

Kóros tirozinizomerek hatása a krónikus inzulinrezisztencia kialakulására és az M1/M2 polarizáció irányára makrofágokban

Csurgyók Roland,¹ Sütő Gábor dr.,¹ Engelmann Péter dr.,² Wittmann István dr.,¹ Vas Tibor dr.¹

¹ Pécsi Tudományegyetem, II. Belgyógyászati Klinika, Nephrológiai és Diabetológiai Centrum

² Pécsi Tudományegyetem, Immunológiai és Biotechnológiai Tanszék

Kulcsszavak

- inzulinrezisztencia
- makrofágok
- oxidatív stressz
- pAkt
- tirozinizomerek

Összefoglalás

Elhízás esetén a fehér zsírszövet gyulladásos citokineket expresszál, ami inzulinrezisztenciához vezet. A fenilalaninból szabad gyökök által termelt, nem fiziológiás meta-tirozin és orto-tirozin (meta-Tyr és orto-Tyr) hozzájárulhat az inzulinrezisztencia kialakulásához. Az ebből eredő inzulinrezisztencia jelentős hatással lehet a makrofágok működésére. Ebben a tanulmányban a meta- és orto-Tyr hatását vizsgáltuk a makrofágok inzulinérzékenységére és M1/M2 polarizációjára Akt-foszforiláció és argináz-1/iNOS arány segítségével. A makrofág-sejtvonalakat para-, meta- vagy orto-Tyr, 5 mmol/l vagy 25 mmol/l glükózt tartalmazó médiumban tenyésztettük (para25-Tyr csoport), és inzulinnal kezeltük. A para25, a meta- és orto-Tyr növelte a pAkt-szintet és csökkentette az argináz-1/iNOS arányt a makrofágokban inzulin hiányában. Fiziológiás para-tirozin-kezelés esetén az inzulin növelte a pAkt mennyiségét és csökkentette az argináz-1/iNOS arányt. Mind a meta-, mind az orto-Tyr-kezelés képes volt megszüntetni vagy megfordítani az inzulin pAkt-ra gyakorolt növelő hatását és az argináz-1/iNOS arányra gyakorolt csökkenő hatását. Eredményeink arra utalnak, hogy a nem fiziológiás tirozinizomerek befolyásolhatják a makrofágok inzulin-jelátvitelét és M1/M2 polarizációját.



Key words

- insulin-resistance
- macrophages
- oxidative stress
- pAkt
- tyrosine isomers

Chronic insulin resistance and changes of M1/M2 polarization in macrophages due to abnormal tyrosines

In obesity, white adipose tissue expresses inflammatory cytokines leading to insulin resistance. Non-physiological meta-tyrosine and ortho-tyrosine (meta-Tyr and ortho-Tyr), produced from phenylalanine by free radicals, may contribute to the development of insulin resistance. The resulting insulin resistance may have a significant impact on macrophage function. In this study we aim to investigate microscopically the effect of meta- and ortho-Tyr on insulin sensitivity and M1/M2 polarization of macrophages using Akt phosphorylation and the arginase 1/iNOS ratio. Macrophage cell lines were cultured in media containing para-, meta- or ortho-Tyr, 5 mmol/L or 25 mmol/L glucose (para25-Tyr group) and treated with insulin. Para25, meta- and ortho-Tyr increased pAkt levels and decreased the arginase 1/iNOS ratio in macrophages in the absence of insulin. In the case of physiological para-tyrosine treatment, insulin increased the amount of pAkt and decreased the arginase 1/iNOS ratio. Both meta- and ortho-Tyr treatment were able to abolish or reverse the insulin's increasing effect on pAkt and the decreasing effect on arginase 1/iNOS ratio. Our results suggest that non-physiological tyrosine isomers may affect the insulin signaling of macrophages and influence their M1/M2 polarization.

Akórosan magas energiabevitel, ami például elhízásban, prediabéteszben vagy 2-es típusú diabetes mellitusban (T2DM) jellemző, a bél mikrobiomjának megváltozásához vezet, melynek metabolitjai képesek átjutni a bélfalon és fenotípusos változásokat okoznak a fehér zsírszövetben (WAT).¹ Ezek a változások a zsírszövetben található egyéb sejteket is érintik. Az adipociták nemcsak az energiatárolásban és mobilitásban játszanak szerepet, hanem parakrin faktorokat is kiválasztanak más, metabolikusan aktív szövetek szabályozására. A megnövekedett energiabevitel hatására a zsírsejtek mérete is gyorsan változik, aminek következtében megnövekszik a szabad zsírsavak kiáramlása, csökken az adiponektin termelődése, nő a gyulladást elősegítő citokinek és gyulladásos sejtek száma a zsírszövetben, fokozódik a hipoxia és a fibrózis. A zsírszövet gyulladásos sejtjei gyulladást elősegítő és gyulladásgátló citokinek is termelhetnek. A krónikusan fokozott energiabevitel szisztémás, alacsony fokú gyulladásához, anyagcsere zavarkhoz, például inzulinrezisztenciához, a gyulladást elősegítő citokinek fokozott termelődéséhez, oxidatív stresszhez vezet.²

Elhízás esetén a WAT stromális vaszkuláris frakciója gyulladásos citokinek választ ki.³ Elhízás esetében makrofágok találhatók a legnagyobb számban a WAT-sejtek körül (közel 40%), míg sovány egyéneknél ez a szám kevesebb mint 10%.⁴ A WAT-makrofágok döntő szerepet játszanak a gyulladásos citokinek expressziójában.³

A makrofágok az immunrendszer fagocitózisra képesek tagjai. Szerepet játszanak mind a veleszületett, mind az adaptív immunmechanizmusokban. A makrofágok fenotípusuk és funkciójuk alapján két csoportra oszthatók: az M1 típusú makrofágok gyulladást serkentő, az M2 típusúak gyulladásgátló hatásúak.⁵ Az M1 és M2 típusú makrofágok eltérően metabolizálják az arginint. Az M1 típusú makrofágok az arginint nitrogén-monoxidra és citrullinra bontják a nitrogén-monoxid-szintáz enzim segítségével. Az M2 típusú makrofágok az arginint az argináz-1 segítségével metabolizálják.⁶ Az M1-makrofágok szabad gyököket és nitrogén-monoxidot (NO) termelnek-, és gyulladásos citokinek, például tumor nekrozis faktor-alfát (TNF- α) és IL-6-ot választanak ki.⁷ Az M1 típusú makrofágok az általuk termelt proinflammatorikus citokinek révén az egyik legjelentősebb szereplők a gyulladás kialakulásában.^{3,7}

Az M2-makrofágok részt vesznek a kórokozók elleni védekezési mechanizmusokban is, főként gombasejtek, paraziták, immunkomplexek, komplement, apoptotikus sejtek, makrofág-kolóniastimuláló faktor (MCSF), interleukin-4 (IL-4), IL-13, IL-10, tumor növekedési faktor-béta (TGF- β) aktiváló hatására.⁸ A kórokozók elleni védekezés mellett az M2-makrofágok képesek eltakarítani az apoptotikus sejteket, elősegítik a sebgyógyulást és csökkentik a gyulladásos választ.⁸ Ennek eredményeként a makrofágok gyulladást elősegítő vagy gyulladásgátló irányba történő polarizációja fontos szerepet játszik a gyulladásos állapotok szabályozásában. Az immunsejtek rendellenes működése és a keringésben a gyulladásos citokinek megnövekedett szintje a szervezet összes sejtjét érintő szisztémás szubklinikai gyulladáshoz vezet, amely végül szubcelluláris szinten oxidatív stresszt okoz.⁹

A folyamatos szubklinikus gyulladás következtében kialakuló oxidatív stressz szerepet játszhat a multihormonális rezisztencia (pl. inzulinrezisztencia, eritropoetinrezisztencia, leptinrezisztencia) kialakulásában.^{10,11} Ezenkívül a szabad gyökök nagyon reaktívak és könnyen reagálnak a különböző típusú makromolekulákkal. Képesek reagálni a DNS-sel, fehérjékkel, lipidekkel és aminosavakkal is. E molekulák szerkezeti változásai funkciójuk módosulásához és elvesztéséhez is vezetnek. Az így létrejött módosított molekulák többnyire stabilak, így az oxidatív stressz markereiként is felhasználhatjuk őket.

A fenilalanin (Phe) esszenciális aminosav, amely enzimatikusan átalakul para-tirozinná (para-Tyr), dihidroxi-fenilalaninná (DOPA), katekolaminokká, melaninná és pajzsmirigy-hormonokká. A Phe aromás gyűrűje viszonylag sérülékeny és a fent említett fontos enzimátikus módosulásokon kívül nem enzimátikus változásokon is áteshet. A hidroxil szabad gyök képes nem enzimátikusan hidroxilálni a Phe aromás gyűrűjét, ami a para-Tyr mellett nem fiziológiás meta- és orto-tirozin (meta-Tyr és orto-Tyr) képződéséhez vezet. A nem enzimátikusan képződött para-Tyr mennyisége azonban lényegesen kisebb, mint az enzimátikus folyamatban képződő para-Tyr mennyisége. Oxidatív stressz esetén a meta- és orto-Tyr a hidroxil szabad gyökök mennyiségét tükrözi. A Tyr-izomereket régóta főként az oxidatív stressz markereiként tanulmányozzák, de egyre több bizonyíték van arra, hogy a nem fiziológiás Tyr-izomerek a káros hatások okozói.¹² Az abnormális tirozinok

ilyen szerepére számos példa ismert. A meta-Tyr gátolhatja más növények fejlődését,¹³ és befolyásolhatja a daganatok növekedését is.¹⁴ Munkacsoportunk korábban megfigyelte, hogy összefüggés mutatható ki az orto-Tyr szérumszintje és az eritropoetinrezisztencia között dializált betegekben. Egy tanulmányban a meta- és orto-Tyr idő- és dóziszfüggő módon képes volt gátolni az eritropoetinfüggő eritrocitaproliferációt.¹⁵ Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy az abnormális tirozinok nemcsak az oxidatív stressz megbízható indikátorai, hanem szövethárosodást is képesek okozni.¹⁰

A meta- és orto-Tyr negatív hatásai mind közvetlenek, mind közvetettek: közvetlenül beépül a fehérjékbe, megváltoztatva azok szerkezetét és funkcióját, közvetve pedig zavarokat okoz a reaktív oxigén- és nitrogéntermékek kialakulásában.¹⁶ Az oxidatív stressz miatt képződő Tyr-izomerek valószínűleg a táplálkozás révén is bejuthatnak az élő szervezetekbe.¹¹ Mindazonáltal kevés klinikai vagy in vivo tanulmány vizsgálta az abnormális Tyr-izomerek káros hatásait.

