

KATKÓ MÓNICA PHD HALLGATÓ¹, KÁDÁR ANDRÁS DR. PHD HALLGATÓ¹, KOSARAS ESZTER PHD HALLGATÓ¹, KÁRPÁTI ISTVÁN DR. PHD¹, MÁTYUS JÁNOS DR. PHD¹, CSONGRÁDI ÉVA DR.², KISS ILDIKÓ PHD HALLGATÓ³, POSTA JÁNOS MTA DR.³, KOVÁCS BÉLA DR. PHD⁴, PARAGH GYÖRGY MTA DR.², BALLA JÓZSEF MTA DR.¹, VARGA ZSUZSA DR. PHD¹

¹DEOEC, I. Belgyógyászati Klinika, Nephrológia Tanszék, Debrecen; ²DEOEC, I. Belgyógyászati Klinika, Anyagcsere Tanszék, Debrecen; ³DETEK, Analitikai és Szervetlen Kémia Tanszék, Debrecen; ⁴DEATC, Élelmiszertudományi, Minőségbiztosítási és Mikrobiológiai Intézet, Debrecen

A NIKKEL SZEREPE A HOMOCISZTEINSZINT ALAKÍTÁSÁBAN, IN VIVO ÉS IN VITRO EREDMÉNYEK

A HYPERHOMOCYSTEINAEMIA (HHC) A KARDIOVASZKULÁRIS MEGBETEGEDÉSEK RIZIKÓFAKTORA. KIALAKULÁSA GYAKRAN VITAMINHIÁNY (B₁₂-VITAMIN, B₆-VITAMIN, FOLSAV) KÖVETKEZMÉNYE, DE A VITAMINPÓTLÁS NEM MINDIG JÁR KIELÉGÍTŐ EREDMÉNNYEL. ÁLLATKÍSÉRLETEKBEN A HHC KOBALT-, NIKKEL-, VAS- ÉS RÉZSÓK ADÁSÁVAL MÉRSÉKELHETŐ. A NYOMELEMEK HUMÁN HOMOCISZTEIN METABOLIZMUSRA GYAKOROLT HATÁSÁT KORÁBBAN MÉG NEM VIZSGÁLTÁK. CÉLUNK EZÉRT A VITAMINOK MELLETT, EGYÉB OLYAN PARAMÉTER AZONOSÍTÁSA – KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A NYOMELEMEKRE – AMELYEK ÖSSZEFÜGGÉST MUTATNAK A HOMOCISZTEIN MENNYISÉGÉVEL IN VIVO. A VÉGSTÁDIUMÚ VESEBETEGEK KÖRÉBEN GYAKORIAK A NYOMELEM-ELTÉRÉSEK ÉS A HHC IS. 122 HEMODIALIZÁLT BETEG SZÉRUMÁNAK HOMOCISZTEIN, FOLSAV, B₁₂-VITAMIN, NYOMELEM (KOBALT, NIKKEL, VAS ÉS RÉZ) KONCENTRÁCIÓJÁT ÉS EGYÉB PARAMÉTEREKET HATÁROZTUNK MEG, ÉS VIZSGÁLTUK A KÖZÖTTÜK LÉVŐ ÖSSZEFÜGGÉSEKET. AZ EREDMÉNYEKET EGÉSZSÉGES KONTROLLKOK ESETÉBEN TALÁLT ÖSSZEFÜGGÉSEKKEL VETETTÜK ÖSSZE. IN VITRO VIZSGÁLATOKBAN, AMELYHEZ FRISSEN IZOLÁLT HUMÁN PERIFÉRIÁS MONONUKLEÁRIS SEJTEKET HASZNÁLTUNK, TANULMÁNYOZTUK A NYOMELEMEK ÉS A HOMOCISZTEIN TERMELÉS KÖZTI KAPCSOLatot. HEMODIALIZÁLT BETEGEK TOTÁL HOMOCISZTEINSZINTJE A B₁₂-VITAMIN ÉS A FOLSAV ELLÁTOTSÁG MELLETT A CRP, ÉS A NYOMELEMEK KÖZÜL A SZÉRUM NIKKEL KONCENTRÁCIÓJÁVAL SZIGNIFIKÁNS NEGATÍV KAPCSOLatot, MÍG A SZÉRUM ALBUMIN ÉS A HEMOGLOBIN ÉRTÉKEKKEL SZIGNIFIKÁNS POZITÍV KAPCSOLatot MUTAT. A NIKKEL A HEMODIALIZÁLT BETEGEKBE TALÁLT KONCENTRÁCIÓTARTOMÁNYBAN SZIGNIFIKÁNSAN CSÖKKENTI A HUMÁN PERIFÉRIÁS MONONUKLEÁRIS SEJTEK HOMOCISZTEIN, CISZTEIN ÉS GLUTATION TERMELÉSÉT. IGAZOLTUK, HOGY A NIKKEL EBBEN A KONCENTRÁCIÓTARTOMÁNYBAN NEM CITOTOXIKUS, NEM BEFOLYÁSOLJA A PERIFÉRIÁS MONONUKLEÁRIS SEJTEK ÉLETKÉPESSÉGÉT, PROLIFERÁCIÓJÁT, FAS-LIGAND ÉS TRAIL-TERMELÉSÉT, NEM INDUKÁL APOPTÓZIST. ÖSSZEFOGLALVA, A NIKKEL, AZ ÁLLATKÍSÉRLETEKBEN BIZONYÍTOTT MÓDON, HUMÁN VONATKOZÁSBAN IS SZEREPET JÁTSZIK A METIONIN-CIKLUS SZABÁLYOZÁSÁBAN.

