy éjszakán át tartó széruméhezést követően az 5 mM-on tenyésztett sejteket és az egyik csoport 25 mM glükózt tartalmazó médiumon növesztett sejtet is T3-mal kezeltük (0; 0,1; 0,3; 1 nM). A sejtek harmadik, 25 mM glükózon tenyésztett csoportját T3 (0; 0,1; 0,3; 1 nM) mellett 10 mM metforminnal is

kezeltük. A kezelések minden esetben 20 percig tartottak, ezután a sejteket 4 °C-os PBS-sel kétszer lemostuk, majd radio-immunoprecipitation assay (RIPA) lízis pufferben mechanikusan felkapartuk és -80 °C-on fagyasztottuk.

Western blot analízist végeztünk p-Akt és össz Akt jelöléssel. A sejtek fehérjetartalmát Bradford módszerrel mértük, bovine serum albumin (BSA) szolgált standardként. A 80-120 µg fehérjét tartalmazó mintákat töltőpufferrel (100 mm/l Tris-HCl, 4% sodium dodecil sulfate (SDS), 20% glicerol, 200 mmol/l DTT és 0,2% brómfenolkék) kevertük és 10 %-os poliakrilamid gélen elektroforetikusan bontottuk, majd egy 38 mmol/l glicint, 45 mmol/l Tris bázist és 20% metanolt tartalmazó pufferben polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra transzferáltuk (90 perc, 250 mA). A membránokat 0,1% TBS-T-ben mostuk, 5% BSA-t tartalmazó oldatban blokkoltuk, majd az anti-foszfo-(Ser473)-Akt primer antitesttel (1:1000) éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Mosást követően peroxidáz-konjugált másodlagos antitesttel (1:2000) jelöltük, majd újabb mosási lépések után megnövelt kemilumineszcenciával felerősítettük a jelet és röntgenfilmen hívtuk elő. Ezután újrapróbáltuk a membránt össz PKB/Akt antitesttel. A denzitometriás analízishez a Scion Image programot használtuk. Az eredményeket az össz Akt eredményével korrigáltuk és a kontrollhoz hasonlítottuk.

5./1./3. Statisztikai analízis

A statisztikai analízis elkészítéséhez az SPSS 24.0 szoftvert (IBM) használtuk. Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk a normalitás vizsgálatára, ahol normális eloszlást találtunk, átlag ± standard deviációt adtunk meg és páros t-próbát használtunk, nem-normál eloszlás esetén a Mann-Whitney U-tesztet használtuk. Az eredményeket 0,05 alatti p érték esetén értékeltük statisztikailag szignifikánsnak.

5./2./1. Podocita sejt kultúra

Immortalizált humán podocita sejt vonalat (Moin Saleem, Bristol Egyetem, UK) RPMI1640 médiumon tenyésztettük, amit 10% FBS-sel, inzulin-transzferrin-szelén szupplementummal, 100 U/ml penicillinnel, 0,1 mg/ml sztreptomicinnel és a médium eredeti p-Tyr tartalmával megegyező mennyiségű para-, meta-vagy orto-tirozinnal egészítettük ki. A sejteket 33 °C-on, 5% CO₂ mellett tenyésztettük, majd mikor elérték a 40-60%-os telítettséget, áthelyeztük a flaskskákat a 37 °C-os inkubátorba differenciálódni. A médium ezután 2% FBS-t tartalmazott, valamint az antibiotikumokat és a különböző tirozinokat. Minden kezelés előtt szérumehezettük a sejteket.

5./2./2. Nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC)-analízis

A módszerek korábbi publikációinkon alapulnak, kisebb változtatásokkal [7]. A fehérjéhez kötött tirozin koncentráció méréséhez 200 µl desztillált vízben lizáltuk a sejteket, majd -70 °C-on lefagyasztottuk. A kioldást követően a mintákat lecentrifugáltuk (10 perc, 4000 rpm). A felülúszóból 200 µl-t kevertünk össze 200 µl 60%-os triklórecetsavval, 30 percig jégen inkubáltuk, újra lecentrifugáltuk (10 perc, 4000 rpm), az üledéket 1%-os triklórecetsavban és 4 µl 400 mmol/l deszferoxaminban felfuszpendáltuk. Összesen 40 µl 500 mmol/l koncentrációjú butilált hidroxitoluént adtunk a mintákhoz, hogy elkerüljük a lehetséges szabad gyök képződést a hidrolízis során. 200 µl 6N hidroklorosavat adtunk a mintákhoz, hogy 120 °C-on egy éjszakán át hidrolizáljuk a fehérjéket. A hidrolizátumot 0,2 µm-es szűrőn átszűrtük és 20 µl filtrátumot injektáltunk a HPLC-oszlopra manuális injektorral.