Korábbi vizsgálatunkban¹⁷ megerősítettük, hogy a nem fiziológiás Tyr-izomerek (meta- és orto-Tyr) az oxidatív stressz markerei voltak 2-es típusú diabetes mellitusban (T2DM) krónikus vesebetegséggel vagy anélkül, végstádiumú vesebetegségben, illetve szepszis körülmények között. Ugyanakkor a rezveratrol antioxidáns hatása miatt a 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegeknél csökkent az orto-Tyr kiválasztása a vizeletben, és ezzel párhuzamosan az inzulinrezisztencia javulása is megfigyelhető volt. Korábbi vizsgálataink során továbbá arra a következtetésre jutottunk, hogy a nem fiziológiás tirozinok nemcsak az oxidatív stressz markerei, hanem számos betegség patogenezisében is szerepet játszhatnak.^{10,11,8} A különböző sejtvonalak meta- és orto-Tyr-en történő tenyésztése inzulinrezisztenciához vezetett ezekben a sejtekben, hasonlóan a magas glükóztartalmú környezetben történő növekedéshez. Ezekben a meta- és orto-Tyr-en tenyésztett sejtekben nem tudtunk kimutatni inzulin által kiváltott IRS-1-foszforilációt. A para-Tyr-en tenyésztett sejtekben az inzulin képes volt az Akt-foszforilációját indukálni normál glükóztartalmú médiumon, azonban meta- és orto-Tyr jelenlétében az inzulin nem tudott semmilyen hatást kifejteni, a magas glükóztartalmú környezethez hasonlóan.

A T2DM-et korunk járványának tekintik, melynek elterjedése világszerte folyamatosan növekszik. Ez egy

krónikus betegség, amely számos társbetegséggel, például szív- és érrendszeri betegségekkel, vesebetegséggel, neuropátiával és demenciával társulhat¹⁹ és immunhiányos állapotot eredményezhet.²⁰ Ezenkívül a T2DM-ben megnövekszik az oxidatív stressz, ami összefüggésbe hozható más betegségek, például szív- és érrendszeri betegségek kialakulásával.^{21,22} A T2DM-et inzulinrezisztencia (IR), hiperglikémia és csökkent inzulinszekréció jellemzi. Az IR és a T2DM közötti kapcsolat régóta jól ismert. Inzulinrezisztencia esetén a sejtek nem reagálnak megfelelően az inzulinra, ami hosszú távon hiperinzulinémiához, hiperglikémiához és T2DM kialakulásához vezet. Az IR előre jelzi és kulcsszerepet játszik a T2DM kialakulásában, ezért az IR a T2DM előrejelzője és terápiás célpontja is.

A gyulladás kulcsszerepet játszik a T2DM patogenezisében. Az immunsejtek nem megfelelő aktiválása és az azt követő gyulladásos folyamatok szerepet játszanak a T2DM progressziójában és kialakulásában.²³ T2DM-ben az IR jelentős hatással lehet a makrofágok működésére,²⁴ mivel az inzulin az Akt-jelátvitelen keresztül befolyásolja a makrofágok M1 és M2 típusú polarizációját.²⁵ Az M1 típusú makrofágok által termelt proinflammatorikus citokinek (pl. TNF- α) hozzájárulnak az IR kialakulásához, másrészt az IR a makrofágok gyulladásos állapotba való polarizációja révén gyulladásához vezethet.^{26,27} A makrofágok polarizációját számos, a környezetükben jelen lévő tényező befolyásolja, amelyek különböző jelátviteli útvonalakon keresztül hatnak. Ezen jelentős jelátviteli útvonalak egyike a foszfoinozitol-3-kináz (PI3K)/Akt útvonal, amelyen keresztül többek között az inzulin jelátvitel is végbemegy.²⁸

Korábbi western-blot módszerrel végzett vizsgálataink során megfigyeltük, hogy az Akt nem stimulált bazális foszforilációja a 3T3-L1 zsírszövetekben, HEK-sejtekben és podocitákban és a nem stimulált bazális IRS-1-foszforiláció makrofágokban szignifikánsan magasabb volt meta- és orto-Tyr hatására a para-Tyr-hez viszonyítva.^{10,11} Ez a „set point shift” rezisztenciát eredményezett az inzulinstimulációval szemben ezekben a sejtekben.^{10,11} Megfigyeltük továbbá, hogy a foszforilált polipeptid defoszforilációja a protein tirozin-foszfátáz 1B enzim által szinte lehetetlen volt, ha a foszforilált tirozin meta-Tyr vagy orto-Tyr volt, míg foszforilált para-Tyr esetén gyorsan defoszforilálódott.^{10,11}

A jelen tanulmányunk célja az volt, hogy mikroszkópos módszerrel vizsgáljuk a meta- és orto-Tyr hatását

a makrofágok inzulinérzékenységére Akt-foszforilációs módszer felhasználásával, valamint az abnormális Tyr-izomerek hatását a makrofágok polarizációjára.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtvonalak tenyésztése

A 293-as számú humán embrionális vesesejteket (HEK) (ATCC® CRL-11268™) és a J774A.1 egér BALB/C monocyta-makrofág sejtvonalakat (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország, CAT-szám: 91051511-IVL) Dulbecco Eagle's módosított tápközegekben (DMEM, Sigma Aldrich CAT-szám: D61046) tenyésztettük és tartottuk fenn. A tápközeget a következőkkel egészítettük ki: 10% magzati szarvasmarha-szérum (Gibco, CAT-szám: A3840402), 100 egység/ml penicillin, 0,1 mg/ml sztreptomycin (Gibco, CAT-szám: 15070-063), 2 μ g/ml Fluconazol (Fresenius Kabi Magyarország), 1 μ g/ml inzulin (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország, CAT-szám: I 9278) és kísérlettől függően 5 vagy 25 mmol/l glükóz.

A makrofágsejtek kezelése a pAkt-jelölés esetén

A DMEM táptalaj eredetileg 36 mg/l para-Tyr-t tartalmaz. Négy csoportot alakítottunk ki az alábbiak szerint: 72 mg/l para-Tyr-t (fiziológiás tirozin) adtunk a negatív kontroll csoport (para-Tyr csoport, 5 mmol/l glükózzal) és a pozitív kontrollcsoport (para25-Tyr csoport, 25 mmol/l glükózzal) tápközegehez. A másik két csoport tápközegehez (5 mmol/l glükózzal) 72 mg/l meta-, vagy orto-Tyr-t (fiziológiás tirozint) adtunk. A sejteket fedőlemezekben tenyésztettük 6 lyukú lemezekben, párástított inkubátorban, 37°C-on és 5% CO₂ tartalom mellett. 5 nap elteltével a sejteket egy éjszakán át szérumentes tápközegekben inkubáltuk. Az inzulinkezelést szérumentes tápközegekben végeztük a következőképpen: 0 nM/l (kontroll), 6 nM/l, 25 nM/l, 100 nM/l és 400 nM/l inzulin 10 percig. Az inzulinkezelés után a sejteket kétszer mostuk jéghideg PBS-sel, hogy teljesen eltávolítsuk a tápközeget.

A festési módszer egy publikáción alapult, kisebb módosításokkal.²⁹ A sejteket 4%-os pufferolt jéghideg PBS-ben oldott paraformaldehiddel (PFA, Sigma Aldrich CAT-szám:

P-6148) fixáltuk 20 percig jégen, majd háromszor 5 percig PBS-sel mostuk. 0,1%-os Triton X-100-zal (Sigma Aldrich CAT-szám: T-9284) permeabilizáltuk 15 percig, amit 1×5 perc PBS-sel történő mosás követett, majd szobahőmérsékleten 5%-os szarvasmarha-szérumalbuminnal (BSA, Sigma Aldrich CAT-szám: A7906-100G) blokkoltuk 60 percig. Ezt követően a sejteket az elsődleges antitesttel (Anti-phospho-Akt [Ser473], Cell Signaling CAT-szám: 4060) inkubáltuk, amit a blokkoló pufferben hígítottunk 1:100 arányban, majd egy éjszakán át 4 °C-on, párasított kamrában, ezt követően 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az elsődleges antitest eltávolításához a fedőlemezeket háromszor 5 percig mostuk 0,1% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben. A sejteket a PBS-ben oldott másodlagos antitesttel (Alexa Fluor 647, kecske anti-nyúl IgG [H+L] erősen keresztadszorbeált másodlagos antitest, Invitrogen CAT-szám: A-21245) inkubáltuk szobahőmérsékleten 4 órán keresztül. 3-szor 5 perc PBS-sel történő mosás után a sejtmembránokat 5 µg/ml CellBrite-tal (Cellbrite Green Cyto-plasmic Membrane Dye, Biotium Inc., CAT-szám: 30021) festettük szobahőmérsékleten 20 percig. 5 perces PBS-sel történő mosás után a sejtek magját 10 µg/ml DAPI-val (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország, CAT-szám: 10236276001) 5 percig festettük szobahőmérsékleten. Végül a mintákat DPX-szel (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország, CAT-szám: 06522) fedtük be.