Kulcsszavak: hyperhomocysteinaemia, hemodialízis, nikkel, homocisztein

ROLE OF NICKEL IN REGULATION OF HOMOCYSTEINE LEVEL; IN VIVO AND IN VITRO RESULTS
HYPERHOMOCYSTEINAEMIA (HHC) IS ASSOCIATED WITH ATHEROSCLEROSIS. THE MODERATE FORM OF HHC USUALLY OCCURS IN VITAMIN DEFICIENCY (VITAMIN B₁₂, VITAMIN B₆, FOLATE), BUT VITAMIN SUPPLEMENTATION IS INEFFICIENT IN SOME PATIENTS TO NORMALIZE TOTAL HOMOCYSTEINE LEVEL. IN ANIMALS, TRACE ELEMENTS SUCH AS COBALT, NICKEL, IRON AND COPPER AMELIORATED HHC. HOWEVER, EARLIER CORRELATIONS BETWEEN PLASMA TOTAL HOMOCYSTEINE AND TRACE ELEMENTS IN HUMAN HAVE NOT BEEN INVESTIGATED. THEREFORE, WE STUDIED RELATIONSHIP BETWEEN HOMOCYSTEIN AND TRACE ELEMENTS, WHICH MIGHT AFFECT HOMOCYSTEINE LEVEL BESIDES VITAMINS, IN VIVO AND IN VITRO. TOTAL HOMOCYSTEINE, FOLATE, VITAMIN B₁₂, TRACE ELEMENTS (COBALT, NICKEL, IRON, COPPER), AND SOME LABORATORY PARAMETERS WERE DETERMINED IN 122 HEMODIALYSIS PATIENTS AND 50 HEALTHY CONTROLS. THE EFFECT OF NICKEL ON HOMOCYSTEINE PRODUCTION WAS ASSESSED IN HUMAN PERIPHERAL MONONUCLEAR CELLS. IN HEMODIALYSIS PATIENTS TOTAL HOMOCYSTEINE NEGATIVELY CORRELATED WITH CONCENTRATION OF FOLATE, VITAMIN B₁₂, NICKEL AND CRP, AND POSITIVELY WITH SERUM ALBUMIN AND HEMOGLOBIN VALUES. NICKEL AT CONCENTRATIONS FOUND IN HEMODIALYSIS PATIENTS, SIGNIFICANTLY INHIBITED HOMOCYSTEINE, CYSTEINE AND GLUTATION PRODUCTION IN HUMAN PERIPHERAL MONONUCLEAR CELLS, WITHOUT INFLUENCING CELL VIABILITY, FAS LIGAND AND TRAIL EXPRESSION, AND APOPTOSIS. THESE RESULTS SUGGEST THAT NICKEL MIGHT ALSO BE INVOLVED IN THE REGULATION OF METHIONINE CYCLE IN HUMANS, AS WAS DEMONSTRATED IN ANIMAL EXPERIMENTS.

Keywords: homocysteinaemia, hemodialysis, nickel, homocysteine

A homocisztein a metionin-ciklus egyik intermedier terméke. A metioninból S-adenozil-metionin (SAM) képződik, amely a metilcsoport átadása után S-adenozil-homociszteinné (SAH) alakul, majd az adenoszin leválása után keletkezik a homocisztein (1. ábra). Ezt követően a szervezet igényeinek megfelelően a homocisztein metilcsoportot vehet fel, és ezzel a remetilációval záródik a ciklus, vagy felhasználódhat ciszteinszintézisre. A remetilációt katalizáló metionin-szintáz egy B₁₂-vitamin kofaktort igénylő enzim, működéséhez a metilcsoportot a metil-tetrahidrofolát szolgáltatja. A transzszulfurációs útvonal első lépéseként bekövetkező reakcióhoz pedig B₆-vitamin szükséges, mint a cisztation-β-szintáz kofaktora (1. ábra). Az említett vitaminok hiánya a homocisztein felhalmozódásához, hyperhomocysteinaemia (HHC) kialakulásához vezet. Az esetek többségében a HHC folsavhiány következménye (1), ezért kezelésére széles körben alkalmazzák a folsavpótlást. A HHC gyakori hemodializált (HD) vesebetegek körében (2-4), és a folsavpótlás nem minden esetben hatékony még magas dózis (10-20 mg/nap) alkalmazása mellett sem (5). Számos vizsgálat próbált a vitaminokon kívül egyéb olyan paramétereket azonosítani, amelyek befolyásolják a homociszteinszintet. A nyomelemek szerepét állatkísérletekben bizonyították. Patkányok számára a nikkel esszenciális nyomelem, és szerepe van a metionin-folsav ciklusban (6-9). A

B₁₂-vitamin-hiány okozta HHC-mértéke szignifikánsan csökkent, amikor az állatok étrendjét kobalt-, nikkel-, vas- és rézszókkal egészítették ki (10). Ezekből az eredményekből kiindulva vizsgáltuk a nyomelemek metionin-folsav ciklusra gyakorolt hatását az emberi szervezetben. Meghatároztuk HD-betegek és egészséges kontrollok szérumanak kobalt, nikkel, réz, vas, homocisztein, B₁₂-vitamin és folsavsztíkjét, illetve a homocisztein státusra ható egyéb paramétereket, ide tartozik a nem, a vasmetabolizmus, a malnutríció mértékét jelző szérum totál protein (TP) és albumin, valamint egyes gyulladásos markerek (CRP, IL-6).

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

EGÉSZSÉGES KONTROLLOK
Klinikánk 50 egészséges dolgozója vett részt a vizsgálatban. Egyiküknek sem volt magas vérnyomása, lipid, máj vagy vese eltérése, testtömeg-indexük a normál tartományban volt (<25 kg/m²).

BETEGEK

122 végstádiumú vesebeteget vontunk be a vizsgálatba. Hemodialízis kezelésük heti 3 alkalommal 4 óráig tart (1,3 m² polysulfone capillary dialyzer, Hemoflow F60(S) High Flux, Fresenius, Fresenius AG. Homburg, Germany) 1,5 mmol/l kalciumot tartalmazó bikarbonát dialízis folyadékkal. A Kt/V arány 1,25±0,3. A terápia kezdetétől kapnak folsavat (3 mg naponta), aktív

D-vitamint (Calcitriol, Rocatrol, Roche: 0,5 µg kétnaponta), intravénásan vasat (Ferrlecit, ferri sorbit gluconate, Aventis Pharma: 62,5 mg kéthetente) a dialízis végén, és hemoglobin értéküktől függően rekombináns humán eritropoetint. A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága engedélyével végeztük. A betegek írásos tájékoztatót kaptak és beleegyeztek a vizsgálatban való részvételbe.

