

**A nem fiziológias tirozin-izomerek hatása a makrofágok működésére,
illetve lehetséges szerepük a vesebetegségek kialakulásában**

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Csurgyók Roland Lajos

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Wittmann István

Témavezető: Prof. Dr. Wittmann István



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

II. sz. Belgyógyászati Klinika, Nephrológiai és Diabetológiai Centrum

Pécs, 2025.

Rövidítésjegyzék

Akt: Protein kinase B; Protein kináz B

ANOVA: Analysis of Variance; Varianciaanalízis

Arg1: Arginase-1; Argináz-1

BSA: Bovine Serum Albumin; Szarvasmarha szérumalbumin

CRF: Corticotropin-releasing factor: Kortikotropin felszabadító faktor

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DOPA: Dihydroxy-phenylalanine; Dihidroxi-fenilalanin

EMT: Epithelial–Mesenchymal Transition; Epiteliális–mezenchimális átmenet

FPE: Foot Process Effacement; Podocita lábnyúlvány-fúzió

FSGS: Focal Segmental Glomerulosclerosis; Fokális szegmentális glomeruloszklerózis

HEK-293: Human Embryonic Kidney cells; Humán embrionális vesesejtek

iNOS: Inducible nitric oxide synthase; Indukálható nitrogén-monoxid-szintáz

IRS-1: Insulin receptor substrate 1; Inzulinreceptor-szubsztrát-1

pAkt: Phosphorylated Akt; Foszforilált Akt

PAST: Paleontological Statistics Software; PAST statisztikai szoftver

PBS: Phosphate-buffered saline; Foszfát-pufferelt sóoldat

Phe: Phenylalanine; Fenilalanin

ROI: Region of Interest; Vizsgált régió

STAT5: Signal Transducer and Activator of Transcription 5; Jelátvivő és transzkripció
aktivátor 5

T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus; 2-es típusú diabetes mellitus

WT1: Wilms' Tumor Protein; Wilms-tumor fehérje

1. BEVEZETÉS

A fenilalanin (Phe) az esszenciális aminosavak közé tartozik és enzimatis úton alakul át para-Tyr-ná, dihidroxifenilalaninná (DOPA), katekolaminokká, melaninná és pajzsmirigyhormonokká. A Phe aromás gyűrűjének sérülékenysége miatt az enzimatis módosulásokon felül lehetséges a nem enzimatis úton történő módosulása. A hidroxil szabad gyök képes a Phe aromás gyűrűjét hidroxilálni, aminek hatására a para-tirozin (para-Tyr) mellett nem fiziológiás para-tirozin (meta-Tyr) és orto-tirozin (orto-Tyr) is képződhet. A nem enzimatisan képződött para-Tyr, illetve meta- és orto-Tyr mennyisége azonban 3 nagyságrenddel kisebb, az enzimatis folyamatban képződő para-Tyr mennyiségéhez képest. A meta- és orto-Tyr megnövekedett mennyisége a hidroxil szabad gyök fokozott képződését tükrözi, ami oxidatív stresszre utal. A Tyr-izomereket régóta főként az oxidatív stressz markereiként tanulmányozzák, de egyre több bizonyíték van arra, hogy a nem fiziológiás Tyr-izomerek káros hatások okozói is [1].

Megfigyeltük, hogy összefüggés mutatható ki az orto-Tyr szérumszintje és az eritropoetin-rezisztencia között dializált betegekben [2]. Egy korábbi tanulmányunkban a meta- és orto-Tyr idő- és dózisfüggő módon gátolta az eritropoetin-függő eritroblaszt-proliférációt, illetve gyakorlatilag megakadályozta az eritropoetin által indukálta ERK és a STAT5 foszforilációt [3].

Előző vizsgálataink szerint a nem fiziológiás Tyr-izomerek (meta- és orto-Tyr) az oxidatív stressz markerei voltak krónikus veseelégtelenséggel együtt vagy anélkül előforduló 2-es típusú diabetes mellitus (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) esetén [4]. További eredményeink azt mutatták, hogy a resveratrol antioxidáns hatása miatt a 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegeknél csökkent az orto-Tyr kiválasztása a vizeletben, és ezzel párhuzamosan az inzulin-rezisztencia javulása is megfigyelhető volt [5].

A különböző sejtvonalak (HEK, podocita, makrofág és adipocita) meta- és orto-Tyr-en történő tenyésztése inzulin-rezisztenciához vezetett ezekben a sejtekben, hasonlóan a magas glükóztartalmú környezetben megfigyeltekhez. Ezekben a meta- és orto-Tyr-en tenyésztett sejtekben csökkent az inzulin által kiváltott inzulinreceptor-szubsztrát-1 (IRS-1) foszforiláció [6].

Korábbi Western-blot módszerrel végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy az Akt (Protein kináz B) nem stimulált, bazális foszforilációja a 3T3-L1 zsírsejtekben, HEK-293-sejtekben (humán embrionális vesesejtek) és podocitákban szignifikánsan magasabb volt meta- és orto-Tyr-kezelés hatására, a para-Tyr-kezeléshez viszonyítva. A megemelkedett foszforiláció rezisztenciát eredményezett ezekben a sejtekben, mert az inzulin-stimulált foszforiláció nem lett szignifikáns. Azt is megfigyeltük, hogy ha a foszforilált tirozin meta-Tyr vagy orto-Tyr volt a foszforilált polipeptid defoszforilációja a protein tirozin-foszfátáz 1B enzimje által szinte lehetetlen volt, míg a foszforilált para-Tyr gyorsan defoszforilálódott [6].

A gyulladásos folyamatok fontos szerepet játszanak a T2DM kialakulásában, viszont ennek mechanizmusa még nem teljesen tisztázott [7]. Valószínűsíthető, hogy az immunsejtek nem megfelelő aktiválása és az ennek hatására módosuló gyulladásos folyamatok részt vesznek a T2DM kialakulásában [7]. Az inzulin-rezisztencia hatással lehet a makrofágok működésére, mivel az inzulin az Akt jelátvitel aktiválásán keresztül befolyásolja a makrofágok M1 és M2 típusú polarizációját [8,9].

Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a nem fiziológiás tirozin-izomerek nemcsak az oxidatív stressz markerei, hanem számos betegség patogenezisében is szerepet játszhatnak [3,4,6,10].

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Célul tűztük ki a Tyr-izomerek sejtek által történő felvételének időbeli és mennyiségi meghatározását vesesejtekben.
2. Célul tűztük ki a nem fiziológiás Tyr-izomerek hatásának vizsgálatát a makrofágok inzulin-jelátvitelére az immunfluoreszcens módon jelölt pAkt (foszforilált Akt) intenzitásának meghatározásával.
3. Meg kívántuk vizsgálni, hogy a para-, meta- és orto-Tyr-kezelések hogyan befolyásolják a makrofágok M1/M2 irányú polarizációját az Argináz-1/iNOS (indukálható nitrogén-monoxid-szintáz) arány meghatározásának segítségével.
4. Célunk volt kimutatni, hogy az inzulin milyen hatással van az M1/M2 irányú makrofág polarizációra, illetve azt, hogy az abnormális Tyr-izomerek hogyan befolyásolják az inzulin ez irányú hatását.
5. Célul tűztük ki a vesebiopsziás minták vizsgálata során a kontroll és az FSGS (fokális szegmentális glomeruloszklerózis) csoport betegeinek összehasonlítását a klinikai adataik alapján.
6. Össze kívántuk hasonlítani a kontroll és FSGS-csoportok vesebiopsziás mintáit a glomerulusokban és a tubulo-interstitiumban immunfluoreszcens módszerrel jelölt WT1 (Wilms-tumor fehérje), vimentin és CRF (kortikotropin felszabadító faktor) festődési intenzitása alapján.
7. Célunk volt megvizsgálni, hogy a meta- és orto-Tyr hogyan befolyásolja a WT1, vimentin és CRF expresszióját embrionális vesesejtekben.

3. MÓDSZEREK

Sejtek tenyésztése

A vizsgálatainkhoz használt J774A.1 egér BALB/C monocita-makrofág és a HEK-293 tenyésztéséhez és fenntartásához Dulbecco Eagle's módosított tápközeget használtunk (DMEM) melyhez az alábbi összetevőket adtuk: 10% magzati szarvasmarha-szérum, 100 egység/ml penicillin, 0,1 mg/ml sztreptomycin, 2 µg/ml Fluconazol, 1 µg/ml inzulin. A tápközeg kísérlettől függően 5 vagy 25 mmol/l glükózt tartalmazott. A sejteket 6 lyukú plate-k-be helyezett fedőlemezekben tenyésztettük, párasított inkubátorban, 37 °C-on és 5%-os CO₂ tartalom mellett.

3.1. NEM FIZIOLÓGIÁS TIROZIN-IZOMEREK HATÁSÁRA KIALAKULÓ KRÓNIKUS INZULIN-REZISZTENCIA MAKROFÁGOKBAN

A makrofág sejtek kezelése és vizsgálata

A kezelések során a médiumhoz para-, vagy meta-, vagy orto-Tyr-t adtunk 72 mg/l mennyiségben. A para-Tyr kezelésein belül 5 és 25 mmol/l glükózt alkalmaztunk. A meta- és orto-Tyr kezelésekénél egyaránt és kizárólag 5 mmol/l glükózt tartalmazott a tápközeg. A kezeléseket 5 napon keresztül végeztük. Az 5. nap végén a sejteket egy éjszakán keresztül szérummentes médiumban tartottuk. Az inzulin-jelátvitel vizsgálata során 6, 25, 100 és 400 nmol-os inzulin dózisokat használtunk 10 perces kezelési idővel, míg az M1/M2 polarizáció meghatározásánál kizárólag 400 nmol-os inzulin koncentrációt használtunk 48 órán keresztül.

A Tyr-izomerek hatását a makrofágok inzulin-jelátvitelére a pAkt mennyiségének, meghatározásával végeztük immunfluoreszcens jelölés és intenzitásmérés segítségével. A makrofágok M1/M2 polarizációjának irányát az Argináz-1/iNOS arány számításával vizsgáltuk, aminek során az immunfluoreszcens módszerrel jelölt Argináz-1 és iNOS

mennyiségét intenzitás méréssel határoztuk meg. Negatív kontrollként csak para-Tyr-t tartalmazó médiumot, pozitív kontrollként pedig csak para-Tyr és magas glükóztartalmú (25 mmol/l) médiumot használtunk. A médium eltávolítása és jéghideg PBS-el való öblítés után a sejtek fixálását jéghideg 4%-os PBS-ben oldott pufferolt paraformaldehiddel 20 percig jégen végeztük. 0,1%-os PBS-ben oldott Triton X-100-zal 15 percig permeabilizáltunk. A blokkoláshoz 5%-os szarvasmarha szérumalbumint használtunk 60 percig szobahőmérsékleten. Az elsődleges antitesttel egy éjszakán át 4 °C-on, majd 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. A másodlagos antitestnél alkalmazott inkubáció 4 óra volt szobahőmérsékleten. A sejtmagokat DAPI segítségével jelöltük, a fedőlemezeket pedig DPX-el fedtük.

A HEK-sejtek tirozinfelvétele

Olyan tápközeget állítottunk elő para-, meta- és orto-Tyr hozzáadásával, amely azonos mennyiségben tartalmazza a három Tyr-izomert. A HEK sejteket ebben a médiumban inkubáltuk 0, 10, 20, 30, 40, 50 és 60 percig.

A sejtek által felvett Tyr-izomerek mennyiségét HPLC-készülék segítségével határoztuk meg. Itt nem volt szükség származékképzésre vagy jelölésre, mivel a para-, meta-, és orto-Tyr mennyiségét autofluoreszcenciájuk segítségével határoztuk meg, amit az általunk használt Shimadzu Class 10 HPLC rendszer RF-10 AXL fluoreszcens detektorával mértünk.