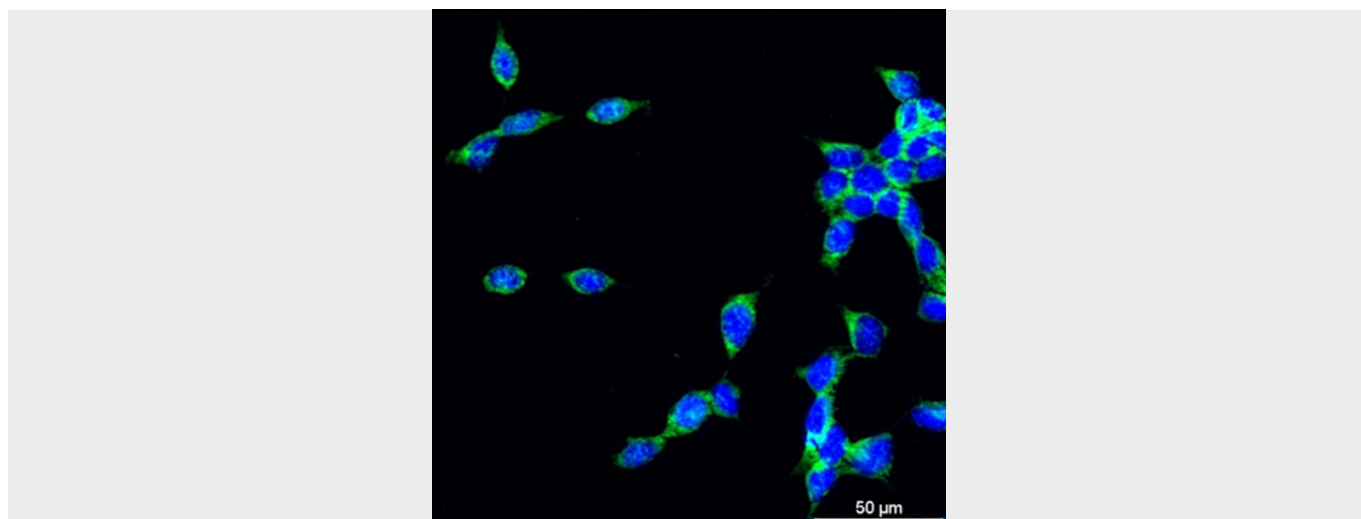
A makrofágsejtek kezelése az argináz-1 és iNOS jelölése esetén

A makrofágok M1/M2 polarizációjának vizsgálatához megmértük az argináz-1 és iNOS jelölésének intenzitását, és az argináz-1/iNOS arányt alkalmaztuk a polarizáció irányának meghatározásához. Az argináz-1 és iNOS jelölésére szánt J774A.1 makrofágsejteket a fent leírtak szerint kezeltük, a következő különbségekkel: a tirozinkezelések vége előtt a sejteket 48 órán át 400 nM/l inzulinnal kezeltük (kivéve a kontrollcsoportot). Ezenkívül 24 órával a tirozinos kezelés vége előtt minden csoportot LPS-sel (Lipopolysaccharide [LPS] Solution [500X], Invitrogen CAT-szám: 00-4976-93) kezeltünk 3 órán keresztül.

Argináz-1 és iNOS jelölésére fikoeritrin (PE) konjugált argináz-1 patkány monoklonális antitestet (AlexF5, Invitrogen CAT-szám: 12-3697-82) és Alexa Fluor™ 488 konjugált anti-iNOS patkány monoklonális antitest (Invitrogen CAT-száma: 53-5920-82) használtunk. A színegyezés miatt nem tudtuk a sejtmembránt jelölni (lásd alább az Intenzitásmérés című részt).

Intenzitásmérés

Az intenzitásmérés a korábbi tanulmányunkban¹⁸ leírt módszer szerint történt kisebb módosításokkal.



1. ábra. Sejtmembránok immunfluoreszcens festése és sejtmagok DAPI-festése J774A.1 makrofágokban

A megfestett sejtek képeit Nikon konfokális lézer pásztázó mikroszkóp rendszerrel (Nikon, Tokió, Japán) szkenneltük. Ugyanabból a kísérletből fluoreszcens képeket készítettünk azonos expozíciós beállításokkal és lézerintenzitással. A festődés intenzitásának számszerűsítésére a Nikon NIS elemsoftvert használtuk. Az érdeklődésre számot tartó régiókat (ROI) manuálisan választottuk ki, az 1. ábrán látható sejtmembránfestés segítségével (Nikon Electronic Format [NEF] 12-bit). Az argináz-1 és az iNOS jelölése esetében nem volt lehetőség a sejtmembrán festésére, ezért a mérési hiba csökkentése érdekében négyesével jelöltük ki a sejteket a ROI-k segítségével. A ROI-kat megkettőztük (a duplikált ROI területe megegyezett az eredeti ROI-val). A duplikált ROI-k a háttérre kerültek. A ROI-kon belüli területeken (eredeti és háttér) lévő képpontokat megmértük, és a háttér-ROI-kon belüli képpontokat kivontuk az eredeti ROI-k képpontjaiból. Végül a kapott intenzitásértékeket a ROI-k területével korrigáltuk. A végső intenzitásértékeket tetszőleges egységekben (a.u.) fejeztük ki.

A HEK-sejtek tirozinfelvétele

A kísérlet előtt a sejteket egy éjszakán át szérummentes tápközegben inkubáltuk. A kontrollvizsgálathoz az eredeti szérummentes tápközeget (DMEM, Sigma Aldrich CAT-szám: D6046) használtuk. A Tyr-felvétel vizsgálatához para-, meta- és orto-Tyr-t adtunk a tápközeghez oly módon, hogy az egyenlő mennyiségben tartalmazza a három Tyr-izomert. A HEK-sejteket a három Tyr-izomert azonos mennyiségben tartalmazó tápközegben inkubáltuk 0, 10, 20, 30, 40, 50 és 60 percig. Az inkubációs periódus végén a sejteket kétszer mostuk jéghideg PBS-sel, majd 80 µl/lemez lízispuffer hozzáadása után mechanikusan felkapartuk. A lízispuffer a következőket tartalmazta: 1 M/l nátrium-klorid (NaCl), 50 mM/l Trisbase, pH 7,4, 1% Triton X, 0,5% nátrium-dezoxikolát (SOD), 0,1% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 5 mg/ml fenilmetil-szulfonil-fluorid (PMSF), 1. és 2. foszfatazinhibitor-koktél (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország, CAT-szám: P5726 és P2850), proteázinhibitor-koktél (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország, CAT-szám: P8340).

A tirozin-izoformák HPLC-mérését a korábbi tanulmányunkban¹⁰ leírt módszer kisebb módosításával végeztük. A Tyr-tartalom HPLC-analízise során mind a nem

fehérjéhez kötött intracelluláris Tyr összkoncentrációját, mind a fehérjéhez kötött Tyr tartalmát mértük. A nem fehérjéhez kötött teljes intracelluláris Tyr-koncentráció mérésére 200 µl desztillált vizet adtunk a mintákhoz, és egy éjszakán át -70 °C-on tároltuk a megfelelő sejtlízis elérése érdekében. Felolvasztás után a mintákat 15 000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk 15 percig. A felülúszóból 200 µl-t vettünk, és 200 µl 60%-os triklórecetsavval összekevertük. A mintákat jégen inkubáltuk 30 percig, majd centrifugáltuk 15 000 fordulat/perc sebességgel 15 percig. Centrifugálás után a leszűrt és ötszörösre hígított felülúszóból 40 µl-t 160 µl desztillált vízzel elkevertünk, majd a HPLC-oszlopra fecskendeztük.

A teljes fehérjéhez kötött celluláris Tyr mennyiségének mérésére 200 µl desztillált vizet adtunk a mintákhoz, és egy éjszakán át -70 °C-on fagyasztva lizáltuk. Felolvasztás után a mintákat 4000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, és 200 µl felülúszót 200 µl 60%-os triklórecetsavhoz adtunk, ezt követően jégen 30 percig inkubáltuk. A következő centrifugálást 4000 fordulat/perc sebességgel hajtottuk végre 10 percig, és az üledéket 1%-os triklórecetsavban és 4 µl 400 mmol/l dezferrioxaminban szuszpendáltuk. A mintákhoz 40 µl 500 mmol/l butilezett hidroxitoluolt adtunk, hogy elkerüljük a szabad gyökök képződését a hidrolízis során. A következő lépésben a fehérjét 120 °C-on egy éjszakán át hidrolizáltuk 200 µl 6 N sósav hozzáadása után. A hidrolizátumot 0,2 µm-es szűrőn (Millipore Co., Billerica, MA, USA) átszűrtük, és a szűrletből 20 µl-t injektáltunk a Shimadzu Class LC-10 ADVP HPLC-rendszer (Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA) HPLC-oszlopára. Az injektáláshoz Rheodyne kézi injektort használtunk.