A *vérvételek* éhgyomorral és HD-betegek esetében dialízis előtt történt. Speciális vacutainert használtunk az elemanalízisre szánt vérhez (Beckton Dickinson, USA). A mintákat -70 °C-on tároltuk a nyomelemek meghatározásáig. A homocisztein mérése közvetlenül a vérvétel után megtörtént.

A *plazma totál-homocisztein* (tHcy) koncentrációját egy HPLC kett (BioRad Laboratories GmbH, Munich, Germany) segítségével határoztuk meg.

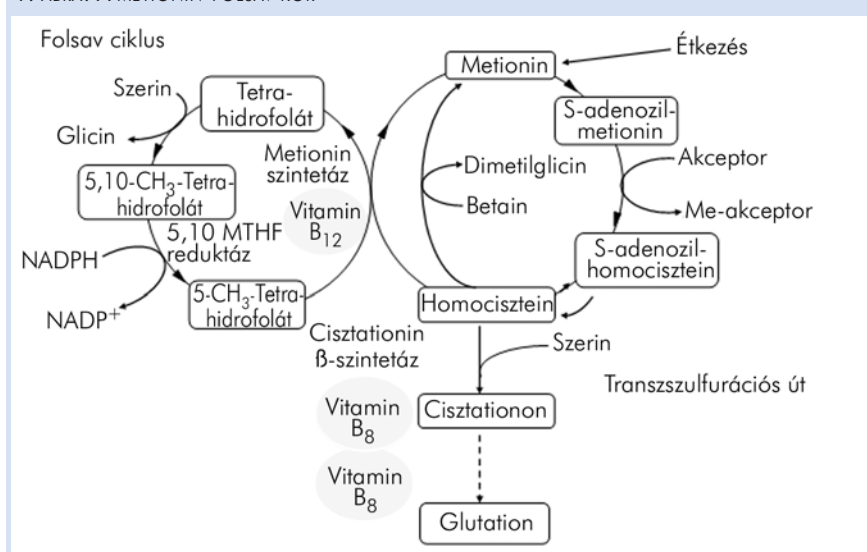
A *B₁₂-vitamin* és a *folsav* szintjét a klinikai kémiában használatos Abbott assay-vel (AxSYM System, Abbott Laboratories, Illinois, USA) állapítottuk meg.

A *kobalt*, a *réz* és a *nikkel* meghatározása induktívan csatolt plazma-tömegspektroszkópos (ICP-MS) módszerrel történt (11). A mintákat savas közegben (0,5 ml szérumhoz 1 ml salétromsavat, 0,5 ml hidrogén-peroxidot, és 0,2 ml hidrogén-fluoridot adtunk) mikrohullámú roncsoló készülékben (MARS-5, CEM, USA) tártuk fel. Az emésztés az alábbi paraméterek mellett zajlott: (1) 150 W 10 percig, (2) 0 W 2 percig, és (3) 300 W 10 percig. A savas mintaoldatot nagy tisztaságú vízzel hígítottuk 10 cm³ térfogatra. Belső standardként ródiót adtunk a mintákhoz 10 µg/l végkoncentrációban. A nyomelem meghatározások ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, induktív csatolású plazmaemissziós spektrometria, tömegszelektív detektálással) módszerrel történtek.

IN VITRO VIZSGÁLATOK

A perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) egészséges személyek vérből sűrűség-grádiens centrifugálással nyertük (12), ehhez Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA) oldatot használtunk. A sejteket 10% borjú szérumalbumint tartalmazó RPMI 1640 tápfolyadékba helyeztük (Sigma). A

1. ÁBRA: A METIONIN-FOLSAV KÖR



nikkel törzsoldatot (NiCl_2 , 1 mg/l) közvetlenül használat előtt RPMI 1640 segítségével hígítottuk a kívánt koncentrációra. A sejtszám (10^6 sejt/ml) beállítása után a sejteket nikkel jelenlétében ($5 \mu\text{g/l}$, $10 \mu\text{g/l}$, $25 \mu\text{g/l}$), vagy nélküle 24 órán át inkubáltuk 37°C -on, 5% CO_2 mellett.

Mindegyik elegyhez adtunk metionint 1 mmol/l vékonykoncentrációban (13). Az egyes vizsgálatokban hozzáadott cisztein, homocisztein és glutation koncentrációját (100 $\mu\text{mol/l}$) RPMI 1640 tápfolyadékkal készült törzsoldatok (10 mmol/l) segítségével állítottuk be. A további vizsgálatokhoz a sejteket feltártuk. A homocisztein, a cisztein és a glutation meghatározása HPLC-vel (Hitachi-Merck L 6200A), fluoreszcens detektorral (Hitachi-Merck F 1050) történt *Ubbink* és *munkatársai* által leírt módon (14). A mobilfázis 4% acetonitril tartalmú 0,1 M KH_2PO_4 puffer (pH=2,1 ortofoszforsavval beállítva) volt (Scharlau). Az áramlási sebesség 1,5 ml/perc. A fluoreszcens detektáláshoz a gerjesztési hullámhossz 385 nm, az emissziós hullámhossz 515 nm volt. A kalibrációhoz analitikai tisztaságú homociszteint, ciszteint és glutationt használtunk (Sigma). A koncentrációértékeket a sejtlizátum fehérjetartalmára vonatkoztatva adtuk meg, a fehérje meghatározást Lowry módszere szerint végeztük (15). Az adatok 5 különálló kísérlet eredményeinek átlag \pm szórás értékét tartalmazzák. Minden esetben 2 párhuzamos mérést végeztünk. A sejtek életképességének megállapítására az MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólium bromid) beépülését mértük (16). A TRAIL és Fas-ligand szinteket a tenyésztett sejtek felülűszójában R&D gyártmányú kitékkel határoztuk meg.