A minták p-, o- és m-Tyr mennyiségét autofluoreszcenciával detektáltuk, így nem volt szükség derivatizálásra vagy festésre. A mintákat Shimadzu Class 10 HPLC rendszerrel mértük, RF-10 AXL fluoreszcens detektorral. A mozgó fázis 1% nátrium-acetátból és 1%

ecetsavból állt, vízben elkeverve. Az elválasztáshoz LiChroCHART 250-4 oszlopot használtunk izokratikus futtatással. 275 nm excitációs- és 305 nm emissziós hullámhosszt alkalmaztunk a p-, o- és m-Tyr méréshez, a fenilalanin méréséhez pedig 258 nm excitációs- és 288 nm emissziós hullámhosszt. A görbe alatti terület (AUC) meghatározásához külső standarddal végeztünk kalibrációt, hogy pontosan meg tudjuk határozni az aminosavak mennyiségét.

5./2./3. Western blot analízis

A sejteket 400 nM inzulinnal kezeltük, majd hideg, fiziológiás sóoldattal kétszer lemostuk és lízis pufferben (1 mol/l trisbase, 1,15% Triton-X, 0,2 mol/l EGTA, 0,5 mol/l EDTA, 5 mg/l phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), 0,1 mol/l dithiothreitol (DTT), 0,1 mol/l Na₃VO₄, 5mg/ml aprotinin, 5mg/ml leupeptin és foszfatáz inhibitor koktél 1 és 2) mechanikusan felkapartuk. A mintákat vortexeltük és a fehérjetartalmát megmértük, standardnak BSA-t használtunk. A mintákat töltőpufferrel (100 mm/l Tris-HCl, 4% sodium dodecil sulfate (SDS), 20% glicerol, 200 mmol/l DTT és 0,2% brómfenolkék) kevertük és a 80-120 µg fehérjét tartalmazó mintákat 7,5 %-os poliakrilamid gélen elektroforetikusan bontottuk és PVDF membránra transzferáltuk. A membránokat Ponceau-festékekkel megfestettük, hogy megbizonyosodjunk a sikeres transzferről. A nem-specifikus kötőhelyeket 5% BSA oldattal blokkoltuk egy órán át szobahőn.

A membránokat éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on az elsődleges antitesttel, anti-foszfo-(Tyr612)-IRS-1 (1:2000). Másnap háromszori TBS-T-oldatos mosást követően HRP-konjugált IgG másodlagos antitesttel (1:4000) inkubáltuk szobahőn egy órán át. Ezt követően ismét három TBS-T-oldatos mosás következett. Az új jelöléshez a membránokat először TBS-T oldatban lemostuk, majd az alábbi stripping puffert alkalmaztuk: 0,1% SDS, 1,5% glicin és 1% Tween-20 (az oldat pH-ját 2,2-re állítottuk be), ebben a pufferben kétszer 10 percig

mostuk a membránt, majd PBS-ben kétszer 5 percig és 0,1% TBS-T oldatban kétszer 5 percig. A membránok blokkolását ismét a fent leírt módon végeztük, majd IRS-1 elsődleges antitesttel (1:1000) inkubáltuk, háromszor 5 percig TBS-T oldatban mostuk, majd másodlagos antitesttel (1:2000) inkubáltuk és ismét mostuk.

Mindkét jelölés után megnövelt kemilumineszcenciával felerősítettük a jelet és röntgenfilmen hívtuk elő az eredményeket. A denzitometrált Scion image programmal végeztük, a fehérjejeleket össz IRS-1-fehérjeszintre korrigáltuk és a kontrollal összehasonlítottuk.

