

Tirozin izomerek szerepe eritropoetin- és inzulin-rezisztenciában

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Kun Szilárd



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

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

Doktori program vezetője: Prof. Dr. Wittmann István

Témavezető: Prof. Dr. Wittmann István, Dr. Molnár Gergő Attila

Pécs, 2017

1. Bevezetés

Hidroxil szabad gyök hatására fenilalaninból (Phe) para-, meta- és ortotirozin (p-Tyr, m-Tyr, o-Tyr) képződik [1,2]. Ezek közül ugyanakkor a p-Tyr élettanilag nagyrészt enzimatikus úton, a fenilalanin-hidroxiláz hatására képződik a vesében és kisebb részben a májban [3]. Az ily módon keletkező p-Tyr mennyisége messze meghaladja a szabadgyökös úton képződöttét. A p-Tyr a glukoneogenezis szubsztrátjaként is szolgálhat.

Az m- és az o-Tyr emberben viszont kizárólag az említett szabadgyökös úton jön létre. A hidroxil szabad gyök detektálása – alacsony koncentrációja és rövid féléletideje miatt – technikailag rendkívül nehézkes, ugyanakkor a hatására képződő, fent leírt, stabil aminosavmódosulatok jól mérhetők. E jellegzetességeiknél fogva az m- és az o-Tyr kiválóan alkalmazható hidroxil szabadgyökmarkerként.

Korábbi *in vitro*, állatkísérletes és humán megfigyelések szerint a fenilalanin oxidatív módosulatainak szintje szignifikánsan magasabb bizonyos patológiás állapotokban. Így például kataraktás lencsék o-Tyr koncentrációja magasabb, mint nem kataraktás lencséké [4]. A vizelettel ürülő o-Tyr mennyisége magasabb diabéteszesekben és krónikus vesebetegekben, mint egészségesekben [5]. Akut iszkémiás stroke-on átesett betegekben a vizelet albumin/kreatinin hányados korrelál a vizelet o-Tyr/kreatinin hányadosával [6]. A természetes antioxidáns rezveratrol adása csökkenti a vizelettel ürülő o-Tyr mennyiségét és javítja az inzulin-érzékenységet 2-es típusú DM-ben szenvedő betegekben [7]. Diabéteszes majmok aortájának fehérjéiben emelkedett o-Tyr szintet találtak [8]. Megfigyelések szerint az m-Tyr citotoxikus hatását annak sejtfehérjékbe történő koncentrációfüggő beépülése közvetíti [9]. További

vizsgálatok alapján mind az m-Tyr, mind az o-Tyr gátolja a tumorsejt proliferációt rágcáslóknak különböző daganat-modelleiben [10].

Közelmúltbéli, *in vitro* tanulmányok tanúsága szerint a patológiás izoformáknak (m- és o-Tyr) szerepe lehet hormonrezisztenciák, így eritropoetin- és inzulinrezisztencia kialakulásában [11-13].

A eritropoesis-stimuláló ágensekkel (ESA) kezelt, végstádiumú veseelégtelenségben (ESRF) szenvedő betegek ESA-ra adott válaszkészsége gyakran csökkent, mely állapot fokozott szabadgyök-képzéssel jár együtt. A csökkent ESA-válasz hátterében számos klasszikus ok, így vas-, folsav-, B12-vitamin-, vagy karnitin-hiány, vérzés, gyulladás, angiotenzin konvertáló enzim (ACE)-gátló használat, urémiás toxinok, elégtelen dialízis, hiperparatiroidizmus és malignus betegségek állhatnak [14-16]. Lényeges összefüggést találtak a csökkent ESA-érzékenység és a diabétesz, illetve az inzulinrezisztencia fennállása között [16,17]. ESRF-ben a p-Tyr termelése csökken [5], és az o-Tyr helyettesítheti azt a fehérjékben.

Szeptikus betegekben emelkedett a kóros Tyr-izoformák szintje. Éhomi állapotban a vese glükózkibocsátása jelentős részét adja a teljes test glükóztermelésének [18,19]. A veséből származó glükóz glukoneogenezis során képződik, amelynek szubsztrátját aminosavak is jelenthetik. A renális glükózkibocsátást gátolja az inzulin [20,21].

2. Célkitűzések

2.1. A különböző tirozinformák ESA-válaszban betöltött szerepének vizsgálata (I.)

- Dializált betegek különböző csoportjaiban, így ESA-val kezelt és nem kezelt hemodializált betegekben, valamint CAPD-kezelt betegekben, továbbá egészségesekben kívántuk tanulmányozni a plazma p- és o-Tyr, valamint Phe szintjét.
- Dializált betegekben kívántuk vizsgálni a plazma p- és o-Tyr, valamint Phe szintjének összefüggését ezen betegek ESA-igényével.
- Dializált betegekben kívántuk meghatározni az ESA-igény statisztikai előrejelzőit.

2.2. A különböző Tyr-formák és a Phe nem-diabéteszes, szeptikus betegek szénhidrát-anyagcseréjében betöltött szerepének vizsgálata (II.)

- Nem-diabéteszes, szeptikus betegekben kívántuk vizsgálni a Phe és hidroxilált származékainak összefüggését a szénhidrát-anyagcsere paramétereivel.
- Nem-diabéteszes, szeptikus betegekben kívántuk meghatározni a napi inzulinigény és az inzulin-glükóz szorzat statisztikai előrejelzőit.
- Nem-diabéteszes, szeptikus betegekben vizsgáltuk a vércukoringadozás összefüggését a betegek klinikai kimenetelével.

3. Módszerek

3./1./1. Dializált betegek (I.)

Első, keresztmetszeti tanulmányunkba önkéntesek négy csoportját vontuk be: egészséges önkénteseket (CONTR; n=16), hemodializált betegeket, akik nem részesülnek ESA-kezelésben (nonESA-HD; n=8), hemodializált betegeket, akik részesülnek ESA-kezelésben (ESA-HD; n=40) és folyamatos ambuláns peritoneális dialízisben részesülő betegeket (CAPD; n=21). Kizártuk az akut infekcióban, malignus betegségben és aktív autoimmun betegségben szenvedő betegeket. ESA-HD betegeink intravénás darbepoietin-alpha-t (DA) kaptak hetente, vagy kéthetente. CAPD-s betegeink szubkután úton kaptak DA-t. Az ESA-igényt ESA-dózisban, ESA-dózis/testtömegben, illetve eritropoetin rezisztencia index₁-ben (ERI₁, heti ESA-dózis/testtömeg/hemoglobin) fejeztük ki. A tanulmányt a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjának Etikai Bizottsága jóváhagyta (4523). A vizsgálat előtt minden önkéntes írásos beleegyezését adta a tanulmány elvégzéséhez.

3./1./2. Nem-diabéteszes szeptikus betegek (II.)

Második tanulmányunkat 25, a PTE KK Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézetébe 2012. szeptembere és 2013. októbere között felvett betegen végeztük. A vizsgálatba az intenzív osztályos felvételkor súlyos szepszis, vagy szeptikus sokk klinikai képét mutató betegeket választottuk be. A szepszis diagnózisát az ACCP/SCCM 2001-es konszenzus guideline-ja szerint állítottuk fel [22]. Kizártunk a vizsgálatból bizonyos, a normál immunválaszt befolyásoló gyógyszeres (pl. krónikus szteroid használat, immunszuppresszív terápia) vagy egyéb kezelésben (pl. radio-, kemoterápia) részesülő betegeket, a malignus hematológiai betegségben szenvedő, továbbá

a már felvételnél oliguriás betegeket (a vizeletgyűjtés kivitelezhetetlen volta miatt). Betegeink kezelése során a mindenkori aktuális szepszis guideline ajánlásai szerint jártunk el [23,24]. Alanyainktól felvételnél (1. nap), majd az azt követő 4 napon (2-5. nap) nyertünk vérmintát. Emellett gyűjtöttük betegeink vizeletét, a napi mennyiséget feljegyeztük. Meghatároztuk a szérumban és a vizelet kreatinin, a szérumban hsCRP és PCT szinteket.

Betegeink a 6-8 mmol/l-es kívánt plazma glükózszint fenntartása érdekében, csúszóskála alapján, perfúzorral intravénás, rövidhatású inzulin adásában részesültek. A vércukorszintet a protokollnak megfelelően, 4 óránként (napi 6 alkalommal), artériás vérgázvizsgálat keretében ellenőriztük. Meghatároztuk a napi inzulin dózist (DID) és az inzulin-glükóz szorzatot (IGP). Ezen értékek összefüggését vizsgáltuk a Phe és Tyr-paraméterekkel. A vércukorvariabilitás jellemzésére kiszámoltuk az átlagos abszolút glükózváltozás (MAG) értékét.

A három Tyr izoforma tubuláris transzportjának vizsgálata érdekében meghatároztuk azok frakcionált exkrécióját (FE ; FE_{p-Tyr} , FE_{m-Tyr} , FE_{o-Tyr}).

A vizsgálati protokollt a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága hagyta jóvá (4422) és azt a 2003-as Helsinkai Deklaráció etikai elveinek megfelelően végeztük.

3./2. Rutin analitikai eljárások (I., II.)

Dializált betegeken végzett tanulmányunkban a hagyományos, rutin laboratóriumi paramétereket standard laboratóriumi módszerekkel határoztuk meg. A HD-kezelt betegek vérmintáit minden esetben az aktuális HD-kezelés előtt nyertük. Az ESA-igényt különböző ESA-indexek segítségével fejeztük ki,

úgy mint $ERI_1 = \text{ESA-dózis}/\text{testtömeg}/\text{hemoglobin}$; $ERI_2 = \text{ESA-dózis}/\text{testtömeg}/\text{hematokrit}$; $ERI_3 = \text{ESA-dózis}/\text{testtömeg}/\text{vörösvértest szám}$.

Szeptikus betegeink vizsgálata során a napi hsCRP, PCT és kreatinin mérések ezen betegek rutin monitorozásának részeként történtek.

A fenti rutin laboratóriumi vizsgálatokat a PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézetében végeztük.

3./3. A Tyr-izoformák és a Phe meghatározása plazmából, szérumból, vizeletből (I., II.)

