

Somogy Megyei Kaposi Mór Oktató Kórház, Szülészeti-Nőgyógyászati Osztály, Kaposvár,¹ Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, II. Belgyógyászati Klinika és Nephrologiai, Diabetológiai Centrum, Pécs²

Tirozin-izoformák egészséges és gestatiós diabeteses anyákból származó placentákban

Tormási Imre dr.,⁽¹⁾ Kun Szilárd dr.,⁽²⁾ †Szilágyi András dr.,⁽¹⁾ Wittmann István dr.⁽²⁾

Összefoglalás

A várandósság és a szülés fokozott oxidatív stresszt jelentő állapot. Gestatiós cukorbetegséggel szövődött várandósokban az egészségeshez viszonyítva szignifikánsan magasabb az oxidatív stressz markereinek méhlepényben mért aránya, ami hozzájárulhat a placentaeredetű szövődmények és a kedvezőtlen várandóssági kimenetel kialakulásához. Egészséges és gestatiós diabeteses anyák szüléskor vett szérumból és méhlepényéből meghatároztuk a fenilalanin (Phe) és a három tirozin (Tyr)-izoforma, a meta- és orto-tirozin (m-Tyr + o-Tyr), valamint a fiziológiás para-tirozin (p-Tyr) koncentrációit és arányát. Az egészséges kismamák szérumban mért kóros izoforma, illetve a kóros/fiziológiás izoforma-arány pozitívan korrelált a vizeletben mért kóros izoformákkal és kóros/fiziológiás izoforma-hányadossal. A placentában mért kóros izoforma, vagy a kóros/fiziológiás izoforma-arány, azonban fordított arányban állt a vizeletben mért kóros izoforma, vagy a kóros/fiziológiás hányadossal. Gestatiós diabeteses anyákból származó placentákban szignifikánsan magasabb volt a kóros izoformáknak a fenilalaninhoz vagy a fiziológiás tirozin-izoformához viszonyított aránya, mint ugyanezen arányok egészséges anyák placentaiban. Gestatiós diabeteses anyák placentaiban a kóros Tyr-izoformák arányának emelkedése a méhlepényben vaszkuláris és működésbeli eltérések okozója lehet, ezáltal a gestatiós diabetes magzati szövődményeinek kockázatát növelheti.

■ **Kulcsszavak:** gestatiós diabetes, oxidatív stressz, tirozin-izoformák, placenta, várandósság

Isoforms of tyrosine in the placenta of healthy pregnant and of patients with gestational diabetes

Summary: Pregnancy and childbirth are conditions with increased oxidative stress. Pregnant women with gestational diabetes have significantly higher levels of oxidative stress markers in the placenta compared to healthy pregnant women, which may contribute to placental complications and adverse pregnancy outcomes. Concentrations and ratios of phenylalanine (Phe) and the three tyrosine (Tyr) isoforms, meta- and ortho-tyrosine (m-Tyr, o-Tyr) and the physiological para-tyrosine (p-Tyr) were determined from the serum and placental tissue of healthy and gestational diabetic mothers. The abnormal isoform and the abnormal/physiological isoform ratio in the serum of healthy pregnant women were positively correlated with the urinary isoforms and the abnormal/physiological isoform ratio. However, placental abnormal isoform or abnormal/physiological isoform ratio was inversely related to urinary pathological isoform or pathological/physiological ratio. In the placental tissue obtained from gestational diabetic mothers, the proportion of abnormal isoforms relative to phenylalanine or the physiological tyrosine isoform was significantly higher than in the placenta of healthy mothers. In

Közlésre érkezett: 2020. január 15. • Közlésre elfogadva: 2020. február 25.

A levelezésért felelős szerző: **Prof. dr. Wittmann István**

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, II. Belgyógyászati Klinika és Nephrologiai, Diabetológiai Centrum • 7624 Pécs, Pacsirta u. 1.
E-mail: istvan.wittmann@aok.pte.hu

gestational diabetic mothers, an increase in the proportion of pathologic Tyr isoforms in the placenta may result in vascular and functional abnormalities, thus increasing the risk of fetal complications of gestational diabetes.