STATISZTIKAI ANALÍZIS

A SAS Institute 8,02 szoftverét (Cary, NC, USA) használtuk statisztikai analízisre. Adataink eloszlását Kolmogorov-Smirnov-teszt alkalmazásával elemeztük. A folyamatos változók közötti összefüggéseket lineáris regressziós analízissel vizsgáltuk. A paraméterek csoportok közötti összevetésére a Student's t-próba vagy Wilcoxon-próba szolgált. Minden adatot átlag \pm szórás formában közlünk. A $p < 0,05$ értéket

1. TÁBLÁZAT: A VIZSGÁLATBAN RÉSZTVEVŐ KONTROLLOK ÉS HEMODIALIZÁLT VESEBETEGEK (HD) DEMOGRÁFIAI JELLEMZŐI ÉS NÉHÁNY LABORATÓRIUMI ADATA

| PARAMÉTER | KONTROLL | HD BETEGEK | P-ÉRTÉK |
|------------------------------|------------------|------------------|---------|
| ÉLETKOR (ÉV) | 37,4 \pm 9,9 | 60,1 \pm 12,3 | 0,0001 |
| FÉRFI/NŐ SZÁM | 19/31 | 65/57 | 0,04 |
| BMI (KG/M ²) | 22,4 \pm 4,8 | 24,5 \pm 4,9 | |
| HT | 0 | 101 | |
| AMI | 0 | 9 | |
| TP (G/L) | 77,1 \pm 9,5 | 68,7 \pm 5,1 | 0,0001 |
| ALBUMIN (G/L) | 48,5 \pm 2,7 | 36,9 \pm 6,5 | 0,0001 |
| HGB (G/L) | 135,4 \pm 12,8 | 117,8 \pm 13,1 | 0,0001 |
| CRP (MG/L) | 1,85 \pm 2,27 | 10,6 \pm 21,2 | 0,002 |
| IL-6 (NG/ML) | 2,37 \pm 1,54 | 13,1 \pm 19,6 | 0,001 |
| TRFSAT (%) | 22,4 \pm 10,2 | 25,0 \pm 9,98 | NS |
| FERRITIN ($\mu\text{G/L}$) | 57,8 \pm 59,2 | 592 \pm 434 | 0,0001 |

HT: HIPERTÓNIA; AMI: AKUT MIOKARDIÁLIS INFARKTUS; TP: TOTÁL PROTEIN; TRFSAT: TRANSZFERRIN SZATURÁCIÓ

tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Az 1. táblázatban mutatjuk be a vizsgálatban résztvevők demográfiai adatait és a homociszteinszint szempontjából lényeges laboratóriumi paramétereket. A TP, az albumin és a hemoglobinszintek szignifikánsan alacsonyabbak, míg a CRP, az IL-6 és a ferritin koncentrációk szignifikánsan magasabbak voltak HD-betegekben az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. A transferrin telítettségében nem volt különbség. A HD betegek szignifikánsan magasabb tHcy, folsav, B₁₂-vitamin, kobalt, nikkel és rézszintekkel, illetve szignifikánsan alacsonyabb vas-koncentrációval rendelkeztek, mint a kontrollok (2. táblázat). A HD betegek tHcy alapján csoportokra osztot-

tuk, az így kapott eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be. A csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget a réz, a kobalt és a TP-értékek esetén. A szérumban albumin, a hemoglobin és a vasszintek magasabbak, a folsav, a B₁₂-vitamin, a nikkel, a ferritin, a CRP és az IL-6-szintek pedig alacsonyabbak voltak a magas (>20 $\mu\text{mol/l}$) tHcy-nel rendelkezők csoportjában az alacsony és normál ($\leq 20 \mu\text{mol/l}$) tHcy-szintű csoportok értékeihez képest. Folsav vagy B₁₂-vitamin hiány nem fordult elő, koncentrációjuk minden esetben a normál tartományon felül volt a vitamin szupplementáció következtében. A korrelációs analízis eredményei szerint a tHcy szignifikáns negatív kapcsolatot mutat a folsav, a B₁₂-vitamin, a nikkel, illetve a CRP értékekkel HD-betegek esetében. A kontrollokban az IL-6, a folsav, és a nyomelemek közül a nikkel mutat

2. TÁBLÁZAT: A PLAZMA TOTÁL HOMOCISZTEIN (T-HCY), B₁₂-VITAMIN, FOLSAV ÉS NYOMELEM TARTALMA AZ EGÉSZSÉGES KONTROLLOK ÉS HEMODIALIZÁLT VESEBETEGEK ESETÉBEN

| PARAMÉTER | KONTROLL | HD BETEGEK | P-ÉRTÉK |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| t-HCY ($\mu\text{MOL/L}$) | 11,8 \pm 4,8 | 22,9 \pm 14,7 | 0,0001 |
| FOLSAV ($\mu\text{G/L}$) | 16,6 \pm 5,1 | 31,6 \pm 18,4 | 0,0001 |
| B ₁₂ -VITAMIN (NG/L) | 283 \pm 100 | 522 \pm 289 | 0,0001 |
| Co ($\mu\text{G/L}$) | 0,16 \pm 0,04 | 0,56 \pm 0,65 | 0,0001 |
| Ni ($\mu\text{G/L}$) | 2,35 \pm 0,8 | 6,27 \pm 9,83 | 0,04 |
| Cu ($\mu\text{G/L}$) | 1100 \pm 213 | 1268 \pm 333 | 0,05 |
| FE ($\mu\text{MOL/L}$) | 16,8 \pm 6,7 | 11,2 \pm 5,1 | 0,0001 |