3.2. WT1, VIMENTIN ÉS CRF EXPRESSZIÓJA FOKÁLIS SZEGMENTÁLIS GLOMERULOSCLEROSISBAN (FSGS) HUMÁN VESÉBEN ÉS A META- ÉS ORTO-TIROZIN HATÁSA A WT1-, VIMENTIN- ÉS CRF-EXPRESSZIÓRA HEK-293-SEJTEKBEN

A vizsgálatban résztvevő betegek

Tanulmányunkban 42 FSGS-el diagnosztizált beteg vesebiopsziás mintáit, illetve klinikai paramétereit vizsgáltuk. Kontrollként 7 vékony bazális membrán nephropathiában szenvedő beteg vesebiopsziás mintáit használtuk. Minden beteg betöltötte a 18 éves kort, átlagéletkoruk az FSGS csoport esetén $39,9 \pm 18,6$ év volt (23 férfi és 19 nő), a kontroll csoport esetén pedig $5,1 \pm 15,6$ év volt (3 férfi és 4 nő). Minden vesebiopsziás mintavétel a Pécsi Tudományegyetem Orvostudományi Karának 2. Belgyógyászati és Nefrológiai-Diabetológiai Központjában történt.

Vesebiopsziás minták

A vesebiopsziás minták esetében a podocita lábnyúlvány-fúzió (FPE) mértékét elektronmikroszkópos vizsgálat segítségével határoztuk meg. A WT1-, vimentin- és CRF-expresszió mértékét immunfluoreszcens jelöléssel, illetve a jelölés intenzitásának mérésével határoztuk meg.

A mintákból nyert szeleteket 0,6%-os Triton-X 100-zal permeabilizáltuk és 1%-os BSA-val (szarvasmarha szérumalbumin) 30 percig blokkoltuk. Az elsődleges antitest jelölés során a szeleteket 90 percig inkubáltuk az elsődleges antitestekkel. A másodlagos antitest alkalmazása során a sejteket 60 percig inkubáltuk. Végül a szeleteket VECTASHIELD Antifade Mounting Medium-mal fedtük.

HEK-293 sejtek kezelése és vizsgálata

A HEK-293-sejtek kezelése során a tápközeg para-, vagy meta-, vagy orto-Tyr-t tartalmazott 72 mg/l mennyiségben. A tirozin izomerekkel történő kezelést 5 napig alkalmaztuk, ami után a sejteket egy éjszakán keresztül szérummentes médiumban növesztettük.

Ezt követően PBS-el öblítve eltávolítottuk a sejtekről a tápközeg maradványait, majd a sejteket 4% pufferolt paraformaldehiddel (PBS-ben oldva) 20 percig fixáltuk. A permeabilizálást 10 percig végeztük PBS-ben oldott 0,3%-os Triton-X 100-zal. A blokkolást 2,5%-os szarvasmarha szérumalbuminnal történt, 45 percen keresztül. Az elsődleges antitest jelölés során a sejteket 60 percig inkubáltuk a PBS-ben oldott elsődleges antitestekkel. A másodlagos antitesttel való jelölés során a sejteket 60 percig inkubáltuk a másodlagos antitestekkel, amiket szintén PBS-ben oldottunk. Végül a sejteket VECTASHIELD Antifade Mounting Medium-mal rögzítettük, fedtük.

Intenzitásmérés

Az immunfluoreszcens módszerrel jelölt mintákról a képeket konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével rögzítettük. A jelölés intenzitását a Nikon NIS elements szoftverének segítségével mértük meg. A vizsgált régiók (Region of interest, ROI) kiválasztása manuálisan történt. Az összes ROI megkettőzése után (a duplikált ROI területe megegyezett az eredeti ROI-val) a duplikátumokat a háttérre helyeztük. A ROI területén belül mért összes pixel számából kivontuk a háttérre helyezett ROI-k intenzitását. Az így kapott intenzitás értéket az adott ROI területével korrigáltuk.

Statisztikai analízis

A változók eloszlásának ellenőrzéséhez a Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztuk. A normális eloszlású változók esetén varianciaanalízist (ANOVA) a nem normális eloszlású változók esetében pedig a Kruskal-Wallis tesztet és a Mann-Whitney U tesztet használtuk. Az adatok trendjeinek tesztelése a Mann-Kendall trendteszt segítségével történt. A kezelések közötti összefüggéseket Spearman-féle rho korrelációs teszttel elemeztük. A 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az adatok statisztikai elemzése a Paleontological Statistics (PAST) szoftver 3.21-es verziójával történt.

4. EREDMÉNYEK

4.1. NEM FIZIOLÓGIÁS TIROZIN-IZOMEREK HATÁSÁRA KIALAKULÓ KRÓNIKUS INZULIN-REZISZTENCIA MAKROFÁGOKBAN

A HEK-sejtek tirozinfelvétele

A Tyr-izomerek felvételének vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a kontrollcsoportban a sejtek elenyésző mennyiségben tartalmaztak meta- és orto-Tyr-izomereket a para-Tyr mennyiségéhez képest. A 20. perctől kezdve a meta-Tyr mennyisége nem különbözött szignifikánsan a para-Tyr mennyiségétől, viszont az orto-Tyr mennyisége a növekedés ellenére 60 perc elteltével is alacsonyabb maradt a para-Tyr, mennyiségéhez képest, tehát a HEK-293-sejtek a para-Tyr-nal közel megegyező mennyiségben veszik fel a meta- és orto-Tyr-t.

