

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Osteoprotegerint befolyásoló tényezők vizsgálata
és a D-vitamin mérések standardizációja
a HunMen tanulmányban**

Jakab Éva

Témavezető: Dr. Bhattoa Harjit Pal



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2019

Osteoprotegerint befolyásoló tényezők vizsgálata és a D-vitamin mérések standardizációja a HunMen tanulmányban

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Klinikai Orvostudományok tudományágban

Írta: Jakab Éva, okleveles klinikai laboratóriumi kutató MSc, klinikai biokémikus

Készült a Debreceni Egyetem, Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bhattoa Harjit Pal, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Simon Ágnes, PhD
Prof. Dr. Kiss Emese, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára
2019. október 22. (kedd) 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Szántó Sándor, az MTA doktora
Prof. Dr. Patócs Attila, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Szántó Sándor, az MTA doktora
Prof. Dr. Patócs Attila, az MTA doktora
Dr. Simon Ágnes, PhD
Prof. Dr. Kiss Emese, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2019. október 22. (kedd) 14:00 óra

BEVEZETÉS

Az osteoprotegerin (OPG), valamint a nukleáris faktor *kappa* B receptor aktivátor ligand (RANKL), a tumor nekrosis faktor receptor szupercsalád két tagja, elengedhetetlen a csontfelszívódás szabályozásában. Az OPG/RANKL/RANK rendszer kulcsfontosságú szabályozója az osteoclastogenesisnek és jelentős közvetítő tényező az oestradiol, testosteron, parathormon, D-vitamin és a csontforgalom között. Számos irodalmi adat számol be az OPG és RANKL vizsgálatáról egészséges férfiakban, de csak részben tisztázott a kapcsolatuk a háttérben működő befolyásoló molekuláris szereplőkkel, mint például a cystatin C csontanyagcserevel való kapcsolata. A cystatin C kis molekulatömegű (13 kDa) fehérje, cisztein proteináz inhibitor, amit minden sejtmaggal rendelkező sejt termel. Az osteoblastokban is szintetizálódik és lassítja az osteoclast képződést a praeosteoclastok differenciálódásának egy késői stádiumában. Irodalmi adatok alapján felmerült, hogy a cystatin C csontanyagcsere-szabályozásában betöltött szerepe jelentős részben tisztázásra vár.

Jelen munkánk egyik célja az OPG és szolubilis RANKL (sRANKL) kapcsolatának elemzése volt az életkorral, cystatin C-vel, csontanyagcsere biokémiai markerekkel (osteocalcin (OC), I. típusú kollagén C-terminális telopeptid (CTx), I. típusú prokollagén N-terminális propeptid (P1NP), továbbá a 25-hidroxi-D-vitaminnal (25OHD), parathormonnal (PTH), nemi hormonokkal (17 β -oestradiol és testosteron), valamint a csont ásványianyag-sűrűség mérési adataival.

Jelentős volumenű publikált vizsgálati anyag bizonyítja, hogy a D-vitamin a kalcium- és foszfát-anyagcsere, így a csontanyagcsere egyik kulcsfontosságú regulátora. A D-vitamin-hiány gyakorisága és népegészségügyi jelentősége az utóbbi évtizedekben laboratóriumi és epidemiológiai vizsgálatai alapján előtérbe került, és nyilvánvalóvá vált, hogy a csonthatásokon túl számos más betegségben (cardiovascularis kórképek, magas vérnyomás, daganatos betegségek, diabetes, sclerosis multiplex, rheumatoid arthritis, infekciók kialakulása) is jelentőséggel bírhat. Mérésének jelentőségét egyre szélesebb körben hangsúlyozzák. A D-vitamin-hiány szerepet játszik a szkeletális és az extra-szkeletális elváltozásokban, és ezekhez az elváltozásokhoz alacsony szérumszintű 25OHD koncentrációk társulnak. A D-vitamin pótlásáról szóló felmérésekben az optimális D-vitamin szint fenntartására 50 nmol/L és 100 nmol/L közötti szérumszintű 25OHD koncentrációról számolnak be, viszont időskorú egyéneknél az elesések és törések kockázatának csökkentésére a legtöbb szakmai szervezet 75 nmol/L feletti szérumszintű 25OHD koncentrációt javasol. Az extra-szkeletális egészség fenntartására az optimális szérumszintű 25OHD koncentráció 75 nmol/L feletti.

Szakmai körökben a kívánatos szérumszint 25OHD koncentrációkról jelenleg is széleskörű vita folyik, különös tekintettel a csontrendszeren túli hatások tekintetében.

A szervezet D-vitamin ellátottságát a totális 25OHD koncentráció meghatározásával állapítjuk meg. A javasolt „arany standard” módszer a folyadék kromatográfia-tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS), mégis a 25OHD értékek standardizációja állandó kihívást jelent. Jelenleg kívánatos egy nemzetközileg elfogadott standardizált, egységes, automatizálható, költséghatékony módszer. A D-vitamin Standardizációs Program (VDSP) javaslata, a már meglévő populációs minta pool-ból meghatározott számú minták újra mérése az adott laboratóriumban elérhető módszerrel, majd ezt követően megismételni a National Institute for Standards and Technology (NIST) által alkalmazott LC-MS/MS referencia módszerrel. A kapott korrekciós szorzóval az eredeti módszerrel mért 25OHD értékek egységesítése lehetővé válna. Rutin laboratóriumi gyakorlatban a 25OHD meghatározására alkalmazott módszerek közül a legelterjedtebbek az immunkémiai módszerek közül, az antitest-kötésen alapuló, továbbá specifikus fehérje-kötésen alapuló különböző jelölésű immunoassayk.

A Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS) egy nemzetközi külső minőségértékelési program, amiben több mint ezer laboratórium vesz részt, és magába foglalja a jelenleg rendelkezésre álló összes 25OHD mérési platformot. A résztvevő laboratóriumok minden DEQAS vizsgálathoz (évente négy alkalommal) öt mintát kapnak postai úton, szobahőmérsékleten. Az eredmények online küldendők vissza, és a benyújtási határidő után a jelentés a DEQAS honlapjáról letölthető. A DEQAS mintákat 2013 áprilisától a NIST is értékeli LC-MS/MS módszerrel és a kapott eredményeket a résztvevő laboratóriumok számára is rendelkezésre bocsátja, így lehetővé teszi a résztvevő laboratóriumok számára, hogy saját eredményeiket összehasonlítsák a NIST célértékével, egyúttal kiváló lehetőséget biztosítva a standardizációs törekvésre.