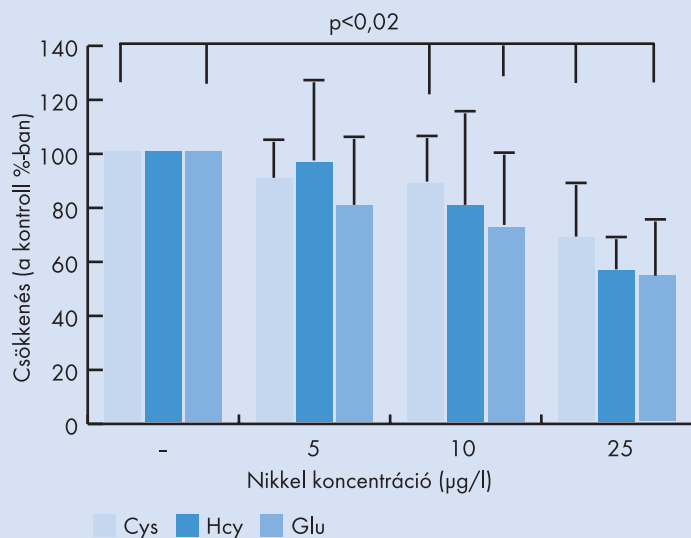
3. TÁBLÁZAT: NYOMELEM KONCENTRÁCIÓK ÉS A MALNUTRICIÓ-INFLAMMÁCIÓ MÉRTÉKÉT JELZŐ PARAMÉTEREK VÁLTOZÁSA A TOTÁL HOMOCISZTEINSZINTEK FÜGGVÉNYÉBEN HEMODIALIZÁLT VESEBETEGEKBEN

| | tHcy ($\mu\text{mol/L}$) | | | |
|--------------------------|----------------------------|------------------|------------------|------------------------|
| | <12 | 12-20 | 20-40 | >40 |
| tHcy | 9,99 \pm 1,09 | 16,6 \pm 2,03 | 25,8 \pm 5,3 | 66,4 \pm 13,9 |
| FOLSAV | 29,2 \pm 19,1 | 36,3 \pm 14,7 | 30,9 \pm 15,3 | 13,2 \pm 7,2 |
| B ₁₂ -VITAMIN | 591 \pm 299 | 609 \pm 231 | 504 \pm 188 | 249 \pm 70 |
| Cu | 1352 \pm 321 | 1169 \pm 227 | 1364 \pm 266 | 1123 \pm 69 |
| Co | 0,59 \pm 0,45 | 0,54 \pm 0,44 | 0,55 \pm 0,44 | 0,6 \pm 4 \pm 0,55 |
| Ni | 13,8 \pm 1,6 | 6,91 \pm 5,91 | 5,47 \pm 3,66 | 3,66 \pm 1,06 |
| Fe | 10,7 \pm 6,3 | 10,7 \pm 3,4 | 11,9 \pm 3,86 | 11,9 \pm 2,5 |
| TP | 66,2 \pm 5,8 | 68,6 \pm 4,4 | 68,8 \pm 3,9 | 69,3 \pm 3,5 |
| ALBUMIN | 30,6 \pm 4,9 | 36,9 \pm 4,2 | 38,6 \pm 4,2 | 37,60 \pm 5,8 |
| HEMOGLOBIN | 107,7 \pm 11,3 | 108,4 \pm 10,1 | 117,3 \pm 11,8 | 127,1 \pm 10,1 |
| CRP | 34,1 \pm 35,6 | 12,2 \pm 9,8 | 11,6 \pm 10,8 | 6,9 \pm 8,1 |
| IL-6 | 60,3 \pm 48,6 | 24,3 \pm 26,0 | 10,1 \pm 7,5 | 9,1 \pm 4,0 |
| FERRITIN | 625 \pm 381 | 592 \pm 325 | 412 \pm 178 | 409 \pm 120 |

4. TÁBLÁZAT: A TOTÁL HOMOCISZTEINSZINET BEFOLYÁSOLÓ PARAMÉTEREK. LINEÁRIS REGRESSZIÓS ANALÍZIS EREDMÉNYE A KONTROLLOK ÉS A HEMODIALIZÁLT BETEGEK ESETÉBEN

| PARAMÉTER | KONTROLL | P-ÉRTÉK | HD-BETEGEK | P-ÉRTÉK |
|--------------------------|----------|---------|------------|---------|
| SZÉRUM FOLSAV | -0,457 | 0,001 | -0,302 | 0,006 |
| B ₁₂ -VITAMIN | -0,101 | NS | -0,347 | 0,0001 |
| NIKKEL | -0,183 | NS | -0,289 | 0,006 |
| HGB | 0,330 | 0,001 | 0,329 | 0,0001 |
| ALBUMIN | 0,249 | 0,03 | 0,316 | 0,0004 |
| CRP | -0,169 | NS | -0,230 | 0,02 |
| IL-6 | 0,329 | 0,001 | -0,190 | NS |
| RÉZ | -0,062 | NS | -0,083 | NS |
| KOBALT | -0,034 | NS | 0,048 | NS |
| VAS | -0,032 | NS | -0,081 | NS |
| TRF SAT | 0,059 | NS | -0,135 | NS |
| FERRITIN | 0,200 | NS | -0,179 | NS |
| TP | 0,069 | NS | 0,094 | NS |

2. ÁBRA: A NIKKEL KONCENTRÁCIÓFÜGGŐ HATÁSA HUMÁN PERIFÉRIÁS MONONUKLEÁRIS SEJTEK INTRACELLULÁRIS HOMOCISZTEIN (Hcy), CISZTEIN (Cys) ÉS GLUTATION (Glu) TARTALMÁRA