Inzulinkezelés hatása J774A.1 makrofágok pAkt mennyiségére különböző médiumokban

Az inzulinkezelésben nem részesült kontroll csoportok esetén az alábbiakat tapasztaltuk: A magas glükóz tartalmú (25 mmol/l) médiumban magasabb volt a nem stimulált pAkt mennyisége a makrofágokban összehasonlítva az 5 mmol/l glükózt tartalmazó kezeléssel. A meta- és orto-Tyr tartalmú médiummal történő kezelés önmagában szintén növelte a nem stimulált pAkt mennyiségét a para-Tyr-os kontrollhoz képest.

Az inzulinnal történő stimuláció hatására a pAkt mennyisége a következőképpen alakult:

A fiziológias para-Tyr-t tartalmazó médiumban az inzulin dózis függő módon növelte a pAkt mennyiségét. A magas glükózkoncentráció megszüntette az inzulin pAkt mennyiségét növelő hatását. A meta- és orto-Tyr megakadályozta az inzulin pAkt-n keresztüli jelátvitelét.

Az inzulinkezelés hatása az argináz-1/iNOS arányra különböző médiumokban inkubált J774A.1 makrofágokban

A magas glükózkezelés csökkentette a makrofágokban az argináz-1/iNOS arányt. Ehhez hasonlóan a meta- és orto-Tyr hatására is csökkent az argináz-1/iNOS arány a makrofág sejtekben a fiziológiás para-Tyr-kezeléshez képest. A para-Tyr-os kontrollkezelés mellett az inzulin csökkentette az argináz-1/iNOS arányt. A magas glükóz tartalmú médium megszüntette az inzulin hatását. Az orto-Tyr kezelés mellett szintén megszűnt az inzulin kiváltotta csökkenés az argináz-1/iNOS arány tekintetében. A meta-Tyr alkalmazása pedig megfordította ezt a hatást és az inzulin növelte az argináz-1/iNOS arányát a makrofág sejtekben.

4.2. A WT1, A VIMENTIN ÉS A CRF EXPRESSZIÓJA FOKÁLIS SZEGMENTÁLIS GLOMERULOSCLEROSISBAN (FSGS) HUMÁN VESÉBEN ÉS A META- ÉS ORTO-TIROZIN HATÁSA A WT1-, VIMENTIN- ÉS CRF-EXPRESSZIÓRA HEK-293-SEJTEKBEN

A kontroll és az FSGS-csoport betegeinek alapadatai

A kontroll és az FSGS-csoport betegeinek alapadatait összehasonlítva azt találtuk, hogy a vártak megfelelően az FSGS-csoportban szignifikánsan nagyobb volt az FPE a kontrollhoz képest. Emellett a vörösvértest-süllyedés értéke is magasabb volt az FSGS-csoportban a kontrollhoz viszonyítva, valamint az FSGS-csoportban az alkalmazott diuretikumok mennyisége is nagyobb volt a kontrollcsoportban regisztrálthoz képest.

Vesebiopsziás minták

A vesebiopsziás mintákban azt találtuk, hogy a WT1-jelölés intenzitásának tekintetében a glomerulusokban nem volt szignifikáns különbség az FSGS- és a kontrollcsoport között. Viszont a tubulo-interstitium esetén az FSGS-csoportban alacsonyabb volt a WT1-expresszió a kontrollcsoportéhoz képest. A vimentin-jelölés intenzitása az FSGS-csoport glomerulusaiban

alacsonyabb volt a kontrollhoz képest. A tubulo-interstitium jelölése esetén pedig magasabb volt a vimentin-expresszió a kontrollcsoporthoz viszonyítva. A CRF-jelölés intenzitása kisebb volt a glomerulusokban mint a tubulo-interstitiumban. A FPE mértéke a glomerulusokban korrelációt mutatott a vimentin- és a CRF-jelölés intenzitásával.

HEK-293 sejtek

A HEK-293-sejtek kezelése során azt tapasztaltuk, hogy a meta- és orto-Tyr kezelés egyaránt csökkentette a WT1 mennyiségét a fiziológias para-Tyr-kezeléshez viszonyítva. A meta-Tyr pedig a vimentin expresszióját csökkentette a HEK-293-sejtekben a para-Tyr-os kontrollhoz képest.

5. MEGBESZÉLÉS

A Tyr-izomerek felvételének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a HEK-293 sejtek közel azonos mértékben veszik fel mindhárom izomert. Az inzulinnal nem kezelt makrofág sejtekben a 25 mmol/l-es glukózkoncentráció, a meta- és az orto-Tyr növelte a pAkt-szintet és csökkentette az argináz 1/iNOS arányt. A fiziológias para-tirozin kezelés esetén az inzulin dózis függően növelte a pAkt mennyiségét és csökkentette az argináz 1/iNOS arányt. Mind a meta-, mind az orto-Tyr-kezelés megszüntette vagy megfordította az inzulin pAkt-ra gyakorolt növelő hatását és az argináz 1/iNOS arányra gyakorolt csökkentő hatását.

A glomerulusokban a WT1 festődés intenzitása az FSGS és a kontrollcsoportokban azonos volt, viszont a tubulo-interstitiumában alacsonyabb volt a WT1 intenzitása az FSGS-betegek esetén. Alacsonyabb volt a vimentin intenzitás az FSGS-betegek glomerulusaiban, és magasabb volt a tubulo-interstitiumban, a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. Az elektronmikroszkóppal meghatározott FPE mértéke korrelációt mutatott a vimentinnel és a CRF-fel a glomerulusokban. A HEK sejtek vizsgálata során a WT1 jelölés intenzitása alacsonyabb volt a meta- és orto-Tyr csoportban, valamint a vimentin intenzitása alacsonyabb volt a meta-Tyr csoportban a para-Tyr csoportban mértékhez képest.

5.1. TYR-IZOMEREK FELVÉTELÉNEK VIZSGÁLATA

Régóta vizsgálják a nem fiziológias Tyr-izomerek káros hatását az élő szervezetekre [11]. Vizsgálatainkból arra következtethetünk, hogy a sejtek azonos mértékben képesek felvenni a kóros Tyr-izomereket, mint a fiziológias para-Tyr-t. Valószínűsíthetjük, hogy a Tyr-izomerek képesek beépülni a fehérjékbe, és többek között ilyen módon is kifejtik az élő szervezetekre gyakorolt káros hatásukat [12].