■ **Keywords:** *gestational diabetes, oxidative stress, tyrosine isoforms, placenta, pregnancy*

DIABETOLOGIA HUNGARICA 28 (N°1) 45–49. 2020. március

DOI: 10.24121/dh.2020.5

Rövidítések:

m-Tyr: meta-Tyr; **NADPH:** nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); **o-Tyr:** orto-Tyr; **p-Tyr:** para-Tyr; **Phe:** fenilalanin (phenylalanine); **RAAS:** renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (renin-angiotensin-aldosterone system); **TCA:** triklórecetsav (trichloroacetic acid); **Tyr:** tirozin

A gestációs cukorbetegség előfordulási gyakorisága populációnként változó, a várandósságok 1,5–12,8%-ában jelentkezik, de akár a 20%-ot is elérheti. Prevalenciája emelkedőben van, ami a túlsúlyos, illetve elhízott kismamák számának emelkedésével arányos, gyakorisága az elmúlt 30 évben, etnikai csoportonként változó mértékben, 10–100%-kal nőtt.^{1,2}

A várandósság során előforduló cukorbetegség kedvezőtlenül befolyásolhatja a magzat méhen belüli fejlődését. Az első trimeszterben a spontán vetélések és súlyos kongenitális rendellenességek számának emelkedését, a második és harmadik trimeszterben a magzat túlzott növekedését, az újszülöttkori hypoglykaemia, légzészavar, sárgaság, polycythaemia és halvaszülés gyakoriságát növelheti. A 2008-ban közzétett HAPO (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes) tanulmány adatai szignifikáns emelkedést igazoltak 10 kedvezőtlen perinatalis állapot előfordulási gyakoriságában a kezeletlen gestációs diabeteses esetekben.³

A gestációs diabetes patofiziológiája összetett, az anyai inzulinrezisztencia és a méhlepény szerepe egyaránt jelentős a kialakulásában. A placenta az anyai és a magzati vérkeringés közötti szelektív gátként működik, amely kontrollálni képes az anyag- és gázcsere-folyamatokat, emellett fontos endokrin szereppel bír, valamint az anyai immuntolerancia kialakításában is nélkülözhetetlen. Helyzeténél fogva kitett a méhen belüli kedvezőtlen hatásoknak, és a várandóssági kóros állapotok során jelentkező anyai és magzati metabolikus folyamatok célpontja lehet. A méhlepény érzékeny a hyperglykaemiás környezetre, amelynek hatására szerkezeti és működésbeli változások következnek be a placenta fejlődése során.⁴

A jelenleg használt szűrési protokollok segítségével megállapított gestációs diabeteses esetekre többnyire a várandósság későbbi, 24–28. hetében derül fény. *Catalano* és munkatársai tanulmánya szerint már az első trimeszterben kimutatható az inzulinrezisztencia és a fokozott inzulinválasz a később gestációs diabetezzel diagnosztizált várandósokban.⁵ Amennyiben a cukorbetegség már a várandósság korai szakaszában kialakul, főként szerkezeti, ha később alakul ki, nagyrészt működésbeli változások mennek végbe a méhlepényben.⁶ A gestációs diabeteses (GDM) várandósságokban emelkedett placenta/magzat arány és a méhlepény szövettani szerkezetében bekövetkezett változások, mint a villusok fibrinoid nekrozisa, villuséretlenség, a villusok bőséges eretztsége (chorangiosis) és ischaemiás elváltozások egyaránt megfigyelhetők. Ezen eltérések a villusok diffúziójában és perfúziójában bekövetkezett változások által a magzat gáz- és anyagcseréjének akut és krónikus zavarát okozhatják, ezáltal a placenta a magzat védelmezője helyett a kedvezőtlen kimenetel egyik potenciális forrása lehet.⁷

A placenta szerkezetében és működésében létrejövő változásokban jelentős szerepe van az oxidatív stressz hatásának. Az oxigén szabad gyökök jelenléte a lepényi erek összehúzódását és proinflammatorikus citokinek termelődését eredményezheti. Az oxidatív stressz eredményeként létrejövő oxidációs termékek felhalmozódása a méhlepényben a membránlipidek, fehérjék és a DNS károsodását okozhatják, ezáltal gyorsítják a placenta elöregedését, a lepényi elégtelenség kialakulását.⁸

Diabetes mellitusban a magas glükózkoncentráció oxidatív stresszt hoz létre, többek között a károsodott metabolizmus, a polioliol-anyagcsereút és nem-enzimatikus glikációs reakciók révén.

