

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Végstádiumú veseelégtelen betegek fokozott vaszkuláris  
rizikó faktorainak vizsgálata**

**dr. Becs Gergely**

**Témavezető: Dr. Balla György**



**DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2019**

# 1 Tartalomjegyzék

1	Tartalomjegyzék.....	2
2	Rövidítések jegyzéke .....	5
3	Bevezetés .....	7
3.1	Krónikus vesebetegség .....	7
3.2	Végstádiumú veseelégtelenség, vesepótló kezelések .....	8
3.3	A vesebetegség rizikófaktorai és a vesebetegség, mint rizikó faktor .....	10
3.4	Vaszkuláris eltérések vesebetegségben .....	11
3.5	Hemoxigenáz-ferritin rendszer szerepe a vaszkuláris betegségekben.....	12
3.6	Véralvadási rendszert érintő változások vesebetegségben .....	13
4	Célkitűzések.....	14
5	Anyagok és módszerek .....	16
5.1	Sejtkultúra és reagensek .....	16
5.2	Alkalikus foszfatáz aktivitás mérése .....	16
5.3	Alkalikus foszfatáz enzimaktivitás festése .....	17
5.4	Kalcium depozíció mérése.....	17
5.5	Oszteokalcin meghatározás .....	18
5.6	Fehérjetartalom meghatározás .....	18
5.7	Western blot.....	18
5.8	Kvantitatív RT-PCR .....	19
5.9	Ferritin nehéz lánc siRNA transzfektálás .....	20
5.10	D-vitamin receptor agonisták in vivo vizsgálata .....	20
5.11	Beteg beválogatás és dialízis kezelések.....	21
5.12	Vérvétel és sejtszámlálás .....	22

5.13	Vérlemezke szegény plazma (PPP, platelet poor plasma) készítés és a szolubilis markerek mérése .....	23
5.14	Áramlási citometriás vizsgálatok.....	23
5.15	Statisztikai analízisek .....	24
6	Eredmények .....	25
6.1	A béta-glicerolfoszfát és az aktivált D <sub>3</sub> vitamin kezelés a vaszkuláris simaizomsejtek csontsejtszerű transzformációját idézi elő.....	25
6.2	A ferritin képes gátolni az Alp aktivitás indukcióját.....	27
6.3	A ferritin humán aorta simaizomsejtek csontsejtekké történő differenciálódását gátló mechanizmusának magyarázata .....	32
6.4	A ferroxidáz aktivitás a kulcs a csontsejtszerű átalakulás gátlásában .....	34
6.5	A humán aorta simaizomsejtek mineralizációját gátolja a ferritin nehéz lánc .....	35
6.6	D-vitamin receptor agonisták szerepe a csontsejtszerű transzformációban .....	39
6.7	Különböző D-vitamin receptor agonisták in vivo vizsgálata .....	39
6.8	A dialízis kezelés alatt végbemenő változások kiértékelése .....	41
6.9	Direkt vérlemezke aktivációs markerek .....	42
6.10	Vérlemezke-fehérvérsejt aggregátumok.....	44
6.11	Kontroll mérések .....	45
6.12	Endotél sejt aktiváció.....	49
7	Diszkusszió .....	50
8	Összefoglalás .....	58
9	Summary .....	59
10	Tárgyszavak/Keywords.....	60
11	Köszönetnyilvánítás .....	61
12	Irodalomjegyzék .....	62

13	Publikációs lista .....	67
14	Függelék.....	69

## 2 Rövidítések jegyzéke:

**ACR:** albumin kreatinin hányados (albumin creatinine ratio)

**Alp:** alkalikus foszfatáz enzim

**BGP:**  $\beta$ -glicerolfoszfát

**BSA:** borjú szérum albumin (bovine serum albumin)

**Cbfa1:** core binding factor alpha 1

**cDNS:** komplementer DNS

**CFU:** colony forming unit

**CKD-EPI:** Chronic Kidney Disease - Epidemiology

**D3T:** 1,2-ditiol-3-tion

**DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium

**EDTA:** etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)

**ELISA:** enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)

**FACS:** fluoreszcencia aktivált sejtválogatás (fluorescence activated cell sorting)

**FBS:** magzati borjú szérum (fetal bovine serum)

**FITC:** fluoreszcein-izotiocianát (Fluorescein isothiocyanate)

**FtH:** ferritin nehéz lánc (ferritin heavy chain)

**FtL:** ferritin könnyű lánc (ferritin light chain)

**GAPDH:** gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

**GFR:** glomerulus filtrációs ráta

**HAoSMC:** humán aorta simaizomsejt (human aortic smooth muscle cell)

**HD:** hemodialízis

**HDF:** hemodiafiltráció

**HO-1:** hem-oxigenáz-1 enzim

**KVB:** krónikus vesebetegség

**MDRD:** modified diet in renal disease

**mRNS:** messenger RNS

**OCM:** online clearance monitoring

**PBS:** foszfát pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)

**PCR:** protein kreatinin hányados (protein creatinine ratio)

**PE:** phycoerythrin

**PFA:** paraform-aldehyd

**Pit-1:** nátrium-foszfor ko-transzporter 1 fehérje

**PPP:** thrombocyta szegény plazma (platelet poor plasma)

**PSGL1:** P-szelektin glicoprotein ligand-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1)

**RANKL:** receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

**SDS:** nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate)

**PAGE:** poliakrilamid gélelektroforézis (polyacrylamide gel electrophoresis)

**siRNA:** small interfering RNA

**TBS-T:** tris pufferelt sóoldat Tween 20 kiegészítéssel (tris-buffered saline-Tween 20)

**vWF:** von Willebrand factor

## 3 Bevezetés

### 3.1 Krónikus vesebetegség

A fejlett országokban a krónikus vesebetegség (KVB) egyre jelentősebb epidemiológiai problémát jelent, mely jelentős egészségügyi kiadásokat vonz magával. [1-3] A vese funkció alapján 5 stádiumot különböztetünk meg, ahol az 5. stádium már nagyrészt a vesepótló kezelésre szoruló végstádiumú veseelégtelenséget jelenti. Egyes becslések szerint a lakosság 10%-a szenved krónikus vesebetegségben, azonban csak egy részük kerül felismerésre idejében, sajnos igen gyakran sürgősséggel kell vesepótló kezelést indítani.

A krónikus vesebetegség stádiumait a glomerulus filtrációs ráta (GFR) alapján lehetséges beosztani. A GFR klirensz alapú számítása bonyolult, 24 órás vizeletgyűjtést igényel, emiatt a mindennapi gyakorlatban a becsült GFR (estimated GFR, eGFR) nyert teret. Az eGFR számításánál nagy esetszámú tanulmányok alapján, olyan tapasztalati képletet igyekeztek megalkotni, mely a számításhoz szükséges tényleges vizsgálatokat (pl.: vérvétel, vizeletgyűjtés, stb.) minimalizálják és a laboratórium számára egyébként is hozzáférhető antropometria adatokat használják fel. A Cockcroft-Gault képlet, mely az első igazán jól használható formula volt eGFR számításhoz, még számos problémával szembesítette az eredményközlő laboratóriumokat, vagy éppen a szérum kreatinin értékekből vesefunkciót számoló szakembereket. [4] A képlet szérum kreatinin, mint egyetlen mért paraméter mellett az egyén életkorát, nemét és testsúlyát vette figyelembe az eGFR számításnál. A testsúly rögzítése a vizsgálatkérő lapon nehézkessé tette a számítás automatizálását, de talán még ennél is nagyobb hátránya volt a képletnek, hogy megalkotása során csak vesebeteg emberek mintáit vették alapul, így csak a 60 ml/perc értéknél kisebb tartományban volt megbízható. A kapott eredmény pedig nem volt testfelszínre normalizálva. Az eGFR számítás következő mérföldköve a „Modification of Diet in Renal Disease” (MDRD) című tudományos kutatás alapján megalkotott képlet volt. [5] A gyakorlatban sok helyen még mindig ezt a formulát használják, melynek oka a korábbi széleskörű elterjedtsége. A képlet a szérum kreatinin szint mérése mellett az egyén életkorát, nemét veszi figyelembe, ill. itt már azt is, hogy melyik rasszba tartozik. A nem mért változók egyszerűen elérhetőek bármely laboratórium számára és az egyént illetve állandóak, ill. az életkor vonatkozásában egyszerű számítással meghatározható. A formula egyetlen hibája, hogy a háttérül szolgáló vizsgálatban ismételten csak vesebeteg egyéneket vontak be, így a megbízhatósága 60 ml/perc/1,73 m<sup>2</sup> alatt érvényesül. 2009-ben kollaborációs vizsgálat kapcsán került megalkotásra a „Chronic Kidney Disease – Epidemiology” (CKD-EPI) formula. [6] A vizsgálatba beválogatott egyének között

vesefunkciót illetően egészséges emberek is szerepeltek, kibővítve ezzel a korábbi vizsgálatok határait 60 ml/perc/1,73 m<sup>2</sup> felé, mely így már 90 ml/perc/1,73 m<sup>2</sup>-ig volt megbízható. A számításhoz alkalmazott képlet az MDRD-nek megfelelő paramétereket használja.

Az eGFR érték birtokában a stádium beosztást elvégezhetjük, a rendszeresen ellenőrzött vesefunkció meghatározással pontosan nyomon követhetjük a változás dinamikáját. (1. táblázat) Az I. stádium esetén az eGFR érték a normál tartományban van, viszont a fennálló strukturális és a funkcionális eltérések alapján már használhatjuk ezt a besorolást. A III. stádium megbontása 2 alcsoportra a krónikus vesebetegség kimenetelében észlelhető progresszió alapján történt, mely szerint 45 ml/perc/1,73 m<sup>2</sup>-es értéket elérve a folyamat progressziója már nem állítható meg, egyetlen lehetőség a folyamat előrehaladásának lassítása. A progresszió során, vagy egyéb úton kialakult 15 ml/perc/1,73m<sup>2</sup> értéket elérő, vagy ennél is kisebb esetben a vesefunkciót már végstádiumú veseelégtelenségnek nevezzük.

### **3.2 Végstádiumú veseelégtelenség, vesepótló kezelések**

A fokozatosan beszűkülő vesefunkció nem feltétlenül jár a vizeletmennyiségének arányos csökkenésével, de definíció szerint együtt jár a salakanyagok csökkent eltávolításával. 15 ml/perc értéknél már olyan mértékű a romlás, hogy a salakanyagok felszaporodás károsan befolyásolja a szervezet egészséges működését. Szerencsére napjainkban egyre ritkábban vagy csak elvétve találkozunk igazi urémiás beteggel, akinél többek között encephalopathia, pericarditis, polineuropathia és a jellegzetes urémiás lehellet, fetor észlelhető. A kiesett vesefunkció pótlására a vesetranszplantáció a legmegfelelőbb, azonban a krónikus vesebetegséggel küzdők számos társbetegséggel rendelkeznek, melyek relatív vagy abszolút módon kontraindikálják a beavatkozást. A jelenleg alkalmazott immunrendszer elnyomó gyógyszeres terápiás protokollok mellett a cadaver donorból származó vesék túlélése is jelentősen javult, így a betegek 5-10, gyakran 15 évet is meghaladva tudják elkerülni a vesepótló kezelések egyéb formáit. Amennyiben a vesetranszplantáció nem lehetséges, vagy a beültetett vese funkcióvesztésének következtében a vesefunkció ismételen 10 ml/perc alá csökken, akkor dialízis kezelés válik szükségessé. A dialízisnek két fő formája ismert, a hemodialízis és a peritonealis dialízis. A hemodialízis során a beteg vérének féláteresztő membránon átvezetve dializáló oldat segítségével megtisztul a kis molekulású salakanyagoktól diffúzió segítségével. A diffúzió és ellenáramlás elvén működő kezelési típust hemodialízis modalitásnak is nevezzük. Hemodialízis során a membrán kb. 10 kDa pórus méretét meghaladó molekulák esetén gyakorlatilag nincs

lehetőségünk diffúzióval méregtelenítést végezni. Az elmúlt évtizedekben számos technikát dolgoztak ki a nagyobb molekulaméretű anyagok eltávolítására. A hemofiltráció során megnövelt hidrosztatikus nyomás alkalmazásával a konvektív transzportnak nevezett folyamat segítségével nyílik lehetőség a mérgeanyagokat a plazmával együtt eltávolítani. Kezelésenként legalább 18 liter folyadékeltávolítás során csökkent kardiovaszkuláris rizikót és jobb túlélési eredményeket írtak le. Az elveszített folyadék mennyiséget steril infúziós oldattal szükséges pótolni. A folyamat során alkalmazott infúziós oldat előállítási költsége igen jelentős, mely sokáig akadályozta a szélesebb elterjedését. Másik fontos hátránya a hemodialízishez viszonyított rosszabb salakanyag eltávolítás az alacsonyabb molekulatömegű salakanyagok viszonylatában. Mondhatni kompromisszumként, de sokkal inkább mindkét modalitás előnyeit figyelembe véve alkották meg a hemodiafiltrációs kezelést.[7-9] A legmodernebb eljárásnak tekinthető modalításban a dializáló oldat mellett a szubsztitúciós folyadék összetétele is a betegek igényei és eredményei alapján testre szabhatóak.[10] Az oldatok kálium tartalma a szérum kálium szintjének megfelelően állítható (2-3-4 mmol/L). A kalcium koncentrációját a vaszkuláris kalcifikáció fokozott rizikója miatt a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani (1,25 mmol/L). A magnézium (0,5 mmol/L) és glükóz (1 g/L) koncentráció fix az oldatokban. Az acidosis korrekciója miatt alkalmazott bikarbonát szint pedig a rendszeresen ellenőrzött vérgáz értékek alapján kerül beállításra (24-40 mmol/L). A járóbeteg ellátásként végzett, de mégis intézethez kötött, a betegek szállításával járó hemodialízissel szemben a peritonealis dialízis a betegek számára egy sokkal szabadabb életet, jobb életminőséget biztosít. A hasi dialízis alapja a hashártyának féligáteresztő membránként való alkalmazása. A vékony egyrétegű köbhámból és basalis membránból álló struktúra lehetővé teszi a salakanyagok diffúzióval történő dializáló oldatba jutását. A szervezet számára felesleges folyadék eltávolítása a dializáló folyadékban lévő glükóz által fenntartott onkotikus nyomás hatására valósul meg. Az oldatok glükóz tartalma különbözik, attól függően mekkora mennyiségű folyadék eltávolításra van szükségünk és ezt a beteg hashártyája mennyire teszi lehetővé. Sok esetben a legalacsonyabb, 1,5%-os glükóztartalom mellett is kielégítő a folyadékeltávolítás, elkerülve így a hashártya magas glükóz által okozott fokozott előregedését, fibrotikus átalakulását. Jó néhány esetben csak a magas cukortartalom, vagy speciális szénhidrátoldat (icodextrin) nyújthat segítséget. A peritonealis dialízis képes hosszán fenntartani a maradék vesefunkciót, megőrizni a vizelettermelést és nagyobb fluktuációktól mentesen relatíve alacsony koncentráción tartani a salakanyag szinteket. Ideális lehetőség tehát a vesetranszplantációig a vesefunkció pótlására. A hashártya idővel sajnos elveszíti ideális tulajdonságait és elégtelenné válik hasi dialízis kezelésre, ilyenkor a fentebb

említett hemodialízis kezelés hemodiafiltrációs modalitással lehet és kell a kieső vesefunkció pótlását végezni.

### **3.3 A vesebetegség rizikófaktorai és a vesebetegség, mint rizikó faktor**

A krónikus vesebetegség kialakulásának háttérében számos szisztémás betegség állhat, melyeket azonban a manifesztálódó vesebetegség is súlyosbíthat. Jól ismert a magasvérnyomás-betegség, az érlemezésedés és a cukorbetegség szerepe a vesebetegségek létrejöttében. Ugyanakkor a hipertónia és a diabetes képes többszörösére emelni az érlemezésedés kialakulásának és gyors progressziójának a kockázatát, ill. a fokozott érlemezésedés pedig a magasvérnyomásbetegséget súlyosbíthatja. Mindhárom esetben azonban a vaszkuláris rendszerre kifejtett direkt és indirekt hatások folytán nagyságrendekkel képesek emelni a kardiovaszkuláris és cerebrovaszkuláris megbetegedések és halálozások kockázatát. A fejlett országokban a kardiovaszkuláris eredetű halálozás a vezető halálokok között szerepel, annak ellenére is, hogy az utóbbi évtizedekben robbanásszerűen javult a kardiológiai intervenciós ellátás, sokkal szélesebb körű ismeretekkel rendelkezünk a betegségek kialakulásához vezető állapotokkal kapcsolatban, ezáltal a megelőzésre is sokkal komolyabb hangsúlyt lehetne fektetni.

Epidemiológiailag az örökletes kórképek (pl.: policisztás vesebetegség mindkét formája, Alport-szindróma, köröm-patella szindróma, vékony basalis membrán betegség, stb.) és közvetlen a veseszövetet érintő kórképek, mint glomerulonephritisek, interstitialis nephritisek és tubulopathiak is jelentős szerepet játszanak a krónikus vesebetegségek kialakulásában. Az alapbetegség vagy a kialakult krónikus vesebetegség gyakran jár együtt a vizeletben fehérjeürítés megjelenésével. A proteinuria azonban nemcsak diagnosztikai paraméter, hanem a vesebetegek fokozott kardiovaszkuláris rizikójának egyik független kockázati tényezője.[11] (1. táblázat)

			Proteinuria stádiuma (mg/mmol)			
			Normoalbuminuria ACR < 3	Mikroalbuminuria ACR 3-30	Proteinuria PCR 45-350	Nefrotikus proteinuria PCR > 350
KVB stádium GFR alapján (ml/perc/1,73 m <sup>2</sup> )	I	>90 magas/normális	alacsony	mérsékelt	nagy	igen nagy
	II	60-89 enyhén csökkent	alacsony	mérsékelt	nagy	igen nagy
	III/a	45-59 mérsékelt VE	mérsékelt	nagy	igen nagy	igen nagy
	III/b	30-44 középsúlyos VE	nagy	igen nagy	igen nagy	igen nagy
	IV	15-29 súlyos VE	igen nagy	igen nagy	igen nagy	igen nagy
	V	<15 végstádiumú VE	igen nagy	igen nagy	igen nagy	igen nagy

**1. táblázat: Krónikus vesebetegség kombinált GFR és proteinuria alapú beosztása és az egyes kategóriák rizikója kedvezőtlen vesekimenetek és kardiovaszkuláris halálozás szempontjából.** ACR: albumin kreatinin arány, PCR: totál protein kreatinin arány, VE: veseelégtelenség, KVB: krónikus vesebetegség, GFR: glomerulus filtrációs ráta. (módosítva a MANET irányelvből)[11]

Jól látható, hogy a nefrotikus mértékű proteinuria még viszonylag megtartott vesefunkciós értékek mellett is igen nagy kardiovaszkuláris kockázatot jelent. A krónikus vesebetegség egyre súlyosabb stádiumainál egyre nagyobb a kardiovaszkuláris rizikó, melyet csak tovább súlyosbít a proteinuria

### 3.4 Vaszkuláris eltérések vesebetegségben

A krónikus vesebetegség romlásával egyenes arányban fokozódik a kardio- és cerebrovaszkuláris rizikó. A kardiovaszkuláris megbetegedések jelentik a legfőbb halálozási okot a KVB-ben szenvedő betegek számára.[12-14] Ennek függvényében a vaszkuláris kalcifikáció és a szövődményei továbbra is komoly klinikai kihívást jelentenek, amit csak fokoz a tény, hogy a vesepótló kezelést igénylő végstádiumú veseelégtelenség kapcsán felgyorsul a progresszió.[15] A vaszkuláris kalcifikáció kapcsán két különböző entitást kell megkülönböztetnünk, mely szövettani vizsgálatok kapcsán el is különíthető egymástól, de gyakran a társbetegségek miatt akár egyszerre is jelen lehet és együttesen ronthatják a betegek életminőségét és okozhatnak súlyos következményeket. Az intimaszklerózis ateroszklerotikus léziókban jelentkezik, míg a tunica media simaizomsejtjeit érintő kalcifikációt a Mönckeberg-féle szklerózisban látjuk.[16] Korábban a media kalcifikációra passzív és jóindulatú folyamatként tekintett az irodalom, azonban mára egyre több bizonyíték utal a morbiditásban és mortalitásban betöltött fontos szerepére, melyet a csökkent artériás tágulékonyosság és a bal kamra hipertrófia következtében alakul ki.[17] Manapság már ismert tényként tekintünk az érrendszer egészét érintő kalcifikációra, ahol egy alaposan szabályozott folyamat során a simaizomsejtek csontsejtszerű sejtekké alakulnak át. A transzdzifferenciációs folyamat során a

simaizomsejtre jellemző fehérjemintázatot (pl.: alfa-aktin, SM22alfa) elveszítik és oszteoblasztokra jellemző fehérjék expressziója indukálódik. Az átalakulás során a runx2 transzkripciós faktornak van kulcsfontosságú szerepe, mely aztán a csontsejtre jellemző fehérjék expresszióját fokozza. Emelkedik az oszteokalcin, az oszteopontin, az oszteoprotegerin, a mátrix Gla protein és az alkalikus foszfatáz szintje. Az alkalikus foszfatáz enzim szintjében bekövetkező változás jól mutatja a sejtek átalakulását.[18, 19] Az alkalikus foszfatáz alapvetően egy hidroláz enzim, mely fontos szerepet tölt be a korai oszteogenezisben és kiemelkedő szereppel bír a hidroxipatit kialakulását gátló pirofoszfát szint csökkentésében annak hidrolizációja révén. Ismerve az alkalikus foszfatáz funkcióját és a bizonyítottan meghatározó szerepét a simaizomsejtek csontsejtszerű átalakulásban talán a leggyakrabban használt marker, mellyel a vaszkuláris kalcifikáció kialakulását és lefolyását lehet nyomon követni.[18] A transzdifferentiációs folyamat másik fontos indikátora az oszteokalcin, mely a csontmátrix fő, nem kollagén természetű fehérjéje és jelen tudásunk szerint a mineralizáció szabályozásában játszik meghatározó szerepet.[19] Számos faktort sikerült azonosítani, melyek a vaszkuláris kalcifikáció kialakulását és progresszióját elősegítik, ill. gátolják.[20] Az egyik legpotensebb induktor az emelkedett foszfát szint. A krónikus vesebetegek esetén a vaszkuláris kalcifikáció jelentős rizikó faktora a hiperfoszfátémia, melyet klinikai, állatkísérleti és in vitro vizsgálatok egyre meggyőzőbb adatokkal támasztanak alá.[21-24] Ugyancsak felgyorsítja a kalcifikáció folyamatát a D-vitamin, azonban különböző formájában eltérő mértékben.[25, 26]

### **3.5 Hemoxigenáz-ferritin rendszer szerepe a vaszkuláris betegségekben**

Korábban kutatócsoportunk már igazolta, hogy a hem-oxigenáz-1/ferritin rendszer aktiválása kedvezően befolyásolja a magas inorganikus foszfát indukálta in vitro kalcifikációt. Az eredmények alapján a vas függetlenül a redox állapotától kiszabadulva a hem csoportból képes gátolni a kalcium lerakódását dózisfüggő módon simaizomsejteken magas inorganikus foszfát jelenlétében.[27] További vizsgálatok során sikerült azonosítani a gátló hatásért felelős, vas által indukált ferritin nehéz lánc expressziót. A rekombináns nehézlánc és speciális aktív centrumában gátolt mutáns variánsával történt kezelés során sikerült azonosítani a ferroxidáz aktivitás protektív hatását.[27, 28] Az előrehaladott krónikus vesebetegség és a vesepótló kezelést igénylő veseelégtelenség gyakran társul a hiperfoszfátémia mellett vashiányal.[29] A legfontosabb faktorok a vashiány hátterében többnyire a hemodialízis alatt jelentkező vérvesztés, a fistula punkcióból származó vérzés és a nagyon gyakori diagnosztikus vérvételek állnak. Továbbá a krónikus gyulladással járó

betegségekben, mint amilyen a krónikus vesebetegség, számtalan citokin túltermelése jelentkezik, mely számos egyéb hatása mellett a hepcidin fokozott termelését okozza, ami a ferroportin degradációjához vezet.[30] Összességében az úgynevezett funkcionális vashiány alakul ki, ami később az intracelluláris ferritin csökkenéséhez vezet. A fentiek alapján, már korábbi vizsgálataink alapján is azt feltételeztük, hogy a vashiány és a csökkent intracelluláris ferritin nehézlánc együttesen rontja a kalcifikációs folyamatot a vesebetegek esetében és valószínűleg a FtH túltermelése gátló hatású lehet az érrendszer mineralizációjában előrehaladott KVB-ben. Figyelembe véve a vas tulajdonságát, hogy szinte azonnal képes elektron felvételre és leadásra, érthető, hogy a vas túladagolás és túltelítés a fiziológias határokon túl reaktív oxigén gyökök termeléséhez és következményes károsodáshoz vezet.[31] A fentiek alapján esett a választásunk a 1,2-ditiol-3-tion-ra (D3T), mely amellet, hogy a vegyi anyagok indukálta tumorgenezis erős gátlószere, képes a ferritin expresszióját indukálni.[32, 33] A ferritin indukció vastól függetlenül alakul ki, amelyért az elektrofil/antioxidáns válaszelem a felelős.[33]

### **3.6 Véralvadási rendszert érintő változások vesebetegségben**

Számos kutató vetette már fel kutatási témaként a koagulációs rendszer és vérlemezkéket érintő változások vizsgálatát hemodializált betegekben. Fontos megemlíteni, hogy a szöveti faktor rendszer szerepét sikerült azonosítani a kardiovaszkuláris rendszert érintő betegségekben, ill. vizsgálatok kapcsán a végstádiumú veseelégtelen betegekben emelkedettebb monocyta eredetű szöveti faktor és adhéziós molekula szinteket találtak.[34] A hemodialízis igényű végstádiumú veseelégtelen betegek körében még kifejezettebben jelentkezett ez a hatás.[35] Korábbi extracorporális keringést vizsgáló tanulmányunkban sikerült beazonosítani a fehérvérsejt aktivációt a véralvadási rendszer receptorok ismeretében.[36, 37] Tanulmányok során gyakran merült fel kérdésként a vérlemezkék számában és funkciójában [38, 39], a vérlemezke, endotél sejt és koagulációs rendszer protrombotikus irányba bekövetkező változásainak vizsgálata.[40] Azonban ezidáig csak egy alkalommal vizsgálták a vérlemezke aktivációt a hemodialízis (HD) és hemodiafiltráció (HDF) összehasonlításában és a CONTRAST vizsgálat alvizsgálataként lett publikálva.[41] A szerzők HDF betegek körében emelkedett vérlemezke asszociált aktivációs markert írtak le, de a szolubilis beta-thromboglobulin vizsgálatakor csökkent vérlemezke degranulációt észleltek[41], így a kapott eredmények alapján sejtes és szolubilis faktorok vonatkozásában nem lehetett egyértelműen állást foglalni.