5.2. AZ ABNORMÁLIS TYR-IZOMEREK HATÁSA A MAKROFÁGOK INZULIN-JELÁTVITELÉRE

A kutatócsoportunk tanulmányain kívül nem találtunk olyan tanulmányt melyben a Tyr-izomerek pAkt, vagy egyéb inzulin-jelátvitelben szereplő fehérje aktivitására gyakorolt hatását vizsgálták. Viszont felleltünk néhány publikációt melyekben az oxidatív stressz hatását vizsgálták az Akt foszforilációjára makrofágokban illetve egyéb szövetekben [13–17]. Mivel az oxidatív stressz növekedésével nő a nem fiziológiás tirozinok mennyisége, ezért ezek a tanulmányok közvetett módon összevethetők az általunk végzett vizsgálatokkal. Ezek közül a tanulmányok közül 3 vizsgált makrofágokat és mind a három vizsgálat alátámasztja azon eredményünket, hogy a nem fiziológiás Tyr-izomerek és a glükóz mennyiségének magasabb szintje növeli a pAkt mennyiségét.

Az említett kutatások nem vizsgálták az oxidatív stressz hatását az inzulinra. Kutatócsoportunk előző munkái során vizsgálta a nem fiziológiás Tyr-izomerek hatását az inzulin-jelátvitelre az IRS-1 és pAkt mérésén keresztül [6]. Ezek az eredmények alátámasztják jelen eredményeinket miszerint a meta- és orto-Tyr jelenlétében megszűnik az inzulin pAkt mennyiségét növelő hatása.

5.3. AZ ABNORMÁLIS TYR-IZOMEREK HATÁSA A MAKROFÁGOK M1/M2 IRÁNYÚ POLARIZÁCIÓJÁRA

Sajnos kevésbé vizsgálták az inzulin-rezisztencia hatását a makrofágok polarizációjának irányára. Két olyan releváns tanulmányt találtunk az irodalomban, ahol az inzulin és az inzulin rezisztencia hatását vizsgálták a makrofágok M1/M2 irányú polarizációjára [18,19]. Ezek a tanulmányok, ahol az iNOS illetve az Arg1 (Argináz-1) expressziót is vizsgálták, alátámasztják azon eredményeinket, miszerint az inzulin-rezisztencia hatására csökken az iNOS és növekszik az Arg1 mennyisége a makrofág sejtekben. Vizsgálatunk megbízhatóságát tovább erősíti az

inzulin-jelátvitel és az M1/M2 polarizáció vizsgálatánál kapott eredményeink közötti koherencia.

5.4. VESEBIOPSIÁS MINTÁK ÉS HEK-293-SEJTEK VIZSGÁLATA

Az FSGS diagnózisában kiemelkedő szerepe van az elektronmikroszkóp segítségével detektálható FPE megléte, amely egyik kezdő lépése a podociták károsodásának [20,21]. Az általunk vizsgált FSGS-el diagnosztizált betegek mintáiban a vártnak megfelelően magasabb volt az FPE aránya a kontroll csoport mintáihoz viszonyítva.

A WT1 nélkülözhetetlen a podociták funkciójának, illetve ezen keresztül a glomeruláris működésnek a fenntartásához. A WT1 expressziójának csökkenése heveny glomerulonephritist és mesangialis sclerosist okozhat [22]. Ezek alapján a WT1 kardinális szerepet tölt be a vese működésében, és hiánya (főként) glomerulopathiak kialakulásához vezethet. Eredményeink szerint a WT1 mennyisége nem különbözött az FSGS és a kontroll csoport glomerulusaiban. Igaz a podociták nem képesek a regenerációra, de vizsgálatok igazolják, hogy a sérülés hatására a pariethalis epithelialis sejtek képesek vándorolni és podocita irányba differenciálódni [23,24]. Ezek a sejtek szaporodhatnak a podocita-károsodás hatására, és képesek helyettesíteni a sérült podocitákat [22]. Ez a fajta regenerációs folyamat lehet felelős a változatlan WT1 szintekért az FSGS korai szakaszában.

A krónikus tubulo-intersticiális változások melyek az FSGS-ben megfigyelhetők, a WT1-jelölés intenzitásának csökkenését okozhatja, ami magyarázhatja az általunk kapott eredményeket.

Egerekben a WT1-fehérje expressziójának gátlása az FSGS kialakulásához vezetett [25]. Eredményeink azt mutatják, hogy a meta- és orto-Tyr tartalmú médiumban csökken a WT1 fehérje jelölésének intenzitása. Ebből arra következtethetünk, hogy az abnormális Tyr-izomereknek szerepe lehet a WT1-fehérje expressziójának gátlásában és így az FSGS kialakulásában is.

A vimentin egy intermedier filamentum, amely főként a mezenchimális eredetű kötőszöveti sejtekben és a simaizom-sejtekben fordul elő és fontos szerepe van a podociták sejtvezeték kialakításában is. Szerepet játszik a podocita sejtek integritásának megőrzésében is, illetve szerepe van a podociták sérülésre adott válaszában is [26,27]. Továbbá a vimentin a vese tubuláris károsodását is jelezheti a tubuláris epithelialis-mezenchimális átmenet (EMT) esetén, ahol a vimentin neo-expressziója figyelhető meg [28]. A fentiek alapján a vimentin fontos szerepet tölt be a vese működésében, és mennyiségének változása a vesekárosodás markereként funkcionálhat.

A vimentin szignifikánsan alacsonyabb szintje az FSGS-betegek glomerulusaiban magyarázható a károsodott podociták megnövekedett számával, amit podocita FPE és a vimentin (glom), valamint a WT1 (glom) és a vimentin (glom) közötti erős negatív korreláció is alátámaszt.