Az oxidatív stressz a szabadgyök-képződés és az antioxidáns védelem közötti egyensúly felborulását jelenti.

A várandósság során az anyai petefészkek és a decidua által extrarenálisan termelt renin a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) fokozott működését okozza. Ez a szérumaldoszteron-szint folyamatos emelkedéséhez vezet, így a szérumaldoszteron-szint a harmadik trimeszterben az egészséges nem-várandósokban mért szintnek három-hatszorosát érheti el.⁹

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer számos kedvezőtlen vaszkuláris hatását az angiotenzin II és az aldoszteron által fejtí ki, a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) oxidáz enzim aktivációja révén, ami szuperoxid szabad gyökök képződését eredményezi.¹⁰

Az oxidatív stressz mértékének meghatározása több módon lehetséges. A szabad gyökök közvetlen detektálása a nagyfokú reaktivitásuk, ezáltal nagyon rövid felezési idejük miatt nehéz. A jelenlegi kutatások a szabad gyökök közvetlen meghatározása helyett a stabil, szabadgyök-reakcióban keletkezett oxidációs termékek mérésére törekednek. Korábbi tanulmányok fokozott szuperoxid-dizmutáz és glutation-peroxidáz aktivitást, valamint emelkedett 8-izoprosztán- és malondialdehid-szintet igazoltak diabeteses anyák placentájában.⁶

Az l-fenilalanin (Phe) egy esszenciális aminosav, amelyet a szervezetünk képtelen előállítani, így forrása a táplálékkal történő exogén bevitel. Emberi vesében a fiziológiás, szemi-esszenciális para-tirozin (p-Tyr) a fenilalanin-hidroxiláz enzim hatására, fenilalaninból keletkezik. Ebben a reakcióban más Tyr-izoforma nem képződik, azonban hidroxil szabad gyök hatására a Phe meta- és orto-helyzetben is hidroxilálódhat, így para-, meta- és orto-tirozin (p-, m-, o-Tyr) is képződik. A fiziológiás izoforma, a para-tirozin, az orto- és a meta-tirozin pedig a hidroxil szabad gyök jelenlétét mutató specifikus marker.¹¹

Korábbi vizsgálataink során igazoltuk a kóros tirozin-izofomák emelkedett szintjét a várandósok szérumában és a megváltozott fiziológiás/kóros izofomák arányát a várandósok vizeletében.¹²

A jelen vizsgálatunk célja egészséges és gestatiós diabeteses várandósságban az oxidatív stressz placentában jelen lévő markereinek, az orto- és meta-tirozin szintjének vizsgálata volt.

Módszerek

Vizsgálatainkban önkéntes, a bevonáskor 12–13. hetes, előzetes anamnézis alapján egészséges várandós nők vettek részt, akik a Somogy Megyei Kaposi Mór Oktatókórház Szülészeti-Nőgyógyászati Osztályán terhesgondozásban részesültek, és részletes tájékoztatást követően a vizsgálatok elvégzésébe írásbeli beleegyezésüket adták. A vizsgálatokhoz 5 egészséges és 5, a várandósság során gestatiós diabéteszrel diagnosztizált nő mintáit használtuk fel. A várandós nők klinikai jellemzői az 1. táblázatban láthatók.

A kutatómunka elvégzését a Somogy Megyei Kaposi Mór Oktatókórház Etikai Bizottsága engedélyezte.