CÉLKITŰZÉSEK

Jelen munkánk a HunMen tanulmányra épül, amelyben debreceni lakóhelyű, 50 éves vagy idősebb, véletlenszerűen kiválasztott férfiak vettek részt 2009 szeptemberétől 2010 szeptemberéig a D-vitamin ellátottság és csontanyagcsere vizsgálatára.

Osteoprotegerint befolyásoló tényezők vizsgálata

Munkánk egyik célja volt, hogy a HunMen tanulmányban résztvevő férfi kohorszban meghatározzuk az OPG és sRANKL koncentrációkat, valamint ezen markerek kapcsolatát elemezzük az életkorral, a csontanyagcsere biokémiai markereivel, a cystatin C-vel, a nemi hormonokkal, valamint a csont ásványianyag-sűrűség mérési adataival.

Ezen vizsgálatok során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen mértékű kapcsolat van az OPG, valamint a sRANKL koncentráció és csontanyagcsere biokémiai markerei között (25OHD, PTH, OC, CTx és P1NP)?
- Az életkor mennyire befolyásolja a vizsgált paraméterek koncentrációit a vizsgált férfi kohorszban?
- Van-e összefüggés az OPG és a cystatin C, total 17β -oestradiol, valamint a total tesztoszteron között?

A 25-hidroxi-D-vitamin mérési adatok standardizációja

Több in vitro diagnosztikai eszközöket gyártó cég, kutató laboratórium, kereskedelmi laboratórium, fejlesztett ki total 25OHD eljárásokat. Ezen mérési eljárások eredményei között jelentős eltéréseket tapasztaltunk, ami felvetette a kérdést, hogy a klinikailag releváns mérési értékek esetén, mely módszer ad megbízható, pontos eredményeket. Ennek kapcsán merült fel, a különböző módszerekkel mért 25OHD értékek standardizációja, rutin diagnosztikai laboratóriumban.

Munkánk további célja a HunMen tanulmány D-vitamin mérési adatainak standardizációja volt, ami kapcsán a következő konkrét célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- A HunMen tanulmányban levő résztvevők mintáinak újra elemzése a szérum 25OHD koncentrációk meghatározásával egy időben a DEQAS minták mérésével a laboratóriumban jelenleg alkalmazott DiaSorin LIAISON[®] 25OHD total chemiluminescens immunoassay (CLIA) meghatározási módszerrel.
- A DEQAS minták (sorszám: 481-485) NIST célértékeiből és a DEQAS minták DiaSorin LIAISON[®] CLIA-val mért 25OHD koncentrációk kapcsolatából származó mesterképlet alkalmazása a korábban nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) mért HunMen 25OHD mérési adatokra.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálati személyek

A célkitűzésben megfogalmazott vizsgálatokat a HunMen tanulmányban résztvevők éhgyomri szérumból végeztük. A mintákat -70 °C-on tároltuk a feldolgozásig. A HunMen tanulmányban a résztvevők D-vitamin ellátottsága és csontanyagcseréje volt a vizsgálat tárgya. Összesen 229, véletlenszerűen kiválasztott önkéntes résztvevő került a vizsgálati személyek közé. Részletes tájékoztatást követően a tanulmány résztvevői írásos beleegyezést adtak.

Besorolási kritériumok: 50 év feletti, ambulanter, általánosan egészségesnek vélt férfiak.

Kizárási kritériumok: ismert csontanyagcsere betegség, máj - vagy vesebetegség, és a csontanyagcserét befolyásoló gyógyszeres kezelés (Ca és D-vitamin pótlás).

Részletes kórtörténet felvétele után, és egy éjszakai éhezést követően került sor a vérvételre. A vizsgálatokat natív vacutainer, elválasztó gélt tartalmazó csövekbe vett vérből, centrifugálással nyert szérumból végezték. A résztvevők mintáiból a következő laboratóriumi vizsgálatok kerültek meghatározásra: total bilirubin, aszpartát-aminotranszferáz, alanin-aminotranszferáz, gamma-glutamyl-transzpeptidáz, alkalikus foszfatáz, laktát dehidrogenáz, kolinszteráz, karbamid nitrogén, kreatinin és húgysav.

Kizárásra kerültek azok a résztvevők, akiknek vizsgálati eredményei $\geq 2 \times \text{ULN}$. Vizsgálati eredményeik alapján 23 önkéntes adatai nem kerültek be a végleges statisztikai elemzésbe.

A tanulmányt a Debreceni Egyetem Klinikai Központ etikai bizottság jóváhagyta.

Vizsgálati módszerek és paraméterek

A OPG és a sRANKL koncentrációkat ELISA (enzimmal kötött immunsorbens assay) módszerrel (Biomedica Gruppe, Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wein, Austria), Labsystem Multiscan MS készülékkel határoztuk meg. A meghatározás során, detektáljuk a monomereket, dimereket és a ligand kötött OPG-t, ami monoklonális egér anti-OPG antitestet, valamint befogó antitestként biotinnal jelölt poliklonális kecske antitestet tartalmaz. A sRANKL vizsgálat, olyan enzim-immunoassay, ami érzékeli a nem komplex, szolubilis humán RANKL-ot, ami elfogó molekulaként humán rekombináns OPG-t és a kimutatásra biotinnal jelölt poliklonális kecske antitestet használ.

A 25OHD koncentrációkat LIAISON immunkémiai automatával, 25OHD total, direkt, kompetitív chemiluminescens jelölésen alapuló DiaSorin LIAISON® CLIA módszerrel határoztuk meg (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, USA). A vizsgálat során az első inkubálás

alatt a 25OHD leválasztásra kerül a kötőfehérjéről és hozzákötődik a szilárd fázison levő specifikus antitesthez, 10 perc után hozzáadjuk az isoluminol származékkal jelölt nyomkövető 25OHD-t. A mintában lévő 25OHD verseng az isoluminol származékkal jelölt 25OHD-al az antitesthez való kötődésben. További 10 percig tartó inkubálást követően, a kötetlen anyagot egy mosási ciklus során eltávolítjuk. Az indítóreagensek hozzáadása után gyors chemiluminescens reakció indul el. A fényjelet egy fotomultiplier relatív fényegységben (RLU) méri, és ez fordítottan arányos a mintában lévő 25OHD koncentrációval.