5./2./4. Immunfluoreszcencia

A podocitákat 6-lyukú lemezekbe helyezett fedőlemezekre ültettük ki. A fedőlemezeket ezt megelőzően átmostuk alkohollal, majd hagytuk UV alatt megszáradni. A sejteket 10% FBS-sel kiegészített RPMI1640 médiumon növesztettük 60%-os lefedettségig, majd a médiumot lecseréltük egy 2% FBS-t tartalmazó RPMI1640 médiumra, amihez már a különböző tirozin izoformákat is hozzáadtuk a médiumban található tirozin koncentrációval megegyező mennyiségben. A sejteket ezután egy 37 °C-ra melegített inkubátorba helyeztük differenciálódni.

A kísérlet előtti éjszaka széruméheztettük a sejteket, majd 400 nmol/l inzulinnal 10 percig inkubáltuk. A médium eltávolítása után a fedőlemezeket kétszer lemostuk PBS-ben, majd a podocitákat szobahőn egy 2% paraformaldehidet és 4% szacharózt tartalmazó oldatban 8 percen át fixáltuk. A következő lépésben 1xPBS-ben elkevert 0,3% Triton-X-100-oldatban 20 percen át permeabilizáltuk, végül 45 percig 2,5% BSA-oldatban blokkoltuk [15].

Az elsődleges antitestet 1xPBS-ben oldottuk és egy órán át nedves körülmények közt inkubáltuk. Az alábbi antitesteket használtuk: egér anti-WT1 (H-1), csirke anti-vimentin, nyúl

anti-GLUT4, egér anti-IRS-1 és nyúl anti-pIRS-1. Az antitestek inkubálása után a fedőlemezeket háromszor 5 percig mostuk PBS-ben és a sejteket fluorofor-konjugált másodlagos antitestekkel jelöltük 60 percig. A mintákat ismét háromszor 5 percig mostuk PBS-ben, majd Vectashield fedőoldattal lefedtük. A mikroszkópos képeket Nikon Eclipse Ti2 mikroszkóppal készítettük.

5./2./5. Statisztikai analízis

A statisztikai analízist SPSS 27 szoftverrel végeztük. Az adatsort először Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk normalitásra. A normál eloszlású adatok esetén parametrikus teszteket, a nem normál eloszlású adatok esetén nem parametrikus teszteket alkalmaztunk.

4. Eredmények

4./1./1. A metformin csökkenti a T3-szintet, a T3/T4 arányt, a fruktózamin és a HOMA-IR szintet

A 4 hetes metformin kezelés után a T3-szint, T3/T4 arány, fruktózamin és HOMA-IR-szint változását vizsgáltuk. A metformin terápia megkezdése utáni 4. héten szignifikáns csökkenést láttunk a T3 szintjében [kezelés előtt: $5,24 \pm 0,7$ pmol/l; metformin kezelés hatására: $4,71 \pm 0,6$ pmol/l; $p < 0,001$].

A T3/T4 arány szintén csökkent. [kezelés előtt: $0,33 \pm 0,065$; metformin kezelés hatására: $0,3 \pm 0,065$; $p = 0,038$].

A vizsgálati idő rövideje miatt HbA_{1C}-mérése helyett a fruktózamin mellett döntöttünk, aminek az értéke szintén alacsonyabb volt a 4 hetes metformin kezelés után [kezelés előtt: $300 \pm 74,7$ mmol/l; metformin kezelés hatására: $274,6 \pm 52,8$ mmol/l; $P = 0,008$]

Az inzulin-rezisztenciát jellemző HOMA-IR-szint szintén csökkenést mutatott. [kezelés előtt: $2,6 \pm 1,2$; metformin kezelés hatására: $2,05 \pm 1,0$; $p = 0,022$].

4./1./2. Változatlan paraméterek

A TSH, T4, TTSI, TFQI, triglicerid, plazma glükóz, plazma inzulin és a vérnyomás valamint pulzusszám értékek nem változtak.