A vérmintákat dializált betegeinktől perifériás véna punkciója útján vettük le, EDTA-s csövekbe, szeptikus betegeinktől centrál vénás katéterből bocsátottuk le, natív csövekbe. Centrifugálással plazmát, illetve szérumot nyertünk, amit későbbi vizsgálatokig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztva tároltunk. Kiindulásként $500\text{ }\mu\text{l}$ plazmához/szérumhoz $125\text{ }\mu\text{l}$ triklórecetsavat (TCA TCA; Reanal Private Ltd., Budapest, Magyarország) adtunk, majd a mintákat 30 percig jégen inkubáltuk. Ezután a csapadékot centrifugálással eltávolítottuk. A felülúszót injektálás előtt fecskendőszűrővel ($0,2\text{ }\mu\text{m}$) (Millipore, Billerica, MA, USA) szűrtük. Végül a p-, m-, o-Tyr és Phe szinteket reverz fázisú-HPLC módszerrel (Shimadzu USA Manufacturing INC, Canby, OR, USA) (C_{18} szilika oszlop, $250 \times 4\text{ mm}$), fluoreszcens detekcióval ($\lambda_{\text{EX}} = 275\text{ nm}$; $\lambda_{\text{EM}} = 305\text{ nm}$ tirozinok esetén, $\lambda_{\text{EX}} = 258\text{ nm}$; $\lambda_{\text{EM}} = 288\text{ nm}$ fenilalanin esetén) határoztuk meg, a munkacsoportunk által korábban leírtak szerint [5]. A vizeletminták esetén hasonló eljárást alkalmaztunk. Az egyes aminosavak koncentrációját külső standardok használatával határoztuk meg.

3./4. Az ESA o-Tyr szintre gyakorolt hatásának vizsgálata (I.)

Az ESA-HD csoportból öt beteget egy longitudinális vizsgálatba is bevontunk, amely két alkalomból állt. Az első alkalom egy olyan HD-kezelés volt, amelynek során a betegek nem részesültek DA-kezelésben (ESA-), míg a második alkalom során ugyanezek a betegek az aktuális HD-kezelés végeztével (a „0” időpontban) kaptak DA-t (ESA+; átlag DA dózis: 28 µg). Egy alkalmon belül összesen ötször nyertünk tőlük vérmintát (60 perccel a HD-kezelés vége előtt [-60], a HD-kezelés végén [0], majd 60, 120 és 180 perccel a HD-kezelés vége után), ennek kapcsán a plazma-o-Tyr szintjének időkinetikáját határoztuk meg a két vizsgálat során.

3./5. Statisztikai analízis (I., II.)

A centrális tendenciát és az eloszlás szélességét normális eloszlás esetén átlag \pm szórás (SD), nem normális eloszlás esetén pedig medián (interquartilis tartomány [IqR]) megadásával fejeztük ki. A normalitás vizsgálatára Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. A csoportok összehasonlítását ANOVA segítségével, Bonferroni *post hoc* teszttel (normális eloszlás esetén), vagy Kruskal-Wallis és Mann-Whitney U teszttel (nem normális eloszlás esetén) végeztük. A kategorikus változók összehasonlítására χ^2 tesztet alkalmaztunk. Korrelációs vizsgálatként Spearman-korrelációt használtunk, mivel a vizsgált változók döntő részt nem normális eloszlást mutattak. Az ESA-, illetve az inzulinigény előrejelzőinek meghatározására többváltozós lineáris regressziós vizsgálatokat végeztünk, stepwise módszerrel. Az eredményeket 0,05 alatti p érték esetén értékeltük statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai analízisekhez a Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 20.0-ás verzióját (IBM Corporation, USA) használtuk.

4. Eredmények

4./1. A különböző tirozinformák ESA-válaszban betöltött szerepe (I.)

4./1./1. Plazma p- és o-Tyr-szint, o-Tyr/p-Tyr hányados dializált betegekben és egészségesekben

A kontrollszemélyekkel összehasonlítva az összes dializált betegcsoportban alacsonyabb p-Tyr szintet találtunk. Az egyes dializált csoportok között nem találtunk különbséget. Az o-Tyr-szintje és az orto-Tyr/para-Tyr hányados ellenben magasabbnak adódott betegekben. A különböző dializált betegcsoportokat összehasonlítva az o-Tyr szintje és az o-Tyr/p-Tyr hányados magasabb volt az ESA-HD, mint a nonESA-HD és a CAPD csoportban. A nonESA-HD és a CAPD csoport között nem mutatkozott szignifikáns különbség.

4./1./2. Az ESA-igény és a plazma o-Tyr-szint, illetve o-Tyr/p-Tyr hányados összefüggése

A heti ESA-dózis/testtömeg pozitívan korrelált a plazma o-Tyr-szintjével. Ennél erősebben korrelált a heti ESA-dózis/testtömeg a plazma o-Tyr/p-Tyr hányadossal. Ezen túlmenően az ERI_1 erős korrelációt mutatott mind a plazma o-Tyr-szintjével, mind a plazma o-Tyr/p-Tyr hányadosával.

Ezután az ESA-igény statisztikai előrejelzőit kerestük többváltozós lineáris regressziós analízissel, különböző modellekben. Az ESA-igényt többféle módon fejeztük ki, úgy mint ESA-dózis, ESA-dózis/testtömeg, továbbá különböző ESA-indexekkel, mint ESA-dózis/testtömeg/hemoglobin, ESA-dózis/testtömeg/hematokrit vagy ESA-dózis/testtömeg/vörösvértest szám (ERI_1 ; ERI_2 ; ERI_3). Meghatároztuk a plazma para-Tyr/Phe, orto-Tyr/Phe és orto-Tyr/para-Tyr hányadosát. Ezt a 3 eltérő aminosav paramétert külön-külön

szerepeltettük modellekben, az ESA-igény irodalomból ismert prediktoraival együtt. Az első modellben a szérumban a kalcium (se-Ca^{2+}), a szérumban anorganikus foszfát (se-PO_4^{3-}), a parathormon (PTH) szintje, valamint a maradék vizelet mennyisége (restdiuresis) és a szérumban a ferritinszint, míg a másodikban az életkor, a dialízis időtartama, a hsCRP, a maradék vizeletmennyiség, végül a szérumban a ferritin szerepelt az aktuális aminosav paraméter mellett. Sem a p-Tyr/Phe, sem az o-Tyr/Phe hányados nem bizonyult független előrejelzőnek ebben a két modellben. Csaknem valamennyi esetben a maradék vizeletmennyiség volt az ESA-igény független prediktora. Ezzel szemben, amikor az o-Tyr/p-Tyr hányadost emeltük be a modellbe, az mind az ESA-dózis, mind az ESA-indexek független előrejelzőjének bizonyult (4. táblázat). Végül létrehoztunk egy harmadik modellt is, ahol a dialízis hatékonyságát jelző kt/v hányadost szerepeltettük az életkor, a PTH, a hsCRP, a szérumban a ferritin és az o-Tyr/p-Tyr hányados mellett. Ebben az esetben is az o-Tyr/p-Tyr hányados bizonyult az ESA-dózis/testtömeg független prediktorának.

4./1./3. Az ESA plazma o-Tyr-szintre gyakorolt hatása

Az előző részben leírt összefüggések egy potenciális magyarázata lehetne az ESA-adás hatására esetlegesen létrejövő hidroxil szabadgyök-képződés. Ebben az esetben a magasabb ESA-dózis nem következménye, sokkal inkább oka lenne az oxidatív stressz kapcsán fellépő aminosav módosulásnak. E feltételezés kizárására egy longitudinális tanulmányt végeztünk, amelyben a plazma-o-Tyr-szintek időbeli változását vizsgáltuk két HD-kezelés alkalmával: először ESA-adása nélkül (ESA-), majd ESA-adása mellett (ESA+). Nem találtunk szignifikáns különbséget a két görbe között.

4./2. A különböző tirozinformák és a Phe nem-diabéteszes, szeptikus betegek szénhidrát-anyagcseréjében betöltött szerepe (II.)

4./2./1. A vizelet m-Tyr szint és az inzulinigény összefüggése

Azon betegek vizelet m-Tyr/p-Tyr hányadosa, akik DID-je medián felettinek adódott, szignifikánsan magasabb volt, mint a medián alatti DID-del rendelkezőké. Hasonlóan, a medián feletti IGP-vel rendelkező betegek vizelet m-Tyr/p-Tyr hányadosa szignifikánsan magasabb volt a medián alatti IGP-vel rendelkezőkénél.

4./2./2. Tyr-paraméterek összefüggése az inzulinigénnyel

A vizelet m-Tyr koncentrációja pozitívan korrelált a DID-del és az IGP-vel. Hasonlóan, a vizelet m-Tyr/p-Tyr hányadosa pozitívan korrelált a DID-del és az IGP-vel.

Az aminosav paramétereket többváltozós lineáris regressziós modellekben külön-külön is vizsgáltuk, mint az inzulinigény (DID-ben és IGP-ben kifejezve) előrejelzőit. A modell összetevője volt még a testsúly, a hsCRP, a PCT, a napi hidrokortizon dózis, valamint a napi dobutamindózis. A szérumban a Phe negatív prediktora volt mind a DID-nek, mind az IGP-nek, míg a szérumban a p-Tyr/Phe hányados erősebb, pozitív előrejelzője lett ezen szénhidrátháztartást jellemző paramétereknek. A szérumban az o-Tyr/Phe hányados pozitív prediktora volt az IGP-nek, ugyanakkor nem bírt előrejelző szereppel DID esetén. A vizeletben az m-Tyr koncentrációja, továbbá az m-Tyr/p-Tyr, az o-Tyr/p-Tyr és az (m-Tyr+o-Tyr)/p-Tyr hányadosa pozitív prediktora volt mind a DID-nek, mind az IGP-nek. Fenti aminosav paramétereket egy másik modellben is teszteltük, ahol a szérumban a kreatininszintet szerepeltettük a testsúly helyett. Ebben az esetben is hasonló eredményeket kaptunk, mint a testsúly használatakor.

4./2./3. Az egyes Tyr-izofomák frakcionált exkréciója

Mind az FE_{m-Tyr} , mind pedig az FE_{o-Tyr} szignifikánsan magasabb volt a FE_{p-Tyr} -nál. Előbbi kettő között is szignifikáns különbséget találtunk. Az FE_{o-Tyr} több mint háromszor magasabbnak adódott, mint az FE_{m-Tyr} . Egyik vizsgált aminosav FE-ja sem mutatott összefüggést egyik szénhidrátháztartást jellemző paraméterrel sem.

4./2./4. A vércukoringadozás összefüggése a túléléssel

A vércukoringadozás átlagos abszolút glükózváltozásban (MAG) megadott értéke magasabb volt az elhalálozott, mint a túlélő betegek körében.

5. Megbeszélés

5./1. A különböző tirozinformák ESA-válaszban betöltött szerepe (I.)