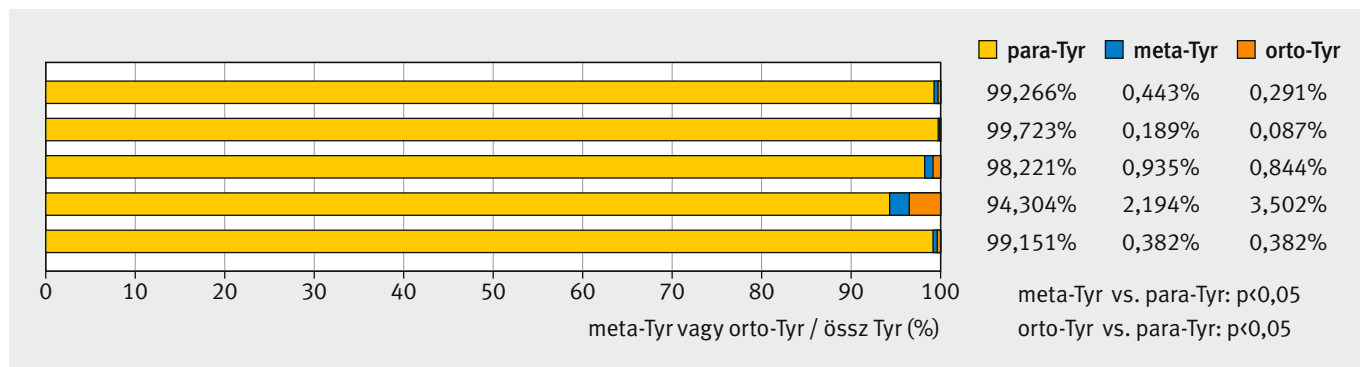
Nem volt szükség származékképzésre vagy jelölésre, mivel a para-, meta- és orto-Tyr mennyiségét autofluoreszcenciájuk mérésével határoztuk meg. Az általunk használt Shimadzu Class 10 HPLC rendszer RF-10 AXL fluoreszcens detektorral volt felszerelve (Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA). Mozgófázisként 1%-os nátrium-acetátot és 1%-os vízben oldott ecetsavat használtunk. Az elválasztásokat LiChro-CHART 250-4 oszlopon (Merck KGaA, Darmstadt 64271, Németország) végeztük izokratikus futtatással. A para-, meta- és orto-Tyr-t 275 nm-es gerjesztési hullámhosszon és 305 nm-es emissziós hullámhosszon mértük. Az aminosavak pontos

koncentrációját a görbe alatti terület (AUC) és a külső standard kalibráció alapján határoztuk meg.

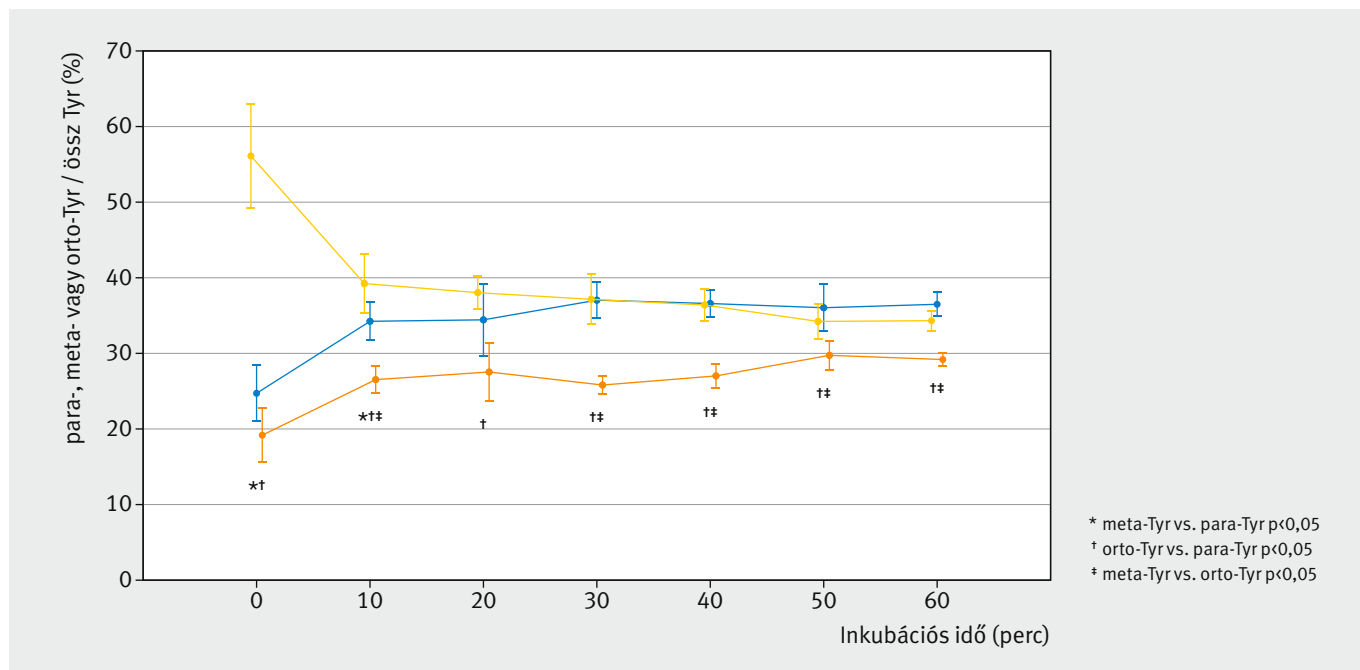
Statistikai elemzések

A változók eloszlását Shapiro-Wilk-tesztel ellenőriztük. A normál eloszlású változók közötti különbséget

varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltuk. A nem normál eloszlású változók esetében a Kruskal-Wallis-tesztet és a Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk. Az adatok trendjeinek tesztelésére a Mann-Kendall-trendtesztet használtuk. A 0,05-nél kisebb p-értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. Az adatok elemzése a Paleontological Statistics (PAST) szoftver 3.21-es verziójával történt.



2. ábra. Tyr-izomerek aránya HEK-sejtekben kontroll táptalajon (n=5/csoport)



3. ábra. A különböző tirozinizomerek mennyisége a sejtekben a különböző Tyr-izomert tartalmazó tápközegen, különböző inkubációs idők után (n=6/csoport)

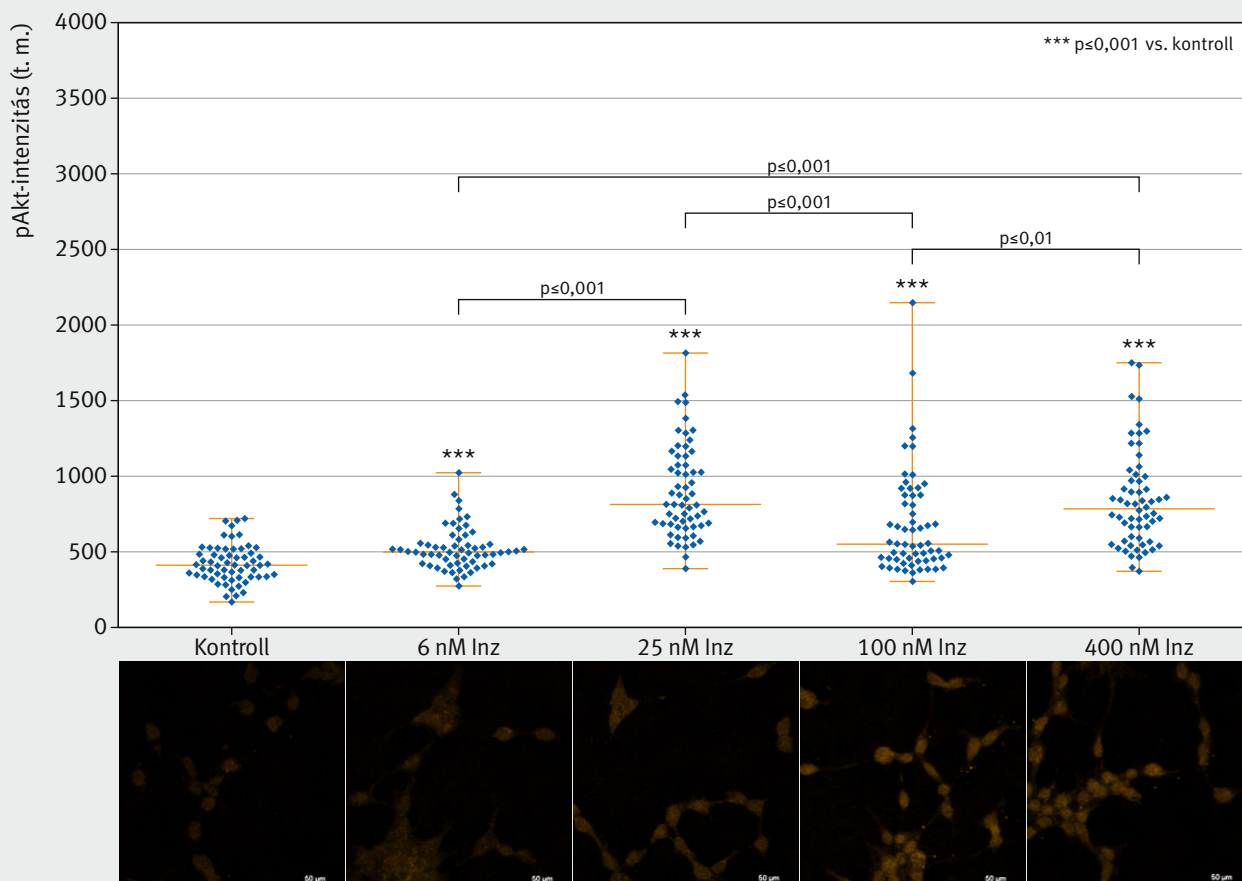
EREDMÉNYEK

A Tyr-felvétel vizsgálata

A kontrollcsoportban a HEK-sejtek elenyésző százalékban tartalmaztak meta- és orto-Tyr-izomereket a fiziológias para-Tyr-izomerhez képest (2. ábra). A három Tyr-izomert egyenlő mennyiségben tartalmazó tápközegben már 20 percnél rövidebb inkubáció után kiegyenlítődés indult meg a HEK-sejtekben, bár az orto-Tyr szignifikánsan alacsonyabb maradt, mint a para-Tyr és a meta-Tyr mennyisége 60 perc inkubáció után (3. ábra).