4./1./3. Akt-foszforiláció HEK sejtekben

In vitro kísérletünket HEK293 sejteken végeztük. Western blot módszerrel kimutattuk, hogy a T3-kezelés (0,1; 0,3 és 1 nM) Akt-foszforilációt indukált azokban a HEK293 sejtekben, amelyeket 5 mM glükózt tartalmazó médiumon növesztettünk (kontroll:

100±18,12; 0,1 nM T3 kezeléssel: 227,27±21,2 p=0,013; 0,3 nM T3 kezeléssel: 158,74±25,97 p=0,045; 1 nM T3 kezeléssel: 173,88±24,92 p=0,038). Ellenben nem látunk emelkedést T3 hatására a pAkt/Akt arányban, ha a sejteket 25 mM glükózt tartalmazó médiumon növesztettük (kontroll: 100±8,77; 0,1 nM T3 kezeléssel: 114,97±17,84, p=0,421; 0,3 nM T3 kezeléssel: 102,74±9,87, p=0,813; 1 nM T3 kezeléssel: 105,93±9,28, p=0,732) és ezen a metformin (10 mM) kezelés se tudott változtatni (kontroll: 100±3,67; 0,1 nM T3 kezeléssel 106,83±2,92, p=0,763; 0,3 nM T3 kezeléssel: 104,9±4,15, p=0,712; 1 nM T3 kezeléssel: 101,16±2,43, p=0,911).

4./2./1. Az o-Tyr és a m-Tyr is beépül a podocita sejtek fehérjéibe

A rendellenes aminosavak megváltoztathatják az inzulin jelátvitelét azzal, hogy beépülnek a fehérjékbe. Ehhez a sejteknek fel kell venniük az adott aminosavakat, ezért lemértük, hogy a sejtek az abnormális aminosavakat is fel tudják-e venni, majd megvizsgáltuk, hogy az o- és m-Tyr beépül-e a sejt fehérjéibe.

Azokban a sejtekben, amiket o- vagy m-Tyr jelenlétében szaporítottunk, a p-Tyr/Phe hányados vagy csökkent, vagy változatlan maradt, míg a fehérjékhez kötött o-Tyr/p-Tyr és m-Tyr/p-Tyr arány növekedett. Kimondhatjuk tehát, hogy a nem fiziológiás aminosavak is képesek beépülni a podocita sejtek fehérjéibe.

4./2./2. Az IRS-1 és az AKT foszforilációja m- és o-Tyr-t tartalmazó médiumon növesztett podocita sejtekben

Hogy értelmezni tudjuk az o- és m-Tyr inzulin indukált glükózfelvételt gátló hatását, az inzulin-receptor szubsztrát-1 és Akt-foszforilációját vizsgáltuk meg, amelyek a glükózfelvétel fontos állomásai az inzulin-jelátvitelben. A p-Tyr-t tartalmazó médiumon tenyésztett sejtekben inzulin hatására kétszeresére nőtt az IRS-1 aktiváló foszforilációja a

kontrollhoz képest [kontroll: $100 \pm 26,3$; inzulinnal kezelt: $192,6 \pm 44,83$, $p=0,048$]. Azokban a sejtekben, amiket m- vagy o-Tyr szupplementált médiumon tenyésztettünk az IRS-1 foszforiláció növekedése elmaradt [m-Tyr kontroll: $194,8 \pm 71,7$; kezelt: $255,8 \pm 89,4$, $p=0,315$; o-Tyr kontroll: $251,5 \pm 118,9$; kezelt: $256,2 \pm 141,2$, $p=0,808$].

Az Akt-foszforiláció vizsgálatával hasonló eredményeink születtek. A p-Tyr-szupplementált médiumon tenyésztve a sejtek az irodalom szerinti inzulin-választ mutatták [kontroll: $100 \pm 20,3$; kezelt: $182 \pm 18,12$; $p=0,0065$] A m-Tyr és o-Tyr szupplementált médiumon tenyésztett sejteknél az inzulin-válasz elmaradt [m-Tyr kontroll: $155 \pm 21,97$; m-Tyr kezelt: $202 \pm 24,78$, $p=0,442$; o-Tyr kontroll: $170,8 \pm 32,61$; o-Tyr kezelt: $208,087 \pm 20,65$, $p=0,256$]. Érdekeség, hogy m-Tyr és o-Tyr kezeléssel az Akt-foszforiláció magasabb alapszintet mutatott a para-tirozinos kezeléshez képest, ezt a szintet viszont az inzulin-kezelés nem tudta növelni [p-Tyr kontroll: $100 \pm 20,3$; m-Tyr kontroll: $155 \pm 21,97$; $p=0,046$; p-Tyr kontroll: $100 \pm 20,3$; o-Tyr kontroll: $170,8 \pm 32,61$; $p=0,048$].