Eredményeink arra utalnak, hogy az o-Tyr/p-Tyr hányados emelkedése felelős lehet a dializáltakban tapasztalt csökkent ESA-érzékenységet. Sem a plazma o-Tyr/Phe, sem a p-Tyr/Phe hányados nem volt az ESA-igény független előrejelzője, ami arra utal, hogy az o-Tyr szint emelkedése, vagy a p-Tyr szint emelkedése önmagában nem elegendő az emelkedő ESA-igény előrejelzésére, ugyanakkor ezen aminosav izomerek kombinált és ellentétes irányú változása szoros összefüggésben van az ESA-ra adott csökkent válaszkésztséggel, vagyis az ESA-val szembeni rezisztenciával. Ez annak következménye lehet, hogy olyan körülmények között, amikor a patológiás o-Tyr koncentrációja emelkedik, miközben a fiziológiás p-Tyr szintje egyidejűleg csökken (pl. ESRF-ben), a p-Tyr helyett a jelátviteli fehérjékbe transzlációs úton beépülő o-Tyr megváltoztathatja az EPO-R intracelluláris jelátvitelét, csökkent ESA-választ okozva ezzel.

A Phe oxidatív módosulatának (o-Tyr) vizsgálata kapcsán született eredményeink egybevágóak korábbi tanulmányok megfigyeléseivel, amelyekben magasabb tiobarbitursav reaktív szubsztanciaszint, csökkent szérum hidroxil szabad gyökfogó aktivitás és emelkedett 8-hidroxi-2'-deoxiguanozin-szint társult magasabb ESA dózisokhoz [25,26].

Egy korábbi, a CHOIR vizsgálatra épülő *post hoc* tanulmányban magasabb epoetin-alfa dózis emelkedett kardiovaszkuláris eseményrátaival járt együtt, ami azt sugallja, hogy az epoetin-alfának valamiféle kardiovaszkuláris rizikónövelő hatása lehet [27]. Eredményeink alapján egy másik mechanizmus lehetőségét vetjük fel. Ezen elképzelés szerint a hidroxil szabadgyök-termékek

emelkedett szintje okozza a csökkent ESA-választ, ami eredményezi a magasabb ESA-igényt, és a nagyobb szabadgyök-termelés állhat a fokozott kardiovaszkuláris rizikó mögött is. Ezt a feltételezést alátámasztják azon bizonyítékok, melyek szerint a szabadgyök-termékek interferálnak a MAP/ERK jelátviteli úttal, továbbá, hogy az ERK1/2 közvetlen gátlása fokozott szívizomsejt pusztuláshoz és ezzel szívelégtelenséghez vezet [10,28]. Vagyis nem a magas ESA-szint önmagában, hanem az ESA-rezisztencia hátterében álló oxidatív stressz vezethet kardiovaszkuláris eseményekhez.

5./2. A különböző tirozinformák és a Phe nem-diabéteszes, szeptikus betegek szénhidrát-anyagcseréjében betöltött szerepe (II.)

Második vizsgálatunkban bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a hidroxil szabad gyök hatására képződő Tyr izoformák, az enzimatikusan termelődött p-Tyr-nal együtt összefüggenek a nem diabéteszes szeptikus betegek megváltozott szénhidrát-háztartásával, és ezzel befolyásolhatják ezen betegek inzulininterápiáját.

A vizsgált aminosavak szérum és vizeletbéli koncentrációi, illetve azok hányadosai erős statisztikai prediktorai voltak mind a DID-nek, mind az IGP-nek olyan modellben, ahol az emelkedett inzulinigény ismert előrejelzői (testtömeg, hsCRP, PCT, napi hidrokortizon dózis, napi dobutamindózis) szerepeltek. Egy hasonló modellben, ahol a szérumkreatinin szintjét foglaltuk be a testtömeg helyett, hasonló eredményeket kaptunk, mely arra utal, hogy ezek az összefüggések függetlenek a vesefunkciótól.

A szérum-Phe-szint DID-del, valamint IGP-vel való összefüggésére potenciális magyarázat lehetne egy esetlegesen a malnutríció miatt fennálló generalizált hipoaminoacidémia. Megvizsgáltuk ezt a lehetőséget, amennyiben

korreláltattuk a szérumban az albuminszintet a DID-del és az IGP-vel. Sem a DID, sem az IGP nem mutatott korrelációt a szérumban az albuminszinttel, ellentétben a Phe-szinttel.

Az eredményeink, amelyek szerint i) a szérumban a Phe szint a DID és az IGP negatív, míg ii) a szérumban a p-Tyr/Phe hányados azok erős pozitív prediktorának bizonyult, ugyanakkor emellett iii) a szérumban a p-Tyr önmagában nem volt előrejelző, továbbá iv) a szérumban a p-Tyr szint septicus betegekben enyhén, de nem szignifikáns mértékben alacsonyabb volt az egészségesekben leírtakénál [5] utalhat arra, hogy septicus betegekben, normál Phe szint mellett, az abból képződő p-Tyr nem csak az export p-Tyr képzését szolgálja, hanem egy része glukoneogenezis céljából felhasználódik helyben, a vesében. Ezt az a tény is megerősíti, miszerint a vizelet p-Tyr/kreatinin hányadosa és a naponta ürített p-Tyr mennyisége nem különbözött a glukoneogenezist fokozó hidrokortizonnal kezelt és nem kezelt betegek között.

Az oxidatív stresszen túl természetesen számos egyéb tényező (úgy mint a metabolikus állapot, a gyulladás aktuális mértéke, antropometriai paraméterek, gyógyszerelés) befolyásolja a glikémiás kontrollt. Ezért használtunk a későbbiekben lineáris regressziót, ahol azonban a testtömegre, gyulladásos markerekre és a glukoneogenezist fokozó gyógyszerek dózisára való korrekció után sem veszett el a vizelet m-Tyr és a glikémiás állapot markerei közti összefüggés. Sőt, ebben az analízisben statisztikailag erősen szignifikáns kapcsolatot találtunk. Ez arra utal, hogy ez az oxidatív stressz hatására keletkező aminosav, a korábbról ismert paraméterek mellett – azoktól függetlenül – erős szereppel bír a szénhidrát-anyagcsere befolyásolásában.

A vércukoringadozás jellemzésére használt MAG érték és a mortalitás kapcsolatának vizsgálatokor kapott eredményünk egybeeseng a korábbi megfigyelésekkel [29-31].

6. A dolgozat tézisei

1. Dializált betegek plazma-p-Tyr-szintje alacsonyabb, mint az egészségeseké.
(I.)
2. ESA-val kezelt hemodializált betegek plazma-o-Tyr-szintje és -o-Tyr/p-Tyr hányadosa magasabb, mint az egészségeseké, valamint az ESA-val nem kezelt hemodializált és a CAPD-kezelt betegeké. (I.)
3. Dializált betegekben a plazma o-Tyr/p-Tyr hányadosa fordított összefüggésben áll az ESA-ra adott válaszkésztséggel. (I.)
4. Dializált betegekben a plazma o-Tyr/p-Tyr hányadosa az ESA-ra adott válaszkésztség független prediktora. (I.)
5. Nem-diabéteszes szeptikus betegekben a szérum p-Tyr/Phe hányadosa és a vizelet m-Tyr-szintje, valamint m-Tyr/p-Tyr hányadosa pozitív összefüggésben áll a betegek inzulinigényével. (II.)
6. Nem-diabéteszes szeptikus betegekben a szérum p-Tyr/Phe hányadosa a vesében zajló glukoneogenezis mértékének jeleként erősen előrejelzi ezen betegek inzulinigényét. (II.)
7. Nem-diabéteszes szeptikus betegekben a vizelet m-Tyr szint, illetve a m-Tyr/p-Tyr hányados emelkedése gátolhatja az inzulin hatását, ezzel erősen emelve az ilyen betegek inzulinigényét. (II.)

7. Irodalomjegyzék

- [1] Stadtman ER, Berlett BS. Fenton chemistry—Amino acid oxidation. *J. Biol. Chem.* 266:17201–17211; 1991.
- [2] Galano A, Cruz-Torres A. OH radical reactions with phenylalanine in free and peptide forms. *Org. Biomol. Chem.* 6:732-738; 2008.
- [3] Ayling JE, Pirson WD, al-Janabi JM, Helfand GD. Kidney phenylalanine hydroxylase from man and rat. Comparison with the liver enzyme. *Biochemistry* 13:78-85; 1974.
- [4] Molnár GA, Nemes V, Bíró Z, Ludány A, Wagner Z, Wittmann I. Accumulation of the hydroxyl free radical markers meta-, orto-tirozin and DOPA in cataractous lenses is accompanied by a lower protein and phenylalanine content of the water-soluble phase. *Free. Radic. Res.* 39:1359-1366; 2005.
- [5] 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 orto-tirozin excretion in diabetes mellitus and renal failure: evidence for hydroxyl radical production. *Kidney Int.* 68:2281-2287; 2005.
- [6] Toth P, Koller A, Pusch G, Bosnyak E, Szapary L, Komoly S, Marko L, Nagy J, Wittmann I. Microalbuminuria, indicated by total versus immunoreactive vizelet albumin in acute ischemic stroke patients. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 20:510-516; 2011.
- [7] Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei A, Halmai R, Mészáros LG, Sümegi B, Wittmann I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br. J. Nutr.* 106:383-389; 2011.
- [8] Vivekanadan-Giri A, Wang JH, Byun J, Pennathur S. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products identifies oxidative mechanisms of diabetic end-organ damage. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 9:275-287; 2008.
- [9] Gurer-Orhan H, Ercal N, Mare S, Pennathur S, Orhan H, Heinecke JW. Misincorporation of free m-tirozin into cellular proteins: a potential cytotoxic mechanism for oxidized amino acids. *Biochem. J.* 395:277-284; 2006.

- [10] Ruggiero RA, Bruzzo J, Chiarella P, di Gianni P, Isturiz MA, Linskens S, Speziale N, Meiss RP, Bustuoabad OD, Pasqualini CD. Tirozin isomers mediate the classical phenomenon of concomitant tumor resistance. *Cancer Res.* 71:7113-7124; 2011.
- [11] 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.* 38:217-225; 2014.
- [12] 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.* 48:749-757; 2014.
- [13] Szijártó IA, Molnár GA, Mikolás E, Fisi V, Cseh J, Laczy B, Kovács T, Böddi K, Takátsy A, Gollasch M, Koller A, Wittmann I. Elevated vascular level of ortho-tyrosine contributes to the impairment of insulin-induced arterial relaxation. *Horm. Metab. Res.* 46:749-752; 2014.
- [14] Locatelli F, Covic A, Macdougall IC, Wiecek A. ORAMA: a study to investigate EBPG impact on renal anaemia - design and baseline data. *J. Nephrol.* 21:592-603; 2008.
- [15] Johnson DW, Pollock CA, Macdougall IC. Erythropoiesis-stimulating agent hyporesponsiveness. *Nephrology (Carlton)* 12:321-330; 2007.
- [16] Rossert J, Gassmann-Mayer C, Frei D, McClellan W. Prevalence and predictors of epoetin hyporesponsiveness in chronic kidney disease patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22:794-800; 2007.
- [17] Abe M, Okada K, Soma M, Matsumoto K. Relationship between insulin resistance and erythropoietin responsiveness in hemodialysis patients. *Clin. Nephrol.* 75:49-58; 2011.
- [18] Stumvoll, M., U. Chintalapudi, G. Perriello, S. Welle, O. Gutierrez, and J. Gerich. Uptake and release of glucose by the human kidney: postabsorptive rates and responses to epinephrine. *J. Clin. Invest.* 96:2528–2533; 1995.
- [19] Meyer, C., V. Nadkarni, M. Stumvoll, and J. Gerich. Human kidney free fatty acid and glucose uptake: evidence for a renal glucose-fatty acid cycle. *Am. J. Physiol.* 273:650–654; 1997.