## 4 Célkitűzések

A krónikus vesebetegség előrehaladtával a kardiovaszkuláris rizikó folyamatosan növekszik, ami a végstádiumú veseelégtelen betegek esetén a leggyakoribb ok a megbetegedések és halálokok között. A vaszkuláris kalcifikáció üteme is fokozottabb a veseelégtelen betegek körében. Korábbi vizsgálataink során sikerült bizonyítanunk az inorganikus foszfát indukáló hatását a vaszkuláris simaizomsejtek csontsejtszerű átalakulásában. Az irodalomban az inorganikus foszfát mellett számos vegyület vonatkozásában írtak le kalcifikációt fokozó hatást, többek között az organikusan kötött foszfát és az aktivált D-vitamin is ezek közé tartozott. A korábbi kísérleteink során a sejt kultúrákhoz adott hemmel az extracelluláris mineralizáció gátlható volt. A gátlás hátterében álló mechanizmusok közül a hem hem-oxigenáz-1 általi bontása a folyamatot iniciáló lépés, majd a felszabaduló vas az intracelluláris ferritin szintézis indukálásán keresztül fejtette ki hatását. A kísérletek során a különböző ferritin molekulák vizsgálata során lehetett azonosítani a ferroxidáz aktivitás kulcsfontosságú szerepét.

Első vizsgálatunkban a célkitűzésünk tehát a vaszkuláris kalcifikáció in vitro modellezése volt organikus foszfát és aktivált D-vitamin alkalmazásával, melyekkel így a vesebetegekre jellemző körülményeket tudtunk biztosítani. További célunk volt a ferritin és a ferroxidáz aktivitás univerzális gátló hatásának bizonyítása, ill. olyan ferritin szintézist fokozó alternatívák kipróbálása, mellyel nem növeljük a szervezet vas terhelését. Végül pedig a vesepótló kezelésre szoruló betegek plazma mintáit kívántuk vizsgálni a simaizomsejt kultúrákon.

A vesepótló kezelésre szoruló végstádiumú veseelégtelen betegek hemosztázis paramétereiben jelentős változások alakulnak ki, melyek részben a felhalmozódó salakanyagok, részben pedig a dialízis kezelésekre hatására jönnek létre. Jól ismert a krónikus betegséget végig kísérő, annak romlásával egyre súlyosbodó vérlemezke funkciózavar. A dialízis kezelése során az extracorporális keringés miatt a betegek vérének a legtöbb esetben antikoagulálni szükséges, ehhez leggyakrabban konvencionális, vagy kis-molekulasúlyú heparint használnak és csak nagyon ritkán történik citrát alapú, tisztán az extracorporális rendszert érintő antikoagulálás. A véralvadási faktorok gátlása a vérlemezke funkciót érdemben nem befolyásolja, de indirekt módon képes csökkenteni a szekvesztráció mértékét. Tanulmányok már több alkalommal is foglalkoztak a vérlemezkek dialízis kezelés alatt bekövetkező funkció változásával, döntően aktivációt észlelve, azonban a különböző kezelési modalitások eltérő hozzáférhetősége miatt a hemodiafiltráció és hemodialízis kezelésekre

összehasonlításában még eddig nem történtek vizsgálatok. Összehasonlító tanulmányok híján a kezelések alatt bekövetkező endotélsejt aktiváció változása sem ismeretes.

A dialízis kezelések alatt végbemenő vérlemezke aktiváció vizsgálatát tűztük ki második tanulmányunk céljául, mely során mind felszíni, mind szolubilis faktorok vizsgálatát és a sejtes konjugátumok szintjének meghatározását kívántuk elvégezni. Mindenekelőtt kíváncsiak voltunk, milyen hatással van a vizsgálni kívánt paraméterekre a kezelések alatt jelentkező folyadékeltávolítás okozta hemokoncentráció. Előzetes méréseket tervezünk, melyek alapján a sejtes kísérletekhez a vörösvértestek számának, míg a szolubilis markerek esetén az albumin koncentrációjának változása szolgálhat alapként a későbbiekben a kapott eredmények normalizálásához. Korábbi vizsgálatok kapcsán már ígéretes markernek számító monocita és neutrofil sejtek és vérlemezkek által alkotott heterotipikus aggregátumokat és a kezelések alatt bekövetkező változásaikat vizsgáltuk. Szolubilis markerek közül a P-szelektin változásait követnénk nyomon a dialízis kezelések alatt. Endotélsejtek aktivációját az E-szelektin és a von Willebrand faktor vizsgálatával tervezzük kimutatni.

Mindkét vizsgálatunk kapcsán a téma felvetések és célkitűzéseink alapja a krónikus vesebetegségek során észlelhető fokozott kardiovaszkuláris rizikó háttérben álló kórélettani folyamatok alaposabb megismerése, ahol lehetséges terápiás támadáspontok azonosítása és potenciális megoldások keresése volt.

## **5 Anyagok és módszerek**

### **5.1 Sejtkultúra és reagensek**

A kísérleteinkhez használt humán aortából származó simaizomsejteket (HAoSMC) 3 különböző forrásból szereztük be: Cell Applications (53 éves kaukázusi férfi és 54 éves ázsiai férfi, San Diego, CA), Lonza (36 és 43 éves férfiak, Allendale, NJ), Cambrex (ismeretlen donor, Wokingham, United Kingdom). A donorok egészséges emberek voltak, legalábbis kardiovaszkuláris betegségben vagy diabetes mellitusban nem szenvedtek az elérhető információ alapján. A kísérleteink döntő többségében a sejtek morfológiája és viabilitása következtében a 43 éves férfi donorból származó sejteket használtuk. A sejtek összesen 5 különböző, egymástól független donorból származtak. Minden ábrán külön jelölés található, ha az adott kísérlethez több donorból származtak a felhasznált sejtek. A sejteket P0 fázisból indulva mindig a teljes konfluencia eléréséig hagytuk osztódni, majd passzázsonként 1:4 arányban szélesztve tenyésztettük tovább. A kísérletekhez 5-7. passzázsból származó sejteket használtunk fel, melyek morfológiailag nem mutattak eltérést és még megtartott osztódási potenciállal rendelkeztek. A sejteket magas glükóz tartalmú DMEM oldatban tenyésztettük, melyet 15% FBS, 1 mM nátrium piruvát, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin és neomycin hozzáadásával egészítettünk ki és használtuk fel, mint növekedési médium (GM, „growth medium”). A sejtek fokozott anyagcseréjére utaló pH csökkenés esetén, de legkésőbb minden második nap történt a növekedési médium cseréje. A kísérletek során a már konfluenssé váló sejtek esetén elegendő volt 2 naponta cserélni a tápoldatot. A kísérleteinkhez használt vegyszerek döntő többsége Sigma-Aldrich-tól került beszerzésre, de többek között a calcitriol a Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI) az FBS a Life Technologies (Bécs, Ausztria) és a Complete Mini proteáz inhibitor tabletták a Roche (Mannheim, Németország) forgalmazásában voltak elérhetőek. A rekombináns ferritin alegységeket, úgymint a könnyű és nehéz lánc, illetve a nehézlánc mutáns formája (H222) Paolo Arosio bocsátotta rendelkezésünkre (Department M.I. and Biomedical Technologies, University of Brescia, Brescia, Olaszország). Az in vivo vizsgálathoz felhasznált paricalcitol (Zemplar<sup>®</sup>) és calcitriol (Calcijex<sup>®</sup>) közforgalmú gyógyszerári forrásból került beszerzésre.

### **5.2 Alkalikus foszfatáz aktivitás mérése**

A sejteket 12-lyukú tenyésztő plate-n növesztettük passzálást követően, majd 7 napon át kezeltük. A kezelés végén a sejteket kétszer is foszfát pufferelt só oldattal (PBS) mostuk és szolubilizáló oldattal (1% Triton-X 100, 0,5% Igepal CA-630, 1% Complete Mini proteáz

inhibitor, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris) szuszpenziót készítettünk. A mérés során a mintából 35  $\mu$ l-t adtunk 130  $\mu$ l Alkaline Phosphatase Yellow Liquid Substrate oldathoz. A mintában található alkalikus foszfatáz enzim a p-nitrofenil-foszfatból hasít le egy foszfát-csoportot létrehozva ezzel a p-nitrofenolt. A képződő p-nitrofenol mennyiségét fotométer segítségével tudjuk detektálni, mely 405 nm-en rendelkezik elnyelési csúccsal. 30 percen át 37°C-on inkubálva a reakcióelegyet percenkénti detektálással kinetikus görbét készítettünk minden mintáról, majd a görbék maximális meredekségét alapul véve az eredményeket a minták fehérje tartalmára normalizálva adtuk meg.[27]

### **5.3 Alkalikus foszfatáz enzimaktivitás festése**

A kísérletekhez használt sejteket 48-lyukú plate-eken tenyésztettük, majd 7 napon keresztül a kezelési protokollnak megfelelő növekedési, illetve kezelési médium segítségével kezeltük. A festési eljáráshoz a Sigma 85L3R kit-jét használtuk fel az alább részletezett módon.[42] A festés előtt a sejteket alaposan PBS segítségével kétszer mostuk. A kit leírása szerint citrát-oldatot készítettünk a törzsoldatból, majd acetonnal 2:3 arányban elegyítve készül el a fixáló oldat. A sejteket 1 percig fixáltuk, majd desztillált vízzel mostuk 2 alkalommal. A festéshez 4% Naphtol AS-MX tartalmú 0,25 mg/ml koncentrációjú Fast Violet B oldatot használtunk sötétben az oldat fényérzékenysége miatt. 30 perces inkubációt követően desztillált vízzel alaposan átmostuk a lyukakat. Fénymikroszkóp alatt ellenőriztük a sejteket, majd fényképekkel dokumentáltuk az eredményeket.

### **5.4 Kalcium depozíció mérése**

A sejtek kezelése 48-lyukú plate-eken történt 7 napon keresztül. PBS-el mosva a sejteket először 0,6 mol/L-es HCl oldattal 24 órán át 37°C-on inkubálva dekalcifikáltuk, majd 0,1 mol/L NaOH és 0,1% nátrium-dodecil-szulfát (SDS) tartalmú oldattal szolubilizáltuk. A dekalcifikáció során nyert felülúszó mintákból QuantiChrome Calcium Assay Kit (Gentaur, Brüsszel, Belgium) segítségével határoztuk meg a kalcium tartalmat.[43] A szolubilizált minták fehérje koncentrációját fotométer segítségével határoztuk meg. A minták kalcium tartalmát a nyers adatokból a fehérjetartalomra normalizálva  $\mu$ g kalcium/mg fehérje formátumban adtuk meg

A mineralizáció kimutatására az Alizarin Red festés is alkalmas.[44] A festéshez a sejteket ugyancsak 48-lyukú plate-n tenyésztettük és kezeltük a szokásos 7 napos protokollal. A protokoll befejezéseként a sejteket PBS-el mostuk, majd 3%-os paraformaldehid oldattal 10 percig fixáltuk. A fixálást követően a sejteket ismételtén PBS-ben mostuk. A festéshez 2%-os Alizarin Red oldatot használtunk és 2 percen át inkubáltuk a sejteket szobahőmérsékleten. Az

inkubációs idő lejártát követően legalább 3 alkalommal desztillált víz segítségével eltávolítottuk a felesleges festéket. Minimális folyadék hátrahagyásával, hogy a teljes kiszáradástól megóvjuk a mintát, fénymikroszkóp segítségével fényképesen dokumentáltuk az eredményeket.

### **5.5 Oszteokalcin meghatározás**

Az oszteokalcin meghatározást a sejtek extracelluláris mátrixából végeztük el. A sejteket a kellő mennyiségű fehérje kimutatásához 6-lyukú plate-eken kezeltük 7 napon keresztül. Az extracelluláris mátrix feloldása 0,5 mmol/L EDTA (pH 6,9) hozzáadásával történt meg. A sejtekből a fentebb leírt szolubilizáló-oldat segítségével készítettünk fehérje meghatározáshoz alkalmas mintákat. Az extracelluláris mátrixból származó minták oszteokalcin tartalmát szendvics ELISA módszer segítségével határoztuk meg (Bender MedSystems, Burlingame, CA).[45] A standard és minta sorokat desztillált vízzel rekonstituáltuk, majd 25 µl mintát adtunk a lyukakhoz. A plate-et 120 percen át inkubáltuk szobahőmérsékleten rázógéppel segítségével. Mosó puffer segítségével 3 alkalommal mostuk a lyukakat, majd TMB Substrate oldatot pipettáztunk a lyukakba és 15 percen át inkubáltuk sötétben. Az inkubációs idő lejártát követően Stop-oldattal felfüggesztettük a reakciót és a kapott színreakciót fotométerrel értékeltük ki. A kapott eredményeket a szolubilizált minták fehérje tartalmára normalizáltuk.

### **5.6 Fehérjetartalom meghatározás**

A különböző mérési protokollok során használt szolubilizálástól függetlenül a minták fehérje tartalmának meghatározása minden esetben BCA reagens (Pierce, Rockford, IL) segítségével történt.[46] A mérések során 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml koncentrációjú BSA standard sor alkalmazásával határoztuk meg a minták protein tartalmát fotométer segítségével 562 nm-en.

### **5.7 Western blot**

A minták fehérje tartalmát a felvitel előtt minden esetben meghatároztuk és az egyenlőtlen betöltés kivédésére minden esetben előre meghatározott mennyiségű fehérje tartalmat vittünk fel a gélekre, mely a legtöbb esetben 20 µg proteint jelentett. Az elektroforézishez 10%-os SDS-PAGE gélt használva 100 V feszültséggel futtattuk a mintákat a standard létra megfelelő szétválásáig.[27] A blottoláshoz 0,45 µm pórus méretű nitrocellulóz membránt (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Egyesült Királyság) használtunk és 75 percen át 100 V feszültséggel végeztük. A membránokat a blottolás után

Tween-20-al kiegészített tris pufferelt só oldattal (TBS-T) átmosva 60 percig 6%-os tejpor oldatban szobahőmérsékleten, rázógépen inkubáltuk az aspecifikus kötőhelyek lefedése miatt. Alapos TBS-T oldattal történő mosást követően 1%-os tejpor oldatban került a membránra az elsődleges antitest, majd 16 órán át 4°C-on rázógépen inkubáltuk. Az alkalikus foszfatáz esetén 1:200 arányban alkalmaztuk az elsődleges antitestet (sc-30203, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), míg a ferritin nehéz lánc kimutatásához 1:400 hígításban (sc-25617, Santa Cruz Biotechnology). A másodlagos antitest hozzáadása előtt a membránt TBS-T oldattal átmostuk, majd szintén 1%-os tejpor oldatban 15000-szeres hígításban alkalmaztuk a tormaperoxidázzal konjugált nyúl (alkalikus foszfatáz), illetve egér (ferritin nehéz lánc) IgG elleni antitesteket (Amersham Biosciences). Az antitest-antitest kötődés 1 óra szobahőmérsékleten végzett rázógépes inkubálás alatt alakult ki, majd alapos mosást követően a membránokra került az ECL előhívószer (Amersham Biosciences). Sötétszobában a membránokról röntgen film előhívásával tudtuk vizualizálni az eredményeket.

A minták felvitt egységes fehérjetartalmának bizonyítására a membránokat gliceraldehid-3-foszfat dehidrogenázra (GAPDH) is megvizsgáltuk. Ehhez a már membránokhoz kötődött antitestek eltávolítására volt szükség. Az antitestektől megtisztított membránokat újra 6%-os tejjel blokkoltuk, és a fent leírtak szerint 1:1000 arányú elsődleges (NB300-221, Novus Biologicals, Littleton, CO) és 1:15000 hígítású másodlagos (Amersham Biosciences) antitestet alkalmaztunk. Az eredmények láthatóvá tétele is a fentiekhez hasonlóan történt. Az előhívott filmeket minden esetben denzitometráltuk és a kapott eredményeket a GAPDH denzitására normalizáltuk.

## **5.8 Kvantitatív RT-PCR**

A sejteket 6-lyukú tenyésztő plate-eken kezeltük 7 napon keresztül. A kezelés befejeztével a sejteket RNA-STAT60 alkalmazásával homogenizáltuk, majd a minták teljes RNS tartalmát izoláltuk. Reverz transzkripció során 1 µg totál RNS-ből kiindulva oligodT (Promega, Madison, WI) és SuperScript III reverse transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) alkalmazásával állítottunk elő komplementer DNS-t (cDNS). A cDNS-ből az alkalikus foszfatáz messenger RNS (mRNS) expresszióját multiplex TaqMan Gene Expression Assay segítségével határoztuk meg és normalizáltuk a GAPDH mRNS szintjéhez (ALP: Hs00758162\_m1; GAPDH: Hs99999905\_m1; Applied Biosystem, Foster City, CA). Összesen 20 µl-es reakció elegyet alkalmaztunk, melyhez 10 µl TaqMan Gene Expression Mastermix (Applied Biosystem) mellett 1-1 µl specifikus TaqMan Gene Expression Assay, 2 µl cDNS oldat és 7 µl dietil-pirokarbonáttal kezelt víz volt szükséges.

A reverz transzkripcióhoz és a qPCR-hoz is a C1000 Thermal Cycler készüléket alkalmaztuk CFX 96 Real Time PCR System kiegészítéssel (Bio-Rad, Hercules, CA).[27, 47]

## **5.9 Ferritin nehéz lánc siRNA transzfektálás**

A sejteket passzálást követően 6-lyukú plate-ekre szélesztettük és kb. 60-70%-os konfluenciáig tenyésztettük. A transzfektáláshoz FtH és negatív kontroll siRNA-t (Ambion, Austin, TX) használtunk.[48] Szérum- és antibiotikummentes média alkalmazásával 30 nmol/L FtH és negatív kontroll siRNA transzfektálást végeztünk 4 órás inkubáció alatt. Az siRNA transzfektálását a sejtekbe Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) segítségével végeztük. Az inkubálási idő leteltét követően friss növekedési médiumot adtunk a sejtekhez, majd további 20 órán át inkubáltuk 37°C-on. A sejteket a transzfektálást követően 4 napig kezeltük, mely idő alatt bizonyítottan jelen volt az siRNA gátló hatása.

## **5.10 D-vitamin receptor agonisták in vivo vizsgálata**

Az alvizsgálatunkba 5 végstádiumú veseelégtelen beteget vontunk be, akik hetente 3 alkalommal intermittáló hemodialízis kezelést kaptak és vesebetegségük miatt szekunder hiperparatireózisban szenvedtek. Mind az 5 beteg esetén fennálltak a paricalcitol és a kalcitriol indikációs kritériumai a Magyar Nephrológiai Társaság irányelvei alapján. Az egységes mintavételi protokoll miatt a hemodialízis kezelések befejezésekor, a gyógyszerbeadása előtt és 10 perccel az után történtek a minták levételei. Minden időpontban 10 ml-es EDTA-val véralvadás gátolt csőbe történt a vérvétel. A vérmintákat tartalmazó csöveket 10 percig, 2000 g alkalmazásával 4°C-on centrifugáltuk, majd a véralvadásgátolt minták plazmáját összegyűjtöttük és -70°C-on lefagyasztva tartottuk a felhasználásukig. Az in vitro kísérletekhez a sejteket a betegek plazmamintáinak és szérummentes növekedési média 1:1 arányú keverékével kezeltük 5 napon keresztül. A kísérletek során a vizsgálatainkban a gyógyszerbeadását követően levett vérminták plazmáját apoferritin hozzáadásával is kiegészítettük.

A vizsgálat teljes egésze, beleértve a vizsgálati protokollt; a beteg beválogatás, írásos betegtájékoztató és beleegyező dokumentumait a Debreceni Egyetem Kutatás Etikai Bizottságának és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével és jóváhagyásával történt, és csak a részletes felvilágosítást követően írásos beleegyezésüket adó betegek esetén végeztük el a mintavételeket.

## 5.11 Beteg beválogatás és dialízis kezelések

A vérlemezkék aktivációját vizsgáló tanulmányunkba 28 végstádiumú veseelégtelen beteget válogattunk be. Az intervenciós vizsgálat longitudinális nem-randomizált önkontrollos paraméterekkel rendelkezett. Kizárási kritérium volt a diabetes mellitus az anamnesisben, mivel korábbi vizsgálatok alapján ismert a vérlemezke aktivációt okozó hatása. Hasonlóképpen a daganatos betegségek, a hematológiai és hemosztazeológiai eltérések is kizárásra kerültek. Továbbá bármilyen vérlemezke aggregációra ható gyógyszer használata is kizáró ok volt. A Debreceni Egyetem Kutatás Etikai Bizottsága és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága is elfogadta és támogatta a vizsgálati protokollt. A részletes írásos és szóbeli tájékoztatást követően a résztvevők írásos beleegyezésüket adták a vizsgálatba. A résztvevők életkora 18 és 70 közötti, átlagosan  $53 \pm 13,8$  év. A 28 résztvevő között 13 férfi és 15 nő volt. Minden beteg a vizsgálatot megelőzően legalább 3 hónapja már dializált volt és átlagosan  $89,5 \pm 74,5$  hónapot töltöttek el a krónikus dialízis programban. A betegek hetente 3 alkalommal 250 perces kezeléson vettek részt, mely során Fresenius 5008S készüléken Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Németország) kezeltük őket. A dialízis kezelés későbbiekben részletezett minőségbiztosítási paramétereinek elérése miatt 5 beteg esetén a kezelések 270 percen át tartottak, de az összehasonlíthatóság miatt ezekben az esetekben is 4 óra után történt a mintavétel. A kezeléshez használt FX CorDiax dializátorok a biokompatibilitás miatt a legújabb Helixone® Plus poliszulfon membránokat tartalmazzák, melyek mérete a beteg testfelszínéhez a hatékonysági mutatók figyelembe vételével lett kiválasztva. A betegek döntő többségében, 24 esetben az  $1,4 \text{ m}^2$  összfelületű FX60 dializátort alkalmaztuk, azonban 3 esetben az  $1,6 \text{ m}^2$  összfelületű FX600-ra, míg 1 betegnél a  $2 \text{ m}^2$ -es FX800-ra volt szükség. A dializátorokat nem változtattuk meg a kezelési modalitások váltása közben. Ugyancsak állandó volt a résztvevők esetén a dializáló gépek vér pumpa sebessége, átlagosan  $366,1 \pm 63,7$  mL/perc és a dializáló oldat áramlási sebessége ( $439,3 \pm 76,5$  mL/perc). A túlhidráltság következtében a betegektől eltávolításra kerülő nettó ultrafiltráció hemodialízis esetén kezelésként  $2703,6 \pm 1118,0$  mL volt, míg hemodiafiltrációnál  $2432,1 \pm 1014,4$  mL. A dialízis hatékonyságának megítélésében a Kt/V érték meghatározása nyújtja a legpontosabb információt. Mérése a dializáló gépeken az Online Clearance Monitoring Kt/V (OCM Kt/V; Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Németország) segítségével történik, mely a nátrium klirensz mérése alapján következtet az urea klirenszére. Így tehát külön vérvételek nélkül lehetőségünk volt minden kezelés alkalmával a hatékonysági mutató meghatározására, melynek hemodialízis esetén 1,3, míg

hemodiafiltráció esetén 1,4 feletti értéknek kell lennie. Vizsgálatunk során hemodialízis alatt az átlagos OCM Kt/V érték  $1,48 \pm 0,2$  volt és 3 beteg nem érte el a kívánt 1,3-es értéket, míg hemodiafiltráció esetén a Kt/V érték  $1,67 \pm 0,21$ -nek adódott és csak 1 beteg nem érte el a szükséges hatékonyságot.