A 17β -oestradiol, testosteron, parathormon, osteocalcin, I. típusú kollagén C-terminális telopeptid, I. típusú prokollagén amino-terminális propeptid, szexhormon kötő globulin vizsgálatokat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország), elektrochemiluminescens jelölésen alapuló immunkémiai módszerrel (ECLIA), Roche MODULAR E170-es immunkémiai analizátorral végeztük.

17β -oestradiol (E2) vizsgálat: Az Elecsys oestradiol mérési eljárás a kompetitív elvre épül, ami specifikusan 17β -oestradiol elleni poliklonális antitestet alkalmaz. A mintából a mesterolone hatására felszabadult endogén oestradiol vetélkedik a biotinilált antitesteken lévő kötőhelyekért a hozzáadott ruténium-komplexxel jelölt oestradiol származékkal.

Testosteron (T) vizsgálat: Az Elecsys testosteron mérési eljárás szintén a kompetitív elvre épül, ami specifikusan testosteron ellenes nagy affinitású monoklonális juh antitestet alkalmaz. A mintából a 2-bróm-oestradiol hatására felszabadult endogén testosteron vetélkedik a biotinilált antitesten lévő kötőhelyekért a hozzáadott ruténium-komplexxel jelölt testosteron származékkal.

Szexhormon-kötő globulin (SHBG) vizsgálat: Az Elecsys SHBG vizsgálati eljárás két, specifikusan humán SHBG elleni monoklonális antitestet alkalmaz, amelynek során az SHBG-specifikus biotinilált monoklonális antitest, valamint az SHBG-specifikus, ruténium-komplexxel jelölt monoklonális antitest reakcióba lép és egy szendvics-komplexet hoz létre.

A szabad 17β -oestradiol indexet (FEI) a teljes 17β -oestradiol SHBG-hez viszonyított arányából, a szabad testosteron indexet (FTI) a teljes testosteron SHBG-hez viszonyított arányából számítottuk.

Parathormon (PTH) vizsgálat: Az intakt PTH meghatározására alkalmazott Elecsys vizsgálat a szendvics elvre épül, amelynek során a biotinilált monoklonális antitest az N-terminális fragmentummal (1-37), míg a ruténium-komplexxel jelölt monoklonális antitest a C-terminális fragmentummal (38 - 84) lép reakcióba.

Osteocalcin (OC) vizsgálat: Az Elecsys N-MID osteocalcin eljárás két monoklonális antitestet használ, melyek specifikusan az N-MID fragmentumon és az N-terminális fragmentumon található epitópok ellen irányulnak. A vizsgálat így mind a stabil N-MID fragmentum, mind a még érintetlen osteocalcin meghatározására alkalmas. Az N-MID osteocalcin-specifikus biotinilált monoklonális antitest és a ruténium-komplexxel jelölt NMID osteocalcin-specifikus monoklonális antitest reakciója során szendvics-komplex jön létre.

I. típusú kollagén C-terminális telopeptid (CTx) vizsgálat: Az Elecsys β -CrossLaps vizsgálat specifikus az I. típusú kollagén fragmentumok keresztkötésben lévő izomerjeire (pirrol, piridinolinok). A mérés specificitását két olyan monoklonális antitest alkalmazása biztosítja, ami felismeri a lineáris β -8AA oktapeptideket (EKAHD- β -GGR). A vizsgálati eljárás a szendvics elvet alkalmazza, amelynek során a β -CrossLaps elleni biotinilált monoklonális antitestek és β -CrossLaps-specifikus, ruténium-komplexxel jelölt monoklonális antitestek lépnek reakcióba.

I. típusú prokollagén amino-terminális propeptid (PINP) vizsgálat: Az Elecsys P1NP vizsgálat a szendvics elvet alkalmazza, amelynek során a P1NP-specifikus, biotinilált monoklonális antitestek és a P1NP-specifikus, ruténium-komplexxel jelölt monoklonális antitestek lépnek reakcióba.

A cystatin C meghatározásokat részecskével erősített immuno-nefelometriás módszerrel, BN ProSpec készülékkel (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany) végeztük. A humán cystatin C-re specifikus antitestekkel bevont polistírol részecskék humán cystatin C-t tartalmazó mintával elkeverve aggregálódnak. A nefelométer által mért szórt fény intenzitása arányos a mintában lévő cystatin C koncentrációjával. A minta cystatin C koncentrációjának meghatározása ismert koncentrációjú cystatin C standard szérum hígításainak fényszórás értékeiből készített standard görbe alapján történik.

A kreatinin meghatározásokat Kreatinin Jaffé 2. gen. (kompenzált) módszerrel cobas c 111 automatával (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) végeztük. Az eGFR kiszámításához a 4-változós MDRD (4-variable Modification of Diet in Renal Disease) egyenletet alkalmaztuk. Emellett, az eGFR számítását a CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) cystatin C és CKD-EPI kreatinin-cystatin C egyenlettel is elvégeztük.

DEQAS minták jellemzése

A DEQAS egy nemzetközi külső minőségértékelési program, amelyben több mint ezer laboratórium vesz részt és magába foglalja a jelenleg rendelkezésre álló összes 25OHD mérési platformot. Minden DEQAS vizsgálathoz (évente négy alkalommal) öt gyűjtött, kevert szérum minta érkezik postai úton, szobahőmérsékleten a résztvevő laboratóriumoknak. A 25OHD eredményeket a laboratóriumok online küldik vissza és a beküldési határidő után jelentés a DEQAS honlapjáról letölthető. A kapott adatok statisztikai kiértékelése után megállapított ALTM (összlaboratórium szűkített átlag) és a módszercsoporthoz viszonyított torzítás feltüntetésével megadják a módszercsoportok szórását, variációs koefficiensét és elkészítik az adott laboratóriumra szabott hisztogramot. Az ALTM hasonló a referencia mérési eljárás (RMP) NIST célértékével minden egyes minta esetében.