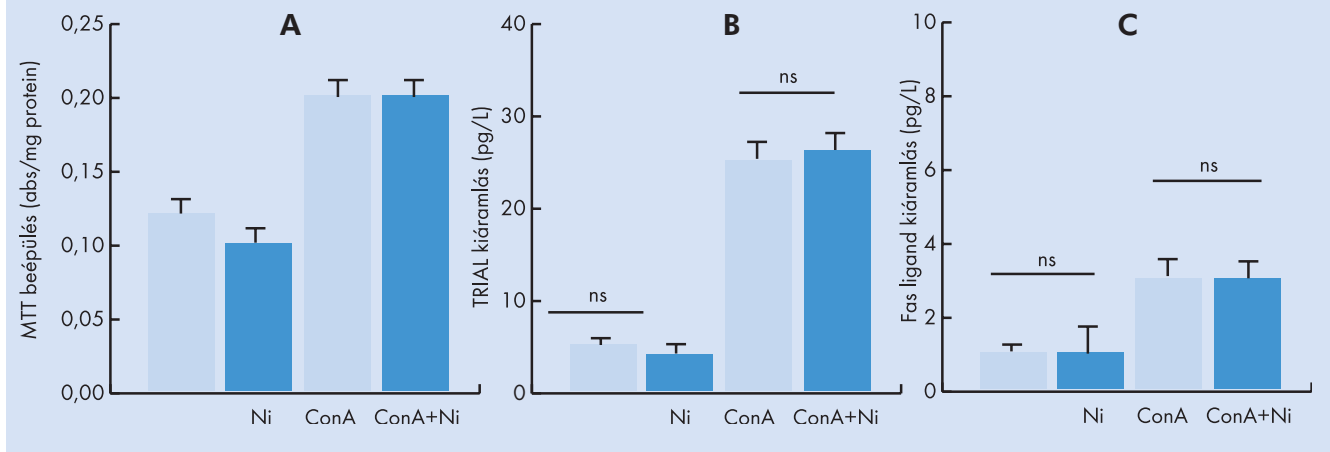
negatív összefüggést a tHcy-nel, de ez utóbbi kapcsolat nem bizonyult szignifikánsnak. A tHcy mind HD-betegek, mind egészségesek körében pozitív kapcsolatot mutat a hemoglobin és a szérum albumin koncentrációval (4. táblázat). A nikkel szint a HD-betegek esetében negatív kapcsolatot mutat a folsavval ($-0,2599$, $p<0,02$), az albuminnal ($-0,2981$, $p<0,002$), a vassal ($-0,2565$, $p<0,01$), és pozitív kapcsolatot a transferrin-szaturációval ($0,2327$, $p<0,02$).

Ismert, hogy a limfocitáknak nagy a metionin igénye, és képesek homociszteint szintetizálni (13), ezért in vitro vizsgálatainkhoz a humán perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) választottuk modellként a nikkel metionin metabolizmusra gyakorolt hatásának vizsgálatára. A nikkel a HD-betegek szérumában mért koncentráció tartományban koncentrációfüggő módon csökkentette a PBMC-ben az intracelluláris homociszteint, ciszteint és glutation tartalmát (2. ábra). A sejtek életképességét, sem a nyugvó, sem a Concanavalin A (ConA) stimulálta sejtekben a nikkel $<100 \mu\text{g/l}$ koncentrációig, amely érték fedti a betegekben talált nikkel koncentráció tartományát ($<30 \mu\text{g/l}$), nem befolyásolta (3. A ábra). A nikkel nem indukált TRAIL (3. B ábra) és Fas-ligand (3. C ábra) kiáramlást sem. A rendszerhez extracellulárisan adott homociszteint nem befolyásolta a nikkel hatását. A homociszteint irreverzibilis metabolizációja során keletkező ciszteinnek sem volt befolyásoló hatása, viszont fiziológiás koncentrációjú glutation hozzáadásával a nikkel homociszteinszint csökkentő hatása nem érvényesült (4. ábra).

MEGBESZÉLÉS

A HHC a koszorúér-betegség önálló rizikófaktora (17, 18), és gyakran az alacsony folsavszinttel hozható összefüggésbe (1, 19). Krónikus vesebetegségben a HHC magas prevalenciájának oka még nem tisztázott. Vizsgálatunk fő megállapítása, hogy HD-betegek tHcy-szintje nemcsak a folsav és a B₁₂-vitamin ellátottsággal függ össze, hanem a nyomelemek közül a nikkelkoncentrációjával is. Ebben a betegcsoportban jellemzőek a nyomelemeltérések. A szérumukban jelentősen

3. ÁBRA: A NIKKEL HATÁSA NYUGVÓ ÉS CONCAVALIN A (CONA) STIMULÁLTA PERIFÉRIÁS MONONUKLEÁRIS SEJTEK ÉLETKÉPESSÉGÉRE (A), TRAIL (B) ÉS FAS LIGAND (C) TERMELÉSÉRE. (A SEJTEKET 48 ÓRÁT INKUBÁLTUK 10 µG/L NIKKEL JELENLÉTÉBEN, ILLETVE HIÁNYÁBAN.)



magasabb nikkeltartalmat találunk a kontrollokéhoz viszonyítva. Azoknál a HD-betegeknél, akik viszonylag alacsony tHcy (<20 µmol/l) koncentrációval rendelkeztek, szignifikánsan magasabb volt a szérumban a nikkel szintje. Ez az összefüggés egészségeseknél is megfigyelhető, de a kapcsolat nem szignifikáns. Ez az eredményünk összhangban van korábbi megfigyelések eredményeivel (20). A többi vizsgált nyomelem (kobalt, réz, vas) esetében nem találtunk összefüggést a tHcy-szinttel, azonban a tHcy és nikkeltartalom közötti kapcsolat felveti annak lehetőségét, hogy az állatkísérletekben tapasztaltakhoz hasonlóan (5, 10), a nikkelt szabályozó szerepet játszik a metionin-homociszteint-folsav kör működésében. HD-betegek tHcy-szintjét összevetve a többi vizsgált paraméterrel azt láthatjuk azonban, hogy a betegek számára nem kifejezetten kedvező az

alacsony vagy normál tartományban lévő tHcy. A magasabb tHcy-szintekhez (>20 µmol/l) alacsonyabb CRP és IL-6, illetve magasabb szérumban albumin- és hemoglobinszintek társultak. Figyelembe véve, hogy a HD-betegekre jellemző felgyorsult ateroszklerózisban jelentős szerepet játszik a malnutríció, és a malnutríció a fokozott gyulladásos folyamatokkal együtt – amelyek az emelkedett CRP és IL-6 szintekkel jellemezhetőek – növeli a betegek mortalitását (22), az alacsony tHcy esetében nem tűnik kedvező hatásúnak.