Dialízis központunkban a hemodiafiltrációs modalitás a standard kezelés, így a vizsgálatunk kezdetén a mintavételt ezen csoporthoz végeztük el. A modalitás váltás okozta zavaró tényezők kivédése miatt 2 hétig alkalmaztunk hemodialízis kezeléseket mielőtt a vérlemezke markerek vizsgálatához a mintákat ismételten levettük volna, immáron a hemodialízis csoporthoz. Az antikoagulálás esetleges befolyásoló hatását kivédendő mindkét modalitás esetén ugyanazt a dózisú konvencionális, frakcionálatlan heparint alkalmaztuk. A heparint a beteg igényeihez mérten dozíroztuk, elkerülve a vér alvadását a dializáló szerelékben, ill. megakadályozva a vézést az arterio-venózus fisztulából. A megfelelő véralvadásgátlás gyors eléréséhez először bólusban, majd a stabil fenntartásához pedig folyamatos perfúzor segítségével adagoltuk a heparint, melyet a vézés kialakulásának csökkentésére 30 perccel a kezelés vége előtt minden betegnél leállítottunk.

A kezelésekhöz használt dializáló folyadék mindkét modalitás esetén megegyezett. Az oldat előállításához szükséges gyógyszerkönyvi tisztaságot csapvízből kiindulva kavicsszűrőn, ioncserélő gyantákon, reverz ozmózis tornyokon és szénszűrőn keresztül lehetett biztosítani. A szigorú előírásoknak (endotoxin szint  $<0,01$  EU/mL, baktérium szám  $<0,1$  CFU/mL és bármely nehézfém ion  $<0,01$  mg/L) megfelelő vízből a dializáló készülék állítja elő a kezeléshez megfelelő oldatot. A végső oldat 138 mmol/L nátriumot, 1,25 mmol/L kalciumot, 0,5 mmol/L magnéziumot, 1 g/L glükózt és 2 vagy 3 mmol/L káliumot tartalmazott, ez utóbbi a betegek szérum kálium szintjének megfelelően került beállításra. Az oldat bikarbonát tartalmát a 28-38 mmol/L közötti intervalumon belül volt lehetőségünk változtatni, hogy a dialízis kezelése előtt meghatározott plazma bikarbonát szintet 20-22 mmol/L között tudjuk tartani. Hemodiafiltrációs kezeléseknél a filtrálásra került folyadék mennyiségét szubsztitúciós oldat formájában pótolja a dializáló gép, melynek összetétele megegyezik a dializáló oldattal, de egy második membránon is keresztülszűrődik. Kezelésenként a szubsztitúciós oldat térfogata  $23,4 \pm 3,8$  liter volt.

## **5.12 Vérvétel és sejtszámlálás**

A vérvétel a dialízis szerelék pumpaszegmens előtti szakaszából történt minden esetben, melyekhez nátrium-citráttal alvadásgáttolt csöveket használtunk. A mintákat 3 különböző időpontban vettük, először a szereléket vérrel teljesen feltöltött kb. 4. percben,

majd 1 és 4 óra múlva a kezelés indításához képest. Hogy megbizonyosodjunk a kezdeti aktiváció mértékéről hemodiafiltrációs kezelések alatt az arterio-venózus fisztula szűrésénél direkt módon az artériás túból 0. percben és a 4. percben a szerelékéből is történt mintavétel. A sejtszámok meghatározása minden esetben Advia 2120 Haematology Analyzer (Siemens, Dublin, Írország) készülékkal történt a vérvételtől számított 2 órán belül. A kezeléseket követő hemokoncentráció miatt a sejt számokat a vörösvértest számokra normalizáltuk.

### **5.13 Vérlemezke szegény plazma (PPP, platelet poor plasma) készítés és a szolubilis markerek mérése**

A teljes vért centrifugáltuk 1500 g-n szobahőmérsékleten 15 percig, majd a mintákból albumin meghatározás történt Cobas C8000 Clinical Analyzer (Roche Diagnostics, USA) használatával. A szolubilis P- és E-szelektin szintek meghatározása ELISA módszerrel történt a gyártó előírásainak megfelelően (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A von Willebrand faktor szintek vizsgálata turbidimetriás méréssel történt (BCS XP, Siemens, Németország). A szolubilis markerek nyers adatait minden esetben a hemokoncentráció nyomkövetésére végzett albumin koncentráció méréshez normalizáltunk. Hemodiafiltrációs kezeléseket mintáiból véletlenszerűen kiválasztva néhányat vizsgáltuk a heparin koncentrációt aktivált X faktor (FX<sub>a</sub>) gátló teszttel (Berichrom<sup>®</sup> Heparin, Siemens), melynek során a plazma konvencionális vagy alacsony molekulásúlyú heparin tartalmának meghatározása kromogén módszerrel történt. A FX<sub>a</sub> az antitrombin III hatására inaktívulódik az inkubációs periódusban, amit a heparin katalizál. A folyamat során továbbra is aktív formában jelen lévő FX mennyiségét 405 nm-en fotométer segítségével detektálhatjuk a kinetikus teszt során alkalmazott kromogén szubsztráttal.[49]

### **5.14 Áramlási citometriás vizsgálatok**

A vérlemezke felszíni P-szelektin expressziója és a fehérvérsejt-vérlemezke heterotipikus aggregátum mérése áramlási citométer (FC500 flow cytometer, Beckman Coulter) segítségével történt.[50] A mérési körülmények standardizálása és a vérlemezkek in vitro aktiválódásának minimalizálása miatt a vérvételtől számított 2 órán belül megtörtént a minták fixálása és jelölése. A felszíni P-szelektin meghatározáshoz a citrátos vérmintákat 1%-os paraformaldehid-oldattal fixáltuk, majd 2500/perc fordulaton 15 percen át centrifugáltuk. PBS oldattal történő mosást és újabb centrifugálást követően a mintákat CD42a-FITC (fluoreszcein-izotiocianát) és CD62-PE (phycoerythrin) (Becton Dickinson Biosciences) antitestek segítségével jelöltük 20 perces inkubáció során. A fehérvérsejt-vérlemezke heterotipikus aggregátumok kimutatásához a vérmintákat 15 percen keresztül inkubáltuk

CD14-PE és CD42a-FITC antitestek jelenlétében. A vörösvértestek méretüknél fogva képesek a mérés eredményét befolyásolni, ezért FACS lízis puffer segítségével 10 perces inkubálás során történik a lízisük. Rövid, 5 percig tartó 1200/perc fordulátú centrifugálást követően, PBS-oldattal mostuk a mintákat, majd ismételten centrifugáltuk. 1%-os PFA-oldattal 30 percig fixáltuk, majd áramlási citométeren mértük a minták leukocytá-vérlemezke aggregátum tartalmát. A minták jelölése során minden esetben IgG izotípus kontrollt használtunk az atípusos kötődésekből adódó álpozitív eredmények kizárására. A vörösvértesteket lizálást és mosást követően kerültek fixálásra és későbbi analízisre.

### 5.15 Statisztikai analízisek

A vérlemezkek aktiválódását vizsgálva az eredmények normál eloszlásának kimutatásához Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk. Mivel a legtöbb paraméter nem-normális eloszlást követett, ezért egyváltozós analíziseket végeztünk Mann-Whitney U-próba vagy független mintás t-próba segítségével. Ahol lehetséges volt párosított mintás vizsgálatokat végeztünk, melyhez Wilcoxon-féle előjeles rangszám próbát vagy párosított mintás t-próbát alkalmaztunk. Spearman-féle  $p$  értéket határoztunk meg a korrelációs analízisekhez. Az említett vizsgálatokat a SPSS Statistics software, version 22.0 (IBM Corps., Armonk, NY, USA) használatával végeztük.

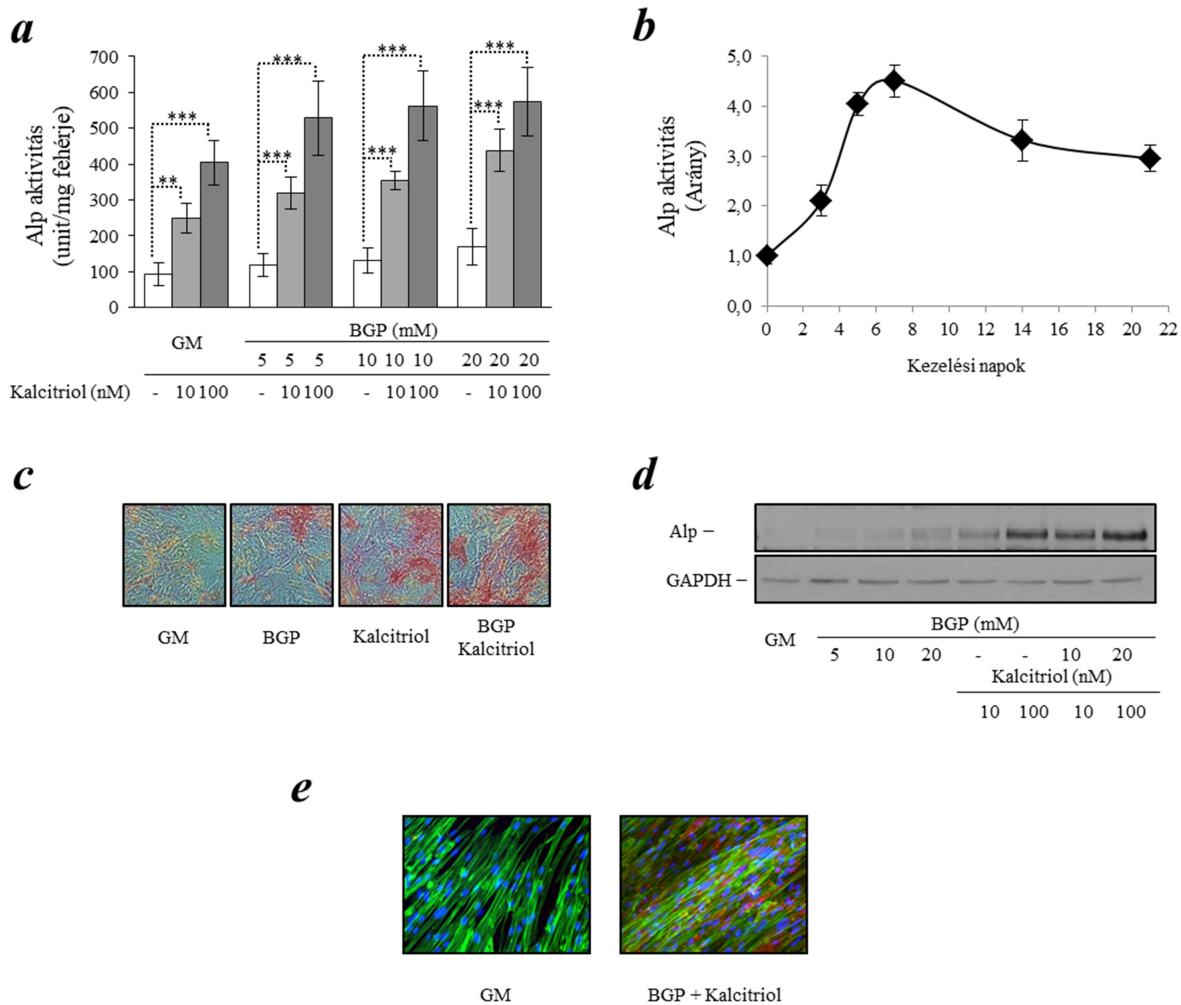
A simaizomsejteken végzett kísérletek során szerzett eredményeink statisztikai elemzéséhez GraphPad Prism 5 szoftvert használtunk és egyszempontú ANOVA próbát végeztünk post hoc Bonferroni-féle többszörös összehasonlítási próbával. Az ábrákon külön-külön jelöltük a nem szignifikáns (ns) és szignifikáns eltéréseket a különböző  $p$ -értékek szerint, ahol \* a  $p < 0,05$ ; \*\* a  $p < 0,01$  és \*\*\* a  $p < 0,001$  szintet jelöli. A diagramokon a minták átlag  $\pm$  SD értékeit ábrázoltuk.

A *II/c* ábra statisztikai vizsgálatához a többi esettől eltérően a Statistica for Windows szoftvert használtuk. A változókat leíró analízisekkel (esetszám, medián, kvartilis) jellemeztük. Miután az adatokat Friedmann-féle ANOVA segítségével összehasonlítottuk Wilcoxon-féle párosított próbát végeztünk Bonferroni-féle korrekcióval, hogy a párosított mintákat elemezhessük. A szignifikancia szint meghatározásánál a  $p \leq 0,05$  értéket vettük alapul.

## 6 Eredmények

### 6.1 A béta-glicerolfoszfát és az aktivált D<sub>3</sub> vitamin kezelés a vaszkuláris simaizomsejtek csontsejtszerű transzformációját idézi elő

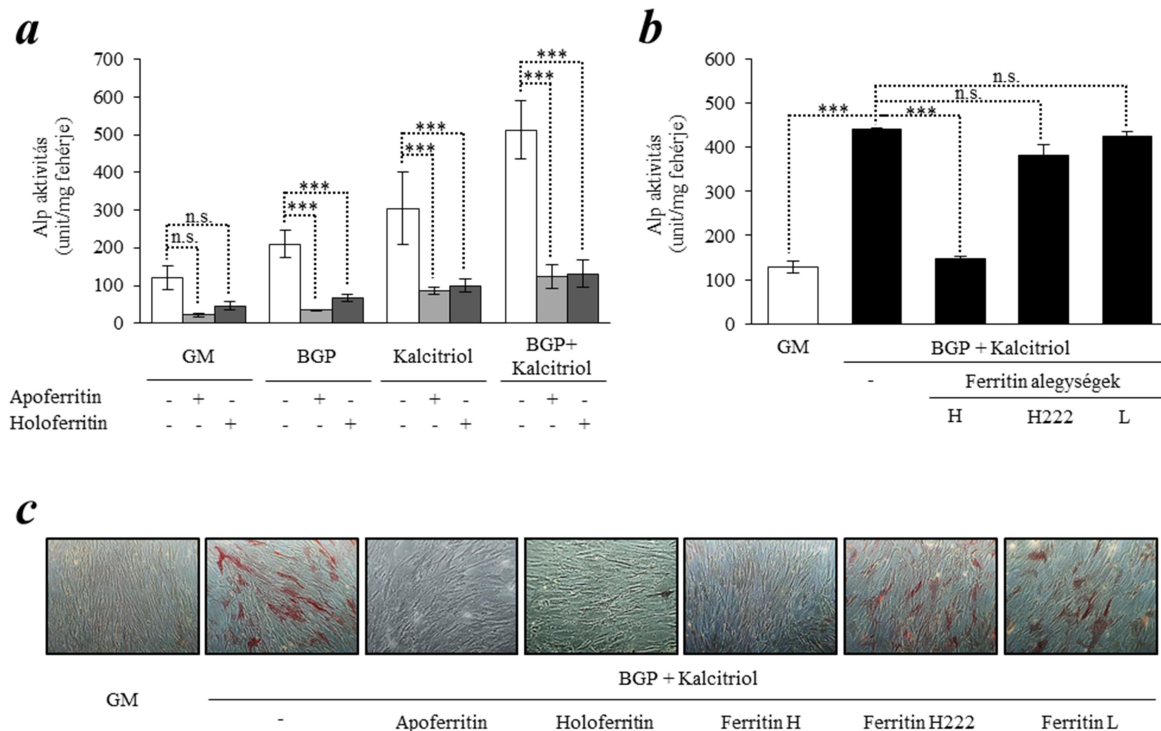
Elsődleges célunk a csontsejtszerű átalakulás kimutatása volt humán aortából származó vaszkuláris simaizomsejteken (HAoSMC) béta-glicerolfoszfát (BGP) és az aktivált D<sub>3</sub> vitamin (kalcitriol) kezelés hatására. Mindkét induktor képes volt emelni az alkalikus foszfatáz enzim (Alp) aktivitását dóziszfüggően. *(1.a ábra)* Az enzimaktivitás indukciója az idő függvényében is változást mutatott, mely a kezdeti gyors emelkedést követően a 7. napon érte el a maximumát, majd lassú csökkenés volt észlelhető. *(1.b ábra)* A további kísérleteinkhez így a 7 napos kezelési időt választottuk valamint 10 mmol/l-es BGP és 10 nmol/l-es kalcitriol dózissal indukáltuk a simaizomsejteket. Az alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának direkt mérésén kívül, lehetőség van az aktivitás festési eljárással való kimutatására is. Az Alp aktivitás festésével sikerült kimutatni a BGP és/vagy kalcitriol alkalmazása mellett is pozitívan festődő sejteket. *(1.c ábra)* A megnövekedett enzim aktivitás háttérében Western blot segítségével sikerült igazolni az Alp enzim fehérje szintű fokozott expresszióját. *(1.d ábra)* A fehérje expresszió növekedés a BGP és a kalcitriol esetében is dóziszfüggő volt, míg együttes alkalmazásuk esetén additív hatást észleltünk. A sejtek Alp fehérje tartalmát a kontroll és az indukált sejteken immunfluoreszcens festéssel vizsgálva jól látható, hogy a BGP és kalcitriol kezelést külön-külön, vagy együttesen alkalmazva hogyan emelkedett a pozitívan festődő sejtek száma. A kontroll esetén nem volt pozitív festődés észlelhető a kéken festődő magok és zölden festődő citoszkeleton mellett. *(1.e ábra)*



**1. ábra: A béta-glicerolfoszfát (BGP) és az aktivált D-vitamin (kalcitriol) hatására a humán aorta simaizomsejtek csontsejtszerű transzformációt mutatnak.** A simaizomsejtek növekedési médiumban (GM, growth medium) vagy növekvő dóziszú BGP (5-10-20 mmol/L) és/vagy alacsony vagy magas dóziszú kalcitriol (10-100 nmol/L, előbbi világos, az utóbbi sötét szürke oszlop) jelenlétében kezeltük 7 napon keresztül. (A) Az alkalikus foszfatáz enzimaktivitás eredményeit a minták fehérje tartalmára normalizálva ábrázoltuk és a 3 különböző donortól származó, egyenként duplikátumban elvégzett kísérletek átlagos eredményeit ábrázoltuk.  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ . (B) Az 5 független donortól származó sejteket 10 mmol/L BGP és 10 nmol/L kalcitriol jelenlétében kezeltük 3 héten keresztül és meghatároztuk az enzimaktivitásokat a 3., 5., 7., 14. és 21. napokon. Az alkalikus foszfatáz enzimaktivitását kezeletlen, 0. napos minták enzimaktivitásához viszonyítottuk. (C) A vaszkuláris simaizomsejtek alkalikus foszfatáz enzimaktivitását direkt módon festettük meg és a kiválasztott reprezentatív részeit választottuk ki a képeknek, melyekhez 100x-os nagyítást használtunk. (BGP: 10 mmol/L; kalcitriol: 10 nmol/L) (D) Az alkalikus foszfatáz enzim szintjében bekövetkező változásokat Western blot segítségével ábrázoltuk a minta felviteli kontroll GAPDH-t is ábrázolva. (E) Az alkalikus foszfatáz indukcióját immunfluoreszcens festéssel is sikerült vizuálizálni reprezentatív képekkel. Kékkel a sejtmag, zölddel a fibrilláris aktin és pirossal az alkalikus foszfatáz enzimet jelöltük. (BGP: 10 mmol/L; kalcitriol: 10 nmol/L) A képek készítéséhez 400-szoros nagyítást használtunk.

## 6.2 A ferritin képes gátolni az Alp aktivitás indukcióját

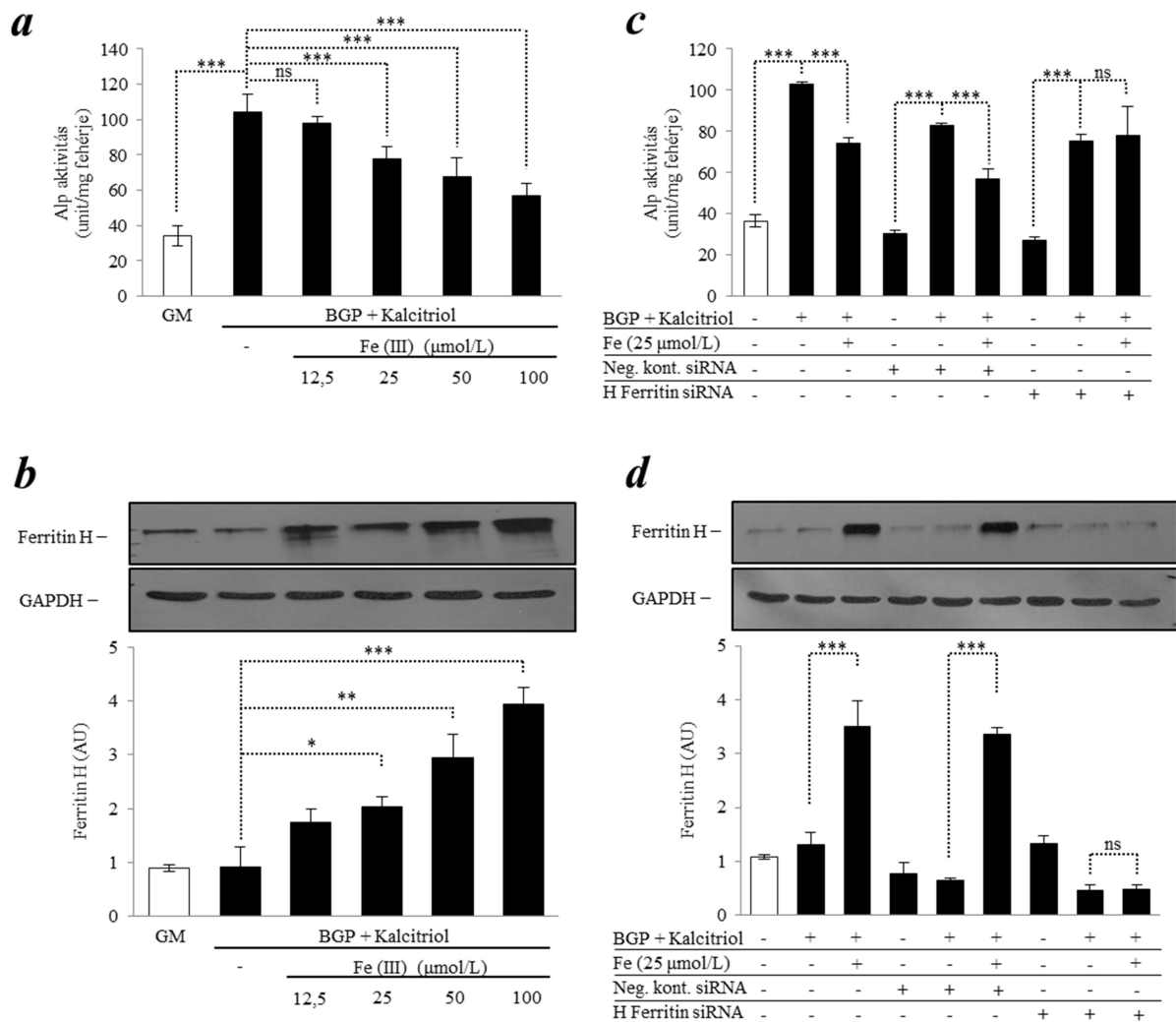
Megvizsgáltuk az apo- és holoferritin hatását az Alp indukciójára BGP-el és kalcitriollal önmagában vagy együtt kezelt HAoSMC esetén. A kísérleteink eredményei alapján mindkét ferritin forma képes volt csökkenteni az Alp aktivitását és nem sikerült szignifikáns különbséget kimutatni közöttük. (2.a ábra) A fenti eredményekre hagyatkozva, miszerint mindkét ferritin molekula képes volt jelentősen csökkenteni az Alp expresszió BGP vagy kalcitriol által előidézett növekedését, így a további kísérletek során inductorként a BGP és kalcitriol kombinációját használtuk. Mivel a ferritin molekula H és L láncból tevődik össze, így könnyen adódott a kérdés, hogy rekombináns ferritin H (FtH) és L (FtL) fehérje használatával vizsgáljuk az esetleges Alp indukciót befolyásoló hatásukat. Továbbá vizsgálni kívántuk a FtH mutáns H<sub>222</sub> jelzésre hallgató formáját, mely az aktív centrumban található mutáció miatt ferroxidáz aktivitással nem rendelkezik, egyebekben viszont megegyezik a vad típussal.[51] Az alkalikus foszfatáz aktivitás mérés megmutatta, hogy transzformáció gátlás csak a FtH esetén jelentkezett, vagyis a ferroxidáz aktivitással nem rendelkező L- és H<sub>222</sub>-lánc esetén nem észleltünk változást az indukció gátlásában. (2.b ábra) Az alkalikus foszfatáz festés során az indukciót követően igazolhatóan megjelentek a pozitívan festődő sejtek összehasonlítva a kezeletlen mintákkal. A jól látható csontsejtszerű átalakulást az apo- és holoferritin mellett, csak a H ferritin volt képes csökkenteni, míg L- és H<sub>222</sub>-ferritin lánc esetén nem lehetett látni csökkenést a pozitívan festődő sejtek számában. A ferroxidáz aktivitás szerepét így ismételten sikerült igazolni. (2.c ábra)



**2. ábra: Ferritinnel gátlható a béta-glicerolfoszfát (BGP) és aktivált D-vitamin (kalcitriol) által indukált csontsejtszerű átalakulás a humán aorta simaizomsejtekben.** (A) A simaizomsejteket 7 napon át növekedési médiumban (GM) kezelve BGP (10 mmol/L) és/vagy kalcitriol (10 nmol/L) jelenlétében és apo- és holo-ferritin (2 mg/ml) hozzáadásával. (B) Simaizomsejteket növekedési médiumban vagy 10 mmol/l BGP és 10 nmol/l kalcitriol jelenlétében kezeltünk és különböző ferritin alegységeket, úgymint nehéz (H) és könnyű (L) lánc, ill. mutáns H-lánc, adtunk a sejtekhez. 7 nap után történt alkalikus foszfatáz enzim aktivitás mérés, melynek eredményt a minták fehérje tartalmára normalizáltuk. \*\*\* $p < 0,001$  (C) Növekedési médiumban vagy 10 mmol/l BGP és 10 nmol/l kalcitriol jelenlétében kezelt sejtekhez adtunk különböző ferritin molekulákat, úgymint apo- és holo-ferritin, H-ferritin, L-ferritin és mutáns H-ferritin. A sejtek alkalikus foszfatáz aktivitását direkt festéssel jelöltük és reprezentatív képek segítségével, 100-szoros nagyítással ábrázoltuk.