2013 áprilisától a DEQAS is közöl NIST célértékeket minden egyes mintára, így a résztvevő laboratóriumok számára lehetővé teszik, hogy saját mérési eredményeiket összehasonlítsák a NIST célértékével, emellett a célérték helyettesítheti a referencia módszerrel (LC-MS/MS) kapott értékeket. Továbbá, a DEQAS a total 25OHD ($25\text{OHD}_2 + 25\text{OHD}_3$) mellett a 25OHD_2 , 25OHD_3 és 3-epi- 25OHD_3 metabolitokra vonatkozóan is közöl NIST célértékeket.

DEQAS és HunMen minták vizsgálata

2009-2010-ben a HunMen tanulmányban a 25OHD koncentrációkat nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) határoztuk meg Jasco HPLC rendszerrel (Jasco, Tokyo, Japan), Bio-Rad reagenskészlettel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A HPLC-vel történő meghatározáskor a mintát az előkészítés során kicsapató reagensekkel megtisztítjuk a fehérjétől, illetve az interferenciát okozó vegyületektől, majd ezt követően történik a metabolitok (25OHD_2 , 25OHD_3), valamint a belső standard elválasztása fordított silica töltetű oszlopon. Az elválasztott 25OHD_2 és 25OHD_3 metabolitok kvantitatív meghatározása abszorpciós UV detektálással történik 265 nm-en.

A folyamatosan növekvő mintaszám miatt a Laboratóriumi Medicina Intézet rutin diagnosztikai laboratóriumában a 25OHD meghatározásokat 2014 júniusától LIAISON immunkémiai automatával, DiaSorin LIAISON® 25OHD total, direkt, kompetitív chemiluminescens immunkémiai módszerrel végezzük.

Jelen munkánkban a 2009-2010-es HunMen tanulmányban levő résztvevők szérum mintáit elemeztük újra a szérum total 25OHD koncentrációik meghatározásával egyidőben a DEQAS minták mérésével. A Laboratóriumi Medicina Intézet részt vesz a DEQAS-ban, és a

külső minőségértékelés (external quality assessment, EQA) céljából érkezett öt DEQAS minta (sorszám: 481-485) mérése 2015 októberében, valamint a Hunmen tanulmányban levő résztvevők mintáiból a 25OHD koncentrációk ismételt meghatározása azonos meghatározási módszerrel (DiaSorin LIAISON® 25OHD total CLIA), azonos analitikai feltételekkel, azonos időben, ugyanolyan LOT számú reagens használatával történt. Ezt követően a HunMen tanulmány 25OHD mérési eredményeit korrigáltuk, a korrekcióhoz az öt DEQAS minta (sorszám: 481-485) NIST célértékeit és a DEQAS minták DiaSorin LIAISON® CLIA-val mért 25OHD koncentrációk kapcsolatából származó lineáris regressziós egyenletet alkalmaztuk.

Csont ásványianyag-sűrűség mérések

A HunMen tanulmány résztvevőinek a csont ásványianyag-sűrűség (BMD) vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán, kettős energiájú röntgenfotonos abszorpciometriával (DXA), LUNAR Prodigy (GE-Lunar Corp., Madison, Wisc., USA) denzitométerrel végezték, L1-L4 gerinc (LS), valamint a combnyak (FN) mérési területeken.

Számítások és elemző statisztikai módszerek

Jelen vizsgálati eredmények elemzése *“post hoc”* módon történt. A vizsgált paramétereket leíró statisztikával jellemeztük (átlag, median, tartomány, szórás). A normalitás értékeléséhez a Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. A legtöbb paraméter nem mutatott normál eloszlást, ezért az analíziseket Mann-Whitney U tesztel végeztük. A paraméterek közötti összefüggést Spearman féle korrelációs elemzéssel vizsgáltuk. A nem normál eloszlást mutató paraméterek esetén logaritmikus transzformációt alkalmaztunk. A vizsgálatok közötti összefüggéseket lineáris regressziós analízissel végeztük. Továbbá, az életkor befolyásolásának csökkentésére a median használatával a vizsgálati populációt életkor szerint két alcsoportra osztottuk.

A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az elemzésekhez az 19.0-es verziójú SPSS Statistics szoftvert használtuk (IBM Corps., Armonk, NY, USA).

EREDMÉNYEK

Osteoprotegerint befolyásoló tényezők vizsgálata

Az életkor befolyásolásának csökkentésére, életkor szerint, a median használatával (median életkor = 59 év) a vizsgálati populációt két alcsoportra osztottuk: középkorú férfiakat tartalmazó (életkor ≤ 59 év, $n = 98$), valamint idősödő férfiakat tartalmazó (életkor > 59 év), $n = 96$) csoportokra. Összehasonlítva a középkorú férfiak és az idősödő férfiak vizsgálati paramétereit, szignifikánsan magasabb OPG és cystatin C koncentrációkat találtunk az idősödő férfi csoportban levőknél, valamint jelentősen alacsonyabb sRANKL koncentrációkat és sRANKL/OPG arányokat.

Vizsgálataink alapján a OPG szignifikánsan korrelált az életkorral, a cystatin C-vel, E2-vel, sRANKL/OPG aránnyal, valamint az FTI-vel. Továbbá, a cystatin C szignifikánsan korrelált az életkorral ($r = 0,377$, $p < 0,001$), kreatininnel ($r = 0,487$, $p < 0,001$), MDRD-eGFR-el ($r = -0,524$, $p < 0,001$), E2-vel ($r = 0,222$, $p = 0,003$), P1NP-vel ($r = 0,151$, $p = 0,040$) és OPG-vel ($r = 0,298$, $p < 0,001$). Annak ellenére, hogy az OPG nem korrelált a szérum kreatininnel vagy az MDRD-eGFR-el, mégis szignifikáns korrelációt mutat a cystatin C-eGFR-el, valamint a cystatin C és kreatinin-eGFR-el. Továbbá, csak az idősödő férfi csoportban találtunk szignifikáns korrelációt az OPG és cystatin C ($r = 0,322$, $p = 0,002$), valamint az E2 között ($r = 0,211$, $p = 0,043$). A középkorú férfiaknál nem mutatott szignifikáns korrelációt a szérum OPG és sRANKL koncentráció a többi vizsgált paraméter között (életkor, testtömeg index (BMI), LS BMD, FN BMD, PTH, 25OHD, OC, CTx, P1NP, cystatin C). Többváltozós lineáris regressziós analízist végeztünk a szérum OPG koncentráció statisztikailag szignifikáns előrejelzőinek meghatározására. Regressziós modellbe helyezve az életkort, cystatin C-t, FTI-t és az E2-t, azt találtuk, hogy az életkor (standard regressziós együttható (β) = 0,232, $p = 0,002$), cystatin C (standard regressziós együttható (β) = 0,182, $p = 0,015$), FTI (standard regressziós együttható (β) = -0,178, $p = 0,012$) és E2 (standard regressziós együttható (β) = 0,166, $p = 0,021$) szignifikáns előrejelzői a szérum OPG koncentrációnak.