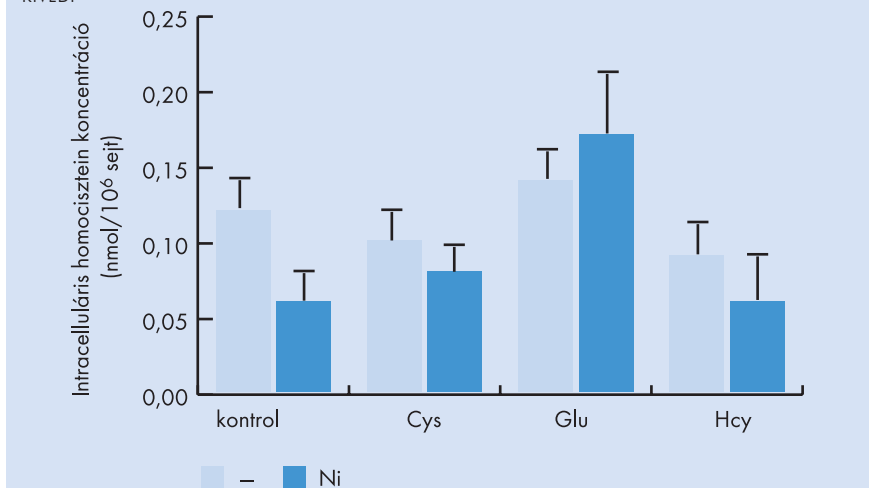
In vitro vizsgálataink eredményei igazolták a nikkelt metionin-folsav ciklusra gyakorolt hatását. A nikkelt a HD-betegekben talált koncentráció-tartományban (≤50 µg/l) szignifikánsan csökkentette a humán PBMC-ben a homociszteint, a ciszteint és a glutation termelését. A nikkelt homociszteint termelést csökkentő hatásának mechanizmusa

nem tisztázott. Több lehetőség merülhet fel, amelyek közül az egyik, hogy a nikkelt közvetlenül a homociszteint képződéséhez vezető folyamatokat gátolja. Szervezetünkben a homociszteint egyetlen közvetlen forrása a SAH, amelyet a SAH-hidroláz (SAHH) enzim alakít homociszteinné és adenozinná. Ebben a folyamatban a nikkelt akár magát az SAHH enzimet, akár az enzim szubsztrátjaként szolgáló SAH, SAM-ból történő keletkezését gátolhatja, mindkét lépés gátlása a homociszteint szint csökkenését eredményezheti. A másik lehetőség, amely hatásosan felmerül, hogy a nikkelt a homociszteint továbbalakulását gyorsítja vagy a remetiláció, vagy a transzszulfurációs útvonal aktivitásának fokozásával (1. ábra). A nikkelt kezelés hatására azonban a sejtekben a homociszteint mellett a ciszteintartalom is csökkent, ezért a nikkelt transzszulfurációt fokozó, irreverzibilis eltávolítást eredményező hatásának lehetőségét elvetettük.

Korábban megfigyelték, hogy nagy koncentrációjú nikkelt (>100 µmol/l) növeli a DNS metiláltságot limfocitákban (21), azaz fokozza a SAM→SAH átalakulást igénylő transzmetilációt. Ennek következménye a SAH koncentráció emelkedése, ami a homociszteint szint növekedéséhez vezet. A homociszteint szint ebben az esetben csak akkor csökkenhetne, ha a metioninná történő remetilációja fokozódna. Jelenleg ennek a kérdésnek a megválaszolásán dolgozunk.

Több vizsgálat igazolta a nikkelt toxikus hatását (3). A vízoldékony kétértékű nikkelt (pl. NiCl₂, NiSO₄) kevésbé toxi-

4. ÁBRA: A NIKKEL INDUKÁLTA INTRACELLULÁRIS HOMOCISZTEINSZINT CSÖKKENÉST AZ EXTRACELLULÁRIS HOMOCISZTEIN (Hcy), CISZTEIN (Cys) NEM BEFOLYÁSOLJA, MÍG A GLUTATION (GLU) KIVÉDI



kus, mint a magasabb oxidációs állapotú (pl. Ni_2O_3) formái (23). A nikkelt hatását több sejttípusban tanulmányozták. Kimutatták, hogy a nikkelt Fas-ligand expresszió növelésén keresztül apoptózist indukál (24), és reaktív oxigénradikálok képződését idézi elő (25).

Vizsgálati eredményünk, amely szerint a glutation kivédi a nikkelt homociszteint csökkentő képességét, feltehetően arra vezethető vissza, hogy az oxidatív stressz is szerepet játszik a nikkelt hatásában, közvetve vagy közvetlenül. Azonban a nikkelt az általunk alkalmazott koncentrációtartományban nem befolyásolja a sejtek életképességét, proliferációs képességét, Fas-ligand és TRAIL-termelését és nem indukál apoptózist. Ez a megállapításunk mégsem mond ellent a felsorolt vizsgálatok eredményeinek, hiszen a toxicitási vizsgálatokban nagyságrendekkel mag-

sabb koncentrációjú ($\geq 100 \mu\text{mol/l}$) nikkelt hatását vizsgálták, szemben az általunk használttal, amely a HD-betegek szérumban mért (patofiziológias koncentráció) $< 900 \text{ nmol/l}$ volt. A nikkelt akkumuláció oka és módja HD-betegek esetében nem ismert. A nikkelt és a vas szérumban koncentráció között tapasztalt negatív kapcsolat arra utal, hogy a táplálékból történő nikkelt abszorpciója az emberben is az állatkísérletekben igazolt módon történik. Megállapították ugyanis, hogy a vashiányos állatokban a nikkelt felszívása nagyobb mértékű, mint a jó vas-ellátottságúakban (26). Ez a megfigyelés összhangban áll azokkal a korábbi közleményekkel, amelyek szerint a nikkelt a szervezetben a vas útvonalát használja és csökkenti a sejtek vaskoncentrációját (27, 28).