A para-Tyr-kezelés

A kontrollhoz képest az inzulin koncentrációfüggő módon növelte a pAkt intenzitását (4. ábra). A kontrollhoz képest az inzulin 6 nM-os koncentrációja szignifikánsan megnövelte a pAkt mennyiségét (4. ábra). A 25 nM-os inzulin a pAkt-jelölés intenzitását is növelte a kontrollhoz képest (4. ábra). A pAkt mennyisége még 100 nM-os inzulinkoncentrációnál is nagyobb volt, mint a kontrollé (4. ábra). A 400 nM-os inzulinkoncentráció magasabb pAkt-szintet eredményezett a J774A.1 makrofágokban a kontrollhoz képest (4. ábra).



4. ábra. Az inzulinkezelés hatása a pAkt-szintre para-tirozinban (para-Tyr) tenyésztett J774A.1 makrofágokban; a pAkt immunfluoreszcens festése és a mért festődési intenzitási értékei J774A.1 makrofágokban (n=60/csoport)

A pAkt mennyisége magasabb volt 25 nM inzulinkezelés mellett, mint a 6 nM-os és a 100 nM-os dózis esetében (4. ábra).

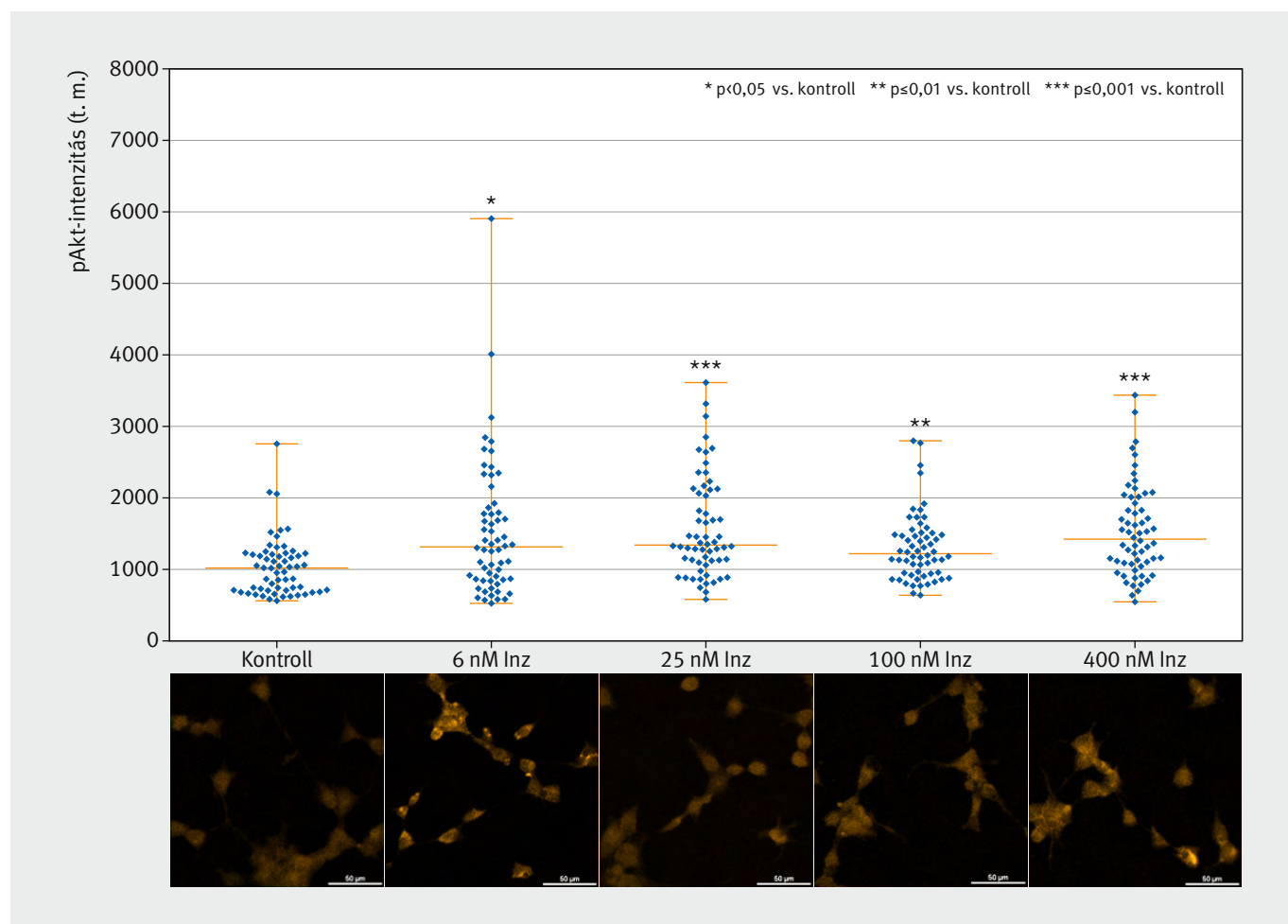
A 400 nM-os inzulindózis nagyobb növekedést eredményezett a pAkt-jelölési intenzitásban, mint a 6 nM-os és a 100 nM-os koncentráció (4. ábra).

A magas glükóztartalmú (para25-Tyr) kezelés

A para25-Tyr csoportban az inzulin minden koncentrációban növelte a pAkt mennyiségét a J774A.1 makrofágokban, azonban ez a pAkt-növekedés nem volt

koncentrációfüggő (5. ábra). A kontrollhoz képest az inzulin 6 nM-os koncentrációja szignifikánsan megnövelte a pAkt mennyiségét (5. ábra). A 25 nM-os inzulin a pAkt-jelölés intenzitását is növelte a kontrollhoz képest (5. ábra). A pAkt mennyisége még 100 nM-os inzulinkoncentrációnál is nagyobb volt, mint a kontrollé (5. ábra). A 400 nM-os inzulinkoncentráció is magasabb pAkt-szintet eredményezett a makrofágokban a kontrollhoz képest (5. ábra).

Nem volt azonban szignifikáns különbség a 6 nM-os, 25 nM-os, 100 nM-os és 400 nM-os inzulinkoncentrációk hatása között magas glükózkezelés esetén (5. ábra).



5. ábra. Az inzulinkezelés hatása a pAkt-szintekre para-tirozinban tenyésztett J774A.1 makrofágokban 25 mmol/l glükózt tartalmazó tápközegben (para25-Tyr csoport); a pAkt immunfluoreszcens festése és a mért festődési intenzitási értékei J774A.1 makrofágokban (n=60/csoport)

A meta-Tyr-kezelés

Az inzulin nem növelte, hanem váratlanul csökkentette a pAkt mennyiségét a kontrollhoz képest (6. ábra). Az inzulin 6, 25 és 400 nM-os koncentrációban csökkentette a pAkt-jelölés intenzitását a kontrollhoz képest (6. ábra).

A 6, 25 és 400 nM-os koncentrációjú inzulin mellett a pAkt mennyisége alacsonyabb volt a 100 nM-os inzulin-kezeléshez képest (6. ábra).