Regressziós modellbe helyettesítve az idősödő férfiaknál talált két szignifikanciát mutató változót (cystatin C-t és E2-t), azt találtuk, hogy csak a cystatin C volt az egyetlen szignifikáns előrejelzője a szérum OPG koncentrációnak (standard regressziós együttható (β) = 0,345; $p = 0,002$).

Összehasonlítva azokat az egyéneket, akiknél alacsonyabb szérum 25OHD koncentrációt találtunk ($25\text{OHD} < 75$ nmol/L), azokkal az egyénekké akiknél a 25OHD

koncentráció az egészségileg kívánatos tartományban van ($25\text{OHD} \geq 75 \text{ nmol/L}$) nem mutatott összefüggést a szérums OPG és sRANKL koncentrációk, valamint a sRANKL/OPG arányok tekintetében.

A sRANKL $< 0,02 \text{ pmol/L}$, ($n = 74$), valamint a sRANKL $\geq 0,02 \text{ pmol/L}$, ($n = 120$) tekintetében való csoportok összehasonlításakor nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a vizsgált paraméterek között, kivéve az LS BMD [$1,190 \text{ gm/cm}^2$ ($0,810 \text{ gm/cm}^2$ - $1,892 \text{ gm/cm}^2$) vs $1,143 \text{ gm/cm}^2$ ($0,749 \text{ gm/cm}^2$ - $1,855 \text{ gm/cm}^2$), $p = 0,043$], és az FN BMD [$0,984 \text{ gm/cm}^2$ ($0,646 \text{ gm/cm}^2$ - $1,281 \text{ gm/cm}^2$) vs $0,949 \text{ gm/cm}^2$ ($0,602 \text{ gm/cm}^2$ - $1,331 \text{ gm/cm}^2$); $p = 0,049$].

DEQAS és HunMen minták vizsgálata

A HunMen tanulmányban vizsgált szérums mintákból a 25OHD koncentrációkat ismételten meghatároztuk egyidőben az EQA céljából érkezett DEQAS mintákkal. A vizsgálatokat a laboratóriumban alkalmazott DiaSorin LIAISON® 25OHD total CLIA módszerrel végeztük. Ezt követően a HunMen tanulmány 25OHD értékeit korrigáltuk, a korrekcióhoz az öt DEQAS minta (sorszám: 481-485) NIST célértékeit és a DEQAS minták DiaSorin LIAISON® 25OHD total CLIA - val mért 25OHD koncentrációk kapcsolatából származó lineáris regressziós egyenletet alkalmaztuk ($y = 1,0582x + 6,169$).

A HunMen tanulmányban az eredetileg HPLC-vel mért 25OHD átlagértékek a DiaSorin LIAISON® 25OHD total CLIA - val való újramérés során jelentősen megváltoztak, 73 nmol/L -ről 53 nmol/L -re, ami a DEQAS NIST 'total' 25OHD célértékkel való standardizációt követően 62 nmol/L -re változott.

A DEQAS adatokkal képzett standardizációs mesterképlettel korrigáltuk a D-vitamin elégtelenségben szenvedők arányát a HunMen kohorszban, így az eredetileg közölt, HPLC-vel mért D-vitamin elégtelenség ($25\text{OHD} < 75 \text{ nmol/L}$) előfordulási gyakorisága a standardizációt követően jelentősen megemelkedett 53% -ról 72% -ra.

Továbbá, a standardizációt követően a HunMen 25OHD adatok jobban hasonlítottak a környező országokbeli D-vitamin ellátottsági adatokkal.

MEGBESZÉLÉS

Osteoprotegerint befolyásoló tényezők a HunMen tanulmányban és saját mérési eredményeink összehasonlítása irodalmi adatokkal

Összehasonlítottuk a jelen értekezésben vizsgált paraméterek és az irodalomban fellelhető mérési adatok statisztikai eredményeit. Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált férfi kohorszban, az életkor előrehaladásával emelkedik a szérum OPG koncentráció és a sRANKL/OPG arány csökken. Az OPG és életkor közötti összefüggés tekintetében eredményeink összhangban vannak a más szerzők által közzétett adatokkal. Az OPG pozitív korrelációja az életkorral talán az egyetlen megállapítás, illetve konszenzus napjainkig a különböző tanulmányok között, egyetlen kivétellel, amit Oh és munkatársai találtak, ahol nincs korreláció az OPG és az életkor között. Ennek az lehet az oka, hogy korlátozott számú esetet ($n = 80$) és viszonylag alacsonyabb életkorúakat vizsgáltak.

Ami az OPG és BMD, valamint OPG és a csont ásványi-anyagcsere biokémiai markereivel való összefüggését illeti, a jelenleg közzétett tanulmányok eredményei szerint statisztikailag szignifikáns pozitív, negatív és nem szignifikáns eredményeket mutattak be. A nem szignifikánsnak talált eredményeink is további tanulmányok elvégzését szorgalmazzák. Ismerve, hogy az OPG mRNS különböző szövetekben expresszálódik, beleértve a tüdőt, vesét és szívet, így többféle szövet járul hozzá a keringő OPG-hez, aminek következtében az OPG meghatározása a csont mikrokörnyezetében a legkíváncsabb. Az E2 és OPG közötti statisztikailag szignifikánsan pozitív korrelációra vonatkozó megállapításunk hasonló Szulc és munkatársaival, valamint Indridason és munkatársaival, ami megerősíti azt a megállapítást, hogy az E2 növeli az OPG mRNS és fehérje termelést a humán oestrogén-érzékeny osteoblastikus sejtvonalban. Továbbá, Khosla és munkatársai bebizonyították, hogy az oestrogén kezelés növeli a szérum OPG koncentrációkat időskorú férfiakban. A testosteron és az OPG közötti negatív korrelációt támogatja az a megállapítás, amit Khosla és munkatársai igazoltak, hogy in vivo körülmények között a testosteron terápiában részesült csoportban alacsonyabb az OPG koncentráció.