Az oxidatív stressz markereinek meghatározásához, a méhlepény megszületését követően, a placenta centrális és széli részéről vett mintákat egészben, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtve tároltuk a további feldolgozásukig.

A szülések és a mintavételek a Somogy Megyei Kaposi Mór Oktatókórház Szülészeti-Nőgyógyászati Osztályán történtek.

Az oxidatív stressz markereinek meghatározása a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrologiai, Diabetológiai Centrum laboratóriumában történt a leépényszövet kiolvasztása és homogenizációja után, hidrogén-klorid-oldatos hidrolízist követően, reverz fázisú nagy teljesítményű folyadékromatográfia (HPLC) használatával. A vizsgálat részletei korábban közlésre kerültek.¹³

A kóros Tyr-izofomák koncentrációját a fiziológiás Phe vagy para-Tyr koncentrációjára korrigálva standardizáltuk, és az eredményeket ebben a formában adtuk meg.

A statisztikai elemzést SPSS szoftverrel (IBM SPSS Statistics, Version 22.0), Spearman- és Pearson-korreláció használatával végeztük.

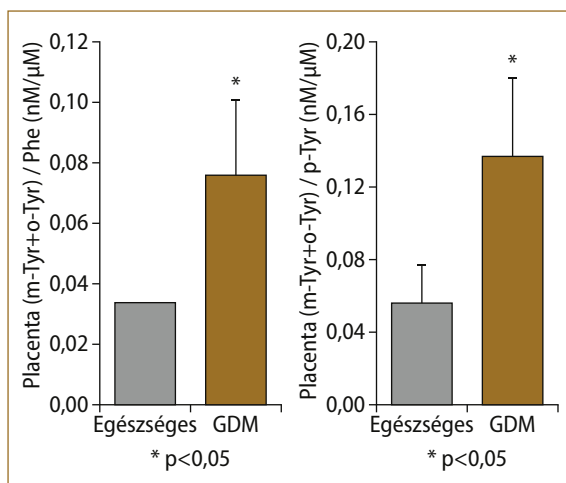
1. táblázat. A vizsgálatban részt vevő várandósok klinikai jellemzői

	Egészséges (n=5)	GDM (n=5)
Életkor	29±5 év	34±2 év
BMI a 12. gestatiós héten	21,9±0,5 kg/m ²	24,1±4,2 kg/m ²
BMI szüléskor	27,4±1,6 kg/m ²	27,8±3,7 kg/m ²
BMI növekedése szülésig	5,6±1,5 kg/m ²	3,7±0,7 kg/m ²
Éhomi vércukor	4,3±0,3 mmol/l	4,4±0,3 mmol/l
Terheléses vércukor a 120. percben	5,4±1 mmol/l	9,2±0,7 mmol/l

Eredmények

Korrelációs vizsgálat során azt találtuk, hogy az egészséges vajúdok szérumban mért kóros/fiziológiás tirozin-izoformák aránya pozitívan korrelál ugyanezen izoformák vizeletben mért arányával, tehát emelkedett szérumszintek esetén a vizelettel történő ürítés is fokozott.

Azonban a placentában mért kóros izoforma, vagy a kóros/fiziológiás izoforma-hányados fordított arányban állt a vizeletben mért kóros izoforma, vagy a kóros/fiziológiás hányadossal (2. táblázat). A tirozin-izoformák méhlepényből történő meghatározása során a gestatiós diabeteses anyák



1. ábra. A kóros tirozin-izoformák, a meta- és orto-tirozin (m-Tyr + o-Tyr) és a fenilalanin (Phe), valamint a p-tirozin (p-Tyr) aránya egészséges és gestatiós diabeteses várandósok placentájában

2. táblázat. Placenta-, szérum- és vizeletaminosav-paraméterek Spearman-korrelációja fiziológiás várandósságban és gestatiós diabetesben