A vimentin expressziója szignifikánsan magasabb volt az FSGS-ben szenvedő betegek tubulo-interstitiumában, ami a krónikus károsodásra adott válaszként az EMT-t markere lehet [29–31]

HEK-293 sejtek esetén az eredményeink azt mutatják, hogy a meta-Tyr jelentősen csökkenti a vimentin festődési intenzitását, ami koherens a vesebiopsziás minták esetén mért eredményeinkkel.

Nem találtunk olyan tanulmányokat, ahol a CRF expresszióját vizsgálták az FSGS-ben illetve az egészséges vesékben sem találtunk adatot a CRF expressziójáról. Vizsgálatunkban immunfluoreszcens jelölés segítségével CRF-expressziót mértünk, az FSGS-ben és a kontrollcsoportban egyaránt. A CRF festési intenzitása szignifikánsan alacsonyabb volt az FSGS-csoport glomerulusaiban és nem mutatott különbséget a két csoport tubulo-interstitiumában.

A HEK-293-sejtek CRF-pozitivitást mutattak, de a meta-Tyr-rel vagy orto-Tyr-rel történő kezelésnek nem volt hatása a CRF-jelölés intenzitására, amiből arra következtethetünk, hogy a CRF valószínűleg nem játszik jelentős szerepet az FSGS patogenezisében.

5.5. KÖVETKEZTETÉSEK

Fentiek alapján a kóros Tyr-izomerek jelentős szerepet játszanak az inzulin-rezisztencia kialakulásában a makrofágokban, amin keresztül hatást gyakorolnak azok M1/M2 irányú polarizációjára. Továbbá az abnormalis Tyr-izomerek az inzulin-rezisztencia előidézésével közvetve, és eredményeink szerint közvetlenül is részt vesznek a különböző vesebetegségek kialakulásában.

6. A DOLGOZAT TÉZISEI

1. Makrofágokban, fiziológias para-tirozin kezelés esetén az inzulin növelte a pAkt mennyiségét és csökkentette az argináz-1/iNOS arányt.
2. Makrofágokban, a meta- és orto-Tyr-kezelés mellett az inzulin csökkentette a pAkt mennyiségét és növelte az argináz-1/iNOS arányt.
3. Makrofágokban, inzulin-kezelés hiányában a 25 mmol/l-es glükózkoncentráció, a meta- és orto-Tyr-kezelés növelte a pAkt-szintet és csökkentették az argináz-1/iNOS arányt
4. A glomerulusban az FSGS- és kontrollcsoportban mért WT1-intenzitások között nem volt különbség, viszont a tubulo-interstitiumban az FSGS-csoport esetén kisebb volt a WT1-intenzitás a kontrollhoz képest.
5. A glomerulusban mért vimentin intenzitás az FSGS-csoportban kisebb volt a kontrollhoz képest és a tubulo-interstitiumban mért vimentin intenzitása FSGS-ben nagyobb volt a kontrollhoz viszonyítva.
6. Glomerulusban mért CRF intenzitás az FSGS-csoportban kisebb volt a kontrollhoz képest.
7. A HEK-293-sejtekben meta- és orto-Tyr-kezelés hatására csökkent a WT1 intenzitása a kontrollhoz képest.
8. A meta-Tyr-kezelés hatására csökkent a vimentin intenzitása a HEK-293-sejtekben.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm témavezetőmen Wittmann István Professzor Úrnak a munkám során nyújtott nélkülözhetetlen útmutatását, segítségét és emberségét.

Szeretném megköszönni szerzőtársaimnak Dr. Vas Tibornak, Dr. Engelmann Péternek, és Prof. Dr. Sütő Gábornak a tanulmányokban való eredményes együttműködést és sok segítséget.

Köszönettel tartozom kollégáimnak, Kertész Melindának, Simóné Tóth Natália Mónikának, Póta Saroltának, és Szalma Krisztinának a laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért.

Köszönöm Bodor Enikőnek, Horvát Klaudiának és Horváth Viktóriának az ügyintézésben és szervezésben nyújtott segítségét.