4./2./3. Mikroszkópos analízis

A p-Tyr-t tartalmazó médiumon növesztett sejtekben a foszforilálódott IRS-1 a membránba transzlokálódik. Azokban a sejtekben, amiket o-Tyr és m-Tyr jelenlétében növesztettünk, ezt nem láthatjuk. Az o-Tyr és m-Tyr médiumon szaporított sejteknél a pIRS-1 intenzitása is alacsonyabb.

Ugyanezt a transzlokációt figyelhetjük meg a GLUT-4 esetében is, ami az inzulinfüggő glükóz-transzportért felel. Ezt a transzlokációt is csak a p-Tyr tenyésztett sejteknél figyelhetjük meg, o-Tyr és m-Tyr esetén a GLUT4 perinukleárisan helyezkedik el. A GLUT4 transzportjában szerepet játszó vimentin filamentumok esetén is megfigyeltünk változásokat. Azokban a sejtekben, amiket p-Tyr jelenlétében tenyésztettünk, a filamentumok

vékonyak voltak, m-Tyr jelenlétében kissé megvastagodtak, míg o-Tyr jelenlétében még vastagabbak lettek.

5. Megbeszélés

5./1. Metformin hatására csökken a T3 rezisztencia eutireóta, 2-es típusú cukorbetegekben

Eutireóta, frissen diagnosztizált 2-es típusú, gyógyszerrel nem kezelt diabéteszes betegekben a metformin csökkenti a T3 szintjét és a T3/T4 arányt. Ezen változások mellett a TSH, T4, vérnyomás és pulzusszám értékek változatlanok maradtak.

Pajzsmirigyhormonok esetén nincs egy konkrét paraméter, aminek mérésével a T3-rezisztenciát meghatározhatnánk, mint inzulin-rezisztencia esetén a HOMA-IR szint, de a T3 alacsonyabb szintje változatlan TSH, vérnyomás és pulzusszám értékek mellett ugyanúgy a rezisztencia csökkenését jelenti, mint a HOMA-IR csökkenése az inzulin-rezisztenciával kapcsolatban, tehát a T3-rezisztencia csökkenését.

Korábbi tanulmányokban már vizsgálták a metformin hatását a 2-es típusú diabéteszes populáció pajzsmirigy funkciójára, de a többi tanulmány esetén a metformin hatását szubklinikus pajzsmirigy alulműködésben vizsgálták.

5./2. Kapcsolat a nem fiziológiás Tyr-izofomák és az inzulin-rezisztencia kialakulása között

Második tanulmányunkban meg kívántuk vizsgálni az orto- és meta tirozin hatását a podocytá sejtek inzulinválaszára, megvizsgáltuk az inzulin-rezisztencia egyik lehetséges hátterét podocytá sejtvonalon. Meg kellett vizsgálnunk, hogy a sejtek valóban felveszik-e a

kóros aminosavakat, beépítik-e fehérjéikbe és azok végül milyen hatást gyakorolnak az inzulin jelátvitelére.

Tanulmányunkat podocita sejteken végeztük, a vizsgálatokat a kutatócsoport korábbi, 3T3-L1 sejteken végzett kutatásaira alapoztuk. HPLC-vizsgálattal megfigyeltük, hogy a podocita sejtek a m- és o-Tyr-t is fel tudják venni és azokat fehérjéikbe be tudják építeni.

Első alkalommal mutattuk be, hogy az abnormális aminosavak (m- és o-Tyr) gátolják a sejtek inzulinra adott glükózfelvételét. Western blot technika segítségével bizonyítottuk, hogy az inzulin-jelátvitel megváltozik azokban a sejtekben, amiket o- vagy m-Tyr tartalmú médiumon tenyésztünk.

Mikroszkópos vizsgálatunk során a különböző tirozin-izoformák beépülésének hatására végbemenő változásokat néztük meg az IRS-1 és p-IRS-1 elhelyezkedésében és egymáshoz viszonyított arányában, a GLUT4 elhelyezkedésében (tehát a glükóz felvételében) és a vimentin szálak morfológiájában, elhelyezkedésében.