Az orto-Tyr-kezelés

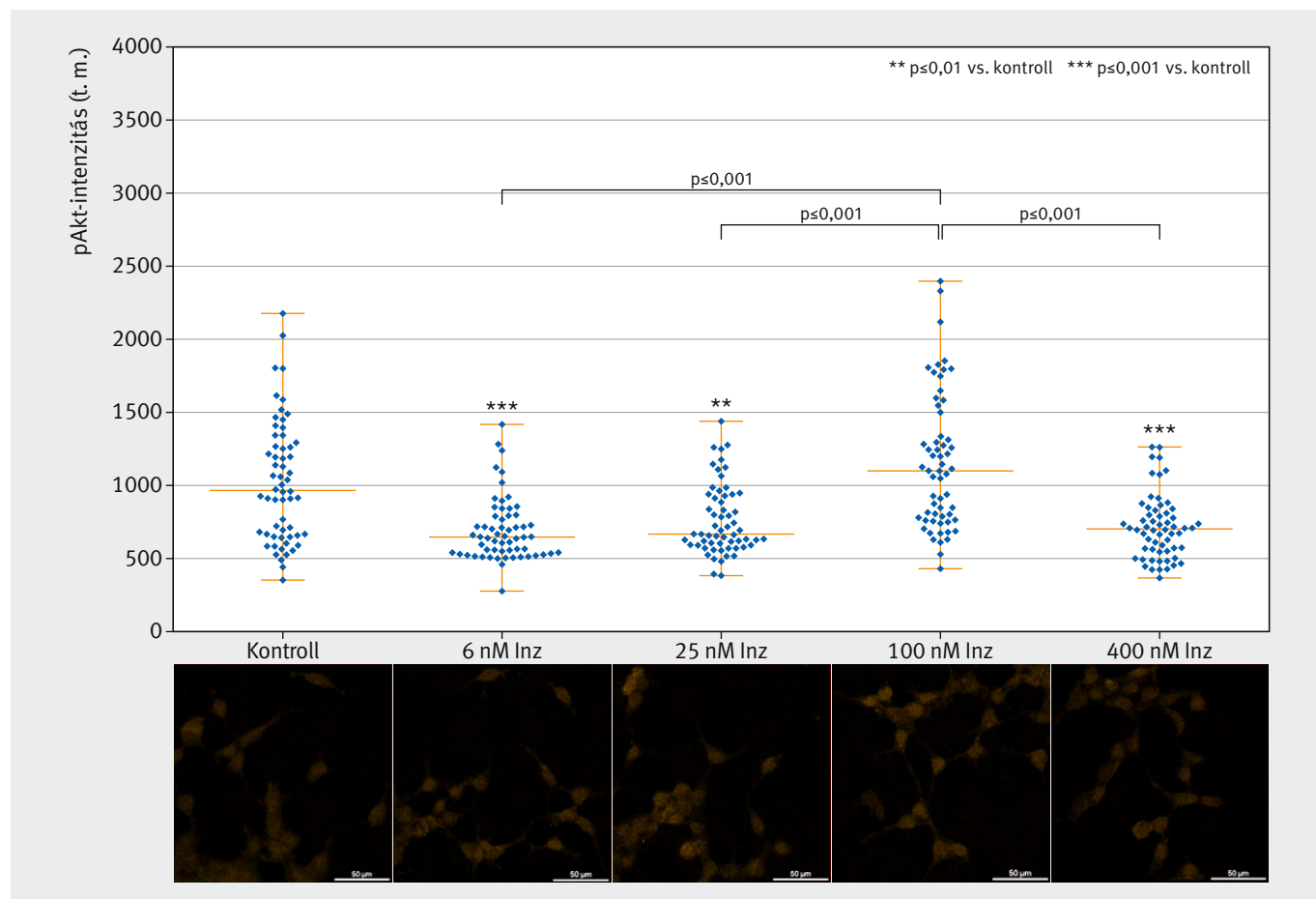
Az inzulin hatására a pAkt növekedése helyett annak tendenciaszerű csökkenését figyeltünk meg

(Mann-Kendall-trendteszt, $p < 0,05$). Ez a csökkenés szignifikáns volt a kontrollhoz képest 400 nM-os inzulinkoncentráció mellett (7. ábra).

A 100 és 400 nM-os inzulin csökkentette a pAkt-ot a 6 nM-os inzulinkoncentrációhoz képest (7. ábra).

Az inzulinnal nem kezelt kontrollok összehasonlítása

Az inzulinnal nem kezelt kontrollokban a para25-, meta- és orto-Tyr csoport magasabb pAkt-szintet mutatott, mint a para-Tyr csoport (8. ábra).



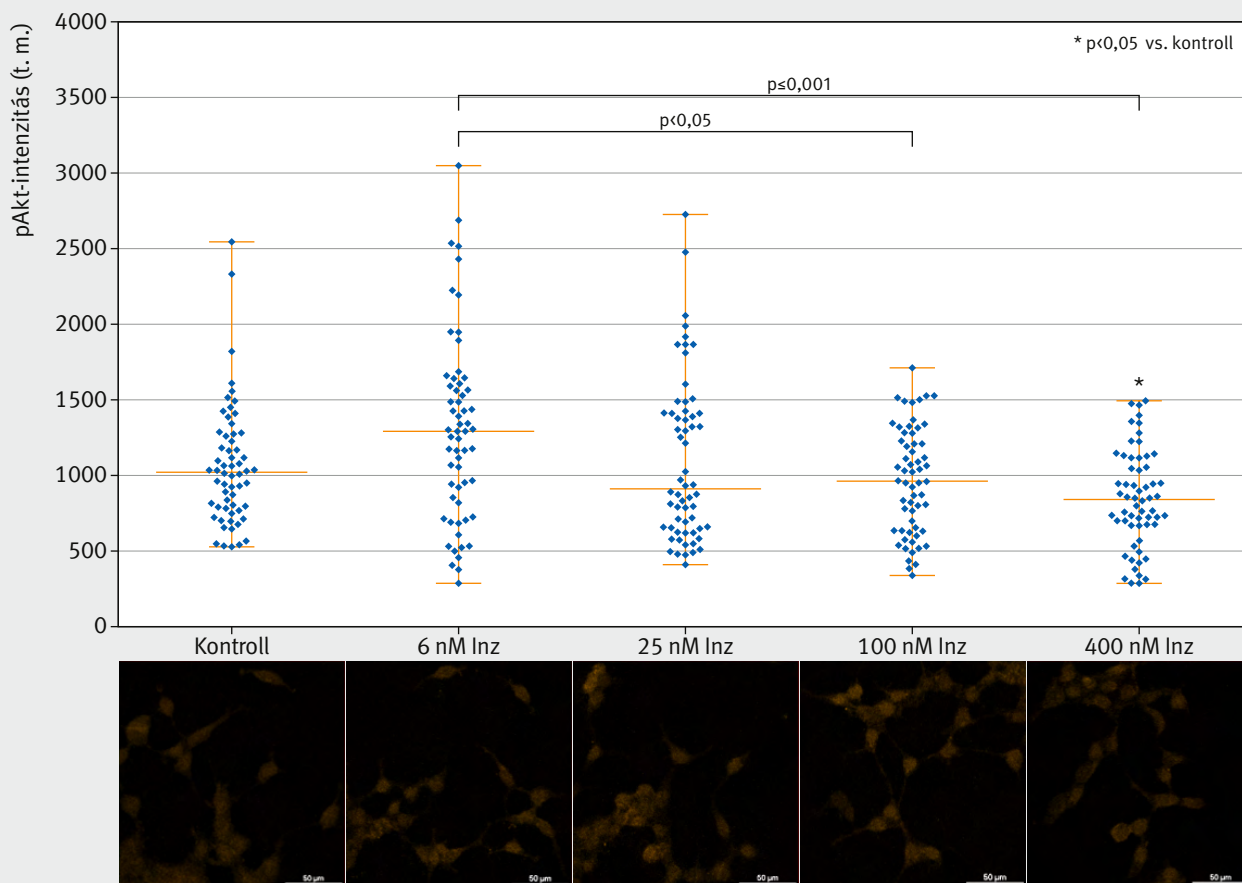
6. ábra. Az inzulinkezelés hatása a pAkt-szintre meta-tirozinban (meta-Tyr) tenyésztett J774A.1 makrofágokban; a pAkt immunfluoreszcens festése és a mért festődési intenzitási értékei J774A.1 makrofágokban (n=60/csoport)

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

A para25-, meta- és orto-Tyr-kezelés csökkenti az argináz-1/iNOS arányt a para-kontrollcsoportéhoz képest (9. ábra). A para-tirozin-kezelés esetén az inzulin csökkentette az argináz-1/iNOS arányt a kontrollcsoportéhoz képest, míg a magas glükóz és az orto-Tyr-kezelés esetén az inzulin elvesztette hatását (9. ábra). A meta-tirozin-kezelés megfordította az inzulin hatását, így itt az inzulin növelte az argináz-1/iNOS arányt (9. ábra).

MEGBESZÉLÉS

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a tenyésztett sejtek a fiziológiás para-Tyr-hez hasonló mennyiségben képesek a meta- és orto-Tyr-izomerek felvételére. A kóros tirozin-izomerek a magas glükózhoz (para25-Tyr) hasonlóan növelték a pAkt-szintet és csökkentették az argináz-1/iNOS arányt a nem inzulinkezelt makrofágsejtekben, inzulinkezelés esetén viszont megszüntették vagy megfordították az inzulin pAkt-ot növelő és az argináz-1/iNOS arányt csökkentő hatását makrofágokban. Mivel az M1 típusú makrofágok egy nitrogén-monoxid-szintáz enzimet