Végezetül köszönöm családomnak és főként Feleségemnek a türelmet, bátorítást és töretlen támogatást.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ipson, B.R.; Fisher, A.L. Roles of the Tyrosine Isomers Meta-Tyrosine and Ortho-Tyrosine in Oxidative Stress. *Ageing Res. Rev.* **2016**, *27*, 93–107, doi:10.1016/j.arr.2016.03.005.
2. Kun, S.; Mikolás, E.; Molnár, G.A.; 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**, *19*, 190–198, doi:10.1179/1351000214Y.0000000090.
3. Mikolás, E.; Kun, S.; 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, doi:10.1159/000355770.
4. Molnár, G.A.; Wagner, Z.; Markó, L.; Kó Szegi, T.; Mohás, M.; Kocsis, B.; Matus, Z.; Wagner, L.; Tamaskó, M.; Mazák, I.; et al. Urinary Ortho-Tyrosine Excretion in Diabetes Mellitus and Renal Failure: Evidence for Hydroxyl Radical Production. *Kidney Int.* **2005**, *68*, 2281–2287, doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00687.x.
5. Brasnyó, P.; Molnár, G.A.; Mohás, M.; Markó, L.; Laczy, B.; Cseh, J.; Mikolás, E.; Szijártó, I.A.; Mérei, A.; Halmai, R.; et al. Resveratrol Improves Insulin Sensitivity, Reduces Oxidative Stress and Activates the Akt Pathway in Type 2 Diabetic Patients. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*, 383–389, doi:10.1017/S0007114511000316.
6. Mohás-Cseh, J.; Molnár, G.A.; Pap, M.; Laczy, B.; Vas, T.; Kertész, M.; Németh, K.; Hetényi, C.; Csikós, O.; Tóth, G.K.; et al. Incorporation of Oxidized Phenylalanine Derivatives into Insulin Signaling Relevant Proteins May Link Oxidative Stress to Signaling Conditions Underlying Chronic Insulin Resistance. *Biomedicine* **2022**, *10*, 975, doi:10.3390/biomedicine10050975.
7. Donath, M.Y.; Shoelson, S.E. Type 2 Diabetes as an Inflammatory Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 98–107, doi:10.1038/nri2925.
8. Daryabor, G.; Atashzar, M.R.; Kabelitz, D.; Meri, S.; Kalantar, K. The Effects of Type 2 Diabetes Mellitus on Organ Metabolism and the Immune System. *Front. Immunol.* **2020**, *11*.
9. Androulidaki, A.; Iliopoulos, D.; Arranz, A.; Doxaki, C.; Schworer, S.; Zacharioudaki, V.; Margioris, A.N.; Tsihchlis, P.N.; Tsatsanis, C. The Kinase Akt1 Controls Macrophage Response to Lipopolysaccharide by Regulating MicroRNAs. *Immunity* **2009**, *31*, 220–231, doi:10.1016/j.immuni.2009.06.024.
10. Wittmann, I. The Common Single Cause of Chronic Multi-Hormonal Resistance in Oxidative Stress. *Antioxid. Basel Switz.* **2022**, *12*, 75, doi:10.3390/antiox12010075.
11. Smith, L.C.; Ravel, J.M.; Lax, S.R.; Shive, W. THE EFFECTS OF PHENYLALANINE AND TYROSINE ANALOGS ON THE SYNTHESIS AND ACTIVITY OF 3-DEOXY-D-ARABINO-HEPTULOSONIC ACID 7-PHOSPHATE SYNTHETASES. *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *105*, 424–430, doi:10.1016/0003-9861(64)90026-8.
12. Gurer-Orhan, H.; Ercal, N.; Mare, S.; Pennathur, S.; Orhan, H.; Heinecke, J.W. Misincorporation of Free M-Tyrosine into Cellular Proteins: A Potential Cytotoxic Mechanism for Oxidized Amino Acids. *Biochem. J.* **2006**, *395*, 277–284, doi:10.1042/BJ20051964.
13. Wang, Y.; Wu, Y.; Peng, S. Resveratrol Inhibits the Inflammatory Response and Oxidative Stress Induced by Uterine Ischemia Reperfusion Injury by Activating PI3K-AKT Pathway. *PloS One* **2022**, *17*, e0266961, doi:10.1371/journal.pone.0266961.

14. Liu, H.; Chen, W.; Lu, P.; Ma, Y.; Liang, X.; Liu, Y. Ginsenoside Rg1 Attenuates the Inflammation and Oxidative Stress Induced by Diabetic Nephropathy through Regulating the PI3K/AKT/FOXO3 Pathway. *Ann. Transl. Med.* **2021**, *9*, 1789, doi:10.21037/atm-21-6234.
15. Pei, C.; Wang, F.; Huang, D.; Shi, S.; Wang, X.; Wang, Y.; Li, S.; Wu, Y.; Wang, Z. Astragaloside IV Protects from PM2.5-Induced Lung Injury by Regulating Autophagy via Inhibition of PI3K/Akt/MTOR Signaling in Vivo and in Vitro. *J. Inflamm. Res.* **2021**, *14*, 4707–4721, doi:10.2147/JIR.S312167.
16. Zheng, H.; Cui, D.; Quan, X.; Yang, W.; Li, Y.; Zhang, L.; Liu, E. Lp-PLA2 Silencing Protects against Ox-LDL-Induced Oxidative Stress and Cell Apoptosis via Akt/MTOR Signaling Pathway in Human THP1 Macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *477*, 1017–1023, doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.022.
17. Huang, J.; Nong, X.; Chen, Y.; Zhang, A.; Chen, L. 3-O-Trans-Caffeoyloleanolic Acid Improves Acute Lung Injury via Anti-Inflammation and Antioxidative Stress-Involved PI3K/AKT Pathway. *Chem. Biol. Drug Des.* **2021**, *98*, 114–126, doi:10.1111/cbdd.13856.
18. Panda, S.; Seelan, D.M.; Faisal, S.; Arora, A.; Luthra, K.; Palanichamy, J.K.; Mohan, A.; Vikram, N.K.; Gupta, N.K.; Ramakrishnan, L.; et al. Chronic Hyperglycemia Drives Alterations in Macrophage Effector Function in Pulmonary Tuberculosis. *Eur. J. Immunol.* **2022**, *52*, 1595–1609, doi:10.1002/eji.202249839.
19. Ieronymaki, E.; Daskalaki, M.G.; Lyroni, K.; Tsatsanis, C. Insulin Signaling and Insulin Resistance Facilitate Trained Immunity in Macrophages Through Metabolic and Epigenetic Changes. *Front. Immunol.* **2019**, *10*.
20. Deegens, J.K.J.; Dijkman, H.B.P.M.; Borm, G.F.; Steenbergen, E.J.; van den Berg, J.G.; Weening, J.J.; Wetzels, J.F.M. Podocyte Foot Process Effacement as a Diagnostic Tool in Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **2008**, *74*, 1568–1576, doi:10.1038/ki.2008.413.
21. Sun, K.; Xie, Q.; Hao, C.-M. Mechanisms of Scarring in Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Dis.* **2021**, *7*, 350–358, doi:10.1159/000517108.
22. Guo, J.-K.; Menke, A.L.; Gubler, M.-C.; Clarke, A.R.; Harrison, D.; Hammes, A.; Hastie, N.D.; Schedl, A. WT1 Is a Key Regulator of Podocyte Function: Reduced Expression Levels Cause Crescentic Glomerulonephritis and Mesangial Sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 651–659, doi:10.1093/hmg/11.6.651.
23. Appel, D.; Kershaw, D.B.; Smeets, B.; Yuan, G.; Fuss, A.; Frye, B.; Elger, M.; Kriz, W.; Floege, J.; Moeller, M.J. Recruitment of Podocytes from Glomerular Parietal Epithelial Cells. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2009**, *20*, 333–343, doi:10.1681/ASN.2008070795.
24. Ohse, T.; Vaughan, M.R.; Kopp, J.B.; Krofft, R.D.; Marshall, C.B.; Chang, A.M.; Hudkins, K.L.; Alpers, C.E.; Pippin, J.W.; Shankland, S.J. De Novo Expression of Podocyte Proteins in Parietal Epithelial Cells during Experimental Glomerular Disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2010**, *298*, F702–711, doi:10.1152/ajprenal.00428.2009.
25. Gebeshuber, C.A.; Kornauth, C.; Dong, L.; Sierig, R.; Seibler, J.; Reiss, M.; Tauber, S.; Bilban, M.; Wang, S.; Kain, R.; et al. Focal Segmental Glomerulosclerosis Is Induced by MicroRNA-193a and Its Downregulation of WT1. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 481–487, doi:10.1038/nm.3142.
26. Yaoita, E.; Franke, W.W.; Yamamoto, T.; Kawasaki, K.; Kihara, I. Identification of Renal Podocytes in Multiple Species: Higher Vertebrates Are Vimentin Positive/Lower Vertebrates Are Desmin Positive. *Histochem. Cell Biol.* **1999**, *111*, 107–115, doi:10.1007/s004180050340.
27. Zou, J.; Yaoita, E.; Watanabe, Y.; Yoshida, Y.; Nameta, M.; Li, H.; Qu, Z.; Yamamoto, T. Upregulation of Nestin, Vimentin, and Desmin in Rat Podocytes in Response to Injury. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **2006**, *448*, 485–492, doi:10.1007/s00428-005-0134-9.