Paraméter 1	Paraméter 2	r	p
Placenta m-Tyr	Vizelet-m-Tyr	-0,779	0,001
Szérum m-Tyr	Vizelet-m-Tyr	0,689	0,004
Szérum m-Tyr/Phe	Vizelet m-Tyr/Phe	0,593	0,020
Placenta m-Tyr/p-Tyr	Vizelet m-Tyr/p-Tyr	-0,536	0,040
Szérum m-Tyr/p-Tyr	Vizelet m-Tyr/p-Tyr	0,746	0,001
Szérum (m+o-Tyr)/p-Tyr	Vizelet (m+o-Tyr)/p-Tyr	*0,722	*0,004

* Pearson-korreláció

placentájában az egészséges várandósok eredményeinél szignifikánsan magasabb volt a kóros tirozin-izoformák fenilalaninhoz viszonyított aránya, illetve szintén szignifikánsan emelkedett volt a szabad gyökös reakcióban képződött izoformák és a fiziológiás para-tirozin aránya ugyanebben a csoportban (1. ábra).

Megbeszélés

Eredményeink alapján az egészséges vajúdok szérumban mért m-Tyr és m-Tyr/p-Tyr, illetve m-Tyr/Phe hányados növekedése esetén az m-Tyr vizelettel történő kiválasztása fokozott, illetve a fenti arányok a vizeletben is emelkedtek. A jelen méréseink szerint, csökkenő vizelettel történő kiválasztás mellett, a placentában, a fokozott oxidatív stressz hatására képződött, patológiás m-Tyr mennyisége és az m-Tyr+o-Tyr/p-Tyr, valamint m-Tyr+o-Tyr/Phe arány növekszik, arra utalva, hogy a kóros izomerek a placentában akkumulálódnak. Gestatiós diabeteses anyák méhlepényében az egészséges anyák placentáihoz viszonyítva szignifikáns az eltolódás a kóros és fiziológiás tirozin-izoformák arányában, fokozott a patológiás izoformák lepényi felhalmozódása. Utóbbi hozzájárulhat a méhlepény szöveti szerkezetében bekövetkező változásokhoz, vaszkuláris és működésbeli eltérések okozója lehet, ezáltal a gestatiós diabeteses magzati szövődeményeinek kockázatát növeli.

Coughlan és munkatársai egészséges és gestatiós diabeteses anyák placentáit vizsgálták. GDM-es anyák méhlepényében kétszeresnek találták a 8-izoprosztán (8-epi-prostaglandin-F2-α) szintjét, egyúttal emelkedett volt a szuperoxid-dizmutáz

és a glutation-peroxidáz aktivitása, valamint a fehérvérjék karboniltartalma is az egészséges kontrollhoz viszonyítva.¹⁴

Madazli és munkacsoportja az anyai és köldökzsinórvér malondialdehid-szintjét vizsgálta, és az eredményeket a méhlepény szövettani változásaival vetette össze. Gestatiós diabeteses anyák esetében mind az anyai, mind a köldökzsinórvérből nyert plazma-malondialdehid szintje magasabb volt a kontrollcsoportnál mért szinteknél, és ezen esetekben a placenta villusainak éretlensége, a choroangioid és az ischaemia egyaránt gyakoribb volt.⁶

Korábbi vizsgálatainkban a kóros tirozin-izoformák szérumszintjét és vizelettel történő kiválasztásukat, valamint ezeknek a paramétereknek a kinetikáját vizsgáltuk a várandósság előrehaladtával. A várandósság során 4 alkalommal vett vér- és vizeletminták elemzésekor az o-Tyr szérumszintje a terminushoz közeledve ugyan emelkedő tendenciát mutatott, azonban mindvégig jelentősen a nem-várandós kontrollcsoportban mért értékek alatt maradt. A vizelettel ürített o-Tyr

menyisége a várandósság előrehaladtával közel szignifikánsan csökkent. Az m-Tyr esetében szignifikánsan emelkedő szérumszinteket és kisebb mértékben, de a vizeletben szintén csökkenő értékeket találtunk. Az o-Tyr esetében a csökkent szérumszintek és a vizeletben történő kisebb mértékű kiválasztás miatt az izoforma szöveti felhalmozódását feltételeztük.¹²