- [20] Meyer C, Dostou J, Nadkarni V, Gerich J. Effects of physiological hyperinsulinemia on systemic, renal and hepatic substrate metabolism. *Am. J. Physiol.* 275:F915–921; 1998.
- [21] Cersosimo E, Garlick P, Ferretti J. Insulin regulation of renal glucose metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* 276:E78-84; 1999.
- [22] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* 31:1250-1256; 2003.
- [23] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL; International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee; American Association of Critical-Care Nurses; American College of Chest Physicians; American College of Emergency Physicians; Canadian Critical Care Society; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; European Society of Intensive Care Medicine; European Respiratory Society; International Sepsis Forum; Japanese Association for Acute Medicine; Japanese Society of Intensive Care Medicine; Society of Critical Care Medicine; Society of Hospital Medicine; Surgical Infection Society; World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med.* 36:296-327; 2008.
- [24] Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock 2012. *Intensive Care Med.* 39:165-228; 2013.
- [25] Hirayama A, Nagase S, Gotoh M, Ueda A, Ishizu T, Yoh K, Aoyagi K, Terao J, Koyama A. Reduced serum hydroxyl radical scavenging activity in

- erythropoietin therapy resistant renal anemia. *Free Radic. Res.* 36:1155-1161; 2002.
- [26] Kato A, Odamaki M, Hishida A. Blood 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is associated with erythropoietin resistance in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18:931–936; 2003.
- [27] McCullough PA, Barnhart HX, Inrig JK, Reddan D, Sapp S, Patel UD, Singh AK, Szczech LA, Califf RM. Cardiovascular toxicity of epoetin-alfa in patients with chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* 37:549-558; 2013.
- [28] Ruppert C, Deiss K, Herrmann S, Vidal M, Oezkur M, Gorski A, Weidemann F, Lohse MJ, Lorenz K. Interference with ERK(Thr188) phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:7440-7445; 2013.
- [29] Bagshaw SM, Bellomo R, Jacka MJ, Egi M, Hart GK, George C, ANZICS CORE Management Committee. The impact of early hypoglycemia and blood glucose variability on outcome in critical illness. *Crit. Care* 13:R91; 2009.
- [30] Egi M, Bellomo R, Stachowski E, French CJ, Hart G. Variability of blood glucose concentration and short-term mortality in critically ill patients. *Anesthesiology* 105:244-252; 2006.
- [31] Hermanides J, Vriesendorp TM, Bosman RJ, Zandstra DF, Hoekstra JBL, DeVries JH. Glucose variability is associated with ICU mortality. *Crit. Care Med.* 38:838-842; 2010.

8. A disszertációhoz csatlakozó közlemények jegyzéke (ld. számozás a fejezetcímeknél)

I. **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 Sep;19(5):190-198. IF: 1,52

II. **Kun S**, Molnár GA, Sélley E, Szélig L, Bogár L, Csontos C, Miseta A, Wittmann I. Insulin Therapy of Nondiabetic Septic Patients Is Predicted by para-Tyrosine/Phenylalanine Ratio and by Hydroxyl Radical-Derived Products of Phenylalanine. *Oxid Med Cell Longev* (2015): 2015:839748. doi: 10.1155/2015/839748. IF: 3,51

8.1. A disszertációhoz nem 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 Apr 2;13(1):69. IF: 3,67

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 Gergő Attila, Laczy Boglárka, Sélley Eszter, **Kun Szilárd**, Wittmann István. Az antidiabeticumok és a cardiovascularis kockázat. *Diabetologia Hungarica.* 2014. március; 22(1):25-32. IF: -

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: -

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.* 2015 Apr 15;6(3):500-507. Review. IF: -

Sélley E, **Kun S**, Kürthy M, Kovács T, Wittmann I, Molnár GA. Para-Tyrosine Supplementation Improves Insulin- and Liraglutide- Induced Vasorelaxation in Cholesterol-Fed Rats. *Protein Pept Lett.* 2015;22(8):736-742. IF: 1,06

Szélig L, **Kun S**, Woth G, Molnár GA, Zrínyi Z, Kátai E, Lantos J, Wittmann I, Bogár L, Miseta A, Csontos C. Time courses of changes of para-, meta-, and

ortho-tyrosine in septic patients: A pilot study. Redox Rep. 2016 Jul;21(4):180-189. IF: 2,61

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;23(7):667-685. IF: 3,85

Sélley E, **Kun S**, Szijártó IA, Kertész M, Wittmann I, Molnár GA. Vasodilator Effect of Glucagon: Receptorial Crosstalk Among Glucagon, GLP-1, and Receptor for Glucagon and GLP-1. Horm Metab Res. 2016 Jul;48(7):476-483. IF: 2,12

Brasnyó P, Kovács T, Molnár GA, Sélley E, **Kun Sz**, Vas T, Laczy B, Fekete K, Kovács T, Mészáros GL, Winkler G, Sümegi B, 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 IF: 1,2

Összesített impakt faktor: 21,27
Független hivatkozások száma: 14

8.2. Könyvfejezet

Kun Szilárd, Wittmann István. Inzulinrezisztencia akut betegségekből, In: Winkler Gábor, Wittmann István. Az inzulinrezisztencia és klinikai vonatkozásai. Budapest, Springmed Kiadó, 2017, 206-210.

8.3. 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.*

Kun Szilárd, Szélig L., Woth G., Zrínyi Z., Molnár G.A., Lantos J., Wittmann I., Bogár L., Miseta A., Csontos Cs.: Tirozin-izomerek eltérő renális transzportja szeptikus betegekben. *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. Para-tirozin szupplementáció javítja az inzulin- és a liraglutid kiváltotta vasorelaxációt koleszterinnel etetett patkányokban. *MDT XXII. Kongresszusa Szeged, 2014.04.26.*

Szélig Lívia, Woth G., **Kun Sz.**, Zrínyi Z., Molnár G.A., Lantos J., Wittmann I., Bogár L., Miseta A., Csontos Cs.: Az oxidatív stressz hatása a meta-, ortho-, és para-tyrosin szintézisre septicus betegekben. Előtanulmány. *MAITT 42. Kongresszusa Siófok, 2014.05.22. (absztrakt: Aneszteziológia és Intenzív Terápia 2014 (44):Suppl. 1, 12.o.)*

Kovács Patrícia, Wittmann I., **Kun Sz.**, Szélig L., Molnár G.A., Bogár L., Miseta A., Zrínyi Z., Csontos Cs.: Vizelet és szérum para-, meta- és orto-tirozin szintjének vizsgálata égett és septicus betegekben. *MAITT 42. Kongresszusa Siófok, 2014.05.22. (absztrakt: Aneszteziológia és Intenzív Terápia 2014 (44):Suppl. 1, 13.o.)*

Patrícia Kovács, Lajos Bogár, István Wittmann, Attila Miseta, Lívia Szélig, **Szilárd Kun**, Zita Zrínyi, Gergő.A. Molnár, Csaba Csontos: Changes of para-, meta-, and ortho-tyrosine levels in serum and urine of septic and burned patients. *Ninth YES (Young European Scientist) Meeting – Internal Medicine Parallel Oral Session Porto, 19th-21st September 2014*

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.

Sélley Eszter dr., **Kun Szilárd dr.**, Szijártó István András dr., Laczy Boglárka dr., Kovács Tibor dr., Fülöp Ferenc dr., Wittmann István dr., Molnár Gergő Attila dr.: A lixisenatid vasodilatációt okoz cGMP közvetítésével ismeretlen receptoron keresztül. *MDT XXIII. Kongresszusa Budapest, 2015.05.14.*

Kun Szilárd dr., Molnár Gergő Attila dr., Sélley Eszter dr., Szélig Lívia dr., Bogár Lajos dr., Csontos Csaba dr., Miseta Attila dr., Wittmann István dr.: Nem diabeteses, szeptikus betegek inzulininterápiájának független prediktora a para-tirozin/fenilalanin hányados és a fenilalanin oxidált származékai. *MDT XXIII. Kongresszusa Budapest, 2015.05.15.*

Szélig Lívia, Kovács Patrícia, Woth Gábor, **Kun Szilárd**, Molnár A. Gergő, Wittmann István, Bogár Lajos, Miseta Attila, Csontos Csaba.: Para-, meta- és orto-tirozin változások vizsgálata égett betegben. *MAITT 43. Kongresszusa Siófok, 2015.05.28.*

Kun Szilárd, Molnár Gergő A., Sélley Eszter, Szélig Lívia, Bogár Lajos, Csontos Csaba, Miseta Attila, Wittmann István.: Nem-diabéteszes szeptikus betegek inzulininterápiájának független prediktora a para-tirozin/fenilalanin hányados és a fenilalanin oxidált származékai. *MBT DSZ LVIII. Vándorgyűlése Kaposvár, 2015.06.18.*

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.: Resveratrol hatásának vizsgálata IgA nephropathiában. (pilot vizsgálat). *MANET XXXII. Nagygyűlése Siófok, 2015.11.12.*

Kun Szilárd, Szélig L., Woth G., Molnár G.A., Zrínyi Z., Lantos J., Wittmann I., Bogár L., Miseta A., Csontos Cs.: Tirozin-izomerek eltérő renális transzportja szeptikus betegeknél. *MANET XXXII. Nagygyűlése Siófok, 2015.11.13.*

Molnár Gergő Attila, **Kun Sz.**, Szélig L., Woth G., Bogár L., Miseta A., Csontos Cs., Wittmann I.: Hiperfiltráció előfordulása intenzív osztályon kezelt égett, szeptikus és politraumatizált, nem-oligúriás betegek körében. *MANET XXXII. Nagygyűlése Siófok, 2015.11.13.*