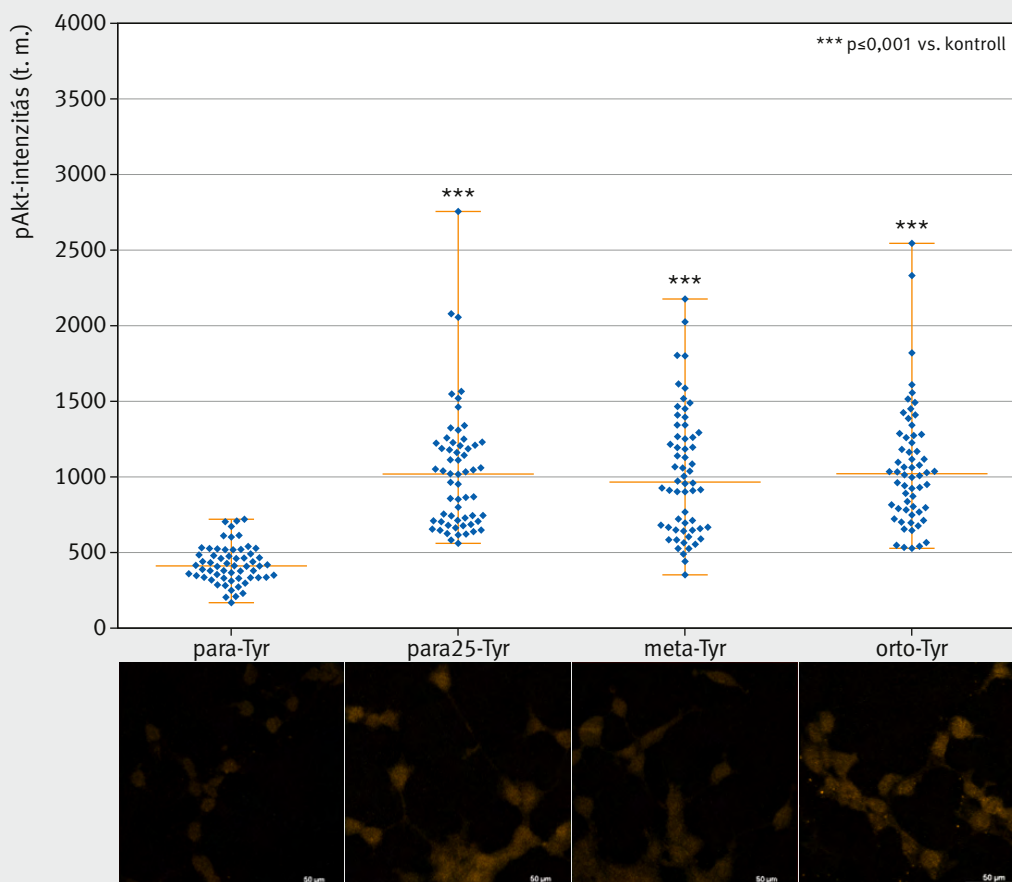
7. ábra. Az inzulinkezelés hatása a pAkt-szintekre orto-tirozint (orto-Tyr) tartalmazó tápközegben tenyésztett J774A.1 makrofágokban; a pAkt immunfluoreszcens festése és a mért festődési intenzitási értékei J774A.1 makrofágokban (n=60/csoport)

expresszálnak, amely az arginint nitrogén-monoxidá (NO) és citrullinná metabolizálja, míg az M2 típusú makrofágokra az arginin argináz-1 általi metabolizmusa jellemző,⁶ ezért az argináz-1/iNOS arány jó indikátora a makrofágok polarizációs irányának. Ebből arra következtethetünk, hogy az inzulin lipopoliszacharid jelenlétében (l. metodika) a makrofágok M1 irányú polarizációját segíti elő, amit a nem fiziológiás tirozinok képesek megszüntetni, sőt megfordítani.

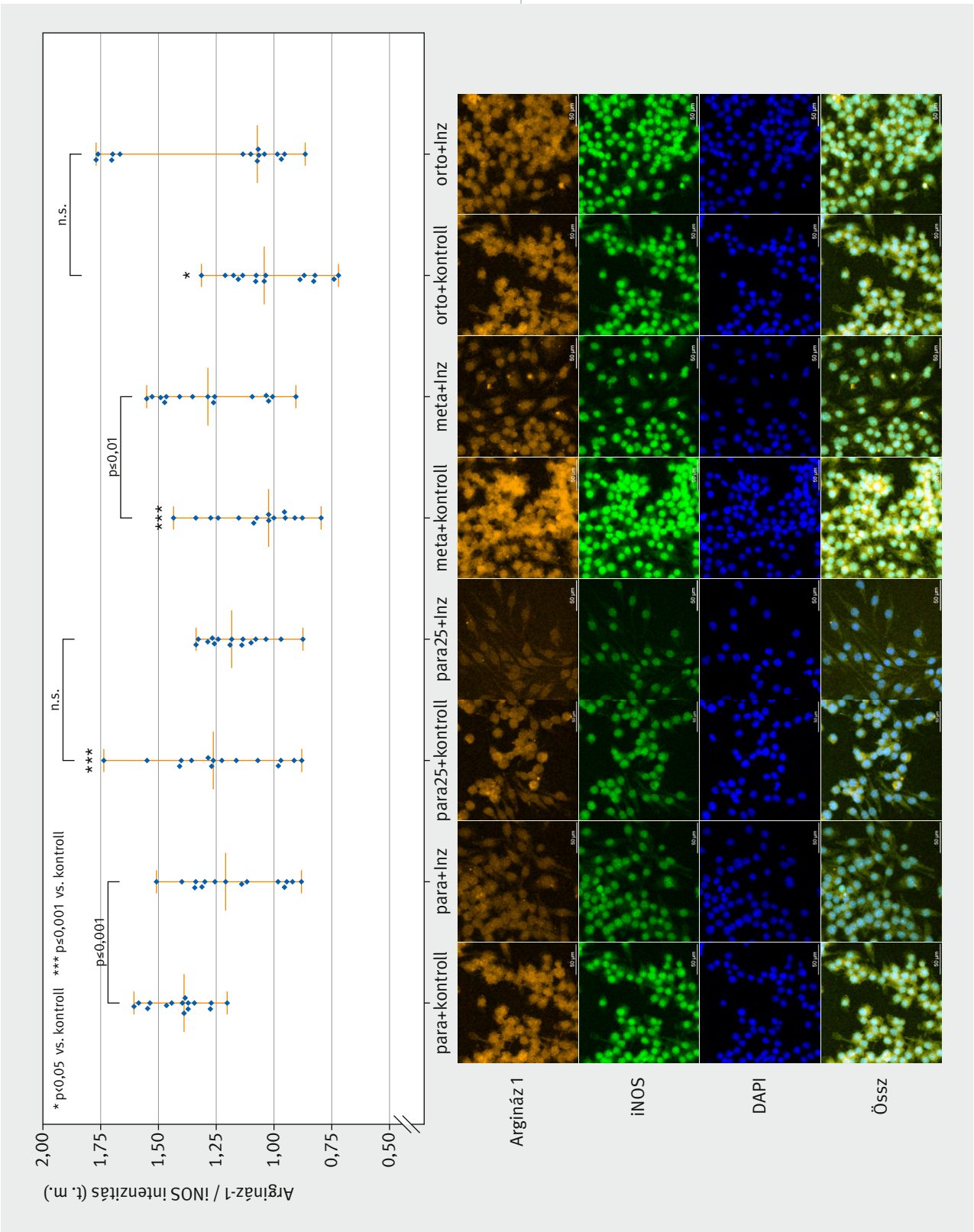
A HEK-sejtek Tyr-felvételét vizsgáló eredményeink azt mutatják, hogy a sejtek felvették a nem fiziológiás Tyr-izomereket, és a három izomer mennyisége kiegyenlítődtött a sejtekben. Huang és munkatársai azt találták, hogy

a 3,4-dihidroxi-fenilalanin és a dopakinon tartósan beépül a fehérjék foszforilációs helyeire.³⁰ A fentiekből az következik, hogy a hidroxil szabad gyökök által módosított tirozinok beépülnek a fehérjékbe és peptidekbe, ezáltal megváltoztathatják a fehérjék szerkezetét és funkcióját.^{30,31}

A hiperglikémiának oxidatív stresszt indukáló hatása is van, ami szerepet játszhat a cukorbetegség inzulinrezisztenciájának és szövődményeinek kialakulásában.^{10,18,29} Az oxidatív stressz hatására megnő a hidroxil szabad gyökök mennyisége, ami a Phe-ből nem enzimatis módon keletkező meta- és orto-Tyr-termékek mennyiségének növekedéséhez vezet.¹⁰



8. ábra. A pAkt jelölési intenzitásának összehasonlítása a para-, para25-, meta- és orto-Tyr csoport inzulinval nem kezelt kontrolljai között; a pAkt immunfluoreszcens festése és a mért festődési intenzitási értékei J774A.1 makrofágokban (n=60/csoport)



9. ábra. Immunfluoreszcencia és DAPI-festés, a para-, para25-, meta- és orto-Tyr-kezelés hatása az argináz-1/iNOS arányra önmagában és inzulinnal J774A.1 makrofágokban (n=15/csoport)

Néhány tanulmányban kimutatták, hogy az oxidatív stressz csökkenti a pAkt foszforilációját például az uterus- és a mezangiális sejtekben,^{32,33} míg más tanulmányok azt mutatták, hogy az oxidatív stressz növeli a pAkt-ot az alveoláris és a humán THP1-makrofágokban.^{34,35,36} Tudomásunk szerint azonban tanulmányunk az első, amely bizonyítja, hogy az oxidatív stressz hatására megemelkedett mennyiségben létrejövő meta- és orto-Tyr az inzulinhatástól függetlenül növeli a pAkt-ot a makrofágokban. Vizsgálataink azt mutatják, hogy a nem fiziológiás tirozinizomerek önmagukban növelik a pAkt mennyiségét és képesek megfordítani az inzulin pAkt-növelő hatását a makrofágokban.