A jelen vizsgálatunkban az irodalomban elsőként elemeztük a méhlepény szövetében akkumulálódott oxidatív stressz marker m- és o-Tyr jelenlétét. Eredményeink a korábbi feltételezéseinket igazolják, és az irodalomban közölt vizsgálatok eredményeihez hasonlóak. Az általunk vizsgált oxidatív stressz markerek aránya a korábbinál leírt, anyai vérből meghatározott más markerekkel összevethetően emelkedett a gestatiós diabeteses anyákból származó méhlepényben. Mindez segítséget nyújthat az esetlegesen felmerülő méhlepény-eredetű szövődmények okainak pontosabb tisztázásában, a gestatiós diabetes súlyosságának és a kezelés eredményességének utólagos vizsgálatában.

Irodalom

- Dall TM, Yang W, Halder P, Pang B, Massoudi M, Wintfeld N, et al.: The economic burden of elevated blood glucose levels in 2012: diagnosed and undiagnosed diabetes, gestational diabetes mellitus, and prediabetes. *Diabetes Care* 2014; 37(12): 3172-3179. DOI: 10.2337/dc14-1036
- Ferrara A: Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: a public health perspective. *Diabetes Care* 2007; 30(Suppl 2): S141-146. DOI: 10.2337/dc07-s206
- Buchanan TA, Xiang AH, Page KA: Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8(11): 639-649. DOI: 10.1038/nrendo.2012.96
- Jarmuzek P, Wielgos M, Bomba-Opon D: Placental pathologic changes in gestational diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett* 2015; 36(2): 101-105.
- Catalano PM: Trying to understand gestational diabetes. *Diabet Med* 2014; 31(3): 273-281. DOI: 10.1111/dme.12381
- Madazli R, Tuten A, Calay Z, Uzun H, Uludag S, Ocak V: The incidence of placental abnormalities, maternal and cord plasma malondialdehyde and vascular endothelial growth factor levels in women with gestational diabetes mellitus and nondiabetic controls. *Gynecol Obstet Invest* 2008; 65(4): 227-232. DOI: 10.1159/000113045
- Gabbay-Benziv R, Baschat AA: Gestational diabetes as one of the "great obstetrical syndromes" – the maternal, placental, and fetal dialog. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2015; 29(2): 150-155. DOI: 10.1016/j.bpobgyn
- Sultana Z, Maiti K, Aitken J, Morris J, Dedman L, Smith R: Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes. *Am J Reprod Immunol* 2017; 77(5). Epub 2017 Feb 27. DOI: 10.1111/ajr.12653
- Cheung KL, Lafayette RA: Renal physiology of pregnancy. *Adv Chronic Kidney Dis* 2013; 20(3): 209-214. DOI: 10.1053/j.ackd.2013.01.012
- Manrique C, Lastra G, Gardner M, Sowers JR: The renin angiotensin aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. *Med Clin North Am* 2009; 93(3): 569-582. DOI: 10.1016/j.mcna.2009.02.014
- Molnar GA, Kun S, Selley E, Kertesz M, Szelig L, Csontos C, et al.: Role of Tyrosine Isomers in Acute and Chronic Diseases Leading to Oxidative Stress – A Review. *Curr Med Chem* 2016; 23(7): 667-685. DOI: 10.2174/0929867323666160119094516
- Tormasi I, Kun S, Molnar GA, Miseta A, Szilagy A, Wittmann I: Abnormal phenylalanine-tyrosine metabolism may play a role in the decrease of haemoglobin in healthy pregnancy: a cohort study. *EJBPS* 2019; 6(13): 164-174.
- Kun S, Mikolas E, Molnar GA, Selley E, Laczy B, Csiky B, et al.: Association of plasma ortho-tyrosine/para-tyrosine ratio with responsiveness of erythropoiesis-stimulating agent in dialyzed patients. *Redox Rep* 2014; 19(5): 190-198. DOI: 10.1179/1351000214Y.0000000090
- Coughlan MT, Vervaart PP, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE: Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* 2004; 25(1): 78-84. DOI: 10.1016/S0143-4004(03)00183-8