Mohás Márton dr., Cseh Judit dr., **Kun Szilárd dr.**, Molnár Gergő Attila dr., Wittmann István dr.: A máj elzsírosodását és kötőszövetes átalakulását jelző képletek összefüggése a rutin klinikai laborparaméterekkel 2-es típusú diabetes mellitusban. *MDT XXIV. Kongresszusa Debrecen, 2016.04.28.*

Sélley Eszter dr., **Kun Szilárd dr.**, Szijártó István András dr., Kertész Melinda, Wittmann István dr., Molnár Gergő Attila dr.: A glukagon vazodilatációs hatása. Receptorális szintű kölcsönhatás a glukagon és a GLP-1 között. *MDT XXIV. Kongresszusa Debrecen, 2016.04.28.*

Molnár Gergő Attila dr., Kertész Melinda, **Kun Szilárd dr.**, Csiky Botond dr., Wittmann István prof. dr.: Bőr és szemlencse fluoreszcencia vizsgálata diabéteszes és/vagy krónikus vesebeteg páciensekben. *MDT XXV. Kongresszusa Pécs, 2017.04.21.*

Wittmann István prof. dr., Vándorfi Győző dr., **Kun Szilárd dr.**, Molnár Gergő Attila dr., Verzár Zsófia dr., Jermendy György prof. dr.: A cukorbeteg kardiovaszkuláris kockázatának becslése a szemlencse autofluoreszcenciájának vizsgálatával. *MDT XXV. Kongresszusa Pécs, 2017.04.23.*

8.4. Poszterek

Kovács P. IV, **Kun Sz.**, Szélig L., Bogár L., Miseta A., Wittmann I., Csontos Cs.: Vizelet és szérum para-, meta- és orto-tirozinszintjének vizsgálata égett és szeptikus betegekben. Pilot study. *MAITT 41. kongresszusa Siófok, 2013.05.23-25. (absztrakt: Aneszteziológia és Intenzív Terápia 2013 (43):Suppl. 1, 26.o.)*

Kun Szilárd, Molnár G.A., Sélley E., Fisi V., Szélig L., Bogár L., Csontos Cs., Miseta A., Wittmann I.: Nem-diabéteszes szeptikus betegek inzulininterápiájának független prediktora a para-tirozin/fenilalanin hányados és a fenilalanin oxidált származékai. *MANET XXXI. Nagygyűlése Eger, 2014.11.07.*

Mohás Márton, Cseh J., **Kun Sz.**, Molnár G. A., Wittmann I. A máj elzsírosodását és a májfibrózist jelző képletek összefüggése a rutin klinikai laborparaméterekkel krónikus veseelégtelenségben. *MANET XXXII. Nagygyűlése Siófok, 2016.10.21.*

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Wittmann Istvánnak és Dr. Molnár Gergő Attilának a kutatómunka során a legalapvetőbb laboratóriumi fogásoktól a legmagasabbrendű tudományos együttgondolkodásig terjedő folyamatos, áldozatos vezetésért, útmutatásért, segítségért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Miseta Attilának, Prof. Dr. Bogár Lajosnak, Dr. Csontos Csabának, Dr. Szélig Líviának és Dr. Kovács Patrícának a tanulmányokban való eredményes együttműködésért és sok segítségért.

Köszönöm közvetlen Kolléganőmnek, Dr. Sélley Eszternek, a számtalan közös munkán, kezdetektől fogva való jó hangulatú, baráti és eredményes együttműködést.

Szeretném továbbá kifejezni köszönetemet Szalma Krisztinának és Dr. Sámikné Varga Ilonának a kiváló asszisztenciáért és a sok segítségért, mivel például a HPLC kezelése során tanúsított precíz, szorgos munkájuk nélkül eredményeim nem születhettek volna meg.

Köszönöm biotechnológus Kolléganőmnek, Kertész Melindának, hogy nagyszerű, baráti munkatársra lelhattünk benne.

Külön köszönettel tartozom a II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum valamennyi orvosának, nővérének, asszisztensének, titkárnőjének, adminisztrátorának, informatikusának, akik munkámat - sokszor nélkülözhetetlen szerepet játszva - segítették.

Köszönöm barátaimnak az elmúlt években is töretlen kapcsolattartást, a lelki és szellemi téren is megnyilvánuló támogatást.

Végezetül köszönöm Édesanyámnak a doktori éveim alatt is (és főleg akkor) tanúsított hatalmas türelmet, a meghozott rengeteg áldozatot, és a folyamatosan biztosított lelki támogatást, amiknek köszönhetően munkámat a hétköznapi gondok terhe nélkül, maximális kényelemben és nyugalomban végezhettem.

Role of tyrosine isoforms in erythropoietin and insulin resistance

Ph.D. thesis summary

Szilárd Kun M.D.



University of Pécs, Medical School
2nd Department of Medicine and Nephrological Center
Pécs, Hungary

Head of the Doctoral (Ph.D.) School: Prof. Gábor L. Kovács M.D., Ph.D., D.Sc.

Head of the Doctoral Program: Prof. István Wittmann M.D., Ph.D., D.Sc.

Supervisors: Prof. István Wittmann M.D., Ph.D., D.Sc., Gergő Attila Molnár
M.D., Ph.D.

Pécs, 2017

1. Introduction

Hydroxyl radical converts Phe to para-, meta- and ortho-Tyr (p-Tyr, m-Tyr, o-Tyr) [1,2]. However, p-Tyr is mainly produced enzymatically in the kidney and to a smaller proportion, in the liver by phenylalanine-hydroxylase [3]. The amount of enzymatically produced p-Tyr is significantly higher than that of hydroxyl radical-derived. p-Tyr could serve as substrate for gluconeogenesis. m- and o-Tyr are produced exclusively by hydroxyl radicals in human. Detection of hydroxyl radical is technically difficult because of its low concentration and extremely short half-life. However, hydroxyl radical-derived stable amino acid species can be relatively simply detected. As a consequence, m- and o-Tyr are reliable markers of hydroxyl radical.

Former *in vivo*, animal and human studies observed elevated levels of the hydroxyl radical products of Phe in different pathological conditions. Higher levels of *m*-Tyr and *o*-Tyr were found in cataractous lenses [4]. Increased urinary excretion of *o*-Tyr was observed in diabetic and chronic renal disease patients [5]. Urinary albumin/creatinine ratio showed a good correlation with urinary *o*-Tyr/creatinine ratio in patients suffering from ischemic stroke [6]. Administration of natural antioxidant resveratrol significantly decreased *o*-Tyr excretion and improved insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus [7]. Level of *o*-Tyr was found to be elevated in the aortic proteins of diabetic monkeys [8]. According to an observation, the cytotoxicity of *m*-Tyr may be mediated by the concentration-dependent integration of this abnormal amino acid into cellular proteins [9]. Furthermore, both *m*- and *o*-Tyr inhibited tumor cell proliferation in different murine models of cancer [10].

Pathological Tyr isoforms may have a role in development of hormone resistances, as erythropoietin and insulin resistance. This has recently been proved in *in vitro* studies [11-13].

Patients with end-stage renal failure (ESRF) treated with erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) are often ESA-hyporesponsive, associated with free radical production. Many classical causing factors are suggested in the background of ESA-hyporesponsiveness, as iron, folate, cobalamin or carnitine deficiency, bleeding, inflammation, angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitor administration, uremic toxins, insufficient dialysis, hyperparathyroidism, and malignancy [14-16]. A significant association was found between lowered ESA-response and the presence of diabetes and insulin resistance [16,17]. Production of p-Tyr is decreased in ESRF [5] and it can be replaced by o-Tyr in proteins.

Levels of pathological Tyr isoforms are elevated in septic patients. Renal glucose output contributes significantly to whole body glucose production during fasting [18,19]. Glucose produced in kidney is derived from gluconeogenesis, and amino acids may be substrates for this process. Renal glucose output is inhibited by insulin [20,21].

2. Aims

2.1 Study of the effect of different tyrosine isoforms on ESA-response (I.)

- We aimed to determine the plasma levels of p-, o-Tyr and Phe in healthy subjects and in different groups of dialyzed patients (patients on hemodialysis *without* ESA-treatment, hemodialyzed patients *with* ESA-treatment and patients on continuous peritoneal dialysis).
- We wanted to study the association of plasma levels of p-, o-Tyr and Phe with ESA-demand of dialyzed patients.
- We also aimed to determine the statistical predictors of ESA-demand of dialyzed patients.

2.2 Study of the role of different tyrosine isoforms and Phe in carbohydrate metabolism of non-diabetic septic patients (II.)

- We aimed to study the association of Phe and its hydroxyl radical-derived products with parameters of carbohydrate metabolism in non-diabetic septic patients.
- We wanted to determine the statistical predictors of the daily insulin dose and insulin-glucose product in non-diabetic septic patients.
- We aimed to study the association of blood glucose variability with clinical outcome of non-diabetic septic patients.

3. Methods

3.1.1. Dialyzed patients (I.)

Four groups of volunteers were involved in our first, cross sectional study between July and December 2012: healthy volunteers (CONTR; n = 16), patients on hemodialysis without ESA-treatment (non-ESA-HD; n = 8), hemodialyzed patients with ESA-treatment (ESA-HD; n = 40), and patients on continuous peritoneal dialysis (CAPD; n = 21). Patients with acute infections, malignancy, and active autoimmune disease were excluded from the study. ESA-HD patients were administered intravenous darbepoietin-alpha (DA) weekly or twice a month. Patients on CAPD were receiving subcutaneous DA. ESA-demand was expressed by ESA-dose, ESA-dose/body weight, and erythropoietin resistance index¹ (ERI¹, weekly ESA-dose/body weight/hemoglobin). The study was approved by the Ethical Committee of the Medical Faculty of the University of Pécs (4523). All patients had given their informed consent.

3.1.2. Non-diabetic septic patients (II.)

Our second study was performed on 25 patients admitted to the Department of Anaesthesia and Intensive Care, Faculty of Medicine, University of Pécs, between September 2012 and October 2013. Those patients who presented with severe sepsis or septic shock at admission were included in the study.

The diagnosis of sepsis was based on the ACCP/SCCM consensus guideline [22]. Exclusion criteria were medication (e.g., chronic steroid use and immunosuppressive medication) or treatment (e.g., radio- and chemotherapy) affecting the normal immune response and hematologic malignant disease and

oliguria at admission (collection of urine samples was impossible). Patients were treated according to the actual sepsis guideline [23,24]. Blood samples were taken on admission (day 1) and on the four consecutive days (days 2–5). Urine has been collected every 24 hours and the daily amount has been noticed. Serum and urinary creatinine, serum hsCRP, and PCT levels were measured.