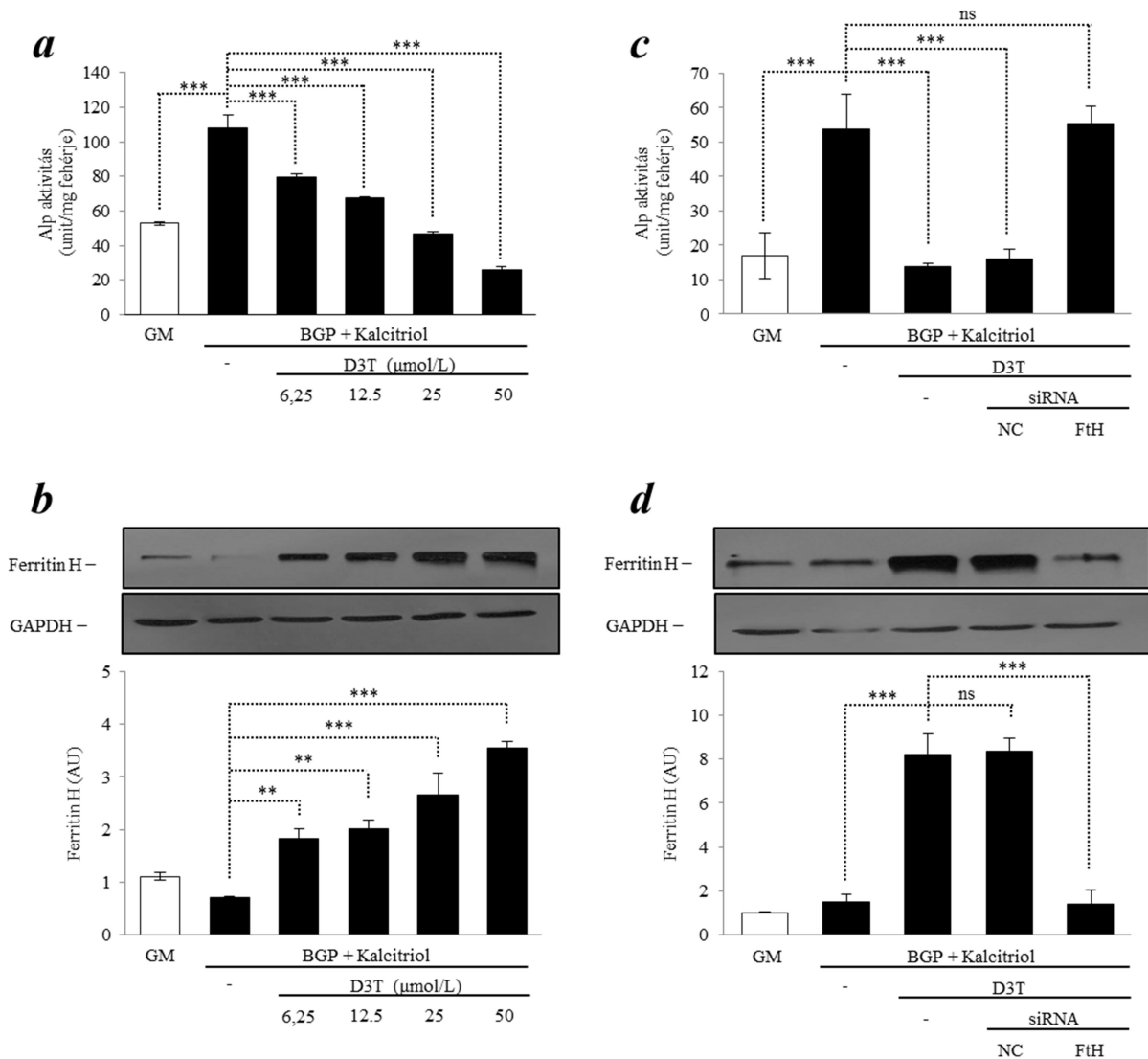
Az exogén módon a rendszerbe juttatott ferritin direkt szerepének bizonyítását követően megvizsgáltuk az endogén úton szintetizálódó ferritin hogyan viselkedik a HAoSMC sejtek átalakulását mediáló folyamatokban. Az endogén ferritin szintjét vas(III)-ammónium citrát hozzáadásával indukáltuk. (3.b ábra) A sejteken növekvő dózisú vas kezelés mellett vizsgáltuk a BGP és kalcitriol által indukált Alp aktivitást, melyet dóziszfüggően sikerült is gátolni. (3.a ábra) A ferritin specifikus szerepét megerősíteni az Alp indukció gátlásában leginkább siRNA alkalmazásával tűnt célszerűnek. A sejteket tehát ismételten vas(III)-ammónium citrát kezelésnek vetettük alá, de ebben az esetben egy részüket anti-FtH siRNA kezelés mellett. A FtH indukció gátlása miatt a hozzáadott vas nem tudta csökkenteni az Alp indukcióját a BGP és kalcitriol kezelt sejtekben. (3.c ábra) Tehát elmondható, hogy az FtH szint emelése, mely függetlenül, hogy külső forrásból származik, vagy exogén vas hatására endogéne szintetizálódik, direkt módon képes csökkenteni a kalcifikációt előidéző folyamatok során jelentkező Alp aktivitás növekedését. Az ábrán jól látható a 4 napos kezelés

során észlelhető körülbelül 80%-os fehérjeszintű expresszió csökkenés a FtH lánc esetében, mely egyértelműen mutatja a silencing hatékonyságát. (3.d ábra)



**3. ábra: A humán aorta simaizomsejtek béta-glicerolfoszfát (BGP) és aktivált D3-vitamin (kalcitriol) által indukált csontsejtszerű transzformációját az exogén vas képes gátolni a megnövelt ferritin expresszió keresztül.** A simaizomsejteket növekedési médiumban (GM) vagy 10 mmol/L BGP és 10 nmol/l kalcitriol mellett növekvő dózisban (12,5-25-50-100  $\mu\text{mol/L}$ ) alkalmazott vas(III)-ammónium-citrát jelenlétében 7 napi kezeltük. (A) Alkalikus foszfatáz enzimaktivitás mérést végeztünk és fehérjetartalomra normalizálva ábrázoltuk az eredmények átlagát, melyek 3 különböző kísérlet duplikált mintáiból származtak.  $***p < 0,001$  (B) A ferritin nehéz-lánc (H) expresszió változását Western blot segítségével mutattuk ki és denzitometráls után glicer-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) értékeire normalizálva ábrázoltuk az alsó panelen. (C) A simaizomsejteket növekedési médiumban, vagy még 10 mmol/l BGP és 10 nmol/l kalcitriol jelenlétében 25  $\mu\text{mol/l}$  vas(III)-ammónium-citrát hozzáadásával 5 napig kezeltük negatív kontroll (NK) vagy ferritin nehéz lánc (FtH) specifikus siRNA silencing mellett. Alkalikus foszfatáz enzimaktivitás mérést végeztünk és fehérjetartalomra normalizálva ábrázoltuk az eredmények átlagát, melyek 2 különböző kísérlet duplikált mintáiból származtak.  $***p < 0,001$ . (D) Az siRNA hatékonyságát Western blotlalt vizsgáltuk és az FtH expressziójában jelentkező változást a GAPDH szintjéhez normalizáltuk denzitometráls után.

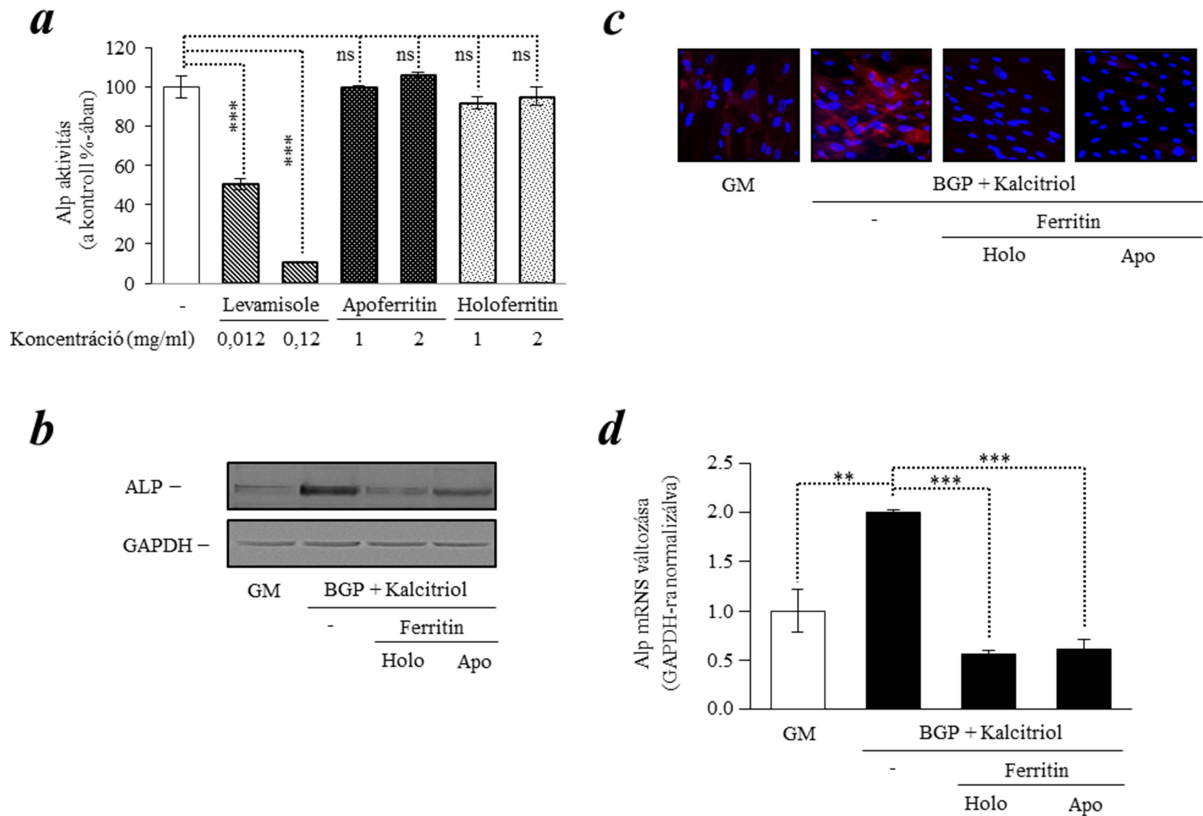
A vas, mint élettani ferritin induktor mellett léteznek más anyagok is, melyek képesek az endogén ferritin expresszióját növelni. Választásunk a 3H-1,2-Dithiole-3-thione-ra (D3T) esett. A BGP és kalcitriol együttes jelenlétében kezelt simaizomsejtekhez növekvő dózisban adtuk a D3T-t és fordított arányosság volt megfigyelhető az alkalmazott D3T dózis és az Alp aktivitás vonatkozásában. (4.a ábra) Western Blot segítségével sikerült igazolni a D3T dóziszfüggő indukáló hatását. (4.b ábra) A D3T hatásának hátterében a H-ferritin szerepét feltételezve FtH elleni siRNA kezelést alkalmaztunk a sejteken és így történt enzimaktivitás mérés. Az eredmények alapján a D3T kezelés hatástalannak bizonyult az Alp aktivitás gátlásában BGP és kalcitriol kezelést követően az anti-FtH siRNA-val transzfektált sejteken. A negatív kontroll siRNA alkalmazása mellett az Alp aktivitás csökkenését észleltük. (4.c ábra) A kísérlet során a silencing hatékonysága 70% körülinek adódott. (4.d ábra)



**4. ábra: A ferritin farmakológiai indukciója képes gátolni a béta-glicerolfoszfát (BGP) és aktivált D3-vitamin (kalcitriol) által kiváltott csontsejtszerű átalakulást a simaizomsejtekben.** Simaizomsejteket növekedési médiumban (GM) vagy BGP (10 mmol/l) és kalcitriol (10 nmol/L) hozzáadásával kezeltünk 7 napon keresztül növekvő dózisu 3H-1,2-dithiol-3-tion (D3T) jelenlétében. (A) Alkalikus foszfatáz enzimaktivitás mérést végeztünk és fehérjetartalomra normalizálva ábrázoltuk az eredmények átlagát, melyek 3 különböző kísérlet duplikált mintáiból származtak. \*\*\* $p < 0,001$  (B) A ferritin nehéz-lánc (H) expressziójában bekövetkező változásokat Western blot segítségével mutattuk ki és denzitometrlás után glicer-aldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) értékeire normalizálva ábrázoltuk az alsó panelen. \*\* $< 0,01$ ; \*\*\* $< 0,001$ . (C) A simaizomsejteket növekedési médiumban (GM) vagy még 10 mmol/l BGP és 10 nmol/l kalcitriol jelenlétében 50 μmol/l D3T hozzáadásával 5 napig kezeltük negatív kontroll (NK) vagy ferritin nehéz lánc (FtH) specifikus siRNA silencing mellett. Alkalikus foszfatáz enzimaktivitás mérést végeztünk és fehérjetartalomra normalizálva ábrázoltuk az eredmények átlagát, melyek 2 különböző kísérlet duplikált mintáiból származtak. \*\*\* $p < 0,001$ . (D) Az siRNA hatékonyságát Western blottal vizsgáltuk és az FtH expressziójában jelentkező változást a GAPDH szintjéhez normalizáltuk denzitometrlás után.

### **6.3 A ferritin humán aorta simaizomsejtek csontsejteké történő differenciálódását gátló mechanizmusának magyarázata**

Következő lépésként a ferritin gátló mechanizmusára koncentráltunk, hogy kimutathassuk az Alp enzim gátlásában, ezáltal a simaizomsejtek csontsejtszerű átalakulásában a pontos támadáspontját. A sejteket 7 napon keresztül BGP és kalcitriol jelenlétében kezeltük, majd a sejteket szolubilizáltuk és a lecentrifugált minta felülúszóját felhasználva mértünk enzimaktivitást, melyet a hozzáadott ferritin molekulákkal direkt módon próbáltunk gátolni. Kontrollként az ismert Alp aktivitást gátló levamizolt használtuk. Az eredmények alapján sem az apo-, sem a holoferritin nem képes direkt módon gátolni az enzim aktivitását, szemben például a levamizollal. (5.a ábra) Mivel az aktivitás mértékét a fehérje mennyisége is meghatározza, így ezt követően Western blot technika segítségével vizsgáltuk meg az Alp fehérje szintű változásait. A kalcifikáló kezelés hatására jelentkező megnövekedett Alp expressziót mind az apo-, mind a holoferritin képes volt meggátolni. (5.b ábra) A ferritin molekulák gátló hatását az Alp fehérje emelkedett szintjében immunfluoreszcens festéssel sikerült láthatóvá tenni. (5.c ábra) A transzkripció szintjén jelentkező gátlás kimutatása miatt RT-PCR vizsgálatot végeztünk. A minták Alp mRNS indukciójában jelentkező változásokat a GAPDH mRNS szintjéhez normalizáltuk és a növekedési médiával kezelt minták arányában vizsgáltuk. (5.d ábra) Jól láthatóan a kalcifikációs kezelés hatására transzkripciós szinten jelentkező Alp indukciót is sikerült gátolni a apo- és holoferritin hozzáadásával, ezáltal bizonyítani, hogy a ferritin hatása transzkripciós szinten jelentkezik.



**5. ábra: A simaizomsejtek csontsejt irányú differenciációját gátló mechanizmusok feltérképezése.** (A) Simaizomsejteket 7 napon át béta-glicerolfoszfát (BGP) és aktivált D3-vitamin (kalcitriol) jelenlétében kezeltünk, majd a sejtlyázatok felhasználásával végeztünk in vitro kísérleteket. Az apo- és holo ferritin alkalikus foszfatáz enzimaktivitására kifejtett direkt gátló hatását a jól ismert gátlószer, a levamiszol hatásával hasonlítottuk össze duplikátumban végezve a méréseket. \*\*\* $p < 0,001$ . 7 napon keresztül növekedési médiumban (GM) vagy hozzáadott BGP (10 mmol/l) és kalcitriol (10 nmol/l) jelenlétében kezelt simaizomsejteket szupplementáltunk apo- és holo ferritinnel (2 mg/ml). (B) Az alkalikus foszfatáz enzim mennyiségét Western blottal vizsgáltuk meg és a minták felvitelének kontrolljára a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) enzim mennyiségét is meghatároztuk. (C) Az alkalikus foszfatáz enzim indukcióját immunfluoreszcens festéssel sikerült láthatóvá tenni. A sejtmagokat kék, az alkalikus foszfatáz enzimet piros szín jelöli a 400-szoros nagyítással készült reprezentatív felvételeken. (D) Az alkalikus foszfatáz mRNS szintű változásainak kimutatására RT-PCR-t alkalmaztunk és a kapott eredményeket a minták GAPDH mRNS tartalmára normalizáltuk és a minták átlagát ábrázoltuk, melyek 2 független kísérlet duplikált mintáiból származtak. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

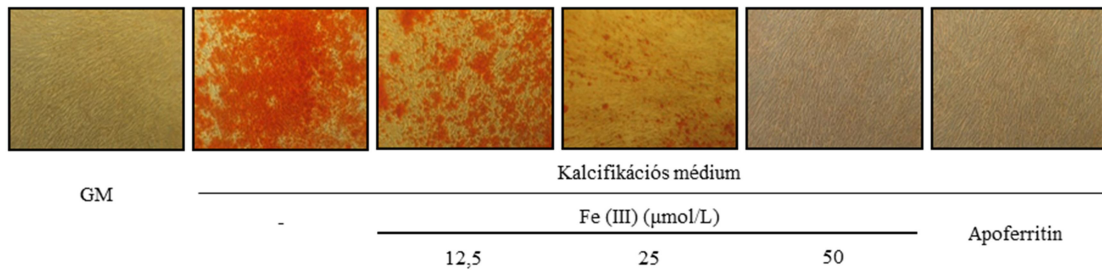


## 6.5 A humán aorta simaizomsejtek mineralizációját gátolja a ferritin nehéz lánc

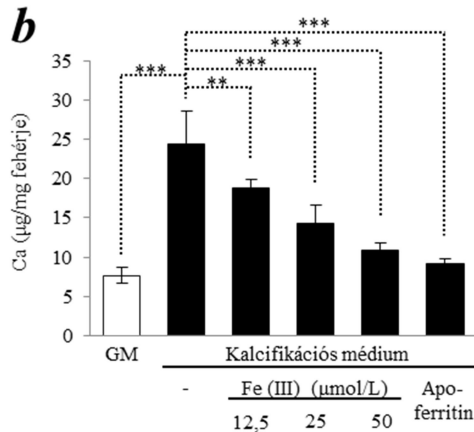
Habár az Alp, mint a mineralizáció korai markerének expressziója fokozódott BGP és kalcitriol kezelés hatására, azonban még az 5 különböző donortól származó sejtekkel sem sikerült magát a mineralizációt kiváltani 3 hétig folytatott kísérletek mellett sem. Az irodalmi adatokat figyelembe véve is leginkább szarvasmarha simaizomsejteket használnak a kalcifikációs vizsgálatokban, mivel ezek a sejtek sokkal könnyebben mineralizálódnak, mint a humán simaizomsejtek. A sejteket a kísérleteinkben további 1,2 mmol/L inorganikus foszfát és 0,9 mmol/L kalcium hozzáadásával, kalcifikációs médiumban kezeltük és így a D3T és vas által indukált ferritin kalcifikációs folyamatokat gátló hatását már nemcsak az Alp vonatkozásában, hanem a mineralizációs folyamatában is lehetőségünk nyílt vizsgálni. A mineralizációt Alizarin Red festéssel és a direkt módon a depozitumok kalcium tartalmának mérésével is képesek voltunk detektálni. Kalcifikációs médium hatására granuláris depozitumok jelentek meg a sejt kultúrákban, melyek azonban teljesen hiányoztak a növekedési médiumban kezelt kontroll esetekben, amit az Alizarin Red festés is jól mutat. (7.a és 8.a ábra) Sikerült kimutatni a vas és a D3T esetében is a granuláris depozitumok alacsonyabb számát a kalcifikációs médiummal kezelt sejtekhez képest. (7.a és 8.a ábra) Az extracelluláris kalcium depozíció mértéke is dózisfüggően csökkent mind vas, mind D3T alkalmazása során és mindkét esetben jelentős gátlás volt észlelhető 25, ill. 50  $\mu\text{mol/L}$  koncentráció esetén. (7.b és 8.b ábra) Nemcsak a vas, mint potens ferritin induktor, hanem a D3T is képes kifejezett intracelluláris ferritin szint emelésre (3-4. ábra), ezért megvizsgáltuk, hogy a megfigyelhető jelentős gátló hatást a kalcium depozícióra képes-e az apoferritin leutánozni. A kísérletek során a vasmentes ferritin forma 2 mg/mL koncentrációban alkalmazva képes volt teljesen meggátolni a kalcium akkumulálódását az extracelluláris térben. (7.b ábra) A vas és D3T gátló hatásának hátterében a FtH szerepét feltételezve siRNA technikával specifikusan csendesítettük el az adott gén működését, mellyel kb. 70%-os hatékonyságot tudtunk elérni. (9.e ábra) A sejteket ismételten vassal és D3T segítségével kezelve már a kalcifikációs média jelenlétében sem sikerült a mineralizációt gátló hatást kimutatni. (9.a és c ábra) Ezen eredmények alapján egyértelműnek látszik, hogy a vas és D3T extracelluláris mineralizációt gátló hatásának letéteményese és mediátora a megnövekedett intracelluláris FtH. A csontspecifikus oszteokalcin jelenléte az extracelluláris mátrixban jól korrelál a simaizomsejtek átalakulási folyamatával. A sejteket 7 napon át kalcifikációs médiával kezelve szignifikáns emelkedést észleltünk az oszteokalcin szintben. (7.c és 8.c ábra) A vas és D3T is képes volt csökkenteni az oszteokalcin fokozott szintjét, mindezt

dózisfüggő módon. (7.c és 8.c ábra) Az apoferritin hatására ugyancsak eltűnt az oszteokalcin indukció. (7.c ábra) A FtH elcsendesítésével a simaizomsejteket a kalcifikáló miliőben vassal és D3T-vel kezelve a korábban észlelt oszteokalcin akkumulációt gátló hatást nem észleltük (9.b és d és 10. ábra) A fentieket összegezve megállapítható, hogy a ferritin, és azon belül is a H ferritin indukciója a simaizomsejtek kalcifikációs és transzdifferentiációs folyamatainak legfőbb mediátora.