A HD-betegekre jellemző vashiány a

nikkeltakkumuláció magyarázataként szolgálhat.

KÖVETKEZMÉNY

HD-betegek szérumban jelentős nyomelem-eltéréseket tapasztaltunk. A magas szérumban nikkelt koncentráció alacsony tHcy-értékekkel járt együtt. A nikkelt, a betegekben mért koncentrációtartományban, szignifikánsan csökkentette a humán PBMC-k homociszteint, ciszteint és glutation tartalmát. Feltételezhetjük, hogy a nikkelt metionin-folsav ciklusra gyakorolt hatása emberi szervezetben is érvényesül, az állatmodellben korábban leírtakhoz hasonlóan. A közlemény megjelent a *Journal of Biological Trace Element Research* című folyóiratban (29).

Köszönetnyilvánítás: A kutatást az OTKA Bizottság támogatta (T 42550, T 48596).

IRODALOM

- Wilcken DE. Novel risk factors for vascular disease: the homocysteine hypothesis of cardiovascular disease. *J Cardiovasc Risk* 1998; 5: 217–221.
- Perna AF, Ingrassio D, Castaldo P, et al. Homocysteine a new crucial element in the pathogenesis of uremic cardiovascular complications. *Miner Electrolyte Metab* 1999; 25: 95–99.
- Gupta A, Robinson K. Hyperhomocysteinemia and end stage renal disease. *J Nephrol* 1997; 10: 77–84.
- Ingrassio D, Cimmino A, Perna AF, et al. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinemia in patients with uremia. *Lancet* 2003; 361: 1693–1699.
- Manns B, Hyndman E, Burgess E, et al. Oral vitamin B12 and high-dose folic acid in hemodialysis patients with hyperhomocyst(e)inemia. *Kidney Int* 2001; 59: 1103–1109.
- Nielsen FH, Myron DR, Givand SH, et al. Nickel deficiency in rats. *J Nutr* 1975; 105: 1620–1630.
- Stangl GI, Kirchgessner M. Nickel deficiency alters liver lipid metabolism in rats. *J Nutr* 1996; 126: 2466–2473.
- Nielsen FH, Uthus EO, Poellot RA, et al. Dietary vitamin B12, sulfur amino acids, and odd-chain fatty acids affect the responses of rats to nickel deprivation. *Biol Trace Elem Res* 1993; 37: 1–15.
- Uthus EO, Poellot RA. Dietary nickel and folic acid interact to affect folate and methionine metabolism in the rat. *Biol Trace Elem Res* 1997; 58: 25–33.
- Stangl GI, Roth-Maier DA, Kirchgessner M. Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia are partly ameliorated by cobalt and nickel supplementation in pigs. *J Nutr* 2000; 130: 3038–3044.
- Dombovari J, Varga Z, Becker JS, et al. ICP-MS determination of trace elements in serum samples of healthy subjects using different sample preparation methods. *Atom Spectrosc* 2001; 22: 331–335.
- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77–89.
- Crott J, Thomas P, Fenech M. Normal human lymphocytes exhibit a wide range of methionine dependency which is related to altered cell division but not micronucleus frequency. *Mutagenesis* 2001; 16: 317–322.
- Ubbink JB, Hayward Vermaak WJ, Bissbort S. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *J Chromatogr* 1991; 565: 441–446.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr A. Protein measurement with folin reagent. *J Biol Chem* 1951; 125: 265–273.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 1987; 47: 943–946.
- McCully KS, Wilson RB. Homocystein theory of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* 1975; 22: 215–227.
- Van Guldener C, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 281–289.
- Van Guldener C, Kulik W, Berger R, et al. Homocysteine and methionine metabolism in ESRD: a stable isotope study. *Kidney Int* 1999; 56: 1064–1071.
- Mansoor MA, Bergmark C, Haswell SJ, et al. Correlation between plasma total homocysteine and copper in patients with peripheral vascular disease. *Clin Chem* 2000; 46: 985–991.
- Lee YW, Broday L, Costa M. Effects of nickel on DNA methyltransferase activity and genomic DNA methylation levels. *Mutat Res* 1998; 415: 213–218.
- Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Block G, et al. A malnutrition-inflammation score is correlated with morbidity and mortality in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 1251–1263.
- Barceloux DG. Nickel. *Clin Toxicol* 1999; 37: 239–258.
- Kim K, Lee SH, Seo YR, et al. Nickel(II)-induced apoptosis in murine T cell hybridoma cells is associated with increased fas ligand expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 185: 41–47.
- Manini P, Napolitano A, Camera E, et al. Ni^{2+} enhances Fe^{2+} /peroxide-induced oxidation of arachidonic acid and formation of genotoxic 4-hydroxynonenal: a possible contributory mechanism in nickel toxicity and allergenicity. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1621: 9–16.
- Tallkvist J, Tjalve H. Effect of dietary iron deficiency on the disposition of nickel in rats. *Toxicol Lett* 1997; 92: 131–138.
- Chen H, Davidson T, Singleton S, et al. Nickel decreases cellular iron level and converts cytosolic aconitase to iron-regulatory protein 1 in A549 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206: 275–287.
- Davidson T, Chen H, Garrick MD, et al. Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis. *Mol Cell Biochem* 2005; 27: 157–162.
- Katko K, Kiss I, Karpati I, et al. Relationship between Serum Nickel and Homocysteine Concentration in Hemodialysis Patients. *Biol Trace Elem Res* 2008; 124 (3): 195–205.