Az a megállapításunk, hogy a sRANKL nem korrelál az életkorral hasonló a korábbi tanulmányokkal. Kétváltozós analízist alkalmazva, nem találtunk összefüggést a sRANKL és BMD között. Ez a megállapítás összhangban van a Trofimov és munkatársai, valamint Oh és munkatársai megállapításaival, de nem ért egyet a Stern és munkatársai megállapításaival, akik arról számoltak be, hogy inverz összefüggés van sRANKL és BMD között. Ennek ellenére statisztikailag magasabb FN és LS BMD-t tapasztaltunk azoknál az egyéneknél, akiknek a sRANKL koncentráció kimutatható volt ($\text{sRANKL} \geq 0,02 \text{ pmol/L}$). Bár a

statisztikai szignifikancia határát csak súrolja a jelenség, ez a megállapítás talán részben magyarázatot adhat az alacsonyabb kockázatú, nem traumás törésekre azoknál az egyéneknél, akik a magasabb szérumsRANKL koncentrációjú csoportban voltak a Schett és munkatársai által leírt tanulmányban. Meg kell jegyeznünk, hogy Schett és munkatársai megállapították, hogy nincs összefüggés a sRANKL és a csont ultrahangos adatok között, valamint nem végeztek BMD méréseket a vizsgált populációban. Jorgensen és munkatársai megállapításai szerint nincs statisztikailag szignifikáns különbség a BMD-ben, azoknál az egyéneknél, akiknél a sRANKL <0.02 pmol/L és azoknál akiknél a sRANKL $\geq$ 0.02 pmol/L. Annak ellenére, hogy a jelenleg használatos immunkémiai módszereknek alacsonyabb a sRANKL kimutathatósági határak, mint az elődjeiknek, szükséges lenne a kimutathatósági határ módszertanának fejlesztése. Talán a még érzékenyebb mérési módszerek bevezetése segítene meghatározni a sRANKL <0.02 pmol/L koncentrációkat, ami valószínű segítene feltárni az alacsony sRANKL és az ismert előrejelzők közötti összefüggéseket. Eddig egyetlen tanulmány volt, amely a sRANKL/OPG arány kapcsolatát elemezte az életkorral és nem talált szignifikanciát ebben a tekintetben, ellentétben a mi tanulmányunkkal, ahol negatív korrelációt találtunk a sRANKL/OPG arány és életkor között. Ezen megállapításunk minden bizonnyal más szerzők általi validálásra vár.

Annak ellenére, hogy az irodalmi adatok szerint a PTH-nak szuppresszív hatása van az OPG termelésre, jelen tanulmányban nem találtunk korrelációt a PTH és OPG között. A mi eredményeink összhangban vannak Indridason és munkatársai által talált eredményekkel, ellentétben Szulc és munkatársai, továbbá Kudlacek és munkatársai által kapott eredményekkel. Ellentétben azzal az irodalmi megállapítással, hogy az 1,25(OH)₂D-vitamin stimulálja az OPG termelést, az in vivo tanulmányokban egészséges férfiaknál, beleértve a mi tanulmányunkat is, nem találtak korrelációt a 25OHD, mint a szervezet D-vitamin ellátottságának jelzője és az OPG között.

Összefoglalva, a különböző tanulmányok megállapításai közötti különbözőségek azzal magyarázhatóak (legalábbis részben), hogy különböző vizsgálati módszerek voltak alkalmazva, néhány esetben több évtizedes fagyasztott minták kerültek feldolgozásra, különböző felvételi kritériumokat használtak a kohorszok kiválasztásánál, valamint a vizsgált mintaszám és talán a vizsgált egyének korösszetétele is különbözött.

A csökkent fehérje clearance szerepe, mint lehetséges oka a korfüggő OPG emelkedésnek néhány korábbi tanulmányban említésre került. Mazziotti és munkatársai szignifikánsan pozitív korrelációt találtak a kreatinin és OPG között, de Samelson és munkatársai emelkedő OPG-t és szignifikánsan csökkenő GFR-t találtak. Ez a megállapítás ellentétben van a Szulc és munkatársai eredményeivel, ahol nem találtak korrelációt az OPG

és kreatinin között. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy nincs korreláció az OPG és az eGFR között az MDRD egyenlet használatakor, viszont szignifikánsan negatív korrelációt találtunk a CKD-EPI cystatin C és CKD kreatinin – cystatin C egyenlet alkalmazásával. Ez a megállapítás illusztrálhatja az eGFR számításához használt egyenlet típusának fontosságát. Továbbá, a kombinált kreatinin-cystatin C egyenlet használata jobbnak bizonyul, mint önmagában ezen markerek egyikén alapuló egyenlet alkalmazása. Erősp pozitív korrelációt találtunk az OPG és cystatin C között, ellentétben Indridason és munkatársaival. Bár az általunk alkalmazott vizsgálati módszer nem volt azonos az Indridason és munkatársai által használt módszerrel, ez a különbség önmagában nem magyarázza a két tanulmány megfigyelései közötti különbséget. Ugyanakkor kimutatták, hogy a szérumban OPG koncentráció pozitív korrelációt mutat a krónikus veseelégtelenségben szenvedő férfi betegekénél.

Annak ellenére, hogy a vizsgálat résztvevői egy jól meghatározott kohorsz tagjai voltak, mégis vannak korlátai a tanulmányunknak. A HunMen tanulmányt elsősorban nem ennek a tanulmánynak a céljára tervezték és a 206 résztvevő mintáiból csak 194 vizsgálati minta állt rendelkezésre a szérumban OPG és sRANKL koncentrációk meghatározására. Nem tudtuk vizsgálni a biológiailag hatékony szabad nemi hormonok OPG-re való hatását, helyette statisztikai elemzéssel számoltuk ki a szabad nemi hormon indexeket.