Munkánkban a nem fiziológiás tirozinok által kiváltott inzulinrezisztencia hatását vizsgáltuk a makrofágok polarizációjára. Számos tanulmány foglalkozott a makrofágpolarizáció szerepével a gyulladás és az inzulinrezisztencia kialakulásában, de kevesebb figyelmet fordítottak az inzulinrezisztencia makrofágokra gyakorolt hatására. Megfigyelték, hogy a cukorbetegség fogékonyabbak a különféle fertőzésekre, mint például az alsó légúti fertőzésekre, a tüdőtuberkulózisra és tüdőgyulladásra, húgyúti fertőzésekre, valamint a bőr- és lágyrészfertőzésekre.²⁰

Panda és munkatársai a makrofágok effektor funkcióit vizsgálták nem kontrollált DM-es betegekben, akiknél tuberkulózisfertőzést állapítottak meg. Munkájuk során a következő csoportokat hozták létre: egészséges kontrollcsoport, nem kontrollált DM-csoport, nem DM-es, tuberkulózisfertőzéssel diagnosztizált (TB) csoport, illetve TB+DM csoport. Vizsgálatuk során többek között

a makrofágok csökkent fagocitáló kapacitását, csökkent NO-szintet (ami csökkent iNOS-aktivációt jelez) és megnövekedett CD206-szintet (M2-makrofág-marker) találtak a makrofágokban diabéteszes körülmények között.³⁷

Ieronymaki és munkatársai az inzulinrezisztencia hatását vizsgálták a makrofágok polarizációjára, sejtenyészetben és in vivo, diéta által kiváltott glükózintolerancia egérmodelljében. Eredményeik azt mutatták, hogy az inzulinrezisztens makrofágok M2-szerű fenotípussal rendelkeznek, és az inzulinrezisztens makrofágokat hordozó egerek csökkent szepszis indukálta tüdőkárosodást mutattak a polimikrobiális szepszis modelljében.³⁸

Vizsgálatunkban fiziológiás para-Tyr jelenlétében a várakozásoknak megfelelően az inzulin növelte a pAkt mennyiségét és csökkentette az argináz-1/iNOS arányt, ami M1-polarizációra utal. A nem fiziológiás meta- és orto-Tyr növelte a bazális pAkt-szintet és csökkentette az argináz-1/iNOS arányt inzulinkezelés nélküli makrofágokban, hasonlóan a magas glükózos kezeléshez. A meta- és orto-Tyr megfordította az inzulin pAkt-ot növelő hatását. A magas glükóz és az orto-Tyr megszüntette az inzulin argináz-1/iNOS arányra gyakorolt csökkentő hatását. Ráadásul a meta-Tyr esetében az inzulin hatása megfordult, és növelte az argináz-1/iNOS arányt.

A pAkt és az argináz-1/iNOS arány mérési eredményei szignifikáns koherenciát mutatnak, ami arra utal, hogy a nem fiziológiás tirozinizomerek növelik a pAkt-szintet és megfordítják az inzulin pAkt-ra gyakorolt hatását a makrofágokban, ami befolyásolja a makrofágok M1/M2 polarizációját.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

IL: interleukin; **iNOS:** indukálható nitrogén-oxid-szintetáz; **IR:** inzulinrezisztencia; **IRS:** inzulinreceptor-szubsztrát; **Phe:** fenilalanin; **PI3K:** foszfoinozitol-3-kináz (phosphoinositide 3-kinase); **ROI:** vizsgált terület (region of interest); **T2DM:** 2-es típusú diabetes mellitus (type 2 diabetes mellitus); **TNF:** tumornekrózis-faktor; **Tyr:** tirozin (tyrosine); **WAT:** fehér zsírszövet (white adipose tissue)

IRODALOMJEGYZÉK

1. Mastrototaro L, Roden M: Insulin resistance and insulin sensitizing agents. *Metabolism* 2021; 125: 154892. doi:10.1016/j.metabol.2021.154892
2. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, et al.: Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol* 2016; 7: 30. doi:10.3389/fendo.2016.00030
3. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al.: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1821-1830. doi:10.1172/JCI200319451

4. Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1796-1808. doi:10.1172/JCI200319246
5. Yunna C, Mengru H, Lei W, et al.: Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol* 2020; 877: 173090. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090
6. Rath M, Müller I, Kropf P, et al.: Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol* 2014; 5: 532. doi:10.3389/fimmu.2014.00532
7. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al.: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25(12): 677-686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
8. Röszer T: Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 816460. doi:10.1155/2015/816460
9. Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, et al.: Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc* 2019; 70(6). doi:10.26402/jpp.2019.6.01
10. Mohás-Cseh J, Molnár GA, Pap M, et al.: Incorporation of oxidized phenylalanine derivatives into insulin signaling relevant proteins may link oxidative stress to signaling conditions underlying chronic insulin resistance. *Biomedicines* 2022; 10(5): 975. doi:10.3390/biomedicines10050975
11. Wittmann I: The common single cause of chronic multi-hormonal resistance in oxidative stress. *Antioxid Basel Switz* 2022; 12(1): 75. doi:10.3390/antiox12010075
12. Ipson BR, Fisher AL: 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
13. Duke SO: The emergence of grass root chemical ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(43): 16729-16730. doi:10.1073/pnas.0707837104
14. Ruggiero RA, Bruzzo J, Chiarella P, et al.: Tyrosine isomers mediate the classical phenomenon of concomitant tumor resistance. *Cancer Res* 2011; 71(22): 7113-7124. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0581
15. Mikolász E, Kun S, Laczy B, et al.: Incorporation of ortho- and meta-tyrosine into cellular proteins leads to erythropoietin-resistance in an erythroid cell line. *Kidney Blood Press Res* 2013; 38 (2-3): 217-225. doi:10.1159/000355770
16. Tyminski M, Ciacka K, Staszek P, et al.: Toxicity of meta-tyrosine. *Plants Basel Switz* 2021; 10(12): 2800. doi:10.3390/plants10122800
17. Molnár GA, Wagner Z, Markó L, et al.: Urinary ortho-tyrosine excretion in diabetes mellitus and renal failure: evidence for hydroxyl radical production. *Kidney Int* 2005; 68(5): 2281-2287. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00687.x
18. Csurgók R, Sütő G, Wittmann I, et al.: Expression of Wilms' tumor 1 Antigen, vimentin, and corticotropin-releasing factor in the human kidney with focal segmental glomerulosclerosis and effect of oxidative stress on these markers in HEK 293 cells. *Kidney Blood Press Res* 2023; 48: 56-65. doi:10.1159/000528727
19. Chang PY, Wang II, Chiang CE, et al.: Vascular complications of diabetes: natural history and corresponding risks of dementia in a national cohort of adults with diabetes. *Acta Diabetol* 2021; 58(7): 859-867. doi:10.1007/s00592-021-01685-y
20. Berbudi A, Rahmadika N, Tjahjadi AI, et al.: Type 2 diabetes and its impact on the immune system. *Curr Diabetes Rev* 2020; 16(5): 442-449. doi:10.2174/1573399815666191024085838
21. Tangvarasittichai S: Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2015; 6(3): 456-480. doi:10.4239/wjdv.6.i3.456
22. Ziolkowska S, Binienda A, Jablowski M, et al.: The interplay between insulin resistance, inflammation, oxidative stress, base excision repair and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 2021; 22(20): 11128. doi:10.3390/ijms222011128
23. Donath MY, Shoelson SE: Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(2): 98-107. doi:10.1038/nri2925
24. Daryabor G, Kabelitz D, Kalantar K: An update on immune dysregulation in obesity-related insulin resistance. *Scand J Immunol* 2019; 89(4): e12747. doi:10.1111/sji.12747
25. Androurlidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, et al.: The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* 2009; 31(2): 220-231. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.024
26. Püschel GP, Klauder J, Henkel J: Macrophages, low-grade inflammation, insulin resistance and hyperinsulinemia: A mutual ambiguous relationship in the development of metabolic diseases. *J Clin Med* 2022; 11(15): 4358. doi:10.3390/jcm11154358
27. Su D, Coudriet GM, Hyun Kim D, et al.: FoxO1 links insulin resistance to proinflammatory cytokine IL-1 β production in macrophages. *Diabetes* 2009; 58(11): 2624-2633. doi:10.2337/db09-0232
28. Acosta-Martinez M, Cabail MZ: The PI3K/Akt pathway in meta-inflammation. *Int J Mol Sci* 2022; 23(23): 15330. doi:10.3390/ijms232315330
29. Molgaard S, Ulrichsen M, Olsen D: Detection of phosphorylated Akt and MAPK in cell culture assays. *MethodsX* 2016; 3: 386-398. doi:10.1016/j.mex.2016.04.009
30. Huang SM, Wu CS, Chiu MH, et al.: High glucose environment induces M1 macrophage polarization that impairs keratinocyte migration via TNF- α : An important mechanism to delay the diabetic wound healing. *J Dermatol Sci* 2019; 96(3): 159-167. doi:10.1016/j.jdermsci.2019.11.004
31. Boscá L, González-Ramos S, Prieto P, et al.: Metabolic signatures linked to macrophage polarization: from glucose metabolism to oxidative phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 2015; 43(4): 740-744. doi:10.1042/BST20150107
32. 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(6): e0266961. doi:10.1371/journal.pone.0266961
33. Liu H, Chen W, Lu P, et al.: Ginsenoside Rg1 attenuates the inflammation and oxidative stress induced by diabetic nephropathy through regulating the PI3K/AKT/FOXO3 pathway. *Ann Transl Med* 2021; 9(24): 1789. doi:10.21037/atm-21-6234
34. Pei C, Wang F, Huang D, et al.: 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
35. Zheng H, Cui D, Quan X, et al.: 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(4): 1017-1023. doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.022
36. Huang J, Nong X, Chen Y, et al.: 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(1): 114-126. doi:10.1111/cbdd.13856
37. Panda S, Seelan DM, Faisal S, et al.: Chronic hyperglycemia drives alterations in macrophage effector function in pulmonary tuberculosis. *Eur J Immunol* 2022; 52(10): 1595-1609. doi:10.1002/eji.202249839
38. Ieronymaki E, Theodorakis EM, Lyroni K, et al.: Insulin resistance in macrophages alters their metabolism and promotes an M2-like phenotype. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2019; 202(6): 1786-1797. doi:10.4049/jimmunol.1800065