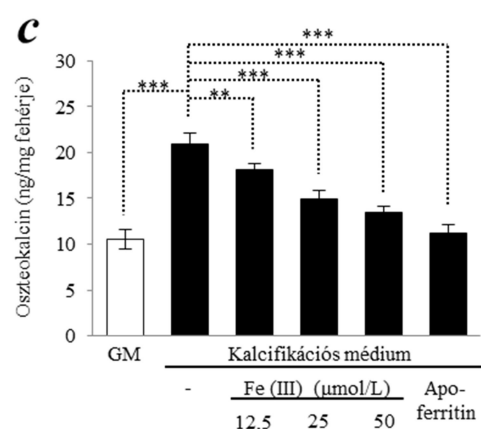
**a**



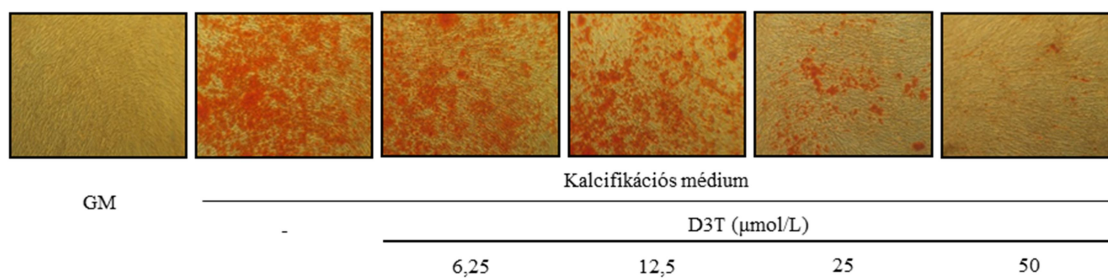
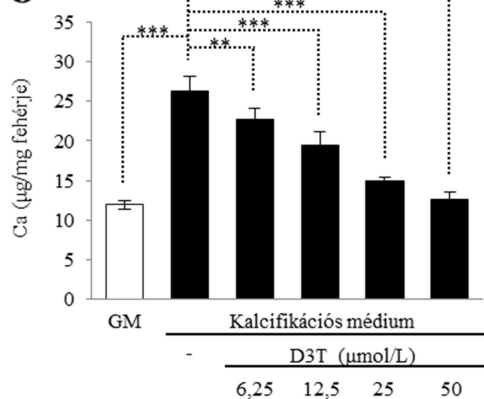
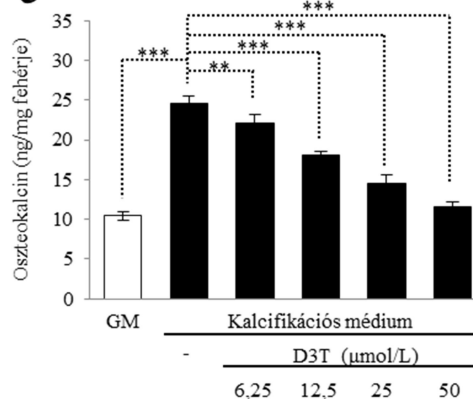
**b**



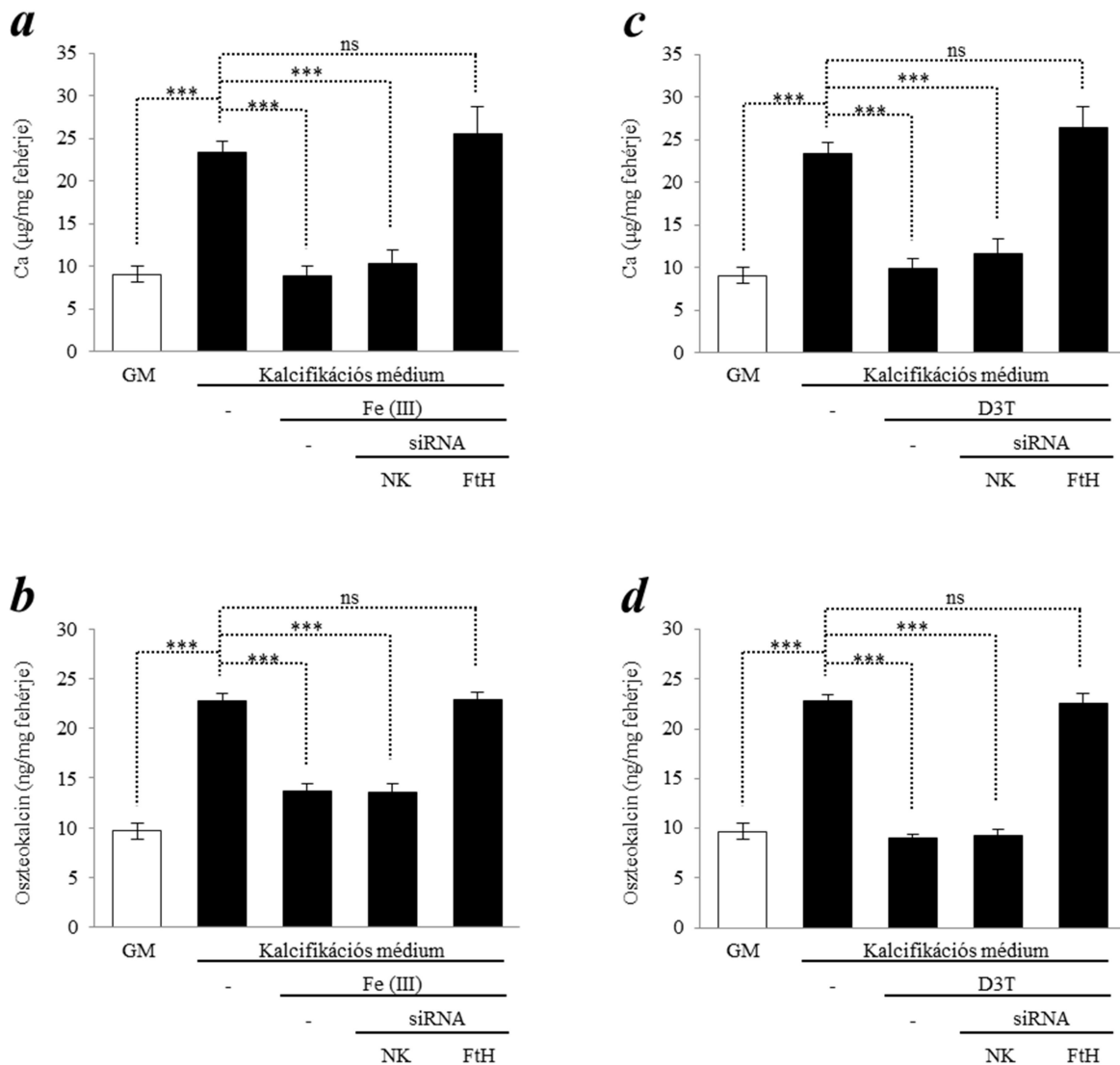
**c**



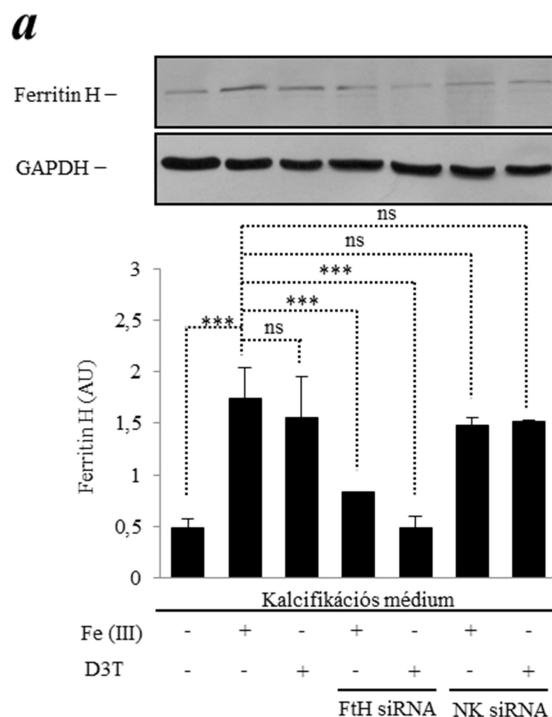
**7. ábra: A ferritin in vitro indukciójával gátolható az inorganikus foszfát és kalcium által kiváltott vaszkuláris simaizomsejt mineralizáció.** A növekedési médiumot (GM) kiegészítve 1,2 mmol/l inorganikus foszfáttal és 0,9 mmol/l kalcium-kloriddal (kalcifikációs médium) kalcifikációt észleltünk. (A) Alizarin Red festés segítségével jól látható a mineralizáció és a növekvő dózisú vas és apoferritin kezelés hatása is. (B) A vas képes gátolni a kalcium extracelluláris depozícióját dóziszfüggően simaizomsejteken, mely gátló hatás apoferritin esetén is kimutatható 5 napos kezelést követően. (C) A vas és az apoferritin is képes csökkenteni a kalcifikációs médium okozta oszteokalcin szint emelkedést. A simaizomsejteket 5 napon át kezeltük növekedési (GM) vagy kalcifikációs médiumban növekvő dózisú vas(III)-ammónium-citrát (12,5-25-50 μmol/l) vagy 2 mg/ml apoferritin jelenlétében. Négy független kísérlet eredményeit ábrázoltuk a fehérjetartalomra normalizálva átlagérték±SD formában. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

**a****b****c**

**8. ábra: A ferritin farmakológiai indukciójával gátolható az inorganikus foszfát és kalcium által kiváltott vaszkuláris simaizomsejt mineralizáció.** Növekedési vagy kalcifikációs médiumban kezelve a simaizomsejteket növekvő dózissal (6,25-12,5-25-50 µmol/l) 3H-1,2-dithiol-3-tion (D3T) jelenlétében 5 napos kezelések alatt észlelhető a mineralizációt gátló hatás. (D) Alizarin Red festéssel jól látható a kalcifikáció, melyet a növekvő dózissal D3T képes csökkenteni a bemutatott reprezentatív képeken. A gátló hatás mind a kalcium depozíció (E), mind az oszteokalcin (F) szintek meghatározásánál is a dózis emelésével arányosan jelentkezett. A grafikonokon 3 független kísérlet adatait ábrázoltuk átlag±SD formában. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.



**9. ábra: A vaszkuláris simaizomsejtek mineralizációját gátló mechanizmusok hátterében a ferritin nehéz lánc (FtH) bír kiemelkedő szereppel.** A simaizomsejteket a kezelések elindítása előtt 24 órával negatív kontroll vagy FtH specifikus siRNA segítségével csendesítettük el. A sejteket növekedési médiumban (GM) vagy kalcifikációs médiumban, 1,2 mmol/l inorganikus foszfát és 0,9 mmol/l kalcium hozzáadásával kezeltük 25 µmol/l vas(III)-ammónium-citrát vagy 50 µmol/l 3H-1,2-dithiol-3-tion (D3T) jelenlétében 4 napon keresztül. Az FtH expresszió gátlását követően nem következett be a vas expozíció után csökkenés sem a kalcium depozíció (A), sem az oszteokalcin (B) szintek vonatkozásában. D3T kezelés során nem csökkent a kalcium depozíció mértéke (C) és nem változott az oszteokalcin koncentrációja (D) sem. \*\*\* $p < 0,001$ .



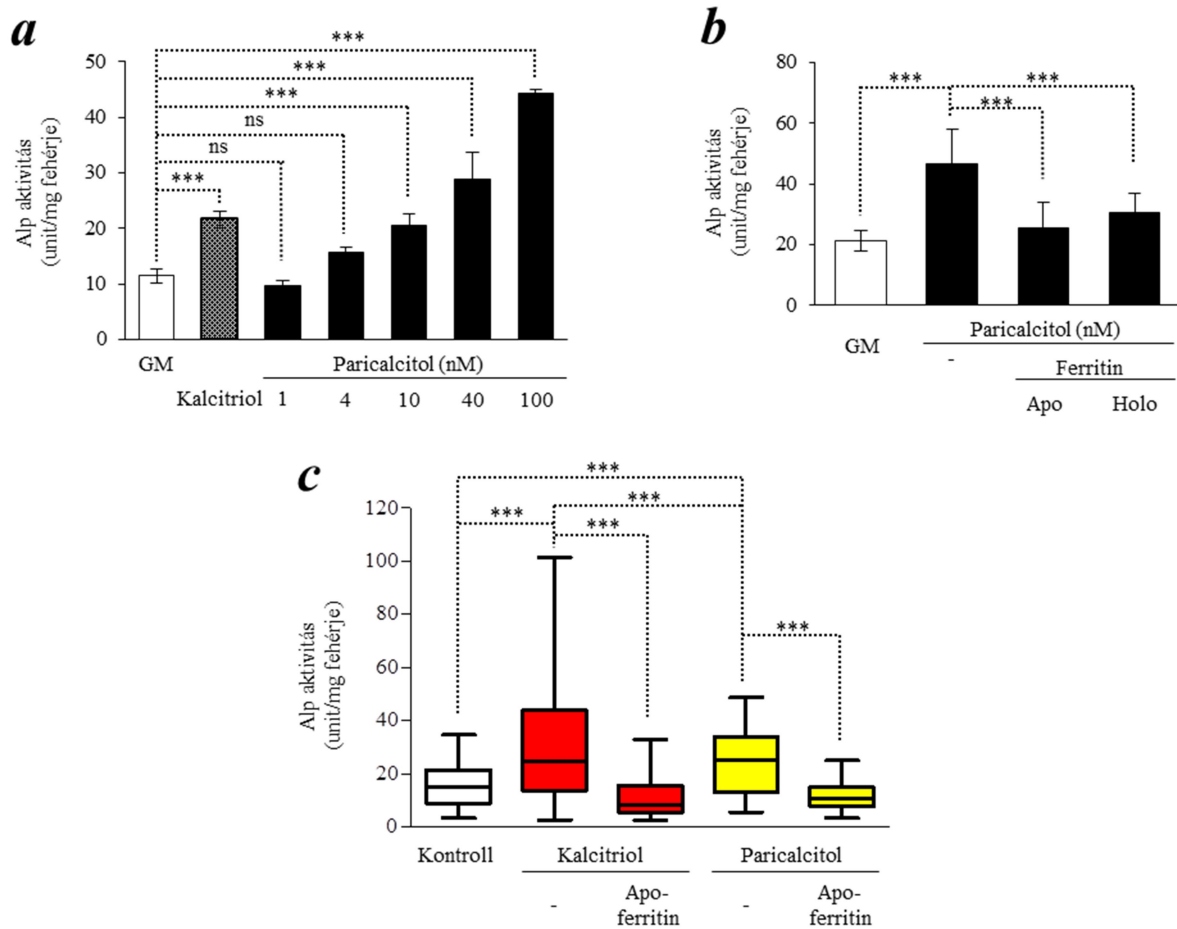
**10. ábra** siRNA kezeléssel specifikusan gátolható a ferritin nehéz lánc szintézise. A FtH siRNA hatékonyságát Western blottal vizsgáltuk és az FtH expressziójában jelentkező változást a gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) szintjéhez normalizáltuk denzitometrálas után. Átlag±SD formában ábrázoltuk. \*\*\* $p < 0,001$

## 6.6 D-vitamin receptor agonisták szerepe a csontsejtszerű transzformációban

A paricalcitol képes volt emelni az Alp aktivitását simaizomsejtekben és az indukáló hatás az alkalmazott dózistól függően emelkedett. (11.a ábra) Az kezelés során alkalmazott apo- és holoferritin ferroxidáz aktivitása képes volt a paricalcitol által indukált Alp aktivitás emelkedést is legátolni. (11.b ábra)

## 6.7 Különböző D-vitamin receptor agonisták in vivo vizsgálata

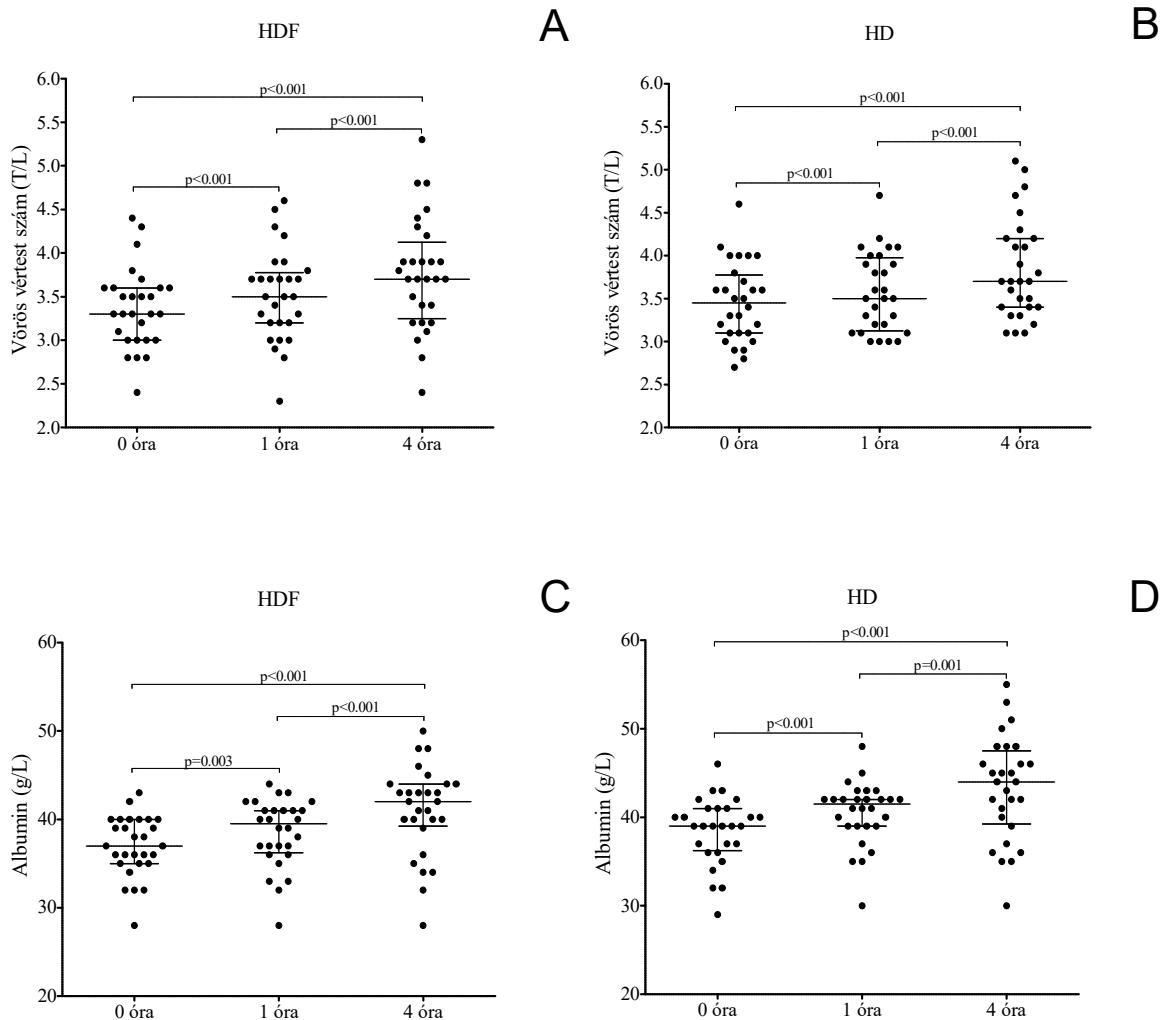
Kalcitriol vagy paricalcitol terápiában részesülő, szekunder hiperparatireózisban szenvedő végstádiumú veseelégtelen betegek plazma mintájával kezelve a simaizomsejteken 5 nap után vizsgáltuk az Alp aktivitásban bekövetkező változásokat. A kalcitriol és a paricalcitol is képes volt szignifikánsan emelni az Alp aktivitását, de a paricalcitol esetén kisebb mértékű emelkedést tudtunk csak detektálni. Apoferritin in vitro hozzáadása mellett az induktortól függetlenül mindkét esetben észlelhető volt az aktivitást gátló hatás. (11.c ábra)



**11. ábra: A D-vitamin analóg vegyületei képesek a simaizomsejtes csontsejtszerű transzformációját kiváltani.** (A) A simaizomsejteket növekedési médiumban (GM) vagy aktivált D3-vitamin (kalcitriol) jelenlétében vagy növekvő dózisú paricalcitol (1-4-10-40-100 nmol/L) hozzáadásával kezeltünk. 7 nap után alkalikus foszfatáz aktivitást mértünk és aminták fehérje tartalmára normalizálva ábrázoltuk az értékeket átlag  $\pm$ SD formában. \*\*\* $p < 0,001$ . (B) A simaizomsejteket növekedési médiumban vagy további 40 nmol/L paricalcitolal kezelve a hozzáadott 2 mg/ml-es dózisú apo- és holoferritin jelenlétében vizsgáltuk az alkalikus foszfatáz aktivitást, 2 független kísérlet sorozat duplikátumban kapott eredményei alapján. \*\*\* $p < 0,001$ . (C) Önkéntes dializált betegektől dialízis kezelést követően azonnal, majd az előírt kalcitriol/paricalcitol injekció beadását követően történt vérvétel. A gyógyszerek beadását követően 5 percig vártunk a megfelelő, egyensúlyi vérszint kialakulásáig, majd levettük a mintákat. A betegek plazma mintáit szérumentes médium alkalmazásával használtuk fel 5 napon keresztül a simaizomsejtes kezelésére, melyeket még további 2 mg/ml apoferritin hozzáadásával egészítettünk ki. Alkalikus foszfatáz enzimaktivitás meghatározásánál a fehérje tartalomra normalizáltuk az eredményeket, majd az így kapott adatokat a betegek között észlelhető igen nagy variabilitás miatt az ábrázolásnál maximum és minimum értékek mellett a mediánt és az interkvartilis tartományokat is figyelembe vettük.

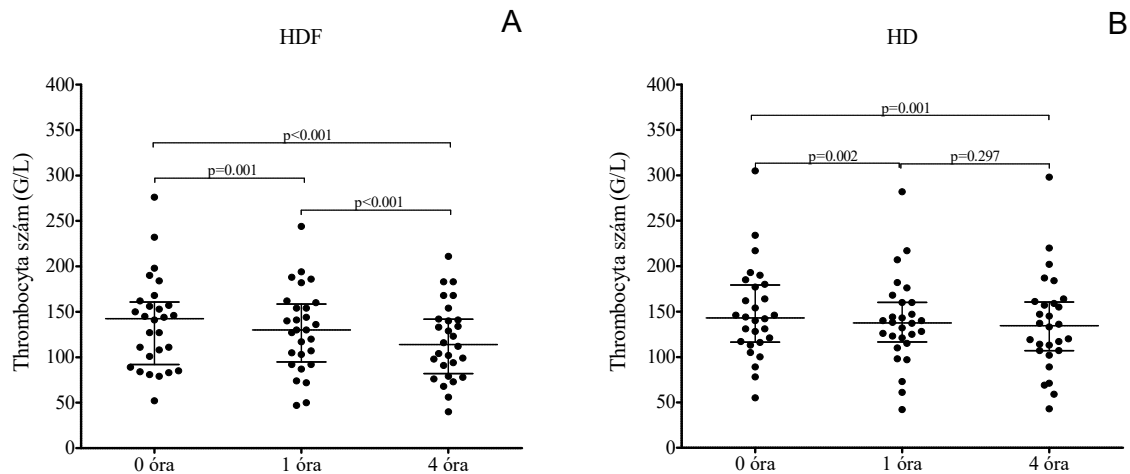
## 6.8 A dialízis kezelés alatt végbemenő változások kiértékelése

Mindkét dialízis modalitás mellett a kezeléseket jelentős folyadékvesztéssel kell számolnunk, mely változó mértékű hemokoncentrációt idéz elő, amit a különböző időpontokban levett minták vörösvértest számának és albumin szintjeinek meghatározásával tudunk monitorozni. Az eredmények alapján mind a vörösvértest szám, mind az albumin szint szignifikánsan emelkedett a kezeléseket során, függetlenül a modalitástól. (12. ábra)



12. ábra: A dialízis kezeléseket alatt bekövetkező ultrafiltráció jelentős hemokoncentrációt képes létrehozni tekintet nélkül a kezelés modalitására. A hemodiafiltráció (HDF) és a hemodialízis (HD) kezeléseket 0., 1. és 4. órájában került meghatározásra a vörösvértest (vvt) szám (A és B) és az albumin szint (C és D). Párosított mintás t-próbát végeztünk a vvt számok és Wilcoxon-féle előjeles rangszám próbát az albumin értékek vizsgálata során, hogy a megfelelő p értékeket meghatározhassuk. (n=28)

A méréseink során a továbbiakban kapott eredményeket minden esetben a sejtszámok vonatkozásában a vörösvértest számra, míg a szolubilis markerek esetén az albumin szintre normalizáltuk. A hemokoncentrációhoz korrigált vérlemezke szám folyamatos szignifikáns csökkenést mutatott a 4 órás kezelés alatt, ami tekintélyes szekvesztrációt jelez a dializáló rendszerben, leginkább a dializátor felszínéhez történő kikötődés valószínűsíthető. (13. ábra)



**13. ábra: A dialízis kezelések alatt bekövetkező vérlemezke szám csökkenés hátterében a fokozott szekvesztráció áll.** Hemodiafiltráció (HDF) és hemodialízis (HD) kezelés indításakor, ill. 1 és 4 óra elteltével határoztuk meg a vérlemezke számot. Párosított mintás t-próbát alkalmaztunk a p értékek számításához. (n=28)