Bár a cystatin C (mint vesefunkciós marker, vagy mint az osteoclastogenesis inhibitora) hatásmechanizmusa a szérumban OPG koncentrációval nem tisztázódott teljes mértékben jelen tanulmány eredményeképpen, mégis azt találtuk, hogy egy jelentős összefüggést mutat a szérumban OPG koncentrációval. Ezek a statisztikai elemzések szerinti megállapítások megerősítéseket és további alap és klinikai vizsgálatokat, továbbá ok és okozati összefüggések feltárását igénylik.

A tanulmányunk eredményei azt mutatták, hogy a vizsgált középkorú és idősödő férfiakból álló kohorszban, az életkoron túl (ami a legerősebb előrejelző faktor) a cystatin C, szabad testosteron index és az oestradiol szintén az OPG jelentős előrejelzői. Továbbá, a cystatin C és az OPG közötti összefüggés egyértelműbb a kor előrehaladtával.

Összefoglalva, a cystatin C az OPG jelentős előrejelzője függetlenül az életkortól, szabad testosteron indextől és az oestradioltól.

A 25-hidroxi-D-vitamin mérési adatok standardizációja

A 25-hidroxi-D-vitamin laboratóriumi standardizációja még mindig kihívást jelent. A VDSP elsődleges fókusz a 25OHD meghatározások standardizációjára két alapvető protokollon alapszik: az egyik a jelenlegi és a jövőben alkalmazandó 25OHD meghatározásokon, a másik a korábbi felmérésekből vagy tanulmányokból származó 25OHD értékek standardizációja. Cashman és munkatársai a szérumban 25OHD értékek

standardizációjára 2008–2010-ben az „Irish National Adult Nutrition Survey” felmérésben a VDSP protokollja alapján a régi mintákból ismételtlen meghatározták a 25OHD koncentrációkat LC-MS/MS-el. Sempos és munkatársai a mérések idejére vonatkozó DEQAS ALTM-től való eltéréssel korrigálták a korábbi 25OHD értékeket, és azt feltételezték, hogy ezzel a módszerrel nem valósítható meg a standardizálás. Sarafin és munkatársai a „Canadian Health Measures Survey” felmérésben standardizálták a 25OHD értékeket. A standardizálás két lépésben történt, először az eredetileg mért mintákat az újonnan rendelkezésre álló immunkémiai módszerrel újramérték, második lépésben, ötven ismert 25OHD koncentrációjú szérumszám mintát, amit a NIST és Ghent referencia laboratóriumi módszerrel mértek, ismételtlen újramérték a jelenleg rendelkezésre álló immunkémiai módszerrel. Később, Cashman és munkatársai a 25OHD értékek standardizációjára a VDSP protokollt alkalmazták az északi populációra. Mindkét tanulmányban egy meghatározott szérumszám mintahalmazt választottak ki biobankból, amit LC-MS/MS módszerrel újra analizáltak, és a régi, illetve újonnan kapott 25OHD értékekből származó kalibrációs egyenletet alkalmazták a mindkét tanulmányban levő teljes adathalmazra.

A VDSP protokolljában tett standardizációs javaslatok követése nem csekély feladat, mivel a tanulmány ideje alatt Magyarországon nem volt olyan rutin diagnosztikai laboratórium, ahol a 25OHD meghatározásokat LC-MS/MS módszerrel végeznék, így a korábban fagyasztott minták újramérése nem volt kivitelezhető. Megközelítésünk alapján, a laboratórium által mért 25OHD eredmények korrekciójához, minden DEQAS vizsgálati körnél a NIST célértéktől való eltérések figyelembe vételével a regressziós analízis elvégzésére és alkalmazására lenne szükség. Továbbá, a DEQAS programban való részvételi díj egészen méltányos, így a mi megközelítésünkkel bátorítani tudjuk a résztvevő laboratóriumokat, hogy könnyedén korrigálni tudják az elsődlegesen kapott 25OHD értékeiket. A tanulmányunk korlátai közé tartozhat, hogy a vizsgálatokat a 6 évig fagyasztva tárolt mintákból végeztük. Módszerünk validálásához és a számítások pontosságához további szérumszám minták lennének szükségesek. A tanulmányunk kapcsán megjelent szakértői kommentár költséghatékonynak vélte a megközelítésünket, de felhívta a figyelmünket, hogy egy definitív módon előválogatott 40 DEQAS minta adatait átölelő mesterképlet használata tovább pontosítaná a standardizációs törekvésünket.

Az általunk javasolt standardizáció következeképpen az eredetileg közölt, HPLC-vel mért HunMen kohorsz D-vitamin ellátottsági adatok revideálásra kerültek és a D vitamin-elégtelenségben szenvedők aránya 53%-ról 72%-ra változott.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az OPG/RANKL/RANK rendszer kulcsfontosságú szabályozója az osteoclastogenesisnek és jelentős közvetítő tényező az oestradiol, testosteron, parathormon, D-vitamin és a csontforgalom között. Számos irodalmi adat számol be az OPG és RANKL vizsgálatáról egészséges férfiakban, de csak részben tisztázott a kapcsolatuk a háttérben működő befolyásoló molekuláris szereplőkkel, mint például a cystatin C csontanyagcserével való kapcsolata.

Munkánk során a HunMen kohorszban meghatároztuk az OPG és sRANKL koncentrációkat, továbbá ezen markerek kapcsolatát elemeztük az életkorral, cystatin C-vel, csontanyagcsere biokémiai markerekkel, továbbá a 25-hidroxi-D-vitaminnal, parathormonnal, nemi hormonokkal (17 β -oestradiol és testosteron), valamint a csont ásványianyag-sűrűség mérési adataival. Vizsgálataink alapján az OPG szignifikánsan korrelált az életkorral, a cystatin C-vel, oestradiollal és a szabad testosteron indexxel. Összehasonlítva a középkorú (életkor: ≤ 59 év, $n = 98$) és az idősödő férfiak (életkor > 59 év, $n = 96$) vizsgálati paramétereit, szignifikánsan magasabb szérum OPG koncentrációt találtunk az idősödő férfi csoportban levőknél és jelentősen alacsonyabb sRANKL koncentrációkat, illetve alacsonyabb sRANKL/OPG arányt.