A p-Tyr tartalmú médiumon növesztett sejtek glükózfelvételét az inzulin mintegy kétszeresére növelte, ezzel szemben azoknál a sejteknél, amik o-Tyr vagy m-Tyr médiumon vagy magas glükóztartalmú médiumon nőttek, a glükózfelvétel csökkent, jóval elmaradt a fiziológiás értékektől. Ezt a hatást már egy nap után is láttuk, de hosszabb, 12 napos kezelés után is látszott. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy ez nem magának a hidroxil szabadgyököknek a hatása, hiszen ezeket a tirozinokat hidroxil szabadgyök megléte nélkül alkalmaztuk, így az o- és m-Tyr direkt hatásáról lehet szó.

Jelenlegi adatainkból arra következtethetünk, hogy a podocita sejtek m- vagy o-Tyr-rel történő kezelése, akár csak a magas glükózsint (25 mM-os médium használatával), a sejtek inzulin-rezisztenciájához vezet. Ezekben a sejtekben az inzulin nem tudta kifejteni a hatását és

növelni az IRS-1 foszforilációját. Érdekesség volt, hogy az IRS-1 foszforiláció nem stimulált állapota sokkal magasabb volt a fiziológiához képest, amit az inzulin nem tudott tovább növelni.

Ezt a jelenséget láttuk Akt esetén is, a p-Tyr tartalmú médiumon növesztett sejtekben az inzulin működött, stimulálta az Akt-foszforilációt, míg az m- vagy o-Tyr-on vagy magas glükózkoncentráció mellett növesztett sejteknél az Akt-foszforilációja elmaradt. Az Akt-foszforiláció gátlását magas glükóz hatására korábban már kimutatták egér myoblaszt sejtvonalon. Ebben a tanulmányban viszont a 25mM glükózt vették kontroll csoportnak és 60mM glükózt tartalmazó médiumot használtak magas glükóznak, aminek hatására jelentősen csökkent a pAkt expressziója a kontroll csoporthoz [16]. A különböző tirozin izoformákkal ilyen korábbi tanulmányok nem állnak rendelkezésünkre.

Konfokális mikroszkóppal az immunfluoreszcens jelölés kimutatta, hogy az IRS-1 és pIRS-1, valamint a GLUT4 és a vimentin helyzete is megváltozik, amennyiben a sejtek p-Tyr helyett m- vagy o-Tyr beépítésére kényszerülnek. Az össz IRS-1 többnyire perinukleárisan helyezkedik el. A pIRS-1 a kizárólag p-Tyr-tartalmú médiumon növesztett sejtekben a membrán közelében helyezkedik el, jelölődése is sokkal intenzívebb azokhoz a sejtekhez képest, amiket m- vagy o-Tyr-tartalmú médiumon növesztettünk. m-Tyr és o-Tyr jelenlétében növesztett sejteknél a pIRS-1 a sejtplazmában elszórtan található, jelentősen kisebb mennyiségben. Arra következtethetünk tehát, hogy m- és o-Tyr hozzáadása a médiumhoz csökkentette az inzulin-választ, az IRS-1 nem foszforilálódott olyan mennyiségben, mint a fiziológias körülmények közt tartott sejtekben.

Ezt az állítást továbbgondolva vizsgáltuk meg a GLUT4 és vimentin változásait a nem fiziológias tirozinok hatására. A p-Tyr- kezelt sejtekben a GLUT4 aggregátumok inzulin hatására a membrán közelében helyezkedtek el, ahogy azt az irodalom szerint is várhattuk

[17]. A GLUT4 membránhoz transzportálódása sokkal kevésbé feltűnő m-Tyr jelenlétében, o-Tyr jelenlétében pedig teljesen eltűnik, inkább perinukleáris marad az elhelyezkedése. Egy fent említett tanulmányban már vizsgálták, hogy a GLUT4 fluoreszcenciájának intenzitása magas glükóztartalmú médiumon tenyésztett sejtekben csökken, valamint ezekben a sejtekben inzulin hatására a kontroll sejtekkel összehasonlítva, sokkal kisebb a GLUT4 expressziója a sejtmembrán közelében [16]. Ahogy azt vártuk, a GLUT4 és a vimentin kolokalizációt mutatott [18].