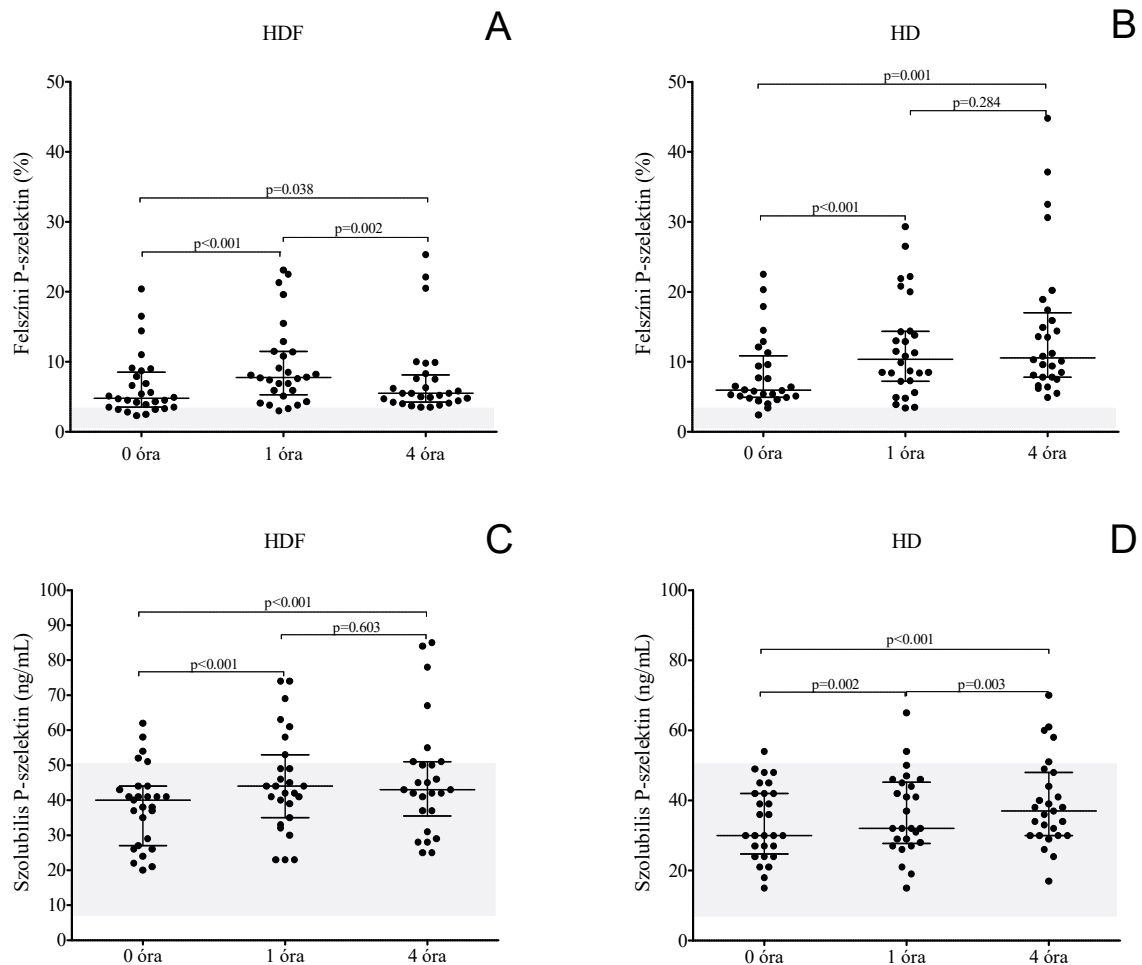
## 6.9 Direkt vérlemezke aktivációs markerek

A vérlemezkek felszíni P-szelektin értékek már a dialízis kezelések elejétől kezdve jóval a korábban leírt 3% alatti referencia tartomány feletti értékűek voltak.[49] (14.a és b ábra) Ki kell hangsúlyozni, hogy az első minták levétele előtt megvártuk, amíg a szerelék teljesen feltöltődik vérrel, mely 4-5 perces folyamatot feltételez a dializáló gépek esetén. Így valójában már pár perc eltelt a kezelésekből mikor a kezdeti minta (0. óra) levételre került. HD kezelés mellett magasabb felszíni P-szelektin szinteket észleltünk, mint HDF esetén, mely különbség a kezelések idejének előrehaladtával egyre kifejezettebbé vált. (2. táblázat) Habár a plazma mintákban a szolubilis P-szelektin értékek mediánja a kezelések végén a referencia tartományban maradt mindkét esetben, meg kell említeni, hogy jó néhány esetben észleltünk a referencia felső határánál magasabb értékeket. (14.c és d ábra) Bár a szolubilis P-szelektin értékek a kezelés alatt emelkedést mutattak, de csak az 1 órás minták esetén volt szignifikáns a különbség az adatok között, és abban az esetben is a HDF kezelés során volt magasabb.

Paraméterek	0. óra			1. óra			4. óra		
	HD (átlag ± SEM)	HDF (átlag ± SEM)	P érték	HD (átlag ± SEM)	HDF (átlag ± SEM)	P érték	HD (átlag ± SEM)	HDF (átlag ± SEM)	P érték
Felszín P-szelektin (%)	8,26 ± 0,98	6,5 ± 0,84	n.s.	12,00 ± 1,33	9,50 ± 1,11	n.s.	14,45 ± 1,92	7,56 ± 1,07	<i>p</i> < 0,001
Szolibilis P-szelektin (ng/mL)	33,68 ± 1,99	38,26 ± 2,17	n.s.	36,08 ± 2,28	45,07 ± 2,75	<i>p</i> = 0,022	39,22 ± 2,40	46,15 ± 3,26	n.s.
Monocytá-thrombocytá aggregátum (%)	64,82 ± 3,57	47,61 ± 2,57	<i>p</i> < 0,001	76,79 ± 3,06	65,82 ± 3,28	<i>p</i> = 0,010	83,18 ± 2,52	67,79 ± 3,48	<i>p</i> = 0,001
Neutrophil-thrombocytá aggregátum (%)	13,75 ± 1,73	9,54 ± 0,84	<i>p</i> = 0,024	17,96 ± 1,81	15,29 ± 1,62	n.s.	24,46 ± 2,57	19,5 ± 2,92	<i>p</i> = 0,032
Szolibilis E-szelektin (ng/mL)	24,75 ± 2,42	25,58 ± 2,14	n.s.	25,08 ± 2,75	26,46 ± 2,09	n.s.	24,37 ± 2,24	25,54 ± 2,07	n.s.
vWF antigén (%)	158,60 ± 10,25	158,30 ± 9,31	n.s.	161,40 ± 10,82	166,10 ± 9,93	n.s.	169,80 ± 10,69	162,80 ± 10,66	n.s.

A *p* értékek meghatározásához Wilcoxon-féle elbjeles rangszám próbát használtunk.

2. táblázat: A vizsgált paraméterek hemodialízis (HD) és hemodiafiltrációs (HDF) kezelések közötti összehasonlítása során nyert *p* értékek a 0, 1 és 4 órás időpontokban. n.s.: *p* > 0.05

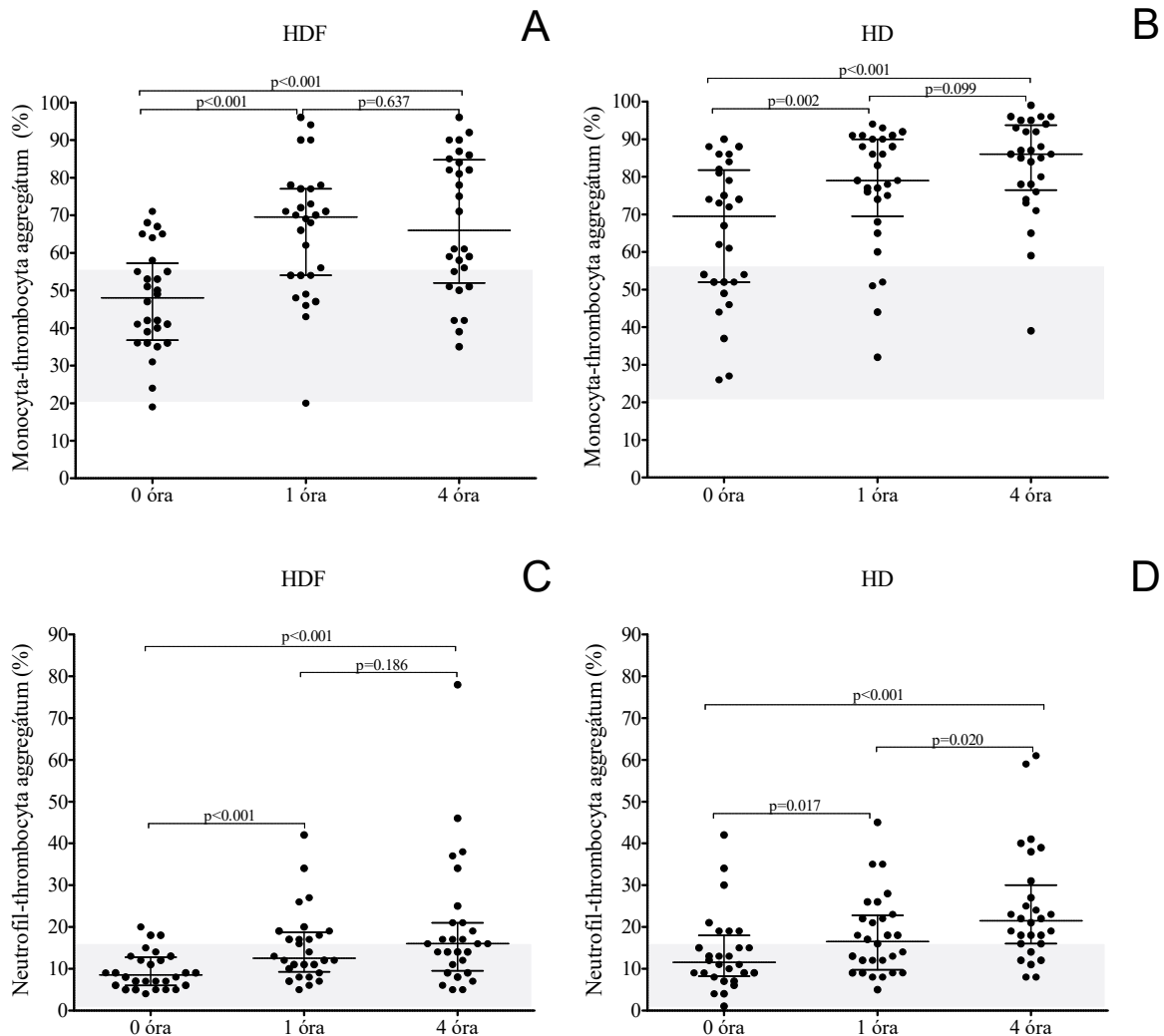


**14. ábra: Dialízis kezelések közben emelkedik a P-szelektin szint.** A felszíni P-szelektin (A és B) és a szolubilis P-szelektin (C és D) szintekben bekövetkező változások láthatóak hemodiafiltrációs (HDF) és hemodialízis (HD) kezelések alatt 0, 1 és 4 órás időpontokban. A beszürkített terület az adott paraméter referencia tartományát mutatja. A p értékeket Wilcoxon-féle előjeles rangszám próba segítségével határoztuk meg. (n=28)

## 6.10 Vérlemezke-fehérvérsejt aggregátumok

A vérlemezke aktiváció nyomon követésére indirekt aktivációs tesztet is alkalmaztunk, mely során a heterotipikus aggregátumokat vizsgáltuk. A monocyta-vérlemezke aggregátumok vizsgálata során kifejezett emelkedést észleltünk, mely a korábban az irodalomban általunk is leírt 38%-os kontroll csoport értékhez képest meglepően magasnak bizonyult.[52, 53] Az aggregátumok aránya folyamatos emelkedést mutatott a veseptlő kezelések alatt, és minden esetben magasabb volt HD kezelés esetén és a különbségek szignifikánsnak is adódtak statisztikailag. (15.a és b ábra) Az előzővel megegyező tendenciát sikerült megfigyelni a neutrofil-vérlemezke aggregátumok arányának változásában a kezelések alatt. (15.c és d ábra) Ugyancsak szignifikánsan magasabb értékeket kaptunk HD

kezelés kapcsán a monocyta-vérlemezke aggregátumok vonatkozásában minden vizsgált időpontban HDF kezeléssel összehasonlítva.

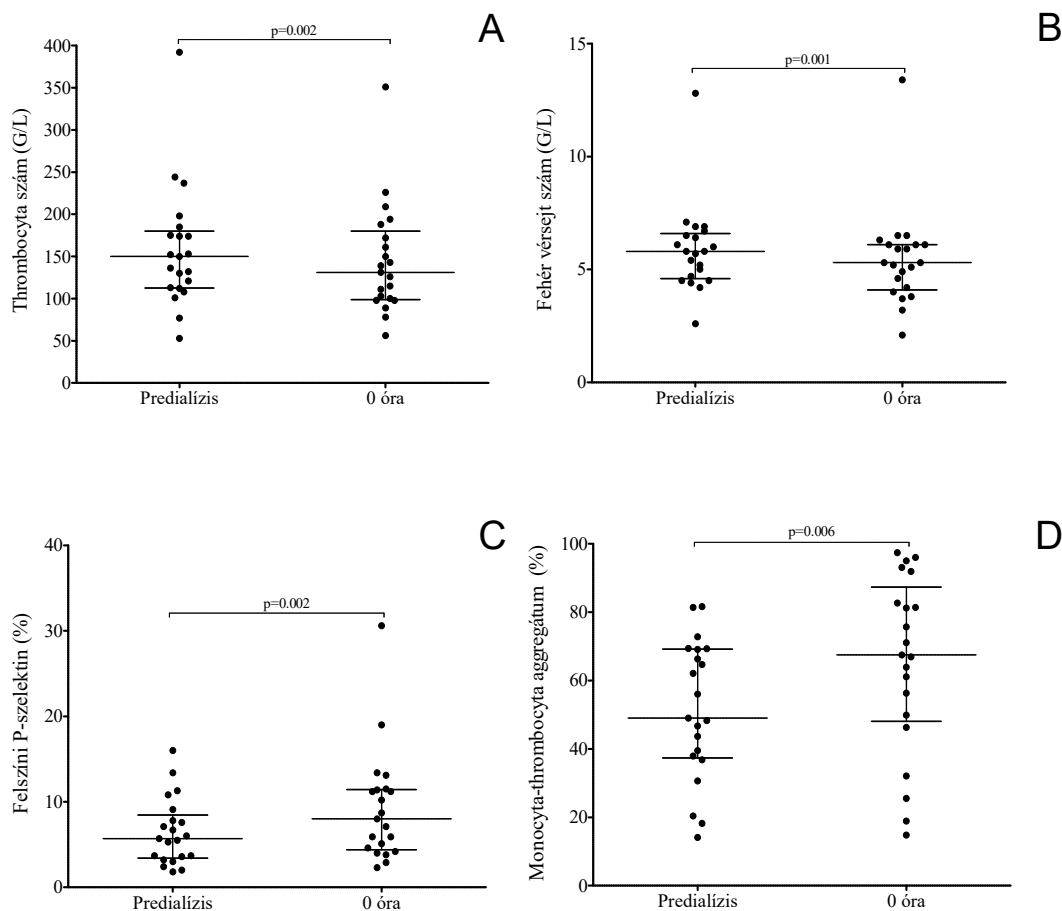


**15. ábra: A heterotipikus aggregátumok szintje folyamatos emelkedést mutat a dialízis kezelések alatt.** A monocyta-vérlemezke (A és B) és a neutrofil-vérlemezke (C és D) aggregátumok szintjét ábrázoltuk hemodiafiltrációs (HDF) és hemodialízis (HD) kezelések 0., 1. és 4. órájában. Wilcoxon-féle előjeles rangszám próba alkalmazásával számoltuk a p értékeket. (n=28)

## 6.11 Kontroll mérések

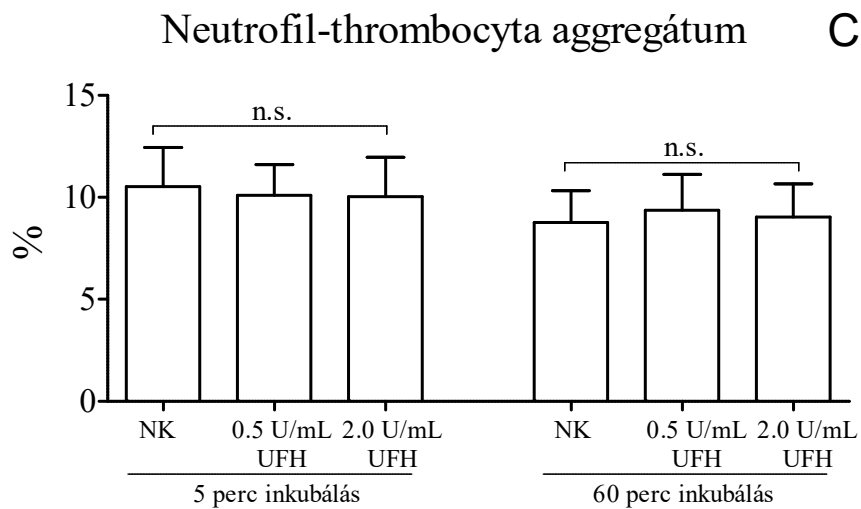
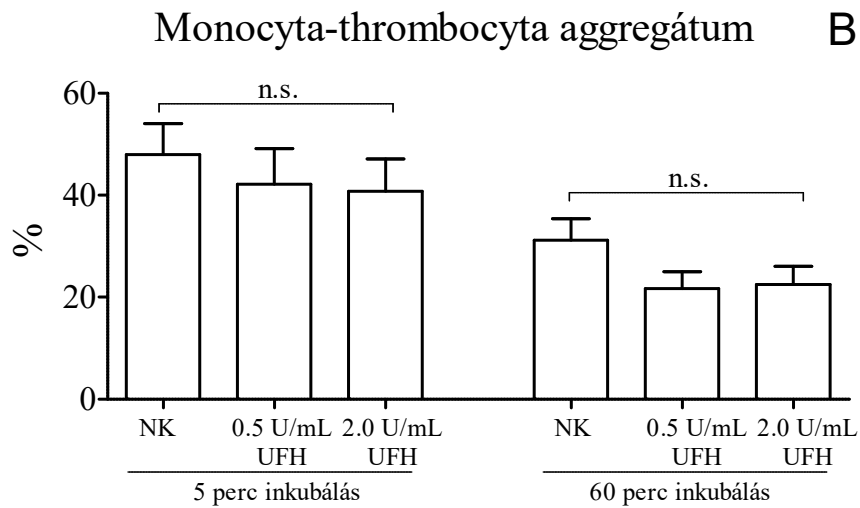
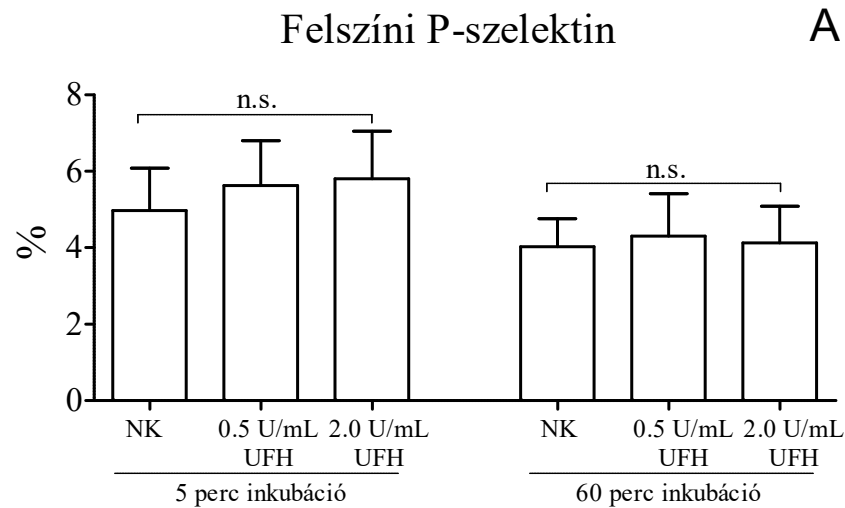
A méréseink során a vérlemezke aktiváció direkt és indirekt markereiben észlelt szignifikánsan emelkedett értékekkel összefüggő változók meghatározására is kísérletet tettünk. Először a vér áramlási sebességét vizsgáltuk. A 0 órás minták esetén sem HD, sem HDF kezelés mellett lehetett korrelációt találni a vizsgált aktivációs markerek vonatkozásában. A változások a felszíni P-szelektin, a szolubilis P-szelektin, monocyta- és neutrofil-vérlemezke heterotipikus aggregátumok esetében a kezelések 4. órájában levett mintákban sem mutattak összefüggést a pumpa fordulattal, függetlenül a kezelési

modalitástól, így összességében kijelenthetjük, hogy a megfigyelt változások nem függenek össze a vér pumpa sebességével. Továbbá nem sikerült kapcsolatot igazolni a dialízisben eltöltött idő és a leírt változások vonatkozásában. A későbbiekben újabb kísérleteket végeztünk annak bizonyítására, hogy a 0 órás minták esetén észlelt magas aktivációs értékek hátterében állhat-e a dializáló gép szerelékének feltöltése közben történő leukocita és/vagy vérlemezke aktiváció. A feltételezésünk igazolására néhány beteg esetén az AV-fisztula szűrését követően, még a szerelékhez csatlakozás előtt történt a vérvétel, ezek lettek a predialitikus minták. A mérések során szignifikáns csökkenést észleltünk a vérlemezke és fehérvérsejt számban a predialitikus és 0 órás minták között (16.a és b ábra), továbbá az aktivációs markerek szintje is magasabbnak adódott a 0 órás mintákat a predialitikus mintákkal összehasonlítva. (16.c és d ábra)



**16. ábra: A fokozott vérlemezke aktiváció már a beteg dializáló géphez csatlakoztatásakor megkezdődik.** Hemodiafiltrációs kezelés mellett mintavétel történt nemcsak a szerelék vérrel való feltöltését követően (0. óra), hanem a beteg arterio-venózus fistulájának szűrésakor is (predialízis). A vérlemezke (A) és fehérvérsejt (fvs) szám (B) meghatározás mellett a mintákból a felszíni P-szelektin (C) és a monocita-vérlemezke aggregátumok (D) szintjét is mértük. A p értékeket Wilcoxon-féle előjeles rangszám próba segítségével határoztuk meg. (n=21)

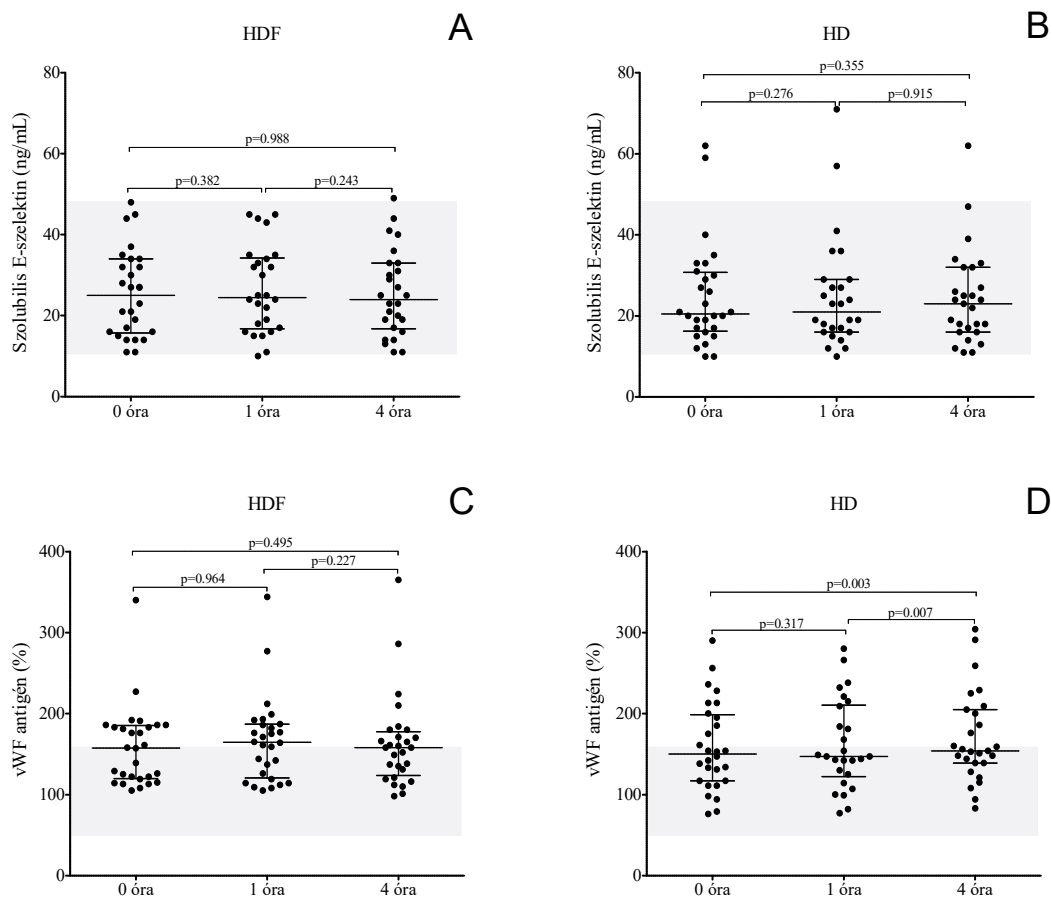
Mivel a heparin önmagában is képes a vérlemezkék aktivációjára, így logikusan adódott a gondolat, hogy a kezelések alatt létrejövő aktivációs paraméter változások háttérében milyen szerep jut a heparinnak. Az in vitro kísérletekhez 3 végstádiumú veseelégtelen betegektől vettünk a heti első dialízis kezelést megelőzően mintákat, majd különböző koncentrációban adtunk konvencionális heparint a vérmintákhoz, hogy meghatározhassuk milyen szerepet is játszik a vérlemezkék aktivációjában. Legelőször a minták heparin koncentrációját állítottuk be anti-Xa mérés segítségével. A mintákat 0,5 U/mL vagy 2 U/mL konvencionális heparin jelenlétében inkubáltuk 5 vagy 60 percen keresztül. Az inkubációt követően a mintákból felszíni P-szelektin és leukocytá-vérlemezske heterotipikus aggregátum meghatározást végeztünk áramlási citométer segítségével és a nem heparinizált mintákkal hasonlítottuk össze a kapott eredményeket. Az in vitro kísérleteink során a heparinizáció kapcsán nem sikerült változást megfigyelni a P-szelektin expressziójában vagy a heterotipikus aggregátumok mennyiségében. Így kijelenthetjük, hogy a korábbi kísérleteink során észlelt változások és a heparinizáció között nincs összefüggés. (17. ábra)



**17. ábra: In vitro a heparin nem képes vérlemezke aktivációt kiváltani dializált betegek vérmintáiban.** A konvencionális heparint különböző dózisban (0,5-2 U/mL) a betegek mintáihoz adva 5, ill. 60 perces inkubálást követően történt felszíni P-szelektin (A), monocita-vérlemezke (B) és neutrofil-vérlemezke (C) aggregátum szint meghatározás. Wilcoxon-féle előjeles rangszám próba alkalmazásával számoltuk a p értékeket.