28. Bénardeau, A.; Verry, P.; Atzpodien, E.-A.; Funk, J.M.; Meyer, M.; Mizrahi, J.; Winter, M.; Wright, M.B.; Uhles, S.; Sebkova, E. Effects of the Dual PPAR- α/γ Agonist Aleglitazar on Glycaemic Control and Organ Protection in the Zucker Diabetic Fatty Rat. *Diabetes Obes. Metab.* **2013**, *15*, 164–174, doi:10.1111/dom.12006.
29. Jercan, O.; Penescu, M.; Traşcă, D.M. Implications of Tubulo-Interstitial Epithelial and Mesenchymal Relation in Chronic Kidney Disease. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* **2012**, *53*, 713–717.
30. Rocha, L.P.; Xavier, S.C.; Helmo, F.R.; Machado, J.R.; Ramalho, F.S.; Dos Reis, M.A.; Corrêa, R.R.M. Epithelial-Mesenchymal Transition in Pediatric Nephropathies. *Pathol. Res. Pract.* **2016**, *212*, 1157–1166, doi:10.1016/j.prp.2016.09.008.
31. Farris, A.B.; Colvin, R.B. Renal Interstitial Fibrosis: Mechanisms and Evaluation. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2012**, *21*, 289–300, doi:10.1097/MNH.0b013e3283521cfa.

9. A DISSZERTÁCIÓHOZ CSATLAKOZÓ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1.:Csurgyók, R., Sütő, G., Wittmann, I., Vas, T. (2023). Expression of Wilms-tumor 1 antigen, vimentin and corticotropin releasing factor in human kidney with focal segmental glomerulosclerosis and effect of oxidative stress on these markers in HEK 293 cells. KIDNEY AND BLOOD PRESSURE RESEARCH, 48(1), 56–65. <http://doi.org/10.1159/000528727>

IF: 2,3

2.:Csurgyók, R., Sütő, G., Engelmann, P., Wittmann, I., Vas, T. (2024). Kóros tirozinizomerek hatása a krónikus inzulinrezisztencia kialakulására és az M1/M2 polarizáció irányára makrofágokban. DIABETOLOGIA HUNGARICA, 32(3), 231–245. doi:10.24121/dh.2024.16

10.A DISSZERTÁCIÓHOZ NEM CSATLAKOZÓ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Bali, Z.K.; Inkeller, J.; Csurgyók, R.; Bruszt, N.; Horváth, H.; Hernádi, I. Differential Effects of A7 Nicotinic Receptor Agonist PHA-543613 on Spatial Memory Performance of Rats in Two Distinct Pharmacological Dementia Models. Behav. Brain Res. 2015, 278, 404–410, doi:10.1016/j.bbr.2014.10.030. IF: 3,0

2. Bali, Z.K.; Bruszt, N.; Tadeipalli, S.A.; Csurgyók, R.; Nagy, L.V.; Tompa, M.; Hernádi, I. Cognitive Enhancer Effects of Low Memantine Doses Are Facilitated by an Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist in Scopolamine-Induced Amnesia in Rats. Front. Pharmacol. 2019, 10, doi:10.3389/fphar.2019.00073. IF: 3,8

3. Sebők, J., Édel, Z., Nusser, N., Péter, I., Csurgyók, R., Kun, S., Wittmann, I. (2024). A balneoterápia szerepe a 2-es típusú diabetes mellitus komplex kezelésében – irodalmi áttekintés. DIABETOLOGIA HUNGARICA, 32(1), 59-67. <http://doi.org/10.24121/dh.2024.7>

4. Sebők, J., Édel, Z., Kun, S., Nusser, N., Péter, I., Bélyi, Z., ... Wittmann, I. (2024). A hőterápia és a kén tartalmú termálvíz hatása 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő betegekben : Háromkarú, randomizált, kontrollált vizsgálat. DIABETOLOGIA HUNGARICA, 32(2), 125–138. <http://doi.org/10.24121/dh.2024.10>
5. Ladányi, E., Csurgók, R., Kun, Sz., Wittmann, I. (2024) A miskolci dialíziscentrum betegeinek jellemzése, különös tekintettel a halálozásra, a testösszetételre és a kezelési módra. HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 28 : 3 pp. 101-111. 11 p. <https://doi.org/10.33668/hn.28.013>