Érdekes volt még megfigyelni, hogy a vimentin szálak morfológiája kissé megváltozott. A p-Tyr-tartalmú médiumon növesztett sejtek esetében vékony filamentumokat láthattunk, m-Tyr jelenlétében ezek a filamentumok kissé megvastagodtak, o-Tyr jelenlétében pedig már egész vaskosak voltak.

A vimentin szálak morfológiájának megváltozása érdekes lehet, ha megnézzük, hogy az irodalom a vimentin overexpresszióját írja le egyes rákos megbetegedésekben, valamint kataraktában, Crohn betegségben, reumatoid artritiszben, emellett megnövekedett vimentin mRNS és fehérje szintet találtak az öregedő sejtekben [19].

6. A dolgozat tézisei

- 1.** A 2-es típusú diabéteszes betegeknél új fogalmat vezethetünk be, még hozzá a „T3-rezisztencia” fogalmát eutireóta betegek esetén.
- 2.** A podocyta sejtek szupplementálása m- vagy o-Tyr-nal, akár csak a magas glükózsint (25 mM-os médium használatával), a sejtek inzulin-rezisztenciájához vezet.
- 3.** Az IRS-1 és pIRS-1, valamint a GLUT4 és a vimentin helyzete ezekben az abnormalis Tyr izoformákat beépítő sejtekben megváltozik.

7. A disszertációhoz csatlakozó közlemények jegyzéke

I. Kertész, Melinda ; Kun, Szilárd ; Sélley, Eszter ; Nagy, Zsuzsanna ; Kőszegi, Tamás ; Wittmann, István. A breakthrough-like effect of metformin reduces peripheral resistance to triiodothyronine in euthyroid, non-insulin-resistant, type 2 diabetic patients.

ENDOCRINE CONNECTIONS 10(7):782–788, 2021. **IF: 3,221**

II. Judit Mohás-Cseh, Gergő Attila Molnár, Marianna Pap, Boglárka Laczy, Tibor Vas, Melinda Kertész, Krisztina Németh, Csaba Hetényi, Orsolya Csikós, Gábor K. Tóth, Attila Reményi and István Wittmann. Incorporation of Oxidized Phenylalanine Derivatives into Insulin Signaling Relevant Proteins May Link Oxidative Stress to Signaling Conditions Underlying Chronic Insulin Resistance
BIOMEDICINES 10(5):975, 2022. **IF: 4.757**

A disszertációhoz csatlakozó közlemények összesített impakt faktora: 7,978

A disszertációhoz nem csatlakozó közlemények jegyzéke

Molnar, GA ; Kun, S ; Selley, E ; **Kertesz, M** ; Szelig, L ; Csontos, C ; Boddi, K ; Bogar, L ; Miseta, A ; Wittmann, I. Role of Tyrosine Isomers in Acute and Chronic Diseases Leading to Oxidative Stress - a review CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 23 : 7 pp. 667-685. , 19 p. (2016) IF: 3,249

Sélley, E ; Kun, Sz ; Sziujártó, IA ; **Kertész, M** ; Wittmann, I ; Molnár, GA. Vasodilator effect of glucagon. Receptorial crosstalk among glucagon, GLP-1 and receptor for glucagon and GLP-1. HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 48 : 7 pp. 476-483. , 8 p. (2016) IF: 2,268

Sinkler, Réka ; **Verébi-Kertész, Melinda** ; Németh, Dóra ; Pap, Marianna ; Kilár, Ferenc. Transferrin-iron-anion complex transport into HeLa cells. UPB SCIENTIFIC BULLETIN, SERIES B: CHEMISTRY AND MATERIALS SCIENCE 82 : 2 pp. 145-152. , 8 p. (2020) IF: 0,51