## 6.12 Endotél sejt aktiváció

Az extrakorporális keringés kapcsán bekövetkező endotél sejt sérülés régóta ismert, és leggyakrabban a szolubilis E-szelektin (sE-szelektin) és von Willebrand faktor (vWF) antigén szintjének változását vizsgálva ki is mutatható. Minden időpontot figyelembe véve is csak néhány esetben észleltünk a gyártó által javasolt felső referencia határnál (51 ng/mL) magasabb sE-szelektin szintet. A mérések során nem észleltünk különbséget a kezelési modalitások között és a kezeléseket alatt a sE-szelektin mediánjai sem változtak. A vWF antigén vonatkozásában sem sikerült kimutatni változást a kezelési típusok között, azonban a sE-szelektin és a vWF antigén szintje is emelkedést mutatott HD kezelés esetén, mely a von Willebrand faktor esetén szignifikáns is volt. (18. ábra)



**18. ábra:** Az endotél sejt aktivációt hemodialízis kezelés kapcsán lehetett kimutatni a von Willebrand faktor emelkedésével. Hemodiafiltráció (HDF) és hemodialízis (HD) kezeléseket 0., 1. és 4. órájában határoztuk meg a szolubilis E-szelektin (A és B) és a von Willebrand faktor (vWF) antigén (C és D) szinteket. Wilcoxon-féle előjeles rangszám próba alkalmazásával számoltuk a p értékeket. (n=28)

## 7 Diszkusszió

A humán aorta simaizomsejtek vizsgálata során észlelt eredményeink egyértelműen alátámasztják a H-ferritin gátló szerepét a simaizomsejtek mineralizációját és csontsejtszerű átalakulását kísérő folyamatokban. A transzformációs folyamatot BGP és/vagy kalcitriol jelenlétében sikerült kimutatni. Ezen kísérletek igazolták a korábban inorganikus foszfát és nagy dózisu aktivált D-vitamin hatására leírt HAoSMC kalcifikációt.[26, 54, 55] Az alkalikus foszfataz expressziójának nyomon követésével képesek voltunk a már korábban leírt módon HAoSMC csontsejteké történő átmenetét vizsgálni. [18] A H-ferritin hatását sikerült kimutatni a kalcifikációs folyamatok gátlásában függetlenül magától az induktortól. Összefüggésben az előzőekkel pedig magának a ferroxidáz aktivitásnak tudtuk igazolni az elsődleges szerepét a mineralizációs folyamatokban. A ferritin alternatív módon történő indukcióját sikerült elérnünk a korábban csak kemoterápiák mellékhatásainak csökkentésére használt D3T alkalmazásával.[32, 33] A D3T hatására kialakult ferritin indukción keresztül gátolni tudtuk a simaizomsejtek transzdzifferenciációs folyamatát és meg lehetett előzni az extracelluláris mátrix kalcifikációját. A továbbiakban sikerült kalcitriol vagy paricalcitol terápiában részesülő végstádiumú veseelégtelen betegek szérum mintái segítségével csontsejtszerű transzformációt igazolni a tenyésztett HAoSMC sejt kultúrákban, melyeken aztán a FtH hozzáadásával ugyancsak gátló hatást találtunk.

A kardiovaszkuláris betegségek sajnos továbbra is a vezető halálokok között szerepelnek az előrehaladott krónikus vesebetegség és a végstádiumú veseelégtelenség vonatkozásában.[13, 56, 57] Az illesztett kardiovaszkuláris eredetű halálozás bizonyítottan 10-20-szor gyakoribb a krónikus vesebetegekben az átlag populációhoz viszonyítva.[58] Az emelkedett prevalencia hátterében, legalább is részben a fokozott vaszkuláris kalcifikáció áll.[59] A vaszkuláris kalcifikáció felgyorsulásában egyértelműen az urémiás milliók van fontos szerepe, amit alátámaszt a már fiatal korokban is vesepótló kezelést igénylő betegek esetén a szív és érrendszeri betegségek kifejezetten emelkedett kockázata.[60, 61] Az emelkedett inorganikus foszfát szint önmagában is szignifikáns rizikó faktor és a kalcifikációban betöltött szerepét már több tanulmányban is elsődlegesnek írták le.[62] A mineralizációs folyamatok hátterében egyéb induktorokat is sikerült azonosítani.[63] A D-vitamin receptor agonistákkal kapcsolatban is jelentek meg közlemények, melyekben az érrendszer fokozott meszesedéséről számoltak be. Azonban a különböző vegyületek alkalmazása során jelentős eltérések tapasztalhatóak.[15, 25] A végstádiumú veseelégtelenséghez gyakran társuló szekunder hiperparatireózis terápiájában széles körben

alkalmazzák a kalcitriolt és analóg vegyületeit. Ismert az irodalomban, hogy a vaszkuláris simaizomsejtek D-vitamin receptort expresszálnak és kalcitriol hatására tovább emelkedik a receptorok száma. Korábbi vizsgálatok eredményei alapján a kalcitriol többféleképpen képes a simaizomsejtek proliferációját és differenciálódását befolyásolni. Továbbá azt is leírták, hogy az élettani szintet meghaladó dozírozás esetén mind in vitro, mind állatmodellekben képes a kalcitriol a vaszkuláris kalcifikáció kialakulását elősegíteni.[64] Az eredményeket figyelembe véve a kalcitriol a simaizomsejtek mineralizációját a RANKL/osteoprotegerin arány emelésével gyorsítja fel.[25] A fentebb említettek tények alapján esett a választásunk a foszfát és kalcitriol, mint kalcifikációt fokozó anyagok használatára.

A ferritin egy ősi szférikus relatíve igen nagy fehérje, mely igen konzervatív háromdimenziós szerkezettel rendelkezik és a legfontosabb intracelluláris vastároló molekula.[65, 66] A ferritinek a szférikus fehérjeburokban egymásra igencsak hasonlító családot alkotnak, kifejezetten a vas megkötésére és hatalmas mennyiségben történő tárolására tervezve biztonságos, szolubilis és mégis könnyen hozzáférhető formában. A ferritin molekula 24 alegységből épül fel, melyek a nehéz (heavy, H) és könnyű (light, L) láncok változatos kombinációjából rakódik össze, melyben szerepe van az adott sejt vasháztartásának, szövet- és szervspecifitásának. A két ferritin polipeptid igen hasonló szerkezetű, de csak a nehézlánc rendelkezik ferroxidáz aktivitással, mely képes a vas redox állapotai közötti átalakulást katalizálni, ezáltal biztonságosan a ferritin molekula belsejében létrehozni egy vas magot. A  $Fe^{2+}$  ionból  $Fe^{3+}$  ion keletkezése során felszabaduló elektron a vas mag körül delokalizált formában passzívan követi a raktározási folyamatot. Maximálisan egy ferritin molekula esetén 4500 vas atom épül be ionizált formában a belső magba. A sejt a számára pillanatnyilag felesleges vastól szabadulva a ferritin molekula segítségével képes tárolni a veszélyes kationt, melyet azonnal képes mozgósítani amennyiben szükséges a sejt élettani folyamataihoz.[65, 66] Jelen tudásunk a ferritinnel és a biológiai funkciójával kapcsolatban az utóbbi évtizedben lett sokkal szélesebb körű, köszönhetően annak, hogy már nemcsak a vas metabolizmusának és homeosztázisának fenntartásáért felelős funkcióját, hanem egyéb élettani és kórélettani folyamatokban betöltött szerepét is megismertük.[27, 46, 67-70] Korábban már sikerült bizonyítanunk, hogy a hem és vas által mediált FtH indukció képes gátolni a magas inorganikus foszfát indukálta kalcifikációt és csontsejtszerű differenciációt.[27] A ferritin hatása összetett, transzkripciós szinten jelentkező folyamatot feltételez, mivel sikerült igazolnunk, hogy hatása nem direkt módon jelentkezik és így nem képes gátolni a sejtek inorganikus foszfát felvételét a nátrium-foszfor ko-transzporter Pit-1 funkciójának befolyásolása révén.[27] A megfigyelt gátló hatás hátterében pedig sikerült a

ferritin nehéz láncc ferroxidáz aktivitásának szerepét igazolni.[27] Ugyancsak meg kell említeni, hogy a FtH nemcsak aktívan képes a csontsejtszerű átalakulást gátolni, hanem képes a csontsejtek aktivitását csökkenteni a Cbfa-1 szintjének csökkentése révén.[27, 70] A Cbfa-1 jelen tudásunk alapján az oszteogenezist mediáló legfontosabb transzkripciós faktor, mely felelős a csontsejt specifikus gének expressziójának szabályozásáért.[71] Elsőként sikerült igazolni a kapcsolatot a krónikus vesebetegség kapcsán oly gyakran jelentkező megváltozott vas háztartás és a vaszkuláris kalcifikáció között. A vesepótló kezelésre szoruló betegek esetén sokkal gyakrabban kell súlyos vashiány kialakulásával számolnunk, melynek háttérében olyan banális okokat is találunk, mint a gyakori vérvételek és sajnos sokszor a dialízis kezelések alkalmával is veszíthetnek néhány milliliter vért.[72] A hepcidin expressziója és szekréciója egyaránt fokozódik krónikus gyulladással járó folyamatokban, mint például a krónikus vesebetegség, így jelentősen képes csökkenteni a ferroportin lizoszomális felvételét és degradációját.[73, 74] A ferroportin hatásának csökkenésével a sejtek képtelenné válnak a vas sejtszintű kiválasztására. A hepcidin áttételesen funkcionális vashiányhoz és vérszegénységhez vezet a bélhámsejtek vas felszívódásának gátlásával és a vas újrahasonosítását végző retikulo-endoteliális rendszerben a vas visszatartásával. Ezek alapján érthető miért is olyan gyakori a vashiány a veseelégtelen betegekben és, hogy miért észlelhető drámai csökkenés a sejten belüli ferritin expresszióban. Feltételezésünk szerint ez a csökkenés okolható a fokozott kalcifikáció háttérében, ezáltal az emelkedett foszfát szinttel együtt részben magyarázva is az urémia és a fokozott kardiovaszkuláris halálozás kapcsolatát. A ferritin expressziójának fokozása terápiás konzekvenciával rendelkezhet, emiatt döntöttünk úgy, hogy potenciális farmakológiai induktorokat próbálunk ki kalcifikációs modellünkben. Kíváncsiak voltunk, hogy a gyógyszeres stimulálást követően képesek vagyunk-e hasonló gátló hatást észlelni, mint a vas indukció következtében képződő ferritin esetében. A voksunkat a D3T mellett tettük le, melyet daganatos betegségek megelőzésében és terápiájában a mellékhatások csökkentésére már klinikai vizsgálatokban használnak és bizonyítottan anti-oxidáns hatással rendelkezik. Sikerült igazolnunk a D3T hatására indukálódott ferritin gátló hatását simaizomsejteken az inorganikus foszfát és kalcitriol által kiváltott csontsejt irányú átalakulásban. A D3T a keresztesvirágúak rendjébe tartozó növényekben természetes módon is előforduló vegyület, azonban humán alkalmazásra eddig még nem törzskönyvezték, de számos tanulmányban igazolták már jótékony hatását.

Összefoglalva vizsgálatunk eredményeit kijelenthetjük, hogy a H-ferritin indukcióján keresztül a simaizomsejtek transzformációs folyamata csontsejtszerű sejtekké jelentős mértékben gátolható. Az eredmények a korábbi közléseknek és kutatócsoportunk

eredményeinek is további bizonyítékául szolgáltak. A parenteralisan adott vas nagy mennyiségben reaktív oxigén gyökök kialakulását idézheti elő így hatalmas az igény, olyan alternatív lehetőségek iránt, melyek a ferritin szintézis fokozásán keresztül képesek a vaszkuláris kalcifikációt gátolni. Állatkísérletek és további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a D3T megállja-e helyét és idővel preventív és/vagy terápiás lehetőségként számolhatunk-e majd vele.

A vérlemezke aktiváció vizsgálata kapcsán összességében sikerült jelentős változásokat detektálnunk az aktivációs markerek szintjében a két különböző kezelés típus között. A vérlemezke szám és a szolubilis P-szelektin értékeiben a kezeléseket alatt észlelt folyamatos emelkedés ellenére csak néhány esetben sikerült szignifikáns különbséget igazolni a kezelési modalitások egymással történő összehasonlítása során. A heterotipikus aggregátumok kialakulása a korábbi vizsgálataink során nyert adatokhoz képest is fokozott mértékben volt megfigyelhető, mely a kezeléseket során tovább emelkedett, különösen igaz volt ez a hemodialízis esetében. A monocita-vérlemezke aggregátumok esetében szignifikánsan magasabb szinteket találtunk HD esetén, mint HDF kezeléseket során. A neutrofil-vérlemezke aggregátumok szintjének változása is folyamatos emelkedést mutatott az idő függvényében, de sokkal kisebb szignifikancia szint mellett. Az endotél sejtek aktivációs markereinek, mint az E-szelektin és von Willebrand faktor, emelkedését csak a HD csoportban sikerült kimutatni és ott is csak a vWF esetén sikerült szignifikáns különbséget találni. Korábbi vizsgálatainkból származó és az irodalmi adatok felhasználásával sokkal komplexebb folyamatként tekinthetünk a krónikus vesebetegségben jelentkező hemosztázis eltérésekre, melyben egyszerre jelentkezhetnek vérzéses és trombotikus epizódok. E kettős eltéréseket épp a vérlemezkek speciális funkcióival tudjuk magyarázni. A krónikus vesebetegek vérlemezke funkcióit vizsgálva gyakran észlelhetünk eltéréseket, melynek hátterében az urémiás toxinok, a nitrogén oxidok megnövekedett termelése és az anaemia állhat, ugyanakkor a dializált betegek vérlemezkei a kezeléseket alatt folyamatosan aktivált állapotban vannak és a kezeléseket ismétlődése során alakul ki az úgynevezett „kimerült vérlemezke szindróma”. [75, 76] Még a legkorábbi vizsgálatok is leírták a vérlemezke-leukocita aggregátumok megjelenését a dialízis kezeléseket alatt, de inkább csak a primer vérlemezke aktivációhoz kötötték. [77] Már abban az időben is fontos biokompatibilitási markerként tekintettek az aggregációra. [78] Későbbi vizsgálatok igazolták a vérlemezkek becsapódását és részleges kötődését különösen a nagyobb vérlemezkek esetén az extrakorporális keringésben, és felmerült a szolubilis markerek, mint például a béta-thromboglobulin szerepe a vérlemezkek degranulációjának kimutatásában. [79] Schoorl és munkatársai által leközölt metodikai

megközelítés során a vérlemezkek degranulációját és ezáltal az aktivációs folyamatokat fény és elektronmikroszkóp alkalmazásával vizsgálták.[80] A dializáló membránok biokompatibilitása többek között a vérlemezkek számának monitorozásával egyszerűen vizsgálható és az utóbbi időben használatos nagy biokompatibilitású membránok esetén, mint a poliszulfon is már csak elenyésző mértékben észlelhető vérlemezke szám csökkenés.[81] A vizsgálatunk során a kiváló biokompatibilitás ellenére szignifikáns különbséget találtunk a vérlemezke szám csökkenésében mindkét kezelési mód kapcsán, bár drámaian nagy változást azért nem észleltünk.

A hemodialízis kezelés kapcsán nemcsak a vérlemezke aktiváció, hanem a leukociták aktivációja is megfigyelhető létrehozva ezzel a heterotipikus aggregátumokat. A krónikus vesebetegek esetén mindig számolnunk kell a szervezetükben folyamatosan jelen lévő kismértékű gyulladással. A gyulladással járó markerek szintjét többek között befolyásolják a fertőzések, számos kísérőbetegség és a dialízis kezelések, mint intermittáló stimulusok.[82] Az egyik legalapvetőbb gyulladási marker a C-reaktív protein esetében már régóta ismert, hogy képes a prokoaguláns faktorként viselkedni a monociták szöveti faktor expressziójának fokozásán keresztül.[83] Az aktiválódott vérlemezkek kötődése a monocitákhoz és neutrofilekhez a P-szelektin fehérjén keresztül valósul meg, de a kötés létrejöttéhez szükséges a P-szelektin glikoprotein ligand 1 (PSGL-1), mely citokinek hatására jelenik meg a sejtek felszínén.[84] Saját megfigyelésünk alapján az áramlási citométerrel végzett vizsgálatok a legérzékenyebbek a vérlemezke és/vagy leukocita aktiváció kimutatásában, ha a két kezelési modalitást kell egymással összehasonlítani. A jelentős emelkedés az arany-standardnak számító vérlemezke P-szelektin szintjében arra enged következtetni, hogy a nagyon magas heterotipikus aggregátumok aránya a mieloid vonal sejtjei és a vérlemezkek között leginkább elsődlegesen a vérlemezkek aktivációjából indul ki, ahogy ezt a korábbiakban is feltételezték.[85] Ezt a jelenséget gyakorlatilag a kezelés legelején, még a dializáló szerelék vérrel történő feltöltése alatt is észleltük és a fistula szúrásakor levett indulási adatokhoz képest is szignifikáns emelkedést mutatott az eltelt néhány perc alatt is. Mivel ilyen rövid idő alatt a visszaáramlás érdemben elhanyagolható, így a megfigyelt eredmények háttérben leginkább a fokozott turbulens áramlás állhat. Korábbi klinikai vizsgálataink alkalmával már sikerült igazolni emelkedett vérlemezke P-szelektin szinteket és monocita-vérlemezke aggregátum arányt obesez és diabeteses betegekben, továbbá koronária sztent implantáció során kontroll egyénekhez képest.[49, 50, 52] Mindamellet meg kell jegyeznünk, hogy ilyen mértékű emelkedést az aggregációban nem sikerült igazolni korábban még egyetlen beteg csoport kapcsán sem, mint a jelen tanulmányunkban HD és HDF kezelés esetén. Habár

korábbi vizsgálatok már utaltak az aggregátumok lehetséges szerepére a kóros vaszkuláris folyamatok patofiziológiájában, mint például a fokozódó artériás merevség, melynek pontos kórfolyamata még mindig magyarázatra vár.[86] Mindazonáltal a szolubilis faktorok szerepe feltételezhető a vérlemezke/leukocita aktiváció hátterében, mivel a kóros folyamatok propagálásában a vér áramlása folytán az egész szervezetre kifejthetik hatásukat valószínűleg a komplement rendszer aktiválásán keresztül.[87] Korábban már sikerült igazolni a HDF kezelés kíméletesebb hatását a bal kamra diasztolés funkcióját vizsgáló szív ultrahangos paraméterek esetén HD kezeléssel szemben.[88] A vérlemezke aktiváció markereiben bekövetkező változások megfigyelését tűztük ki célul összehasonlítva a különböző dialízis kezelési típusokat.

Jelen munkánkban külön figyelmet fordítottunk a hemodialízis és hemodiafiltrációs kezelések között észlelhető különbségekre a vérlemezke aktiváció direkt és indirekt markereit vizsgálva a lehetséges előnyösebb tulajdonságok vonatkozásában. A dialízis kezeléseket különböző effektív felületű dializátorok segítségével végeztük. A megfelelő felület kiválasztásánál többek között a betegek testtömegét, a szükséges hatékonysági mutatók elérését és az alkalmazott vér pumpa fordulatot vettük figyelembe. A vizsgálatba végül bevont 28 beteg döntő többségében, 24 esetben FX60-as, 3 betegnél FX600-as még 1 beteg esetében FX800-as dializátor használatával értük el a legmegfelelőbb paramétereket. Az alkalmazott dializátorok effektív felülete rendre 1,4-1,6-2 m<sup>2</sup> effektív értékkel bírt. Mivel a kezelési paraméterek sajátosságából adódóan a dializátorokon változást nem kívántuk változtatni, így az eltérő, és amúgy igen kis esetszám miatt érdemi statisztikai analízist nem tudtunk végezni az aktivációs markerek és a dializátor felszínének vonatkozásában.

Habár az egyik legutóbbi meta-analízis során hasonló szenzitivitás volt észlelhető a vaszkuláris eltérések kapcsán mind a szolubilis, mind a vérlemezke asszociált P-szelektin esetében, ugyanakkor a dialízis kezelés alatt együttesen vizsgálva e két markert már sokkal szembetűnőbb a különbség és bizonyíthatóan jóval magasabb a vérlemezke P-szelektin érzékenysége a szolubilis P-szelektinnel szemben.[47] Michelson által már korábban is javasolt módon a legérzékenyebb vérlemezke aktivációban használatos mérési módszer a monocita-vérlemezke konjugátum mennyiségének meghatározása, mivel a vérlemezkekből a P-szelektin képes a keringésbe kerülni.[89] A beteg csoportunkban megfigyelt adatokat figyelembe véve a vérlemezke-leukocita aggregátumok ugyancsak kiváló szenzitivitással rendelkeznek még a közel maximális értékek esetén is, melyeket gyakorlatilag csak in vitro kísérletek során tudtunk reprezentálni agonista stimulálást követően.

Szemben a vérlemezke aktivációs markerekkel a szolubilis endotél aktivációs marker E-szelektin esetében nem sikerült változást kimutatnunk a kezelések alatt. Az E-szelektin szintézise de novo az endotél sejteket ért stimulusok hatására tud emelkedni és ennek megfelelően mind az expresszió kialakulásához, mind a véráramba kerüléshez tekintélyes időre van szükség. Ellentétben az E-szelektinnel a von Willebrand faktor az endotél sejtek Weibel-Palade testecskéiben raktározódik és képes azonnal mobilizálódni, amint az endotél sejt aktivációja bekövetkezik. Valószínűleg ezzel magyarázható a dialízis kezelések alatt észlelt különbség a két fehérje szintjében és ez lehet az oka, hogy például a HD kezelés során miért emelkedhetett meg szignifikánsan a kezelés végére. Itt kell megjegyeznünk, hogy az endotél sejtek aktivációja során a Weibel-Palade testekből P-szelektin is felszabadul, azonban még ezt figyelembe véve sem sikerült, olyan érzékenységet elérnie, mint a sejtfelszíni markerek esetében. A vérlemezke aktiváció markereinek mérete igen fontos szempont esetleges a dializátoron keresztül történő eltávolítás miatt. Az E-szelektin 115 kDa, a P-szelektin 140 kDa és a von Willebrand faktor monomerje pedig 250 kDa molekulásúlyú. A monocita-vérlemezke konjugátum átmérője legalább 15  $\mu\text{m}$ . A gyári katalógus adatokat figyelembe véve az FX CorDiax dializátorok pórus mérete függetlenül az effektív felszíntől minden esetben megegyezik, kb. 10 kDa méretű. Ilyen pórus méret mellett az ún. Sieving koefficiens, ami megmutatja, hogy az adott molekula milyen arányban oszlik meg a féligáteresztő membrán két oldalán az alkalmazott dializátorok esetében albuminra vonatkoztatva kisebb, mint 0,001. Az albumin kb. 70 kDa molekulásúlyát meghaladó fehérjék esetén még ennél is kisebb az anyagok átjutásának lehetősége, tehát a kísérletek során észlelt elváltozások háttérben biztosan nem kell az esetlegesen kidializált mennyiségekkel számolnunk. A sejtes elemek számára pedig lehetetlen átjutni a dializátor kapillárisán.

Az előzőekben részletezett megfigyelések alapján tehát kijelenthetjük, hogy a HDF a HD kezeléshez képest sokkal kíméletesebb hatású, mely így kevésbé befolyásolja vaszkuláris rendszert. A háttérben álló folyamatokat a két dialízis kezelés típus alapvetően eltérő fizikai mechanizmusai magyarázhatják. Bár mindkét modalitás során ugyanazt a típusú dializátort használja, ugyanazzal a pórus mérettel, de amíg HD során a salak anyagok eltávolítása csak diffúzió útján valósul meg, addig HDF kezelések alatt konvektív transzport is zajlik. A konvektív transzport önmagában is képes kis és közepes méretű, kb. 5-40 kDa molekulásúlyú proteinek kiválasztását drámaian fokozni mindamelllett, hogy a kisebb molekulák esetén is nagyobb mértékű az eltávolítás, mint HD esetén. További vizsgálatok szükségesek majd annak eldöntésére, hogy a HDF esetén észlelt alacsonyabb aktiváció háttérét lehet-e

magyarázni a vérlemezke aktivációban résztvevő egyéb faktorok megnövekedett eliminációjával.