Patients received insulin intravenously, using perfusor, according to a sliding-scale to maintain blood glucose level in the range of 6–8 mmol/L. Glucose levels were measured 6 times per day using arterial blood gas analysis. Daily insulin dose (DID) and insulin-glucose product (IGP) were calculated and their connection with Phe and Tyr parameters was assessed. Blood glucose variability was characterized using mean absolute glucose change (MAG).

Fractional excretions (FE) of the three Tyr isoforms were calculated (FE_p -Tyr, FE_m -Tyr, and FE_o -Tyr) to determine tubular handling of them.

The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Medical Faculty of the University of Pécs (4422) and it was completed in accordance with the ethical guidelines of the 2003 Declaration of Helsinki.

3./2. Routine analytical measurements (I., II.)

In our first study on dialyzed patients, routine laboratory parameters were determined by standard laboratory techniques. All of the blood samples were drawn just before the actual HD-treatment. ESA-demand was expressed using different ESA indices such as $ERI1 = \text{ESA-dose/body weight/hemoglobin}$; $ERI2 = \text{ESA-dose/body weight/hematocrit}$; $ERI3 = \text{ESAdose/body weight/red blood cell count}$.

Daily hsCRP, PCT, and creatinine measurements were part of the routine monitoring of septic patients and they were carried out at the Institute of Laboratory Medicine, University of Pécs.

3./3. Measurement of plasma, serum and urinary levels of p-, m-, o-Tyr and Phe (I., II.)

Blood samples of dialyzed patients were obtained by way of vein puncture, in tubes containing EDTA, while samples of septic patients were obtained from a central venous catheter, into native tubes. Plasma/serum was obtained by centrifugation. Plasma, serum and urine samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further examinations. Thereafter, $125\text{ }\mu\text{L}$ trichloroacetic acid (TCA; Reanal Private Ltd., Budapest, Hungary) was added to $500\text{ }\mu\text{L}$ plasma, serum or urine and then samples were incubated on ice for 30 min. Subsequently precipitate was separated by centrifugation. The supernatant was filtered by a syringe filter ($0.2\text{ }\mu\text{m}$) (Millipore, Billerica, MA, USA) before analysis. Finally serum and urinary *m*-, *o*-, and *p*-Tyr and Phe levels were determined using reverse phase-HPLC (Shimadzu USA Manufacturing INC, Canby, OR, USA) (C18 silica column, $250 \times 4\text{ mm}$) with fluorescence detection ($\lambda\text{EX} = 275\text{ nm}$; $\lambda\text{EM} = 305\text{ nm}$ for the tyrosines and $\lambda\text{EX} = 258\text{ nm}$; $\lambda\text{EM} = 288\text{ nm}$ for Phe) as described earlier [5]. Concentrations were calculated using an external standard.

3./4. Investigating ESA-effect on o-Tyr level (I.)

Five patients of the ESA-HD group were included in a longitudinal analysis that consisted of two sessions. The first session was a HD without DA-treatment (ESA $-$), while the second session of the same patients was a HD with

DA-treatment (ESA+ ; mean 28 µg of DA) at time point '0'. Blood samples were obtained five times (60 minutes before the end of HD (-60), at the end of HD (0) and 60, 120 and 180 minutes after the end of HD). The time kinetics of plasma o-Tyr levels at both sessions was examined.

3./5. Statistical analysis (I., II.)

Central tendency and width of distribution were expressed using mean ± SD in the cases of normally and, using median(interquartile range), in case of non-normally distributed data. Kolmogorov–Smirnov test was used to test normality. Differences between groups were analyzed using ANOVA with Bonferroni post hoc test (normal distribution) or using Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests (non-normal distribution). χ^2 test was used to compare groups in the case of categoric variables. Correlations were calculated using the Spearman correlation. Multivariate linear regression analyses were performed using a stepwise method in order to determine statistical predictors of ESA- and insulin-demand. P values <0.05 were considered to be statistically significant. All statistical analyses were performed with Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Statistics software, version 20.0 (IBM Corporation, USA).

4. Results

4./1. Effect of different tyrosine isoforms on ESA-response (I.)

4./1./1. Plasma levels of p- and o-Tyr, o-Tyr/p-Tyr ratio in dialyzed patients and in healthy subjects

Plasma p-Tyr levels were significantly lower in all groups of dialyzed patients than in the control subjects, but there was no difference among non-ESA-HD, ESA-HD, and CAPD groups. We detected significantly higher plasma o-Tyr levels and o-Tyr/p-Tyr ratios in groups of dialyzed patients than in the control subjects. Plasma o-Tyr levels and o-Tyr/p-Tyr ratios were significantly lower in non-ESA-HD and CAPD groups than in the ESA-HD group, while there was no significant difference between non-ESA-HD and CAPD patients.

4./1./2. Association between ESA-demand and plasma o-Tyr level and o-Tyr/p-Tyr ratio

There was a significant positive correlation between weekly ESA-dose/body weight and plasma o-Tyr level and a somewhat stronger correlation between weekly ESA-dose/body weight and plasma o-Tyr/p-Tyr ratio. Moreover, ERI1 proved to be in strong correlation with both the plasma o-Tyr level and the plasma o-Tyr/p-Tyr ratio. We examined the predictors of ESA-demand in multivariate regression analyses. ESA-demand was expressed in terms of ESA-dose, ESA-dose/body/weight, and different ESA-indices such as ESA-dose/body weight/hemoglobin, ESA-dose/body weight/hematocrit or ESA-dose/body weight/red/blood cell count (ERI1; ERI2; ERI3, respectively) in different models. We calculated plasma p-Tyr/Phe, plasma o-Tyr/Phe, and plasma o-Tyr/p-Tyr ratios. These three different tyrosine values were included separately in models, together with already known predictors of ESA-demand.

In the first model serum calcium, serum phosphate, parathormone (PTH), restdiuresis, and serum ferritin; while in the second model age, dialysis duration, hsCRP, restdiuresis, and serum ferritin were included besides the actual tyrosine value. As a result neither p-Tyr/Phe nor o-Tyr/Phe ratio proved to be an independent predictor in these two models. In almost all cases restdiuresis was the independent predictor. In contrast, when the o-Tyr/p-Tyr ratio was included into the model, it proved to be an independent predictor of the ESA-dose and ESA-indices in both models. Finally, we set a third model where kt/v was also included among age, PTH, hsCRP, serum ferritin, and o-Tyr/p-Tyr ratio. Also in this case o-Tyr/p-Tyr ratio proved to be the independent predictor of ESA-dose/body weight.

4./1./3. ESA-effect on plasma o-Tyr level

A potential explanation for the observed associations shown in the previous part could be a formation of hydroxyl radical due to ESA-administration. In that regard, larger ESA-doses would not be the consequence, but rather the cause of oxidative stress-related amino acid modification. To rule this out, in a longitudinal analysis, time kinetics of plasma o-Tyr levels were compared at two hemodialysis sessions, in the absence of ESA-treatment, and in the presence of ESA-therapy. As a result, no significant difference was found between the two curves.

4./2. Role of different tyrosine isoforms and Phe in carbohydrate metabolism of non-diabetic septic patients (II.)

4./2./1. Urinary m-Tyr levels and insulin demand

Urinary m-Tyr/p-Tyr ratio was significantly higher in patients with DID over median compared to those with DID below median. Similarly, urinary m-Tyr/p-Tyr ratio was significantly higher in patients with IGP over median compared to those with IGP below median.

4./2./2. Association of Tyr parameters with insulin demand

Urinary m-Tyr concentration showed a positive correlation with DID and with IGP. Similarly, urinary m-Tyr/p-Tyr ratio showed a positive correlation with DID and with IGP. Amino acid parameters were tested separately in multivariate linear regression models as predictors of insulin demand (DID and IGP). The components of this model were body weight, hsCRP, PCT, daily hydrocortisone dose, and daily dobutamine dose. Serum Phe was a negative predictor of both DID and IGP, while serum p-Tyr/Phe ratio associated positively and strongly with these carbohydrate metabolism parameters. Serum o-Tyr/Phe ratio was a positive predictor of IGP only, but not of DID. Urinary level of m-Tyr and ratios of urinary m-Tyr/p-Tyr, o-Tyr/p-Tyr, and (m-Tyr+o-Tyr)/p-Tyr were positive predictors of both DID and IGP. The abovementioned amino acid parameters were tested also in another model, in which serum creatinine level was included instead of body weight. In this model, similar results were obtained compared to the case of body weight.

4./2./3. Fractional excretion of Tyr isoforms

Both $FE_m\text{-Tyr}$ and $FE_o\text{-Tyr}$ were significantly higher than $FE_p\text{-Tyr}$. There was also a significant difference between $FE_m\text{-Tyr}$ and $FE_o\text{-Tyr}$, as $FE_o\text{-Tyr}$ was more than threefold higher than $FE_m\text{-Tyr}$. No direct connection between FE values of any of the investigated amino acid and carbohydrate parameters was found.

4./2./4. Connection of blood glucose variability with survival

Value of MAG was found to be higher in patients who died at the intensive care unit compared with survivors.

5. Discussion

5./1. Effect of different tyrosine isoforms on ESA-response (I.)

Our results may suggest that elevation of the ratio of o-Tyr/p-Tyr could be responsible for decreased ESA-responsiveness in dialyzed patients. Neither the plasma o-Tyr/Phe nor the p-Tyr/Phe ratio were independent predictors of ESA-demand, suggesting that neither an elevation of the o-Tyr level or a decrease in the p-Tyr level *per se* is sufficient predictor of the raising ESA-demand, but that combined and inverse alteration of these amino acid isomers is in a strong association with decreased ESA-responsiveness. This may mean that among circumstances when pathological o-Tyr concentration is increased and at the same time physiological p-Tyr is lowered (e.g. in ESRF), translational integration of o-Tyr instead of p-Tyr into the signaling proteins could change the intracellular outcome of EPO-receptor activation, causing lowered ESA-responsiveness.

Our findings with oxidative product of Phe are in agreement with the results of former studies, where higher levels of thiobarbituric acid reactive substances, lowered serum hydroxyl radical scavenging activity and elevated levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine were associated with higher ESA doses [25,26].

In a former *post hoc* study based on CHOIR trial, higher epoetin-alfa doses were associated with increased risks for cardiovascular events, suggesting that epoetin-alfa could have a cardiovascular toxic effect [27]. However, our findings raise the possibility of a different mechanism, since an elevated level of hydroxyl radical-derived products may cause decreased responsiveness to ESAs, leading to higher ESA-demand, and that this could

also be at the background of higher risk for cardiovascular events. Namely, there is evidence that these products can interfere with the MAP/ERK signaling pathway and that direct inhibition of ERK1/2 can lead to exacerbated cardiomyocyte death and impaired cardiac function [10,28].