Összefoglalva, a vizsgált kohorszban, az életkoron túl, ami a legerősebb előrejelző faktor, a cystatin C az OPG jelentős előrejelzője függetlenül az életkortól, az FTI-től és az E2-től, valamint a cystatin C és az OPG közötti összefüggés egyértelműbb a kor előrehaladtával.

Továbbá, a DEQAS adatokkal képzett standardizációs mesterképlettel a HunMen tanulmány 25OHD értékeit korrigáltuk. A korrekcióhoz a DEQAS NIST célértékek és a DEQAS minták DiaSorin LIAISON[®] CLIA módszerrel mért 25OHD koncentrációk kapcsolatából származó lineáris regressziós egyenletet alkalmaztuk.

A HunMen tanulmányban HPLC-vel mért 25OHD átlagértékek a DiaSorin LIAISON[®] CLIA módszerrel való újramérés során 73 nmol/L-ről 53 nmol/L-re, majd a DEQAS NIST célértékkel való standardizációt követően 62 nmol/L-re változott. Továbbá, az eredetileg közölt, HPLC-vel mért D-vitamin elégtelenség (25OHD < 75 nmol/L) előfordulási gyakorisága a standardizációt követően jelentősen megemelkedett 53%-ról 72%-ra.

A DEQAS adatok használatával az általunk javasolt módon képzett mesterképlet alkalmazásával költséghatékonyan standardizálni lehet a rutin diagnosztikai laboratóriumokban különböző módszerekkel meghatározott 25OHD értékeket.

AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS MEGÁLLAPÍTÁSAI, GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

- Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált férfi kohorszban, az életkor előrehaladásával emelkedik a szérum OPG koncentráció és a sRANKL/OPG arány csökken.
- A vizsgált férfi kohorszban, az életkoron túl, ami a legerősebb előrejelző faktor, a cystatin C, FTI és E2 szintén az OPG jelentős befolyásoló tényezői, illetve a cystatin C és az OPG közötti összefüggés egyértelműbb a kor előrehaladtával.
- Vizsgálataink azt mutatják, hogy nincs korreláció az OPG és az eGFR között az MDRD egyenlet használatakor, viszont szignifikánsan negatív korrelációt találtunk a CKD-EPI cystatin C és CKD kreatinin – cystatin C egyenlet alkalmazásával.
- A csont ásványianyag-sűrűség mérési adatainak elemzése során statisztikailag magasabb FN és LS BMD-t tapasztaltunk azoknál az egyéneknél, akiknél a sRANKL kimutatható volt ($sRANKL \geq 0,02$ pmol/L).
- Ellentétben azzal az irodalmi megállapítással, hogy az $1,25(OH)_2D$ -vitamin stimulálja az OPG termelést, nem találtunk korrelációt a 25OHD, mint a szervezet D-vitamin ellátottságának jelzője és az OPG között.
- Annak ellenére, hogy irodalmi adatok szerint a PTH-nak szuppresszív hatása van az OPG termelésre, jelen tanulmányban nem találtunk korrelációt a PTH és OPG között.
- A DEQAS adatok használatával az általunk javasolt módon képzett mesterképlet alkalmazásával költséghatékonyan standardizálni lehet a rutin diagnosztikai laboratóriumokban különböző módszerekkel meghatározott 25OHD értékeket.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/325/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Jakab Éva
Neptun kód: JEVA
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Jakab, É.**, Kalina, E., Pethő, Z., Pap, Z., Balogh, Á., Grant, W. B., Bhattoa, H. P.: Standardizing 25-hydroxyvitamin D data from the HunMen cohort.
Osteoporosis Int. 28 (5), 1653-1657, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/DOI 10.1007/s00198-017-3924-4>
IF: 3.856
2. **Kulcsár-Jakab, É.**, Pethő, Z., Pap, Z., Kalina, E., Földesi, R., Balogh, Á., Antal-Szalmás, P., Bhattoa, H. P.: Cystatin C as a potential predictor of osteoprotegerin levels in healthy men, a cross-sectional, observational study.
BMC Musculoskelet. Disord. 16 (277), 1-7, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12891-015-0684-1>
IF: 1.684





További közlemények

3. Pethő, Z., **Kulcsár-Jakab, É.**, Kalina, E., Balogh, Á., Pusztai, A., Gulyás, K., Horváth, Á., Szekanecz, Z., Bhattoa, H. P.: Vitamin D status in men with psoriatic arthritis: a case-control study.
Osteoporosis Int. 26 (7), 1965-1970, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-015-3069-2>
IF: 3.445
4. Pethő, Z., **Kulcsár-Jakab, É.**, Onyeka, U., Molnár, Z., Kalina, E., Balogh, Á., Paragh, G., Antal-Szalmás, P., Káplár, M., Bhattoa, H. P.: Az országspecifikus FRAX-algoritmus által meghatározott 10 éves csípő- és major osteoporoticus törések valószínűségének vizsgálata 2-es típusú diabeteses férfiak csoportjában.
LAM KID. 4 (4), 155-161, 2014.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,985

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
5,54**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.10.11.



KÖSZÖNETNYILVÁNYÍTÁS

Szeretettel és tisztelettel köszönöm témavezetőmnek, Dr. Bhattoa Harjit Pal egyetemi docens úrnak a kutatásom kivitelezésében és a dolgozatom elkészítésében nyújtott maximális szakmai és emberi támogatását, valamint iránymutatását. Ugyanakkor köszönöm bizalmát és a lehetőséget, hogy megismerhettem a kutatói munka szépségeit.

Szeretném megköszönni Dr. Kappelmayer János professzor úrnak, hogy a Debreceni Egyetem ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézetében végezhettem a tudományos munkámat.

Köszönettel tartozom munkahelyi vezetőmnek, Dr. Csernák Zsolt főorvos úrnak, hogy tanulmányaimhoz háttérrel biztosított és támogatott.

Köszönöm a Debreceni Egyetem ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézet dolgozóinak, valamint a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Csontdenzitometria Szakrendelés dolgozóinak a vizsgálatok kivitelezésében nyújtott segítséget.

Köszönöm munkatársaimnak, a SYNLAB Budapest Szent János Kórház Laboratórium és Magán Vértvételi Hely dolgozóinak türelmét és támogatását.

Hálásan köszönöm Édesanyámnak és nővéremnek, valamint minden kedves családtagomnak és a barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak és önzetlenül támogattak.