## 8 Összefoglalás

A krónikus vesebetegség legsúlyosabb stádiumában, amikor már végstádiumú veseelégtelenségről beszélhetünk, olyan mértékben csökken a salakanyagok kiválasztása és gyakran ezzel párhuzamosan a vizelet mennyisége is, hogy valamilyen formában már a kieső vesefunkciót pótolni szükséges. A vesepótló kezelésektől függetlenül is sajnos a betegeink fokozott kardiovaszkuláris rizikóval rendelkeznek. A megnövekedett rizikó háttérében már vannak jól ismert, kutatócsoportunk által is azonosított faktorok (pl.: inorganikus foszfát, vashiány, stb.), ill. irodalmi adatok alapján számos olyan tényező (pl.: D-vitamin és analóg vegyületei, kumarin származékok, stb.), melyek elősegítik a vaszkuláris kalcifikáció kialakulását, progresszióját. A vaszkuláris kalcifikáció speciális formájának számító Mönckeberg-féle mediasclerosis típusosan a krónikus vesebetegséghez társuló kórkép. Azonban a krónikus vesebetegség kialakulását előidéző, vagy „csak” a vesebetegséghez társultan jelentkező társbetegségek kapcsán gyakran az átlag populációban gyakori intimasclerosis is megfigyelhető betegeinknél. Ilyen esetekben a vaszkulátúra károsodása nagyságrendekkel gyorsabban zajlik.

A vaszkuláris betegségek etiológiájában ugyancsak fontos szereppel bír a vérlemezkék számában és/vagy funkciójában bekövetkező változás. Vizsgálatunkban sikerült igazolni, hogy a dialízis kezelés önmagában képes a vérlemezkék aktivációját fokozni, de az irodalomban is újnak számító eredményként sikerült bizonyítanunk a hemodiafiltrációs kezelés kedvezőbb hatását a vérlemezke aktiváció vonatkozásában.

Mindkét munkám során próbáltunk olyan területeket vizsgálni, melyek a végstádiumú veseelégtelen betegek fokozott kardiovaszkuláris rizikójának háttérében játszódó patofiziológiai folyamatok részletesebb megismerése révén segíthet a mindennapi gyakorlat számára is hasznos terápiás lehetőségek kidolgozásában.

## 9 Summary

Cardiovascular risk is elevated among chronic kidney disease patients and it is independent from the modality of renal replacement therapy. Cardiovascular risk is increasing in parallel with the progression of CKD.

There are many well-known pathophysiological factors in the background of increased CV risk, some of them are also confirmed by our research group (e.g. high inorganic phosphate, iron deficiency, etc.), while others can be found in the literature as inducers of vascular calcification (e.g. vitamin D and its analogues, coumarin derivatives, etc.).

We demonstrated an in vitro model for Mönckeberg's type mediasclerosis of vascular smooth muscle cells with activated vitamin D and beta-glycerophosphate. Induction of ferritin heavy chain expression and its ferroxidase activity inhibited successfully the process of calcification. Among the inducers we used iron and other alternatives.

The changes in platelet count and platelet function are also crucial in the aetiology of vascular diseases. We proved that platelet activation is increased in patients during the dialysis treatments. Our research group was the first to show that haemodiafiltration modality is more favourable in this respect.

The aim of both studies was to recognize complex pathophysiological processes resulting in an increased cardiovascular risk of patients with end-stage renal disease and find new potential therapeutic strategies for everyday use.

## **10 Tárgyszavak/Keywords**

*krónikus vesebetegség, végstádiumú veseelégtelenség, dialízis, vaszkuláris kalcifikáció, ferritin, ferroxidáz aktivitás, thrombocytá aktiváció, heterotípikus aggregátumok*

*chronic kidney disease, end-stage renal disease, dialysis, vascular calcification, ferritin, ferroxidase activity, platelet activation, heterotypic aggregates*

## 11 Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek és testvérének szeretnék köszönetet mondani, hogy lehetőségem volt ilyen kiváló színvonalú szakmai műhelyben dolgozni és megvalósítani a munkámat. Köszönöm mindkettőjük folyamatos támogatását és, hogy mindig töretlen lelkesedésükkel, kitartó és pozitív hozzáállásukkal a tudomány szeretetének átadására törekedtek. Megtanítottak a tudomány iránti alázatra. Magas szintű szakmai tudásukkal, emberséges hozzáállásukkal és barátságukkal példaképpül szolgálnak a későbbiekben is számomra.

Köszönetet mondok a Vaszkuláris Biológiai Laboratórium minden jelenlegi és korábbi dolgozójának. Külön köszönet dr. Oros Melindának, dr. Bányai Emesének, Zavaczki Erzsébetnek, Sikura Katalinnak és Barna Erikának a segítségükért.

Kollaborációban végzett kísérletekben nyújtott segítségéért köszönet illeti Prof. Dr. Kappelmayer Jánost és kutató csoportjának tagjait: Dr. Hudák Renátát, Fejes Zsoltot és Debreczeni Ildikót, akik hatalmas részt vállalva járultak ahhoz hozzá, hogy ez a munka megszülethessen.

Köszönöm a segítségét Dr. Jeney Viktóriának és Balogh Enikőnek.

Legvégül, de a legnagyobb szeretettel mondok köszönetet családomnak, akik szeretetteljes, nyugodt háttérrel biztosítottak számomra az elmélyült munkához. Hittek a munkám sikerében és bizakodásukkal erőt adtak.

A kutatások a Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával megvalósult TÁMOP-4.2.2, A-11/1/KONV-2012-0045, a BMC Korea Research Fund, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (OTKA) K112333 és T75199, a Magyar Nephrológiai Társaság valamint a Magyar Tudományos Akadémia (11003) támogatásával valósultak meg.

*Ezt a munkát nagy szeretettel ajánlom szüleimnek, testvéremnek, feleségemnek,  
Adriennek, és gyermekeimnek, Zsombornak és Csongornak!*

## 12 Irodalomjegyzék

1. **Coresh, J., E. Selvin, L.A. Stevens, et al.**, Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*, 2007. 298: p. 2038-47.
2. **Levey, A.S., P.E. de Jong, J. Coresh, et al.**, The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int*, 2011. 80: p. 17-28.
3. **Levin, A., B. Hemmelgarn, B. Culleton, et al.**, Guidelines for the management of chronic kidney disease. *CMAJ*, 2008. 179: p. 1154-62.
4. **Cockcroft, D.W.,M.H. Gault**, Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*, 1976. 16: p. 31-41.
5. **Levey, A.S., J.P. Bosch, J.B. Lewis, et al.**, A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*, 1999. 130: p. 461-70.
6. **Levey, A.S., L.A. Stevens, C.H. Schmid, et al.**, A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, 2009. 150: p. 604-12.
7. **Kerr, P.G.**, What are the causes of the ill effects of chronic hemodialysis? Is routine hemodialysis enough to improve patient well being? *Semin Dial*, 2014. 27: p. 18-21.
8. **Canaud, B., J.L. Bragg-Gresham, M.R. Marshall, et al.**, Mortality risk for patients receiving hemodiafiltration versus hemodialysis: European results from the DOPPS. *Kidney Int*, 2006. 69: p. 2087-93.
9. **Schmid, H.,H. Schiff**, Hemodiafiltration and survival of end-stage renal disease patients: the long journey goes on. *Int Urol Nephrol*, 2012. 44: p. 1435-40.
10. **Susantitaphong, P., M. Siribamrungwong,B.L. Jaber**, Convective therapies versus low-flux hemodialysis for chronic kidney failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nephrol Dial Transplant*, 2013. 28: p. 2859-74.
11. Oláh V. Anna, K.J., Nagy Judit, Mátyus János, *Ajánlás a számított GFR és az albuminuria, proteinuria vizsgálatára laboratóriumi szakemberek számára*, M.N. Társaság, Editor. 2012.
12. **Foley, R.N., P.S. Parfrey,M.J. Sarnak**, Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis*, 1998. 32: p. S112-9.
13. **Alani, H., A. Tamimi,N. Tamimi**, Cardiovascular co-morbidity in chronic kidney disease: Current knowledge and future research needs. *World J Nephrol*, 2014. 3: p. 156-68.
14. **Ardhanari, S., M.A. Alpert,K. Aggarwal**, Cardiovascular disease in chronic kidney disease: risk factors, pathogenesis, and prevention. *Adv Perit Dial*, 2014. 30: p. 40-53.
15. **Mizobuchi, M., D. Towler,E. Slatopolsky**, Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2009. 20: p. 1453-64.
16. **McCullough, P.A., V. Agrawal, E. Danielewicz,G.S. Abela**, Accelerated atherosclerotic calcification and Monckeberg's sclerosis: a continuum of advanced vascular pathology in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008. 3: p. 1585-98.
17. **Beadenkopf, W.G., A.S. Daoud,B.M. Love**, Calcification in the Coronary Arteries and Its Relationship to Arteriosclerosis and Myocardial Infarction. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 1964. 92: p. 865-71.
18. **Lomashvili, K.A., P. Garg, S. Narisawa, et al.**, Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int*, 2008. 73: p. 1024-30.

19. **Giachelli, C.M., Steits S., Jono S.,** Potential roles of bone matrix proteins in vascular calcification. *Clin Calcium*, 1999: p. 20-7.
20. **Giachelli, C.M.,** Inducers and inhibitors of biomineralization: lessons from pathological calcification. *Orthod Craniofac Res*, 2005. 8: p. 229-31.
21. **Giachelli, C.M., S. Jono, A. Shioi, et al.,** Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis*, 2001. 38: p. S34-7.
22. **Giachelli, C.M.,** Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol*, 2003. 14: p. S300-4.
23. **Jono, S., M.D. McKee, C.E. Murry, et al.,** Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*, 2000. 87: p. E10-7.
24. **Shioi, A., Y. Nishizawa, S. Jono, et al.,** Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. 15: p. 2003-9.
25. **Cardus, A., S. Panizo, E. Parisi, et al.,** Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res*, 2007. 22: p. 860-6.
26. **Henley, C., M. Colloton, R.C. Cattley, et al.,** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*, 2005. 20: p. 1370-7.
27. **Zarjou, A., V. Jeney, P. Arosio, et al.,** Ferritin prevents calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol*, 2009. 20: p. 1254-63.
28. **Cozzi, A., B. Corsi, S. Levi, et al.,** Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity. *J Biol Chem*, 2000. 275: p. 25122-9.
29. **Wittwer, I.,** Iron deficiency anaemia in chronic kidney disease. *J Ren Care*, 2013. 39: p. 182-8.
30. **Huang, M.L., C.J. Austin, M.A. Sari, et al.,** Heparin bound to alpha2-macroglobulin reduces ferroportin-1 expression and enhances its activity at reducing serum iron levels. *J Biol Chem*, 2013. 288: p. 25450-65.
31. **Arosio, P., S. Levi,** Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, 2002. 33: p. 457-63.
32. **Kensler, T.W., J.D. Groopman, T.R. Sutter, et al.,** Development of cancer chemopreventive agents: oltipraz as a paradigm. *Chem Res Toxicol*, 1999. 12: p. 113-26.
33. **Pietsch, E.C., J.Y. Chan, F.M. Torti, S.V. Torti,** Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *J Biol Chem*, 2003. 278: p. 2361-9.
34. **Pawlak, K., D. Pawlak, M. Mysliwiec,** Tissue factor and urokinase-type plasminogen activator system are related to the presence of cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Thromb Res*, 2007. 120: p. 871-6.
35. **Al-Saady, N.M., E.W. Leatham, S. Gupta, et al.,** Monocyte expression of tissue factor and adhesion molecules: the link with accelerated coronary artery disease in patients with chronic renal failure. *Heart*, 1999. 81: p. 134-40.
36. **Kappelmayer, J., A. Bernabei, L.H. Edmunds, Jr., et al.,** Tissue factor is expressed on monocytes during simulated extracorporeal circulation. *Circ Res*, 1993. 72: p. 1075-81.
37. **Kappelmayer, J., A. Bernabei, N. Gikakis, et al.,** Upregulation of Mac-1 surface expression on neutrophils during simulated extracorporeal circulation. *J Lab Clin Med*, 1993. 121: p. 118-26.

38. **Daugirdas, J.T., A.A. Bernardo**, Hemodialysis effect on platelet count and function and hemodialysis-associated thrombocytopenia. *Kidney Int*, 2012. 82: p. 147-57.
39. **Schoorl, M., M. Schoorl, M.J. Nube, P.C. Bartels**, Coagulation activation, depletion of platelet granules and endothelial integrity in case of uraemia and haemodialysis treatment. *BMC Nephrol*, 2013. 14: p. 72.
40. **Milburn, J.A., K. Cassar, I. Ford, et al.**, Prothrombotic changes in platelet, endothelial and coagulation function following hemodialysis. *Int J Artif Organs*, 2011. 34: p. 280-7.
41. **Gritters-van den Oever, M., M.P. Grooteman, P.C. Bartels, et al.**, Post-dilution haemodiafiltration and low-flux haemodialysis have dissimilar effects on platelets: a side study of CONTRAST. *Nephrol Dial Transplant*, 2009. 24: p. 3461-8.
42. **Ohta, S., Y. Imaizumi, Y. Okada, et al.**, Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 2011. 6: p. e16182.
43. **Villa-Bellosta, R., V. Sorribas**, Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29: p. 761-6.
44. **Luo, G., P. Ducy, M.D. McKee, et al.**, Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 1997. 386: p. 78-81.
45. **Dhonukshe-Rutten, R.A., S.M. Pluijm, L.C. de Groot, et al.**, Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res*, 2005. 20: p. 921-9.
46. **Balla, G., H.S. Jacob, J. Balla, et al.**, Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*, 1992. 267: p. 18148-53.
47. **Kappelmayer, J., B. Nagy, Jr., K. Miszti-Blasius, et al.**, The emerging value of P-selectin as a disease marker. *Clin Chem Lab Med*, 2004. 42: p. 475-86.
48. **Zavaczki, E., V. Jeney, A. Agarwal, et al.**, Hydrogen sulfide inhibits the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*, 2011. 80: p. 731-9.
49. **Csongradi, E., B. Nagy, Jr., T. Fulop, et al.**, Increased levels of platelet activation markers are positively associated with carotid wall thickness and other atherosclerotic risk factors in obese patients. *Thromb Haemost*, 2011. 106: p. 683-92.
50. **Kaplar, M., J. Kappelmayer, A. Veszpremi, et al.**, The possible association of in vivo leukocyte-platelet heterophilic aggregate formation and the development of diabetic angiopathy. *Platelets*, 2001. 12: p. 419-22.
51. **Broxmeyer, H.E., S. Cooper, S. Levi, P. Arosio**, Mutated recombinant human heavy-chain ferritins and myelosuppression in vitro and in vivo: a link between ferritin ferroxidase activity and biological function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88: p. 770-4.
52. **Nagy, B., Jr., T. Szuk, I.B. Debreceni, J. Kappelmayer**, Platelet-derived microparticle levels are significantly elevated in patients treated by elective stenting compared to subjects with diagnostic catheterization alone. *Platelets*, 2010. 21: p. 147-51.
53. **Arellano-Rodrigo, E., A. Alvarez-Larran, J.C. Reverter, et al.**, Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica*, 2006. 91: p. 169-75.
54. **El-Abbadi, M.M., A.S. Pai, E.M. Leaf, et al.**, Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney Int*, 2009. 75: p. 1297-1307.

55. **Lau, W.L., E.M. Leaf, M.C. Hu, et al.**, Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. *Kidney Int*, 2012. 82: p. 1261-70.
56. **Cai, Q., V.K. Mukku, M. Ahmad**, Coronary artery disease in patients with chronic kidney disease: a clinical update. *Curr Cardiol Rev*, 2013. 9: p. 331-9.
57. **Said, S., G.T. Hernandez**, The link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *J Nephropathol*, 2014. 3: p. 99-104.
58. **Kumar, S., R. Bogle, D. Banerjee**, Why do young people with chronic kidney disease die early? *World J Nephrol*, 2014. 3: p. 143-55.
59. **Block, G.A.**, Prevalence and clinical consequences of elevated Ca x P product in hemodialysis patients. *Clin Nephrol*, 2000. 54: p. 318-24.
60. **Milliner, D.S., A.R. Zinsmeister, E. Lieberman, B. Landing**, Soft tissue calcification in pediatric patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*, 1990. 38: p. 931-6.
61. **Moradi, H., D.A. Sica, K. Kalantar-Zadeh**, Cardiovascular burden associated with uremic toxins in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol*, 2013. 38: p. 136-48.
62. **Burke, S.K.**, Phosphate is a uremic toxin. *J Ren Nutr*, 2008. 18: p. 27-32.
63. **Shroff, R., D.A. Long, C. Shanahan**, Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol*, 2013. 24: p. 179-89.
64. **Ueno, Y., T. Shinki, Y. Nagai, et al.**, In vivo administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses the expression of RANKL mRNA in bone of thyroparathyroidectomized rats constantly infused with PTH. *J Cell Biochem*, 2003. 90: p. 267-77.
65. **Arosio, P., R. Ingrassia, P. Cavadini**, Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1790: p. 589-99.
66. **Finazzi, D., P. Arosio**, Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration. *Arch Toxicol*, 2014. 88: p. 1787-802.
67. **Alkhateeb, A.A., J.R. Connor**, Nuclear ferritin: A new role for ferritin in cell biology. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1800: p. 793-7.
68. **Coffman, L.G., D. Parsonage, R. D'Agostino, Jr., et al.**, Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106: p. 570-5.
69. **Zarjou, A., S. Bolisetty, R. Joseph, et al.**, Proximal tubule H-ferritin mediates iron trafficking in acute kidney injury. *J Clin Invest*, 2013. 123: p. 4423-34.
70. **Zarjou, A., V. Jeney, P. Arosio, et al.**, Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis. *J Bone Miner Res*, 2010. 25: p. 164-72.
71. **Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, et al.**, Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 1997. 89: p. 755-64.
72. **Eschbach, J.W., J.W. Adamson**, Anemia of end-stage renal disease (ESRD). *Kidney Int*, 1985. 28: p. 1-5.
73. **Nemeth, E., M.S. Tuttle, J. Powelson, et al.**, Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 2004. 306: p. 2090-3.
74. **Singh, B., S. Arora, P. Agrawal, S.K. Gupta**, Heparin: a novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin Chim Acta*, 2011. 412: p. 823-30.
75. **van Bladel, E.R., R.L. de Jager, D. Walter, et al.**, Platelets of patients with chronic kidney disease demonstrate deficient platelet reactivity in vitro. *BMC Nephrol*, 2012. 13: p. 127.

76. **Schoorl, M., M.P. Grooteman, P.C. Bartels, M.J. Nube,** Aspects of platelet disturbances in haemodialysis patients. *Clin Kidney J*, 2013. 6: p. 266-271.
77. **Gawaz, M.P., S.K. Mujais, B. Schmidt, H.J. Gurland,** Platelet-leukocyte aggregation during hemodialysis. *Kidney Int*, 1994. 46: p. 489-95.
78. **Gawaz, M.P., S.K. Mujais, B. Schmidt, et al.,** Platelet-leukocyte aggregates during hemodialysis: effect of membrane type. *Artif Organs*, 1999. 23: p. 29-36.
79. **Gritters-van den Oever, M., M. Schoorl, M. Schoorl, et al.,** The role of the extracorporeal circuit in the trapping and degranulation of platelets. *Blood Purif*, 2009. 28: p. 253-9.
80. **Schoorl, M., P.C. Bartels, M. Gritters, et al.,** Electron microscopic observation in case of platelet activation in a chronic haemodialysis subject. *Hematol Rep*, 2011. 3: p. e15.
81. **Nasr, R., C. Saifan, I. Barakat, et al.,** Relationship between platelet count and hemodialysis membranes. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 2013. 6: p. 143-7.
82. **Meuwese, C.L., P. Stenvinkel, F.W. Dekker, J.J. Carrero,** Monitoring of inflammation in patients on dialysis: forewarned is forearmed. *Nat Rev Nephrol*, 2011. 7: p. 166-76.
83. **Cermak, J., N.S. Key, R.R. Bach, et al.,** C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood*, 1993. 82: p. 513-20.
84. **Nagata, K., T. Tsuji, K. Matsushima, et al.,** Redistribution of selectin counterligands induced by cytokines. *Int Immunol*, 2000. 12: p. 487-92.
85. **Gremmel, T., R. Koppensteiner, A. Kaider, et al.,** Impact of variables of the P-selectin - P-selectin glycoprotein ligand-1 axis on leukocyte-platelet interactions in cardiovascular disease. *Thromb Haemost*, 2015. 113: p. 806-12.
86. **Kobayashi, S., M. Miyamoto, H. Kurumatani, et al.,** Increased leukocyte aggregates are associated with atherosclerosis in patients with hemodialysis. *Hemodial Int*, 2009. 13: p. 286-92.
87. **Itoh, S., K. Takeshita, C. Susuki, et al.,** Redistribution of P-selectin ligands on neutrophil cell membranes and the formation of platelet-neutrophil complex induced by hemodialysis membranes. *Biomaterials*, 2008. 29: p. 3084-90.
88. **Czifra, A., A. Pall, J. Kulcsar, et al.,** Hemodialysis and hemodiafiltration differently modulate left ventricular diastolic function. *BMC Nephrol*, 2013. 14: p. 76.
89. **Michelson, A.D., M.R. Barnard, H.B. Hechtman, et al.,** In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93: p. 11877-82.

## 13 Publikációs lista



**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/287/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Becs Gergely  
Neptun kód: KCV2DF  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Becs, G.**, Hudák, R., Fejes, Z., Bekéné Debreceni, I., Bhattoa, H. P., Balla, J., Kappelmayer, J.:  
Haemodiafiltration elicits less platelet activation compared to haemodialysis.  
*BMC Nephrol.* 17 (1), 147, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12882-016-0364-x>  
IF: 2.289
2. **Becs, G.**, Zarjou, A., Agarwal, A., Sikura, K. É., Becs, Á., Nyitrai, M., Balogh, E., Bányai, E.,  
Eaton, J. W., Arosio, P., Poli, M., Jeney, V., Balla, J., Balla, G.: Pharmacological induction of  
ferritin prevents osteoblastic transformation of smooth muscle cells.  
*J. Cell. Mol. Med.* 20 (2), 217-230, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12682>  
IF: 4.499





**További közlemények**

3. Páll, A., Sebestyén, V., Czifra, Á., **Becs, G.**, Anupam, A., Zarjou, A., Paragh, G., Lőrincz, I., Balla, J., Szabó, Z.: The disparate effect of hemodialysis and hemodiafiltration on T-wave-peak-to-end interval (Tpe) and Tpe/QT ratio of the surface electrocardiogram.  
*Trauma Emerg. Care.* 2 (4), 1-6, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.15761/TEC.1000142>
4. Páll, A., Czifra, Á., Sebestyén, V., **Becs, G.**, Kun, C., Balla, J., Paragh, G., Lőrincz, I., Páll, D., Padra, J. T., Agarwal, A., Zarjou, A., Szabó, Z.: Hemodiafiltration and hemodialysis differently affect P wave duration and dispersion on the surface electrocardiogram.  
*Int. Urol. Nephrol.* 48 (2), 271-277, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11255-015-1144-4>  
IF: 1.564
5. Góz, L., Körtvélyesiné Bari, K., **Becs, G.**, P. Szabó, R., Balla, J., Kárpáti, I., Mátyus, J., Újhelyi, L., Ben, T.: A nonresponder betegek HBV vakcinációjának gyakorlata centrumunkban.  
*Nővér.* 28 (6), 29-33, 2015.
6. Páll, A., **Becs, G.**, Erdei, A., Sira, L., Czifra, Á., Barna, S., Kovács, P., Páll, D., Pfliegler, G., Paragh, G., Szabó, Z.: Pseudopheochromocytoma induced by anxiolytic withdrawal.  
*Eur. J. Med. Res.* 19 (1), 2014.  
IF: 1.495
7. Potor, L., Bányai, E., **Becs, G.**, Soares, M. P., Balla, G., Balla, J., Jeney, V.: Atherogenesis May Involve the Prooxidant and Proinflammatory Effects of Ferryl Hemoglobin.  
*Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, [1-13], 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/676425>  
IF: 3.363

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,21**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
6,788**

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, 2018.08.28.



## 14 Függelék

A vaszkuláris kalcifikáció vizsgálata során az immun fluoreszcens festéseket Dr. Bányai Emese végezte, a kalcium depozíció kvantifikálását, az Alizarin Red festést és az oszteokalcin mérést Sikura Katalinnal közösen végeztük.

A thrombocyta funkció vizsgálata során a betegek beválogatását és a minták levételét követően a minták előkészítése és a mérések Prof. Dr. Kappelmayer János laboratóriumában történtek Bekéné Debreceni Ildikó, Dr. Hudák Renáta és Dr. Fejes Zsolt közreműködésével. A statisztikai vizsgálatokat az SPSS program segítségével Dr. Bhattoa Harjit Pal végezte.

Segítségüket ismételtelen köszönöm!