5./2. Role of different tyrosine isoforms and Phe in carbohydrate metabolism of non-diabetic septic patients (II.)

In our second study, we provided evidence that elevated levels of hydroxyl radical-derived Tyr isoforms along with enzymatically produced *p*-Tyr could contribute to altered carbohydrate metabolism in nondiabetic septic subjects and thus predict insulin therapy of these patients. Serum and urinary levels and ratios of the abovementioned amino acids were strong predictors of both DID and IGP in a model which was composed by the known predictors of elevated insulin demand. In another model, with serum creatinine level instead of body weight, the same results were obtained, indicating that these associations are independent of renal function.

A potential cause of the abovementioned association of serum level of Phe with DID and with IGP could be a generalized hypoaminoacidemia due to malnutrition. We tested this possibility by performing correlation tests between serum level of albumin and DID or IGP. Neither DID nor IGP showed correlation with serum albumin level.

The fact that (i) serum level of Phe proved to be a negative predictor of DID and IGP and (ii) serum *p*-Tyr/Phe ratio proved to be a stronger positive one, while (iii) serum *p*-Tyr alone was not a predictor and (iv) serum *p*-Tyr level was slightly but not significantly lower in septic patients compared to that of healthy subjects [19, 23] may suggest that in septic patients the conversion of

Phe to *p*-Tyr—at a normal Phe level—results not only in the production of export *p*-Tyr, but the produced *p*-Tyr is also consumed for gluconeogenesis *in loco* in the kidney.

We are aware that, beyond oxidative stress, also other factors (such as metabolic status, actual level of inflammation, anthropometric parameters, and medications) may also have a strong influence on glycemic control. That is why we subsequently performed linear regression analyses, where correction to body weight, inflammatory markers, and doses of gluconeogenesis-stimulating agents did not lead to a disappearance of the association between *m*-Tyr and markers of glycemic status. Indeed, in this analysis, a statistically highly significant connection was observed. This suggests that, besides already known parameters, independently of them, the oxidative stress-derived amino acid does play a role in determining carbohydrate control.

In course of analysing the connection between blood glucose variability and mortality, we acquired similar results as former studies show [29-31].

6. List of the Ph.D. theses

1. Plasma level of p-Tyr is lower in dialyzed patents compared to healthy subjects. (I.)
2. Plasma level of o-Tyr and ratio of o-Tyr and p-Tyr is higher in ESA-treated hemodilyzed patients compared to healthy subjects, nonESA-treated hemodilyzed patients and patients on peritoneal dialysis. (I.)
3. Plasma ratio of o-Tyr and p-Tyr inversely correlates with ESA-response in dialysed patients. (I.)
4. Plasma ratio of o-Tyr and p-Tyr is an independent predictor of ESA-response in dialyzed patients. (I.)
5. Serum ratio of p-Tyr and Phe, urinary level of m-Tyr and urinary ratio of m-Tyr and p-Tyr positively correlate with exogenous insulin demand in non-diabetic septic patients. (II.)
6. Serum ratio of p-Tyr and Phe, as a marker of renal gluconeogenesis, strongly predicts insulin demand in non-diabetic septic patients. (II.)
7. Elevation of urinary level of m-Tyr and urinary ratio of m-Tyr and p-Tyr may inhibit insulin effect, thus resulting a significant rise in exogenous insulin demand in non-diabetic septic patients. (II.)

7. References

- [1] Stadtman ER, Berlett BS. Fenton chemistry—Amino acid oxidation. *J. Biol. Chem.* 266:17201–17211; 1991.
- [2] Galano A, Cruz-Torres A. OH radical reactions with phenylalanine in free and peptide forms. *Org. Biomol. Chem.* 6:732-738; 2008.
- [3] Ayling JE, Pirson WD, al-Janabi JM, Helfand GD. Kidney phenylalanine hydroxylase from man and rat. Comparison with the liver enzyme. *Biochemistry* 13:78-85; 1974.
- [4] Molnár GA, Nemes V, Bíró Z, Ludány A, Wagner Z, Wittmann I. Accumulation of the hydroxyl free radical markers meta-, orto-tirozin and DOPA in cataractous lenses is accompanied by a lower protein and phenylalanine content of the water-soluble phase. *Free. Radic. Res.* 39:1359-1366; 2005.
- [5] 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 orto-tirozin excretion in diabetes mellitus and renal failure: evidence for hydroxyl radical production. *Kidney Int.* 68:2281-2287; 2005.
- [6] Toth P, Koller A, Pusch G, Bosnyak E, Szapary L, Komoly S, Marko L, Nagy J, Wittmann I. Microalbuminuria, indicated by total versus immunoreactive vizelet albumin in acute ischemic stroke patients. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 20:510-516; 2011.
- [7] Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei A, Halmai R, Mészáros LG, Sümegi B, Wittmann I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br. J. Nutr.* 106:383-389; 2011.
- [8] Vivekanadan-Giri A, Wang JH, Byun J, Pennathur S. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products identifies oxidative mechanisms of diabetic end-organ damage. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 9:275-287; 2008.

- [9] Gurer-Orhan H, Ercal N, Mare S, Pennathur S, Orhan H, Heinecke JW. Misincorporation of free m-tyrosine into cellular proteins: a potential cytotoxic mechanism for oxidized amino acids. *Biochem. J.* 395:277-284; 2006.
- [10] Ruggiero RA, Bruzzo J, Chiarella P, di Gianni P, Isturiz MA, Linskens S, Speziale N, Meiss RP, Bustuoabad OD, Pasqualini CD. Tyrosine isomers mediate the classical phenomenon of concomitant tumor resistance. *Cancer Res.* 71:7113-7124; 2011.
- [11] 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.* 38:217-225; 2014.
- [12] Sziártó 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.* 48:749-757; 2014.
- [13] Sziártó IA, Molnár GA, Mikolás E, Fisi V, Cseh J, Laczy B, Kovács T, Böddi K, Takátsy A, Gollasch M, Koller A, Wittmann I. Elevated vascular level of ortho-tyrosine contributes to the impairment of insulin-induced arterial relaxation. *Horm. Metab. Res.* 46:749-752; 2014.
- [14] Locatelli F, Covic A, Macdougall IC, Wiecek A. ORAMA: a study to investigate EBPG impact on renal anaemia - design and baseline data. *J. Nephrol.* 21:592-603; 2008.
- [15] Johnson DW, Pollock CA, Macdougall IC. Erythropoiesis-stimulating agent hyporesponsiveness. *Nephrology (Carlton)* 12:321-330; 2007.
- [16] Rossert J, Gassmann-Mayer C, Frei D, McClellan W. Prevalence and predictors of epoetin hyporesponsiveness in chronic kidney disease patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22:794-800; 2007.
- [17] Abe M, Okada K, Soma M, Matsumoto K. Relationship between insulin resistance and erythropoietin responsiveness in hemodialysis patients. *Clin. Nephrol.* 75:49-58; 2011.
- [18] Stumvoll M, U. Chintalapudi, G. Perriello, S. Welle, O. Gutierrez, and J. Gerich. Uptake and release of glucose by the human kidney: postabsorptive rates and responses to epinephrine. *J. Clin. Invest.* 96:2528–2533; 1995.

- [19] Meyer, C., V. Nadkarni, M. Stumvoll, and J. Gerich. Human kidney free fatty acid and glucose uptake: evidence for a renal glucose-fatty acid cycle. *Am. J. Physiol.* 273:650–654; 1997.
- [20] Meyer C, Dostou J, Nadkarni V, Gerich J. Effects of physiological hyperinsulinemia on systemic, renal and hepatic substrate metabolism. *Am. J. Physiol.* 275:F915–921; 1998.
- [21] Cersosimo E, Garlick P, Ferretti J. Insulin regulation of renal glucose metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* 276:E78-84; 1999.
- [22] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* 31:1250-1256; 2003.
- [23] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL; International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee; American Association of Critical-Care Nurses; American College of Chest Physicians; American College of Emergency Physicians; Canadian Critical Care Society; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; European Society of Intensive Care Medicine; European Respiratory Society; International Sepsis Forum; Japanese Association for Acute Medicine; Japanese Society of Intensive Care Medicine; Society of Critical Care Medicine; Society of Hospital Medicine; Surgical Infection Society; World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. *Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Crit Care Med.* 36:296-327; 2008.
- [24] Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of*

- Severe Sepsis and Septic Shock 2012. *Intensive Care Med.* 39:165-228; 2013.
- [25] Hirayama A, Nagase S, Gotoh M, Ueda A, Ishizu T, Yoh K, Aoyagi K, Terao J, Koyama A. Reduced serum hydroxyl radical scavenging activity in erythropoietin therapy resistant renal anemia. *Free Radic. Res.* 36:1155-1161; 2002.
- [26] Kato A, Odamaki M, Hishida A. Blood 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is associated with erythropoietin resistance in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18:931–936; 2003.
- [27] McCullough PA, Barnhart HX, Inrig JK, Reddan D, Sapp S, Patel UD, Singh AK, Szczech LA, Califf RM. Cardiovascular toxicity of epoetin-alfa in patients with chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* 37:549-558; 2013.
- [28] Ruppert C, Deiss K, Herrmann S, Vidal M, Oezkur M, Gorski A, Weidemann F, Lohse MJ, Lorenz K. Interference with ERK(Thr188) phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:7440-7445; 2013.
- [29] Bagshaw SM, Bellomo R, Jacka MJ, Egi M, Hart GK, George C, ANZICS CORE Management Committee. The impact of early hypoglycemia and blood glucose variability on outcome in critical illness. *Crit. Care* 13:R91; 2009.
- [30] Egi M, Bellomo R, Stachowski E, French CJ, Hart G. Variability of blood glucose concentration and short-term mortality in critically ill patients. *Anesthesiology* 105:244-252; 2006.
- [31] Hermanides J, Vriesendorp TM, Bosman RJ, Zandstra DF, Hoekstra JBL, DeVries JH. Glucose variability is associated with ICU mortality. *Crit. Care Med.* 38:838-42; 2010.