A disszertációhoz nem csatlakozó közlemények összesített impakt faktora: 6,027

8. Irodalomjegyzék

1. . IDF Diabetes Atlas. 10th ed. Brussels, Belgium: IDF Executive Office; 2021
2. De Fronzo R.A. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 58(4):773-95; 2009.
3. Schwartz SS, Epstein, S, Corkey BE, Grant SFA, Gavin JR, Aguilar RB. The time is right for a new classification system for diabetes: Rationale and implications of the beta-cell-centric classification schema. *Diabetes Care* 39(2):179-86; 2016.
4. Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: A complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45(11):1475-83; 2002.
5. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* 6(3):456-80; 2015.
6. Molnár GA, Mikolás EZ, Szijártó IA, Kun S, Sélley E, Wittmann I. Tyrosine isomers and hormonal signaling: A possible role for the hydroxyl free radical in insulin resistance. *World J Diabetes*. 6(3):500-7; 2015.
7. 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* 68(5):2281-2287; 2005.
8. 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*. 19(5):190-8; 2014.
9. Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei A, Halmai R, Mészáros LG, Sümegi B, Wittmann I.: Resveratrol

- improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr.* 106(3):383-9; 2011.
10. Wittmann I. The Common Single Cause of Chronic Multi-Hormonal Resistance in Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel).* 12(1):75; 2022.
 11. Le TN, Celi FS, Wickham EP. Thyrotropin levels are associated with cardiometabolic risk factors in euthyroid adolescents. *Thyroid* 26(10):1441–1449; 2016.
 12. Dietrich JW, Landgrafe-Mende G, Wiora E, Chatzitomaris A, Klein HH, Midgley JE, Hoermann R. Calculated Parameters of Thyroid Homeostasis: Emerging Tools for Differential Diagnosis and Clinical Research. *Front Endocrinol (Lausanne).* 9:7:57; 2016.
 13. Martin Laclustra, Belen Moreno-Franco, Jose Manuel Lou-Bonafonte, Rocio Mateo-Gallego, Jose Antonio Casasnovas, Pilar Guallar-Castillon, Ana Cenarro, Fernando Civeira; Impaired Sensitivity to Thyroid Hormones Is Associated With Diabetes and Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 42 (2): 303–310; 2019.
 14. Sijue Yang et al.: Thyroid Feedback Quantile-Based Index Is Associated With Blood Pressure and Other Hemodynamic Measures: A Cross-sectional Study. *Endocrine Practice*, 28(1):1055-1061; 2022.
 15. Schiwek D, Endlich N, Holzman L, Holthöfer H, Kriz W, Endlich K. Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int.* 66(1):91-101; 2004.
 16. Luo W, Ai L, Wang BF, Zhou Y. High glucose inhibits myogenesis and induces insulin resistance by down-regulating AKT signaling. *Biomed Pharmacother.* 120:109498; 2019.

17. Adilson Guilherme; Masahiro Emoto; Joanne M. Buxton; William E. Theurkauf; John Leszyk; Michael P. Czech. Perinuclear Localization and Insulin Responsiveness of GLUT4 Requires Cytoskeletal Integrity in 3T3-L1 Adipocytes. Mechanisms of signal transduction. 275(49):38151-38159; 2000.
18. Liu LB, Omata W, Kojima I, Shibata H. Insulin recruits GLUT4 from distinct compartments via distinct traffic pathways with differential microtubule dependence in rat adipocytes. J Biol Chem. 278(32):30157-69; 2003.
19. Danielsson F, Peterson MK, Caldeira Araújo H, Lautenschläger F, Gad AKB. Vimentin Diversity in Health and Disease. Cells. 7(10):147; 2018.

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Wittmann István professzor úrnak, amiért kezdetektől támogatott kutatásaimban, azokat végig irányította, figyelemmel kísérte és folyamatosan hasznos tanácsokkal látott el, valamint Dr. Laczy Boglárka adjunktus nőnek a rengeteg szakmai tanácsért és támogatásért.

Köszönettel tartozom kollégáimnak, Dr. Kun Szilárdnak, Dr. Sélley Eszternek, Dr. Mohás-Cseh Juditnak a sok segítségért, bátorításért és a baráti beszélgetésekért.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Pap Marianna tanárnőnek és Dr. Molnár Gergő Attila professzor úrnak akik rendkívül sok segítséget nyújtottak munkám szakmai részében.

Szeretném megköszönni az asszisztensi és baráti támogatást Szalma Krisztinának. Valamint szeretnék köszönetet mondani a II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai, Diabetológiai Centrum dolgozóinak, akik segítségükkel hozzájárultak, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

Végül szeretném megköszönni egész családom támogatását, türelmét és szeretetét, amire szükség volt ebben az időszakban.