8. List of publications used for the theses (see numbering at subcaptions)

I. **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 Sep;19(5):190-198. IF: 1,52

II. **Kun S**, Molnár GA, Sélley E, Szélig L, Bogár L, Csontos C, Miseta A, Wittmann I. Insulin Therapy of Nondiabetic Septic Patients Is Predicted by para-Tyrosine/Phenylalanine Ratio and by Hydroxyl Radical-Derived Products of Phenylalanine. *Oxid Med Cell Longev* (2015): 2015:839748. doi: 10.1155/2015/839748. IF: 3,51

8.1. List of publications not related to the thesis

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 Apr 2;13(1):69. IF: 3,67

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 Gergő Attila, Laczy Boglárka, Sélley Eszter, **Kun Szilárd**, Wittmann István. Az antidiabeticumok és a cardiovascularis kockázat. *Diabetologia Hungarica.* 2014. március; 22(1):25-32. IF: -

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: -

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.* 2015 Apr 15;6(3):500-507. Review. IF: -

Sélley E, **Kun S**, Kürthy M, Kovács T, Wittmann I, Molnár GA. Para-Tyrosine Supplementation Improves Insulin- and Liraglutide- Induced Vasorelaxation in Cholesterol-Fed Rats. *Protein Pept Lett.* 2015;22(8):736-742. IF: 1,06

Szélig L, **Kun S**, Woth G, Molnár GA, Zrínyi Z, Kátai E, Lantos J, Wittmann I, Bogár L, Miseta A, Csontos C. Time courses of changes of para-, meta-, and ortho-tyrosine in septic patients: A pilot study. *Redox Rep.* 2016 Jul;21(4):180-189. IF: 2,61

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;23(7):667-685. IF: 3,85

Sélley E, **Kun S**, Szijártó IA, Kertész M, Wittmann I, Molnár GA. Vasodilator Effect of Glucagon: Receptorial Crosstalk Among Glucagon, GLP-1, and Receptor for Glucagon and GLP-1. *Horm Metab Res*. 2016 Jul;48(7):476-483. IF: 2,12

Brasnyó P, Kovács T, Molnár GA, Sélley E, **Kun Sz**, Vas T, Laczy B, Fekete K, Kovács T, Mészáros GL, Winkler G, Sümegi B, 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 IF: 1,2

Cumulative impact factor: 21,27

Number of independent citations: 14

8.2. Book chapter

Kun Szilárd, Wittmann István. Inzulinrezisztencia akut betegségekben, In: Winkler Gábor, Wittmann István. Az inzulinrezisztencia és klinikai vonatkozásai. Budapest, Springmed Kiadó, 2017, 206-210.

8.3. List of presentations and abstracts

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.*

Kun Szilárd, Szélig L., Woth G., Zrínyi Z., Molnár G.A., Lantos J., Wittmann I., Bogár L., Miseta A., Csontos Cs.: Tirozin-izomerek eltérő renális transzportja szeptikus betegekben. *II. MATHINÉ Budapest, 2014.03.14.*

Mikolás Esztella Zsóka, **Kun Sz.**, Laczy B., Molnár G.A., Sélley E., Kőszegi T., Wittmann I.: A cukorbetegekben 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 vazóaktív 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. Para-tirozin szupplementáció javítja az inzulin- és a liraglutid kiváltotta vasorelaxációt koleszterinnel etetett patkányokban. *MDT XXII. Kongresszusa Szeged, 2014.04.26.*

Szélig Lívia, Woth G., **Kun Sz.**, Zrínyi Z., Molnár G.A., Lantos J., Wittmann I., Bogár L., Miseta A., Csontos Cs.: Az oxidatív stressz hatása a meta-, ortho-, és para-tyrosin szintézisre septicus betegekben. Előtanulmány. *MAITT 42. Kongresszusa Siófok, 2014.05.22. (absztrakt: Aneszteziológia és Intenzív Terápia 2014 (44):Suppl. 1, 12.o.)*

Kovács Patrícia, Wittmann I., **Kun Sz.**, Szélig L., Molnár G.A., Bogár L., Miseta A., Zrínyi Z., Csontos Cs.: Vizelet és szérumban para-, meta- és orto-tirozin szintjének vizsgálata égett és septicus betegekben. *MAITT 42. Kongresszusa Siófok, 2014.05.22. (absztrakt: Aneszteziológia és Intenzív Terápia 2014 (44):Suppl. 1, 13.o.)*

Patrícia Kovács, Lajos Bogár, István Wittmann, Attila Miseta, Lívia Szélig, **Szilárd Kun**, Zita Zrínyi, Gergő.A. Molnár, Csaba Csontos: Changes of para-, meta-, and ortho-tyrosine levels in serum and urine of septic and burned patients. *Ninth YES (Young European Scientist) Meeting – Internal Medicine Parallel Oral Session Porto, 19th-21st September 2014*

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.

Sélley Eszter dr., **Kun Szilárd dr.**, Szijártó István András dr., Laczy Boglárka dr., Kovács Tibor dr., Fülöp Ferenc dr., Wittmann István dr., Molnár Gergő Attila dr.: A lixisenatid vasodilatációt okoz cGMP közvetítésével ismeretlen receptoron keresztül. *MDT XXIII. Kongresszusa Budapest, 2015.05.14.*

Kun Szilárd dr., Molnár Gergő Attila dr., Sélley Eszter dr., Szélig Livia dr., Bogár Lajos dr., Csontos Csaba dr., Miseta Attila dr., Wittmann István dr.: Nem diabeteses, szeptikus betegek inzulininterápiájának független prediktora a para-tirozin/fenilalanin hányados és a fenilalanin oxidált származékai. *MDT XXIII. Kongresszusa Budapest, 2015.05.15.*

Szélig Livia, Kovács Patrícia, Woth Gábor, **Kun Szilárd**, Molnár A. Gergő, Wittmann István, Bogár Lajos, Miseta Attila, Csontos Csaba.: Para-, meta- és orto-tirozin változások vizsgálata égett betegben. *MAITT 43. Kongresszusa Siófok, 2015.05.28.*

Kun Szilárd, Molnár Gergő A., Sélley Eszter, Szélig Livia, Bogár Lajos, Csontos Csaba, Miseta Attila, Wittmann István.: Nem-diabéteszes szeptikus betegek inzulininterápiájának független prediktora a para-tirozin/fenilalanin hányados és a fenilalanin oxidált származékai. *MBT DSZ LVIII. Vándorgyűlése Kaposvár, 2015.06.18.*

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.: Resveratrol hatásának vizsgálata IgA nephropathiában. (pilot vizsgálat). *MANET XXXII. Nagygyűlése Siófok, 2015.11.12.*

Kun Szilárd, Szélig L., Woth G., Molnár G.A., Zrínyi Z., Lantos J., Wittmann I., Bogár L., Miseta A., Csontos Cs.: Tirozin-izomerek eltérő renális transzportja szeptikus betegeknél. *MANET XXXII. Nagygyűlése Siófok, 2015.11.13.*

Molnár Gergő Attila, **Kun Sz.**, Szélig L., Woth G., Bogár L., Miseta A., Csontos Cs., Wittmann I.: Hiperfiltráció előfordulása intenzív osztályon kezelt égett, szeptikus és politraumatizált, nem-oligúriás betegek körében. *MANET XXXII. Nagygyűlése Siófok, 2015.11.13.*

Mohás Márton dr., Cseh Judit dr., **Kun Szilárd dr.**, Molnár Gergő Attila dr., Wittmann István dr.: A máj elzsírosodását és kötőszövetes átalakulását jelző képletek összefüggése a rutin klinikai laborparaméterekkel 2-es típusú diabetes mellitusban. *MDT XXIV. Kongresszusa Debrecen, 2016.04.28.*

Sélley Eszter dr., **Kun Szilárd dr.**, Szijártó István András dr., Kertész Melinda, Wittmann István dr., Molnár Gergő Attila dr.: A glukagon vazodilatációs hatása. Receptorális szintű kölcsönhatás a glukagon és a GLP-1 között. *MDT XXIV. Kongresszusa Debrecen, 2016.04.28.*

Molnár Gergő Attila dr., Kertész Melinda, **Kun Szilárd dr.**, Csiky Botond dr., Wittmann István prof. dr.: Bőr és szemlencse fluoreszcencia vizsgálata diabéteszes és/vagy krónikus vesebeteg páciensekben. *MDT XXV. Kongresszusa Pécs, 2017.04.21.*

Wittmann István prof. dr., Vándorfi Győző dr., **Kun Szilárd dr.**, Molnár Gergő Attila dr., Verzár Zsófia dr., Jermendy György prof. dr.: A cukorbeteg kardiovaszkuláris kockázatának becslése a szemlencse autofluoreszcenciájának vizsgálatával. *MDT XXV. Kongresszusa Pécs, 2017.04.23.*

8.4. Posters

Kovács P. IV, **Kun Sz.**, Szélig L., Bogár L., Miseta A., Wittmann I., Csontos Cs.: Vizelet és szérum para-, meta- és orto-tirozinszintjének vizsgálata égett és szepszis betegekben. Pilot study. *MAITT 41. kongresszusa Siófok, 2013.05.23-25. (absztrakt: Aneszteziológia és Intenzív Terápia 2013 (43):Suppl. 1, 26.o.)*

Kun Szilárd, Molnár G.A., Sélley E., Fisi V., Szélig L., Bogár L., Csontos Cs., Miseta A., Wittmann I.: Nem-diabéteszes szepszis betegek inzulininterápiájának független prediktora a para-tirozin/fenilalanin hányados és a fenilalanin oxidált származékai. *MANET XXXI. Nagygyűlése Eger, 2014.11.07.*

Mohás Márton, Cseh J., **Kun Sz.**, Molnár G. A., Wittmann I. A máj elzsírosodását és a májfibrózist jelző képletek összefüggése a rutin klinikai laborparaméterekkel krónikus veseelégtelenségben. *MANET XXXII. Nagygyűlése Siófok, 2016.10.21.*

9. Acknowledgements

I would like to express my gratitude to my supervisors, to Professor Dr. István Wittmann and to Dr. Gergő Attila Molnár for the continuous, enthusiastic guidance and help during my research. Their leadership covered the basic laboratory problem solving as well as the highest scientific thinking.

I would like to say thank you to Professor Dr. Attila Miseta, Professor Dr. Lajos Bogár, Dr. Csaba Csontos, Dr. Lívia Szélig and Dr. Patricia Kovács for the great amount of help and fruitful collaboration.

I am grateful to my closest colleague, Dr. Eszter Sélley for the cheerful, amicable and productive cooperation on our numberless common works.

I would also like to express my thanks to Krisztina Szalma and Ilona Dr. Sámikné Varga for their excellent assistance and great help. Their precise and sedulous work on HPLC was priceless.

I would like to thank my biotechnologist colleague, Melinda Kertész for finding a great, friendly partner in her.

I am also thankful to Enikő Bodor, Viktória Horváth and Klaudia Horváth for their lot of supporting cooperation.

I would like to say thank you to all the doctors, nurses, assistants, administrators and ITs at the 2nd Department of Medicine and Nephrological Center who helped my work, playing an indispensable role in many cases.

I need to say thank you to my friends for their spiritual and intellectual support at the past years.

Last, but not least, I am especially grateful to my Mother for her eternal patience and the many sacrifices she made during my doctoral period, so that I could do my work in maximal comfort and calm.